



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

REAPROVEITAMENTO DE GLICEROL PARA PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS:  
BIOPOLÍMEROS

**THAÍSSA RODRIGUES ARAÚJO**

UBERLÂNDIA – MG  
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**REAPROVEITAMENTO DE GLICEROL PARA PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS:  
BIOPOLÍMERO**

Thaíssa Rodrigues Araújo

Orientadora:

Dra. Patrícia Angélica Vieira

Coorientador:

Dr. Ubirajara Coutinho Filho

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

**UBERLÂNDIA – MG  
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

A659r Araújo, Thaíssa Rodrigues, 1986-  
2014 Reaproveitamento de glicerol para produção de bioprodutos:  
biopolímeros / Thaíssa Rodrigues Araújo. - 2014.  
81 f. : il.

Orientadora: Patrícia Angélica Vieira.  
Coorientador: Ubirajara Coutinho Filho.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
Inclui bibliografia.

1. Engenharia Química - Teses. 2. Glicerina - Teses. 3. Biopolímeros - Teses. 4. Fermentação - Teses. I. Vieira, Patrícia Angélica. II. Coutinho Filho, Ubirajara. III. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

---

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE THAÍSSA RODRIGUES ARAÚJO  
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE  
DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
ENGENHARIA QUÍMICA, EM 22/07/2014.

BANCA EXAMINADORA:

Patrícia Angélica Vieira

Profa. Dra. Patrícia Angélica Vieira

(Orientadora - PPG-EQ/UFU)

Ubirajara Coutinho Filho

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho

(Coorientador - PPG-EQ/UFU)

Vicelma Luís Cardoso

Profa. Dra. Vicelma Luís Cardoso

(PPG-EQ/UFU)

Miriam de Resende

Miriam Maria de Resende

(PPG-EQ/UFU)

Gorete Ribeiro de Macedo

Gorete Ribeiro de Macedo

(PPG-EQ-NT/UFRN)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos Professores Patrícia, Ubirajara e Vicelma pela orientação deste trabalho.

Aos meus pais, pelo amor incondicional.

Meus irmãos Thalita, Thainara, Beatriz e João Pedro, por fazerem minha vida mais feliz.

À minha vó querida e amada, não tenho palavras pra dizer o quanto é importante em minha vida, peço a Deus que lhe dê saúde para que possamos desfrutar da sua companhia ainda por muitos anos.

À minha amiga Tais, por me ajudar sempre, sem ela tudo seria mais difícil.

Agradeço a Janaína, por ser sempre tão amável, me ajudando todas as vezes que precisei.

As minhas amigas de infância, Lígia, Luana, Lívia e Marília, pelos mais de 20 anos de amizade.

À FAPEMIG pela bolsa concedida durante a realização do curso.

Aos membros da Banca Examinadora, pela contribuição nas correções e sugestões, que permitiram o aprimoramento deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	11
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
1 - INTRODUÇÃO .....	14
2 - OBJETIVOS .....	16
2.1 - Objetivo geral .....	16
2.2 - Objetivos específicos.....	16
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 - Biodiesel .....	17
2.2 – Glicerol .....	19
2.2.1- Histórico e Características .....	20
2.2.2- Produção de Glicerol.....	21
2.2.3- Aplicações do Glicerol.....	24
2.3 - Produção de Biopolímeros .....	28
2.3.1- Características dos Biopolímeros.....	29
2.3.2- Micro-organismos Produtores de Biopolímeros .....	30
2.3 - Processos de Fermentação .....	32
2.3.1 - Parâmetros Importantes para Produção de Biopolímeros .....	33
2.3.1 - Processos de Fermentação para Produção de Biopolímeros.....	35
2.4 - Técnicas de Caracterização de Biopolímeros .....	36
4 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
4.1– Micro-organismos .....	39
4.2– Fonte de Carbono.....	39
4.3– Meio de Cultivo e Manutenção em Meio Czapeck (Condições Iniciais) .....	39
4.4 – Meio de Cultura .....	39

4.5– Testes Preliminares: Produção de Goma em Erlenmeyers .....	40
4.5.1- Seleção das Linhagens .....	40
4.5.2 - Ensaios Preliminares Visando a Otimização das Variáveis Relacionadas a Produção de Biopolímero.....	40
4.6 - Produção de Goma em Fermentador .....	42
4.7 – Determinação do Coeficiente de Transferência de Oxigênio (K <sub>la</sub> ) .....	43
4.8 – Recuperação e Purificação da Goma .....	43
4.9 – Análises Quantitativa .....	44
4.9.1 - Determinação da Quantidade de Glicerol Consumido.....	45
4.9.2 – Determinação da Biomassa por de Massa Seca .....	46
4.9.3 - Avaliação do Comportamento Reológico da Goma Formada no Biorreator	46
4.9.4 – Espectroscopia na Região do Infravermelho da Goma Produzida no Biorreator .....	46
4.9.5 – Composição Química do biopolímero.....	47
4.9.5.1- Determinação dos Monossacarídeos Neutros .....	47
4.9.5.2- Determinação do Teor de Monossacarídeos Ácidos (Ácidos Urônicos) ...	48
5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	49
5.1- Testes Preliminares.....	49
5.1.1- Seleção da Linhagem Produtora de Biopolímero .....	49
5.1.2- Ensaios Preliminares para Estudo das Variáveis Relacionadas a Produção de Biopolímero.....	50
5.1.2.1- Ensaios para Determinação da Concentração Inicial de Glicerol no Meio Fermentativo.....	50
5.1.2.2- Ensaio para Determinação do Tempo de Fermentação.....	51
5.1.2.3 - Ensaio para Determinação do Tempo de Cultivo do Inóculo em Meio Czapeck .....	53
5.1.2.4- Ensaios com Aeração .....	54
5.1.2.5- Avaliação da Reposição de Meio Durante o Processo de Produção da Goma e Avaliação da Agitação .....	55

5.1.2.6- Avaliação das Vazões de Aeração .....	56
5.1.2.7- Reavaliação da Concentração de Glicerol .....	57
5.1.2.8- Avaliação Da Influência da Aeração na Fase de Crescimento Celular e Fase de Produção de Goma .....	58
5.1.2.9- Perfil Cinético do Biopolímero Formado em Erlenmeyer .....	59
5.1.2.10- Determinação do Efeito da Adição de Extrato de Levedura Sobre a Produção de Goma .....	60
5.1.2.11- Avaliação da Produção de Goma sem Glicerol .....	62
5.3- Produção de Goma em Fermentador.....	63
5.3.1- Comportamento Reológico do Biopolímero Produzido em Condições Estudadas em Erlenmeyer .....	65
5.3.2- Comportamento Reológico da Goma Produzida no Biorreator à 76 Horas..	66
5.3.3- Espectroscopia na Região de Infravermelho da Goma Produzida e Goma Xanthana Comercial .....	67
5.3.4- Caracterização Química do Biopolímero.....	69
6 – CONCLUSÕES .....	70
7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	71
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1 - Representação da fórmula estrutura do Glicerol.....	19
Figura 2. 2 - Fluxograma do processo de produção de biodiesel e glicerol. ....	22
Figura 2. 3 - Mercado do glicerol (volumes e usos industriais). ....	23
Figura 2. 4 - Vias metabólicas de assimilação de glicerol por micro-organismos e seus possíveis produtos. ....	26
Figura 2. 5 6 - Estrutura do polissacarídeo extracelular formado pela <i>Xanthomonas campestris</i> . ....	31
Figura 4. 1- Foto do fermentador Biostat-B utilizado para realizar os ensaios. ....	42
Figura 4. 2 – Goma após precipitação. ....	44
Figura 4. 3 – Esquema do procedimento analítico percorrido pelas amostras após fermentação. ....	45
Figura 5. 1 - Goma produzida pelo <i>Mucor racemosus Fresenius</i> . ....	50
Figura 5. 2 - Gráfico da quantidade de goma formada (■) e do consumo de glicerol (♦), para diferentes concentrações do substrato glicerol (25, 50, 100 e 125 g/L). ....	51
Figura 5. 3 - Gráfico do efeito do tempo de fermentação na quantidade de goma formada (■) e consumo de glicerol (♦).....	52
Figura 5. 4 – Foto do micro-organismo com idade de 24 (a), 48 (b), 72 (c), 96 (d), 120 (e) e 144 horas (f). ....	53
Figura 5. 5 - Gráfico do efeito do tempo de preparo do inóculo na quantidade de goma formada (■) e consumo de glicerol (♦).....	54
Figura 5. 6 - Efeito da vazão de ar na quantidade de goma formada (■) e consumo de glicerol (♦).....	57
Figura 5. 7 - Quantidade de goma (■) e consumo de substrato (♦) formada para diferentes concentrações de glicerol (25, 50, 100 e 125 g/L), com 4 vvm.....	58
Figura 5. 8 - Perfil Cinético da quantidade de biopolímero, quantidade de goma formada (●), consumo de glicerol (♦) e crescimento celular (○).....	60

Figura 5. 9 Gráfico do efeito da quantidade de extrato de levedura para formação do biopolímero, quantidade de goma formada (■) e consumo de glicerol (◆).....	61
Figura 5. 10 – Efeito do extrato de levedura como fonte de carbono para a formação da goma. ....	62
Figura 5. 11 - Perfil Cinético da produção do biopolímero formado no Biorreator, quantidade de goma formada (●), consumo de glicerol (◆) e crescimento celular (○). .	63
Figura 5. 12 - Foto da goma à 74 horas. ....	64
Figura 5. 13 – Foto da goma à 76 horas. ....	
Figura 5. 14 – Variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento de soluções aquosas do biopolímero nas concentrações 0,5; 0,75 e 1%, à 25 °C.....	66
Figura 5. 15 – Variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para a goma formada à 76 horas de fermentação no biorreator (solução a 0,75% ). ....	67
Figura 5. 16 – Comparação por Espectrometria de Infravermelho da goma Xanthana comercial e da goma produzida no Biorreator (Absorbância).....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1 - Propriedades físico-químicas do glicerol a 20 °C (ADILSON <i>et al.</i> , 2011).	20
Tabela 2. 2 - Usos do glicerol nos principais mercados mundiais .....	24
Tabela 2. 3 - Gomas microbianas e suas aplicações industriais .....	30
Tabela 5. 1 – Resultados de quantidade de goma formada pelos micro-organismos....	49
Tabela 5. 2 - Resultados obtidos das fermentações em 48 e 96 horas nas condições com aeração, com e sem reposição de meio fermentativo, <u>com agitação</u> . ....	55
Tabela 5. 3 - Resultados obtidos das fermentações em 48, 96 e 144 horas realizadas com aeração, com e sem reposição de meio fermentativo, <u>sem agitação</u> .....	56
Tabela 5. 4 - Valores obtidos da fermentação com 24 horas sem aeração e com 72 horas de aeração. ....	59
Tabela 5. 5 – Composição monossacarídica da goma formada.....	69

## RESUMO

Este trabalho utilizou glicerol como fonte de carbono na obtenção de biopolímero a partir de fermentação com fungos do cerrado. Foram utilizados quatro diferentes micro-organismos com o objetivo de converter glicerol em biopolímeros. Os micro-organismos testados foram: *Mucor racemosus Fresenius*, *Monilia sitophila*, *Fusarium sp*, e *Acremonium sp*. Para cada microrganismo realizou-se ensaios exploratórios, afim de selecionar cepas capazes de converter glicerol no bioproduto de interesse. No primeiro teste exploratório, com 168 horas de fermentação, o micro-organismo *Mucor racemosus Fresenius*, apresentou formação de 1 g/L de biopolímero. As variáveis avaliadas nos ensaios posteriores (em erlenmyer) foram em sequência cronológica: concentração inicial de glicerol; tempo de fermentação; tempo de cultivo do inóculo em meio Czaapeck; ensaios com aeração contínua; avaliação da reposição de meio durante a fermentação; avaliação da vazão de ar; avaliação da influência da aeração aplicada em duas fases no crescimento celular e na produção do biopolímero; avaliação do efeito da adição de extrato de levedura sobre a produção de goma e avaliação da produção de goma sem adição do glicerol. Dentre as condições estudadas identificou-se como mais promissoras: concentração inicial de glicerol de 50 g/L, 2 g/L de extrato de levedura, com tempo de fermentação de 96 horas e com agitação de 100 rpm, 120 horas de idade de cultivo do inóculo, sistema com aeração empregando vazão de ar de 4 vvm na fase de produção (72 horas após as 24 h sem aeração), sem reposição de meio de cultivo. Nestas condições houve uma produção máxima de 14,21 g/L de goma formada e 67,7% consumo de glicerol. Após estes ensaios foi realizado o ensaio cinético em fermentador Biostat B de capacidade de 2L, com volume útil de 1L, para avaliar o desempenho do fungo na produção do biopolímero nas melhores condições estabelecidas de processo. Nesta etapa foi gerada uma produção de 23 g/L de goma e consumo de glicerol de 75%. A análise do espectro de infravermelho da goma produzida comparada a goma xantana mostrou, que as gomas possuem natureza de carboidrato.

**Palavras-Chave:** glicerol, biopolímero, fungos, fermentação, aeração.

## ABSTRACT

The present work used glycerol as a carbon source to obtain bio-based products from fermentation with fungi. It was used four different microorganisms in order to convert glycerol into biopolymers and biosurfactants. The microorganisms tested were: *Mucor racemosus Fresenius*, *Monilia sitophila*, *Fusarium sp* and *Acremonium sp*. For each microorganism exploratory tests were held in order to select strains capable of converting glycerol in bio-based products of interest. In the first exploratory test of 168 hours fermentation, the microorganism *Mucor racemosus Fresenius* showed the formation of 1 g/L biopolímero. As variables evaluated in subsequent tests (in Erlenmyer) are in chronological order: the concentration of glycerol; fermentation time; cultivation time of inoculum amid Czaapeck; trials with continuous aeration; review the replacement of the medium during fermentation; review of the flow rate; evaluate the influence of aeration applied in two stages in cell growth and production of the biopolymer; assessing the effect of adding yeast extract on gum production and evaluation of gum production without addition of glycerol. These assays have promoted the following results: glycerol concentration of 50 g/L 2 g/L yeast extract with fermentation time of 96 hours with agitation of 100 rpm and 120 hours of culture age of the inoculum, aeration system using flow rate of 4 vvm in the production phase (72 hours after the 24 h without aeration) without replacement of culture medium. Under these conditions there was a maximum yield of 14.21 g/L and 67.7% gum formed consumption glicerol. After these tests the kinetic assay was performed in Biostat B fermenter with a capacity of 2L, with a working volume of 1L to evaluate the performance of the fungi in the production of biopolymer in the best conditions established process. In this step has been generated an output of 23 g/L of starch and glycerol consumption of 75%. The analysis of the infrared spectrum of the biopolymer produced compared to xanthana gum showed that biopolymers have carbohydrate nature.

**Keywords:** glycerol, biopolymer, fungi, fermentation, aeration.

## 1 - INTRODUÇÃO

O governo brasileiro estabeleceu a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao combustível de petróleo pela lei 11097/2005, determinando que a partir de 2013, a quantidade de biodiesel adicionado deveria alcançar 5 % do volume total de diesel utilizado, o que representa um aumento significativo na produção de biodiesel (ANP, 2014). Esta decisão do governo brasileiro vem gerando um aumento da produção de biodiesel no Brasil e consequentemente um excedente de glicerol produzido.

No processo de produção de biodiesel, o glicerol constitui o maior subproduto gerado via transesterificação de ácidos graxos vegetais ou gordura animal com álcool, metanol ou etanol, para produzir ésteres e glicerol na presença de catalisador (hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio) (DIECKELMANN e HEINZ, 1988).

Uma rota para o aproveitamento da glicerina loira (glicerol bruto) é o refino visando à obtenção de glicerina pura que é destinado para vários ramos da indústria sendo: tintas, cosméticos, automotiva, alimentícia, farmacêutica, indústrias de papel e celulose, couro e têxtil (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011).

De forma que toda a cadeia de produção do biodiesel seja sustentável e economicamente viável, tornando-se competitivo no mercado de biocombustíveis é necessário pesquisar e desenvolver alternativas de utilização do excedente de glicerol bruto produzido na tentativa de reaproveitamento direto deste resíduo, sem tratamento. Uma vez que, os tratamentos de purificação (filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons) para remoção principalmente de catalisadores ( $K^+$  e  $Na^+$ ) são de alto custo, limitando o tratamento por pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel que não tem recursos para realizar este tipo de processo. Como resultado desta falta de estrutura maiores quantidades de efluentes contendo glicerol poderão ser descartadas no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando consequentemente os problemas e riscos ambientais (RIVALDI *et al.*, 2007).

O grande volume de glicerol gerado na produção de biodiesel inviabiliza o seu descarte, devido aos danos que este pode ocasionar ao meio ambiente. Com o intuito de evitar futuros problemas derivados da acumulação desse resíduo e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessário a busca de alternativas para o uso do glicerol.

Vários micro-organismos são capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono. Por isso, um dos destinos possíveis para o glicerol bruto resultante da indústria

do biodiesel é seu uso na composição de meios de cultura para crescimento de micro-organismos em processos biotecnológicos que levem à produção de moléculas de interesse econômico, como por exemplo: etanol, ácido succínico, ácido propiônico, ácido cítrico, pigmentos, biosurfactante, biopolímeros, etc. (SILVA *et al.*, 2006).

A utilização do glicerol como fonte de carbono, para produção de compostos químicos de interesse comercial, além de diminuir os possíveis impactos ambientais e melhorar a economia do setor de biodiesel, torna-se vantajoso pelo baixo custo deste substrato em relação a outros tradicionalmente utilizados como fonte de carbono para obtenção de bioproductos, como por exemplo, o melaço de cana de açúcar (RIVALDI, 2007).

Como os biopolímeros são bastante utilizados como matéria prima para fabricação de diferentes produtos, a sua produção tem sido objeto de intensa pesquisa. Os biopolímeros produzidos são polissacarídeos de origem microbiana, também conhecidos como exopolissacarídeos (EPSs) microbianos, sintetizados por bactérias, fungos e/ou leveduras (BARRETO, 2011).

Na produção de biopolímeros há um grande interesse nas gomas, que são de grande uso pelas indústrias de alimentos, farmacêuticas e petroquímicas. As gomas ou biopolímeros possuem a propriedade de formar soluções viscosas em meio aquoso ou géis (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Um grande número de bactérias conhecidas produz quantidades abundantes de biopolímeros, podendo ser citadas às fitopatogências como *Xanthomonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Pectobacterium sp.* e bactérias fixadoras de nitrogênio *Rhizobium sp.*, *Beijerinckia sp.* e *Azotobacter sp.* (VERMANI *et al.* 1995). Destas, os biopolímeros de *Xanthomonas campestris* (*xantana*), *Sphingomonas paucimobilis* e *Pseudomonas elodea* (*gelana*), *Acetobacter xylinum* (celulose) e *Rhizobium sp.* (succinoglucana) estão sendo comercializados (SUTHERLAND, 2001).

O estudo da produção de polissacarídeos fúngicos tem despertado interesse devido a suas propriedades reológicas e físico-químicas. Estes são biomateriais que têm encontrado amplo campo de aplicações, incluindo o uso em terapia farmacêutica devido a suas atividades biológicas como ação anti-tumoral, antiviral e antiinflamatória. Sendo assim apresentam-se como uma alternativa às gomas tradicionais (SARANGI *et al.*, 2006).

Neste contexto, esta pesquisa aparece no cenário científico buscando linhagens fungicas e condições de processo que proporcionem produções de biopolímeros,

empregando glicerol como fonte alternativa de carbono de menor custo para produção de biopolímero. Além disso, como reflexo desta utilização há a diminuição dos possíveis impactos ambientais que este resíduo poderia promover no meio ambiente.

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral utilizar o glicerol como fonte alternativa de carbono para a produção de biopolímero, buscando linhagens fungicas capazes de produzir este bioproduto e melhores condições operacionais para proporcionar maior produção.

### 2.2 - Objetivos específicos

- Selecionar dentre 4 fungos do cerrado o que apresenta maior capacidade de consumir glicerol para a produção de biopolímeros;
- Estudar as variáveis de processo visando aumento da produção de goma, empregando o fungo com maior capacidade de produção, sendo elas: concentração inicial de glicerol, tempo de fermentação, tempo de cultivo do inóculo em meio *Czapeck*, efeito da aeração, níveis de aeração e concentração de extrato de levedura. Avaliar o efeito destes parâmetros na resposta consumo de glicerol e formação de biopolímero;
- Estudar a cinética de fermentação em biorreator verificando: o consumo de glicerol, crescimento celular e quantidade de produto formado nas fermentações empregando o micro-organismo selecionado nas melhores condições avaliadas;
- Caracterizar a goma formada realizando as análises de comportamento reológico do biopolímero e de espectroscopia na região de infravermelho.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo busca-se fornecer embasamento teórico sobre o tema em estudo. Inicialmente fala-se um pouco sobre o biodiesel, justificando a escolha do glicerol como fonte de carbono e posteriormente, cita-se as características de produção do glicerol, e suas aplicações. Após, são apresentados noções de biopolímeros, os micro-organismos produtores de biopolímeros, processos e parâmetros importantes para sua produção e finalmente técnicas de caracterização.

### 2.1 - Biodiesel

Nos últimos anos, a demanda por fontes energéticas renováveis vem crescendo significativamente, devido principalmente à preocupação com a diminuição das reservas de combustíveis fósseis, como por exemplo, o petróleo.

Além disso, o consumo de combustíveis fósseis derivados do petróleo apresenta um impacto significativo na qualidade do meio ambiente. A poluição do ar, as mudanças climáticas, os derramamentos de óleo e a geração de resíduos tóxicos são resultados do uso e da produção desses combustíveis (BIODIESELBRASIL, 2014).

Neste sentido, a busca intensiva por combustíveis alternativos ao petróleo, como o biodiesel, apresenta grande importância principalmente para os países emergentes, uma vez que sua produção auxilia na conservação do meio ambiente, reduzindo os gases responsáveis pelo aquecimento global, e contribui para o desenvolvimento social mediante a geração de empregos.

Segundo Holanda (2004), comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas. Além disso, reduz em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre.

A mistura de uma fonte de óleo com um álcool de cadeia curta, metanol ou etanol e um catalisador, hidróxido de sódio ou potássio, possibilita a ruptura das moléculas de triglicerídeos em metil ou etil ésteres, chamados de biodiesel, e glicerol (propano-1,2,3-triol). Para cada litro de biodiesel produzido, aproximadamente 80 g de glicerol são obtidos (KERR *et al.*, 2007).

São vários os óleos vegetais com potencial para serem utilizados na produção de biodiesel: bagaço de mamona, polpa de dendê, amêndoas de coco de dendê, amêndoas

do coco de babaçu, semente de girassol, amêndoas do coco da praia, caroço de algodão, grão de amendoim, semente de canola, semente de maracujá, polpa de abacate, caroço de oiticica, semente de linhaça, semente de tomate e de nabo forrageiro. No Brasil, os óleos vegetais mais comumente usados são os óleos de soja, milho, mamona, girassol, amendoim, algodão, palma, entre outros (HOLANDA, 2004).

Outras matérias prima de grande interesse são os óleos e gorduras residuais, resultantes de processamento doméstico, comercial e industrial e óleos e gorduras de animais. As fontes de gorduras residuais podem ser: lanchonetes, restaurantes, cozinhas industriais, indústrias em que ocorre a fritura de produtos alimentícios, os esgotos municipais em que a nata é rica em material graxa, águas residuais de processos de indústrias alimentícias (HOLANDA, 2004). Entre as gorduras animais, destacam-se o sebo bovino, os óleos de peixes, o óleo de mocotó, a banha de porco, entre outros (PARENTE, 2003).

A produção de biodiesel pode ser realizada por 3 etapas: emulsificação, pirólise, e transesterificação, sendo que a mais utilizada é a transesterificação. O processo de produção do biodiesel via transesterificação possui as seguintes etapas: preparação da matéria prima, podendo ser uma das citadas anteriormente; reação de transesterificação, utilizando-se com catalisador NaOH ou KOH; separação de fases, na qual a fase mais pesada é a glicerina bruta, e a mais leve são os ésteres impregnados de impurezas; e como etapa final a purificação dos ésteres, dando origem ao biodiesel próprio para consumo (DIECKELMANN, 1988; RIVALDI *et al.*, 2007).

No Brasil, a produção e comercialização de biodiesel possuem importantes vantagens devido à grande disponibilidade de matéria-prima para sua produção e ao crescimento contínuo da indústria de óleos vegetais e etanol (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Assim, o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2010, de 2,4 bilhões de litros e uma capacidade instalada, no mesmo ano, cerca de 5,8 bilhões de litros (BIODIESELBR, 2014).

Há de se destacar que o Brasil conta com O Programa Nacional de Uso e Produção de Biodiesel (PNPB) que introduziu esse biocombustível na matriz energética brasileira pela lei nº 11.097, de 13 de Janeiro de 2005. E em janeiro de 2010, foi estabelecido pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 26 de outubro de 2009 que

aumentou a quantidade de biodiesel de 4% para 5 % em todo óleo diesel comercializado no país até o ano de 2013.

A contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis. Assim, esperam-se mais incentivos para a produção de biodiesel nacional.

Entretanto as dúvidas dos agentes envolvidos com o biodiesel são muitas, principalmente com os subprodutos gerados, como glicerina, lecitina, farelo e a torta de oleaginosa, os quais devem ser foco de estudos mais detalhados, pois o aumento da produção de biodiesel pode ser economicamente viabilizado, se forem encontradas novas aplicações para os subprodutos.

Mas, o subproduto da reação de transesterificação do biodiesel que mais preocupa é o glicerol, pois constitui o maior subproduto gerado e vem sendo queimado em caldeiras ou despejado no ambiente sem tratamento prévio, pois não está sendo totalmente absorvido pelo mercado consumidor, visto que a oferta é três vezes maior que a demanda.

## 2.2 – Glicerol

O nome glicerol deriva da palavra *glykys*, doce. É o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanetriol, um polialcool de fórmula estrutural apresentada na Figura 4, descoberto por Carl W. Scheele (químico sueco), em 1779, durante a separação de uma mistura aquecida de litargírio ( $PbO$ , usado no esmalte para cerâmicas) preparada com óleo de oliva. Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano.

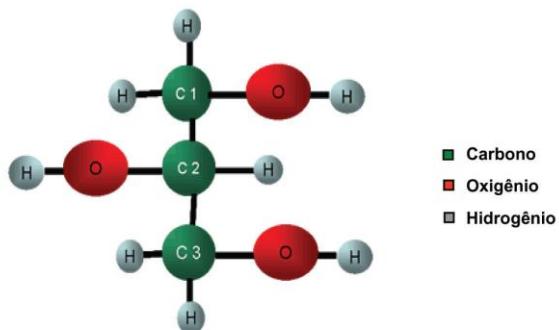


Figura 2. 1 - Representação da fórmula estrutural do Glicerol.

(Fonte: ARRUDA *et al.*, 2007)

## 2.2.1- Histórico e Características

No século XIX, algumas descobertas provocaram um aumento na demanda de glicerina. O químico italiano Ascanio Sobrero, em 1846, produziu pela primeira vez a nitroglicerina. E, em 1867, Alfred Nobel absorveu a nitroglicerina em diatomita, tornando seguro o seu manuseio como dinamite. O glicerol antes de ser produzido sinteticamente a partir de matérias-primas petroquímicas, em 1870, o mesmo era obtido pela recuperação da glicerina e do sal das lixívias do sabão (KATHA, 1999).

Dentre as características físico-químicas do glicerol na sua forma pura destacam-se as propriedades de ser um líquido oleoso, incolor, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool em todas as proporções e pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarbonetos (LOPES *et al.*, 1995).

A presença de três grupos hidroxila na estrutura do glicerol é responsável pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica. É uma molécula altamente flexível formando ligações de hidrogênio tanto intra como intermoleculares (CALLAM, 2001).

A Tabela 2.1 mostra algumas propriedades físico-químicas do glicerol puro a 20 °C.

Tabela 2. 1 - Propriedades físico-químicas do glicerol a 20 °C. (ADILSON *et al.*, 2011).

Fórmula Química	Glicerol ( $C_3H_8O_3$ )
Massa molecular	92, 09 g/ mol
Densidade	1, 261 g/cm <sup>3</sup>
Viscosidade	1,5 Pa s
Ponto de fusão	18,2 °C
Ponto de ebulição	290 °C
Calorias	4,32 kcal/g
Ponto de fulgor	160 °C
Tensão superficial	64,00 mN/m
Coeficiente de temperatura	-0,0598 mN (mK) <sup>-1</sup>

O termo glicerol aplica-se somente ao composto puro, enquanto o termo glicerina aplica-se à purificação de compostos comerciais que contém normalmente quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol (MORRISON, 1994). A glicerina pode ser vendida na sua forma bruta (glicerina natural), sem qualquer purificação, ou purificada. São comercializados dois tipos de glicerina natural. O primeiro apresenta 80% de glicerol, enquanto o segundo de 88 a 91% de glicerol. Quanto à glicerina

purificada é classificada em glicerina técnica 99,5% de glicerol, ou glicerina farmacêutica 86% ou 99,5% de glicerol.

O glicerol é encontrado naturalmente na forma combinada como glicerídeos na circulação e nas células de animais, gorduras vegetais e óleos. Em micro-organismos eucarióticos, o glicerol constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos (WANG *et al.*, 2001). Também, é considerado como um agente crioprotetor em micro-organismos, pois não permite a formação de cristais de gelo na célula, mantendo a estabilidade da parede celular e vitalidade da mesma durante o processo de congelamento para sua conservação.

Em humanos, o glicerol participa na termo-regulação do corpo, resistência a altas temperaturas, na resistência dos músculos em atividades físicas e na resposta neural da variação da glicemina (YANG *et al.*, 2009).

Ele é derivado da lipólise no tecido adiposo, da hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas do sangue e da gordura dietética (LIN, 1977). No fígado e no tecido adiposo, o glicerol é um precursor para a síntese de triacilgliceróis e de fosfolipídios, sendo liberado do catabolismo do triacilglicerol, convertido à glicose via fosforilação do glicerol quinase, e então participa da gliconeogênese ou é oxidado via glicólise e Ciclo de Krebs, promovendo energia prontamente disponível, sendo em média responsável pela produção de 22 mols de ATP por mol de glicerol (MOUROT *et al.*, 1994).

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel.

### **2.2.2- Produção de Glicerol**

O glicerol é uma substância que pode ser produzida em menor proporção por fermentação microbiana, sendo que uma quantidade significativa pode ser obtida a partir do álcool alílico, e, ao mesmo tempo em que também pode ser recuperado como o principal subproduto da saponificação do sabão, do isolamento de ácidos graxos, da hidrogenação da sacarose e, atualmente, pela transesterificação, durante a obtenção do biodiesel (WANG *et al.*, 2001; ARRUDA *et al.*, 2007).

A produção comercial de glicerol a partir da epicloridrina, obtida pela síntese de propileno, desde 1949, encontra-se em declínio devido ao excesso no mercado de glicerol do processo de biodiesel.

A produção do glicerol via fermentação microbiológica é conhecida há 150 anos, mas devido ao baixo rendimento do processo microbiológico em relação ao processo químico, a matéria-prima que encarece consideravelmente nos custos, e à dificuldade de sua extração e purificação dos caldos fermentados, este processo não vem sendo muito utilizado, entretanto, vem aumentando o número de pesquisas nesta área.

Como resultado do grande excedente de glicerol obtido como subproduto da produção de biodiesel, plantas de produção de glicerol estão fechando e plantas que usam glicerol como matéria-prima estão sendo abertas (PAGLIARRO *et al.*, 2007). Como já dito anteriormente, o biodiesel é produzido a partir da reação de transesterificação entre óleos vegetais e metanol ou etanol, em que são necessários três moles de álcool para cada um mol de triglicerídeo utilizado, formando ésteres metílicos ou etílicos e o glicerol bruto. A separação do glicerol bruto do biodiesel metílico ocorre via decantação, porém quando se utiliza etanol esta separação é mais complicada (BEATRIZ *et al.*, 2011).

A Figura 2.2 mostra o fluxograma típico do processo de produção de biodiesel e glicerol.

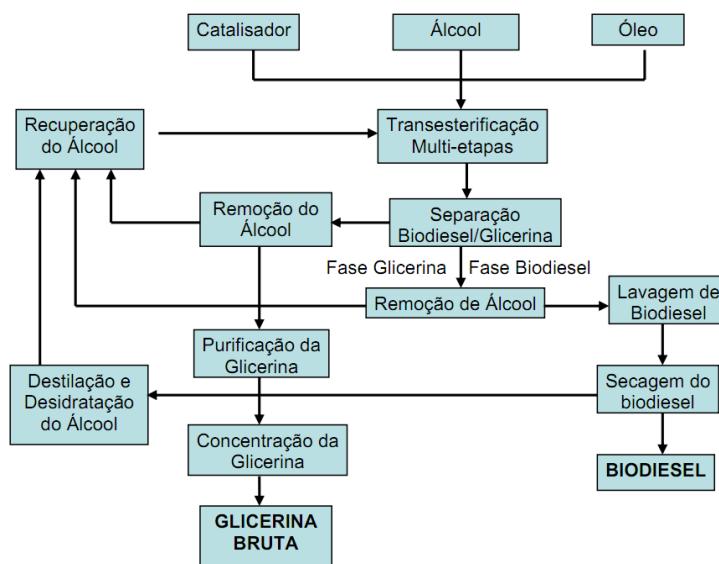


Figura 2. 2 - Fluxograma do processo de produção de biodiesel e glicerol.

(Fonte: GOMIDE, 2010).

A composição do glicerol resultante depende do tipo de semente utilizada e do processo de produção do biodiesel. Geralmente, a produção de resíduos contendo altos

níveis de glicerol é gerada, na maior parte, de indústrias que usam gordura animal ou óleos vegetais como matéria-prima. Por exemplo, a indústria oleoquímica gera resíduo contendo de 55 a 90% de glicerol (YAZDANI *et al.*, 2007).

O glicerol bruto contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, e que são factíveis de serem utilizados por micro-organismos para o seu crescimento durante processos fermentativos (THOMPSON, 2005).

Uma rota para o aproveitamento da glicerina loira (glicerol bruto) é o refino visando à obtenção de glicerina pura que é destinado para vários ramos da indústria sendo: tintas, cosméticos, automotiva, alimentícia, farmacêutica, indústrias de papel e celulose, couro e têxtil (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011). A Figura 2.3 mostra a distribuição em termos de porcentagem às inúmeras aplicações na indústria, no entanto, a quantidade utilizada (Tabela 2.2) é muito menor do que a indústria do biodiesel produz atualmente (BEATRIZ, *et al.*, 2011).

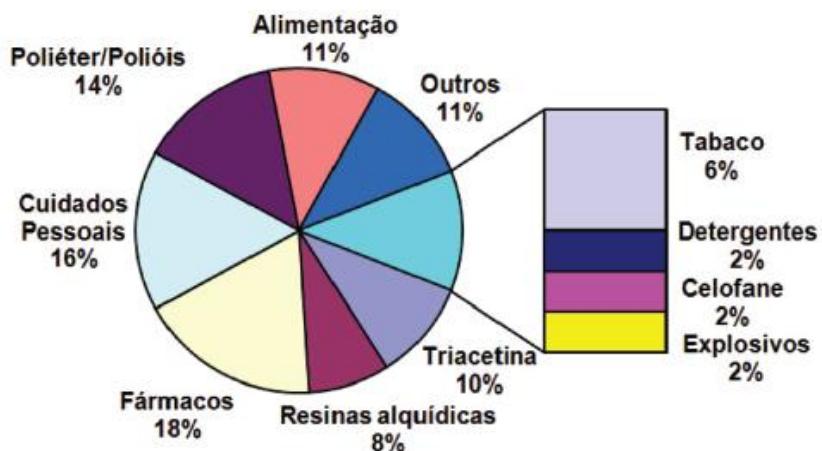


Figura 2.3 - Mercado do glicerol (volumes e usos industriais).

(Fonte: BEATRIZ, *et al.*, 2011).

Tabela 2. 2 - Usos do glicerol nos principais mercados mundiais (BEATRIZ *et al.*, 2011).

Uso como	Mercado (%)			
	USA	Europa	Japão	China
	160.000 t/ano	190.000 t/ano	50.000 t/ano	80.000 t/ano
Fármacos	39,5	23,1	34,0	5,2
Tabaco	15,8	2,5	5,3	7,3
Triacetato de glicerina	-	14,4	-	-
Alimentação	14,5	5,6	-	-
Poliéster álcool	10,5	13,1	11,6	5,2
Tintas	9,2	13,1	19,5	49,0
Celofane	2,0	4,4	3,8	1,5
Dinamite	0,6	3,1	1,9	3,1
Pasta de dentes	-	-	-	16,0
Cosméticos	-	-	-	6,3
Miscelâneas	7,9	20,6	23,9	7,2

### 2.2.3- Aplicações do Glicerol

O glicerol é um produto com grande capacidade industrial, possuindo mais de 1500 aplicações, como principais consumidores destacam-se as indústrias de cosméticos, saboarias e fármacos, nas quais o glicerol é usado na forma bruta (PIESKER *et al.*, 2006).

Nos alimentos o glicerol é utilizado como aditivo alimentar em função de suas propriedades estabilizantes, antioxidantes, sequestrantes, emulsificantes e umectantes.

Na Comunidade Européia, o glicerol está registrado como aditivo de alimento, sem limite de inclusão (PIESKER *et al.*, 2006). A legislação Norte-americana atribui ao glicerol o status GRAS (geralmente reconhecido como seguro), quando usado como aditivo alimentar segundo as boas normas de fabricação e alimentação inclusive na alimentação humana (MENTEN *et al.*, 2008). No Brasil, seu uso em produtos alimentícios é assegurado pela Resolução de nº 386, de 5 de Agosto de 1999 (ANVISA, 2013).

Como produto farmacêutico sua aplicação se deve à sua alta viscosidade, o que permite sua utilização em xaropes, na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos e emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e anti-sépticos (MORRISON, 1994; ANVISA, 2013).

O glicerol é ainda empregado na indústria terapêutica e em diagnósticos, na produção de resinas e poliésteres devido à sua reatividade polifuncional e também como lubrificante na indústria têxtil.

Apesar destas várias aplicações mencionadas, a oferta de glicerol vem sendo maior que a demanda, devido ao crescimento da produção de biodiesel, tornando-se necessária a busca de alternativas para sua utilização. Recentemente novas aplicações do glicerol vêm sendo descobertas, em que na forma parcialmente livre de impurezas, pode ser utilizado como substrato para fermentação por várias espécies de micro-organismos, com a finalidade de se obter produtos de alto valor agregado como polímeros biodegradáveis, raminolípídeos, biosurfactantes, dentre outros.

Neste contexto, o glicerol vem sendo investigado como a futura fonte de carbono em processos microbianos para a obtenção de bioproductos. A Figura 2.4 apresenta várias rotas metabólicas utilizadas por micro-organismos, nas quais o glicerol é catabolizado podendo formar 1,3- propanodiol, ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido cítrico, ácido lático, etc.

A valorização biotecnológica mais comum de glicerol refere-se a sua conversão em 1,3-propanodiol, o qual pode ser aplicado como ingrediente na produção de bioplásticos como poliésteres, poliéter e poliuretanos com excelentes propriedades plásticas, sendo que os micro-organismos mais utilizados atualmente para este fim são as bactérias *Clostridium butyricum* e *Klebsiella pneumoniae* (XIU *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2009). Ayub *et al.*, (2009), utilizando consórcio microbiano contendo *Klebsiella pneumoniae* obtiveram 22,84 g/L de 1,3-propanodiol a partir de 70 g/L de glicerol residual proveniente da produção de biodiesel de grau de pureza 80,93%.

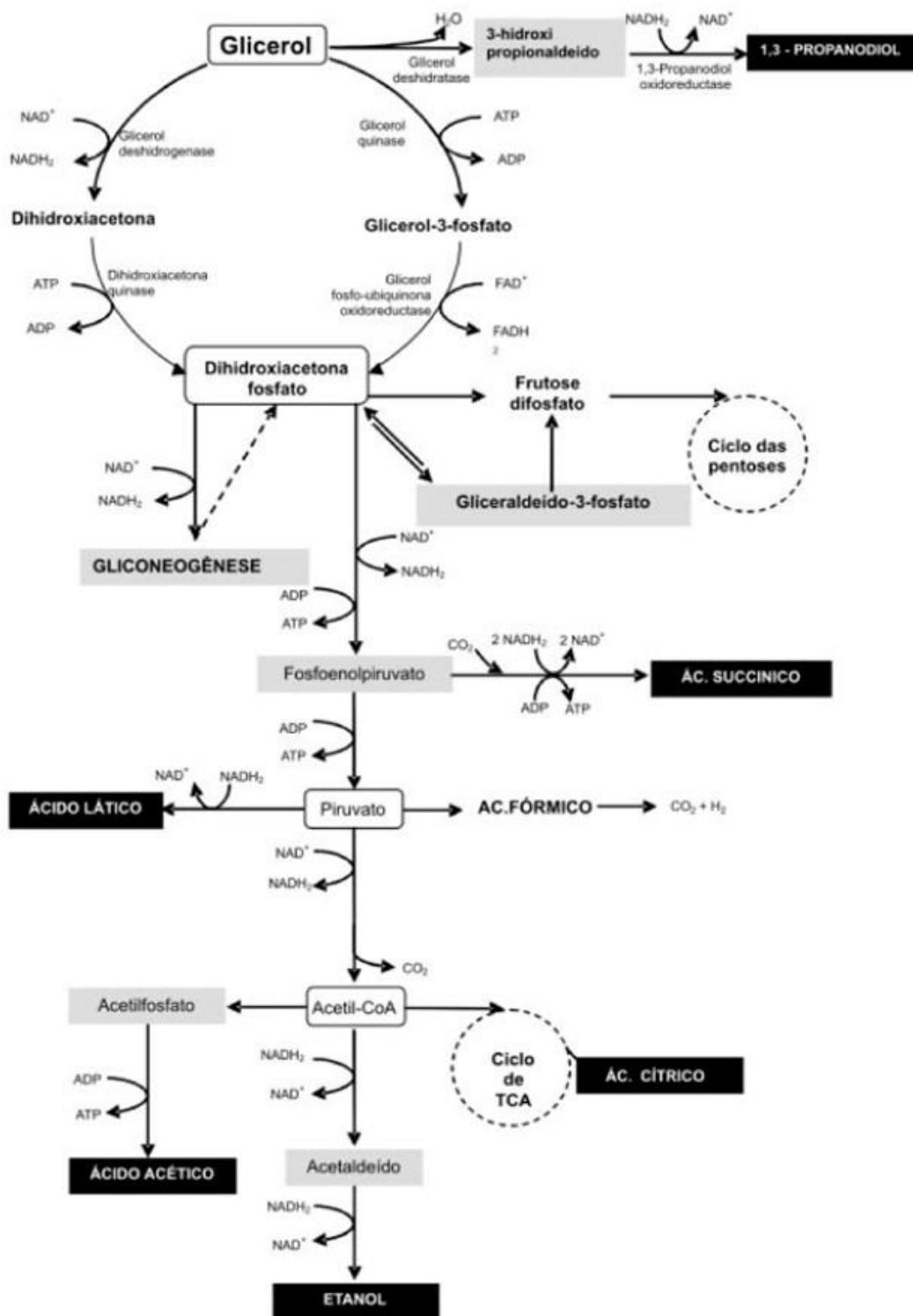


Figura 2. 4 - Vias metabólicas de assimilação de glicerol por micro-organismos e seus possíveis produtos.

Fonte: (RIVALDI *et al.*, 2007)

Papanikolaou *et al.*, (2011), estudaram a capacidade de produção de 1,3-propanodiol por *C. butyricum* e a maior concentração obtida do composto foi de 31-48

g/L, utilizando 0,55 g/L de glicerol. Os mesmos pesquisadores obtiveram uma produção de 29,2 g/L de ácido acético e 19,4 g/L de matinol a partir de 30 g/L de glicerol utilizando *Yarrowia lypolitica*, enquanto *Pichia membranifaciens* sintetizou 28,4 g/L de biomassa com uma concentração de 90 g/L de glicerol. Em outro estudo com *Yarrowia lypolitica* foi possível a partir de 40 g/L de glicerol, obter uma produção de 21,6 g/L de ácido cítrico ( LEVINSON *et al.*, 2007).

Além disso, o glicerol bruto tem sido empregado como um substrato para produção de outro metabólito microbiano, o lipídeo microbiano. Papanikolaou *et al.*, (2011) também obtiveram como resultado acúmulo de lipídeos em meio com limitação de nitrogênio e concentração de 30 g/L de glicerol bruto, utilizando leveduras apresentaram um acúmulo de 22% (m/m), na qual a espécie *Rhodotorula sp* foi a mais eficiente. E utilizando fungos o acúmulo foi de 42,6% (m/m), ocorrendo predominância de ácido linoléico.

Outra aplicação para o glicerol foi abordada por Pinheiro *et al.* (2009) e Ito *et al.* (2005), que estudaram a produção biológica de hidrogênio (H<sub>2</sub>) e etanol. O hidrogênio é considerado uma fonte de energia limpa e o etanol uma fonte renovável de combustível. No trabalho de Ito *et al.*, (2005), os pesquisadores utilizaram o micro-organismo *Enterobacter aerogenes* HU-101, obtendo bons rendimentos de etanol e hidrogênio. Pinheiro *et al.*, (2009) utilizaram *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, que apresentaram uma boa produção de etanol a partir de glicerol chegando a produzir respectivamente, 1,4 g/L de etanol em 5 horas de fermentação e 0,14 g/L de etanol em 7 horas.

Antônio *et al.* (2012) estudaram glicerol, glicose e manitol separadamente como substratos carbônicos para produzir biopolímero a partir da bactéria *Gluconoacetobacter hansenii*, os resultados mostraram que na presença de glicerol ocorreu a maior conversão de substrato em produto, com um rendimento de 36 g de celulose/ 100 g de substrato.

Como se vê a utilização de glicerol em processos fermentativos é promissora tendo em vista a variedade de produtos alternativos obtidos, e por ser um substrato de baixo custo contribui para o decréscimo do custo de produção, auxiliando também na destinação de resíduos, minimizando problemas ambientais.

## 2.3 - Produção de Biopolímeros

O crescente interesse por biopolímeros deve-se principalmente pela escassez e alto preço do petróleo, além do impacto ambiental determinado pela sua extração e refino, e uma vez que os polímeros sintéticos não sofrem degradação biológica (BRITO et al., 2011).

Biopolímeros são polissacarídeos de origem microbiana, também conhecidos como gomas, exopolissacarídeos (EPS) ou hidrocolóides, que têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso.

O termo “hidrocolóide” é usado para todos os polissacarídeos, obtidos de plantas, algas marinhas e fontes microbianas, como também para as gomas derivadas de exudados de plantas e biopolímeros produzidos por tratamento químico ou enzimático do amido ou celulose (DICKINSON, 2003).

Segundo Bobbio e Bobbio (1992), os polímeros são moléculas muito grandes, constituídas pela repetição de pequenas e simples unidades químicas, denominadas de monômeros, unidos entre si por ligações glicosídicas, constituindo-se substâncias de alto peso molecular.

Os micro-organismos produzem polissacarídeos de três formas distintas: intracelulares, integrantes da parede celular e extracelulares (exopolissacarídeos ou EPS). Os polissacarídeos extracelulares, ou exopolissacarídeos (EPS), podem, ainda, ser classificados em dois tipos: cápsulas integradas com a parede celular (capsular) ou gomas acumuladas no lado de fora da parede celular e difundidas no meio de cultura (livres). Os EPS despertam maior interesse porque podem ser recolhidos diretamente do meio para o qual são secretados (MOREIRA, 2002).

Os polissacarídeos constituem uma importante percentagem da biomassa fúngica; a parede da hifa, por exemplo, contém mais de 75% deste tipo de biomolécula (SILVA et al., 2006). A biomassa está relacionada à capacidade de sobrevivência do micro-organismo em condições adversas do meio ambiente (MOREIRA, 2002). A goma formada ao redor da parede celular desempenha diferentes papéis como, proteger o micro-organismo contra desidratação; servir de barreira contra vírus; neutralizar toxinas; atuar como fonte de carbono e energia; interagir com células de animais ou plantas em relações específicas, simbióticas ou patogênicas (PACE, 1991).

### 2.3.1- Características dos Biopolímeros

Para os autores Bobbio e Bobbio (1992), os polissacarídeos podem ser provenientes de plantas terrestres, encontrados na própria estrutura (pectina, celulose e amido), nas sementes (goma guar e locusta) ou exudatos (goma arábica); de plantas aquáticas (agar, carragena e alginato); e de micro-organismos (xantana, dextrana e gelana), conhecidos como biopolímeros microbianos.

A produção de EPS microbianos tem sido objeto de intensa pesquisa, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores, podendo ser obtidos a qualquer época do ano, pois a produção pode ser controlada cuidadosamente, não dependendo das condições climáticas, falhas nas colheitas ou contaminação marinha, que prejudicam a oferta e alteram o custo de produção das gomas tradicionais. (MAUGERI, 2001). Como também há técnicas de genética molecular que permitem obter polissacarídeos microbianos com propriedades específicas, as quais ainda não são possíveis nos vegetais.

Os biopolímeros possuem propriedades químicas e físicas únicas ou superiores às dos polissacarídeos tradicionais, como por exemplo, a alta viscosidade, o maior poder geleificante, a compatibilidade com uma grande variedade de sais em ampla faixa de pH e temperatura, a estabilidade em elevadas concentrações iônicas, a alta solubilidade em água e, também, a ação sinérgica com outros polissacarídeos (SEVIOUR, 1992; SUTHERLAND, 2001; SELBMANN, 2002).

Segundo Born (2002) o uso de biopolímeros em soluções aquosas na indústria é devido, principalmente, por serem multifuncionais, isto é, possuem uma combinação de propriedades que são essenciais para definir sua aplicação final. A característica mais importante é sua capacidade de modificar as propriedades aquosas do meio, isto é, sua capacidade de espessar, emulsificar, flocular, intumescer e/ou formar géis, filmes e membranas.

As gomas ou hidrocolóides são amplamente utilizados como aditivos na tecnologia de alimentos, pois melhoram a textura, retardam a retrogradação do amido e aumentam a retenção de umidade (ROJAS *et al.*, 1998).

A incorporação de hidrocolóides, em soluções de amido, modifica as propriedades reológicas e aumenta a viscosidade das soluções. Por este motivo, as gomas são utilizadas para estabilizar produtos como pudins e sobremesas (SUDHAKAR *et al.*, 1996).

Biopolímeros produzidos por fungos ainda não foram adequadamente explorados e poucos têm sido produzidos em escala industrial, vários destes biopolímeros apresentam propriedades reológicas que são valiosas para emprego industrial (BARBOSA *et al.*, 2004).

Uma possibilidade de aplicação destes biopolímeros é na saúde humana, várias pesquisas sobre polissacarídeos fúngicos têm se concentrado em aplicá-los como agentes antitumorais (MAZIERO *et al.*, 1999; HWANG *et al.*, 2003).

### 2.3.2- Micro-organismos Produtores de Biopolímeros

Os principais biopolímeros encontrados no mercado são as gomas xantana e as dextranas. As primeiras representam a maior parte do mercado, sendo aplicadas como aditivos em alimentos: estabilizantes de suspensão líquidas e emulsificante.

A Tabela 2.3 apresenta as gomas de origem microbiana mais utilizadas nas áreas industriais (ASHTAPUTRE *et al.*, 1995).

Tabela 2. 3 - Gomas microbianas e suas aplicações industriais (ASHTAPUTRE *et al.*, 1995).

Gomas	Micro-organismo	Aplicações Industriais
<b>Xantana</b>	<i>Xanthomonas campestris</i>	Espessante, emulsificante, estabilizante, agente de suspensão
<b>Dextrana</b>	<i>Acetobacter sp.</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Expansor sangüíneo
<b>Curdiana</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Agente gelificante
<b>Gelana</b>	<i>Sphingomonas elodea</i>	Agente gelificante
<b>Pululana</b>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Material plástico

Por possuir propriedades funcionais interessantes, como elevada viscosidade mesmo em baixas concentrações, um dos biopolímeros mais produzidos do mundo é a

goma Xantana, sintetizada pela bactéria *Xanthomonas campestris*. Este heteropolissacarídeo possui estrutura primária com repetidas unidades de pentassacarídeos, formados por duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico, como mostra a Figura 2.5.

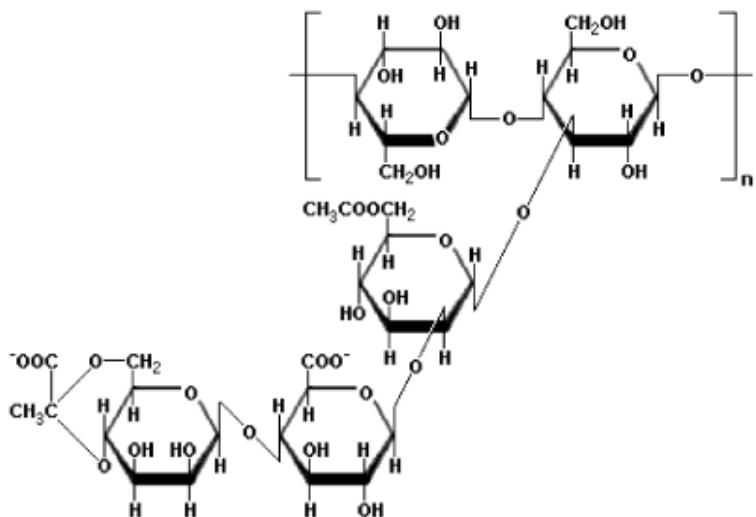


Figura 2. 5 - Estrutura do polissacarídeo extracelular formado pela *Xanthomona campestris*.

Fonte: COLOGROVE, 1983.

A goma curdlana, sintetizada por *Alcaligenes faecalis* é capaz de formar dois tipos de géis de acordo com a temperatura de aquecimento, sendo utilizada para modificar ou estabilizar propriedades físicas do produto (YUKIHIRO, 1991). Por ser bem tolerada pelo organismo humano, a goma dextrana é muito utilizada no campo médico-farmacêutico, em procedimentos que envolvem transfusão de sangue e na construção de géis transportadores de drogas (MOSCARDINI *et al.*, 2000 ).

A goma gelana é um heteropolissacarídeo sintetizado pela bactéria *Sphingomonas elodea*, também conhecida como *Pseudomonas elodea*. A família das gelanas é constituída pelas gomas gelana, welana e ransana. A welana e ransana não formam géis e produzem soluções altamente viscosas e termoestáveis (LOPES *et al.*, 1995).

Entre os polissacarídeos fúngicos com aplicação comercial podem ser citados a escleroglucana e pululana.

A pululana, é uma  $\alpha$ -glucana produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, é uma goma muito utilizada em poços de petróleo por ser um fluido pseudoplástico. Outras aplicações se valem de seu comportamento como excelente adesivo, espessante, estabilizante e agente de revestimento. Quando incorporada à dieta humana promove o crescimento seletivo de *Bifidobacterium sp* nos intestinos (PICTON *et al.*, 1995). E pesquisas indicam que este biopolímero apresenta potencial de uso em produtos das linhas *diet* e *light* (CHI & ZHAO, 2003).

Pode-se citar ainda o biopolímero clairana, que entre outras aplicações, também apresenta potencial de uso em produtos das linhas *diet* e *light*. Este polissacarídeo é produzido a partir do fungo *Beijerinckia sp.* 7070.

O fungo *Phlebia radiata*, um degradador ativo da madeira, produz o polissacarídeo extracelular glucana, cuja estrutura química foi determinada por Krcmar e colaboradores. Outros fungos produtores de glucanas extracelulares podem ser citados, como *Alternaria solani*, *Amanita muscaria*, *Aspergillus nidulans*, *Aureobasidium pullulans*, *Botryosphaeria rhodina*7, *Botryosphaeria sp.*, *Botrytis cinerea*, *Claviceps purpúrea*, *Epicoccum nigrum*, *Microdochium nivale*, *Paecylomyces lilacinus*, *Pestalotia sp.*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phytophthora parasitica*, *Phlebia radiata*, *Phoma herbarum*, *Pleurotus tuber-regium*, *Poria cocos*, *Schizophyllum commune*, *Sclerotium glucanicum* e *Tremella menziesii* (SILVA *et al.*, 2006).

Um dos polissacarídeos produzidos por fungos que pode ser aplicado como agentes antitumorais são as glucanas (SILVA *et al.*, 2006).

### **2.3 - Processos de Fermentação**

Na condução de uma fermentação, na primeira etapa multiplica-se o micro-organismo em quantidade suficiente e tempo necessários para uma ótima produção, depois o mesmo é transferido para um meio contendo alguns sais inorgânicos, nos quais as células se adaptam as novas condições da fase de produção (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com o modo de cultivo, podendo ser em superfície ou em profundidade. Fermentação em superfície é aquele no qual tanto o crescimento do micro-organismo como a formação do produto acontecem em meio sólido ou semi-sólido. Na fermentação em profundidade, o crescimento do micro-organismo e a formação do produto se desenvolvem submersos em meio líquido (REGULY, 2000).

O meio fermentativo deve conter fonte de carbono, nitrogênio e minerais para o desenvolvimento das células. Os carboidratos são as principais fontes de carbono e energia, sendo a glicose a mais fácil e amplamente utilizada, seguida por frutose, manose e galactose (GADD, 1988). O nitrogênio é um constituinte importante para as células, sendo necessário à formação de aminoácidos e ácidos nucléicos. Os minerais como hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, manganês, sódio, ferro, *etc* são importantes para as funções estruturais e fisiológicas dos micro-organismos (PEREIRA *et al.*, 2008).

A agitação e a aeração em frascos agitados são conseguidas pelo movimento de rotação ou ação recíproca dos agitadores. Em fermentadores em escala piloto ou industrial, a aeração e agitação são proporcionadas por meio de ar comprimido e por dispositivos mecânicos.

### **2.3.1 - Parâmetros Importantes para Produção de Biopolímeros**

Para a produção de biopolímeros são vários os parâmetros importantes para otimização do processo, podemos citar pH, temperatura, taxa de agitação e aeração, suprimento de nitrogênio e concentração de substrato.

Os valores de pH e temperatura usualmente recomendados para a produção de gelana e para a maioria das fermentações para produção de biopolímero variam de 6,5 a 7,0 e 30°C, respectivamente (KANG *et al.*, 1982).

Geralmente para produção de goma, como por exemplo, a goma xantana, o pH neutro é ótimo para o crescimento do micro-organismo, sendo que este decresce para 5,0 durante a produção, devido aos grupos ácidos presentes no polímero.

FARIA (2002) diz que no processo de produção de polissacarídeos deve-se considerar desde o micro-organismo em estudo até a determinação dos parâmetros de agitação, excesso ou ausência de carboidratos e volume de inóculo, em que se destaca o meio de produção e sua influência na síntese, no rendimento e na composição dos EPS.

SUTHERLAND (2001) afirma também que o rendimento e a qualidade do biopolímero dependem da composição do meio, da linhagem e das condições de fermentação utilizadas.

O suprimento de oxigênio é requerido para micro-organismos aeróbicos, sendo um requisito para a eficiente produção do biopolímero e uma boa produtividade, uma vez que ocorre grande aumento da viscosidade do meio ao longo da fermentação (WOICIECHOWSKI, 2001).

Assim como a aeração fornece oxigênio aos micro-organismos, a agitação também tem esse objetivo fundamental, para que os micro-organismos possam exercer suas atividades metabólicas e também para mantê-los em suspensão.

A agitação é importante não apenas na produção de células, mas também tem influência na formação do produto, sendo por isso, essencial o controle da agitação adequada a ser fornecida.

Sabe-se também que sob velocidade de agitação constante, a proporção entre o volume do líquido e o volume do frasco ( $V_l/V_f$ ) e até a forma do frasco influência na taxa de transferência de oxigênio (REGULY, 2000).

Desta forma, quando não se tem injeção de ar, a eficiência do suprimento de ar é determinada pela velocidade de agitação, volume livre e forma do frasco. Assim, estes parâmetros influenciam nas respostas das fermentações para produção de biopolímeros.

As condições de crescimento do micro-organismo afetam a cinética, a eficiência de produção, o peso molecular e a estrutura do biopolímero produzido. O crescimento e a formação do produto estão relacionados, determinando a operação mais econômica. A velocidade e eficiência de formação de polímero são influenciadas pela natureza dos fatores limitantes de crescimento, assim como por outras variáveis ambientais como oxigênio dissolvido, pH e temperatura (PACE, 1991).

Os ingredientes utilizados no meio fermentativo, como água, fontes de energia, carbono, nitrogênio, elementos minerais, e oxigênio, como também a quantidade dos mesmos, são parâmetros que influenciam no processo de produção de polissacarídeos.

Para alguns micro-organismos, a fonte de carbono determina a quantidade de polissacarídeo formado, bem como a qualidade do produto sintetizado. Como fontes de carbono podem ser citadas preferencialmente glicose e sacarose (SUTHERLAND, 2001). Outras fontes têm sido sugeridas, tais como o glicerol, soro de leite, casca de café, bagaço de mandioca, *etc* (WOICIECHOWSKI, 2001).

Já se sabe que para produção de xantana, o meio padrão deve conter fonte de nitrogênio, fonte de carbono, íons fosfato e magnésio, e elementos traços, e como a bactéria *Xanthomonas campestris* é estritamente aeróbica, o oxigênio é, portanto, requerido para o crescimento e produção de xantana (BORN *et al.*, 2002).

A reposição de meio fermentativo ao longo da produção pode ser necessária ou não. Repor os nutrientes pode ser favorável, fazendo com que o micro-organismo produza mais goma, em contrapartida, pode ser que o mesmo produza biopolímero em

condições ambientes extremas, isso faz com que a reposição de meio não seja favorável para a produção de goma.

No que diz respeito ao tempo de fermentação, um tempo muito longo pode ser ótimo para a quantidade de biopolímero formado, mas ao mesmo tempo pode interferir na qualidade do mesmo, afetando suas fibras e consequentemente sua viscosidade.

### **2.3.1 - Processos de Fermentação para Produção de Biopolímeros**

Ivanov *et al.*, (2009) utilizou fungo *L. theobromae* para produção de biopolímero, os ensaios foram realizados com agitação, em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo, o qual teve seu pH ajustado para 6,0 e é constituído de glicose como fonte de carbono, extrato de levedura, fosfato de potássio dibásico e sulfato de magnésio, utilizando um fluxo de ar de 0,8 vvm e 30°C de temperatura. Neste estudo o pesquisador observou que aumentando a concentração de substrato de 20g/L para 60 g/L na condição de maior agitação, o aumento de produtividade foi de 2,9 vezes ao observado na mesma condição de menor agitação.

Utilizando a bactéria *Beijerinckia sp.* 7070, incubadas por 24 horas, Moreira et al (2002) para a produção do biopolímero utilizou em meio líquido as fontes extrato de levedura, fosfato de potássio dibásico, sulfato de magnésio, triptose e sacarose. A fermentação aeróbica em batelada ocorreu em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio, com agitação de 180 rpm e à 24 °C. A maior viscosidade encontrada foi a do biopolímero de fibra longa após 72 horas de fermentação.

Berwanger (2007), utilizou *Sphingomonas capsulata*, a produção das células foi realizada em meio líquido, em duas etapas, primeiramente preparando-se um pré-inóculo. Para sintetizar o biopolímero a fermentação foi realizada utilizando melaço bruto, melaço pré-tratado e extrato aquoso de resíduo de proteína de soja, com agitação de 208 rpm, a 28°C de temperatura, em 72 horas. Os pesquisadores concluíram que o melaço pré-tratado 8% apresentou as maiores produtividades.

Luvizetto (2007), cultivou a bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli (3-hidroxibutirato), utilizou como fonte de carbono a sacarose e fonte de nitrogênio o sulfato de amônio para produção do biopolímero, o pH do meio foi ajustado para 7 em todos os ensaios, com 160 rpm de agitação, temperatura de 30°C, por um período de 18 horas de pré-inóculo, e depois 5 horas de fase de crescimento exponencial. Observou-se que esta bactéria foi capaz de produzir grandes quantidades

deste biopolímero sem limitações de nitrogênio, e que existe uma forte relação entre pH do meio e acúmulo do poli (3-hidroxibutirato).

Para otimização da produção de biopolímero por *Candida lipolytica*, Sarubbo (1997) utilizou óleo de babaçu e glicose como fonte de carbono. Primeiramente o inoculo foi incubado em meio sólido, em seguida transferido para frascos meio líquido, e incubado sob agitação por 24 horas a 150 rpm. As fermentações para produção do biopolímero foram realizadas em frascos com 1000 mL de capacidade contendo 300 mL do meio sob agitação de 150 rpm durante 144 horas, à temperatura de 27°C. O pesquisador estudou duas linhagens, *Candida lipolytica* 1055 e 1120, concluindo que o pH do meio apresentou-se de forma semelhante para ambas as amostras, mas a amostra 1120 apresentou menor produção de biopolímeros.

De uma maneira geral, podemos observar que cada processo de fermentação para produção de biopolímeros possui suas condições ótimas, dependendo do meio de cultura, o tipo de micro-organismo utilizado, a forma dos frascos, a agitação, o excesso de substrato, *etc.*

#### **2.4 - Técnicas de Caracterização de Biopolímeros**

Atualmente progressos significativos em relação à identificação, caracterização e utilização de polissacarídeos sintetizados por micro-organismos vem sendo observados (PADILHA, 1997).

Conhecer as propriedades dos biopolímeros, como a viscosidade e o comportamento reológico são necessárias para o direcionamento de suas aplicações industriais, servindo para predizer em quais produtos podem ser utilizados (SCAMPARINI *et al.*, 1997).

Os polímeros podem ser avaliados de acordo com suas propriedades reológicas, viscosidade e viscoelasticidade, uma vez que estas propriedades determinam a qualidade do polímero (AMANULLAH *et al.*, 1996).

Vários tipos de reômetros e viscosímetros, modelos matemáticos, medidas do comportamento viscoelásticos de fluidos, otimização de resultados dos ensaios reológicos, *etc*, são objeto de estudo da reologia.

A reometria consiste em técnicas experimentais para medir propriedades reológicas (relação entre tensão e taxa de cisalhamento) de polímeros fundidos, utilizando como equipamento, os reômetros. A viscosidade é medida em viscosímetros, um tipo muito utilizado é o Brookfield, pela facilidade de manuseio.

Reologia é a ciência que estuda a maneira como os materiais se deformam. Os fluidos podem ser classificados como Newtonianos ou Não-Newtonianos, conforme o comportamento da viscosidade em relação à taxa de cisalhamento aplicada.

Assim, o conhecimento de alguns conceitos tais como, viscosidade, comportamento Newtoniano e não-Newtoniano, é importante para o entendimento da caracterização dos biopolímeros (LEWIS, 1993)

O estudo da viscosidade é um ramo da reologia, é uma propriedade definida como a medida da resistência que um fluido apresenta para fluir ou escoar, portanto, fluidos altamente viscosos requerem maior força para se mover do que materiais menos viscosos (LEWIS, 1993; MOTT, 1996). A viscosidade está relacionada com as forças intermoleculares, sendo seu estudo muito importante, pois permite conhecer o comportamento dos materiais em diferentes faixas de temperatura, pH e pressão durante a produção, transporte e armazenagem, *etc.* (TAVARES, 2013).

Na prática, para uma dada temperatura, a viscosidade dos fluidos Newtonianos permanece constante, indiferente de qual modelo de viscosímetro, spindle (cilindros concêntricos utilizados para aplicação da taxa de cisalhamento pelo Reômetro) ou velocidade seja usada para medi-la, ou seja, viscosidade independe da taxa de cisalhamento na qual é medida. Quando a viscosidade dos fluidos muda conforme se varia a taxa de cisalhamento, os fluidos são não-Newtonianos. Os fluidos não-Newtonianos classificam-se em pseudoplásticos, os dilatantes e os plásticos (LEWIS, 1993; MOTT, 1996).

Para os pseudoplásticos, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, o que é também chamado de cisalhamento fino ou *shear-thinning*. Já para os dilatantes, a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento, sendo referido também como comportamento de fluxo *shear-thickening* (LEWIS, 1993; MOTT, 1996). Os fluidos plásticos apresentam comportamento semelhante aos pseudoplásticos, mas necessitam de uma tensão de cisalhamento mínima para iniciar o escoamento.

Na indústria de alimentos, os biopolímeros utilizados como espessantes requerem que, em baixas concentrações gere uma alta viscosidade, promovendo a suspensão das partículas. Além disso, os produtos alimentícios devem possuir fluidez ao serem agitados, portanto, a viscosidade deve decrescer sob agitação, mas recuperar-se logo após qualquer tensão de cisalhamento aplicada.

Assim, é de imensa importância conhecer o comportamento reológico de um biopolímero, uma vez que esta avaliação nos mostra a qualidade do mesmo e qual poderá ser sua aplicação.

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os procedimentos adotados durante o desenvolvimento deste trabalho.

### 4.1– Micro-organismos

Neste trabalho foram testados quatro diferentes fungos coletados de árvores, frutos e cascas do cerrado do Triângulo Mineiro: *Monilia sitophila*, *Mucor racemosus Fresenius*, *Fusarium sp*, e *Acremonium sp*. Estes micro-organismos foram testados visando escolher o melhor produtor de goma.

Os fungos foram identificados pela Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia (Campinas, SP-Brasil) e Laboratório Exame (Uberlândia, MG-Brasil), por testes bioquímicos de taxonomia convencional. Esta metodologia é baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados das espécies de referência descritas na literatura (FISCHER, 2014).

### 4.2– Fonte de Carbono

Utilizou-se como principal matéria-prima glicerol comercial (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) com pureza de 99,5%.

### 4.3– Meio de Cultivo e Manutenção em Meio Czaapeck (Condições Iniciais)

Os fungos foram cultivados em placas Petri contendo o meio *Czaapeck* (pH=6) com a seguinte composição em g/L : Glicose- 20, Nitrato de sódio 2,0, Fosfato dibásico de potássio 1,0, Sulfato de magnésio 0,5, Cloreto de Potássio 0,5, Sulfato Ferroso 0,01, Agar-Agar 20. O meio preparado foi esterilizado a 110°C e 1 atm por 20 minutos. A incubação foi realizada a 28±1°C por 120 horas.

### 4.4 – Meio de Cultura

O meio de cultura (M) adotado e empregado em todos os experimentos apresentou a seguinte composição em g/L: glicerol; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,0, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,0, CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 0,02, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,03, extrato de levedo 2,0 (em alguns experimentos houve variações nesta quantidade). O pH foi ajustado para 6,5 com posterior esterilização a 110°C e 1atm por 20 minutos.

## **4.5– Testes Preliminares: Produção de Goma em Erlenmeyers**

### **4.5.1- Seleção das Linhagens**

Para escolha da linhagem, os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers com capacidade de 500 mL. A quantidade de meio de cultura (M) adicionada em cada erlenmyer foi de 100 mL e 25 g/L de glicerol. A quantidade de inóculo empregado correspondeu a adição do equivalente a duas hastes de Hoffman contendo os micro-organismos (~ 0,18 g/L). As fermentações ocorreram por 7 dias em mesa oscilatória à 100 rpm e temperatura ambiente  $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Utilizou-se 120 horas como idade do inoculo.

### **4.5.2 - Ensaios Preliminares Visando a Otimização das Variáveis Relacionadas a Produção de Biopolímero**

Os experimentos desenvolvidos nesta etapa seguiram a mesma sistemática descrita no item anterior (item 4.5.1) em termos do tipo de frasco, quantidades de meio de cultura e inóculo, agitação e temperatura do processo. As variáveis avaliadas nos ensaios desta etapa seguiram uma sequência cronológica, sendo elas: concentração inicial de glicerol; tempo de fermentação; tempo de cultivo do inóculo em meio Czaapeck; ensaios com aeração contínua; avaliação da reposição de meio durante a fermentação; avaliação da vazão de aeração fornecida em vvm; avaliação da influência da aeração aplicada em duas fases no crescimento celular e na produção do biopolímero; avaliação do efeito da adição de extrato de levedura sobre a produção de goma e avaliação da produção de goma sem adição do glicerol.

Os valores das variáveis estudadas foram adotados de acordo com dados da literatura.

O esquema abaixo mostra todos os detalhes das sequências de estudos descritos anteriormente.

As variáveis adotadas como resposta para todos os experimentos estudados foram: concentração de biopolímero e consumo de glicerol. Nos experimentos com aeração foi feita correção para o volume final de 100 mL.

## Testes Preliminares

1°

**Determinação da concentração de glicerol:** Testadas concentrações de 25, 50, 100 e 125 g/L. Tempo de operação de 7 dias. (Ensaios sem aeração)

2°

**Determinação do tempo de cultivo do inóculo em meio Czapeck:**

Tempos de cultivo do inóculo adotados - 48, 72, 96 e 120 horas.

3°

**Determinação do tempo de fermentação:**  
Tempos de fermentação adotados- 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas  
(Ensaios sem aeração)

4°

**Ensaios com aeração:**

Em cada erlenmyer testou-se uma aeração acima do meio de cultivo com 6 vvm. O ar foi fornecido desde o primeiro dia de processo.

5°

**Avaliação da reposição de meio e agitação durante a fermentação:**  
Utilizou-se 1 vvm.

- Com agitação: com e sem reposição de meio fermentativo para tempos de processo de 48 e 96 horas.  
- Sem agitação: com e sem reposição de meio fermentativo para tempos de processo de 48, 96 e 144 horas.

6°

**Avaliação da vazão de ar na fermentação:**

Foram testados as seguintes vazões de ar (vvm): 1, 2, 3 e 4 vvm.

7°

**Avaliação da influência da aeração na fase de crescimento celular e na fase de produção da goma em níveis diferenciados de aeração:**

Teste com 24 horas sem aeração+ 72 horas com aeração (total de 96 horas) com 4 e 2 vvm.

8°

**Nova avaliação para concentração de glicerol:**

Como todas as variáveis de processo foram anteriormente otimizadas foram testadas novamente as concentrações de 25, 50, 100 e 125 g/L.

9°

**Perfil cinético do biopolímero formado em erlenmeyer**

Foi empregado a melhor vazão de ar obtido no teste 6 e 8, com 24 horas sem aeração+ 72 horas com aeração avaliou-se o perfil cinético nos tempos de processo de 24, 48, 60, 72 e 96 horas.

10°

**Avaliação do efeito da adição de extrato de levedura sobre a produção de goma:**

Diferentes concentrações de extrato de levedura foram avaliadas: 0; 0,5; 1; 2; 2,5, 3 e 4 g/L.

11°

**Avaliação da produção de goma sem glicerol:**

Na ausência de glicerol e com as condições otimizadas anteriormente, este ensaio foi realizado variando-se as concentrações de extrato de levedura (2,5; 3 e 4 g/L).

#### 4.6 - Produção de Goma em Fermentador

Após otimização das variáveis (tempo de cultivo de inóculo, concentração de glicerol, nível de aeração, agitação 100 rpm, vazão de ar e tempo de fermentação) foram realizados ensaios cinéticos em fermentador Biostat-B para avaliar o desempenho do fungo na produção do biopolímero. O experimento foi realizado em fermentador Biostat-B com 2 L de capacidade, contendo 1L de meio de fermentação, com coeficiente volumétrico de transferência de ar ( $K_{la}$ ) de  $8\text{ h}^{-1}$  na Fase de crescimento e de  $14\text{ h}^{-1}$  na Fase de Produção. A Figura 4.1 ilustra o fermentador usado para conduzir os experimentos.



Figura 4. 1- Foto do fermentador Biostat-B utilizado para realizar os ensaios.

Para acompanhamento do processo foram avaliados quantidade de goma formada, consumo de glicerol (em porcentagem %), concentração celular, concentração de oxigênio dissolvido, comportamento reológico do biopolímero produzido, espectroscopia na região de infravermelho da goma.

#### 4.7 – Determinação do Coeficiente de Transferência de Oxigênio (K<sub>la</sub>)

O procedimento adotado para coleta de dados de oxigênio dissolvido no meio de produção ocorreu na ausência do inoculo, com prévia aferição do eletrodo seguida de medições sucessivas até atingir a saturação do meio (BORZANI, 2001). Os dados foram tratados por meio de regressão múltipla usando o software OriginPro 8.0. A Equação (1) abaixo descreve a variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo:

$$\frac{dC}{dt} = k_{la} (C^* - C) \quad (1)$$

Sendo: C\* - concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol/L), e

C- concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol/L);

A solução do sistema fornece:

$$\int_{C=0}^{C=C^*} \frac{dC}{(C^* - C)} = \int_{t=0}^{t=t} K_{la} (C^* - C) \quad (2)$$

Rearranjando e integrando a Equação acima, tem-se:

$$\ln \left( 1 - \frac{C}{C^*} \right) = -K_{la} \cdot t \quad (3)$$

O coeficiente angular da reta fornece o valor do K<sub>la</sub>.

#### 4.8 – Recuperação e Purificação da Goma

Visando a recuperação da goma o mosto fermentado foi diluído em água na razão de 1:1 e processado em centrífuga Beckman Coulter Avanti J-25, para retirada das células, a 18900 g por 30 minutos (FARIA, 2009).

O sobrenadante foi filtrado a vácuo em sucessivas membranas de acetato de celulose (Millipore) com porosidades de 20 e 0,8 µm e o polímero recuperado por precipitação com etanol. Para 10 mL do mosto diluído centrifugado, adicionou-se 30 mL de etanol absoluto, obtendo dessa forma, sob agitação a goma (FARIA, 2009).



Figura 4. 2 – Goma após precipitação.

Para purificação da goma, esta foi lavada com soluções de etanol absoluto em concentrações crescentes iguais a 70%, 80%, 90%, o qual permaneceu em contato por cerca de 10 minutos. A secagem do produto foi realizada em placas de Petri com peso conhecido, recobertas com filme plástico perfurado e mantido à temperatura de  $30\pm1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (FARIA, 2009).

Após secagem a goma foi pesada para determinação da quantidade de goma formada em g/L.

#### 4.9 – Análises Quantitativa

A Figura 4.3 representa a seqüência analítica percorrida pelas amostras na forma de fluxograma.

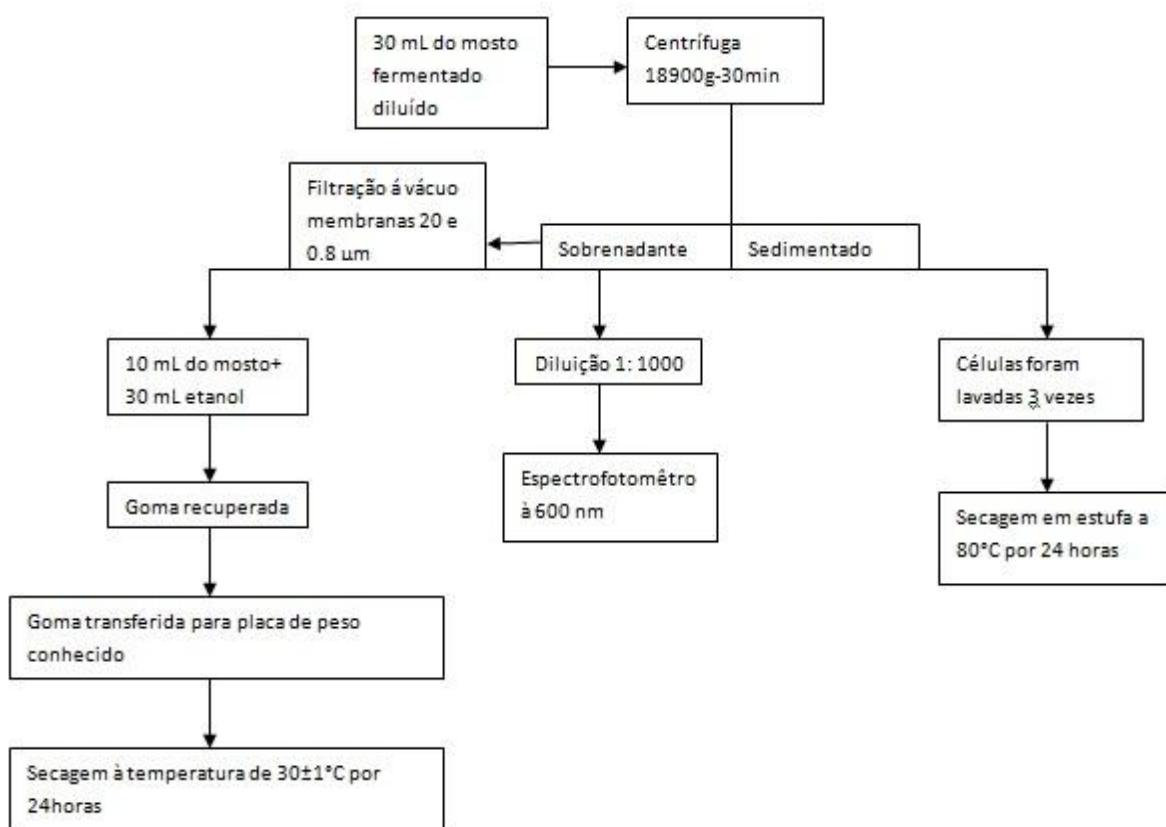


Figura 4. 3 – Esquema do procedimento analítico percorrido pelas amostras após fermentação.

#### 4.9.1 - Determinação da Quantidade de Glicerol Consumido

O consumo de glicerol foi calculado utilizando kits de detecção de triglicérides da marca DOLES, seguindo as orientações do fabricante. Antes de se proceder as análises foi feita a curva de calibração do Kit, a leitura foi realizada em espectrofotômetro Genesys- modelo 10UV à 600 nm (Apêndice 1).

Para determinação da quantidade de glicerol consumido, o sobrenadante foi diluído 1:1000 em água destilada. Em seguida, acrescentou-se 1mL do Kit em 1mL da amostra diluída, para análise no espectrofotômetro à 600 nm.

Assim, a quantidade de glicerol consumido foi determinada pela seguinte equação (4):

$$\%GC = \left[ \frac{Gi - Gf}{Gi} \right] \times 100$$

Sendo %GC- porcentagem de glicerol consumido, Gf- Concentração final do glicerol (g/L), Gi- Concentração inicial do glicerol (g/L).

#### **4.9.2 – Determinação da Biomassa por de Massa Seca**

O mosto foi diluído 1:1 em água e as células foram separadas por centrifugação em centrífuga Beckman Coulter Avanti J-25 a 18900 g por 30 minutos. Em seguida, o sedimentado (células) foi lavado, por três vezes, em água destilada para completa eliminação dos componentes do meio e dos metabólitos (FARIA, 2009).

Após a lavagem das células a biomassa úmida foi transferida para um bêquer previamente seco e de peso conhecido. Este bêquer foi colocado em estufa à 80°C por 24 horas para secagem das células a peso constante, sendo portanto calculada a massa seca de células em g/L (FARIA, 2009).

#### **4.9.3 - Avaliação do Comportamento Reológico da Goma Formada no Biorreator**

A reologia da goma foi obtida preparando uma solução polimérica a 0,5%, 0,75% e 1%. Esta solução foi preparada após a secagem da goma em temperatura ambiente. Esta foi triturada e hidratada. O preparo das soluções ocorreram sob agitação magnética durante, aproximadamente 10 horas (FARIA, 2009).

A reologia foi determinada utilizando um reômetro Brookfield RVDVIII, acoplado a um banho-maria, marca Brookfield, modelo TC-502P, utilizando-se o adaptador para pequenas amostras, spindle 18. Segundo o modelo de Ostwald de Waele, ou power-law, foram utilizados os dados de tensão cisalhante, medidos a partir de taxas de deformação.

As unidades de medida utilizadas foram: Pa.s para viscosidade aparente e 1/segundo ( $s^{-1}$ ) para taxa de cisalhamento.

#### **4.9.4 – Espectroscopia na Região do Infravermelho da Goma Produzida no Biorreator**

O espectro de infravermelho (IV) foi uma metodologia adotada para detectar similaridades ou diferenças entre as estruturas químicas das gomas produzidas e da goma xantana comercial (padrão). Esta análise foi realizada com amostra da goma produzida no laboratório pelo biorreator e com a amostra da goma xantana comercial.

O método consiste na utilização de espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) gravadas com Bruker Equinox 55, equipado com um detector KBr DLATGS. Cada análise foi feita realizando 100 leituras no intervalo de comprimento de onda de 4000-400 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. O pó puro diluído, de cada uma das gomas, foi prensado em discos de KBr (cerca de 5% m/m) e utilizados para a análise de vibrações esqueléticas. O software (OPUS / IR ) fornecido pela Bruker foi utilizado para as análises.

A espectroscopia de infravermelho fornece informações sobre as características estruturais das moléculas e grupos funcionais presentes nas amostras.

Os espectrogramas da goma produzida e da goma xantana comercial foram úteis para a comparação dos picos presentes nos gráficos e, assim, obter uma prova de identificação das estruturas moleculares dos compostos.

#### **4.9.5 – Composição Química do biopolímero**

A composição química do biopolímero formado foi realizada gentilmente pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

##### **4.9.5.1- Determinação dos Monossacarídeos Neutros**

Para determinação da composição monossacarídica das frações em termos de açúcares neutros as amostras foram hidrolisadas com ácido trifluoracético 2 M em duas condições, durante 8h a 100 °C ou por 2h a 120 °C. Para cada condição de hidrólise foram realizadas 4 repetições. Ao término da hidrólise o excesso de ácido foi removido por evaporação (BIERMANN, 1989). Após a hidrólise ácida total, os monossacarídeos foram solubilizados em água destilada e reduzidos pela adição de cerca de 10 mg de boroidreto de sódio por 16h a 4 °C (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Posteriormente, foi adicionada resina catiônica fortemente ácida para remoção dos íons Na<sup>+</sup>. As soluções foram filtradas e o solvente evaporado à vácuo. Adicionou-se 1 mL de metanol para remoção do ácido bórico e o borato de metila formado foi evaporado à vácuo. Este processo foi repetido por três vezes. Os alditóis formados foram acetilados pela adição de 0,5 mL de anidrido acético e 0,5 mL de piridina, em tubos vedados, permanecendo durante 12 horas à temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). A reação foi interrompida pela adição de gelo, sendo a seguir procedida a

extração dos acetato de alditóis, através da adição de clorofórmio e posterior eliminação de piridina em tratamentos sucessivos com sulfato de cobre 5% e água destilada. Após a evaporação do solvente, os acetatos de alditóis formados foram submetidos a cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) para determinação da composição dos monossacarídeos neutros. A composição monossacarídica foi calculada como média das 8 análises.

#### **4.9.5.2- Determinação do Teor de Monossacarídeos Ácidos (Ácidos Urônicos)**

Para determinação do teor de monossacarídeos ácidos (ácidos urônicos) a dosagem de ácidos urônicos foi realizada pelo método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), tendo como solução padrão ácido galacturônico nas concentrações de 10-100 µg/mL e leitura em 520 nm. Foram realizadas 8 repetições.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos na etapa experimental são apresentados neste capítulo, bem como as discussões pertinentes em cada caso. Em primeiro lugar são mostrados os resultados referentes à seleção de linhagens. Num segundo momento são discutidos os resultados dos estudos das variáveis para produção do biopolímero. E por último é realizada uma avaliação do perfil cinético da produção de biopolímero em biorreator.

### 5.1- Testes Preliminares

#### 5.1.1- Seleção da Linhagem Produtora de Biopolímero

Numa primeira série de experimentos foi realizada a seleção das linhagens em relação a sua capacidade de converter glicerol em biopolímeros.

As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers com capacidade de 500 mL. A quantidade de meio fermentativo colocado em cada reator de bancada foi de 100 mL, com 25 g/L de glicerol. Foram adicionados, então, ~0,18g/L de micro-organismos com idade de 120 horas e as fermentações ocorreram por 168 horas em mesa giratória à 100 rpm, em temperatura ambiente e sem aeração.

A Tabela 5.1 mostra os resultados dos testes exploratórios a fim de selecionar o micro-organismo com maior capacidade em produzir biopolímero.

Tabela 5. 1 – Resultados de quantidade de goma formada pelos micro-organismos.

Micro-organismos	Quantidade de goma formada (g/L)
<i>Monilia sitophila</i>	ND*
<i>Mucor racemosus Fresenius</i>	1
<i>Fusarium sp</i>	ND*
<i>Acremonium sp</i>	ND*

*Observação: \*ND- não detectado*

Por meio da Tabela 5.1, pode-se observar que o *Mucor racemosus Fresenius* foi o único que apresentou formação de goma e com concentração de 1 g/L, obtendo-se

uma produtividade de 0,006 g/ L.h . A Figura 5.1 mostra em detalhe a característica da goma formada.



Figura 5. 1 - Goma produzida pelo *Mucor racemosus Fresenius*.

Como o micro-organismo *Mucor racemosus Fresenius* foi o que apresentou produção de goma no teste de prospecção, este foi escolhido para as demais etapas relacionadas de estudo das variáveis de processo.

### **5.1.2- Ensaios Preliminares para Estudo das Variáveis Relacionadas a Produção de Biopolímero**

#### **5.1.2.1- Ensaios para Determinação da Concentração Inicial de Glicerol no Meio Fermentativo**

Nestes primeiros ensaios foram avaliadas as concentrações iniciais de glicerol de 25, 50, 100 e 125 g/L de glicerol, com 120 horas de idade de inoculo, em 168 horas de fermentação, sem aeração e agitação de 100rpm.

A Figura 5.2 apresenta o influênci a concentração inicial de glicerol na formação do biopolímero.

Pode-se observar, que a concentração de glicerol que promoveu a maior formação de goma foi a de 50 g/L. Nesta concentração foi formado 2 g/L de goma (produtividade de 0,012 g/L.h) com consumo de glicerol de 38,4 %. Além disso, pode-se verificar por estes resultados que elevadas concentrações de glicerol em 100 e 125 g/L inibiu a produção de goma. Mas, observa-se que nestas concentrações houve maior

consumo do substrato (glicerol) de 42,75 % e 46,12%. Isto sugere que o consumo de glicerol não foi utilizado especificamente para a produção de goma.

Antônio *et al.*, (2012) em 14 dias de fermentação obtiveram 6,9 g/L de biopolímero utilizando 25 g/L de glicerol, a partir da bactéria *Gluconoacetobacter hansenii*. Se compararmos este resultado com o presente trabalho, pode-se observar que apesar de um menor resultado apresentado neste estudo (2 g/L goma e 50 g/L de glicerol em 168 horas de processo), o micro-organismo estudado se mostra com potencial capacidade de produção de goma. Uma vez, que nesta etapa nenhuma otimização das condições de produção ainda foi realizada.

A concentração de 50 g/L de glicerol foi a escolhida como a melhor condição para as demais etapas deste trabalho.

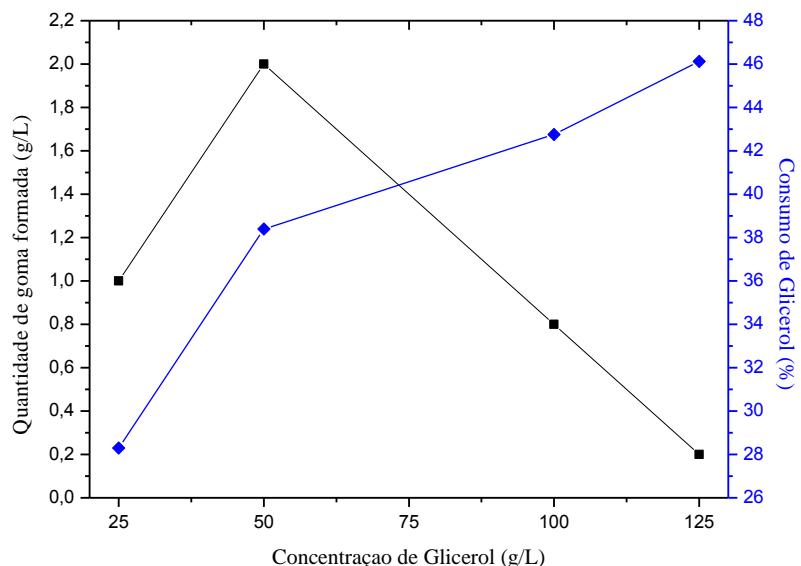


Figura 5. 2 - Gráfico da quantidade de goma formada (■) e do consumo de glicerol (◆), para diferentes concentrações do substrato glicerol (25, 50, 100 e 125 g/L).

### 5.1.2.2- Ensaio para Determinação do Tempo de Fermentação

Com o intuito de selecionar o tempo de processo de formação de goma, diversos ensaios variando o tempo de fermentação foram realizados, com 50g/L de glicerol, 120 horas de idade de inóculo, sem aeração e agitação a 100rpm.

A Figura 5.3 apresenta os resultados obtidos nos ensaios realizados nos tempos de fermentação de 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas.

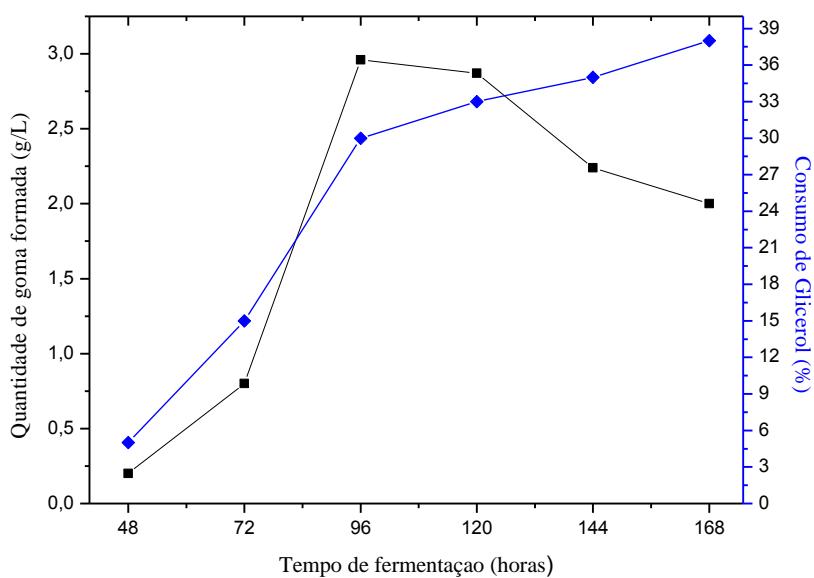


Figura 5. 3 - Gráfico do efeito do tempo de fermentação na quantidade de goma formada (■) e consumo de glicerol (◆).

De acordo com a Figura 5.3, observa-se pelo comportamento apresentado que a maior quantidade de goma é formada no quarto dia (96 horas) de fermentação com produção de 2,96 g/L (produtividade de 0,031 g/L.h). Em 120, 144 e 168 horas observa-se um decréscimo na quantidade de goma formada apresentando valores de 2,87, 2,26 e 2 g/L, respectivamente. Este comportamento pode estar relacionado a degradação da goma por enzimas produzidas pelo micro-organismos e/ou ao consumo da mesma pela cepa.

Nota-se ainda que em, 120, 144 e 168 horas de fermentação o consumo de glicerol (Figura 5.3) aumentou apesar da pequena quantidade de goma formada. Isto sugere que a goma começa a ser degradada e o glicerol é consumido para formação de outros tipos de produtos.

Com base nestes resultados apresentados foi escolhido como melhor tempo de fermentação para maior quantidade de produção de goma o tempo de 96 horas.

### 5.1.2.3 - Ensaio para Determinação do Tempo de Cultivo do Inóculo em Meio Czapeck

Para determinação do melhor tempo de cultivo do inóculo em meio *Czapeck* para a produção da goma foram realizados experimentos com concentração inicial de glicerol de 50 g/L, tempo de fermentação de 96 horas, sem aeração e agitação à 100rpm.

A Figura 5.4 mostra o aspecto do micro-organismo nos variados tempos de cultivo de inóculo de 48, 72, 96, 120 e 124 horas, o que motivou o desenvolvimento desta etapa de avaliação. Este estudo tornou-se necessário, pois o tempo de incubação está associado a idade do inóculo que pode diretamente influenciar no processo fermentativo, geração de produto e formação de goma.

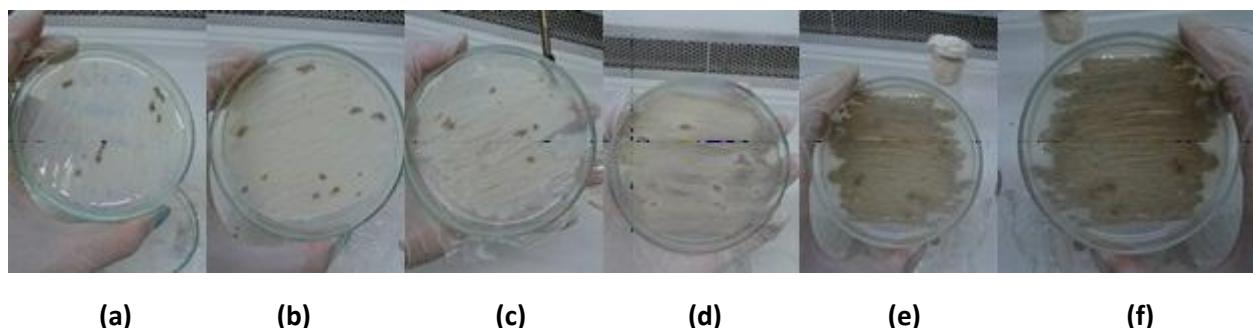


Figura 5. 4 – Foto do micro-organismo com idade de 24 (a), 48 (b), 72 (c), 96 (d), 120 (e) e 144 horas (f).

De acordo com a Figura 5.4, pode-se observar que houve diferenciação no aspecto visual deste micro-organismo com o tempo de incubação. Observou-se que no tempo de 120 e 144 horas o fungo apresentou maior intensidade na coloração.

A Figura 5.5 apresenta os resultados obtidos de quantidade de goma formada e consumo de glicerol empregando os inóculos após os tempos de incubação avaliados.

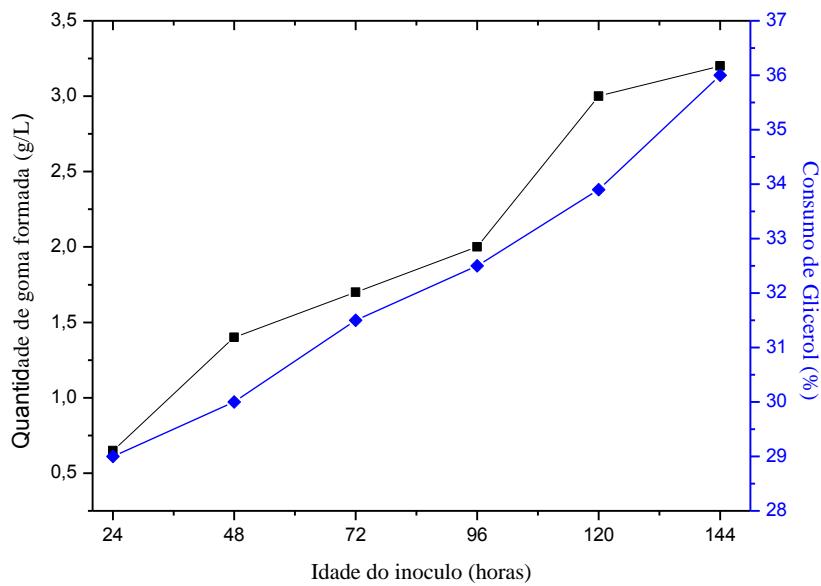


Figura 5. 5 - Gráfico do efeito do tempo de preparo do inóculo na quantidade de goma formada (■) e consumo de glicerol (◆).

Analisando a Figura 5.5 observa-se que no tempo de 120 horas houve uma produção de 3 g/L e 33,9 % de glicerol consumido. Em 144 horas houve um aumento de 0,2 g/L de goma formada, que pode estar associado a erros experimentais.

Desta forma, a idade de cultivo do inóculo adotado para o desenvolvimento deste trabalho foi de 120 horas.

#### 5.1.2.4- Ensaios com Aeração

Esta etapa foi realizada nas condições otimizadas de 50 g/L de glicerol, tempo de fermentação de 96 horas, idade do inóculo de 120 horas, agitação de 100rpm e com vazão de ar de 6 vvm, sendo realizada as amostragens em 48 e 96 horas.

Nestas condições observou-se, que em 48 horas de processo houve uma produção de 4,04 g/L (produtividade de 0,084 g/L.h) e em 96 horas de fermentação o meio secou-se completamente. Estes resultados mostraram que, a aeração é uma variável importante na formação da goma por este fungo do cerrado. Além disso, a vazão adotada foi elevada, pois promoveu a secagem do caldo em 96 horas de processo. Outro ponto importante, verificado com a aeração foi o aumento da produtividade que passou de 0,031 g/L.h em 96 horas de processo para 0,084 g/L.h em 48 horas. Portanto,

a aeração mostrou-se como um parâmetro importante a ser explorado e avaliado de diferentes formas.

#### **5.1.2.5- Avaliação da Reposição de Meio Durante o Processo de Produção da Goma e Avaliação da Agitação**

A fim de avaliar o efeito da reposição do meio fermentativo e agitação para a formação da goma, os testes foram realizados com as mesmas condições anteriores, com vazão de ar de 1 vvm.

Os testes nesta etapa seguiram duas linhas de trabalho: 1) os reatores foram colocados para fermentar durante 48 e 96 horas com agitação (em mesa giratória à 100 rpm); 2) os reatores foram colocados para fermentar durante 48, 96 e 144 horas, sem agitação. Em ambas as etapas de testes foram empregados os sistemas com e sem reposição de meio durante a fermentação.

As Tabelas 5.2 e 5.3 apresentam os resultados obtidos no teste de aeração, em mesa oscilatória e sem agitação, com reposição e sem reposição de meio fermentativo.

**Tabela 5. 2 - Resultados obtidos das fermentações em 48 e 96 horas nas condições com aeração, com e sem reposição de meio fermentativo, com agitação.**

<b>Com reposição de meio durante a fermentação</b>	<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>Quantidade de goma formada (g/L)</b>	<b>Glicerol consumido (%)</b>
	48	0,41	32,97
	96	1,97	38,3
<b>Sem reposição de meio durante a fermentação</b>	<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>Quantidade de goma formada (g/L)</b>	<b>Glicerol consumido (%)</b>
	48	1,72	34,67
	96	3,67	53,69

Ao analisar as Tabelas 5.2 e 5.3 verifica-se, que a agitação é uma variável de extrema importância para a formação da goma. Observa-se que para todas as condições estudadas sem agitação não promoveu a produção do produto desejado.

Verifica-se na Tabela 5.2 que a reposição de meio não foi favorável a produção de goma, uma vez que quantidade de goma formada foi maior na condição sem reposição de meio, proporcionando uma concentração máxima de goma de 3,67 g/L (produtividade de 0,038 g/L.h) em 96 horas de fermentação, com 53,69% de glicerol consumido.

Tabela 5. 3 - Resultados obtidos das fermentações em 48, 96 e 144 horas realizadas com aeração, com e sem reposição de meio fermentativo, sem agitação.

<b>Com reposição meio durante a fermentação</b>	<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>Quantidade de goma formada(g/L)</b>	<b>Glicerol consumido(%)</b>
	48	*ND	34,85
<b>Sem reposição de meio durante a fermentação</b>		<b>Quantidade de goma formada(g/L)</b>	<b>Glicerol consumido(%)</b>
		48	*ND
		96	*ND
		144	*ND

*Observação:* \*ND: não detectado

#### 5.1.2.6- Avaliação das Vazões de Aeração

Nestes ensaios foram testados as seguintes vazões de aeração: 1, 2, 3 e 4 vvm.

As fermentações foram desenvolvidas durante 96 horas em mesa oscilatória à 100 rpm, com 50 g/L de glicerol, 120 horas de idade de cultivo do inóculo e sem reposição de meio durante o processo de produção da goma, condições estas selecionadas anteriormente.

A Figura 5.6 apresenta os resultados obtidos nestes ensaios, nas condições já descritas anteriormente.

Na Figura 5.6 pode-se observar que o aumento vazão de ar refletiu diretamente no aumento de produção do biopolímero, verificando a importância da concentração do oxigênio no metabolismo de produção deste biopolímero.

Segundo Inanov e colaboradores (2009) em seu estudo conseguiram produzir 6,58 g/L de biopolímero utilizando o fungo *L. theobromae*, com um fluxo de ar de 0,8 vvm e 30°C de temperatura. Comparando os resultados destes autores com o presente trabalho verifica-se que empregando vazão de ar de 4 vvm obteve-se valores de quantidade de goma formada superior (10,63 g/L- produtividade de 0,111 g/L.h)) ao obtido pelos autores citados.

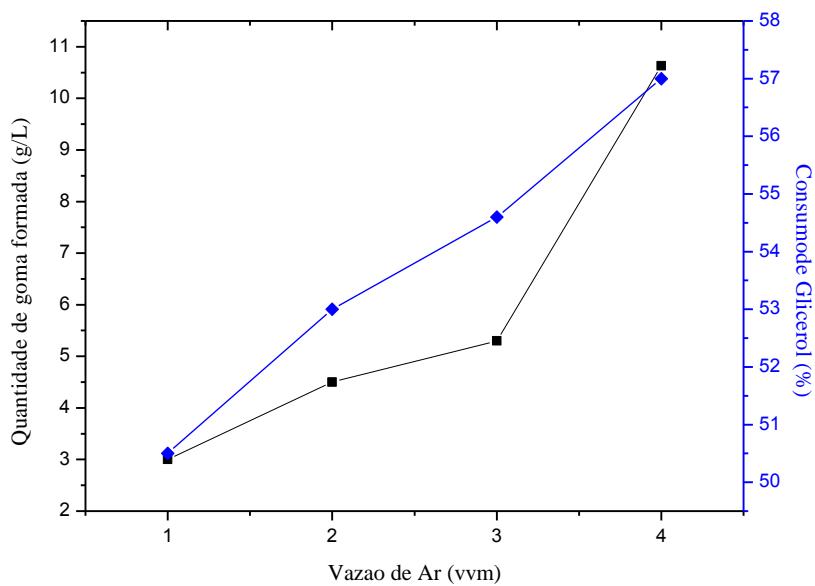


Figura 5. 6 - Efeito da vazão de ar na quantidade de goma formada (■) e consumo de glicerol (◆).

Com estes resultados pode-se verificar, que a aeração é também uma variável importante para se obter grandes quantidades de goma e maior consumo de glicerol. Desta forma, foi adotado vazão de ar de 4 vvm nos próximos ensaios.

#### 5.1.2.7- Reavaliação da Concentração de Glicerol

Como foi possível observar que a vazão de ar é uma variável que influência consideravelmente a produção do biopolímero, foi necessário um novo estudo para determinar a melhor concentração de glicerol no meio. Para esta finalidade foram testadas novamente as concentrações de glicerol de 25, 50, 100 e 125 g/L. Neste caso, as demais variáveis operacionais selecionadas foram mantidas sendo elas: 4 vvm, tempo de fermentação de 96 horas, em mesa giratória à 100 rpm, 120 horas de idade de cultivo do inóculo e sem reposição de meio durante o processo de produção da goma.

A Figura 5.7 apresenta os resultados obtidos de quantidade de goma formada e consumo de glicerol, respectivamente.

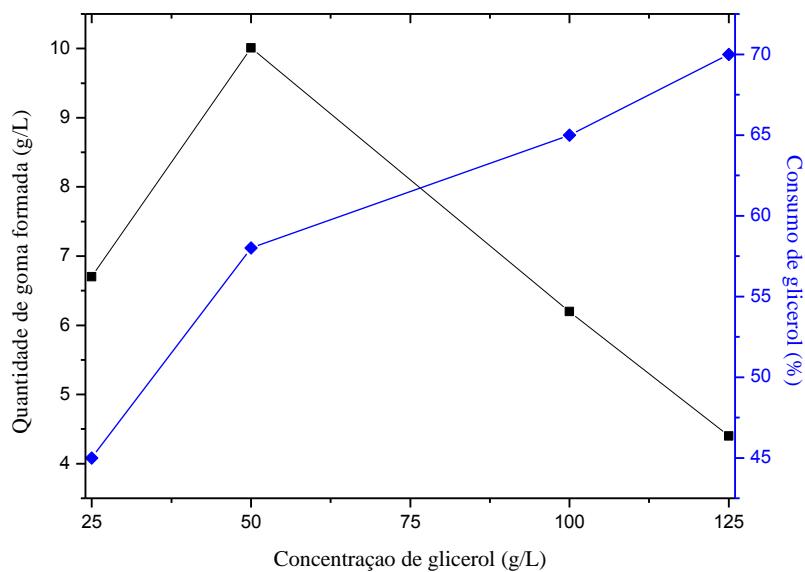


Figura 5. 7 - Quantidade de goma (■) e consumo de substrato (◆) formada para diferentes concentrações de glicerol (25, 50, 100 e 125 g/L), com 4 vvm.

De acordo com a Figura 5.7 pode-se verificar que a concentração que proporcionou maior produção de goma (10,01 g/L- produtividade de 0,104 g/L.h) continuou sendo na concentração inicial de glicerol de 50 g/L, com 58% de consumo de glicerol.

Ao comparar este resultado de produtividade de 0,104 g/L.h e quantidade de goma formada de 10,01 g/L (Figura 5.7) com a da Figura 5.2 (2 g/L/produtividade de 0,012 g/L.h- resultado da condição inicial dos estudos e sem aeração) verifica-se que ocorreu um aumento significativo de goma formada. Portanto, o efeito da aeração mostrou ser um fator bastante considerável no aumento de formação de goma.

#### 5.1.2.8- Avaliação Da Influência da Aeração na Fase de Crescimento Celular e Fase de Produção de Goma

Os testes anteriores foram realizados com aeração contínua, ou seja, desde o primeiro dia de fermentação. Sabe-se que o fornecimento de oxigênio influencia o metabolismo das células. Na fase de crescimento o micro-organismo pode necessitar de pouco ou elevada quantidade de ar. Assim, nesta etapa foi realizado um ensaio, a fim de avaliar se os micro-organismos necessitam para o seu crescimento apenas do ar ambiente (pouco ar), para posteriormente iniciar a produção da goma (com elevada

quantidade de ar). Para isto, neste ensaio o ar foi introduzido após 24 horas de fermentação.

A Tabela 5.4 apresenta os dados obtidos neste ensaio, em que foram colocados para fermentar durante 96 horas em mesa giratória (24 horas sem aeração; 72 horas com aeração) à 100 rpm, com vazão de ar de 4 e 2 vvm, 50 g/L de glicerol, 120 horas de idade de cultivo do inoculo, sem reposição de meio durante o processo de formação da goma.

Tabela 5.4 - Valores obtidos da fermentação com 24 horas sem aeração e com 72 horas de aeração.

4 vvm	Quantidade de goma formada (g/L)	Glicerol consumido (%)
	14,15	68,34
2 vvm	Quantidade de goma formada (g/L)	Glicerol consumido (%)
	6,57	55,56

Verifica-se que houve um aumento da quantidade de goma formada comparando os resultados da Tabela 5.3 com os resultados obtidos com aeração contínua ( 4,54 g/L/produtividade de 0,047 g/L.h com 2 vvm; 10,63 g/L/produtividade de 0,111 g/L.h com 4 vvm - Figura 5.6), o que mostra que a fermentação deve ser realizada em duas fases distintas: 24 horas de fase de crescimento e 72 horas de fase de produção.

#### **5.1.2.9- Perfil Cinético do Biopolímero Formado em Erlenmeyer**

Este ensaio foi realizado a fim de avaliar crescimento celular, quantidade de goma formada e consumo de glicerol em função do tempo de fermentação, após 24 horas de fase de crescimento (sem aeração).

A Figura 5.8 apresenta os resultados obtidos deste ensaio, realizado com vazão de ar de 4 vvm na fase de produção, concentração de glicerol de 50 g/L, em mesa giratória à 100 rpm, 120 horas de idade de cultivo do inóculo e sem reposição de meio.

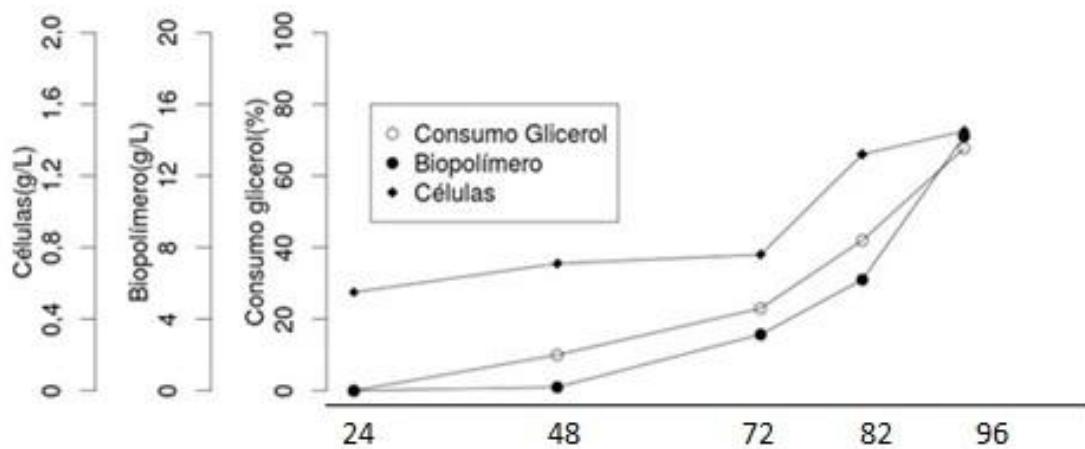


Figura 5.8 - Perfil Cinético da quantidade de biopolímero, quantidade de goma formada (●), consumo de glicerol (◆) e crescimento celular (○).

Analizando a Figura 5.8, é possível concluir que o melhor tempo de fermentação do biopolímero é de 96 horas (24 horas sem aeração e 72 horas com aeração), com 14,21 g/L de goma formada (produtividade de 0,148 g/L.h) e 67,7% de glicerol consumido e 1,45 g/L de biomassa. Nota-se que o biopolímero somente é formado depois de 48 horas, com 0,76 g/L de biomassa no meio fermentativo. Observa-se ainda que há uma relação direta entre crescimento celular e a produção do biopolímero.

#### 5.1.2.10- Determinação do Efeito da Adição de Extrato de Levedura Sobre a Produção de Goma

Os resultados da determinação do efeito da adição de extrato de levedura sobre a produção de goma estão apresentados na Figura 5.9.

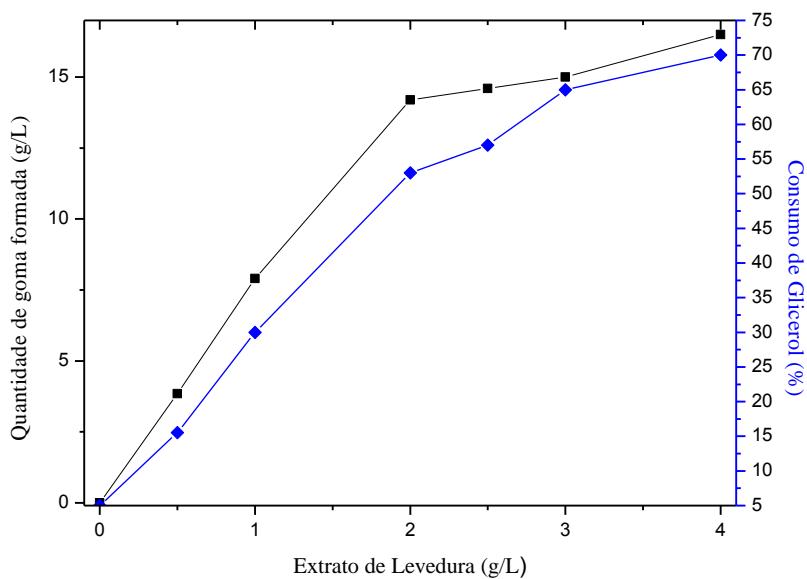


Figura 5. 9 Gráfico do efeito da quantidade de extrato de levedura para formação do biopolímero, quantidade de goma formada (■) e consumo de glicerol (♦).

Segundo Pereira (2008) o potencial para utilizar fontes de carbono para o metabolismo varia entre os micro-organismos, sendo que praticamente todos os compostos orgânicos da natureza podem ser utilizados como fonte de carbono e/ou energia por micro-organismos, desde que estes possuam os sistemas enzimáticos e de transporte adequados a cada fonte.

Analizando a Figura 5.9, é possível concluir que para a formação da goma o micro-organismo utiliza extrato de levedura, que é uma fonte de carbono, já que o aumento da concentração deste composto aumenta a produção de goma. Além disso, nota-se que sem extrato de levedura o micro-organismo não produz o biopolímero e apresenta baixo consumo de glicerol, apenas 15,53%.

O alto custo do extrato de levedura pode inviabilizar a produção de goma para instalações de grande porte, a menos que este composto preserve alguma característica fundamental, ou signifique um ganho econômico na recuperação do produto (FARIA, 2009).

Schiavão Souza *et al.*, (2007) estudaram o efeito do extrato de levedura para produção de biopolímero por linhagens lácticas probióticas, *Lactobacillus acidophilus*

(L.a.-5) e *Lactobacillus casei* (L.c.-1), obtendo como concentração ótima de extrato de levedura 0,58% (p/v).

Faria (2009) também estudou esta variável na produção de xantana a partir de *Xanthomonas campestris* pv. com cana-de-açúcar como fonte de carbono, e constatou que a condição ótima de extrato de levedura foi de 1,8 g/L.

Dentre as possibilidades, optou-se por utilizar nos próximos ensaios a quantidade usada nos ensaios anteriores de 2 g/ L de extrato de levedura, que gerou uma quantidade de 14,2 g/L de goma/produtividade de 0,148 g/L.h (Figura 5.9).

#### 5.1.2.11- Avaliação da Produção de Goma sem Glicerol

Um ensaio contendo como única fonte de carbono extrato de levedura foi realizado com o intuito de verificar a quantidade de goma formada somente a partir desta fonte.

A Figura 5.10 apresenta os resultados obtidos no ensaio realizado variando a concentração de extrato de levedura (2,5; 3 e 4 g/L) e mantendo 4 vvm, com tempo de fermentação de 96 horas (24 horas sem aeração; 72 horas com aeração), em mesa giratória à 100 rpm, 120 horas de idade de cultivo do inóculo e sem reposição de meio durante o processo de produção de goma.

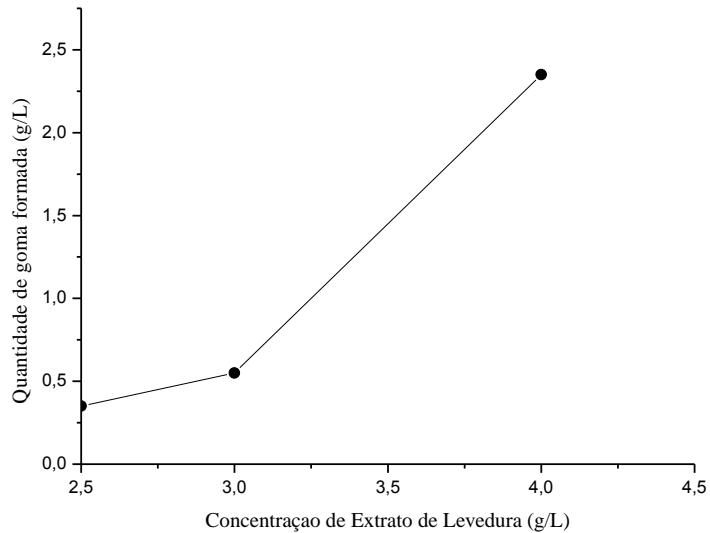


Figura 5. 10 – Efeito do extrato de levedura como fonte de carbono para a formação da goma.

Por meio da Figura 5.10, observa-se que com uma concentração de 2,5; 3 e 4 g/L de extrato de levedura produziu-se 0,35, 0,55 e 2,35 g/L de goma, respectivamente.

A partir deste ensaio fica confirmado que o fungo estudado utiliza parte do extrato de levedura como fonte de carbono para produzir o biopolímero.

### 5.3- Produção de Goma em Fermentador

Uma vez fixadas as condições de 2 g/L de extrato de levedura, concentração de glicerol de 50 g/L, com tempo de fermentação de 96 horas, à 100 rpm, 120 horas de idade de cultivo do inóculo, e sem reposição de meio durante o processo de produção de goma, foi realizado um estudo cinético fermentador Biostat B, com 24 horas de fase de produção com  $k_{l,a} = 8 \text{ h}^{-1}$  e fase de produção com  $k_{l,a} = 14 \text{ h}^{-1}$ .

A Figura 5.11 apresenta as curvas obtidas para o crescimento celular, quantidade de goma formada e consumo de glicerol em função do tempo de fermentação.

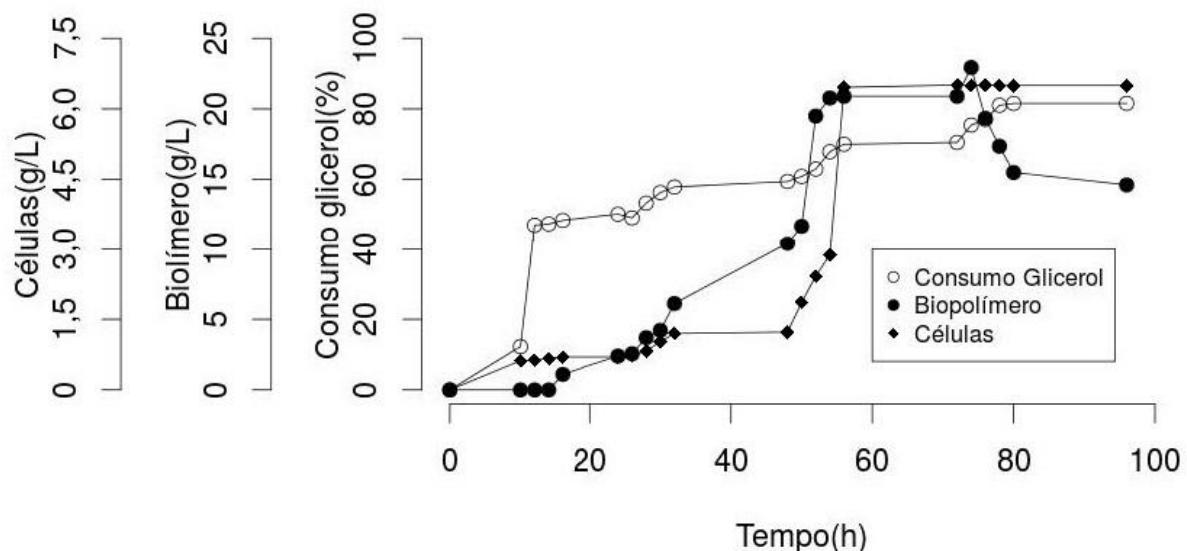


Figura 5. 11 - Perfil Cinético da produção do biopolímero formado no Biorreatore, quantidade de goma formada (●), consumo de glicerol (♦) e crescimento celular (○).

Na produção de biopolímero no biorreator, observa-se que após 16 horas de fermentação há produção do biopolímero em 1,1 g/L (produtividade de 0,069 g/L.h) (Figura 5.11). Em Erlenmeyers houve uma produção de 3,14 g/L (produtividade de 0,065 g/L.h) após 48 horas de fermentação (Figura 5.8). Isto mostra que as etapas anteriores nas quais foram selecionadas as melhores condições das variáveis foram importantes para o desempenho positivo neste fermentador. Além disso, de acordo com a Figura 5.11 observa-se que há uma relação direta entre crescimento celular e quantidade de goma formada, pois a quantidade de goma formada aumentou conforme o crescimento do micro-organismo.

Em 74 horas houve uma produção máxima de goma de 23 g/L (produtividade de 0,310 g/L.h) com um crescimento máximo de células de 6,5 g/L. Outro aspecto observado foi à redução no conteúdo de biopolímero após 74 horas, sendo que a partir desse momento foi verificado aumento do consumo de glicerol. As Figuras 5.12 e 5.13 mostram o aspecto da goma à 74 horas e após 74 horas, respectivamente.

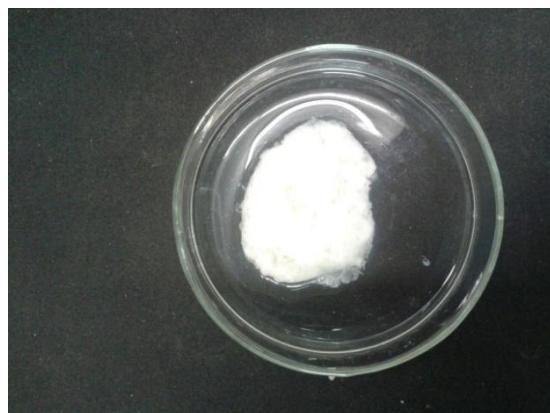


Figura 5. 12 - Foto da goma à 74 horas.



Figura 5. 13 – Foto da goma à 76 horas.

As Figuras 5.12 e 5.13 aumentam as evidências que o fungo pode ter produzido enzimas que pudessem ter degradado parte da goma e utilizado o restante de glicerol como substrato para produção de outros bioproductos. Após 74 horas (Figura 5.13) observa-se que as fibras da goma estão soltas, diferente da goma formada à 74 horas (Figura 5.12) que se encontra compacta.

Zanatta *et al.*, (2012) avaliou o perfil cinético da produção de exopolissacarídeo pelo fungo *L. theobromae* MMPI em meio formulado com melaço de

cana-de-açúcar suplementado com sais minerais, em Biorreator Biostat B, obtendo a maior produção 18,65 g/L após 72 horas de produção.

Faria (2009), trabalhando com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 estudou perfil cinético em biorreator e obteve 16,4 g/L de concentração de goma.

Os valores encontrados neste estudo se comparado com Zanatta *et al.*, (2012) e Faria (2009) foram superiores, conforme apresentado anteriormente, mostrando que o estudo das variáveis foi de extrema importância para a elevada concentração de biopolímero produzido.

### **5.3.1- Comportamento Reológico do Biopolímero Produzido em Condições Estudadas em Erlenmeyer**

O conhecimento sobre as propriedades dos biopolímeros, principalmente, a viscosidade e o comportamento reológico são importantes para futuras aplicações industriais, pois nos permite obter informações a respeito das propriedades de escoamento e deformação dos materiais (SCAMPARINI *et al.*, 1997).

As propriedades reológicas foram avaliadas por meio da análise de viscosidade aparente, para verificar a qualidade das gomas produzidas no Biorreator com as condições estudadas em erlenmeyer, demonstrando o comportamento da solução aquosa do polímero em concentrações de 0,5; 0,75 e 1%, na temperatura de 25 °C.

Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 5.12, em que as soluções das gomas apresentaram comportamento pseudoplástico para concentração de 1%, 0,75% e 0,5%. Isto indica que a viscosidade aparente decresceu com o aumento da taxa de cisalhamento. De acordo com a literatura, esse comportamento tem sido encontrado em soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos (AMANULLAH *et al.*, 1996; PADILHA, 1997).

BEYER *et al.*, (1987) observaram que em soluções a 1% do polissacarídeo produzido por *Rhizobium* CB744 medida à 25 °C, também houve um decréscimo da viscosidade com aumento da taxa de cisalhamento.

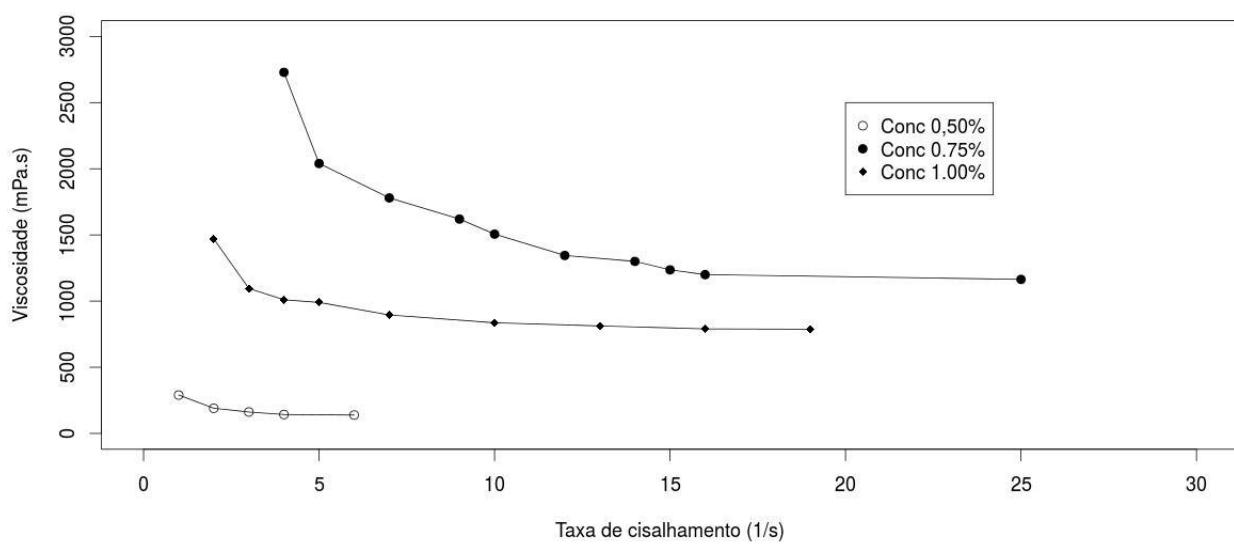


Figura 5. 14 – Variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento de soluções aquosas do biopolímero nas concentrações 0,5; 0,75 e 1%, à 25 °C.

Nos gráficos comparativos entre as leituras de viscosidade aparente das soluções aquosas das gomas produzidas, pode-se observar que a concentração de 0,5% apresenta os valores de viscosidade mais baixos, aproximadamente 143 mPa.s para uma taxa de cisalhamento de  $4\text{ s}^{-1}$  (Figura 5.14).

As soluções de 0,75% e 1% para taxa de cisalhamento de  $4\text{ s}^{-1}$ , apresentaram viscosidades de aproximadamente 2730 e 1010 mPa.s, respectivamente (Figura 5.14).

Os resultados de viscosidade das gomas obtidas pelo fungo foram maiores que os encontrados por Oliveira (2011) na caracterização reológicas de xantanas, para soluções de 1% (m/v), utilizando um viscosímetro rotacional à 25 °C e 475 mPa.s de viscosidade.

### 5.3.2- Comportamento Reológico da Goma Produzida no Biorreator à 76 Horas

A fim de verificar se após 74 horas de produção a goma sofre degradação, determinou-se a viscosidade à 76 horas de fermentação.

A Figura 5.15 representa a viscosidade da solução 0,75% da amostra do biopolímero à 76 horas de produção, em função da taxa de deformação.

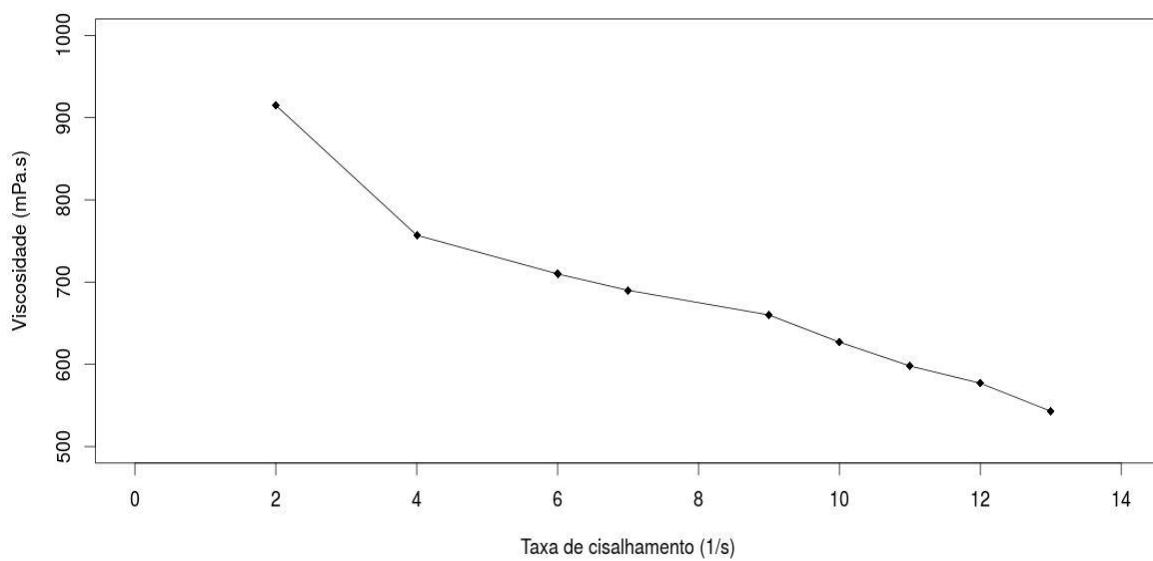


Figura 5. 15 – Variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para a goma formada à 76 horas de fermentação no biorreatador (solução a 0,75% ).

De acordo com os resultados verificados na Figura 5.15, observa-se que após 74 horas também apresentou comportamento pseudoplástico, já que a viscosidade aparente decresceu com o aumento da taxa de cisalhamento.

Pela Figura 5.15 nota-se que a viscosidade da goma formada após 74 horas (757 mPa.s à uma taxa de cisalhamento de  $4\text{ s}^{-1}$ ) de produção diminui em relação a goma formada à 74 horas (2729 mPa.s à uma taxa de cisalhamento de  $4\text{ s}^{-1}$ ) (Figura 5.14), o que aumenta as evidências da degradação da goma por enzimas produzidas pelo micro-organismo.

Assim, o tempo de fermentação de 74 horas da goma produzida no biorreatador foi o melhor tempo para se obter maiores viscosidades.

### 5.3.3- Espectroscopia na Região de Infravermelho da Goma Produzida e Goma Xanthana Comercial

A análise de espectro de infravermelho foi realizada para detectar similaridades ou diferenças na estrutura química da goma produzida no laboratório pelo fermentador Biostat B e da goma xanthana comercial.

A Figura 5.16 apresenta a espectrometria de infravermelho da goma Xanthana comercial e da goma produzida no presente estudo.

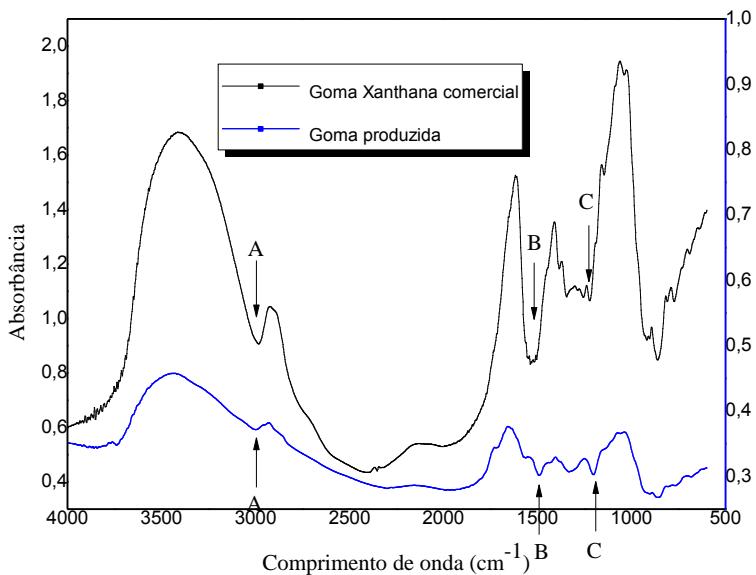


Figura 5.16 – Comparação por Espectrometria de Infravermelho da goma Xanthana comercial e da goma produzida no Biorreator (Absorbância).

Pela Figura 5.16 observa-se que o biopolímero produzido e a goma xanthana comercial apresentam diferenças nas absorbâncias, o que está associado aos grupos externos da molécula do biopolímero produzido que estão interagindo com os outros compostos do meio. Tal interação sugere que pode ser resultado da purificação incompleta tanto da goma produzida quanto da goma xanthana comercial.

O ponto A destacado na Figura 5.16 representa bandas de *overlapping* de intensidade moderada que estão associadas às vibrações das ligações C-H com banda de  $2920\text{ cm}^{-1}$ .

A banda de  $1659\text{ cm}^{-1}$  (Ponto B), esta associada a deformação axial da carbonila C=O de ésteres, ácidos carboxílicos, aldeídos e cetonas.

Na região em  $1250\text{ cm}^{-1}$  (Ponto C) observou-se a banda característica de simetria C-O, típica de enóis.

Barbosa (2007) encontrou entre  $1420$  a  $1430\text{ cm}^{-1}$  deformação angular de C-H e entre  $1050$  a  $1150\text{ cm}^{-1}$  notou-se uma deformação axial de C-O, típica de éteres, alcoóis, fenóis, ácidos graxos, ésteres e anidridos, para goma xanthana.

Faria (2009), encontrou para goma xanthana obtida a partir de *Xanthomonas campestris* pv. NRRL B-1459 utilizando caldo de cana, as bandas  $3200$ - $3450\text{ cm}^{-1}$  deformação axial de -OH,  $2850$ - $2950\text{ cm}^{-1}$  deformação axial de C-H e CHO,  $1710$ - $1730$

$\text{cm}^{-1}$  deformação axial de C=O de ésteres, ácidos carboxílicos, aldeídos e cetonas, 1530-1650 deformação axial de C=O de enóis, 1420-1430  $\text{cm}^{-1}$  deformação angular de C-H, 1050-1150  $\text{cm}^{-1}$  deformação axial de C-O.

Assim, o espectro de infravermelho da goma xanthana comercial e o obtido pela goma produzida no presente estudo mostraram que as gomas possuem natureza de carboidrato.

#### 5.3.4- Caracterização Química do Biopolímero

A Tabela 5.5 apresenta a composição monossacarídica da goma formada pelo fungo *Mucor racemosus Fresenius*.

Tabela 5. 5 – Composição monossacarídica da goma formada.

<b>Rhamnose</b>	6,6±0,5
<b>Manose</b>	28,3±1,8
<b>Galactose</b>	32,1±0,8
<b>Glucose</b>	22,5±1,1
<b>Ácidos urônicos</b>	10,5±1,4

Como mostra a Tabela 5.5 a goma apresenta maiores quantidades dos açúcares manose, galactose e glucose, e menores quantidades de rhamnose e ácidos urônicos.

A xanthana comercial sintetizada pela *Xanthomonas campestris pv campestris* é composta de D-glucose, D-manose, ácido D-glucurônico, ácido pirúvico e O-acetil (Sloneker & Jeanes, 1962). Outros componentes também são encontrados em polissacarídeos sintetizados por bactérias descritas como outras espécies de *Xanthomonas* (Sutherland, 1993).

Konicek *et al.* (1977) relataram na espécie *Fusca*s a presença de galactose e ribose no polissacarídeo sintetizado por cepas mutantes. Lowson & Symes (1977) relataram a presença de rhamnose no polímero sintetizado pelos *Patovares juglandis e pruni* e xilose no polissacarídeo sintetizado pelo *Patovar phaseoli*.

## 6 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- O glicerol se mostrou viável para a produção de biopolímero utilizando o fungo do cerrado *Mucor racemosus Fresenius*;
- Nos testes em erlenmeyers verificou-se que na melhor condição das variáveis estudadas: com vazão de ar de 4 vvm na fase de produção (72 h após as 24 h sem aeração), concentração de glicerol de 50 g/L, em mesa giratória à 100 rpm, 120 horas de idade de cultivo do inóculo e sem reposição de meio durante a fermentação, houve a produção de 14,21 g/L de goma formada e 67,7% de consumo de glicerol.
- A cinética estudada no Fermentador Biostat B empregando as variáveis estudadas em erlenmeyers foi satisfatória, uma vez que se obteve desempenho positivo de produção de goma e consumo de glicerol. Em 74 horas de processo houve uma produção máxima de 23 g/L de biopolímero e consumo de glicerol de 75%;
- A diminuição da viscosidade da goma produzida após 74 horas aumentou as evidências de degradação da mesma pelas enzimas produzidas pelo micro-organismo;
- As soluções de 0,75%, 1% e 0,5% do biopolímero apresentaram comportamento pseudoplástico;
- O espectro de infravermelho da goma xantana comercial e a obtido pela goma produzida no presente estudo mostraram que as gomas possuem natureza de carboidrato.
- Em termos de composição química a goma apresentou maiores quantidades dos açúcares manose, galactose e glucose, e menores quantidades de rhamnose e ácidos urônicos.

## **7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Otimizar as condições de produção;
- Aprofundar a caracterização química e reológica deste biopolímero;
- Melhorar o processo de purificação da goma;
- Verificar a produção de goma pelo micro-organismo em estudo utilizando glicose como fonte de carbono.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C; LEITE, V. M.; SETTE, L. D.; SILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochm. Biotechnol.**, v. 161, p. 333-346, 2010.
- AMANULLAH, A.; SERRANO, L. C.; GALINDO, E.; NIENOW, A. W. Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. **Biotechnology Progress**, New York, v. 12, n. 4, p. 466-473, Jul./Aug. 1996.
- ANP-Agência Nacional do Petróleo e gás. Gás natural e Biocombustíveis. **Agência Nacional do Petróleo e gás**. Disponível em: <[www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br)>. Acesso em: 8 fevereiro 2014.
- ANTÔNIO, E. A. et al. Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos. **I Simpósio de Integração Científica e Tecnológica do Sul Catarinense - SICT**, Santa Catarina, 3, n. 1, 2012.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **ANVISA**. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/alimentos/aditivosalimentares.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/aditivosalimentares.htm)>. Acesso em: 12 Junho 2013.
- ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 26, p. 56-62, 2007.
- ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. Evaluation of rheological properties of the exopolysaccharide of *Sphingomonas*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 442-445, 1995. ISSN 4-5.
- AYUB M. A. Z., R. D. M. Bioconversão de Glicerol residual da síntese de Biodiesel em 1,3-propanodiol e etanol por *K.pneumoniae*. **x Oktoberforum**, Porto Alegre, outubro 2011. 1-6.
- BARBOSA, A. M. et al. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, p. 29-42, Janeiro/Junho 2004.

BARBOSA, L.C.A. **Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos**. Ed. UFV. Viçosa,2007, p. 13-60.

BARRETO, M. D. C. S. et al. Produção e Comportamento Reológico de Biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 17, p. 221-227, Abril-Junho 2011.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. D. Glicerol: Um breve histórico e aplicação em sínteses estereoseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.

BERWANGER, A. L. S. **Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por Sphingomonas capsulata**.Erechim: Universida de Regional Integrada do Alto do Uruguai e das Missões. p. 18-31. Dissertação (Mestrado). Revista Ciências do Ambiente, São Paulo, v. 3, n 1, fev.2007.

BEYER, R.; MELTON, D. L.; KENNEDY, D.L. Viscosity studies on the polysaccharide gum from Rhizobium strain CB 744. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 39, p.151-161. 1987.

BIODIESELBR. **Biodiesel Brasil**. Disponivel em: <[www.biodieselbr.com/efeito-estufa/co2/efeito-estufa-dioxido.htm](http://www.biodieselbr.com/efeito-estufa/co2/efeito-estufa-dioxido.htm)>. Acesso em: 26 março 2014.

BIODIESELBR-PORTAL de Informações sobre Biodiesel. **Biodiesel Brasil**. Disponivel em: <[www.biodieselbrasil.com.br](http://www.biodieselbrasil.com.br)>. Acesso em: 3 fevereiro 2014.

BLACK, G. E.; FOX, A. Recent progress in the analysis of sugar monomers from complex matrices using chromatography in conjunction with mass spectrometry or atand-alone tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, p. 51-60, 1996.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Introdução à química de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992. 223 p.

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthana. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers - biology, chemistry, biotechnology and applications**. [S.I.]: [s.n.], 2002. p. 259-291.

BORZANI, W. Engenharia bioquímica In: BORZANI, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., SCHMIDELL, W. 1 ed. São Paulo, Edgard Blucher, 2001. (Biotecnologia Indistrial, v.2).

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 6.2, p. 127-139, 2011. ISSN 1809-8797.

CALLAM, C. S. et al. Computacional analysis of the potencial energy surfaces of glycerol in the gas and aqueous phases: effects of level of theory, basis set, and solvation on strongly intramolecularly hydrogen-bonded systems. **J Am chem Soc**, v. 123, n. 47, p. 11743-11754, novembro 2001.

COLEGROVE, G.T. Agricultural Applications of Microbial Polysaccharides. **I&EC Prod. Res. Dev**, v.22, p. 456-460, 1983.

CHATZIFRAGKOU, A. et al. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Elsevier**, v. 36, p. 1097-1108, Fevereiro 2011. ISSN 2.

CHHABRA, R. P. E. R. J. F. Non-Newtonian Flow in the Process Industries Fundamentals and Engineering Applications. **Butterworth Heinemann**, Great Britain, p. 436, 1999.

CHI, Z. and ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme Microb Technologic**. v.33,p. 206–211, 2003.

DEMIRBAS, A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. **Energy Convers Manage**, Amsterdam, v. 44, n. 13, p. 2019-2093, 2003.

DIECKELMANN, G.; HEINZ, H. J. E. **The Basics of Industrial Oleochemistry**. [S.l.]: Publisher P. Pomp, 1988. 123 p.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.17, p.25-39, 2003.

**DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen**. Disponível em: HYPERLINK "<http://www.dsmz.de/>" \t "\_blank" <http://www.dsmz.de/> . Acesso em 08/10/2013.

FARIA, L.H.B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias Isoladas de amostras do solo**. São José do Rio Preto, 2002.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas, Universidade Estadual Paulista.

**FARIA , S. Otimização da produção e caracterização da goma xantana empregando caldo de cana. Uberlândia, 2009.** Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia.

**FELIZARDO, P. M. G. . B. R. . B. J. C. . C. M. J. N. Produção de Biodiesel a Partir de Óleos Usados de Fritura.** Instituto Superior Técnico. Lisboa. 2003.

**FISCHER, J. Produção de etanol de segunda geração pelo uso de complexo enzimático de cepas selecionadas do ecossistema do cerrado.** Tese de doutorado. Universidade Federal de Uberlândia. Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, 2014.

**GADD, G. M. Carbon Nutrition and Metabolism.** In: Physiology of Industrial Fungi. Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK, 1988.

**GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 7, p. 549-579, nov. 2000.

**GLAZER, A.; NIKAIDO, H. Microbial Biotechnology:** Fundamental of Applied Microbiology. 2. ed. New York: W.H. Freeman, 1995. 50 p.

**HOLANDA, A. Biodiesel e inclusão social.** Câmara dos Deputados. Brasília, p. 200. 2004.

**HWANG, H. J. et al.** Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. **Elsevier**, v. 38, p. 1025-1030, Fevereiro 2003. ISSN 7.

**IVANOV, Raphael C. et al.;** Produção de biopolímero sintetizado pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* em fermentação submersa. **XIV SICITE – UTFPR**, v. 2, 2009.

**ITO, T. et al.** Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 260-265, 2005.

KANG, K. S., VEEDER, G. T., MIRRASOUL, P. J., KANEKO, T., COTTRELL, I. W. Agar-like polysaccharides produced by a *Pseudomonas* species: production and basis properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1086-1091, 1982.

KATHA, S. S. Medical Hypotheses. **Elsevier**, v. 53, n. 4, p. 338-344, outubro 1999.

KERR, B. J.; HONEYMAN, M.; LAMMERS, P. Feeding Bioenergy Coproducts to Swine. Iowa Pork Industry Center. **Animal Science**, Iowa, dezembro 2007.

KONICEK, J.; LASÍK, J.; WURST, M. Production and characteristics of the exocellular polysaccharide in mutant strains of *Xanthomonas fuscans*. **Folia Microbiol**, v. 22, p. 12-18, 1977.

LEVINSON, W. E.; KURTZMAN, C. P.; M.T., K. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Elsevier**, v. 41, n. 3, p. 292-295, 2007.

LIDE, D. R. **Handbook of Chemistry and Physics**. 87. ed. Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2006.

LIN, E.C.C. **Glycerol utilization and its regulation in mammals. Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 765-795, 1977.

LEWIS, M. J. **Propiedades Físicas de los Alimentos y los Sistemas de Processo**. Zaragoa: Editorial Acribia S. A., 1993.

LOPES, L., ANDRADE, C. T. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos. **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro, v.703, p.19-23, out./dez 1995.

LOWSON, C. J.; SYMES, K. C. Oligosaccharides produced by partial acetolysis of xanthan gum. **Carbohydrates Research**, v.58, p. 433-438, 1977.

LUVIZETTO, D. J. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para produção do biopolímero poli(3-hidroxidobutirato) e modelagem matemática do bioprocesso**. Porto Alegre, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MAUGERI, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U. A., et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, v. 3, 2001. p. 593.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of Basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 77-84, Novembro 1999. ISSN 0001-3714.

MENTEN, J. F.; PEREIRA, P. W. Z.; RACANICCI, A. M. C.. **Avaliação da glicerina proveniente do biodiesel como ingrediente para rações de frango de corte**. Conferência APINCO 2008 de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. 2008. p. 66.

MOREIRA, A. S. Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* *pv pruni*. 2002. 73f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MORRIS, V. J. Bacterial Polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharide and their applications**. New York: Basel Marcel Dekker, 1995. p. 341-375.

MORRISON, L. R. Glycerol. In: **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: [s.n.], 1994. p. 921-932.

MOSCARDINI, M. S.; TIERA, M. J.; OLIVEIRA, V. A. D. Síntese e estudos fotofísicos em solução de dextrana modificada hidrofobicamente. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, 2000.

MOTT, R. L. **Mecânica de Fluidos Aplicada**. México: Prentice- Hall Hispanoamericana S.A., 1996.

MOUROT, J.; AUMAITRE, A.; MOUNIER, A.; PEINIAU, P.; FRANÇOIS, A.C. Nutritional and physiological effects of dietary glycerol in the growing pig. Consequences on fatty tissues and post mortem muscular parameters. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 38, p. 237-244, 1994.

OLIVEIRA, K. S. M., et. al. “**Influência da temperatura de produção sobre a concentração, viscosidade aparente e parâmetros e k do biopolímero produzido por *Xanthomonas campestris* *pv campestris***”. Disponível em: [http://prope.unesp.br/xxi\\_cic/27\\_06627212684.pdf](http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_06627212684.pdf). Acessado em 08 de maio de 2013.

PACE, G. W. Polímeros Microbianos. In: BU'LOCK, J. & KRISTIANSEN, B, **Biotecnologia Básica**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1991.

PADILHA, F.F. **Síntese e caracterização de biopolímeros por *Beijerinckia* sp 7070**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1997.

PAPANIKOLAU, S.; CHATZIFRAGKOU, A.; DIETZ, D.; DOULGERAKI, A.I.; NYCHAS, G.J.E.; ZENG, A. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. **Biotechnological products and process engeneering**. p. 101-112, 2011.

PAGLIARO, M. et al. From Glycerol to Values-Added Products. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, p. 4434-4440, Abril 2007. ISSN 24.

PARENTE, E. J. D. S. **Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado**. Fortaleza: Tecbio, 2003. 66 p.

PEREIRA, J. N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de Bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química:UFRJ, v. 1, 2008. 62 p.

PICTON, L. MOCANU, G., MIHAI, D. Chemically modified exopolysaccharide pullulans: physico-chemical characteristics of ionic derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 131 - 136, 1995.

PIESKER, M.; DERSJANT-LI, Y. Glycerol in Animal Nutrition - Versatile coproduct of biodiesel production. **Feedmagazine Kraftfutter**, 2006.

PINHEIRO, R. S. et al. Estudo da produção microbiana de álcool utilizando glicerol como substrato. **VII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Uberlândia, Julho 2009.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. 1 ed. Pelotas: EDUFPel, 2000. v. 3.

RIVALDI, J. D. et al. **Glicerol de Biodiesel**, São Paulo, n. 37, 2007. 44-51.

ROJAS, J. A.; ROSELL, C. M.; DE BARBER, C. B. Pasting properties of different wheat flour hydrocolloid systems. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 13, p. 27-33, 1998.

SAMSON, R. A; et al. **Introduction to Food-Borne Fungi**, 4nd ed., CBS, Netherlands, 1995.

SARANGI, I. et al. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **International Immunopharmacology**, 6, 2006. 1287-1297.

SARUBBO, L.A., MARÇAL, M.C.R, CAMPOS-TAKAKI, G.M. Comparative study on bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* strains. **Arq. Biol. Technol.**, v.40, p. 707-720, 1997.

SCAMPARINI, A; MARIUZZO, D; FUJIHARA, H; JACOBUSI, R; VENDRUSCOLO, C. Structural Studies of CV-70 Polysaccharide. **International journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 115-121, 1997.

SCHIAVÃO SOUZA, T. D. et al. Produção de exopolissacarídeos por Bactérias Probióticas: Otimização do Meio de Cultura. **Brazilian Journal od food technology**, Campinas, v. 10, n. 1, p. 27-34, Fevereiro 2007. ISSN 1517-7645.

SELBMANN, L. et al. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Elsevier**, v. 153, p. 585-592, Novembro 2002. ISSN 9.

SERVIOUR, R. J. et al. Production of Pullulan and other Exopolysaccharides by Filamentous Fungi. **Biotechnology Research Centre**, Victoria, v. 12, n. 3, p. 279-298, 1992.

SILVA, M. D. L. C. D. et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 85-92, Agosto 2006.

SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B - 1459. **Canadian Journal of Chemistry**. vol. 40, p. 2066-2071, 1962.

SUDHAKAR, V.; SINGHAL, R.S.; KULKARNI, P.R. Starch-Galactomannan interactions: functionality and rheological aspects. **Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 259-264, 1996.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gramnegative. **International Dairy Journal**, Barking, 11, 2001. 663-674.

SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 363-388.

TAVARES, R. “**Apostila de práticas – Físico-Química**”. Universidade Federal do Ceará. Disponível em: [http://www.labufc.com.br/arqs/Apostila\\_FQII.pdf](http://www.labufc.com.br/arqs/Apostila_FQII.pdf). Acessado em 6 de fevereiro de 2013.

THOMPSON, J. C. . H. B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 22, n. 2, p. 261-265, dezembro 2005. ISSN 0883-8542.

VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M.; KAMAT, M. Y. Production and optimization of certain growth parameters for na exopolysaccharide from Azotobacter vinelandii MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, 80, n. 6, 1995. 599-602.

VIEIRA, B. M. et al. Síntese do Biodiesel para obtenção do álcool alílico. **ENPOS-Encontro de pós graduação**, Pelotas, 2011.

WANG, Z. W. et al. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Elsevier**, v. 19, n. 3, p. 201-223, Junho 2001.

WOICIECHOWSKI, A. L. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de goma xantana a partir de resíduo agroindustrial de café e de mandioca**. 153f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963a.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-68, 1963b.

XIU, Z. L. et al. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by Klebsiella pneumoniae under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. **Springer Science**, China, v. 29, p. 1281-1285, Agosto 2007. ISSN 8.

YANG, Q.; CHEN, B.; JI, X.; HE, Y. F.; CHEN, Q. G. Exergetic evaluation of corn-ethanol production in China. *Comm Nonlinear Sci Num Simulat.* Amsterdam, v. 14, n. 5, p.2450-2461, 2009.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path economic viability for the biofuels industry. **Elsevier**, v. 18, p. 213-219, Junho 2007. ISSN 3.

YUKIHIRO, N. et al. Curdlan: Properties and application to foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 3, p. 769-772, 1991.

ZANATTA, M. et al. Avaliação da produção de exopolissacarídeo pelo fungo *L. theobromae* MMPI em meio formulado com meloço de cana-de-açúcar suplementado com sais minerais. **SICITE XVII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR**, Curitiba, 2012.

## APÊNDICE 1:

### MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE GLICEROL (TIOGLIÓLICO)

O método para determinação do consumo de glicerol foi realizado de acordo com o procedimento citado abaixo:

- Diluir as amostras adequadamente;
- Adicionar à um tubo de ensaio 1 mL da amostra previamente diluída e 1 mL do Reagente Cor (Kit de Detecção de Triglicérides);
- Esperar por 15 minutos, até a completa estabilização da cor;
- Fazer a leitura da absorbância com comprimento de onda de 600 nm no espectrofotômetro;
- Converter o valor da leitura em concentração g/L de glicerol por meio de uma curva-padrão previamente construída.

Para a determinação da concentração de glicerol, foi construída previamente uma curva de calibração ( $C_{glicerol} = 0,085Abs + 0,000, r^2 = 0,99$ ), os dados desta curva estão apresentados na Figura A.1.

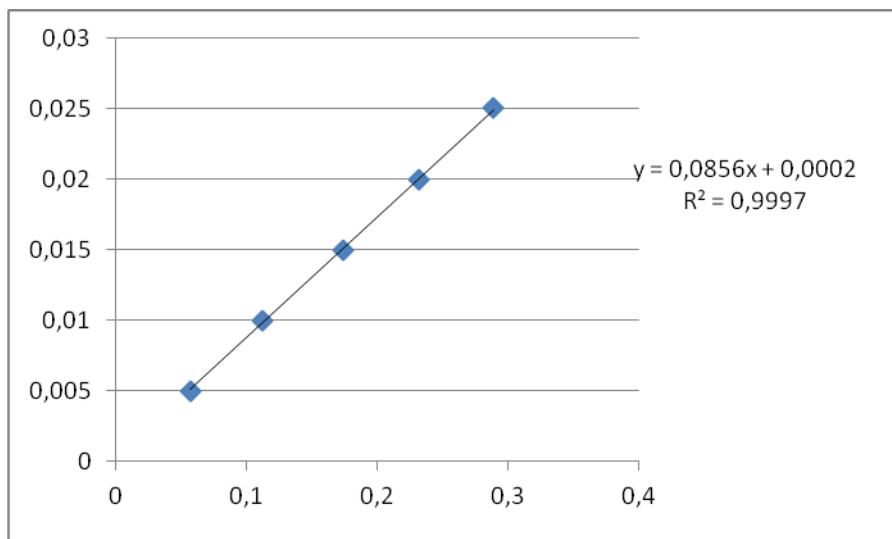


Figura A.1 – Curva de calibração para determinação da concentração de glicerol.