



**Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Química – IQ
Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Estratégias para a obtenção de ácido láctico
via processo fermentativo, sua modificação
química e aplicação na síntese de polímeros**

Raissa Gabriela Martins Reis Barroso

**Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.
Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.**

**Brasília, DF
2019**



**Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Química – IQ
Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ**

Estratégias para a obtenção de ácido láctico via processo fermentativo, sua modificação química e aplicação na síntese de polímeros

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Raissa Gabriela Martins Reis Barroso

**Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.
Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.**

**Brasília, DF
2019**

**Estratégias para a obtenção de ácido láctico via
processo fermentativo, sua modificação química e
aplicação na síntese de polímeros**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ELABORADA POR:
RAISSA GABRIELA MARTINS REIS BARROSO**

**COMO REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM QUÍMICA**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabricio Machado Silva
Instituto de Química – UnB

Prof. Dr. Fabio Moreira da Silva
Instituto de Química – UnB

Dra. Thais Fabiana Chan Salum
Embrapa

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Raissa Gabriela Martins Reis Barroso**, matrícula nº **17/0089231**, intitulada ***"Estratégias para a obtenção de ácido láctico via processo fermentativo, sua modificação química e aplicação na síntese de polímeros"***, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 26 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Fabrício Machado Silva
Presidente de Banca

Prof. Dr. Fábio Moreira da Silva
Membro Titular

Dra. Thaís Fabiana Chan Salum
Membro Titular EMBRAPA Agroenergia

Prof.^a Dra. Simone Monteiro e Silva
Membro Suplente

Em 26 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as graças concedidas.

A meus pais e minha irmã, por todo amor, apoio e carinho de sempre. Vocês foram essenciais. Obrigada por sempre me incentivarem e acreditarem no meu potencial.

Agradeço a meu esposo Pedro Rafael por todo amor, paciência e cumplicidade durante todos esses anos. Sou muito grata por ter sempre ao meu lado alguém que me inspira e me faz ser uma pessoa melhor.

A meus orientadores Fabricio Machado e Sílvia Belém, pelo acolhimento, paciência, suporte e por me proporcionar tantos aprendizados. Vou levar esses ensinamentos para todos aspectos da minha vida.

A Universidade de Brasília e a Embrapa Agroenergia, pela oportunidade de desenvolver este projeto.

A meus amigos e colegas de bancada por participarem de todas as etapas deste projeto. Sou grata por ter a oportunidade de trabalhar com pessoas tão queridas e competentes. Vocês contribuíram muito para esse trabalho.

Por fim, agradeço a todos que torceram e acreditaram em mim.

Resumo

Grande parte dos polímeros são produzidos a partir do petróleo e fibras sintéticas. Tais materiais são dependentes de matéria prima não renovável e necessitam de longos períodos de tempo para a sua degradação. Com isso, há um interesse no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis. O poli(ácido láctico) – PLA é um material de interesse na área científica, por ser um polímero biodegradável e ser utilizado na área biomédica. Este trabalho teve três objetivos principais: a produção de ácido láctico por via fermentativa utilizando a bactéria *Klebsiella* sp., a síntese e caracterização de um monômero derivado do ácido láctico e sua aplicação na síntese de novos materiais poliméricos. O processo fermentativo foi realizado utilizando glicerol, subproduto da indústria de biodiesel, para produção de produtos químicos de alto valor agregado (ácido láctico). Inicialmente foram realizados experimentos com a *Klebsiella* sp. para verificar seu comportamento em um sistema avaliando os efeitos que a quantidade de inóculo, pH e temperatura têm sobre o consumo de glicerol, produção de biomassa e ácido láctico. Em temperaturas mais elevadas e pH mais básicos, observou-se maiores produções de ácido láctico. A concentração de inóculo mostrou-se pouco significativa para a produção de ácido láctico. O melhor rendimento obtido para produção de ácido láctico foi para fermentação em minirreatores, que 92,5% do glicerol foi convertido em ácido láctico. Em reator, obteve-se aproximadamente 3,0 g/L de ácido láctico. Na segunda parte do projeto, o ácido láctico passou por um processo de esterificação com o ácido acrílico para a obtenção de um monômero polimerizável via mecanismo de poliadição. Esse monômero foi caracterizado por técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e infravermelho *in situ*. Os resultados preliminares mostraram que a esterificação do ácido láctico com ácido acrílico pode ser realizada com sucesso, originando monômero apto à polimerizações com o objetivo de sintetizar polímeros para aplicações biomédicas. Foram sintetizados copolímeros de metacrilato de metila com 0, 5, 10 e 20% de ácido láctico modificado. O efeito da incorporação do ácido láctico modificado no copolímero foi estudado, indicando que houve variações nos valores de T_g , M_w , M_n e na dispersão da massa molar dos polímeros, em copolimerizações em miniemulsão com conversões elevadas, variando entre 80 e 97%.

Palavras-chave: Ácido láctico, ácido acrílico, fermentação, *Klebsiella* polimerização em miniemulsão.

Abstract

The majority of polymers is produced from petroleum and synthetic fibres. Such materials depend on non-renewable raw material and need long periods for degradation. Therefore, there is an interest in the development of biodegradable polymers. Poly(lactic acid) – PLA is a material of interest in the scientific area, both as a biodegradable polymer and for use in biomedicine. This work had three main objectives: the production of lactic acid through fermentation using the *Klebsiella* sp. bacteria; the synthesis and characterization of a monomer derived from lactic acid and its application in the synthesis of new polymeric materials. The fermentation process was performed using glycerol, a sub-product of the biodiesel industry, to the production of chemicals products of high added value (lactic acid). Initially, experiments were performed with the *Klebsiella* sp. to verify its behaviour in a system, observing the effects that the amount of inoculum, pH, and temperature had over the consumption of glycerol, biomass production, and lactic acid. At higher temperatures and more alkaline pH solutions, a larger production of lactic acid was observed. The amount of inoculum was not-significant to lactic acid production. The best yield obtained to lactic acid production was through fermentation in mini-reactors where 92,5% of glycerol was converted into lactic acid. In the second part of the project, the lactic acid was esterified with acrylic acid to obtain a monomer polymerizable via polyaddition mechanism. This monomer was characterized through nuclear magnetic resonance and *in situ* infrared techniques. Preliminary experimental results have shown that the esterification of lactic acid with acrylic acid can be successfully carried out to produce polymerizable monomer intended for the synthesis polymers for biomedical applications. Copolymers of methyl methacrylate with 0, 5, 10 and 20% of modified lactic acid were synthesized. The effect of the incorporation of the modified lactic acid in the copolymer was studied, indicating that there were variations in the T_g , M_w , M_n and dispersion of the molar mass of the polymers, in high conversion copolymerizations of 80 to 97%.

Keywords: Lactic acid, acrylic acid, fermentation, *Klebsiella* sp., miniemulsion polymerization.

Sumário

1 - Introdução	1
1.1 Objetivos gerais	2
1.1.1 Objetivos específicos	2
1.3 Estrutura do projeto	2
2 - Revisão bibliográfica	4
2.1 Ácido lático e suas propriedades e aplicações	4
2.2 Formas de obtenção do ácido lático.....	5
2.2.1 Síntese química.....	5
2.2.2 Processos fermentativos.....	6
2.2.2.1 Fermentação contínua.....	7
2.2.2.2 Fermentação descontínua.....	8
2.3 Cinética dos processos fermentativos.....	9
2.4 Produção de químicos pela fermentação microbiana de glicerina	10
2.4.1 Bactéria <i>Klebsiella</i> sp.....	13
2.4.2 Purificação do ácido lático	15
2.5 Polimerização.....	15
3 - Materiais e métodos	20
3.1 Materiais	20
3.1.1 Equipamentos.....	20
3.2 Métodos	21
3.2.1 Seleção da bactéria.....	21
3.2.2 Avaliação da influência dos principais parâmetros de fermentação no crescimento da <i>Klebsiella</i> sp.....	21
3.2.2.1 Correlação da massa de bactéria com a densidade ótica	21
3.2.2.2 Crescimento de pré-inóculo	22
3.2.2.3 Produção de ácido lático por <i>Klebsiella</i> sp. via fermentação em mini reatores	22
3.2.2.4 Produção de ácido lático por <i>Klebsiella</i> sp. via fermentação em tubos do tipo falcon	23
3.2.2.5 Planejamento fatorial completo para fermentações com <i>Klebsiella</i> sp.: 1º Conjunto de Experimentos.....	23
3.2.2.6 Plano central composto rotacional (PCCR) para fermentações com <i>Klebsiella</i> sp.: 2º Conjunto de Experimentos.....	24
3.2.2.7 Fermentações com <i>Klebsiella</i> sp. em Biorreator.....	25
3.2.2.8 Análise de cromatografia líquida de alta eficiência	26
3.2.3 Esterificação seletiva de ácido lático com ácido acrílico	27
3.2.3.1 Reação de copolimerização em miniemulsão com metacrilato de metila	29
3.2.3.2 Técnicas de caracterização do monômero oriundo das reações de esterificação e do copolímero	30
4 - Resultados e discussão	32
4.1 Seleção da bactéria	32
4.1.1 Avaliação da produção de ácido lático em minirreatores.....	32
4.1.2 Avaliação da produção de ácido lático em frasco tipo falcon.....	32
4.1.3. Avaliação dos parâmetros de fermentação para uma melhor produção de ácido lático, utilizando glicose como fonte de carbono: Planejamento Fatorial Completo.....	36
4.1.3.1 Análise da significância dos fatores e suas interações na produção de ácido lático utilizando a glicose	36

4.1.3.2 Análise da significância dos fatores e suas interações na produção de propanodiol para o consumo de glicose	39
4.1.4 Planejamento Fatorial Completo: Avaliação dos parâmetros de fermentação para uma melhor produção de ácido lático, utilizando glicerol como fonte de carbono.....	40
4.1.4.1 Análise da significância dos fatores e suas interações na produção de ácido lático para o consumo de glicerol	41
4.1.4.2 Análise da significância dos fatores e suas interações na produção de propanodiol para o consumo de glicerol.....	43
4.1.5. Plano central composto rotacional (PCCR): Avaliação dos parâmetros de fermentação para uma melhor produção de ácido lático utilizando glicerol como fonte de carbono.....	45
4.1.5.1 Análise da significância dos fatores e suas interações na produção de ácido lático	45
4.1.5.2 Análise da significância dos fatores e suas interações para a produção de propanodiol	46
4.1.5.3 Análise da significância dos fatores e suas interações para o consumo de glicerol	47
4.1.6. Produção de ácido lático em biorreator	48
4.2 Esterificação seletiva de ácido lático com ácido acrílico	49
4.3 Reações de copolimerização em miniemulsão	54
4.3.1 Descrição macroscópica	54
4.3.2 Distribuição do tamanho de partícula	54
4.3.3 Avaliação cinética da reação de polimerização	56
4.3.4 Composição da cadeia polimérica	61
5 – Conclusões e Perspectivas	64
7 - Referências	65

Lista de Abreviações e Acrônimos

ALM	Ácido láctico modificado
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CMC	Concentração micelar crítica
D_M	Dispersão de massa molar
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMM	Distribuição de massa molar
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com transformadas de Fourier (<i>Fourier-transform infra red spectroscopy</i>)
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HD	Hexadecano
KPS	Persulfato de potássio
LDH	Lactato desidrogenase
MMA	Metacrilato de metila
M_n	Massa molar média em número
M_w	Massa molar média em massa
nLDH	Lactato-desidrogenase
P	Fosfato
PDH	Piruvato desidrogenase
PFL	Piruvato formato liase
PLA	Poli(ácido láctico)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SLS	Lauril sulfato de sódio
T_g	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
THF	Tetra-hidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TSB	Caldo Triptona de Soja (<i>Tryptic Soy Broth</i>)

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura química da molécula de ácido láctico.	4
Figura 2 – Reações de obtenção do ácido láctico por síntese química (Adaptado de NARAYANAN et al. ¹⁸ e LOPES. ¹⁰).....	6
Figura 2 - Vias catabólicas das bactérias lácticas. Homofermentação (A), heterofermentação (B) e fermentação de vários ácidos a partir do piruvato (C). P = fosfato, LDH = Lactato desidrogenase, PFL = piruvato formato liase, e PDH = piruvato desidrogenase (Modificado de HOFVENDAHL e HÄGERDAL ^{10,12}).....	7
Figura 3 - Configuração geral do sistema de biorreatores para cultivos contínuos: 1) Frasco contendo meio de alimentação estéril; 2) Biorreator; 3) Frasco para coleta do meio de saída; 4) Bomba peristáltica de alimentação de meio; 5) Bomba peristáltica pra retirada de meio; 6) Sistema de agitação (BASSO ¹⁴).....	8
Figura 5 - Curva de crescimento microbiano.	10
Figura 6 - Vias metabólicas de <i>Klebsiella oxytoca</i> a partir de glicerol (Adaptado de ROMIO ²⁶)	14
Figura 7 – Etapa de nucleação. A cabeça da molécula de surfactante é hidrofílica e a cauda corresponde a parte hidrofóbica e retém o monômero em seu interior (OLIVEIRA ³⁷).....	17
Figura 8 - Curva padrão para determinação da concentração de bactéria.	22
Figura 9 - Sistema de Fermentação New Brunswick, modelo Bioflo/celligen 115.	26
Figura 10 - Sistema utilizado para a esterificação seletiva de ácido láctico e ácido acrílico, onde 1 é o funil de adição, 2 é o <i>Dean Stark</i> acoplado com condensador, 3 a sonda de infravermelho In Situ e 4 a bomba de vácuo.....	27
Figura 11 – Fluxograma do processo de polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila.....	29
Figura 12 - Avaliação da produção de ácido láctico por <i>Klebsiella</i> sp. em diferentes condições de concentração de inóculo em tubos do tipo falcon de 15 mL.....	33
Figura 13 - Avaliação da produção de ácido láctico em diferentes condições de agitação para a proporção de 1:12 de meio em tubos do tipo falcon de 15 mL.....	34
Figura 14 - Avaliação de glicerol residual em diferentes condições de agitação para a proporção de 1:12 de meio em tubos do tipo falcon de 15 mL.....	34
Figura 15 - Avaliação da produção de propanodiol em diferentes condições de concentração de inóculo em tubos do tipo falcon de 15 mL.....	35
Figura 16 - Avaliação da produção de propanodiol em diferentes condições de agitação para a proporção de 1:12 de meio em tubos do tipo falcon de 15 mL.....	35
Figura 17 – Produção de ácido láctico e propanodiol obtidos em meio M9 com 10% de glicose por 48 horas para condições referentes aos experimentos do planejamento fatorial.	36
Figura 18 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de ácido láctico utilizando glicose como substrato (A) e predição do modelo de regressão (B) para 48 horas de fermentação com glicose.	37
Figura 19 - Curva de nível para experimento com glicose relacionando (A): temperatura (X1) com concentração celular (X2); (B): temperatura (X1) com pH (X3) e (C) concentração celular (X2) com pH (X3) para produção de ácido láctico por <i>Klebsiella</i> sp.....	38
Figura 20 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de propanodiol utilizando glicose como substrato.	39
Figura 21 - Curva de nível para experimento com Glicose relacionando (A): temperatura (X1) com concentração celular (X2); (B): temperatura (X1) com pH (X3) e (C) concentração celular (X2) com pH (X3) para produção de propanodiol.....	40

Figura 22 – Produção de ácido láctico e propanodiol obtidos em meio M9 com 10% de glicerol por 48 horas para as condições referentes aos experimentos do planejamento fatorial.....	41
Figura 23 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de ácido láctico utilizando glicerol como substrato (A).	42
Figura 24 – Curva de nível para experimento com Glicerol relacionando (A): temperatura (X1) com concentração celular (X2); (B): temperatura (X1) com pH (X3) e (C) concentração celular (X2) com pH (X3) para produção de ácido láctico.....	42
Figura 25 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de propanodiol utilizando glicerol como substrato.	43
Figura 26 - Curva de nível para experimento com Glicerol relacionando (A): temperatura (X1) com concentração celular (X2); (B): temperatura (X1) com pH (X3) e (C) concentração celular (X2)) com pH (X3) para produção de propanodiol.....	44
Figura 27 - Produção de ácido láctico e propanodiol obtidos em meio M9 com 4% de glicerol por 72 horas para as condições referentes aos experimentos do planejamento central composto rotacional.....	45
Figura 28 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de ácido láctico utilizando glicerol como substrato (A); para 72 horas de fermentação com glicerol e curva de nível (B) para experimento relacionando densidade óptica (X1) com pH (X2).	46
Figura 29 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de propanodiol utilizando glicerol como substrato (A); Predição do modelo de regressão (B) para 72 horas de fermentação com glicerol e curva de nível (C) para experimento relacionando densidade óptica (X1) com pH (X2).....	47
Figura 30 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação ao consumo de glicerol (A); Predição do modelo de regressão (B) para 72 horas de fermentação com glicerol.	48
Figura 31 – Gráfico de superfície para o consumo de glicerol para experimentos do planejamento fatorial 2 (A) e curva de nível (B) para o consumo de glicerol para experimento relacionando densidade óptica (X1) com pH (X2).....	48
Figura 32 – Reação de esterificação entre o ácido láctico e ácido acrílico.	50
Figura 33 – Perfil de consumo de reagentes e formação dos produtos durante a reação de esterificação seletiva entre o ácido láctico e ácido acrílico obtido através na sonda de infravermelho <i>in situ</i> onde os reagentes estão representados pela linha roxa e os produtos pela linha vermelha.	50
Figura 34 - Desconvolução dos espectros de infravermelho dos reagentes (roxo) e do produto (vermelho).	51
Figura 35 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da reação de esterificação seletiva entre o ácido láctico e o ácido acrílico. Espectro 1 - Meio reacional inicial. Espectro 2 - Meio reacional final.	52
Figura 36 – Aspecto macroscópico das miniemulsões de metametilacrilato e ácido láctico modificado e material sólido formado após a polimerização em miniemulsão para as concentrações de 0, 5 10 e 20% de ácido láctico modificado em matriz de metacrilato de metila.	54
Figura 37 - Distribuições de massa molar (DMM) dos copolímeros MMA/ALM e o efeito do aumento da concentração de ALM no sistema de reação.	56
Figura 38 - Dados experimentais para o copolímero com 10% de ALM – reação 1: Massas molares médias (M_w e M_n) e a dispersão da massa molar (\mathcal{D}_M) relativos ao copolímero 10% MMA e 90% ALM) obtidos via processo de polimerização em miniemulsão.	58
Figura 39 - Distribuições de massa molar (DMM) dos copolímeros 90% MMA/10% ALM e o efeito do tempo no sistema para reação 1.	58
Figura 40 - Dados experimentais para o copolímero com 10% de ALM – reação 2: Massas molares médias (M_w e M_n) e a dispersão da massa molar (\mathcal{D}_M) relativos	

ao copolímero 10% ALM e 90% MMA obtidos via processo de polimerização em miniemulsão.	60
Figura 41 - Distribuições de massa molar (DMM) dos copolímeros 90% MMA/10% ALM e o efeito do tempo no sistema para reação 2.	60
Figura 42 - Estrutura do copolímero, onde m é proveniente do ácido láctico modificado e n do metilmetacrilato.	61
Figura 43 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio. Espectro 1 -Copolímero 100% MMA; Espectro 2 - Copolímero 5% ALM e 95% MMA; Espectro 3 - Copolímero 10% ALM e 90% MMA. Espectro 4 - Copolímero 20% ALM e 80% MMA.	62

Lista de Tabelas

Tabela 1. Produção de químicos de alto valor agregado utilizando diferentes microrganismos e glicerol como substrato. (Adaptado de ALMEIDA ⁵).....	13
Tabela 2. Planejamento fatorial completo das fermentações realizadas com <i>Klebsiella sp.</i> variando temperatura, concentração do inóculo e pH.....	24
Tabela 3. Condições dos experimentos do planejamento central composto rotacional.....	25
Tabela 4: Massas dos reagentes utilizados nas reações de esterificação seletiva entre o ácido láctico e o ácido acrílico.....	28
Tabela 5. Quantidade de reagentes utilizadas para o preparo das miniemulsões com metacrilato de metila (MMA) e ácido láctico modificado (ALM).....	30
Tabela 6. Valores de concentrações obtidos como produtos da fermentação em biorreator para o reator 1.....	49
Tabela 7. Valores de concentrações obtidos como produtos da fermentação em biorreator para o reator 2.....	49
Tabela 8. Valores de deslocamentos químicos dos núcleos de ¹ H obtidos por RMN de 600 MHz para o Espectro 1 (inicial).....	53
Tabela 9. Valores de deslocamentos químicos dos núcleos de ¹ H obtidos por RMN de 600 MHz para o Espectro 2 (final).....	53
Tabela 10. Dados experimentais de tamanho médio de partículas (Dp), índice de polidispersão do tamanho (Pdl), massa molar média em massa de cadeia (Mw), massa molar média em número de cadeia (Mn) e a dispersão da massa molar ($D_M = Mw/ Mn$), temperatura de transição vítrea (Tg) e frações mássicas (χ) relativos aos copolímeros (MMA e ALM) obtidos via processo de polimerização em miniemulsão.....	55
Tabela 11. Dados experimentais para o copolímero com 10% de ALM – reação 1: tamanho médio de partículas (Dp), Índice de polidispersão do tamanho (Pdl), massa molar média em massa de cadeia (Mw), massa molar média em número de cadeia (Mn) e a dispersão da massa molar ($D_M = Mw/ Mn$) relativos aos copolímeros (MMA e ALM) obtidos via processo de polimerização em miniemulsão e temperatura de transição vítrea.....	57
Tabela 12. Dados experimentais para o copolímero com 10% de ALM – reação 2: tamanho médio de partículas (Dp), Índice de polidispersão do tamanho (Pdl), massa molar média em massa de cadeia (Mw), massa molar média em número de cadeia (Mn) e a dispersão da massa molar ($D_M = Mw/ Mn$) relativos aos copolímeros (MMA e ALM) obtidos via processo de polimerização em miniemulsão.....	59

1 - Introdução

Atualmente, grande parte dos polímeros e compósitos poliméricos são produzidos a partir do petróleo e fibras sintéticas. Tais materiais são altamente dependentes de matéria prima não renovável e necessitam de longos períodos de tempo para a sua degradação. Sendo assim, do ponto de vista ambiental, há um interesse tecnológico crescente em utilizar matérias-primas naturais para obtenção de um produto final mais ecológico.¹

O ácido láctico é um alfa hidroxiácido com dois grupos funcionais, tornando-o adequado para uso em uma variedade de transformações químicas e produtos. Ele tem sido explorado como matéria prima na síntese de diversos polímeros, entre eles o poli(ácido láctico) – PLA. Tal polímero tem grande uso em diversas áreas, tais como biomedicina e química ambiental, visto que possui biocompatibilidade e é biodegradável. O ácido láctico pode ser obtido tanto pela ação fermentativa de bactérias, fungos e leveduras quanto por síntese química. Dentre as opções, os processos fermentativos são mais vantajosos, uma vez que são mais econômicos e seletivos à formação de ácido láctico puro (dextrogiro ou levogiro) em detrimento da rota química que produz uma mistura racêmica (d,l-ácido láctico).^{2,3,4}

Neste contexto de aproveitamento de matérias-primas de origem renovável, a glicerina produzida em excesso pela indústria de biodiesel pode ser utilizada em processos para produção de produtos químicos de alto valor agregado, minimizando a eliminação de resíduos e contribuindo para a economia do processo. A fermentação da glicerina para a produção de químicos como propanodiol, butanol, ácido láctico e ácido cítrico já tem sido avaliada em escala laboratorial.⁵

Por exemplo, o propanodiol já foi obtido a partir da fermentação da glicerina por diversos organismos, como *Klebsiella pneumoniae* LDH 526. HONG et al.⁶ produziu 102,6 g/L de 1,3-propanodiol através de fermentação em batelada alimentada em sistema aeróbico. Por sua vez, TANG et al.⁷ obtiveram 104,4 g/L de propanodiol utilizando o mesmo sistema de fermentação, utilizando *E. coli* K 12.^{6,7}

Os métodos de polimerização convencionais utilizados para a síntese do PLA são processos complexos, de elevado custo energético e altamente dependentes do tipo de catalisador utilizado, além de ser necessária uma etapa de purificação. Sendo assim, os custos totais do processo são elevados.¹

O presente trabalho propõe **i)** o uso do glicerol para produção de ácido láctico por via fermentativa, **ii)** modificação química estrutural da molécula de ácido láctico via reação de esterificação com ácido acrílico, visando seu uso como monômero em processos de

polimerização radicalares, e *iii*) síntese de copolímeros a base de ácido lático modificado e metacrilato de metila via polimerização em cadeia.

1.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo avaliar a produção de ácido lático através de fermentação de glicerol, usando a bactéria *Klebsiella* sp. como micro-organismo. Em paralelo, utilizamos o ácido lático P.A. como matéria-prima para sintetizar novos polímeros, que apresentam como benefícios, condições de reação mais brandas e maior capacidade de controle de propriedades macromoleculares, como por exemplo, as massas molares médias e a temperatura de transição vítrea.

1.1.1 Objetivos específicos

- Definir condições de pH, temperatura e concentração de inóculo na fermentação que maximizem a produção de ácido lático pela bactéria *Klebsiella* sp. utilizando o glicerol como fonte de carbono.
- Sintetizar e caracterizar derivados do ácido lático, tendo em vista a formação de novos monômeros.
- Utilizar os derivados do ácido lático para a produção de compostos de alto valor agregado por meio do processo de polimerização em cadeia.
- Sintetizar e caracterizar polímeros com os monômeros obtidos;
- Determinar as estruturas dos polímeros sintetizados, utilizando diversos métodos de análise, tais como espectroscopia de infravermelho, cromatografia de permeação em gel e ressonância magnética nuclear.

1.3 Estrutura do projeto

Essa dissertação está estruturada em 5 Seções, incluindo esta seção introdutório.

A segunda Seção é reservada à revisão bibliográfica, que descreve sobre as propriedades e estrutura do ácido lático, bem como suas aplicações e formas de obtenção. A revisão também descreve as propriedades e características da fermentação da bactéria utilizada neste trabalho. Os tipos de polimerização usadas para a obtenção do polímero final também são abordadas nesta seção.

Na terceira Seção apresenta-se a parte experimental, o qual foi dividido em 2 partes. A primeira parte constituiu-se em um planejamento experimental para otimizar a produção do ácido lático por meio fermentativo. A segunda parte contempla os experimentos das reações de síntese do monômero derivado do ácido lático para a obtenção de um polímero.

A quarta Seção consiste na apresentação e discussão dos resultados

observados nos experimentos.

Por fim, na quinta Seção, analisaram-se os dados para a conclusão final e elaboração de perspectivas futuras de pesquisa do trabalho.

2 - Revisão bibliográfica

2.1 Ácido láctico e suas propriedades e aplicações

O ácido láctico, ácido 2-hidroxiopropiônico ou ácido α -hidroxiopropiônico é um composto orgânico de função mista de ácido carboxílico e álcool, alifático, incolor de alto valor comercial devido à sua ampla aplicabilidade. Tem importância comercial desde 1881 e tem aplicações principalmente nas indústrias alimentícia, têxtil, química e farmacêutica.^{2,8} A Figura 1 mostra a estrutura química dessa molécula.

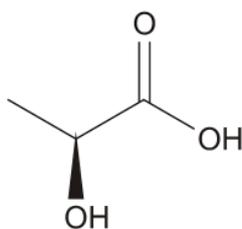


Figura 1 - Estrutura química da molécula de ácido láctico.

Possui em sua estrutura um carbono β quiral, ou seja, possui dois isômeros que são a imagem especular um do outro, sendo chamados de enantiômeros. Isso faz com que haja uma relação objeto-imagem especular de modo que não podem ser sobrepostas, o ácido D(-)-láctico e ácido L(+)-láctico.^{1,2,8}

Estudos recentes demonstram o grande potencial dos polímeros provenientes do ácido láctico na medicina. Esses materiais têm capacidade de reabsorção e por isso são utilizados na regeneração de tecidos, suturas, fixação de fraturas, reposição óssea, reparo da cartilagem, fixação de ligamentos e implantes. Esses polímeros podem ser empregados na forma de parafusos, pinos, grampos e placas nas aplicações ortopédicas e cirurgias orais em humanos e animais.⁹

O polímero derivado do ácido láctico (PLA) também pode ser usado na manufatura de produtos como: embalagens de alimentos, copos, pratos e talheres descartáveis, fibras, revestimentos, entre outros. Uma das características do polímero derivado de ácido láctico, caracterizado como um atrativo ecológico, é o tempo de vida útil destes polímeros, que é menor do que os provenientes dos hidrocarbonetos. Ou seja, podem ser totalmente degradados no meio ambiente em condições de aerobiose ou anaerobiose controladas. Outra característica de tais polímeros é que quando expostos à altas temperaturas (termoplástico natural) e alta umidade, podem ter sua biodegradação otimizada.¹⁰

A síntese do PLA é feita principalmente por dois métodos: policondensação

direta de ácido láctico e polimerização por abertura do anel láctico (lactide), que é o dímero cíclico do ácido láctico. A policondensação direta de ácido láctico é a mais simples, entretanto, tem como produto polímeros com baixa massa molar. Quando um maior grau de polimerização é desejável, utiliza-se a polimerização por abertura de anel. Porém, como o ácido láctico possui uma função álcool e uma função ácido carboxílico, pode ser polimerizado por outros métodos.¹¹

2.2 Formas de obtenção do ácido láctico

O ácido láctico pode ser obtido pela ação fermentativa de bactérias, fungos e leveduras ou por síntese química. A produção de ácido láctico em escala comercial ainda é feita, em sua maioria, pela fermentação descontínua. Os açúcares representam as melhores fontes de carbono para as bactérias lácticas, porém elas são bastante exigentes em relação às condições do meio para crescimento; havendo, portanto, a necessidade de fonte de nitrogênio, vitaminas e sais minerais para um melhor desempenho da fermentação láctica.⁸

2.2.1 Síntese química

O processo de obtenção do ácido láctico por síntese química tem como substância base o lactonitrilo (Reação 1). O ácido cianídrico reage com o acetaldeído na presença de uma base para produzir o lactonitrilo, em meio líquido sob alta pressão atmosférica. O lactonitrilo é recuperado e purificado por destilação. Em seguida é hidrolisado a ácido láctico mediante adição de ácido clorídrico ou ácido sulfúrico (Reação 2). Sendo assim, formam-se sais de amônio e ácido láctico. O ácido láctico pode sofrer uma reação de esterificação com o metanol, formando o metil lactato (Reação 3). Por sua vez, o metil lactato pode sofrer hidrólise e os compostos iniciais podem ser recuperados (Reação 4). Neste método, o produto é unicamente uma mistura racêmica de ácido láctico.¹⁷ A Figura 4 representa tais reações.

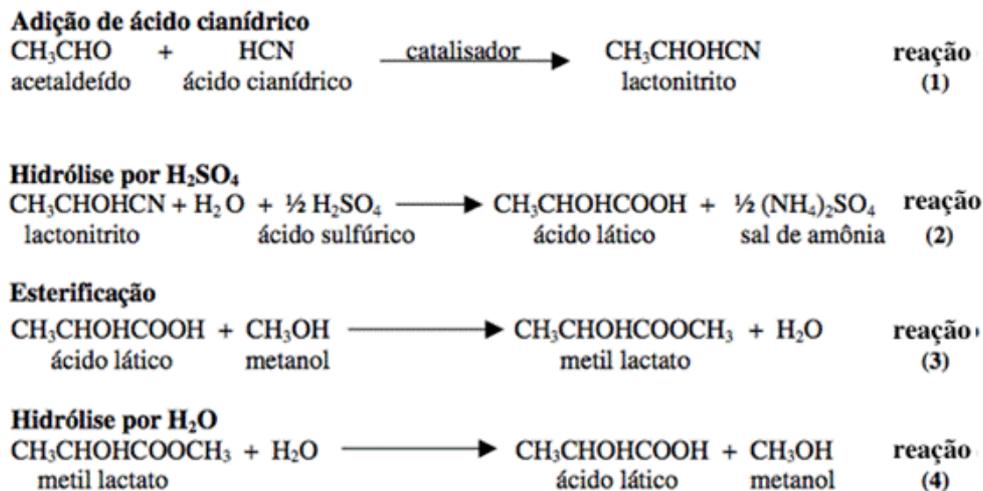


Figura 2 – Reações de obtenção do ácido láctico por síntese química (Adaptado de NARAYANAN et al.¹⁸ e LOPES.¹⁰).

2.2.2 Processos fermentativos

A obtenção de ácido láctico por fermentação pode produzir os isômeros dextrogiro ou levogiro, dependendo da enzima envolvida no processo. Isso deve-se a presença das enzimas L(+) lactato desidrogenase ou D(+) lactato desidrogenase (nLDH) nas células bacterianas. As bactérias lácticas fermentam a glicose por duas vias diferentes: homofermentativas e heterofermentativas. Essa classificação é dada de acordo com os produtos obtidos.¹⁰

Na homofermentação, o ácido láctico é o produto final predominante do metabolismo da glicose pela via glicolítica, na qual o ácido pirúvico é convertido em ácido láctico pela ação da enzima lactato-desidrogenase (LDH).^{10, 12}

Entretanto na heterofermentação, quantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono e etanol ou acetato são formados a partir da glicose pela via oxidativa das pentoses (fosfoquinase), sendo o ácido pirúvico e o acetaldeído substâncias intermediárias dessa via para formar o etanol. Ao mudar as condições de meio da fermentação (como condições limitadas de glicose, crescimento em outros açúcares, pH e temperatura) vários outros ácidos são formados. A Figura 2 demonstra as vias catabólicas de bactérias lácticas.^{10, 12}

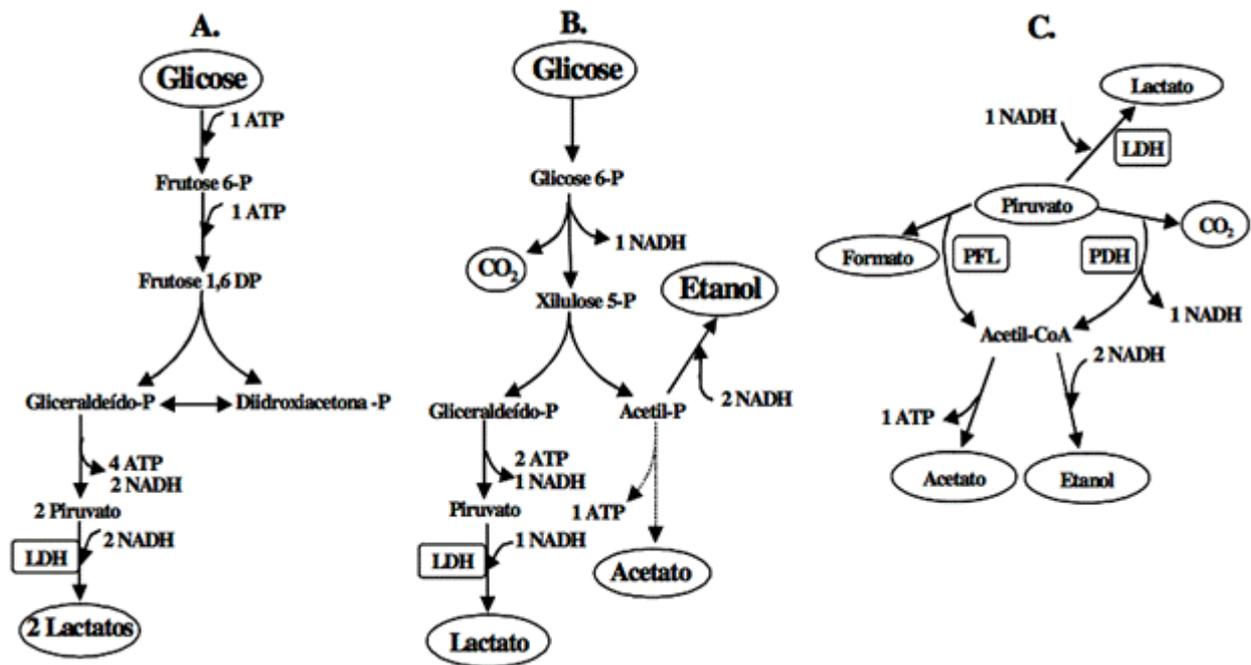


Figura 3 - Vias catabólicas das bactérias lácticas. Homofermentação (A), heterofermentação (B) e fermentação de vários ácidos a partir do piruvato (C). P = fosfato, LDH = Lactato desidrogenase, PFL = piruvato formato liase, e PDH = piruvato desidrogenase (Modificado de HOFVENDAHL e HÄGERDAL^{10,12}).

2.2.2.1 Fermentação contínua

Biorreatores são reatores nos quais as reações ocorrem devido a ação de biocatalisadores. Esses biocatalisadores podem ser enzimas ou células vivas, tais como microbianas, animais ou ainda vegetais. Os reatores com microrganismos estão sendo empregados desde a década de 1940 para a produção industrial de uma grande diversidade de produtos, entre eles podemos citar: enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos, solventes, ou ainda no tratamento de resíduos orgânicos industriais ou domésticos.¹³

O processo contínuo possui alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante no biorreator. O volume de reação se mantém o mesmo durante todo o processo, devido a retirada contínua de meio fermentado. A Figura 3 exemplifica o funcionamento de tal reator.

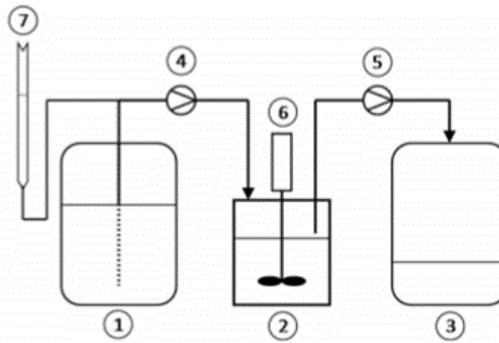


Figura 4 - Configuração geral do sistema de biorreatores para cultivos contínuos: 1) Frasco contendo meio de alimentação estéril; 2) Biorreator; 3) Frasco para coleta do meio de saída; 4) Bomba peristáltica de alimentação de meio; 5) Bomba peristáltica para retirada de meio; 6) Sistema de agitação (BASSO¹⁴).

Tal sistema pode operar por longos períodos de tempo em estado estacionário, o que é uma vantagem em relação ao processo descontínuo tradicional, gerando aumento de produtividade. Outro fator positivo é a manutenção das células em um mesmo estado fisiológico, o que torna o processo contínuo uma excelente ferramenta para estudos de mecanismo de regulação metabólica. Por outro lado, um cuidado que se deve ter quanto a esse processo é a maior probabilidade de contaminações.¹⁵

2.2.2.2 Fermentação descontínua

Também conhecida como fermentação em batelada, a fermentação descontínua tem seu modo de operação constituído da inoculação com microrganismos da solução nutriente esterilizada no fermentador no instante inicial e depois incubada, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbicos e ácido ou base para controle do pH.¹⁶

Um fermentador tem como função principal proporcionar um meio reacional controlado que permita o crescimento eficiente das células e, a conseqüente, obtenção do produto de interesse. Sendo assim deve-se levar em conta a futura ampliação de escala, que por sua vez, resulta em fermentadores onde o custo e objetivos específicos são levados em conta. Os fermentadores trabalham, na maior parte dos processos, em condições assépticas, o que sugere a utilização de inóculo livre de contaminantes e de um sistema de fermentação passível de esterilização.¹⁰

2.3 Cinética dos processos fermentativos

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste na análise da evolução da concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo em função do tempo de fermentação. São considerados como componentes: o microrganismo, os metabólitos e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura.¹⁹

A cinética ainda possibilita uma comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo, como pH, agitação e temperatura, por intermédio de variáveis, como: as velocidades de transformação e os fatores de conversão obtidos também a partir das curvas de ajuste.¹⁹

As velocidades instantâneas de crescimento ou reprodução do microrganismo, consumo de substrato e formação de produto, traduzidas respectivamente pelas seguintes expressões, para um tempo t: ¹⁹

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad \text{(Equação 1)}$$

$$r_S = -\frac{dS}{dt} \quad \text{(Equação 2)}$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} \quad \text{(Equação 3)}$$

Uma vez que a concentração microbiana X aumenta durante um cultivo descontínuo, é mais viável analisar os valores das velocidades instantâneas com relação à referida concentração microbiana, ou seja, especificando-as com respeito ao valor de X em um dado instante, conforme indicam a expressão:¹⁹

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad \text{(Equação 4)}$$

2.3.1 Curva de crescimento microbiano

Após a inoculação de um meio de cultura, favorável ao desenvolvimento do em estudo, sob temperatura controlada e agitação adequada, observa-se um comportamento nos valores da concentração celular como descrito na Figura 5.¹⁹

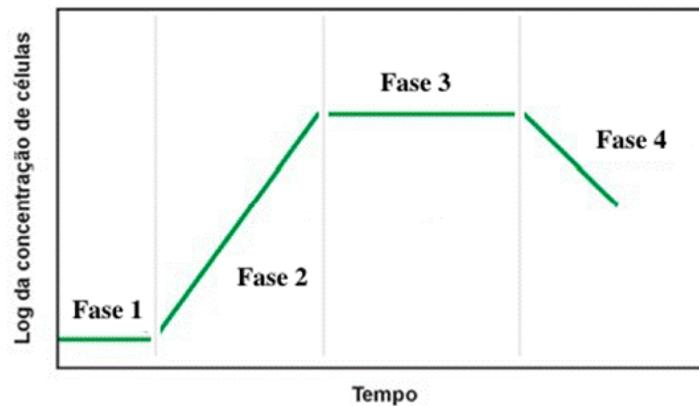


Figura 5 - Curva de crescimento microbiano.

- A Fase 1 é conhecida como fase "lag" ou de latência e ocorre imediatamente após a inoculação do meio com o microrganismo. É um período de adaptação, no qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. Durante essa primeira fase não há reprodução celular. A duração dessa fase varia principalmente com a concentração do inóculo, com a idade do microrganismo e com o seu estado fisiológico.¹⁹
- A Fase 2 é denominada fase logarítmica ou exponencial, na qual a velocidade específica de crescimento é constante e atinge o máximo de concentração de células. A velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração inicial de inóculo.¹⁹
- Na Fase 3, também conhecida como estacionária, a concentração de células atinge o valor máximo e constante. Há um balanço entre a velocidade de crescimento e a velocidade de morte do microrganismo.¹⁹
- A Fase 4 é denominada de declínio ou lise. O valor da concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de produção de células novas.¹⁹

2.4 Produção de químicos pela fermentação microbiana de glicerina

O biodiesel é um combustível alternativo derivado de biomassa renovável que emite menos gases do efeito estufa do que o diesel. Por isso, seu uso se tornou obrigatório em diversos países.²⁰

A produção do biodiesel se dá, principalmente, pela transesterificação de gorduras e óleos por metanol ou etanol na presença de um catalisador (homogêneo ou heterogêneo). O produto principal obtido são ésteres metílicos ou etílicos de ácidos

graxos, os quais são utilizados como biocombustível, além de glicerina como subproduto da reação.²¹

Com o considerável aumento na taxa produção do biodiesel, a produção dos subprodutos também aumentou. Sua cadeia produtiva gera como principais coprodutos as tortas, farelos e glicerina bruta. As tortas geradas pela prensagem das oleaginosas para extração de óleo e os farelos são, em geral, utilizadas como alimento para animais ou fertilizantes, agregando valor à cadeia produtiva. Por outro lado, o excesso de glicerina bruta produzida na indústria de biodiesel está levando a uma queda dos preços da glicerina no mercado.²²

A glicerina, também conhecida como glicerol quando purificada, já é uma fonte de matéria prima para diversos produtos de alto valor agregado, tais como polímeros, aditivos para combustíveis, antibióticos e analgésicos. Além disso, devido à natureza reduzida da molécula de glicerol, os microrganismos são capazes de convertê-la a uma série de metabólitos, com rendimentos semelhantes aos obtidos com o metabolismo de açúcares.^{5,22}

O desenvolvimento de biorrefinarias tem como base integrar os processos de conversão de biomassa para a produção de combustíveis, energia e produtos químicos. Ou seja, a utilização da glicerina formada na indústria de biodiesel oferece uma oportunidade para o desenvolvimento de biorrefinarias.²²

Isto se dá ao fato de que o excesso de glicerina bruta produzida pela indústria de biodiesel pode ser reutilizado em processos para a formação de produtos químicos de alto valor agregado, diminuindo resíduos gerados, além de contribuir para a economia do processo. Tendo em vista tais fatos, a valorização da glicerina por meio da produção de metabólitos microbianos de alto valor agregado via processos fermentativos tem sido estudada de forma crescente. A produção de metabólitos por bactérias, principalmente os dos gêneros *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Klebsiella* e *Enterobacter* são objetos de estudos atuais.⁵

A glicerina bruta contém diversos elementos nutricionais como fósforo, enxofre, sódio, cálcio, nitrogênio e magnésio, o que torna viável seu uso na conversão fermentativa microbiana. Um grande desafio para a utilização da glicerina bruta na produção de químicos é a obtenção de linhagens microbianas eficientes no metabolismo da glicerina que sejam tolerantes a compostos inibitórios nela encontrados, como sais e solventes orgânicos. Uma forma de resolver tal desafio é pela bioprospecção da diversidade microbiana de diferentes ambientes, uma vez que linhagens dentro de uma mesma espécie respondem diferentemente a compostos inibitórios e/ou a diferentes fontes de carbono.^{5, 22}

As seleções e avaliações de novas linhagens de microrganismos tendo como objetivo aplicação em processos fermentativos permitirão avanços biotecnológicos na área de biodiesel e biorrefinarias no país. Na indústria do biodiesel, a busca por novas linhagens contribuirá para o aproveitamento da glicerina bruta e, assim, melhorar a economia do processo, além de fornecer novas rotas microbianas de produção de químicos.⁵

Para a produção de ácido láctico por meio de processos fermentativos são utilizadas as chamadas bactérias lácticas. Essas bactérias geralmente possuem forma de cocos ou bacilos e ocorrem em cadeia ou isoladamente. São em geral Gram positivas e não formam esporos, sendo anaeróbias ou anaeróbias facultativas e não patogênicas. Apresentam-se em colônias pequenas e a produção de pigmentos é incomum, mas quando produzem, pode ser amarelo, laranja ou vermelho. Entre elas podemos citar como os mais importantes gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium*.^{23, 24, 25}

MAZUMDAR et al.⁴² produziu 32,0 g/L de ácido láctico a partir de processo fermentativo em batelada com *E. coli* K12 strain. MAZUMDAR et al.⁴³ obteve 50,0 g/L de ácido láctico por via fermentativa com *E. coli* (*engineered*) com batelada alimentada. Por sua vez, HONG et al.⁶ mostraram em seu trabalho que foi possível produzir 85,8 g/L de ácido láctico, por meio de fermentação em batelada alimenta com *E. coli* AC-52, utilizando como fonte de carbono o glicerol em meio aeróbico. O rendimento foi de 0,9 mol de ácido láctico por mol de glicerol.

A Tabela 1 mostra exemplos de produtos químicos obtidos a partir da fermentação utilizando diferentes microrganismos e glicerol como substrato.

Tabela 1. Produção de químicos de alto valor agregado utilizando diferentes microrganismos e glicerol como substrato. (Adaptado de ALMEIDA⁵)

Microrganismo	Modo de fermentação	Produto	Concentração do produto (g/L)	Referência
<i>E. coli</i> K12 strain	Batelada	Ácido láctico	32,0	MAZUMDAR et al. ⁴²
<i>E. coli</i> (engineered)	Batelada alimentada	Ácido láctico	50,0	MAZUMDAR et al. ⁴³
<i>E. coli</i> AC-521	Batelada alimentada	Ácido láctico	85,8	HONG et al. ⁶
<i>K. pneumoniae</i> LDH 526	Batelada alimentada	1,3 propanodiol	102,6	HONG et al. ⁴⁴
<i>C. pasteurianum</i>	Batelada	butanol	5,0	TACONI et al. ⁴⁵
<i>Y. lipolytica</i>	Batelada	Ácido cítrico	124,2	RYMOWICZ et al. ⁴⁶
Engineered <i>E. coli</i>	Batelada	Ácido succínio	14	BLANKSCHEN et al. ⁴⁷

2.4.1 Bactéria *Klebsiella* sp.

A *Klebsiella* sp. é uma bactéria Gram-negativa, possui forma de bastonete e é anaeróbia facultativa. Microrganismos do gênero *Klebsiella* sp. apresentam um crescimento rápido em meios de cultivo simples e apresentam potencial biotecnológico satisfatório, uma vez que produzem diversos metabólitos de interesse industrial a partir de diversos substratos, como a glicose, sacarose, xilose e glicerol.^{4, 25, 26}

Nas vias fermentativas, a *Klebsiella* sp. pode produzir metabólitos como o 2,3-butanodiol, 1,3-propanodiol, etanol, ácido láctico e ácido succínico. Tais produtos possuem grande valor agregado e são de grande interesse industrial. ROMIO²⁶, em seu trabalho, obteve 92,1 g/L de 2,3-butanodiol e rendimento de 92,6%.^{27, 28, 29}

A Figura 6 apresenta as vias bioquímicas para a metabolização do glicerol pela bactéria *Klebsiella* sp.. O glicerol adentra na membrana citoplasmática do

microrganismo por transporte passivo. Em seguida, pode ser metabolizado e gerar equivalentes redutores.²⁶

Como é uma bactéria anaeróbica facultativa, a *Klebsiella* sp. apresenta duas grandes vias. Em condições de aerobiose, o glicerol é convertido a piruvato e segue para o ciclo do ácido cítrico gerando ATP e biomassa. Quando em anaerobiose, outras vias são ativadas para geração de energia e manutenção celular.^{26, 41}

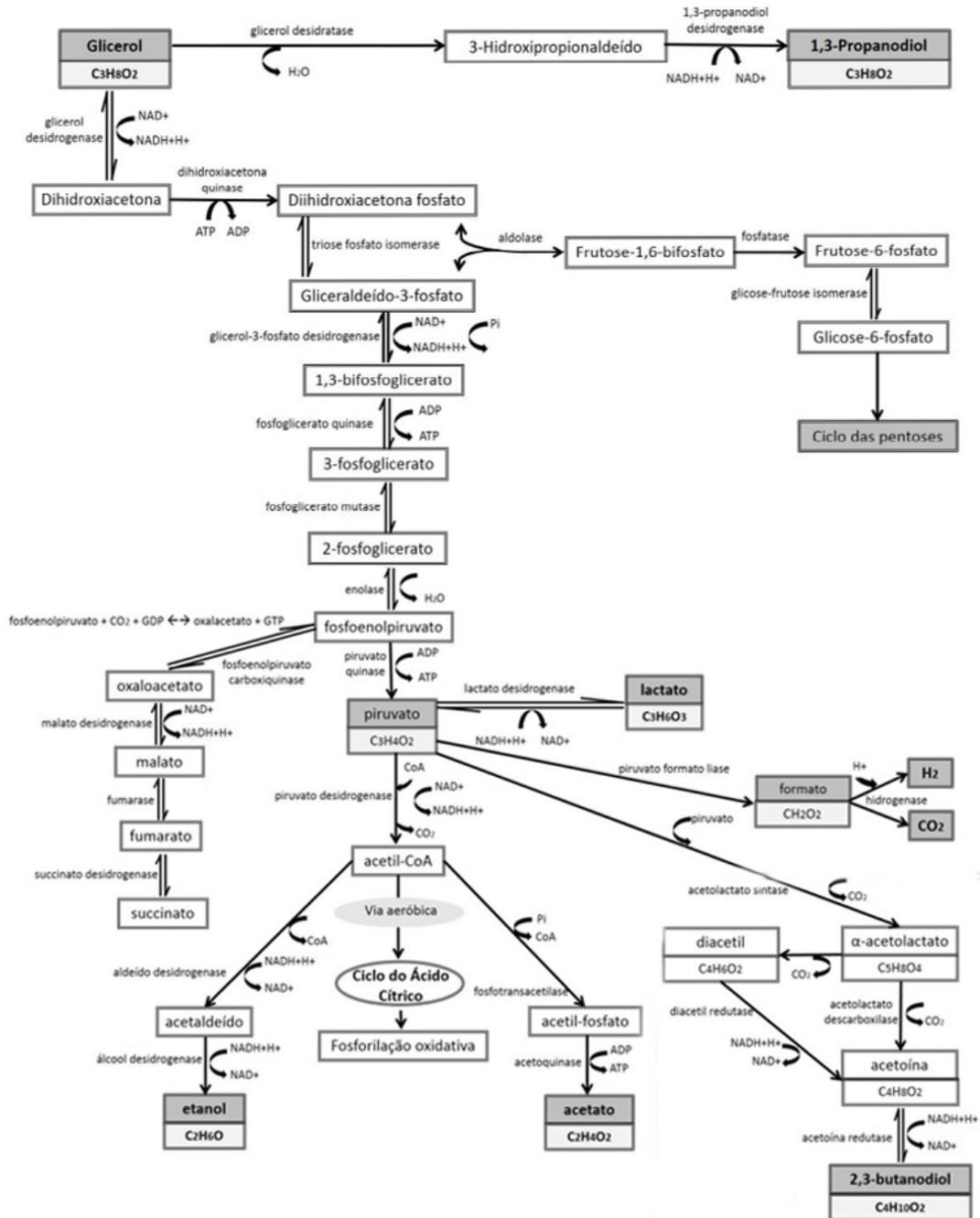


Figura 6 - Vias metabólicas de *Klebsiella oxytoca* a partir de glicerol (Adaptado de ROMIO²⁶)

2.4.2 Purificação do ácido láctico

O método convencional de purificação do ácido láctico é feito a partir da precipitação do lactato de cálcio, que pode ser filtrado. Apesar de ser um processo econômico, simples e confiável, gera como subproduto grandes quantidades de sulfato de cálcio, ou seja, um contaminante ambiental. Sendo assim, há uma crescente procura por métodos alternativos para a purificação que não cause impactos ambientais. Entre eles estão: troca-iônica, destilação a vácuo, esterificação, métodos de hidrólise, separação por membrana (osmose inversa).³⁰

Em virtude da alta seletividade, os processos de separação por membranas podem assegurar elevados níveis de purificação e separação. Membranas de seletividade e permeabilidade podem ser integradas aos fermentadores convencionais, o que fornece produção e purificação em uma mesma unidade, reduzindo custos com equipamentos. Porém, as membranas possuem um elevado custo.³¹

2.5 Polimerização

De acordo com o Gold Book da IUPAC, conceitualmente, polímero é uma macromolécula de alta massa molar relativa, cuja estrutura compreende essencialmente a repetição múltipla de unidades derivadas de moléculas de baixa massa molar relativa.³²

Podemos, então, definir polímero como uma macromolécula formada pela união de um número elevado de moléculas individuais repetidas, chamadas de monômeros (ou meros). Portanto, a polimerização é a reação na qual os monômeros reagem e se unem para a formação do polímero.

Polímeros podem ser compostos com uma grande variedade de monômeros. Eles possuem diversas propriedades intrínsecas distintas dependentes da natureza química dos monômeros, do tipo de mecanismo de polimerização e tipo de processo e da configuração do reator, entre outros. Há diferentes maneiras de classificar polímeros e sua estrutura molecular desempenha um papel importante na determinação de suas propriedades físicas.³³

Primeiramente, as reações de polimerização foram estudadas em meio homogêneo, o qual só existe uma fase na qual estão dispersos o(s) monômero(s) e a(s) espécie(s) catalítica(s). Se houver a utilização de solvente, são chamadas de polimerização em solução. Quando não há solvente, são denominadas polimerização em massa. Em seguida, houve desenvolvimento da polimerização em meio

heterogêneo que contém mais de uma fase, o meio contínuo e o meio disperso. O segundo método apresenta vantagens operacionais em relação ao processo homogêneo, entre elas estão: melhor controle de troca térmica, menor viscosidade (devido a adição de uma fase contínua, imiscível com o monômero, sendo também responsável pela troca de calor e dispersão apropriada da fase orgânica reativa) e não necessidade de alta agitação (devido ao aumento da área superficial ocasionado pela utilização de espécies surfactantes e coestabilizadores).³⁴

2.5.1 Polimerização em emulsão

A polimerização em emulsão é um processo heterogêneo, no qual o monômero é emulsionado em um meio contínuo aquoso com o uso de um agente emulsificante, o surfactante. Há a formação de um sistema micelar por apresentar uma estrutura molecular com cadeias hidrofóbicas e extremidades hidrofílicas. As moléculas de emulsificante livres têm como principal desempenho a estabilidade coloidal das gotas de monômero (que atuam como reservatórios), presentes no início do processo, e das partículas formadas, além de estabelecer estabilidade entre a fase orgânica e a fase aquosa.^{34, 35}

Na polimerização em emulsão, a nucleação ocorre preferencialmente dentro das micelas formadas pelo surfactante (inchadas por monômero – fase orgânica) dispersas na fase aquosa. Tais micelas possuem dimensões entre 5 e 10 nm. Para que isso ocorra, a concentração do surfactante deve sempre estar acima da concentração micelar crítica (CMC), parte do processo na qual formará os primeiros aglomerados de surfactante (denominadas micelas), originando um meio disperso com elevada estabilidade coloidal. Neste caso, a agitação do meio é necessária apenas para inibir eventuais gradientes de temperatura durante a polimerização.^{34, 36}

No processo de nucleação, a partir do excesso do agente emulsificante, as micelas são formadas no sistema aquoso. A medida que se adiciona o monômero, parte deste fica na forma de gotas livres (reservatórios) e outra parte penetra as micelas. Isto se dá ao fato de a molécula de surfactante possuir uma cabeça hidrofílica e a cauda hidrofóbica. Sendo assim, o mecanismo de reação envolve a migração de moléculas de monômero em direção ao interior das micelas, uma vez que o monômero apresenta pouca solubilidade pela fase aquosa.³⁴ A Figura 7 exemplifica a etapa de nucleação e a estrutura micelar formada pelo surfactante com monômero em seu interior.

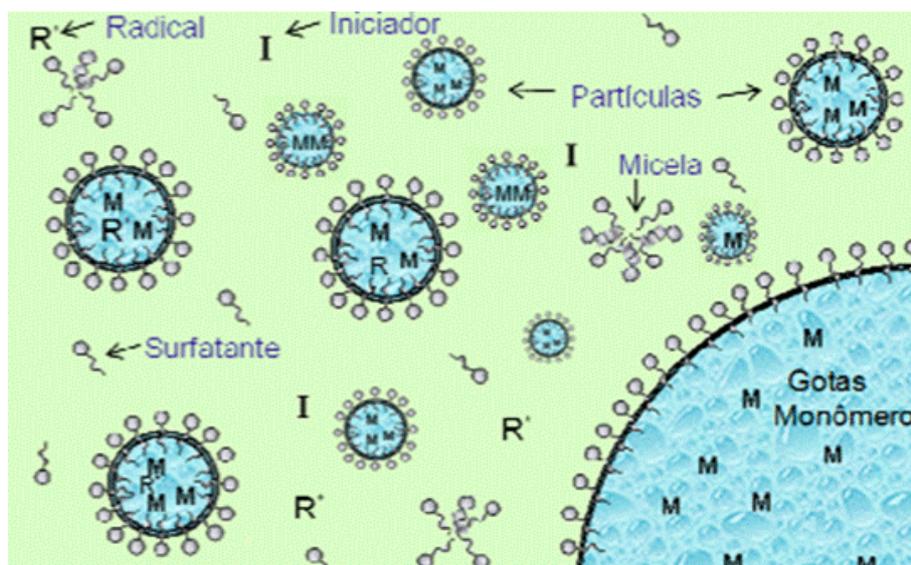


Figura 7 – Etapa de nucleação. A cabeça da molécula de surfactante é hidrofílica e a cauda corresponde a parte hidrofóbica e retém o monômero em seu interior (OLIVEIRA³⁷).

Ao adentrarem nas micelas, os monômeros causam um aumento na dimensão micelar. É nessa situação que ocorre a reação de polimerização preferencialmente. Quanto maior a solubilidade do monômero pela fase hidrofóbica do surfactante (interior da micela), maior será a facilidade de difusão para as micelas, que são o *locus* da reação.³⁴

Para que haja a formação da emulsão, deve-se aplicar uma leve agitação no meio para que a dispersão coloidal se torne homogênea. Uma vez que a emulsão foi formada, o iniciador é adicionado para que a reação de polimerização inicie no momento em que o primeiro radical de iniciador encontra o monômero no interior da micela inchada (ou então pela formação de estruturas oligoméricas de baixa solubilidade na fase aquosa, que são “capturadas” pela micela, onde ocorre o crescimento da cadeia polimérica). Após formação do primeiro radical polimérico, ocorrerá a incorporação sucessiva de moléculas de monômero a cadeia polimérica em crescimento.³⁴

A polimerização em emulsão pode ser dividida em três etapas:

- Nucleação das partículas: Etapa na qual ocorre um aumento do número de partículas de forma rápida, levando ao aumento da taxa de polimerização. No decorrer da reação, os polímeros são formados dentro das micelas de surfactantes e, por difusão, moléculas da gota de monômero migram para o interior das micelas, dando continuidade a reação.^{34, 38}

- Crescimento das partículas: Nessa etapa o número de partículas se mantém constante e aumentam em tamanho. Com o aumento da dimensão das partículas, mais moléculas de surfactante são necessárias para manter a estabilidade das partículas poliméricas e há a dissolução das micelas residuais não nucleadas.^{34, 38}
- Consumo do monômero residual: Com o esgotamento das gotas de monômero, a concentração de monômero no interior das partículas irá diminuir. A reação acaba quando todo monômero for consumido, alcançando a máxima conversão.^{34, 38}

As reações de polimerização em emulsão, em geral, apresentam elevadas taxas de polimerização, ou seja, alta incorporação do monômero nas cadeias, conduzindo a formação de polímeros de elevada massa molar média.^{34, 38}

2.5.2 Polimerização em miniemulsão

Neste processo de polimerização, a nucleação ocorre na gota de monômero. Tal processo é realizado na presença de monômero, água, surfactante e coestabilizador, promovendo uma dispersão de óleo em água, produzindo partículas que variam de 50 nm a 400 nm.^{34, 35}

Usa-se também concentrações de surfactantes menores que a CMC, uma vez que as reações ocorrem sem que haja formações de micelas, que são indesejadas neste processo. Os iniciadores podem ser hidrossolúveis ou organossolúveis. Os tamanhos finais das partículas são menores e mais estáveis do que no processo de emulsão devido à combinação de alto cisalhamento juntamente com um surfactante e coestabilizador.³⁶

Após a mistura do meio aquoso, surfactante, monômero e coestabilizador, um agente externo capaz promover de forma eficiente a cavitação da mistura (homogeneizador ultrassônico, geralmente) conduz à ruptura das gotas de monômeros por meio do alto cisalhamento. Geralmente, as gotas geradas terão o mesmo tamanho que as partículas poliméricas finais, já que cada gota de monômero estabilizada na fase aquosa pode ser considerada um nanorreator onde ocorre a polimerização. Uma vez estáveis pela utilização de surfactantes e co-surfactantes, as gotas mantêm o mesmo tamanho durante todo o processo

de polimerização, evitando os efeitos de coalescência e degradação difusional.^{36, 37}

Quanto menor o tamanho das gotas formadas, maiores serão as áreas superficiais e, conseqüentemente, mais surfactante será necessário para o revestimento da fase orgânica. Além disso, um maior número de partículas promove um melhor aproveitamento dos radicais gerados, a probabilidade de somente um radical iniciar e propagar a reação é maior. Sendo assim, há um favorecimento da formação de cadeias poliméricas de elevado tamanho e elevadas massas molares.³⁷

O coestabilizador é uma substância que apresenta uma solubilidade muito baixa no meio contínuo. Sua principal função é limitar a difusão do monômero, de modo a criar uma barreira na superfície das gotas por meio da combinação com o surfatante, prevenindo a difusão das gotas menores para as maiores e gerando assim uma pressão osmótica dentro das gotas de monômero.^{36, 37}

A presença do coestabilizador no meio não altera o tamanho de partícula, somente estabelece as relações de pressão osmótica quando adsorvidas nas gotículas. Essas relações são necessárias para que a miniemulsão permaneça estável por maiores períodos de tempo.^{37, 39}

3 - Materiais e métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

Equipamentos utilizados nas análises e procedimentos:

- ✓ Espectrofotômetro Multimodal com absorvância UV/VIS, marca Molecular Devices, modelo Spectramax.
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE, marca Agilent, modelo 1260 Infinity. Coluna Aminex HPX-87H 300 x 7.8 mm, pré-coluna de 30 x 4.6 mm (Bio-Rad) e detector índice de refração. Fase móvel H₂SO₄ 0,005 M, vazão de 0,6 mL/min, e temperatura de 40 °C.
- ✓ Shaker orbital de bancada com incubação e refrigeração, marca Thermo Scientific, modelo Max 4000.
- ✓ Capela de fluxo laminar, marca FilterFLux, modelo FLV960/4.
- ✓ Centrifuga de bancada refrigerada para tubos Eppendorf, marca Herme Labortechnik, modelo Z326K.
- ✓ Centrifuga de bancada refrigerada para tubos Falcon, marca MPW MED Instruments, modelo MPW-352R.
- ✓ Autoclave Vertical, marca Primatec, modelo CS capacidade 100 L.
- ✓ Estufa Incubadora, marca Quimis, modelo Q315M25.
- ✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 600 MHz, marca Bruker, modelo Magneto Ascend 600, Console Avance III HD.
- ✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 300 MHz, marca Varian, modelo Magneto Oxford YH300, Console Mercury Plus 300.
- ✓ Cromatógrafo de Permeação em Gel (GPC/SEC), marca Malvern Instruments, modelo Viscotek RImax e detector de índice de refração.
- ✓ Sonda de Espectroscopia FTIR In Situ, marca Mettler Toledo, modelo ReactIR 15.
- ✓ Analisador Termogravimétrico (TGA) marca Shimadzu, modelo DTG-60H.
- ✓ Calorímetro Exploratório Diferencial (DSC) marca Shimadzu, modelo DSC-60.
- ✓ Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) equipamento Malvern Zetasizer-NanoSeries, modelo NANO ZS
- ✓ Processador Ultrassônico marca Cole Parmer

Reagentes utilizados nas análises e procedimentos:

- ✓ Glicerol P.A. ACS – 99,5%. Marca Dinâmica.

- ✓ Glicose P.A. ACS – Marca Sigma-Aldrich.
- ✓ Ácido láctico P.A – 85%. Marca Dinâmica.
- ✓ M9 Broth – Marca Sigma-Aldrich.
- ✓ Ácido acrílico anidrido – 99%, 200 ppm de inibidor Mequinol – Marca Sigma-Aldrich.
- ✓ Hexadecano – 99% – Marca Sigma-Aldrich.
- ✓ Dodecil sulfato de sódio – 95% – Marca Sigma-Aldrich.
- ✓ Metacrilato de metila – 99%, 30 ppm de inibidor Mequinol – Marca Sigma-Aldrich.
- ✓ Persulfato de sódio- Química fina LTDA

3.2 Métodos

3.2.1 Seleção da bactéria

Dezoito linhagens de bactérias da Coleção de Microrganismos isolados de solos contaminados com glicerina padrão e bruta – Cesbra (65% de pureza) da Fazenda Sucupira da Embrapa foram submetidas às fermentações. A fase de adaptação dos microrganismos, devido à estocagem em ultrafreezer, foi feita em placas Petri com TSB ágar em estufas a 27 °C. Em seguida, os microrganismos que cresceram nas placas em colônias puras foram inoculados em mini reatores (placas de 96 poços) com 800 µL de meio de cultura M9 contendo concentração de 4% de glicerol P.A.. Tais experimentos foram realizados com o objetivo de verificar a capacidade de crescimento e de produção de ácido láctico das linhagens. A bactéria com o melhor desempenho foi selecionada para dar continuidade às próximas fermentações.

3.2.2 Avaliação da influência dos principais parâmetros de fermentação no crescimento da *Klebsiella* sp.

3.2.2.1 Correlação da massa de bactéria com a densidade ótica

Para determinar a concentração da bactéria durante a fermentação foi necessário medir sua taxa de crescimento. Uma curva de calibração foi feita a partir da correlação entre a densidade ótica obtida no espectrofotômetro com absorbância UV/Vis 600 nm e a concentração de bactérias no meio de cultura no decorrer de 24 horas. A Figura 8 mostra a relação o coeficiente angular dessa relação, bem como seu coeficiente de determinação.

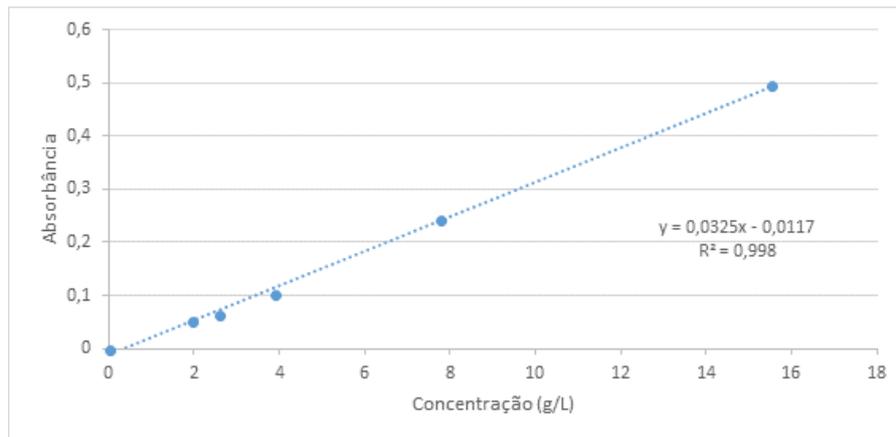


Figura 8 - Curva padrão para determinação da concentração de bactéria.

3.2.2.2 Crescimento de pré-inóculo

Primeiramente, os microrganismos foram retirados do estoque e crescidos em meio rico, TSB ágar, para a fase de adaptação dos microrganismos devido à estocagem em ultrafreezer. Em seguida, o microrganismo foi inoculado em meio de cultura M9, suplementado com glicerol P.A. para a fase de bioconversão. O meio de cultura M9 é composto por cloreto de amônio, fosfato dissódico, fosfato monopotássico e cloreto de sódio.

Preparou-se 1 L do meio de cultura M9 suplementado com 4 % e 10 % (%v/v) de glicerol. Para efeitos comparativos, foram feitos meios suplementados com glicose nas mesmas concentrações. Para tal, pesou-se 10,5 g do meio de cultivo M9. Seguidamente, dissolveu-se tal massa em 1000 mL de água destilada, e adicionou-se 40 mL do glicerol à solução para 4 % e 100 mL para 10 % e 100 g de glicose para a solução de 10 %.

Para o meio TSB, pesou-se 15 g do meio de cultivo TSB. Seguidamente, dissolveu-se tal massa em 500 mL de água destilada. Todos os meios foram autoclavados por 20 minutos a 1 atm. Foram feitas alíquotas em triplicatas de 50 mL em erlenmeyers de 125 mL e depois colocado para autoclavar por 20 min, juntamente com uma alça de inoculação.

Os Erlenmeyers, contendo o meio autoclavado, foram inoculados utilizando a alça de inoculação dentro do fluxo laminar usando a bactéria *Klebsiella* sp. mantida em ágar. Os frascos foram então incubados no shaker a 120 rpm e 32 °C por 24 horas.

3.2.2.3 Produção de ácido láctico por *Klebsiella* sp. via fermentação em mini reatores

Foram adicionados 800 microlitros de meio M9 com 4% de glicerol em placas de 96 poços. Em seguida, foram inoculados 200 microlitros do meio de cultura contendo a bactéria. A placa foi vedada com um adesivo e após 48 horas em *shaker* rotativo a

32 °C e 120 rpm, foram retiradas alíquotas de 100 microlitros de cada poço para verificar a produção de ácido láctico, que foi realizado cromatografia líquida de alta eficiência conforme o item 3.2.2.8.

3.2.2.4 Produção de ácido láctico por *Klebsiella* sp. via fermentação em tubos do tipo falcon

Em falcons devidamente autoclavados de 15 mL foram adicionados 12 e 10 mL de meio M9 suplementado com 4 % de glicerol e, em capela de fluxo laminar, inoculados com o creme da bactéria nas concentrações de 1/12, 1/25 e 1/50. Os falcons foram mantidos em *shaker* rotativo a 32 °C e 120 rpm por 48 horas. Para a concentração 1/12, o experimento foi realizado com e sem agitação. Foram retiradas alíquotas de 1000 microlitros em 24 e 48 horas.

3.2.2.5 Planejamento fatorial completo para fermentações com *Klebsiella* sp.: 1° Conjunto de Experimentos

O planejamento experimental foi feito utilizando variáveis que podem ser expressivas para a determinação tanto do crescimento da *Klebsiella* sp. como da produção de ácido láctico. Este planejamento foi realizado para duas fontes de carbono, glicose e glicerol, para fins comparativos. O planejamento fatorial completo 2³ com réplicas no ponto central é empregado para avaliar e determinar fatores que influenciam de forma significativa a fermentação e a produção de ácido láctico.

Os resultados dos experimentos realizados com base neste planejamento de experimentos serão utilizados para decidir as melhores condições de fermentação para a produção do ácido láctico.

Os 3 fatores estudados foram pH inicial, concentração de inóculo e temperatura. As condições experimentais e suas respectivas interações dos fatores se encontram na Tabela 2. Esses fatores foram escolhidos de acordo com o observado experimentalmente. A agitação foi mantida em 50 rpm, visto que a bactéria *Klebsiella* sp. é anaeróbica facultativa e obteve melhores resultados para produção de ácido láctico com menores amplitudes e, conseqüentemente, menor oxigenação.²⁷

Tabela 2. Planejamento fatorial completo das fermentações realizadas com *Klebsiella* sp. variando temperatura, concentração do inóculo e pH.

Fatores	(-)	(0)	(+)
X ₁ : Temperatura (°C)	27	32	37
X ₂ : Concentração do inóculo (g/L)	5	12,5	20
X ₃ : pH	6,5	7,5	8,5
Experimento	X ₁	X ₂	X ₃
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers de 125 mL utilizando meio M9 suplementado com 10% de glicerol ou glicose como meio de cultura. Este planejamento contempla também uma triplicata no ponto central para a determinação do erro experimental.

Foram adicionados 100 mL de meio M9 suplementado com 10 % de glicerol em erlenmeyers de 125 mL. Foi também realizado com 10 % de glicose para efeitos comparativos. Os fracos contendo o meio foram autoclavados e os microrganismos foram inoculados. Os frascos foram mantidos em shaker rotativo por 48 horas a 50 rpm.

3.2.2.6 Plano central composto rotacional (PCCR) para fermentações com *Klebsiella* sp.: 2º Conjunto de Experimentos

Com base nos resultados do experimento de planejamento fatorial 1 (Seção 3.2.1.5), foi feito um novo planejamento de experimento para verificar as melhores condições para a produção do ácido lático. A Tabela 3 mostra as condições experimentais e suas respectivas interações dos fatores. O planejamento fatorial completo com réplicas no ponto central utilizando os pontos axiais foi empregado para avaliar e determinar fatores que influenciam de forma significativa a fermentação e a produção de ácido lático com $\alpha = \pm 1,41$.

Tal experimento foi feito utilizando meio M9 suplementado com 4 % de glicerol, visto que nos demais experimentos, boa parte do glicerol pura não foi consumido.

Tabela 3. Condições dos experimentos do planejamento central composto rotacional.

Fatores		- α	(-)	0	(+)	+ α
X₁: Concentração do inóculo (g/L)		6,1	7,5	10	12,5	14,9
X₂: pH		7,6	9	9,5	10	11,4

Experimento	X ₁	X ₂
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	- α	0
9	+ α	0
10	0	- α
11	0	+ α

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL, utilizando M9 suplementado com 4% de glicerol como meio de cultura. Este planejamento contempla também uma triplicata no ponto central para a determinação do erro experimental.

Foram adicionados 100 mL de meio M9 suplementado com 4% de glicerol. Os frascos contendo o meio foram autoclavados e os microrganismos foram inoculados nos recipientes. Os frascos foram mantidos em shaker rotativo por 72 horas a 50 rpm a 37 °C.

3.2.2.7 Fermentações com *Klebsiella* sp. em Biorreator

Analisando os dados obtidos nos experimentos fatoriais foi possível verificar as melhores condições de fermentação em batelada para a produção de ácido láctico. O meio M9 foi suplementado com 2% de glicerol P.A, com pH ajustado para 9,5. A fermentação ocorreu a 37 °C por 72 horas em fermentadores de 1 L com 800 mL de meio e 6 g/L de inóculo inicial.

Para o pré-inóculo, inoculou-se a *Klebsiella* sp. crescida em meio de cultivo TSB ágar, em erlenmeyers de 1 L contendo 800 mL do meio de cultivo M9 suplementado com 2% de substrato glicerol. Os frascos foram condicionados em shaker rotativo durante 48 horas, em temperatura de 37 ± 2 °C e agitação de 120 ± 3 rpm para aumentar a oxigenação e promover maior crescimento celular.

Decorrido o período de inoculação de 72 horas, centrifugou-se o caldo fermentado de cada erlenmeyer durante 10 minutos a 13000 rpm. A quantidade da

biomassa referente a cada experimento foi inoculada nos vasos dos biorreatores de 1 L.

Em cada vaso foi colocado 800 mL de meio de cultivo suplementado com 2% de glicerol com pH 9,5 a 37 °C para a fase de bioconversão. Após 48 horas de fermentação, foi adicionado gás nitrogênio aos vasos, para inibir o crescimento celular e favorecer a produção de ácido láctico, que é melhor em condições anaeróbicas. Foi utilizada uma frequência de agitação de 100 rpm para manter o meio homogêneo e evitar deposição das células no fundo do vaso.

A Figura 9 mostra o sistema de fermentação da marca New Brunswick, modelo Bioflo/celligen 115 utilizado nos experimentos. O Experimento foi realizado em duplicata com as mesmas condições, sendo denominados vaso 1 e vaso 2.



Figura 9 - Sistema de Fermentação New Brunswick, modelo Bioflo/celligen 115.

3.2.2.8 Análise de cromatografia líquida de alta eficiência

Fez-se uma diluição de 10 vezes das amostras coletadas ao longo do processo de bioconversão dos meios de cada um dos ensaios. Para isso, adicionou-se 100 µL da amostra em 900 µL de água mili-Q. Para a quantificação de ácido láctico, propanodiol e glicerol foi feita uma solução padrão de 5 g/L. A partir desta solução, foram feitas diluições seriadas para preparo dos padrões necessários à identificação desses compostos nas amostras de bioconversão, a serem quantificadas utilizando equipamento CLAE.

Seguindo uma concentração de aproximadamente 5 g/L para os compostos, pesou-se 0,125g de glicerol, 0,109 g de ácido láctico, 0,168g de propanodiol e 0,132g de butanodiol, diluídos em 350 mL de água mili-Q, uma vez que são os principais produtos produzidos pela *Klebsiella* sp.. Os padrões foram diluídos de forma seriada, onde o tubo de ensaio A foi preenchido com 10 mL da solução padrão. Em um segundo tubo de ensaio B, 1 mL da solução original foi completada com 9 ml de água mili-Q. Transferiu-se 1 mL da solução do tubo de ensaio B para o tubo de ensaio C, que novamente foi

completada com 9 ml de água mili-Q. Este processo foi repetido por mais quatro vezes para obter concentrações de sete pontos da curva de calibração.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada com coluna Aminex HPX-87H 300 x 7.8 mm e pré-coluna de 30 x 4.6 mm (Bio-Rad), fase móvel de 0.005 mol/L de H₂SO₄, fluxo de 0.6 mL/min e temperatura da coluna de 40 °C.

3.2.3 Esterificação seletiva de ácido láctico com ácido acrílico

Um balão de fundo redondo foi submetido a banho térmico com óleo de silicone sob uma placa de agitação. Na primeira boca do balão foi colocado um funil acoplado, para que fosse feita a adição controlada do ácido acrílico com ácido metanossulfônico. Após a adição controlada, um termômetro foi colocado para verificar se a temperatura do sistema estava adequada e constante. Na segunda boca, foi colocado um condensador do tipo *Dean Stark* para retirar água do sistema. A terceira boca serve para acoplar a sonda de Espectroscopia FTIR In Situ. A Figura 10 exemplifica esse esquema.

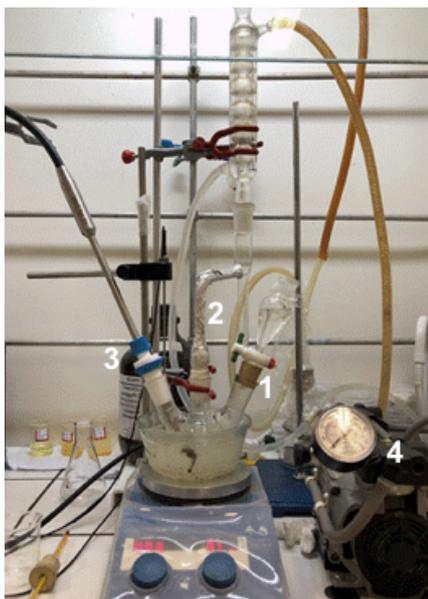


Figura 10 - Sistema utilizado para a esterificação seletiva de ácido láctico e ácido acrílico, onde 1 é o funil de adição, 2 é o *Dean Stark* acoplado com condensador, 3 a sonda de infravermelho In Situ e 4 a bomba de vácuo.

Primeiramente, o ácido láctico e a hidroquinona foram adicionados ao balão de fundo redondo com três bocas juntamente. Quando a temperatura interna do balão atingiu 100 °C, o ácido acrílico e o ácido metanossulfônico foram adicionados gota a gota, com o auxílio do funil. O sistema é submetido a vácuo e a reação ocorre com agitação de 600 rpm por 3 horas.

A hidroquinona pode ser utilizada como inibidor porque há em sua estrutura

duas hidroxilas ligadas a um anel benzênico na posição para. Tal estrutura está em equilíbrio químico com a p-benzoquinona, gerando dois H^+ . Cada H^+ reage com um radical, formando H^* radicalar capaz de inativar possíveis sítios iniciadores de polimerização entre os monômeros formados.

Foram testadas reações com proporção de 1:1 e 1:1,5 em massa de ácido acrílico e ácido láctico. As concentrações de hidroquinona de 0,5 e 1 % da massa total do sistema foram utilizadas para cada reação. O catalisador foi usado na proporção de 1 %, 3 % e 5 % com relação ao ácido láctico. A composição utilizada para a esterificação do monômero utilizado nas reações de polimerização foi 1:1,5 em massa de ácido acrílico e ácido láctico, 0,5 % de hidroquinona e 5% de ácido metanossulfônico. A Tabela 4 mostra as massas utilizadas em algumas das reações testadas.

Tabela 4: Massas dos reagentes utilizados nas reações de esterificação seletiva entre o ácido láctico e o ácido acrílico.

Experimento	Ácido acrílico (g)	Ácido láctico (g)	Hidroquinona (g)	Ácido Metanossulfônico (g)
1	7,45	5,01	0,075	-
2	7,66	5,19	0,077	-
3	15,82	10,17	0,154	-
4	7,37	5,04	0,068	-
5	15,04	10,04	0,146	-
6	15,19	10,47	0,138	-
7	7,66	5,09	0,009	-
8	14,62	9,89	0,142	-
9	15,36	5,29	0,077	-
10	15,28	9,03	0,139	-
11	23,48	15,04	0,125	0,797
12	15,47	10,05	0,154	0,347
13	14,05	10,23	0,135	0,268
14	7,37	5,04	0,068	0,147
15	15,15	10,14	0,146	0,279
16	15,28	9,83	0,129	0,359
17	15,05	24,71	0,201	2,616
18	12,53	20,44	0,135	2,317
19	14,012	20,09	0,137	1,702
20	17,49	20,02	0,125	1,749

3.2.3.1 Reação de copolimerização em miniemulsão com metacrilato de metila

As reações de copolimerização em miniemulsão foram realizadas em batelada, em ampolas de vidro de 20 mL, com aquecimento via banho de água com recirculação. As reações foram realizadas a 80 °C. A temperatura é controlada no decorrer das 2 h de reação. Por fim, o material polimérico foi colocado em estufa a 70 °C para secagem e calcular a conversão.

Em um béquer adiciona-se as quantidades de 33 g de água, 0,15 g de dodecil sulfato de sódio (SLS), 0,15 g de hexadecano (HD) e 0,15 g de persulfato de potássio (KPS) e 6 g de monômero. Em seguida, a mistura é submetida ao ultrassonicador por 4 minutos, com 70% de amplitude e 10 segundos on/5 off em banho de gelo para evitar polimerização.

Foram realizadas reações de copolimerização utilizando 5, 10 e 20% de monômero de ácido lático modificado (ALM) produzido pela esterificação seletiva com ácido acrílico com metacrilato de metila (MMA). Foi feita também a polimerização com 100% de MMA para efeitos comparativos. As reações foram feitas a 80 °C por 2 horas. A Figura 11 indica o fluxograma do processo de polimerização em miniemulsão. A Tabela 5 indica as quantidades de reagentes utilizados em cada reação de polimerização em miniemulsão.

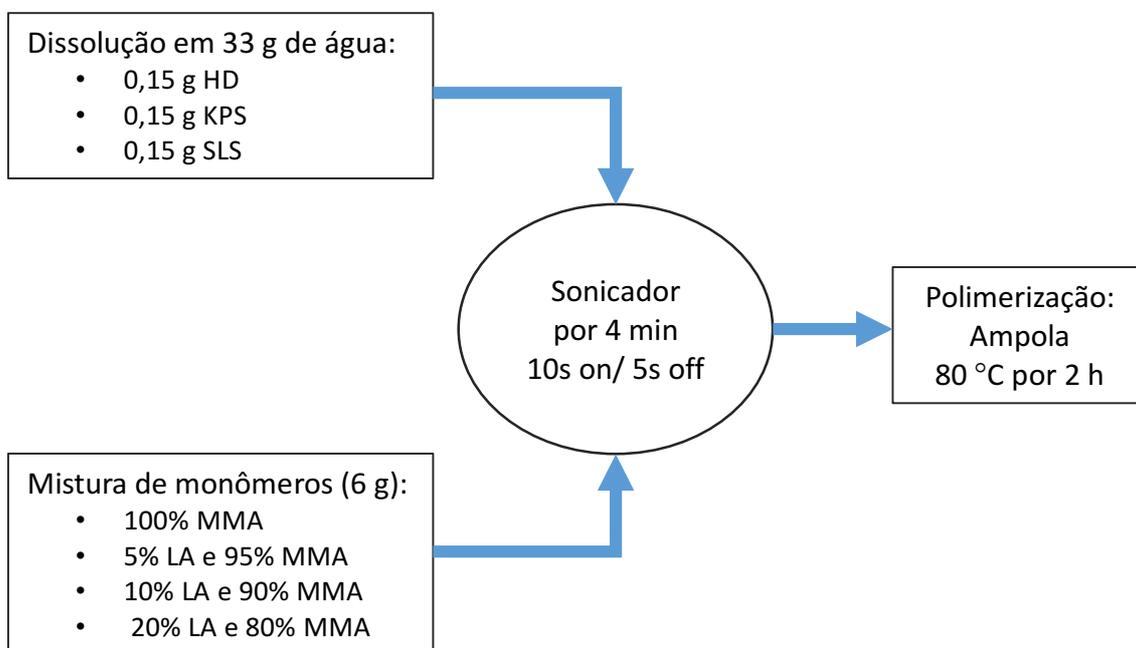


Figura 11 – Fluxograma do processo de polimerização em miniemulsão de metacrilato de metila.

Tabela 5. Quantidade de reagentes utilizadas para o preparo das miniemulsões com metacrilato de metila (MMA) e ácido láctico modificado (ALM).

	Água (g)	SLS (g)	MMA (g)	ALM (g)	KPS (g)	HD (g)
MMA	33,0	0,15	6,0	-	0,15	0,15
MMA e ALM5%	33,0	0,15	5,7	0,3	0,15	0,15
MMA e ALM 10%	33,0	0,15	5,4	0,6	0,15	0,15
MMA e ALM 10%	33,0	0,15	4,8	1,2	0,15	0,15

Para o copolímero com 10% de ALM, foram retiradas alíquotas nos tempos de 20, 40, 60, 90, 120 e 180 minutos para verificar a evolução da reação. Os valores de conversão foram obtidos através da Equação 5. Após o tempo de polimerização, a alíquota é levada para a estufa a 70 °C por aproximadamente 2 dias, até que atinja uma massa constante de polímero.

$$x(\%) = \frac{mpol}{mmon} \cdot 100\% \quad (5)$$

Onde *mpol* é a massa de polímero (peso seco), *mmon* é a massa de monômero total utilizado.

3.2.3.2 Técnicas de caracterização do monômero oriundo das reações de esterificação e do copolímero

- **Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR):** Com o auxílio de uma sonda *in situ*, a reação foi acompanhada durante as 3 horas. A cada 3 minutos, um espectro do meio reacional era obtido pela sonda de espectroscopia FTIR In Situ, marca Mettler Toledo, modelo ReactIR 15.
- **Ressonância magnética nuclear (RMN):** A composição química e estrutural do monômero e das várias etapas da síntese foram avaliadas através dos espectros obtidos através dos equipamentos de RMN (Varian Mercury Plus M300 MHz, Varian Instruments e Bruker 600 MHz, Magneto Ascend 600, Console Avance III HD). Aproximadamente 25 mg de amostra foram dissolvidas em 1 mL de clorofórmio deuterado (CDCl₃) e os espectros foram adquiridos a 25 °C, utilizando

TMS ($\delta = 0$ ppm) como padrão interno.

- **Cromatografia de permeação em gel (GPC):** As distribuições de massa molar e as massas molares médias foram determinados pela passagem de uma solução (contendo 5 mg do monômero dissolvido em 1 mL do solvente tetra-hidrofurano) por meio de um filtro de Teflon com um tamanho de malha de 45 micrômetros. O cromatógrafo possui um conjunto composto de três colunas montadas em série (KF-802.5, KF-804L e KF-805L) e detector de índice de refração (RID-10A), utilizando THF como fase móvel, a 40 °C, e com uma vazão volumétrica de 1 mL·min⁻¹.
- **Espalhamento de luz dinâmico (DLS):** O espalhamento de luz dinâmico é usado para medir o tamanho das partículas da miniemulsão e as formadas durante o processo de polimerização. A técnica é capaz de informar qual o tamanho médio de partículas (D_p) e a distribuição do tamanho de partículas (DTP). O equipamento utilizado foi Malvern Zetasizer-NanoSeries, modelo NANO ZS. A diluição feita foi de aproximadamente 1 gota para 10 mL de água destilada.
- **Calorimetria diferencial de varredura (DSC):** A calorimetria diferencial de varredura tem como princípio fundamental a medida da diferença de energia ou fluxo de calor de um material em relação a uma amostra de referência. A técnica foi utilizada para avaliar as temperaturas de transição vítrea (T_g) dos copolímeros formados a medida em que se alteram as composições dos copolímeros.

4 - Resultados e discussão

4.1 Seleção da bactéria

Dos 18 microrganismos testados, apenas um metabolizou o glicerol produzindo ácido láctico. Tal microrganismo foi identificado por meio da extração de DNA por sequenciamento genético pela bióloga colaboradora da Embrapa Agroenergia Jamille Ribeiro Coelho de Lima. A linhagem foi identificada como uma bactéria do gênero *Klebsiella* sp..

Sendo assim, a *Klebsiella* sp. foi selecionada para dar continuidade aos experimentos.

4.1.1 Avaliação da produção de ácido láctico em minirreatores

Após 48 horas de fermentação a 120 rpm e 32 °C, conforme o indicado no item 3.2.1.3, verificou-se que houve produção de ácido láctico e propanodiol em minirreatores (placas de 96 poços) utilizando meio suplementado com 4 % de glicerol. Ao fim da fermentação 92,5 % do glicerol inicial foi consumido.

Ao fim da fermentação, a bactéria produziu 3,8 g/L de ácido láctico e 5 g/L de propanodiol. Verificou-se que só houve produção de ácido láctico em condições anaeróbicas.²⁷

4.1.2 Avaliação da produção de ácido láctico em frasco tipo falcon

O experimento utilizando frasco tipo falcon teve como objetivo aumentar a escala mantendo as condições do experimento em placas de 96 poços. A Figura 12 mostra a produção do ácido láctico para diferentes diluições de creme da bactéria no meio M9 suplementado com 4 % de glicerol nas proporções de: 1:25, 1:50 1:10 e 1:12 para 24 e 48 horas com agitação de 120 rpm a 32 °C.

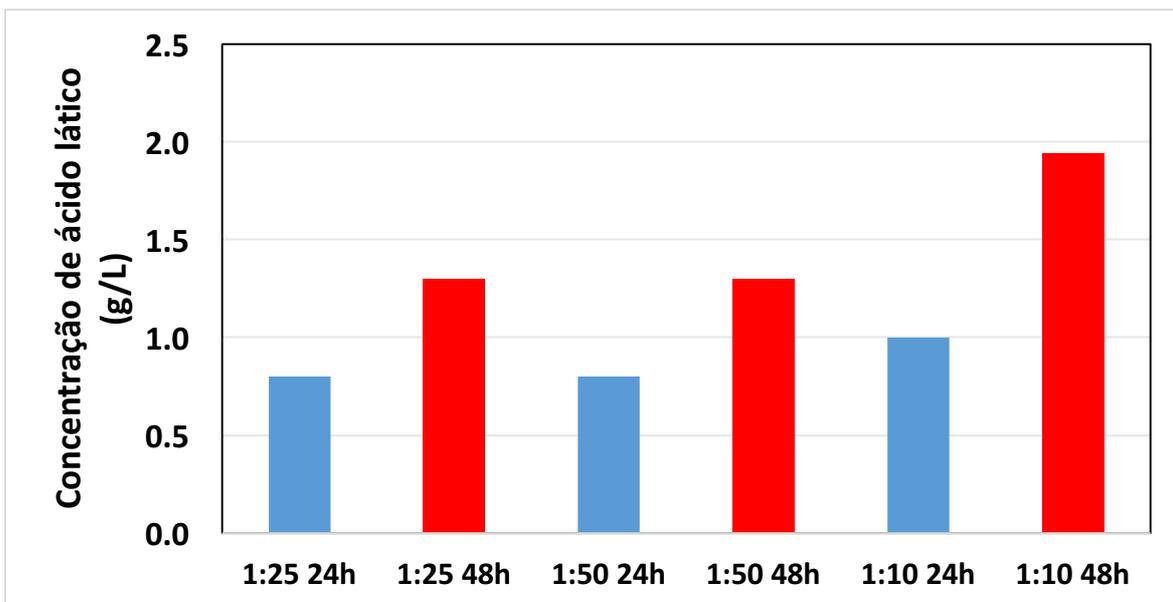


Figura 12 - Avaliação da produção de ácido láctico por *Klebsiella* sp. em diferentes condições de concentração de inóculo em tubos do tipo falcon de 15 mL.

A melhor condição com agitação foi o fator de diluição 1:10, em que foram produzidos 1,94 g/L de ácido láctico. Pode-se observar que os experimentos em que o creme estava mais diluído no meio, menor foi a produção de ácido láctico, visto que há um número menor de células metabolizando o glicerol e, conseqüentemente, produzindo menos ácido láctico.

Outro fator analisado foi a agitação. Quando a fermentação foi realizada em tubo falcon em incubadora, sem agitação, há menos oxigênio, o que favorece a via anaeróbica da bactéria. Tal fato pode ser verificado quando se compara a mesma diluição (1:12) com e sem agitação. O experimento realizado na incubadora e sem agitação mostrou uma produção de ácido láctico duas vezes maior do que o produzido no experimento efetuado no *shaker* rotativo a 120 rpm, como mostra a Figura 13.

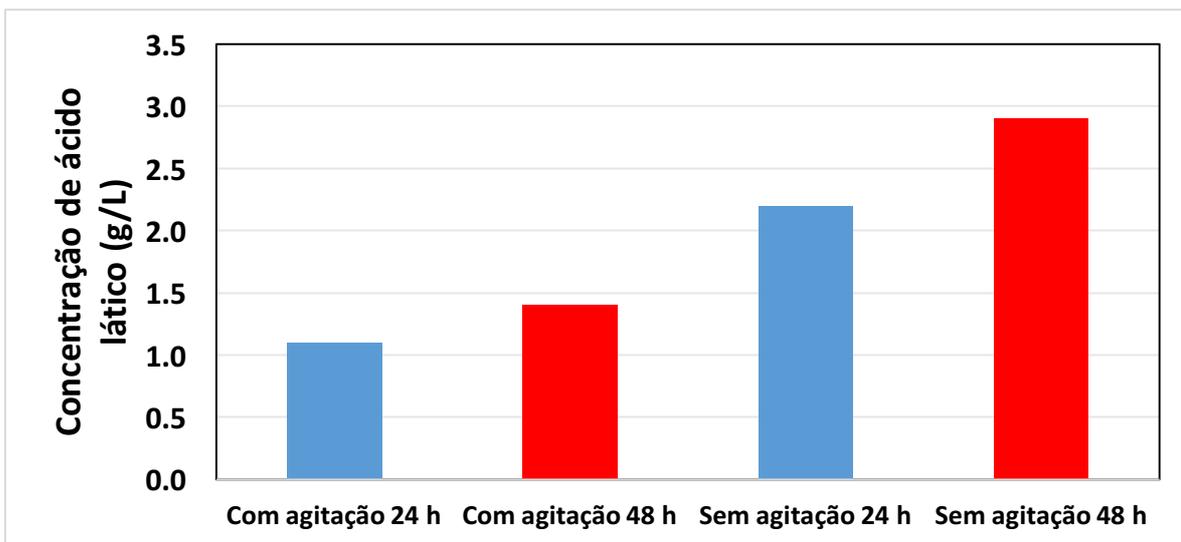


Figura 13 - Avaliação da produção de ácido láctico em diferentes condições de agitação para a proporção de 1:12 de meio em tubos do tipo falcon de 15 mL.

Em todas as fermentações houve a diminuição na concentração do glicerol. Entretanto, o consumo de glicerol foi maior no experimento realizado na incubadora sem agitação, mostrando que quanto menos aerado é o meio, mais glicerol será metabolizado para a produção de ácido láctico. Isso corrobora o fato de que a bactéria ativa a via do lactato em condições anaeróbicas.²⁶ A Figura 14 mostra o consumo do glicerol para as condições de agitação de 120 rpm no *shaker* e sem agitação em incubadora, ambas a 32 °C em 24 e 48 horas de fermentação.

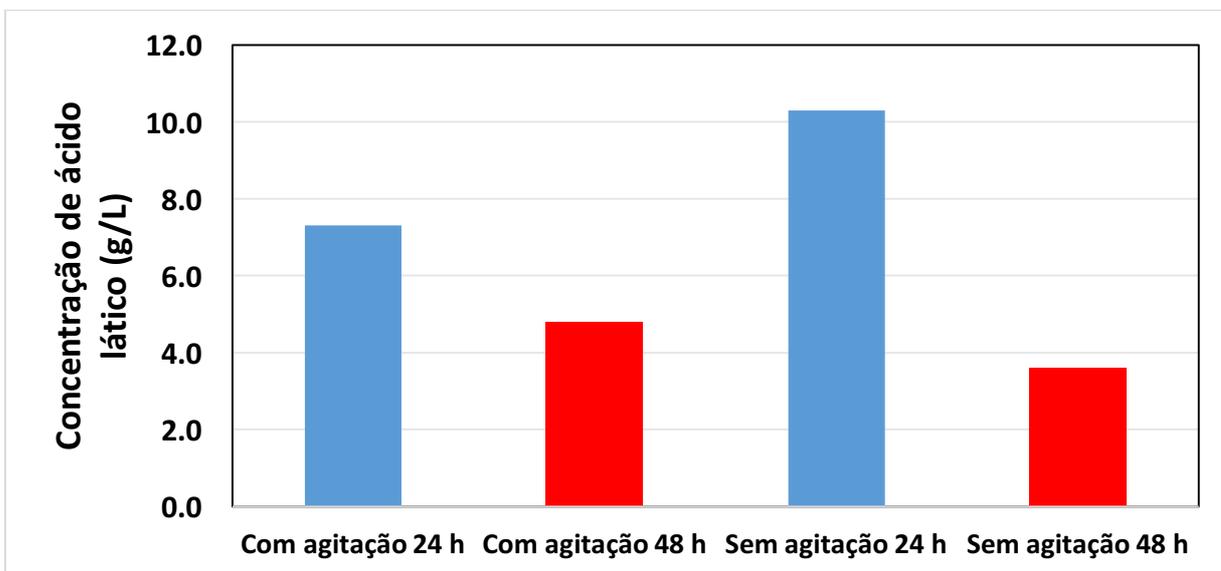


Figura 14 - Avaliação de glicerol residual em diferentes condições de agitação para a proporção de 1:12 de meio em tubos do tipo falcon de 15 mL.

Na Figura 15, que traz os resultados em diferentes condições de diluição, pode-se observar que a produção de propanodiol foi menor do que no experimento em

minirreatores. Tal fato é desejável, visto que o produto de interesse é o ácido láctico. O comportamento da produção do propanodiol é semelhante ao ácido láctico, ou seja, quanto menos células incubadas, menor é a produção. Além disso, os experimentos sem agitação também apresentam uma produção maior de propanodiol. A Figura 16 mostra as concentrações obtidas em diferentes condições de agitação.

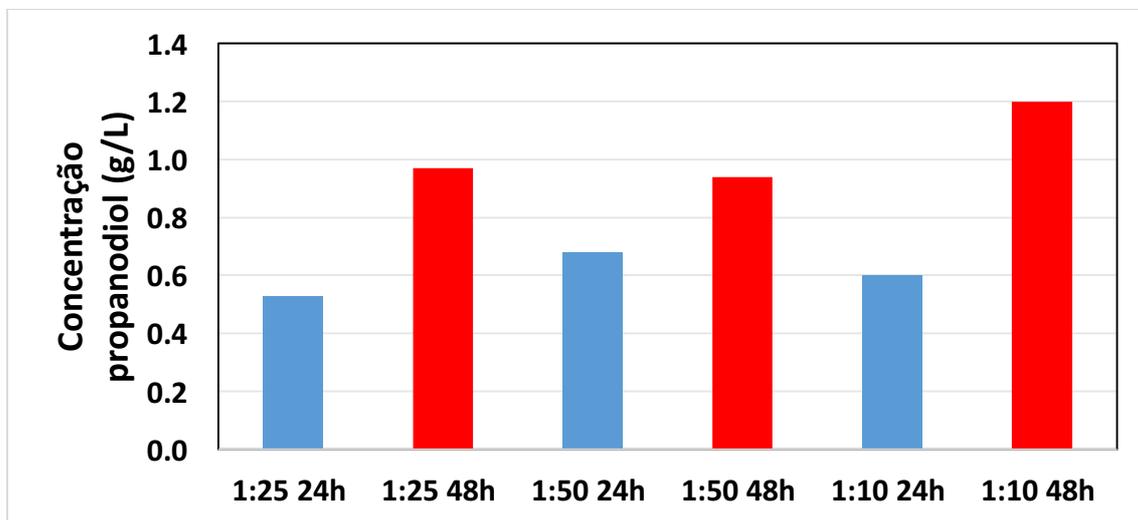


Figura 15 - Avaliação da produção de propanodiol em diferentes condições de concentração de inóculo em tubos do tipo falcon de 15 mL.

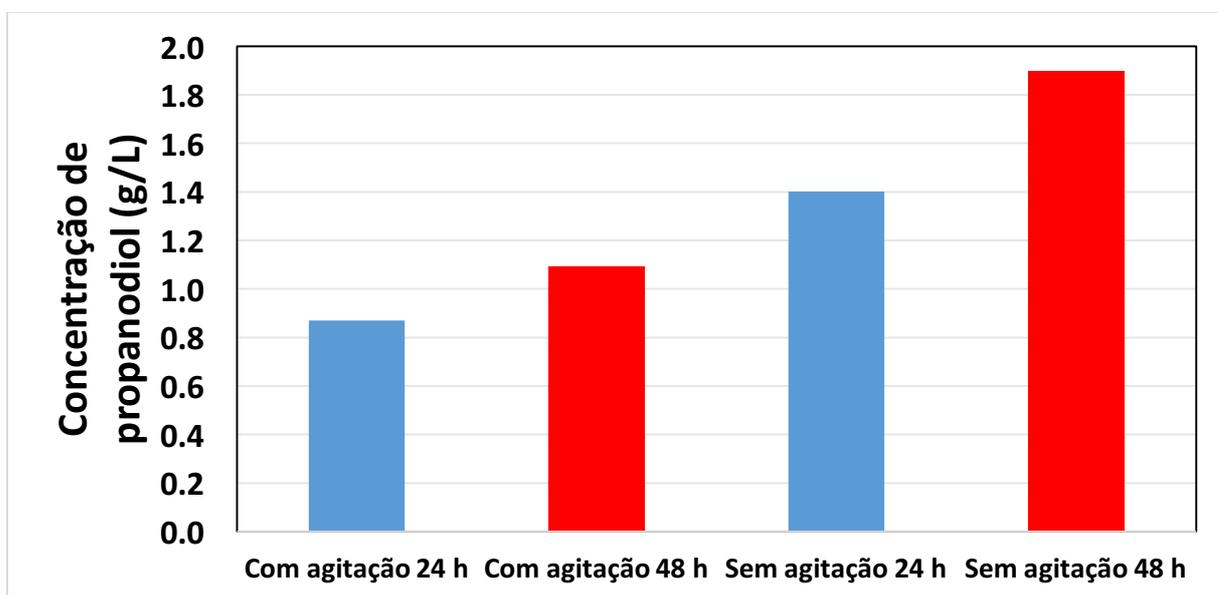


Figura 16 - Avaliação da produção de propanodiol em diferentes condições de agitação para a proporção de 1:12 de meio em tubos do tipo falcon de 15 mL.

Tendo em vista os resultados com melhor rendimento para ácido láctico, optou-se por continuar os experimentos com a diluição de 1:10, ou 15,5 g/L, de inóculo para o meio M9. A agitação também foi diminuída para 50 rpm.

4.1.3. Avaliação dos parâmetros de fermentação para uma melhor produção de ácido láctico, utilizando glicose como fonte de carbono: Planejamento Fatorial Completo

Como a glicose é um açúcar comumente utilizado como fonte de carbono em fermentações, por exemplo, no trabalho de Wong et al.³³, ela foi utilizada nos experimentos para comparar com os resultados obtidos com o glicerol, que foram realizados simultaneamente. A Figura 17 mostra as concentrações de ácido láctico e propanodiol nas fermentações com meio M9 e 10% de glicose.

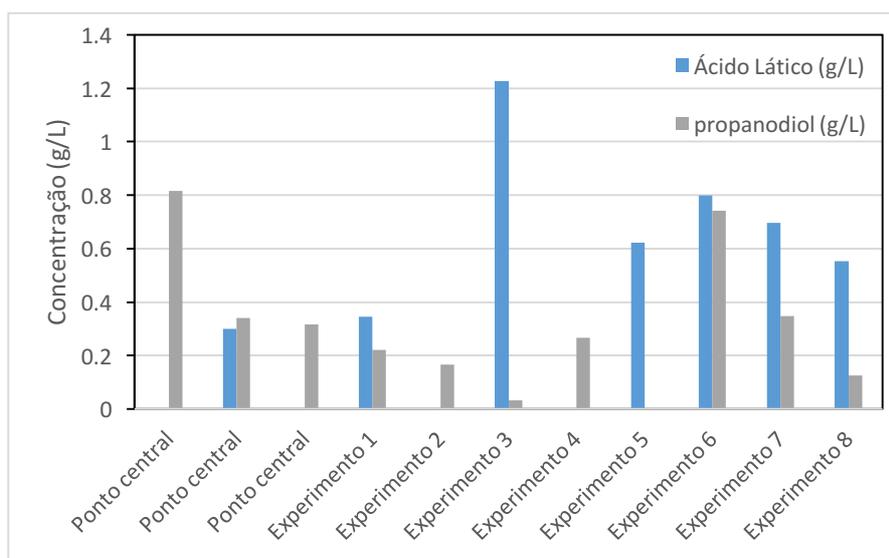


Figura 17 – Produção de ácido láctico e propanodiol obtidos em meio M9 com 10% de glicose por 48 horas para condições referentes aos experimentos do planejamento fatorial.

4.1.3.1 Análise da significância dos fatores e suas interações na produção de ácido láctico utilizando a glicose

A avaliação da significância dos efeitos (temperatura, concentração de inóculo e pH) foi realizada com base em análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Statistica como ferramenta. A Figura 18A apresentam o diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de ácido láctico, considerando o ponto equivalente a 48 h de fermentação nos experimentos com glicose. O “p-valor” ou “p” destacado pela linha vermelha no gráfico é o critério de significância estatística, o qual representa a magnitude mínima para que o parâmetro seja considerado significativo estatisticamente. Os valores a direita do “p-valor” satisfazem a hipótese estatística, ou seja, são significativos. O teste ANOVA indicou que apenas o efeito 1 (temperatura) e curvatura (o que indica que respostas não-lineares não podem ser desprezadas) são significativos para a concentração de ácido láctico na fermentação com glicose. O nível

de confiança para essas análises foi de 95% ($p = 0,05$).

Como já mencionado a temperatura foi a única variável significativa ao final das 48h de fermentação para os experimentos com glicose. Ou seja, a temperatura exerceu maior influência na produção de ácido láctico. Uma vez que esse fator é apresentado como um valor positivo, indica que quanto maior a temperatura (X_1), maior pode ser a produção de ácido láctico.

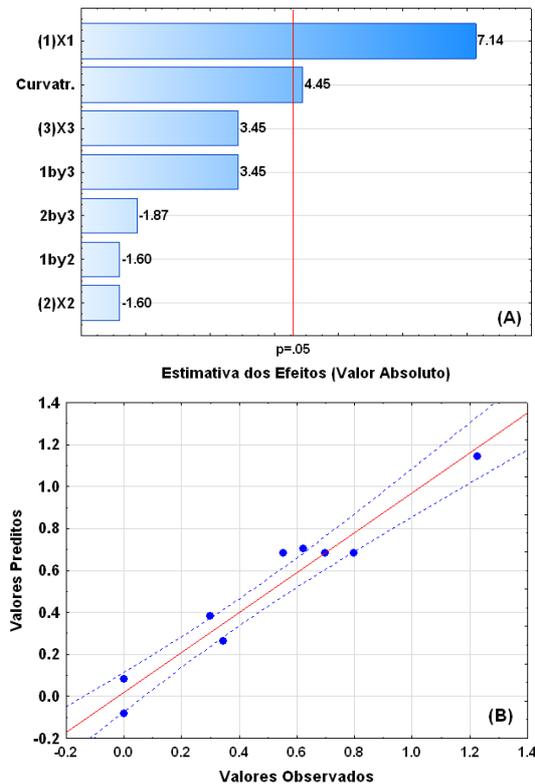


Figura 18 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de ácido láctico utilizando glicose como substrato (A) e predição do modelo de regressão (B) para 48 horas de fermentação com glicose.

Os dados experimentais obtidos com base no planejamento fatorial podem ser descritos por um modelo de regressão linear múltipla que leva em consideração as variáveis de processo, representado pela Equação 6.

$$y = \alpha + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{23} X_2 X_3 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \delta \alpha_c \quad (6)$$

onde, y representa as variáveis dependentes na condição experimental, α_i ($i = 0, 1, 2$ e 3) são os coeficientes de regressão linear, X_i são as variáveis independentes e α_c é o parâmetro associado à curvatura e ao erro da triplicata do ponto central. Além disso, o parâmetro δ é tido como:

$$\delta = \begin{cases} 1, & \text{se o ponto corresponde ao ponto central} \\ 0, & \text{demais pontos experimentais} \end{cases}$$

A Figura 18B representa a capacidade de predição do modelo com relação à produção do ácido lático, indicando que o modelo linear prediz de forma satisfatória os dados obtidos experimentalmente, uma vez que a maioria dos pontos se encontram dentro da curva de contorno. Considerando apenas as variáveis significativas, podemos representar o modelo de processo como:

$$y = 0,31 + 0,31X_1 + 0,37\delta \quad (7)$$

O coeficiente de correlação R^2 foi de 94,96 para essa equação.

Podemos verificar por meio das curvas de nível expressas na Figura 19A que há uma tendência para maior produção de ácido lático quando há aumento na temperatura, corroborando os dados obtido pela ANOVA. A concentração celular não se mostra significativa. Fica claro que, assim como o indicado no digrama de Pareto, o único fator significativo nos gráficos de curva de nível foi a temperatura. Em 19B, mais uma vez mostra que a temperatura exerce uma forte influência para a produção de ácido lático. A Figura 19C mostra a tendência de maiores produções de ácido lático em pH mais básicos, apesar desta variável não ter se apresentado como significativa.

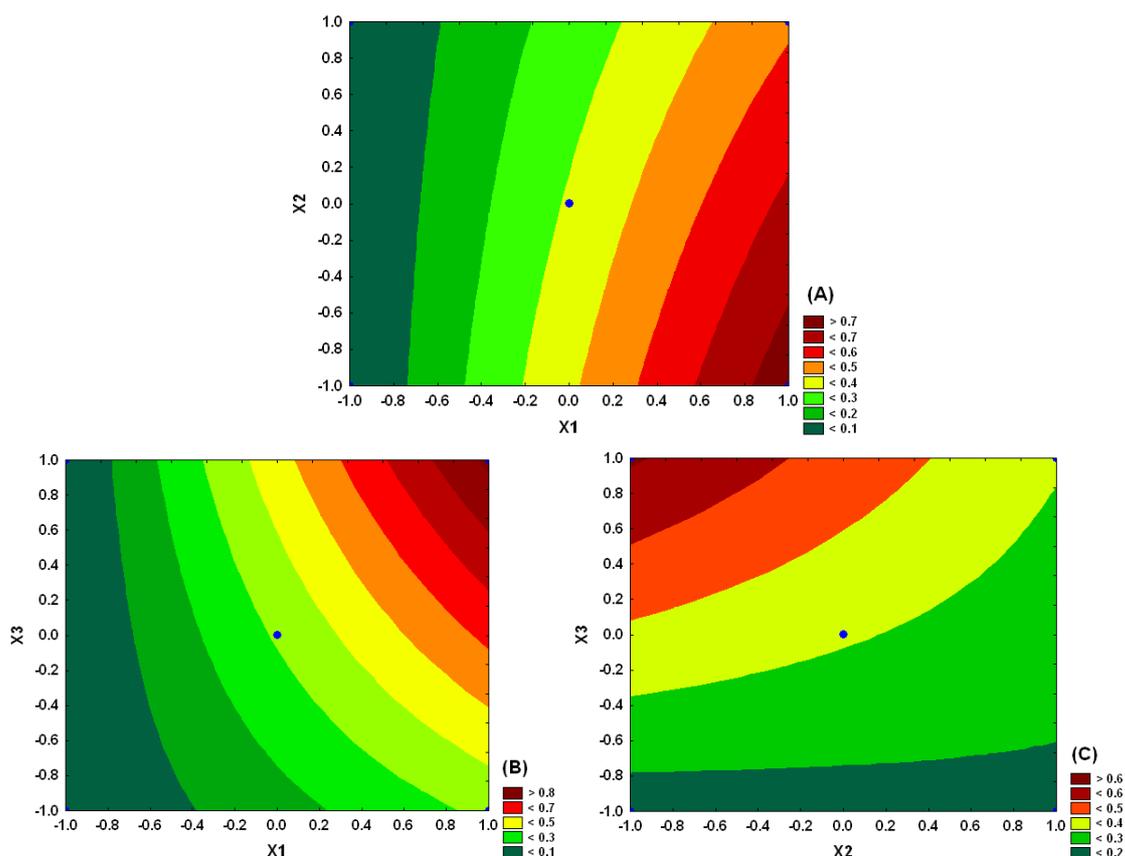


Figura 19 - Curva de nível para experimento com glicose relacionando (A): temperatura (X1) com concentração celular (X2); (B): temperatura (X1) com pH (X3) e (C) concentração celular (X2) com pH (X3) para produção de ácido lático por *Klebsiella* sp..

4.1.3.2 Análise da significância dos fatores e suas interações na produção de propanodiol para o consumo de glicose

A Figura 20A apresenta o diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de propanodiol nos experimentos com glicose, considerando o ponto equivalente a 48 h de fermentação. O teste ANOVA indicou que nenhum efeito foi significativo para a produção de propanodiol, dentro da faixa estudada. O nível de confiança para essas análises foi de 95% ($p = 0,05$).

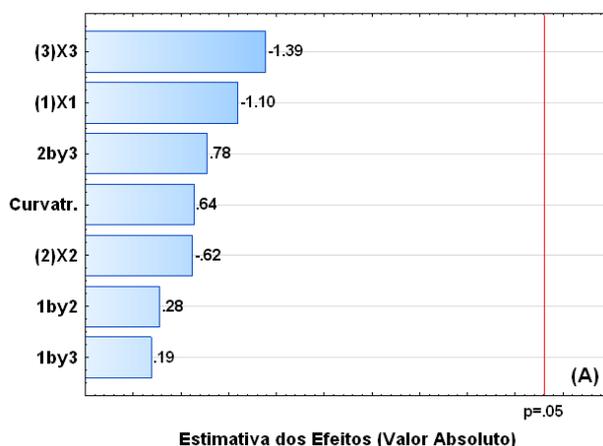


Figura 20 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de propanodiol utilizando glicose como substrato.

O diagrama de Pareto não indicou fatores significativos para o experimento com glicose, porém algumas tendências podem ser inferidas através de análises das curvas de nível. A Figura 21 mostra as curvas de nível para o experimento do glicose e produção de propanodiol. Em 21A verifica-se que há uma tendência de maior produção de propanodiol para temperaturas mais baixas.

A Figura 21B mostra que pH mais básicos desfavorecem a produção de propanodiol. Isso é interessante, uma vez que o produto de interesse é o ácido lático e um meio de cultivo mais básico favorece sua produção.

A Figura 21C confirma a tendência de maior produção de propanodiol em meios mais ácidos. Sendo assim, no próximo planejamento, o pH será mais alto para minimizar a produção do propanodiol.

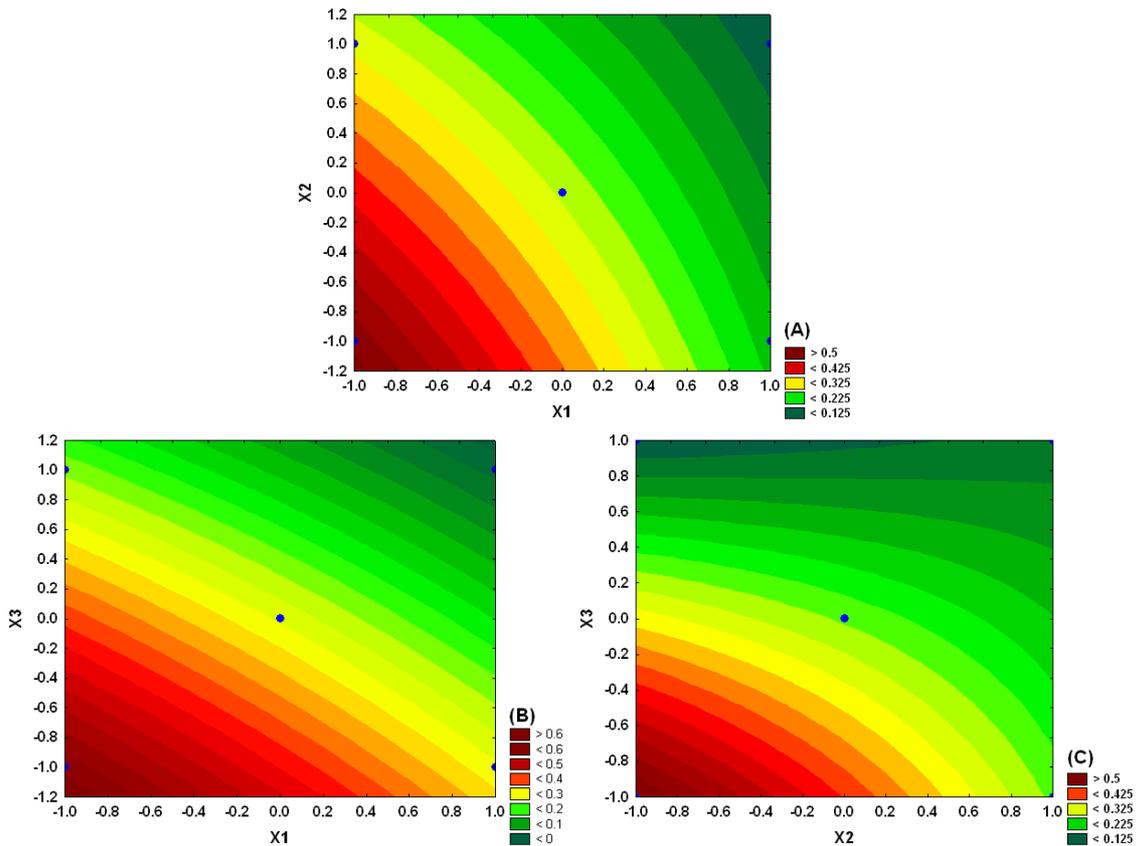


Figura 21 - Curva de nível para experimento com Glicose relacionando (A): temperatura (X1) com concentração celular (X2); (B): temperatura (X1) com pH (X3) e (C) concentração celular (X2) com pH (X3) para produção de propanodiol.

4.1.4 Planejamento Fatorial Completo: Avaliação dos parâmetros de fermentação para uma melhor produção de ácido lático, utilizando glicerol como fonte de carbono

A Figura 22 mostra a obtenção de ácido lático e propanodiol nos experimentos utilizando meio M9 suplementado com 10% de glicerol. HONG et al.⁶ utilizou glicerol como fonte de carbono em processos fermentativos utilizando o microrganismo *E. Coli* AC-521e produziu 85,8 g/L de ácido lático.

Observou-se uma melhor produção de ácido lático nos experimentos que foram suplementados com glicerol. Sendo assim, os próximos planejamentos experimentais serão feitos apenas com o glicerol.

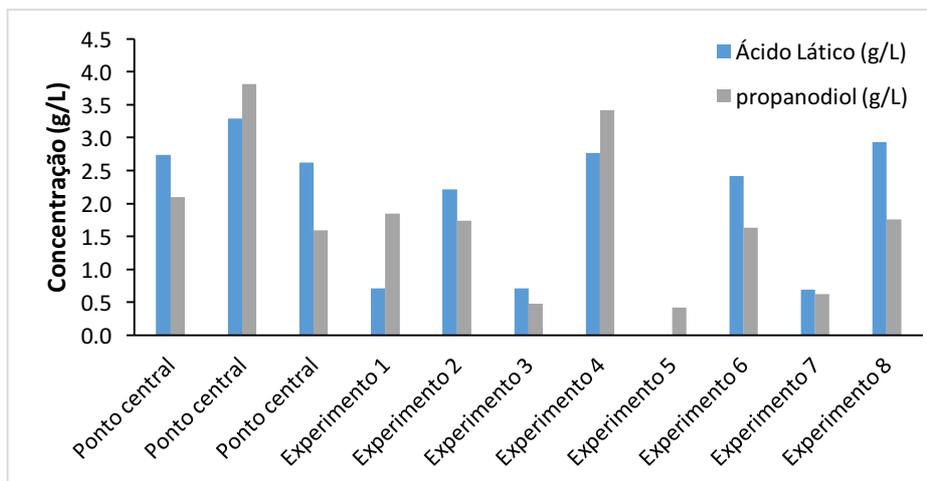


Figura 22 – Produção de ácido láctico e propanodiol obtidos em meio M9 com 10% de glicerol por 48 horas para as condições referentes aos experimentos do planejamento fatorial.

4.1.4.1 Análise da significância dos fatores e suas interações na produção de ácido láctico para o consumo de glicerol

Foi feita a avaliação da significância dos mesmos efeitos (temperatura, concentração de inóculo e pH) para os experimentos que utilizaram o glicerol como fonte de carbono, com base em análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Statistica como ferramenta.

A Figura 23A apresenta o diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de ácido láctico, considerando o ponto equivalente a 48 h de fermentação nos experimentos com glicerol. Como apenas o efeito 1 (temperatura) e curvaturas estão a direita do “p-valor”, somente eles são significativos para a produção de ácido láctico e satisfazem a hipótese estatística dentro da faixa avaliada.. O nível de confiança para essas análises foi de 95% ($p = 0,05$).

O teste ANOVA indicou que temperatura foi a única variável significativa ao final das 48 h de fermentação para os experimentos com glicerol. Uma vez que esse fator é apresentado como um valor positivo, indica que quanto maior a temperatura (X_1), maior foi a produção de ácido láctico.

A Figura 22B representa a capacidade de predição do modelo com relação à produção do ácido láctico, indicando que o modelo linear prediz de forma satisfatória os dados obtidos experimentalmente, uma vez que a maioria dos pontos se encontram dentro da curva de contorno.

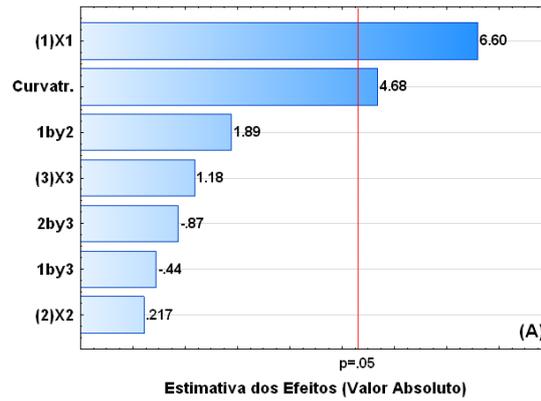


Figura 23 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de ácido láctico utilizando glicerol como substrato (A).

O modelo de regressão para o experimento utilizando o glicerol como fonte de carbono pode ser expresso como:

$$y = 1,75 + 0,83X_1 + 0,027X_2 + 0,15X_3 + 0,24X_1 X_2 - 0,11X_1 X_3 - 0,055X_1 X_3 + 1,13\delta \quad (8)$$

O coeficiente de correlação R^2 foi 96,4. Considerando apenas os fatores significativos, a equação da reta seria:

$$y = 1,75 + 0,83X_1 + 1,13\delta \quad (9)$$

Com as curvas de nível é possível verificar a tendência da produção do ácido láctico comparando dois fatores independentes. A Figura 24 é referente ao experimento utilizando o glicerol para a produção de ácido láctico.

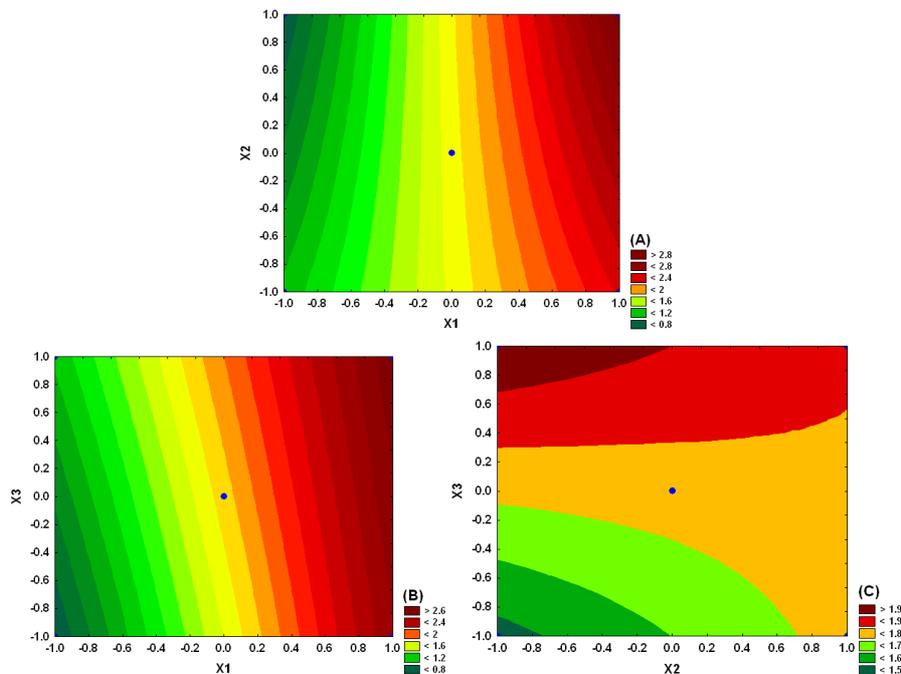


Figura 24 – Curva de nível para experimento com Glicerol relacionando (A): temperatura (X1) com concentração celular (X2); (B): temperatura (X1) com pH (X3) e (C) concentração celular (X2) com pH (X3) para produção de ácido láctico.

Fazendo uma análise da Figura 24A, é possível verificar que há uma tendência para maior produção de ácido láctico quando há aumento na temperatura. Sendo assim, o próximo planejamento de experimento será feito com temperaturas maiores, uma vez que o objetivo é aumentar a produção do ácido láctico. Também podemos verificar que as curvas de nível corroboram com a análise feita pelo diagrama de Pareto, reforçando que a variação na concentração celular (X2) não foi significativa para a produção de ácido láctico. Isso pode ocorrer devido ao fato de que a produção de ácido láctico ocorre durante o crescimento celular.

A Figura 24B indica mais uma vez que há uma tendência de maior produção de ácido láctico para maiores temperaturas. O fator 3 (pH) apresenta-se de forma não significativa. A Figura 24C indica que, apesar de não ser um fator significativo no diagrama de Pareto, o aumento do pH (X3) pode levar a uma maior produção de ácido láctico.

4.1.4.2 Análise da significância dos fatores e suas interações na produção de propanodiol para o consumo de glicerol

A Figura 25 apresenta o diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de propanodiol nos experimentos com glicerol, considerando o ponto equivalente a 48 horas de fermentação. O teste ANOVA indicou que nenhum efeito foi significativo para a produção de propanodiol. O nível de confiança para essas análises foi de 95% ($p = 0,05$).

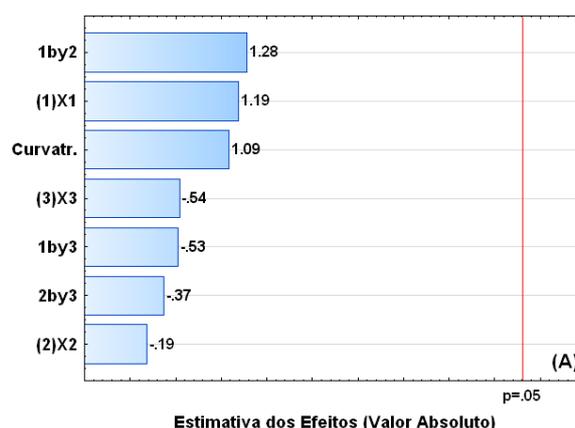


Figura 25 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de propanodiol utilizando glicerol como substrato.

Algumas tendências podem ser inferidas por meio de análises das curvas de níveis. A Figura 26 mostra as curvas de nível para o experimento com glicerol na produção do propanodiol. Em 26A verifica-se que há uma tendência de maior produção de propanodiol para temperaturas mais elevadas. A Figura 26B mostra que pH mais

baixos favorecem a produção de propanodiol. A produção de ácido lático é favorecida com o aumento do pH, deste modo pode-se pensar em trabalhar em pH mais básicos para desfavorecer a produção do propanodiol, uma vez que se deseja obter uma maior produção do ácido lático.

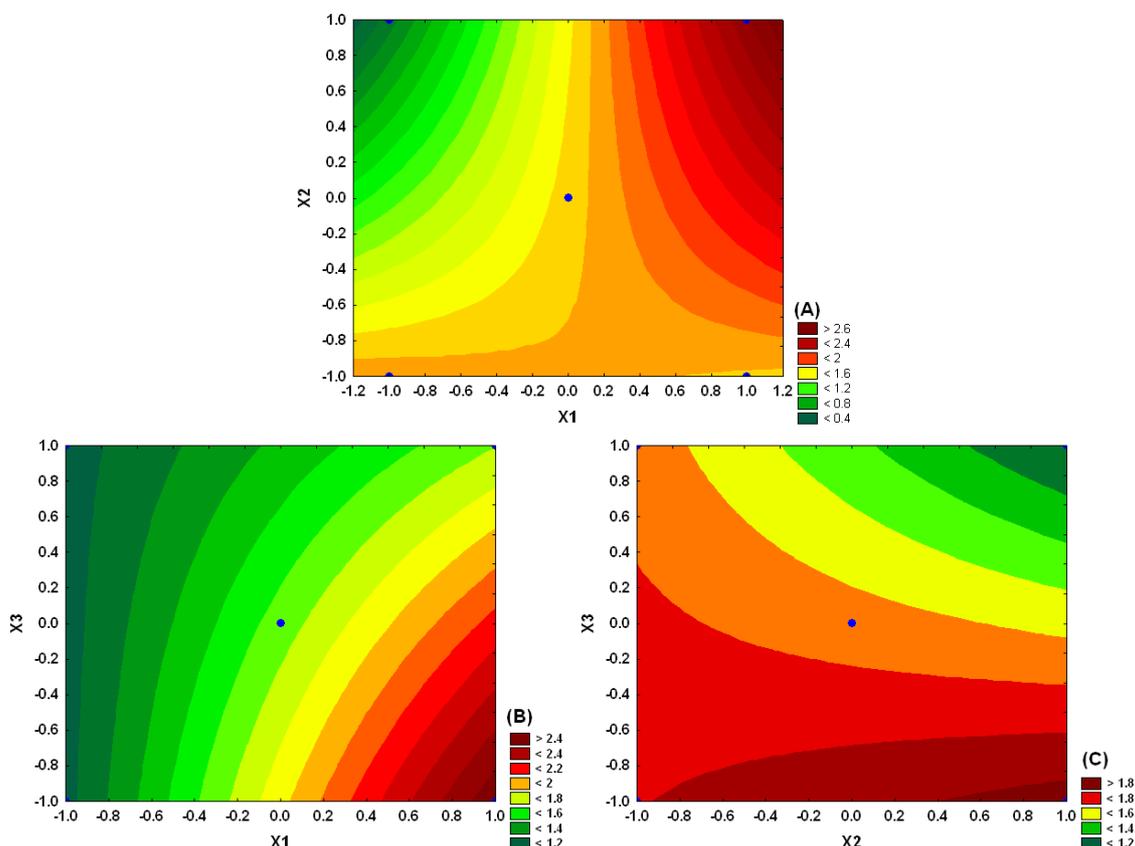


Figura 26 - Curva de nível para experimento com Glicerol relacionando (A): temperatura (X1) com concentração celular (X2); (B): temperatura (X1) com pH (X3) e (C) concentração celular (X2) com pH (X3) para produção de propanodiol.

A Figura 26C confirma a tendência de maior produção de propanodiol em meios mais ácidos e ainda indica que, em maiores concentrações de células, há mais formação de propanodiol. Sendo assim, no próximo planejamento, pH mais alto e menores concentrações de células serão explorados, para minimizar a produção do propanodiol.

De maneira geral, observou-se que o comportamento para a produção de ácido lático e propanodiol nas fermentações utilizando a glicose como fonte de carbono foi semelhante ao comportamento das fermentações com glicerol. Contudo, viu-se que a produção de ácido lático é maior quando o glicerol é usado como fonte de carbono. Então, foi estabelecido que os próximos experimentos serão feitos apenas com o glicerol como suplemento de meio, para maximizar a produção de ácido lático. Um novo planejamento de experimento foi realizado para avaliar novas condições que o

experimento fatorial apontou como melhores para produção de ácido láctico.

4.1.5. Plano central composto rotacional (PCCR): Avaliação dos parâmetros de fermentação para uma melhor produção de ácido láctico utilizando glicerol como fonte de carbono.

A Figura 27 mostra a obtenção de ácido láctico e propanodiol nos experimentos utilizando meio M9 suplementado com 4% de glicerol. Foram retiradas alíquotas em 48 e 72 horas. Verificou-se um aumento significativo na produção de ácido láctico para o tempo de 72 horas.

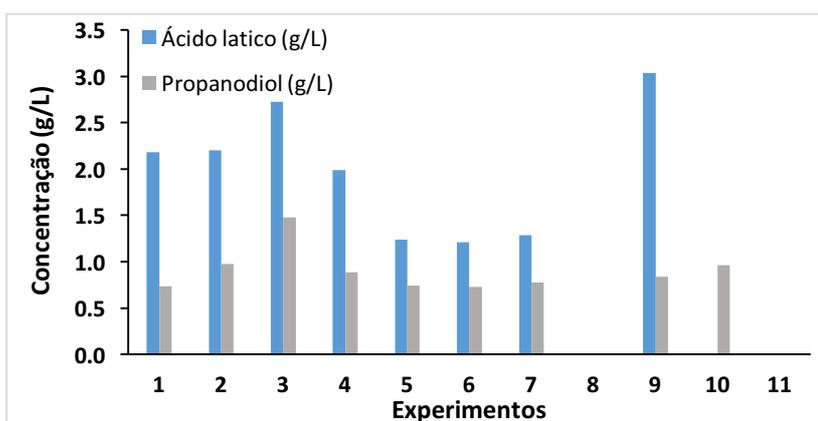


Figura 27 - Produção de ácido láctico e propanodiol obtidos em meio M9 com 4% de glicerol por 72 horas para as condições referentes aos experimentos do planejamento central composto rotacional.

4.1.5.1 Análise da significância dos fatores e suas interações na produção de ácido láctico

Foi feita a avaliação da significância dos efeitos da concentração de inóculo e pH para os experimentos apresentados na Tabela 3, a 37 °C que utilizaram o glicerol como fonte de carbono, com base em análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Statistica como ferramenta.

A Figura 28A apresenta o diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de ácido láctico, considerando o ponto equivalente a 72 h de fermentação nos experimentos do segundo conjunto de experimentos. Como os efeitos 1 e 2 estão à direita do “p-valor”, indica que a concentração do inóculo (X1) e o pH (X2) são significativos para a produção de ácido láctico e satisfazem a hipótese estatística dentro da faixa avaliada. O teste ANOVA indicou que o efeito densidade óptica foi significativo para a produção de ácido láctico. O efeito entre a relação quadrática do pH e da densidade óptica também foram significativos, assim como o efeito de relação X1 por X2. O nível de confiança para essas análises foi de 95% ($p = 0,05$).

Na Figura 28B é possível verificar a curva de nível referente a produção de ácido láctico, relacionando os fatores densidade óptica (X1) com pH (X2). Os resultados corroboram com os obtidos no diagrama de Pareto, indicando que maiores concentrações de inóculo tendem a produzir mais ácido láctico. Quando analisa-se o fator pH, verifica-se uma maior tendência de produção próximo ao ponto central, indicando que o meio deve ter pH 9,5.

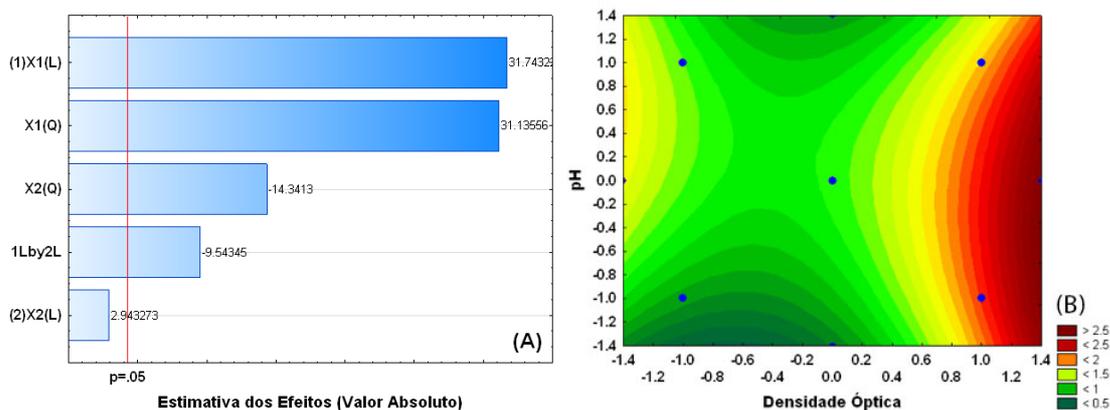


Figura 28 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de ácido láctico utilizando glicerol como substrato (A); para 72 horas de fermentação com glicerol e curva de nível (B) para experimento relacionando densidade óptica (X1) com pH (X2).

4.1.5.2 Análise da significância dos fatores e suas interações para a produção de propanodiol

Os fatores pH e densidade óptica também foram analisados para a produção de propanodiol. A Figura 29A apresenta o diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de propanodiol, considerando o ponto equivalente a 72 h de fermentação nos experimentos do planejamento fatorial 2 com glicerol. Como os efeitos 1 e 2 estão a esquerda do “p-valor”, indica que a concentração do inóculo (X1) e o pH (X2) também são significativos para a produção de propanodiol e satisfazem a hipótese estatística dentro da faixa avaliada. O teste ANOVA indicou que os fatores densidade óptica e pH são significativos para a produção de propanodiol, assim como a relação entre os fatores. O nível de confiança para essas análises foi de 95% ($p = 0,05$).

Na Figura 29B é possível verificar a curva de nível referente à produção de ácido láctico, relacionando os fatores densidade óptica (X1) com pH (X2). Os resultados corroboram com os obtidos no diagrama de Pareto, indicando que maiores concentrações de inóculo tenderiam a produzir mais ácido láctico. Quando se analisa o fator pH, verifica-se uma maior tendência de produção de propanodiol próximo em pH mais ácido.

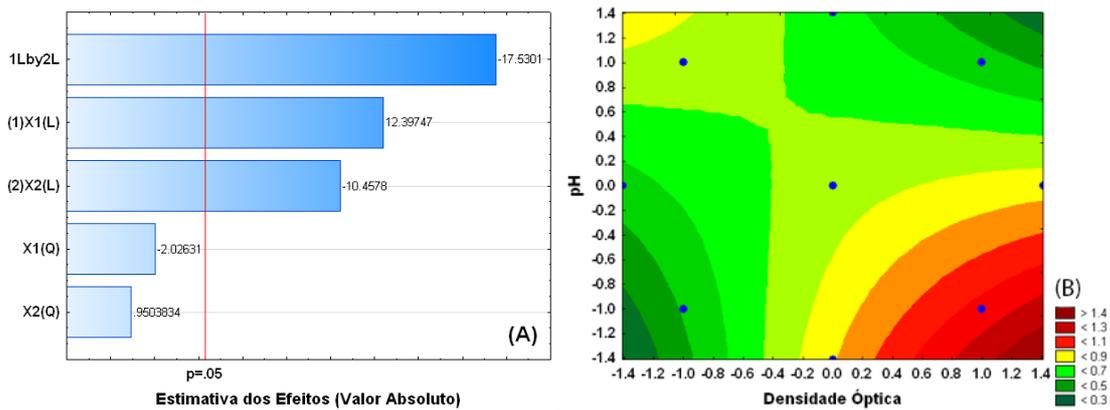


Figura 29 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação à produção de propanodiol utilizando glicerol como substrato (A); Predição do modelo de regressão (B) para 72 horas de fermentação com glicerol e curva de nível (C) para experimento relacionando densidade óptica (X1) com pH (X2).

4.1.5.3 Análise da significância dos fatores e suas interações para o consumo de glicerol

A Figura 30A apresenta o diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação ao consumo de glicerol, considerando o ponto equivalente a 72 h de fermentação nos experimentos do planejamento fatorial 2. Ambos os efeitos, 1 e 2 estão a esquerda do “p-valor”, indicando que a concentração do inóculo (X1) e o pH (X2) são significativos para a concentração de ácido lático e satisfazem a hipótese estatística dentro da faixa avaliada. O teste ANOVA indicou que as relações quadráticas dos fatores densidade óptica e pH são fatores significantes para o consumo de glicerol. O nível de confiança para essas análises foi de 95% ($p = 0,05$).

A Figura 30B representa a capacidade de predição do modelo com relação ao consumo do glicerol, indicando que o modelo linear prediz de forma satisfatória os dados obtidos experimentalmente, uma vez que a maioria dos pontos se encontram dentro da curva de contorno.

O modelo de regressão para o experimento utilizando o glicerol como fonte de carbono teve coeficiente de correlação R^2 de 92,08 e pode ser expresso como:

$$y = 45,07 - 3,33X_1^2 - 4,48X_2^2 \quad (10)$$

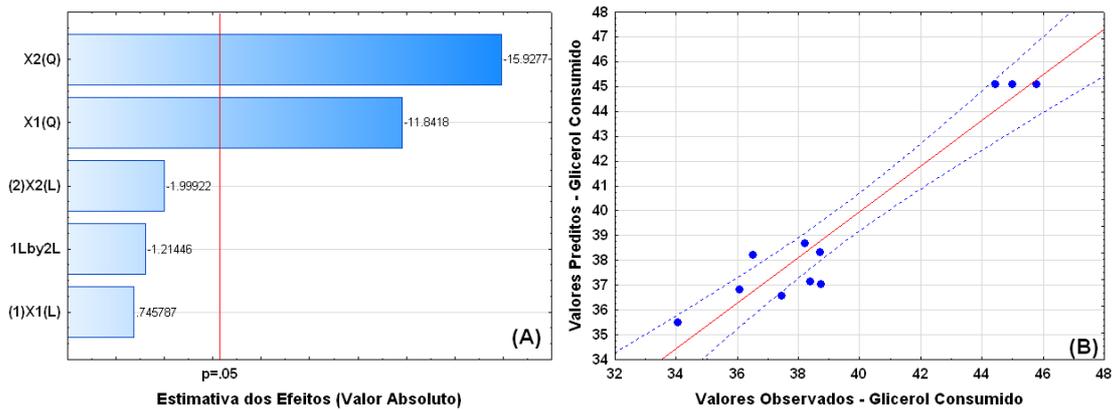


Figura 30 - Diagrama de Pareto para efeitos normalizados com relação ao consumo de glicerol (A); Predição do modelo de regressão (B) para 72 horas de fermentação com glicerol.

Com o gráfico de superfície e a curva de nível representados na Figura A e B é possível verificar um ponto de máximo consumo de glicerol. Tal fato mostra que as condições de maior consumo de glicerol é o ponto central. Tal condição é aproximadamente a mesma para o pH para a produção do ácido lático. A partir desse experimento, foi possível verificar quais parâmetros influenciam de forma mais significativa na produção do ácido lático e usá-los no experimento em biorreator. Tais condições foram: pH 9,5, temperatura 37 °C e 14,9 g/L de concentração de inóculo.

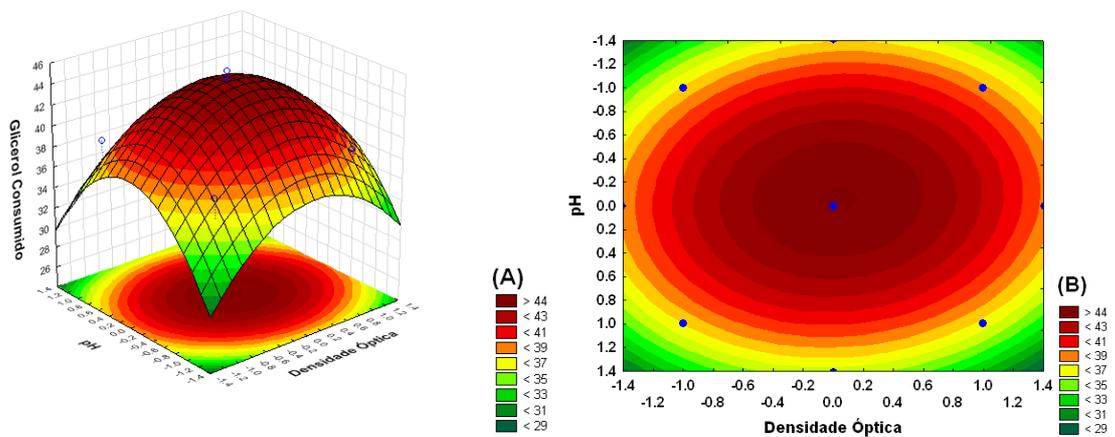


Figura 31 – Gráfico de superfície para o consumo de glicerol para experimentos do planejamento fatorial 2 (A) e curva de nível (B) para o consumo de glicerol para experimento relacionando densidade óptica (X1) com pH (X2).

4.1.6. Produção de ácido lático em biorreator

O experimento utilizando em biorreatores de 1 litro teve como objetivo aumentar a escala, utilizando as melhores condições observadas no segundo conjunto de experimentos. O microrganismo foi inoculado em meio M9 suplementado com 2 % de glicerol devidamente estéril, com agitação de 100 rpm a 37 °C. A concentração de inóculo ótima obtida no experimento 4.1.5 foi de 14,9 g/L. Porém, seria inviável produzir essa quantidade de microrganismo para o experimento em biorreator. Sendo assim, a

concentração inicial utilizada foi de 6 g/L de inóculo para cada vaso.

A Fermentação ocorreu por 72 horas, sendo retirada alíquota em 48 horas. O sistema de fermentação foi um biorreator da marca New Brunswick, modelo Bioflo/celligen 115 e realizado em duplicata com as mesmas condições, sendo denominados vaso 1 e vaso 2. Os valores de concentração obtido nos vasos encontram-se nas Tabelas 6 e 7. No fim do experimento, o pH final do meio foi 6,52 no vaso 1 e 6,81 para o vaso 2.

Obteve-se valores de concentração de ácido láctico maiores do que em experimentos em erlenmeyers. Isso ocorre porque a condição do meio reacional é mais controlada no biorreator. Além disso, as condições de anaerobiose são mais eficientes, uma vez que há injeção de gás nitrogênio, inibindo a presença de gás oxigênio.

Tabela 6. Valores de concentrações obtidos como produtos da fermentação em biorreator para o reator 1

	Ácido Láctico (g/L)	Glicerol (g/L)	Propanodiol (g/L)
48 horas	1,62003	25,033559	0,72118
72 horas	3,13822	20,15828	1,69269

Tabela 7. Valores de concentrações obtidos como produtos da fermentação em biorreator para o reator 2

	Ácido Láctico (g/L)	Glicerol (g/L)	Propanodiol (g/L)
48 horas	1,66764	23,12650	1,66764
72 horas	3,0661	20,14387	1,49463

Com bases nos resultados obtidos, outras fermentações em biorreatores podem ser realizadas, mudando as condições do meio para obter maiores concentrações de ácido láctico. Fatores como concentração do inóculo e a injeção do gás nitrogênio são exemplos de parâmetros que podem ser reavaliadas para maximizar a produção.

4.2 Esterificação seletiva de ácido láctico com ácido acrílico

O monômero resultante da esterificação seletiva de ácido láctico e ácido acrílico foi sintetizado de acordo com o procedimento experimental descrito na Seção 3.2.2. Foram realizados testes e análises a fim de verificar se os materiais esperados estavam sendo formados.

A Figura 32 é uma hipótese de reação de esterificação esperada, de acordo com a estequiometria do sistema e os dados de caracterização que prevemos acontecer no processo.

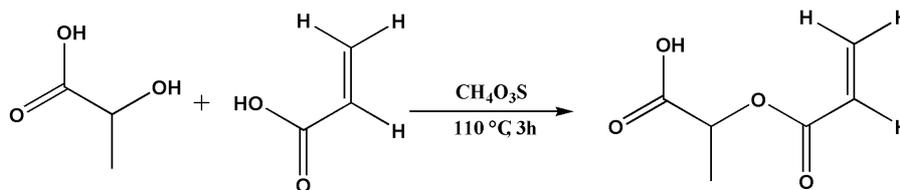


Figura 32 – Reação de esterificação entre o ácido láctico e ácido acrílico.

Com o auxílio de uma sonda FTIR *in situ*, foi possível acompanhar a reação. A Figura 33 mostra o consumo de reagentes e a formação do produto ao longo do tempo. É possível verificar que houve consumo dos reagentes, verificando que a esterificação de fato ocorreu ao fim das 3 horas.

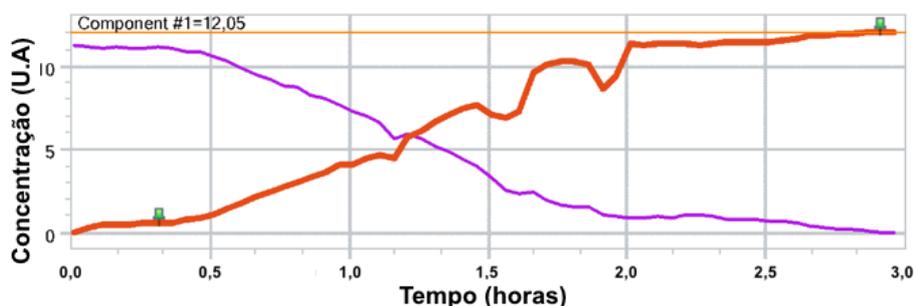


Figura 33 – Perfil de consumo de reagentes e formação dos produtos durante a reação de esterificação seletiva entre o ácido láctico e ácido acrílico obtido através na sonda de infravermelho *in situ* onde os reagentes estão representados pela linha roxa e os produtos pela linha vermelha.

A Figura 34 mostra a desconvolução dos espectros de infravermelho dos reagentes (roxo) e do produto (vermelho). Pode-se verificar o surgimento de um sinal em 1096 cm^{-1} característico de estiramento C-O de éster, sendo um indicativo de que a esterificação ocorreu. Outro indicativo é a supressão do sinal em 1126 cm^{-1} característico de C-O de álcool, mostrando que a hidroxila do ácido láctico foi consumida durante a reação. Em 1730 cm^{-1} ainda é possível verificar o estiramento da dupla referente a carbonila. A dupla ligação entre os carbonos pode ser verificada nos sinais em 1630 cm^{-1} .

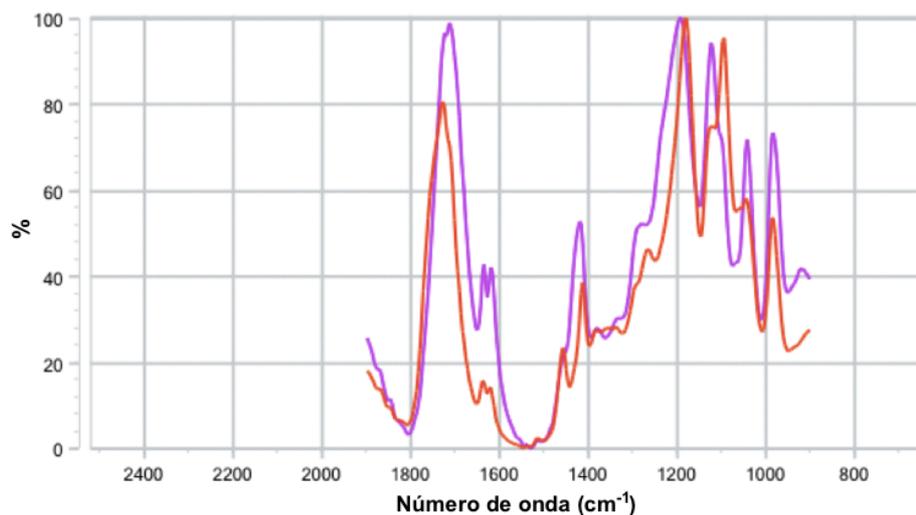


Figura 34 - Desconvolução dos espectros de infravermelho dos reagentes (roxo) e do produto (vermelho).

Outro método de caracterização utilizado foi a RMN, que foi utilizada para verificar as modificações geradas na molécula após cada etapa de reação. A Figura 35 mostra os espectros obtidos no início da reação e ao final das 3 horas

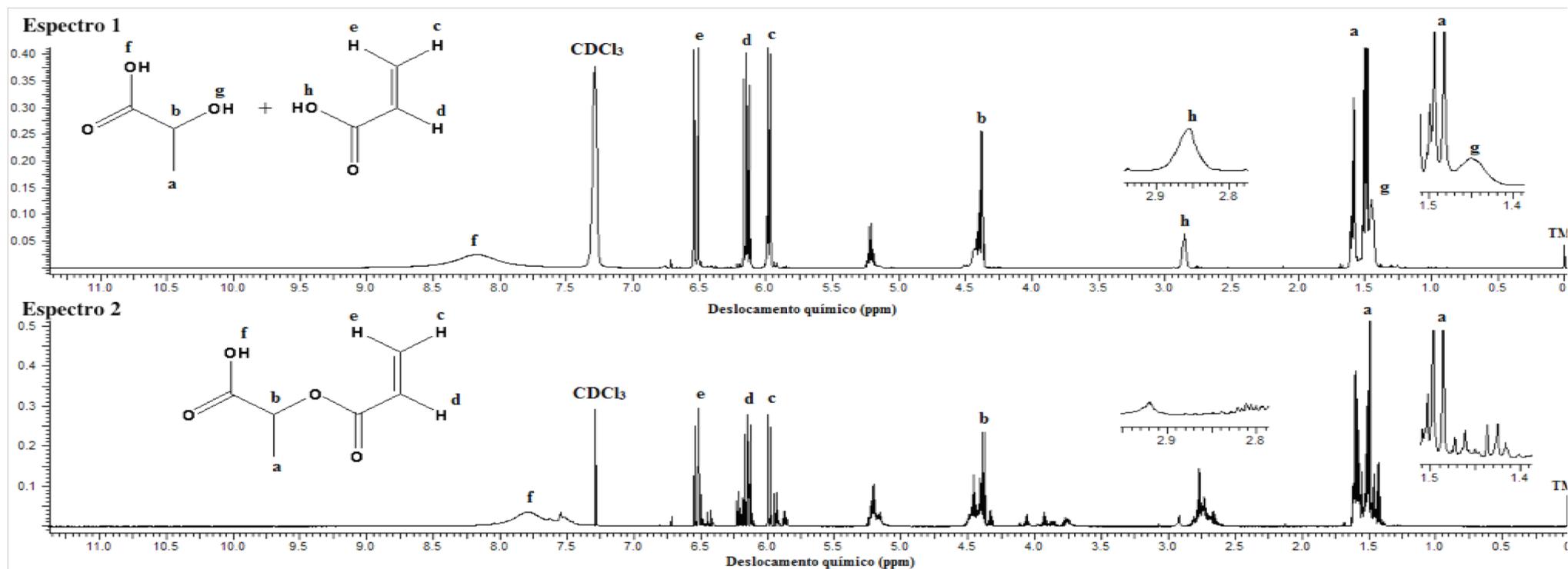


Figura 35 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio da reação de esterificação seletiva entre o ácido láctico e o ácido acrílico. Espectro 1 - Meio reacional inicial. Espectro 2 - Meio reacional final.

Tabela 8. Valores de deslocamentos químicos dos núcleos de ^1H obtidos por RMN de 600 MHz para o Espectro 1 (inicial).

δ (ppm)	Multiplicidade	Atribuição
1,49 e 1,58	Dupleto	a
4,38	Quadrupeto	b
5,98	Duplo dupleto	c
6,14	Duplo dupleto	d
6,53	Duplo dupleto	e
8,18	Simpleto	f
1,45	Simpleto	g
2,86	Simpleto	h

Os valores obtidos na Tabela 8 em conjunto com a Figura 35 mostram que os sinais estão de acordo com o esperado. O dupleto com deslocamento químico de 1,49 e 1,58 ppm integrando para 3 hidrogênios são referentes a metila do ácido láctico. Como foi utilizado na síntese uma mistura racêmica, estão presentes os sinais das metilas dos isômeros r e s com deslocamentos químicos próximos.

As duplas ligações do ácido acrílico são indicadas pelos duplos dupletos. É importante que as duplas se mantenham no produto final, uma vez que a polimerização do monômero ocorrerá por poliadicação via radicais livres.

O simpleto em 1,45 representa a hidroxila do ácido láctico, que é a função álcool e sítio de reação da esterificação. Já o simpleto em 2,86 é a hidroxila do ácido acrílico que fará o ataque para que a esterificação ocorra. Sendo assim, eles devem ser suprimidos no produto final para indicar que houve a esterificação. A Tabela 9 mostra que o sinal em 2,86 foi suprimido, indicando que a reação de esterificação ocorreu.

Tabela 9. Valores de deslocamentos químicos dos núcleos de ^1H obtidos por RMN de 600 MHz para o Espectro 2 (final).

δ (ppm)	Multiplicidade	Atribuição
1,49 e 1,58	Dupleto	a
4,37	Quadrupeto	b
5,98	Duplo dupleto	c
6,14	Duplo dupleto	d
6,52	Duplo dupleto	e
7,79	Simpleto	f

Pode-se observar que os deslocamentos químicos não se alteram de maneira significativa ao final da reação. Isso deve-se ao fato que o ambiente químico do reagente de partida e do produto final serem semelhantes. Houve a supressão dos simpletos referentes às hidroxilas, indicando que houve reação de esterificação.

4.3 Reações de copolimerização em miniemulsão

As reações de polimerização foram realizadas em ampolas de vidro de 20 mL, sob aquecimento em banho maria a 80 °C por 2 horas. Os monômeros foram adicionados em um béquer juntamente com o SLS, HD e água, conforme as quantidades da Tabela 5 e submetidas ao ultrassonicador em banho de gelo.

4.3.1 Descrição macroscópica

As miniemulsões antes e depois da reação de polimerização apresentam coloração branca de acordo com a Figura 36. Após secagem do polímero na estufa, o produto formado é um sólido branco para o polímero com MMA que iria adquirindo coloração castanho conforme aumentava a concentração do ALM, como mostra a Figura 36. Para o polímero de MMA, obteve-se conversão de 96,51%. Os copolímeros tiveram conversões de 96, 92 e 85% respectivamente para os de 5, 10 e 20% de ALM. Houve um pequeno decréscimo na conversão com o aumento da concentração de ALM. A despeito disso, conversões mais elevadas podem ser obtidas em condições de maior concentração de iniciador.

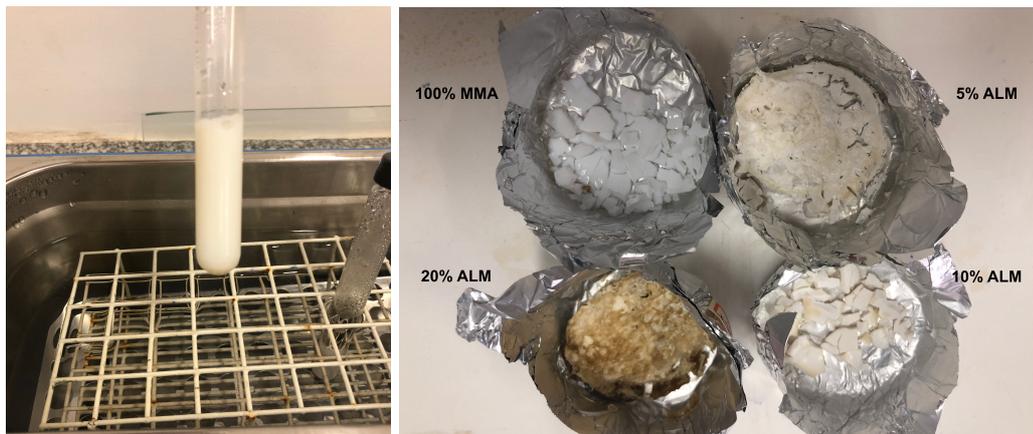


Figura 36 – Aspecto macroscópico das miniemulsões de metacrilato e ácido lático modificado e material sólido formado após a polimerização em miniemulsão para as concentrações de 0, 5 10 e 20% de ácido lático modificado em matriz de metacrilato de metila.

4.3.2 Distribuição do tamanho de partícula

As miniemulsões foram estáveis, com diâmetros médio (DP) variando entre 72 nm e 200 nm e baixos índices de polidispersão (PDI), ou seja, as partículas possuíam uniformidade de diâmetro, como observado na Tabela 10. O tamanho médio das partículas do copolímero cresce com o aumento da concentração de ALM. Como a

concentração do emulsificante foi a mesma para todas as copolimerizações, tal aumento se deve ao fato de o ALM apresentar viscosidade alta, o que dificulta a quebra das gotas durante o processo de sonicação.

Os valores de massas molares médias obtidas por cromatografia de permeação em gel indicam que quanto menor a concentração do monômero de ácido láctico modificado, maior é o valor de massa molar. A dispersão da massa molar, \overline{DM} , é a razão entre a massa molar média em massa de cadeia (M_w) e a massa molar média em número de cadeia (M_n).

Tabela 10. Dados experimentais de tamanho médio de partículas (D_p), índice de polidispersão do tamanho (PDI), massa molar média em massa de cadeia (M_w), massa molar média em número de cadeia (M_n) e a dispersão da massa molar ($\overline{DM} = M_w / M_n$), temperatura de transição vítrea (T_g) e frações mássicas (χ) relativos aos copolímeros (MMA e ALM) obtidos via processo de polimerização em miniemulsão.

Amostra	D_p (nm)	PDI	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	\overline{DM}	T_g (°C)	χ_{MMA}	χ_{ALM}
MMA	72,2	0,060	1104591	451261	2,44	116	100	0
MMA e ALM 5%	78,4	0,169	294771	154174	1,80	105	95,7	4,3
MMA e ALM 10%	101,1	0,142	122526	11218	10,90	102	90,9	9,1
MMA e ALM 20%	201,5	0,221	98147	20593	4,80	86	84,9	15,1

A T_g decresce à medida que se aumenta a concentração de ácido láctico modificado quando relacionada com o MMA puro. A temperatura de transição vítrea varia de 116 °C para o homopolímero de MMA para 86 °C para o copolímero com 20% de ácido láctico modificado. Tal fato pode ser atribuído pela diminuição da massa molar que o copolímero sofre devido ao aumento de ácido láctico incorporado em sua estrutura, assim como BARBANTI⁴⁸ conclui em seu trabalho.

A Figura 37 mostra o efeito da concentração de ALM nas distribuições de massa molar dos copolímeros MMA/ALM indicando que as massas molares médias (M_w e M_n)

são significativamente afetadas pela adição de ALM. Os copolímeros MMA/ALM apresentam redução nos valores de massa molar à medida em que a fração molar de ALM é aumentada nas cadeias do copolímero.

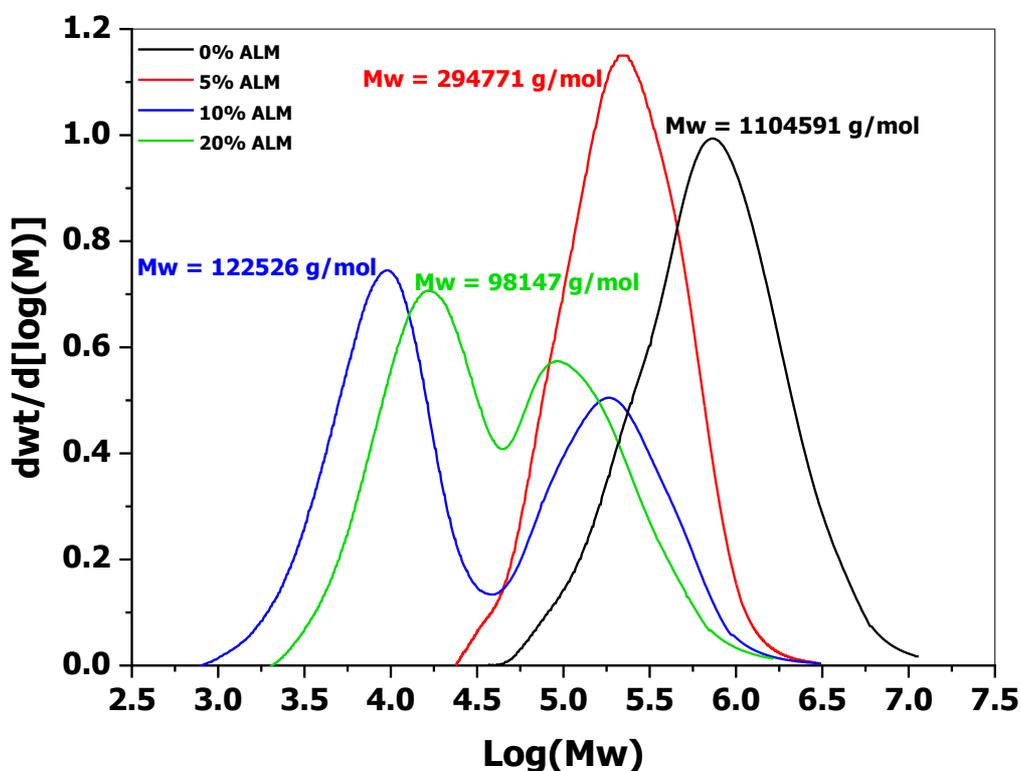


Figura 37 - Distribuições de massa molar (DMM) dos copolímeros MMA/ALM e o efeito do aumento da concentração de ALM no sistema de reação.

A distribuição de massa molar do homopolímero de MMA puro e do copolímero sintetizado com 5% de ALM tem perfil semelhante, sendo que o polímero de MMA apresenta massa molar média significativamente mais alta. Outro aspecto interessante é o caráter bimodal nas distribuições de massa molar de 10 e 20% de ALM. A fração que mais contribui para o peso molecular é a região a direita do gráfico, sendo assim, o M_w do copolímero com 10% de ALM é maior que a com 20%, como o esperado. Tal fato pode ser justificado, pois quanto maior as gotas de monômero, uma taxa mais efetiva de entrada de radicais de iniciador é favorecida, levando a elevadas taxas de terminação entre as cadeias poliméricas em crescimento, o que reduz as massas molares médias.³⁷

4.3.3 Avaliação cinética da reação de polimerização

Com o intuito de avaliar o comportamento da reação, novos experimentos foram realizados para obtenção de perfis de tamanho de partícula, massa molar e temperatura de transição vítrea. Durante a polimerização em miniemulsão do copolímero com 10% de ALM foram retiradas alíquotas para verificar a evolução da reação. Os dados obtidos

encontram-se na Tabela 11. A miniemulsão era estável, com diâmetro médio (D_p) de gotas variando entre 127,7 nm a 71,5 nm com baixos índices de polidispersão (PDI). Com 20 minutos de reação, o diâmetro médio das partículas já diminuiu. Tal fato pode ser justificado pela nucleação homogênea, uma vez que um iniciador hidrossolúvel foi utilizado. No decorrer dos 180 minutos de reação houve pequenas variações do tamanho de partícula, mantendo o diâmetro constante, com pequena alteração no ponto de 180 minutos.

Tabela 11. Dados experimentais para o copolímero com 10% de ALM – reação 1: tamanho médio de partículas (D_p), Índice de polidispersão do tamanho (PDI), massa molar média em massa (M_w), massa molar média em número (M_n) e a dispersão da massa molar ($D_M = M_w / M_n$) relativos aos copolímeros (MMA e ALM) obtidos via processo de polimerização em miniemulsão e temperatura de transição vítrea.

Tempo (min)	D_p (nm)	PDI	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	D_M	T_g (°C)
20	72,5	0,092	230119	92020	2.50	95
40	71,5	0,082	308178	114265	2.70	96
60	72,4	0,090	263795	116929	2.26	100
90	72,2	0,100	280158	115016	2.44	98
120	73,6	0,103	339689	133535	2.54	102
180	79,2	0,122	426196	134488	3.17	-----

A Figura 38 representa os gráficos que relaciona massas molares médias (M_w e M_n) e a dispersão da massa molar (D_M) com o tempo, para a segunda reação de polimerização com 10% de ALM. Percebe-se que os três fatores aumentam com o decorrer da reação, mostrando que quanto maior o tempo de reação, maior foi a massa molar média.

Com a Figura 39, pode-se observar que as distribuições de massa molar (DMM) mantiveram com mesmo formato, porém o caráter bimodal não aparece mais tão pronunciado. Este comportamento precisa ser melhor estudado, entretanto, se faz necessário uma melhor avaliação da reatividade do par monomérico, e também do efeito de nucleação sobre o tamanho das cadeias poliméricas, além do efeito de

temperatura e disponibilidade de radicais de iniciador no *locus* da reação.

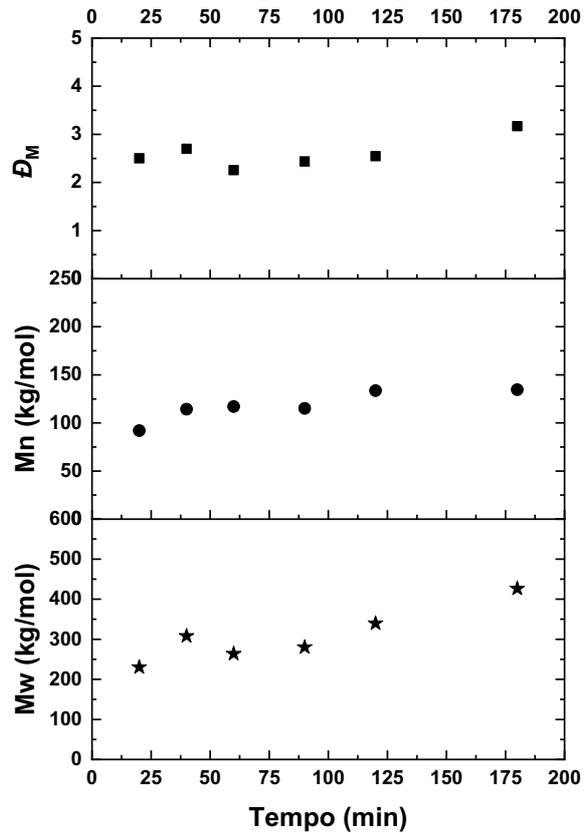


Figura 38 - Dados experimentais para o copolímero com 10% de ALM – reação 1: Massas molares médias (M_w e M_n) e a dispersão da massa molar (\bar{D}_M) relativos ao copolímero 10% MMA e 90% ALM) obtidos via processo de polimerização em miniemulsão.

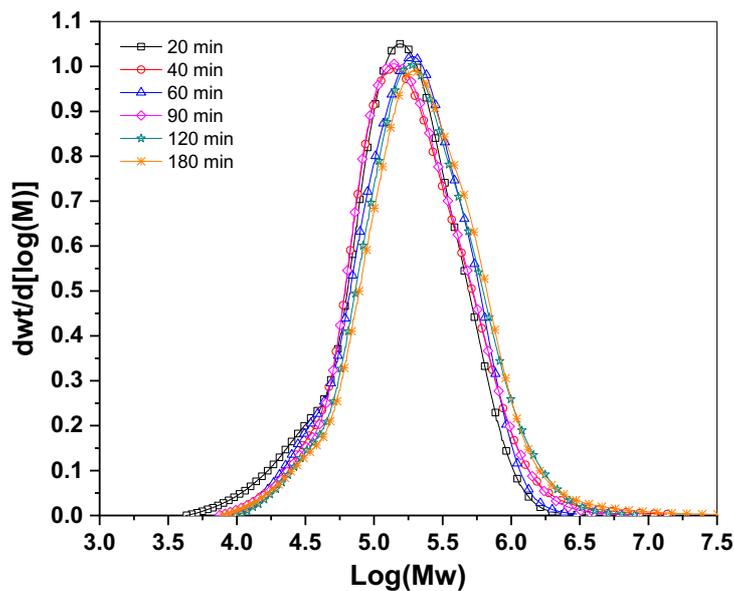


Figura 39 - Distribuições de massa molar (DMM) dos copolímeros 90% MMA/10% ALM e o efeito do tempo no sistema para reação 1.

Por meio da calorimetria de varredura diferencial, foi possível analisar a temperatura de transição vítrea, a T_g . Para o homopolímero de MMA, a T_g foi de 116 °C. Tal valor é o esperado para tal polímero. Conforme indica a Tabela 11, com o passar do tempo de reação, a T_g variou, aumentando de 95 em 20 minutos até 102 °C para 120 minutos de reação.

Uma outra reação foi feita para verificar a reprodutibilidade da polimerização. A distribuição de massa molar também perdeu o caráter bimodal pronunciado notado na primeira polimerização.

A Tabela 12 indica os valores de massas molares médias (M_w e M_n) e a dispersão da massa molar (\mathcal{D}_M) para a terceira polimerização com 10% de ALM. Os valores obtidos são condizentes com os da segunda polimerização, com pequenas alterações, mostrando que houve reprodutibilidade nas reações.

Tabela 12. Dados experimentais para o copolímero com 10% de ALM – reação 2:), massa molar média em massa (M_w), massa molar média em número (M_n) e a dispersão da massa molar ($\mathcal{D}_M = M_w / M_n$) relativos aos copolímeros (MMA e ALM) obtidos via processo de polimerização em miniemulsão.

Tempo (min)	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	\mathcal{D}_M
20	208403	69085	3.02
40	246004	104645	2.35
60	226030	93581	2.42
90	251450	100867	2.49
120	205401	83792	2.45
180	336479	136632	2.46

A Figura 40 representa os gráficos que relaciona massas molares médias (M_w e M_n) e a dispersão da massa molar (\mathcal{D}_M) com o tempo, para a terceira reação de polimerização com 10% de ALM. Percebe-se que as três variáveis aumentam com o decorrer da reação, mostrando que, de maneira geral, quanto maior o tempo de reação, maior foi a massa molar média.

Com a Figura 41, pode-se observar que as distribuições de massa molar (DMM) mantiveram-se com mesmo formato, apresentando caráter bimodal apenas na reação com 20 minutos.

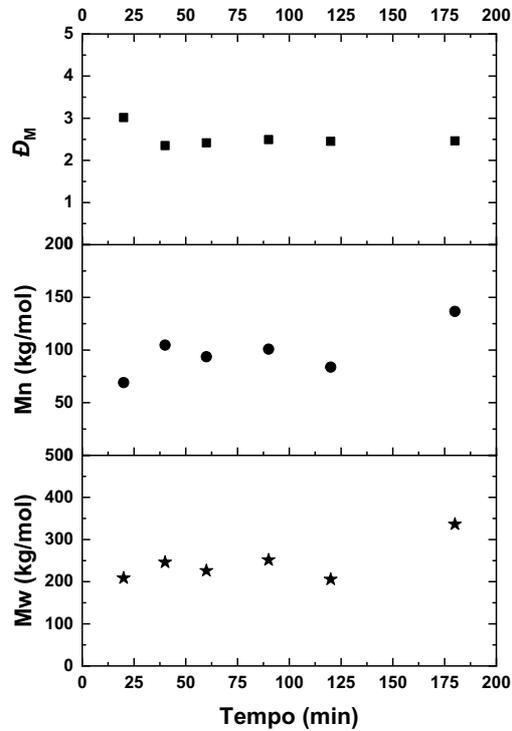


Figura 40 - Dados experimentais para o copolímero com 10% de ALM – reação 2: Massas molares médias (M_w e M_n) e a dispersão da massa molar (\bar{D}_M) relativos ao copolímero 10% ALM e 90% MMA obtidos via processo de polimerização em miniemulsão.

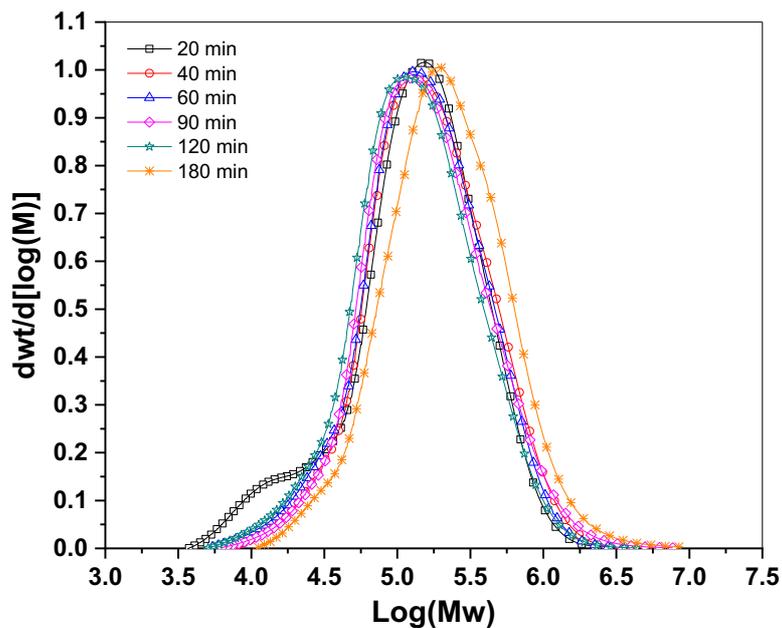


Figura 41 - Distribuições de massa molar (DMM) dos copolímeros 90% MMA/10% ALM e o efeito do tempo no sistema para reação 2.

4.3.4 Composição da cadeia polimérica

Para determinar a composição da cadeia polimérica foi utilizada a técnica de ressonância magnética nuclear. Uma vez que se obteve o polímero seco, ele foi macerado e diluído em clorofórmio deuterado. A Figura 42 indica o copolímero esperado da miniemulsão com ALM e MMA sem levar em conta o arranjo dos monômeros na cadeia polimérica. A estrutura de repetição m é referente ao ácido láctico modificado e a n ao metilmetacrilato.

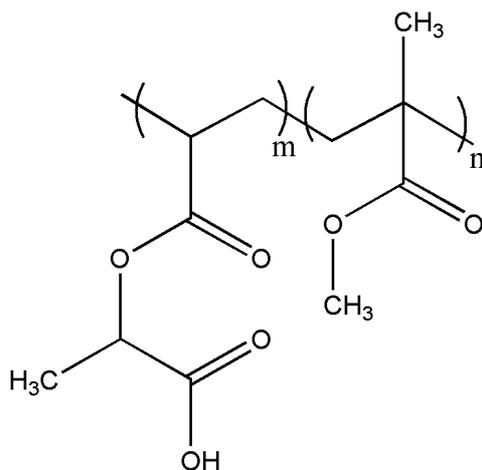


Figura 42 - Estrutura do copolímero, onde m é proveniente do ácido láctico modificado e n do metilmetacrilato.

Para calcular a composição dos copolímeros de MMA e ALM foi utilizada a ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

A Figura 43 indica os espectros de ressonância magnética nuclear para as 4 composições de polímeros formados. O primeiro é referente ao polímero com 100% MMA, que serviu como referência. Mudanças espectrais são observadas a medida que a concentração de ALM muda na fase orgânica.

A partir dos valores de integração é possível inferir a fração molar do ALM incorporado a cadeia polimérica. A partir da equação 10 utilizada por JENSEN ³⁷ podemos fazer analogias para o copolímero de MMA e ALM.

$$X_{MMA} = \frac{3I_{\text{metila}}}{3I_{\text{metila}} + 1I_{\text{CH}}}$$

Onde I_{metila} corresponde ao valor da integração do pico em 3,62 ppm, referente a metila do MMA ligada ao oxigênio e I_{CH} é o valor referente a integração do pico em 4,45 ppm referente ao hidrogênio do C-H ligado ao oxigênio do ALM (setas vermelhas)

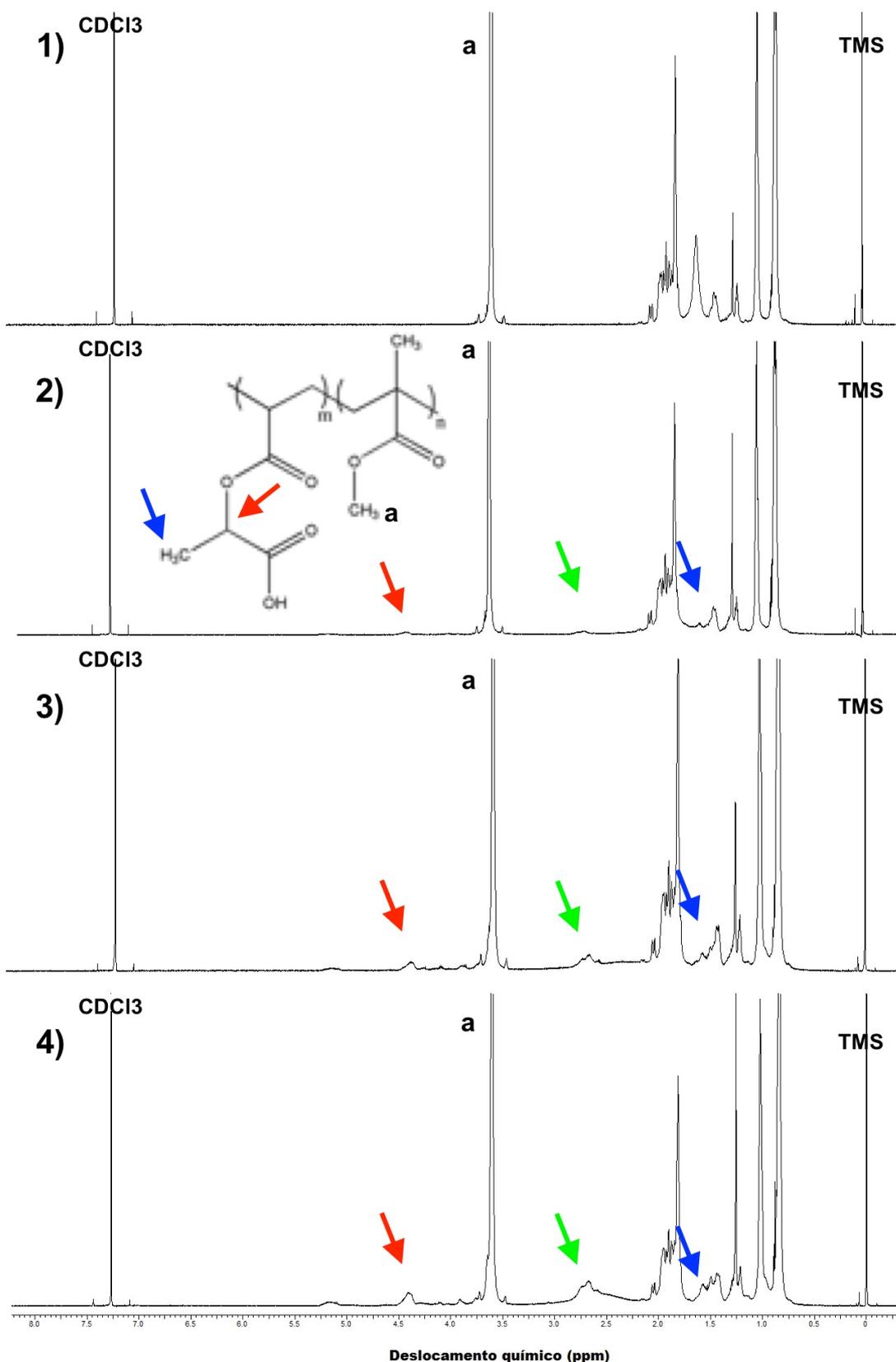


Figura 43 - Espectros de RMN de 600 MHz de Hidrogênio. Espectro 1 -Copolímero 100% MMA; Espectro 2 - Copolímero 5% ALM e 95% MMA; Espectro 3 - Copolímero 10% ALM e 90% MMA. Espectro 4 - Copolímero 20% ALM e 80% MMA.

No deslocamento químico de 1,49 e 1,59 ppm (setas azuis) é possível ver o sinal da metila do ALM nos espectros 2, 3 e 4. Tal sinal é mais pronunciado conforme aumenta-se a concentração do ALM, indicando que houve a incorporação do monômero de interesse na matriz de MMA.

Em 2,54 ppm (setas verdes) há outra evidência da incorporação dos dois monômeros aos polímeros. Tal pico é verificado no espectro monômero ALM puro (Figura 35) e surge com o aumento da sua concentração. Esse é uma outra evidência que o monômero foi incorporado à matriz polimérica de MMA. Em 4,45 ppm (setas vermelhas) é possível ver o hidrogênio do C-H ligado ao oxigênio da função éster do ALM. Ele não aparece no espectro 1, referente ao polímero de MMA puro. Nos demais espectros, ele é formado, conforme aumenta a concentração do ALM. Isso indica que o ALM foi incorporado ao polímero com MMA.

5 – Conclusões e Perspectivas

Com o presente trabalho, pode-se verificar que é possível a produção de produtos de alto valor agregado a partir de processos fermentativos usando o glicerol como substrato. A bactéria *Klebsiella* sp. mostrou-se um microrganismo potencial para a produção do ácido láctico.

O planejamento experimental indicou a tendência para maximizar a produção do ácido láctico, e um maior consumo de glicerol a 37 °C e pH 9,5. O experimento em biorreator de 1 litro, utilizando meio de cultura M9 com 2% de glicerol, pH 9,5 a 37°C com adição de gás nitrogênio produziu aproximadamente 3 g/L de ácido láctico, valor maior do que a média obtida nos experimentos em erlenmeyers.

Nota-se ainda que materiais obtidos a partir da modificação do ácido láctico tem potencial para serem utilizados como monômeros em polimerizações por adição de cadeia visando à formação de novos materiais poliméricos.

O copolímero sintetizado com o ácido láctico modificado e metacrilato de metila em diferentes composições foi possível pela miniemulsão com altos percentuais de conversão. A incorporação e o aumento da concentração de ALM na cadeia polimérica causam mudanças significativas no tamanho da cadeia e nos espectros de ressonância magnética nuclear. O aumento da concentração de ALM acarreta no aumento do diâmetro médio das partículas, bem como uma diminuição da massa molar média, M_w .

A fermentação pode ser feita utilizando a glicerina bruta como fonte de carbono, a fim de verificar se haverá a produção de ácido láctico sem que seja necessária a etapa de purificar do glicerol.

Nova formulações de miniemulsão podem ser feitas, de modo a verificar quais proporções de surfactantes, coestabilizadores e iniciadores devem ser usadas para que as características de interesse sejam alcançadas. Testes de biodegradabilidade podem ser feitos, além de estudos sobre as características da superfície do polímero obtido, por meio de microscopia eletrônica.

7 - Referências

- [1] ESMAEILI, N. et. al. Synthesis and characterization of methacrylated star-shaped poly(lactic acid) employing core molecules with different hydroxyl groups. *Journal of Applied Polymer Science*, 2017.
- [2] HAULY, M. C. de O.; OLIVEIRA, A. R. de; OLIVEIRA, A. S. De. Lactic acid production by *L. curvatus* in sugarcane molasses. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 24, n. 1, p. 133-142, jan./jun, 2003
- [3] JAHNO, V. D; LIGABUE, R; EINLOFT, S; SANTOS, L.A. Synthesis and Characterization of poly(L-lactic acid) using Clean Methods. *Biomaterials*, 2005
- [4] SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: ácido láctico uma alternativa. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v.25, n.1, p.37-40, 1991.
- [5] ALMEIDA, J. R. M. Microrganismos para produção de químicos a partir da glicerina bruta gerada na produção de biodiesel. *Circular técnica 07*, 2011.
- [6] HONG, A. A.; CHENG, K. K.; PENG, F.; ZHOU, S.; SUN, Y.; LIU, C. M.; LIU, D. H. Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Oxford*, v. 84, p. 1576-1581, 2009.
- [7] TANG, X. M.; TAN, Y. S.; ZHU, H.; ZHAO, K.; SHEN, W. Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol by an Engineered Strain of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology, Washington*, v. 75, p. 1628-1634, 2009.
- [8] OLIVEIRA, R. F.; SOUSDALEFF, M.; LIMA, M. V. S.; LIMA, H. O. S Lactic acid production by fermentation from sugarcane molasses with *Lactobacillus casei*. *Brazilian Journal Food Technology, VII BMCFB*, junho 2009
- [9] SAKATA, M. M.; RINCON, M.C.A. do; DUEK, E. A. R. Estudo da interação polímero / cartilagem / osso utilizando Poli (ácido láctico - co - ácido glicólico) e Poli (p- Dioxanona) em condilo femural de coelhos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 14, n. 3, p. 176-180, 2004.
- [10] LOPES, A. R. Produção de ácido láctico por lactobacilos em diferentes meios de

cultivo. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, 2008

[11] AURAS, R. A. et al. Mechanical, physical, and barrier properties of poly (lactide) films. *Journal of Plastic Film & Sheeting*. V.19, p.123-135, 2003

[12] HOFVENDAHL, K.; HÄGERDAL-HAHN, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 87-107, 2000.

[13] CRUZ, M. M. Engenharia evolutiva aplicada à adaptação da bactéria *Klebsiella pneumoniae* ao aumento da concentração de glicerol em meios de cultivo. Trabalho de Conclusão de Curso, o Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

[14] BASSO, T. O. Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Biotecnologia, University of São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-14092011-153623/>>. Acesso em: 2014-09-25.

[15] SCHMIDELL, W et al. *Biotecnologia Industrial*. Vol.2; 1. Ed., 541 p. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

[16] LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*, v. 3, cap. 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

[17] NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P.K.; SRIVASTAVA, A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 7, n.2, p. 167-179, 2004.

[18] NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P.K. and SRIVASTAVA, A. Isolation of adh mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L(+) Lactic acid. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2004, vol. 7, n. 1.

[19] BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial*. Volume 2. Editora Edgard Blucher LTDA, 2001.

- [20] O'CONNOR, D. Report T39-T3. Biodiesel GHG emissions, pas, present, and future . A report to IEA Bioenergy Task 39, 2011.
- [21] LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. DA. Biodiesel: quality parameters and analytical methods. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1596–1608, 2009.
- [22] YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, London, v. 18, p. 213-219, 2007.
- [23] HOFVENDAHL, K.; HÄGERDAL-HAHN, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 87-107, 2000.
- [24] BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E.; COWAN, S.T., HOLT, J.G.; LISTON, J.; MURRAY, R.G.E.; NIVEN, C. F.; RAVIN, A.W.; STAINER R.Y. *Bergey's Manual of Determinative bacteriology*. Eight Edition. Baltimore: The Willians & Wilkins Company, 1974.
- [25] KLEIN, G.; PACK, A.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bactéria. *Internatinal Journal of Food Microbiology*, v. 4, n. 2, p. 103-125, 1998.
- [26] ROMIO, T. Produção de 2,3-butanodiol a partir de glicerol por *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Dissertação de mestrado Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, 2014.
- [27] PARK, J.M.; SONG, H., LEE, H.J.; SEUNG, D. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of *Klebsiella oxytoca* for 2,3-butanediol production. *Microbial Cell Factories* 12(20): 1-20, 2013.
- [28] WONG, C.L.; YWN, H.W.; LIN, C.L.; CHAN, J. S. Effect of pH and fermentation strategies on 2,3-butenediol production with an isolate *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. *Bioresource Technology* 152: 169- 176, 2014.
- [29] CHENG, K.K.; WU, J.; WANG, G.Y.; LI, W.Y.; FENG, J.; ZHANG, J.A. Effects of pH e dissolved CO₂ level on simultaneous production of 2,3-butanediol and succinic acid using *Klebsiella pneumoniae*. *Bioresource Technology* 135: 500-503, 2013.
- [30] JI, X.J.; HUANG, H.; DU, J.; ZHU, J. G.; REN, L.J.; LI, S.; NIE, Z.K. Development of an industrial medium for economical 2,3-butanediol production through co-fermentation

- of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*. *Bioresour. Technol.* 100: 5214-5218, 2009.
- [31] JOGLEKAR, H.G.; RAHMAN, I.; BABU, S.; KULKARNI B.D.; JOSHI, A. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. *Separation and Purification Technology*. v.52, p.1–17, 2006.
- [32] PAL, P.; SIKDER, J.; ROY, S.; GIORNO, L. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes. *Chemical Engineering and Processing*, v. 49, p. 1549- 1559, 2009.
- [33] IUPAC. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/html/M/M03667.html> Acesso em 15/03/2018.
- [34] MACHADO, F. S., LIMA, E. L., PINTO, J. C. Revisão sobre os processos de polimerização em suspensão Polímeros, 2007.
- [35] GILBERT, R. G. *Emulsion Polymerization – A Mechanistic Approach*. Academic Press Limited San Diego, 1995.
- [36] FERNANDES, L. S. Desenvolvimento de um sistema de polimerização por atomização para a formação de partículas em escala micro e sub-micro. Tese em Engenharia Química – UFRN, 2016.
- [37] JENSEN, A. T. Síntese de látices poliméricos a base de oleato de metila modificado e estireno via polimerização em meios dispersos. Dissertação de mestrado em Química – UnB, 2013.
- [38] OLIVEIRA, M. P.; Síntese de novos estabilizantes poliméricos do tipo poli(álcool vinílico-co-neo decanoato de vinila) para utilização na copolimerização em miniemulsão do acetato de vinila (VAc) com o neo-nonanoato de vinila (VEOVA-9). Lorena: Universidade de São Paulo, 2010
- [39] ODIAN, G. , *Principles of Polymerization*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, 2004.
- [40] SCHORK, F. J., LUO, Y., SMULDERS, W. RUSSUM, J., BUTTÉ, A., FONTENOT, K. Miniemulsion Polymerization, in *Polymer Particles*, M. Okubo, Editor. Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- [41] ZHANG Y.; Huang, Z.; Du, C.; Li, Y.; Cao, Z. Introduction of an NADH regeneration

system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metab. Eng.* 11: 101-106, 2009

[42] MAZUMDAR S, CLOMBURG JM, GONZALEZ R. *Escherichia coli* strains engineered for homofermentative production of D-lactic acid from glycerol. *Applied Environ Microbiology*, 2010

[43] Mazumdar S, Blankschien MD, Clomburg JM, Gonzalez R. Efficient synthesis of L-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2013

[44] HONG, W. K.; KIM, C. H.; HEO, S. Y.; LUO, L. H.; OH, B. R.; RAIRAKHWADA, D.; SEO, J. W. 1,3-Propanediol production by engineered *Hansenula polymorpha* expressing *dha* genes from *Klebsiella pneumoniae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Garching, v. 34, p. 231-236, 2011.

[45] TACONI, K. A.; VENKATARAMANAN, K. P.; JOHNSON, D. T. Growth and Solvent Production by *Clostridium pasteurianum* ATCC (R) 6013 (TM) Utilizing Biodiesel-Derived Crude Glycerol as the Sole Carbon Source. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, Malden, v. 28, p. 100-110, 2009.

[46] RYMOWICZ, W.; FATYKHOVA, A. R.; KAMZOLOVA, S. V.; RYWINSKA, A.; MORGUNOV, I. G. Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 87, p. 971- 979, 2010.

[47] BLANKSCHIEN, M. D.; CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of succinate from glycerol. *Metabolic Engineering*, Cambridge, v. 12, p. 409-419, 2010.

[48] BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Accelerated degradation of poly(ϵ -caprolactone) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds in alkaline medium. *Polímeros: Ciencia e Tecnologia*, v.16, n2, p.141-148, 2006.