

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA QUIMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II**

**LUIZ PAULO FERREIRA ALCÂNTARA DE OLIVEIRA
TATIANE CHITOLINA MANSANO**

**PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA BIOFERMENTAÇÃO DO
GLICEROL VIA BACTÉRIAS *ESCHERICHIA COLI* E
*ARTHROBACTER SP.***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

PONTA GROSSA

2015

LUIZ PAULO FERREIRA ALCÂNTARA DE OLIVEIRA
TATIANE CHITOLINA MANSANO

**PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA BIOFERMENTAÇÃO DO
GLICEROL VIA BACTÉRIAS *ESCHERICHIA COLI* E
*ARTHROBACTER SP.***

Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química, do
Departamento de Engenharia
Química, da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana de
Arruda Moura Pietrowski
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Priscilla
dos Santos Gaschi Leite

PONTA GROSSA

2015



TERMO DE APROVAÇÃO

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA BIOFERMENTAÇÃO DO GLICEROL VIA BACTÉRIAS
ESCHERICHIA COLI E *ARTHROBACTER SP.*

por

Luiz Paulo Ferreira Alcântara de Oliveira

Tatiane Chitolina Mansano

Monografia apresentada no dia 24 de junho de 2015 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho _____Aprovado_____ (aprovado, aprovado com restrições ou reprovado).

Prof. Dra. Erica Roberta Lovo da Rocha Watanabe
(UTFPR)

Prof. Dra. Denise Milleo Almeida
(UTFPR)

Profa. Dra. Giovana de Arruda Moura Pietrowski
(UTFPR)
Orientador

Profa. Dra. Juliana Martins Teixeira de Abreu Pietrobelli
Responsável pelo TCC do Curso de Engenharia Química

OBS: o mesmo devidamente assinado se encontra no departamento de engenharia química da UTFPR – Câmpus Ponta Grossa.

RESUMO

OLIVEIRA, Luiz Paulo Ferreira Alcântara de; MANSANO, Tatiane Chitolina. **Produção de etanol a partir da biofermentação do glicerol via bactérias *Escherichia coli* e *Arthrobacter sp.*** 2016. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2016.

As principais fontes de geração de energia no mundo atualmente são representadas pelo petróleo, gás natural e carvão mineral, as quais são consideradas como não renováveis e não podem ser regeneradas. A instabilidade política dos países detentores de grande quantidade destes combustíveis, bem como os altos preços e a alta poluição associada na maioria dos casos, faz com que estes se tornem inviáveis no sentido econômico e de sustentabilidade. Neste sentido, o presente trabalho caracterizou-se como um estudo inicial a uma alternativa para utilização do glicerol, por meio de uma fermentação bacteriológica com finalidade de produzir um metabólito de maior valor agregado, etanol. Com a presente pesquisa se concluiu que o glicerol, subproduto da indústria de biodiesel, pode ser transformado em um produto de maior valor agregado a partir da biofermentação bacteriológica. Os resultados apresentados podem garantir o ponto de partida para novos estudos neste segmento, observando que as análises estatísticas evidenciaram que ampliando as faixas de variação dos fatores independentes, como pH e concentração de glicerol, pode se obter resultados mais significativos em relação a produção de etanol. Além disso, nota-se que podem ser avaliadas outras variáveis controláveis que interfiram diretamente no ciclo das bactérias, como valores diferentes de temperatura do meio de cultivo e aeração.

Palavras-chave: Etanol. Biofermentação. Glicerol. *Escherichia coli*. *Arthrobacter sp.*

ABSTRACT

OLIVEIRA, Luiz Paulo Ferreira Alcântara de; MANSANO, Tatiane Chitolina.
**Ethanol production from biofermentation of glycerol via bacteria
Escherichia coli and Arthrobacter sp.** 2016. 53 p. Work of Conclusion
Course (Chemical Engineering) - Federal University of Technology - Paraná,
Ponta Grossa, 2016.

Energy sources are not currently represented by oil, natural gas and coal as they are considered to be non-renewable and can not be regenerated. It is one of the reasons why countries become richer and more meaningful for countries with large resources, as well as for high prices and the high incidence of prosecutions. In this sense, the present work was characterized as an initial study of an alternative for the use of glycerol, through a bacteriological fermentation with the purpose of producing a higher value-added metabolite, ethanol. With this research, glycerol, a by-product of the biodiesel industry, can be transformed into a higher value-added product from bacteriological biofermentation. The presented results can guarantee the starting point for the new students in this topic, noting the statistical statistics that can be compared with the variables of selection of independent factors, like the pH and the concentration of glycerol. . In addition, it can be evaluated other controllable variables that interfere directly in the cycle of bacteria, such as the different temperature levels of the culture medium and aeration.

Keywords: Ethanol. Biofermentation. Glycerol. Escherichia coli. Arthrobacter sp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mercado do Glicerol, volumes e usos	14
Figura 2- Curva de crescimento de <i>E. coli</i> durante o processo fermentativo..	31
Figura 3 -Curva de crescimento de <i>E. coli</i> em 24 horas entre os tratamentos.	32
Figura 4 - Superfície de resposta da concentração de biomassa da <i>E. coli</i> , entre as médias dos tempos de fermentação, em relação as variáveis pH e forma de cultivo.	33
Figura 5 -: Superfície de resposta da concentração de biomassa da <i>E. coli</i> , entre as médias dos tempos de fermentação, em relação as variáveis concentração de glicerol e forma de cultivo....	33
Figura 6 - Superfície de resposta da concentração de biomassa da <i>E. coli</i> , entre a média dos tempos de fermentação, em relação as variáveis concentração de glicerol e pH..	34
Figura 7 - Superfície de resposta da concentração de biomassa da <i>E. coli</i> no processo fermentativo, entre a média dos ensaios em relação as variáveis pH e forma de cultivo.....	35
Figura 8 - Curva de crescimento da <i>Arthrobacter sp.</i> durante o processo fermentativo..	36
Figura 9 - Curva de crescimento de <i>Arthrobacter sp.</i> em 24 horas, entre os tratamentos.	37
Figura 10 - Superfície de resposta da concentração de biomassa da <i>Arthrobacter sp.</i> , entre a média dos tempos de fermentação em relação as variáveis pH e forma de cultivo..	38
Figura 11 – Superfície de resposta da concentração de biomassa da <i>Arthrobacter sp.</i> , entre a média dos tempos de fermentação em relação as variáveis concentração de glicerol e forma de cultivo..	38
Figura 12- Superfície de resposta da concentração de biomassa da <i>Arthrobacter sp.</i> , entre a média dos tempos de fermentação em relação as variáveis concentração de glicerol e pH.	39

Figura 13 - Superfície de resposta da concentração de biomassa da <i>Arthrobacter sp.</i> no processo fermentativo, entre a média dos ensaios em relação as variáveis pH e forma de cultivo..	40
.....	
Figura 14 -Quantidade de etanol produzido pela <i>E. coli</i>	41
.....	
Figura 15 - Concentração de etanol produzido por <i>E. coli</i> em relação as variáveis pH e forma de cultivo	42
.....	
Figura 16 - Concentração de etanol produzido por <i>E. coli</i> em relação as variáveis glicerol e forma de cultivo..	42
.....	
Figura 17 - Concentração de etanol produzido por <i>E. coli</i> em relação as variáveis glicerol e pH.	43
.....	
Figura 18 - Concentração de etanol produzido pela <i>Arthrobacter sp.</i>	44
.....	
Figura 19 - Concentração de etanol produzido por <i>Arthrobacter sp</i> em relação as variáveis pH e forma de cultivo...	45
.....	
Figura 20 - Concentração de etanol produzido por <i>Arthrobacter sp.</i> em relação as variáveis glicerol e forma de cultivo...	45
.....	
Figura 21 - Concentração de etanol produzido por <i>Arthrobacter sp.</i> em relação as variáveis glicerol e pH	46
.....	
Figura 22 - Analise do valor da variável em relação a media dos experimentos	49
.....	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades do glicerol.....	14
Tabela2 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2 ³ com três pontos centrais para <i>Escherichia coli</i> e <i>Arthrobacter sp.</i>	24
Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial para <i>Escherichia coli</i> e <i>Arthrobacter sp.</i>	24
Tabela 4 -Componente do meio de cultivo.....	27
Tabela 5 - Consumo de glicerol bruto para a bactéria <i>E. coli.</i>	38
Tabela 6 - Consumo de glicerol bruto para a bactéria <i>Arthrobacter sp.</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS

E. coli	<i>Escherichia coli</i>
Kg	Quilograma
kcal	Quilocaloria
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
g L ⁻¹	Gramas por litro
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de diamônia
K ₂ HPO ₄	Fosfato de dipotássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Monopotássio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
H ₂ O	Água
MnCl ₂	Cloreto de Manganês
H ₃ BO ₃	Ácido Bórico
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
CoCl ₂	Cloreto de Cobalto
NiCl ₂	Cloreto de Níquel
Na ₂ MoO ₄	Molibidato de Sódio
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco
HCl	Ácido Clorídrico

LISTA DE SIGLAS

DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
pH	Potencial Hidrogeniônico
EMB	Ágar eosina e azul de metileno
rpm	Rotação por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 PROBLEMA	12
1.2 OBJETIVO GERAL	12
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
1.4 JUSTIFICATIVAS	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 PRODUÇÃO DE ENERGIA NO ÂMBITO MUNDIAL	13
2.2 GLICEROL	14
2.3 PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO	18
2.3.1 MICRO-ORGANISMOS.....	18
2.3.1.1 <i>Escherichia Coli</i>	18
2.3.1.2 <i>Arthrobacter sp.</i>	20
2.3.2 TEMPERATURA	20
2.3.3 INÓCULO	21
2.3.4 PH	21
2.3.5 FORMA DE CULTIVO	21
2.4 ETANOL	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 DELINEAMENTO	22
3.2 LOCAL DA PESQUISA	24
3.3 ORIGEM DOS MICRO-ORGANISMO E DO GLICEROL	24
3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	25
3.5 ENSAIO DE FERMENTAÇÃO	26
3.5.1 PREPARO DO INÓCULO	26
3.5.2 PREPARO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO	27
3.5.2.1 Preparo de solução traço	27
3.5.2.2 Preparo dos meios de fermentação	28
3.5.2.3 Realização das fermentações	28
3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	29
3.6.1. Densidade ótica.....	29
3.6.2 Cromatografia Gasosa	29
3.6.2.1 Preparo das amostras para coleta do headspace	29
3.6.2.2 Análise cromatográfica de compostos voláteis.....	30
3.6.2.3 Determinação do glicerol por diferença de massa	30
3.6.2.4 Análise estatística	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
4.1 ANÁLISE CRESCIMENTO MICROBIASNO POR DENSIDADE ÓTICA PARA <i>E. COLI</i>	31

4.2 ANÁLISE CRESCIMENTO MICROBIASNO POR DENSIDADE ÓTICA PARA <i>ARTHROBACTER SP</i>	36
4.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR CROMATOGRAFIA PARA <i>E. COLI</i>	40
4.4 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR CROMATOGRAFIA PARA <i>ARTHROBACTER SP</i>	42
4.5 ANÁLISE DO CONSUMO DE GLICEROL BRUTO POR DIFERENÇA DE MASSA PARA <i>E. COLI</i>	45
4.6 ANÁLISE DO CONSUMO DE GLICEROL BRUTO POR DIFERENÇA DE MASSA PARA <i>ARTHROBACTER SP</i>	46
5 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

As principais fontes de geração de energia no mundo atualmente são representadas pelo petróleo, gás natural e carvão mineral, as quais são consideradas como não renováveis e não podem ser regeneradas. Além disso, estas são consumidas em uma escala que a natureza não pode acompanhar e recompor.

A instabilidade política dos países detentores de grande quantidade destes combustíveis, bem como os altos preços e a alta poluição associada na maioria dos casos, faz com que estes se tornem inviáveis no sentido econômico e de sustentabilidade.

Face a isto, a incorporação de combustíveis alternativos no mercado como solução desta problemática tem se popularizado e sido incentivado gradualmente, consolidando espaço cada vez mais amplo no setor energético mundial, como o biodiesel que obtem-se por meio da transesterificação de óleos vegetais (BARROS, 2006)

Rodríguez (2010, p. 21) ao discorrer sobre o aumento na produção mundial de biodiesel aponta que:

A produção mundial de biodiesel aumentou drasticamente nos últimos anos, por exemplo: a produção norte-americana pulou de 7,6 milhões de litros em 2000 para 946 milhões de litros em 2006. Quando todas as plantas industriais, em construção naquele país, estiverem funcionando, a capacidade nominal total atingirá a marca de 12,4 bilhões de litros de biodiesel por ano. A mesma tendência é observada na Comunidade Européia que, de acordo com dados da European Biodiesel Board – EBB (2008), atingiu 5,7 milhões de toneladas em 2007.

Contudo, paralelo ao aumento da demanda mundial de biodiesel vem crescendo a preocupação com o acúmulo do volume de glicerol, subproduto do processo produtivo, que possui alto teor de impurezas o que acarreta consequentemente a queda do seu valor comercial. Devido á alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) presente na glicerina o seu descarte em aterros sanitários ou a sua pirólise (queima) para geração de energia direta é impossibilitada. Logo, atualmente se faz necessário o estudo de novas rotas de aplicação (ANTUNES, 2011).

A bioconversão microbiana do glicerol (subproduto da reação de transesterificação) via processos fermentativos se mostra como alternativa capaz para utilização, na produção de etanol, tendo em vista a simplicidade operacional requerida e dos insumos envolvidos, gerando produtos de maior valor agregado em menor tempo de produção. Neste âmbito, Antunes et al. (2011, p.1) destaca que “sabe-se que diversos micro-organismos são capazes de metabolizar o glicerol, e existem vários estudos sendo desenvolvidos, principalmente com bactérias e leveduras”.

Neste sentido, o presente trabalho caracterizou-se como um estudo inicial a uma alternativa para utilização do glicerol, por meio de uma fermentação bacteriológica com finalidade de produzir um metabólito de maior valor agregado, etanol.

1.1 PROBLEMA

É possível produzir etanol a partir da fermentação do glicerol, via espécies bacterianas *Escherichia coli* e *Arthrobacter sp.*?

1.2 OBJETIVO GERAL

Produzir etanol a partir da biofermentação do glicerol via bactérias *Escherichia coli* e *Arthrobacter sp.*

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a formação de etanol oriundo do processo de bioconversão do glicerol.
- Quantificar a produção de etanol.
- Avaliar entre as espécies bacterianas estudadas, *Escherichia coli* e *Arthrobacter sp.*, qual apresenta maior potencial fermentativo para produção de etanol.
- Avaliar a influência do potencial hidrogeniônico e concentração de glicerol na produção de etanol.

- Qualificar a eficiência do processo nas condições estudadas.

1.4 JUSTIFICATIVA

Visto que o glicerol é um resíduo gerado em larga escala no processo de produção do biodiesel, surge a necessidade de uma correta destinação deste produto.

Neste contexto, o presente trabalho identifica uma alternativa para o problema por meio da biotransformação deste resíduo, com o intuito de gerar como produto final o etanol.

Neste contexto, observou o alto potencial da bactéria *E. coli* para produzir o etanol através de trabalhos já realizados por outros autores, com base nisso, viu-se a necessidade de otimizar o processo observando as variáveis, pH, forma de cultivo e glicerol. Além disso caracterizou um estudo inicial com a bactéria *Arthrobacter sp.* desconhecida bibliograficamente até então.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A geração de energia no mundo é baseada na utilização de combustíveis não renováveis. Para garantir a recuperação natural dos combustíveis, cresce eminentemente a produção de biocombustíveis como biodiesel. Contudo durante a produção de biodiesel se tem a formação de produto excedente, glicerol, o qual o mercado atual não consegue absorver total montante. A transformação do glicerol em etanol por meio da biofermentação consolida uma alternativa para utilização do glicerol.

2.1 PRODUÇÃO DE ENERGIA NO ÂMBITO MUNDIAL

A matriz energética mundial é consolidada a partir da queima de combustíveis fósseis não renováveis. De acordo Pizzol e Ferraz (2009, p. 773) os estudos mais generosos estimam que a exploração de petróleo no mundo cessará em aproximadamente 100 anos. Com isso é de fundamental

importância a busca por fontes alternativas de energia, que possam ser renovadas de acordo com a demanda mercadológica, que certifiquem o desenvolvimento sustentável do planeta representando um menor potencial poluidor ao meio ambiente, além de favorecer o consumidor frente aos preços flutuantes dos combustíveis atualmente empregados.

Neste contexto, a produção de biodiesel alavancou-se exponencialmente no país nos últimos anos, considerando os fatores referidos, os elementos geográficos e climáticos favoráveis à produção e os incentivos governamentais de apoio. Contudo, concomitantemente à propagação da produção desse biocombustível existe também uma progressiva preocupação com o problema da incorporação do grande montante de glicerol residual, caracterizado como subproduto da reação de transesterificação a partir de óleos vegetais ou gorduras animais para produção de biodiesel, pelo mercado mundial. Em linhas gerais, para cada tonelada de biodiesel produzida são gerados 10% desse volume total de glicerina, ou seja, 100 kg de coproduto impuro e de baixa relevância econômica (SÁ, 2011).

Barbosa (2009, p. 13) ao discorrer sobre a produção de resíduo glicerol no processo produtivo do biodiesel destaca que:

No Brasil, o volume de glicerol produzido no ano de 2008 alcançou mais de 100 milhões de litros como consequência da produção de 1,2 bilhões de litros de biodiesel, necessário para cumprir a legislação que estabelece a obrigatoriedade de adição de 2% do biocombustível ao diesel comum.

A biotransformação do glicerol por via fermentativa a fim de gerar metabólitos de maior valor agregado, tem firmado uma promissora alternativa para a utilização do volume excedente desse resíduo, tendo em vista que os organismos envolvidos no processo se beneficiam do carbono presente no glicerol como fonte de substrato para o seu metabolismo.

2.2 GLICEROL

Na antiguidade o glicerol ainda era produzido como produto, e sendo totalmente utilizado na indústria farmacêutica, de saponificação, alimentícia, entre outras, isso devido à geração e utilização de pouco biodiesel,

fazendocom que o glicerol fosse produzido em pequenas quantidades como subproduto.

Por volta dos anos 40, o glicerol era produzido a partir de combustíveis fósseis, como o propileno, e pela síntese de propeno, em que é formado o cloreto de alila pela cloração do propeno, este cloreto é posteriormente adicionado ao ácido, e em seguida tratado com excesso de base.No entanto, estas fábricas vêm fechando gradativamente, isso por que, hoje, a glicerina existe em grande escala como coproduto, não se fazendo mais necessário sua fabricação direta (MOTA, 2009).

Porém no meio disso ainda surgem alguns problemas, como impurezas presentes nesse subproduto advindo da produção de biodiesel, como catalisadores, álcool, ácidos graxos, sais e água estão presentes em números significativos, chegando a 20% em volume, e isso acaba acarretando em uma queda considerável no preço de venda do glicerol. Estas quantidades variam conforme o tipo de oleaginosa e catalisadores empregados (BEATRIZ, ARAUJO e LIMA, 2010).

Com todas essas impurezas, para aumentar o valor de mercado deste produto, a glicerina passa por processos de purificação, entre eles a destilação a pressão reduzida. Outro método ainda mais eficiente e mais caro, que traz um percentual de 99,5% de pureza é através de resinas de troca iônica (BEATRIZ, ARAUJO e LIMA 2010).

Contudo o glicerol vem sendo utilizado na indústria continuamente, como se observa na Figura 1, inúmeros mercados empregam a glicerina como insumo, porém seu uso não supre sua produção.

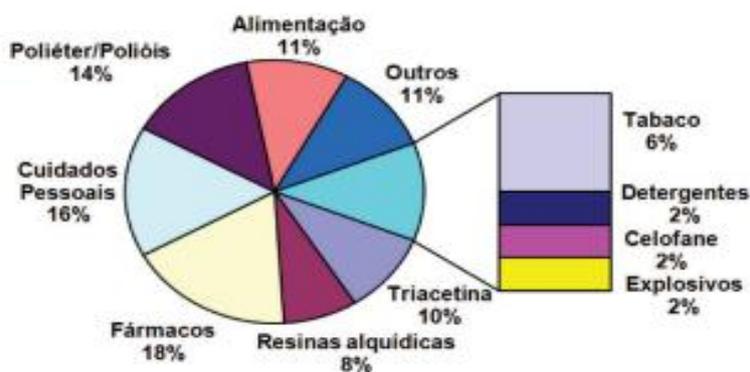


Figura 1: Mercado do Glicerol, volumes e usos.

Fonte: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v34n2/25.pdf>.

Quanto à estrutura química do glicerol, também conhecido por 1,2,3-propanotriol, é caracterizada como um tri-álcool com três carbonos e quanto suas propriedades físicas sabe-se que é um líquido incolor viscoso, que possui paladar adocicado, sem cheiro, derivado de fontes naturais ou petroquímica. A Tabela 1 apresenta algumas propriedades da glicerina.

Tabela 1: Propriedades do glicerol.

PROPRIEDADE	
Formula Química	C ₃ H ₈ O ₃
Massa molecular	92,093 g mol ⁻¹
Densidade	1,261 g cm ⁻³
Viscosidade	1,5 Pa s
Ponto de fusão	18,2 °C
Ponto de ebulição	290 °C
Ponto de fulgor	160 °C
Tensão superficial	64 mN m ⁻¹
Calorias	4,32 kcal g ⁻¹
Coeficiente de temperatura	0,0598 mN (mK) ⁻¹

Fonte: Própria.

O glicerol forma ligações tanto inter como intramoleculares com o hidrogênio, e por possuir três hidroxilas apresenta alta solubilidade em água (MOTA, 2009).

O termo glicerol é usado quando se refere ao componente puro, 1,2,3-propanotriol. Ao se tratar da glicerina podemos entender por glicerina tratada, e purificada industrialmente, mas elas não se restringem apenas a estes dois tipos. Outra classe são as glicerinas loiras, que se enquadram nos subprodutos do biodiesel, onde passam por um tratamento de neutralização e são obtidas com até 80% em volume de glicerol, e os outros 20% em volume contendo

água, sais e alcoóis. As usadas restritamente em explosivos e resinas são conhecidas como glicerina purificada(MOTA, 2009).

Com todos esses dados nota-se o amplo mercado que a glicerina abrange, como alimentício, cosmético e farmacêutico, considerando suas propriedades físicas e químicas bem como o seu alto teor energético, cerca de 4100 kcal / kg (MIN, 2010).

Não há definido na Política Nacional de biodiesel uma saída para diminuir o volume excedente de glicerol. Além disso, os mercados tradicionais do glicerol (indústria de cosméticos, de resinas, farmacêutica, têxtil, alimentícia) possuem uma quantidade limitada de absorção. Perante esta realidade, pesquisadores buscam caminhos alternativos para a utilização deste glicerol. Desta forma, uma aplicação atualmente promissora deste álcool seria utilizá-lo como combustível (GONÇALVES, 2009).

Segundo Mendes e Serra (2012) uma das técnicas utilizadas para tratamento e aproveitamento da glicerina é a queima do coproduto para o aproveitamento de seu poder calorífico.

O grau de pureza para atender o mercado só é alcançado por processos complexos e caros, sendo necessária uma análise econômica do processo para determinar se tal purificação é viável. Pode-se observar que para obter um grau de pureza elevado utilizando a glicerina loira, é necessária uma destilação a alto vácuo em uma temperatura controlada entre 190°C e 200°C. Em seguida uma condensação em tanque *flash*, também a alto vácuo para ocorrer a desodorização, por fim uma clarificação com carvão ativado e em condições adversas a glicerina pode polimerizar e até mesmo se decompor.

Outro método aplicado para purificação da glicerina se dá por troca iônica. Inicialmente a matéria prima passa por vários leitos, eliminando os ácidos graxos, a cor, o odor e as outras impurezas, e posteriormente atravessa evaporadores múltiplos, para garantir a maior pureza do produto. No Brasil é empregada uma técnica similar a troca iônica, onde o glicerol é submetido a uma neutralização, substituindo os leitos, e em seguida passa pelos evaporadores contínuos (MIN, 2010).

2.3 PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO

Uma rota alternativa para a utilização do glicerol são os métodos conversivos que transformam o glicerol em produtos funcionais, a partir de transformações microbiológicas.

No processo fermentativo de conversão da glicerina em etanol via bactérias, o carbono presente no glicerol substitui os tradicionais carboidratos utilizados nos substratos reacionais (sacarose ou glicose) como fonte energética para manter o metabolismo destes micro-organismos (COSTA, 2010).

Deve-se considerar que um processo fermentativo eficiente é sustentado por quatro pilares básicos: os processos de recuperação do metabólito, a forma de condução do processo, o meio de cultura e as bactérias selecionadas. Estas premissas possuem uma estreita interação e devem ser determinadas em conjunto, salientando os aspectos econômicos e bioquímicos do projeto além da conversão requerida. Ainda, algumas condições físico-químicas têm influência direta na bioconversão proposta por esta pesquisa, destacando o *pH*, tipo de substrato, concentração de substrato e forma de cultivo.

2.3.1 MICRO-ORGANISMOS

2.3.1.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (*E.coli*) se encontra dentro do grupo de coliformes fecais (coliformes a 45 °C), sendo utilizado na identificação de contaminação fecal e eventual presença de bactérias patogênicas. Podem ser encontradas no trato intestinal, mas também presente nas fezes, sobrevivendo nas partículas fecais, em poeira e água por dias ou meses, podendo ser disseminada facilmente no meio ambiente.

E.coli, pertencente a família *Enterobacteriaceae* é um bastonete curto, Gram-negativo (possui mais lipídios na parede celular dificultando a permeabilidade neste micro-organismo, mas um tratamento com álcool/éter extrai os lipídios, resultando numa maior permeabilidade), não esporulado, que pode medir entre 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm, e por possuir flagelos peritríqueos,

a maioria destes são móveis. Estes micro-organismos possuem metabolismo micro-anaerófilo, tendo capacidade de fermentar a família dos carboidratos, como lactose, glicose, entre outras, com produção de ácido e gás (CORRÊA, 2012).

Este gênero de bactérias quando sujeitos a nutrientes sólidos (Ágar) apresentam cerca de 1 a 3 mm de diâmetro, criando formas lisas e rugosas, ou ainda podem existir com características intermediárias e mucóides. Estas bactérias quando se apresentam em formas lisas são convexas e brilhantes, possuem bordos regulares e se dispersam em solução salina a 0,85% (CORRÊA, 2012).

A bactéria *E. coli* em ágar *MacConkey* forma colônias de cor rosada, e quando submetidas em ágar eosina e azul de metileno (EMB) produzem colônias com brilho metálico, e até mesmo podem vir a apresentar atividade hemolítica em ágar-sangue (CORRÊA, 2012).

Por outro lado, a *E. coli* exerce grande benefício sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando considerável quantidade de vitaminas. Apesar destas vantagens, as cepas de *E. coli*, possuem um grupo que pode provocar doenças em indivíduos humanos, conhecidos como *E. coli* enteropatogênicas. Essas colônias estão entre os principais agentes das doenças de origem alimentar nos Estados Unidos correspondendo a 28,6% das mortes e 7,4% dos surtos provocadas por bactérias na década de 90 (SILVA, SILVEIRA e YOKOYA, 2003).

Os primeiros estudos relacionados com a *E. coli* ocorrerão devido a um surto epidêmico em uma creche, causando a morte de pelo menos 50% dos afetados pela *E. coli* (FRANCO, 2002).

Esta bactéria é um dos agentes etiológicos mais isolados em casos de diarreia no homem e em animais. Estas cepas presentes no trato gastrointestinal são comensais não patogênicos em sua maioria. Colônias de *E. coli* toxigênicas são as causadoras de diarreia aquosa profusa e lesões vasculares sistêmicas devido à liberação de toxinas termo-lábil, termo-estável e *Shiga* toxina, que induzem a hipersecreção pelas células do intestino ou que interferem com a síntese protéica das células (MACÊDO, 2007).

2.3.1.2 *Arthrobactersp.*

As bactérias do gênero *Arthrobactersp.* são em sua maioria aeróbias obrigatórias, porém as espécies *A. globiformis* e *A. nicotiana* exibem metabolismo anaeróbio. As espécies com metabolismos anaeróbios possuem essas características pois ao viverem na camada superior do solo tiveram que se adaptar ao meio, onde existiam épocas de maior e menor oxigenação. Possuem estrutura unicelulares e têm formas de bastonetes com coloração Gram-negativo quando em fase inicial, e Gram-positivos em células antigas (SANTOS, 2014).

A *Arthrobactersp.* possui quando em fase de crescimento estático, forma esférica, porém quando em fase de crescimento é conhecida pelo seu pleomorfismo (várias formas ao longo da vida). A literatura indica que sua temperatura ótima de crescimento está na faixa entre 25 a 30°C (NEIDHART, 1990).

Alguns trabalhos mostram que esta bactéria são habitantes naturais de solos e possuem capacidade de degradar compostos orgânicos alifáticos, aromáticos, compostos químicos estranhos a um sistema biológico. Também são capazes de degradar herbicidas, o que leva sua utilização em plantações, mas em concentrações excessivas causam danos ao solo e lençóis freáticos (ARAUJO, 2010).

2.3.2 TEMPERATURA

A temperatura é considerada uma das variáveis que mais influencia no processo de fermentação. Tem-se que, considerando a bibliografia de processos fermentativos já estudados, ao aumentar a temperatura do meio de 20 para 35°C ocorre um aumento na produção dos metabólitos determinados. No entanto se a temperatura variar em uma faixa de 35 a 55°C observa-se uma queda na produção, ocasionada por mudanças no metabolismo das bactérias ou na sua rota metabólica (COSTA, 2010).

2.3.3 INÓCULO

A biomassa constituída pelas bactérias foi inserida ao meio fermentativo com o objetivo de gerar metabólitos específicos, que é denominado por inóculo, possuindo influência determinante na condução do processo peculiarmente em pesquisas em escala laboratorial, como proposto neste estudo. Observa-se que podem ocorrer variações na produção de componentes desejáveis, considerando o mesmo meio de cultivo, as mesmas condições físico-químicas e nutricionais, tendo em vista a grande variabilidade metabólica dos micro-organismos.

2.3.4 pH

Outro aspecto que pode influenciar no processo biofermentativo do glicerol é o pH do meio e sua acidez, destacando que para medidas de pH menores que 7 tem-se a presença de maiores quantidades de íons de hidrogênio tornando o meio mais ácido.

O pH pode alterar a atividade enzimática da reação bioquímica de conversão da glicerina assim como a rota metabólica das bactérias envolvidas (COSTA, 2010).

O valor ótimo desta variável para a biofermentação proposta pode variar de acordo com o modo de processo abordado, as condições de cultivo e ainda principalmente com a bactéria presente no inóculo. Neste contexto, esta pesquisa avaliou a influência do pH no processo de bioconversão e determinou qual a melhor faixa para otimização da produção de etanol nas condições predeterminadas.

2.3.5 FORMA DE CULTIVO

A biofermentação do glicerol requer uma homogeneização adequada, visando promover a uniformidade do meio, impedir a concentração de partículas aglomeradas, bem como auxiliar as reações bioquímicas presentes, aumentando assim a eficiência do processo (SANTOS, 2006).

Em consequência disso, o presente estudo abrangeu as duas formas de cultivo: estática e com agitação, conforme planejamento fatorial, para comparar os resultados e consolidar experimentalmente os dados teóricos.

2.4 ETANOL

Também conhecido como álcool etílico, o etanol é um combustível ecologicamente correto, considerando que pode ser obtido a partir de matérias-primas renováveis e que também reduz os impactos ambientais gerados pela emissão de gás carbônico na atmosfera.

Atualmente o processo mais difundido industrialmente para a produção deste combustível no Brasil é a partir da fermentação da cana-de-açúcar, contudo linhas de pesquisas recentes mostram diversos caminhos de obtenção do etanol (PIACENTE, 2006).

De acordo com Piacente (2006) o país consumiu etanol de forma direta para produção de energia de motores automotivos mais de 25 bilhões de litros em 2011, além das exportações que experimentaram um salto de 73% na produção em quatro anos, de 3,53 bilhões de litros em 2007 para 6,10 bilhões de litros em 2011.

Observa que esse incremento econômico do etanol se deve principalmente pela adaptação do mercado a atual situação, indicado pelo aumento da frota brasileira de veículos que operam tanto movidos a gasolina ou a etanol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Na presente pesquisa foram utilizadas metodologias já estudadas por outros pesquisadores cuja linha de estudo se assemelha a proposta desta pesquisa.

3.1 DELINEAMENTO

A presente pesquisa caracteriza-se como uma pesquisa aplicada. Barros e Lehfeld (2000, p.50) aponta que a mesma “tem como motivação a

necessidade de produzir conhecimento para aplicação de seus resultados, com o objetivo de contribuir para fins práticos, visando a solução de problemas em longo ou em curto prazo”.

Considerando que o principal objetivo deste trabalho foi a produção de conhecimento e inovação para a aplicação prática a médio prazo, visando interesses específicos e abrangendo necessidades regionais, a investigação prática e teórica é qualificada como aplicada.

Do ponto de vista dos objetivos da pesquisa o estudo se classifica como uma pesquisa exploratória. Gil (1999, p.33) ao discorrer sobre os níveis de pesquisa, define que “as pesquisas exploratórias têm como principal finalidade desenvolver, esclarecer e modificar conceitos e ideias, tendo em vista, a formulação de problemas mais precisos ou hipóteses pesquisáveis para estudos posteriores. Estas pesquisas são desenvolvidas com o objetivo de proporcionar visão geral, de tipo aproximativo, acerca de determinado fato. Esse tipo de pesquisa é realizado especialmente quando o tema escolhido é pouco explorado e constitui a primeira etapa de uma investigação mais ampla”.

Observando que o tema sugerido pela pesquisa ainda é pouco explorado pela comunidade científica, caracteriza-se como uma investigação exploratória, partindo de um processo de sondagem, visando aprimorar ideias e construção de hipóteses para a solução de problemas.

Em relação ao enfoque do estudo, foi aplicado o método quantitativo.

Os métodos quantitativos como o próprio nome já diz, significa quantificar dados fatos ou opiniões, nas normas de coletas de informações, como também com o emprego de técnicas e recursos simples de estatística, tais como média, percentagem, moda, desvio padrão e mediana, como o uso de métodos mais complexos tais como análise de regressão, coeficiente de correlação etc., bastante comum em defesas de teses.

O método quantitativo é bastante usado no desenvolvimento das pesquisas nos campos sociais, de opinião, de comunicação, mercadológica, administrativo e econômico, representando de forma geral a garantia de precisão dos resultados, evitando enganos e distorções na interpretação dos dados (OLIVEIRA,2002, p.155).

Pode-se observar que o presente estudo utilizou técnicas estatísticas para quantificação dos resultados, buscando verificar a relação entre as variáveis estudadas e os dados coletados.

Ainda, do ponto de vista dos procedimentos técnicos foi empregada uma pesquisa experimental.

A pesquisa experimental consiste essencialmente em submeter os objetos de estudo à influência de certas variáveis, em condições controladas e conhecidas pelo investigador, para observar os resultados que a variável produz no objeto. Não constitui exagero afirmar que boa parte dos conhecimentos obtidos nos últimos três séculos se deve ao emprego do método experimental que pode ser considerado como o método por excelência das ciências naturais (GIL, 1999, p. 33).

Nota-se que o presente estudo aborda o método experimental considerando que a matéria prima de estudo e as variáveis de influência, serão submetidas a diferentes condições operacionais determinadas.

3.2 LOCAL DA PESQUISA

Os experimentos biotecnológicos propostos foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia e de Iniciação Científica, ambos localizados na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Câmpus* Ponta Grossa. As análises dos produtos obtidos foram realizadas no Laboratório de Métodos Instrumentais e Laboratório de Química Instrumental, localizados na mesma instituição.

3.3 ORIGEM DOS MICRO-ORGANISMOS E DO GLICEROL

As cepas das bactérias *E. coli* e *Arthrobactersp.* utilizadas nos experimentos foram isoladas e cultivadas por alunos e professores da instituição nos laboratórios da UTFPR do campus Ponta Grossa. Devido a quantidade considerável de contaminantes presentes no glicerol residual oriundo da produção do biodiesel além do processo de purificação requerer tempo e ser dispendioso, foi utilizado nesta pesquisa o glicerol comercial (Vetec), que para efeitos qualitativos produziram resultados equivalentes no consumo deste glicerol por bactérias, considerando a mesma composição química de ambas glicerinas (MONTIBELLER e MILLEO, 2014).

3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Um experimento planejado é uma série de testes, no qual são feitas modificações propositais nas variáveis iniciais de um determinado processo, possibilitando observar e identificar respectivas alterações na resposta de saída (MONTEGOMERY, 2001).

Aplicação dos Planejamentos Experimentais são fundamentais para desenvolvimento de novos produtos e para o controle de processos. Nesta área é comum aparecer problemas em que se precisa estudar várias propriedades ao mesmo tempo e estas, por sua vez, são afetadas por um grande número de fatores experimentais. É papel de técnicas de planejamento de experimentos, auxiliar na fabricação de produtos com melhores características, na diminuição do seu tempo de desenvolvimento, aumentar a produtividade de processos e minimizar a sensibilidade a fatores externos (SCARMINIO et al., 2001).

No planejamento para o presente estudo foram consideradas as seguintes variáveis independentes, levando em conta os valores ideais de cada variável pesquisada na literatura:

- pH (faixa de variação: 5,0 a 8,0);
- Forma de cultivo (faixa de variação: 0 a 150 rpm);
- Concentração de glicerol (faixa de variação: 10 a 30 g/L).

Investigando as condições específicas de metabolização do glicerol para cada espécie bacteriana proposta nesta pesquisa, obteve-se os planejamentos experimentais no modelo 2^n , com três pontos centrais, identificando n como o número de variáveis independentes, e uma variável dependente, a concentração de etanol, apresentados nas Tabelas 2 e 3 para *E. coli* e *Arthrobacter sp.*

Tabela 2: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais para *Escherichia coli* e *Arthrobacter sp.*.

VARIÁVEL	NÍVEIS			UNIDADE
	-1	0	1	
pH	5	6,5	8	
Agitação	0	75	150	Rpm
Glicerol	10	20	30	g/L

Fonte: própria.

Tabela 3: Matriz do planejamento fatorial para *Escherichia coli* e *Arthrobacter sp.*.

ENSAIO	pH	AGITAÇÃO(rpm)	GLICEROL(g/L)
1	5	0	10
2	5	0	30
3	5	150	10
4	5	150	30
5	8	0	10
6	8	0	30
7	8	150	10
8	8	150	30
9	6,5	75	20
10	6,5	75	20
11	6,5	75	20

Fonte: própria.

3.5 ENSAIO DE FERMENTAÇÃO

3.5.1 PREPARO DO INÓCULO

Para o aumentada biomassa das cepas bacterianas já isoladas e caracterizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica

Federal do Paraná *Câmpus* Ponta Grossa, foi preparado o meio de cultura, Caldo Nutriente (SP Labor) (peptona 5,0 g/L, extrato de carne 1,5 g/L, extrato de leveduras 1,5 g/L e cloreto de sódio 5,0 g/L), esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, com posterior inoculação de 10% (v/v) dos micro-organismos *Escherichia coli* e *Arthrobactersp.*, separadamente em ambiente asséptico, em frascos com 10mL, 100mL e 250mL do meio de cultivo, seguindo o aumento de escala.

O cultivo de ambas bactérias (frascos de 10mL e 100mL) foi realizado sob agitação em shaker (Tecnal) a 100 rpm e temperatura 37°C ± 2°C, até atingir índice de turbidez próximo a 1, medido em Espectrofotômetro UV-Vis o que representa população microbiana suficiente (10⁶ UFC/g) para condução dos experimentos. Segundo Schmidell et al. (2001), esta análise indireta é eficaz para quantificação de biomassa bacteriana, observando que um índice de turbidez de 0,8 representa uma ótima proporção de bactérias presentes naquele meio medido (10⁶ UFC/g).

O cultivo dos micro-organismos em erlenmeyers com 200 mL do meio de cultivo foi conduzido de forma estática, em estufa a 37°C ± 2°C durante 24 horas.

3.5.2 PREPARO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

3.5.2.1 Preparo do meio de cultivo

Para garantir o crescimento de ambas bactérias durante o experimento foi preparada um meio de cultivo contendo os nutrientes necessários ao ciclo dos micro-organismos, conforme Tabela 4, autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Tabela 4: Componentes do meio de cultivo.

NUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO (g/100mL)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4000
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0200
NiCl ₂	0,0025

Na ₂ MoO ₄	0,0035
ZnSO ₄	0,0140
HCl	0,0900
K ₂ HPO ₄	0,0520
KH ₂ PO ₄	0,0250
MgSO ₄	0,0200
Extrato de Levedura	0,1500
PeptonaBacteriológica	0,1000
MnCl ₂	0,0100
H ₃ BO ₃	0,0060
CuSO ₄	0,0004

Fonte: Própria.

3.5.2.2 Preparo dos meios de fermentação

Para a condução das fermentações, foram preparados frascos de Erlenmeyers, com capacidade de 250 mL, contendo 200 mL de água deionizada, 0,2 mL/200 mL do meio de cultivo, glicerol e pH variando de acordo com o planejamento experimental. Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.5.2.3 Processo fermentativo

As fermentações foram conduzidas de acordo com o planejamento experimental descrito no item 3.4, variando agitação, pH e concentração de glicerol, em temperatura 35°C± 2°C, utilizando 20 mL do inoculo de *E. coli* e *Arthrobactersp.*, em 200 mL do meio de cultivo.

As coletas das amostras foram realizadas em intervalos de 8 horas, durante as 72 horas de fermentação, sendo 5mL para análise de densidade ótica e 10 mL para análise de concentração de etanol e consumo de glicerol.

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.6.1 DENSIDADE ÓTICA

O objetivo desta análise é verificar o desenvolvimento bacteriano durante as fermentações, com o intuito de conhecer a dinâmica de crescimento de cada bactéria em estudo nas condições determinadas.

O índice de turbidez foi analisado no Espectrofotômetro *UV-Vis* (Cintra 10), dispondo de alíquotas de 5mL das amostras. A leitura foi realizada utilizando comprimento de onda infravermelho de 600 nm e em triplicatas.

3.6.2 CROMATOGRAFIA GASOSA

Para quantificar a produção de etanol nos ensaios por ambas bactérias foi empregado o método analítico de alta precisão e valor científico, cromatografia gasosa por headspace.

3.6.2.1 Preparo das amostras para coleta do headspace

As amostras do fermentado foram colocadas em frascos com capacidade de 20 mL, na quantidade de 6mL, onde foram colocados 100 µL de padrão interno (Hexanol, Merck) e 1 g de sulfato de sódio anidro. Os frascos foram fechados com tampa de silicone e lacre de alumínio. Antes da coleta do headspace, as amostras permaneceram a 60°C sob agitação no forno do injetor automático (cromatógrafo gasoso Young LinInstrument) durante 10 minutos.(SANTOS et al.1998)

3.6.2.2 Análise cromatográfica de compostos voláteis

A análise do etanol foi realizada em cromatógrafo gasoso Young LinInstrument - YL 6100 GC, equipado com detector de ionização de chama - FID, coluna capilar (Phenomenex) de 30 m de comprimento, com diâmetro interno de 25 mm e filme de ZB-WAX com 0,25µm de espessura. A

temperatura do injetor foi de 200°C, do detector de 230°C e o gás de arraste foi o nitrogênio a um fluxo de 2 mL.min⁻¹. A técnica de injeção foi split1:1,2 e foi utilizado o modo de injeção automática do CG, com volume de 1000µL. As condições de análise foram com programação de temperatura inicial a 40°C por 2 minutos, elevação de 10°C.min⁻¹ até 230°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos.

O etanol foi identificado comparando o tempo de retenção com o obtido na solução de referência. Para a quantificação do etanol foi utilizada a Equação 1.

$$C = A \quad (1)$$

Onde:

C = concentração do componente (mg.L⁻¹)

A= concentração da substância na solução de referência (mg.L⁻¹)

h = área do pico da substância na amostra

H = área do pico da substância na referência

I = área do pico do padrão interno na referência

i = área do pico do padrão interno na amostra.

3.6.2.3 Determinação de glicerol bruto por diferença de massa

Após as fermentações, foi observado que foi produzida uma mistura ternária, cujos os três componentes envolvidos eram: glicerol, água e etanol. O ponto de ebulição de cada uma destas moléculas, é de 78,37 °C para o etanol, 100 °C para a água e 290 °C para o glicerol, o que possibilita a separação de componentes por secagem.

Foram utilizados alíquotas de 4mL das amostras, dispostas em recipientes de alumínio previamente pesados e submetidas a estufa com controle de temperatura a 105 °C por 24 horas, a fim de volatilizar os componentes água e etanol. Com isso, o produto de fundo restante foi caracterizado como elemento de interesse para esta análise, glicerol bruto, que pode ser obtida de acordo com a Equação2.

$$m_{\text{glicerol}} = m_{\text{capsulacomamostra}} - m_{\text{capsi}}(2)$$

O tempo de volatilização foi validado fazendo inicialmente ensaios testes com a maior concentração inicial de glicerol dos fermentados, observando o planejamento experimental e para isto, foram preparadas soluções com 30 g/L de glicerol. Uma amostra de 4mL e outra de 8 mL foram submetidas a estufa à temperatura descrita anteriormente, para concluir sobre a eficiência da quantidade de amostra para a análise. As pesagens foram feitas em 2 e 24 horas a 105 °C, até atingir massa constante, para determinar o tempo de permanência na estufa de volatilização. Com isso, foi verificado que as amostras de 4 ml com permanência de 24 horas de aquecimento seriam eficazes para quantificar a concentração de glicerol bruto.

3.6.2.4 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em nível de 95% de confiança. Os parâmetros estudados foram analisados pela metodologia de análise de superfície de resposta, utilizando o programa Statistica versão 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE *E. COLI* POR DENSIDADE ÓTICA

De acordo com a metodologia descrita, a determinação do aumento da biomassa durante as fermentações foi realizada avaliando a densidade ótica de cada amostra. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 2 para ensaios realizados com a *E. coli*.

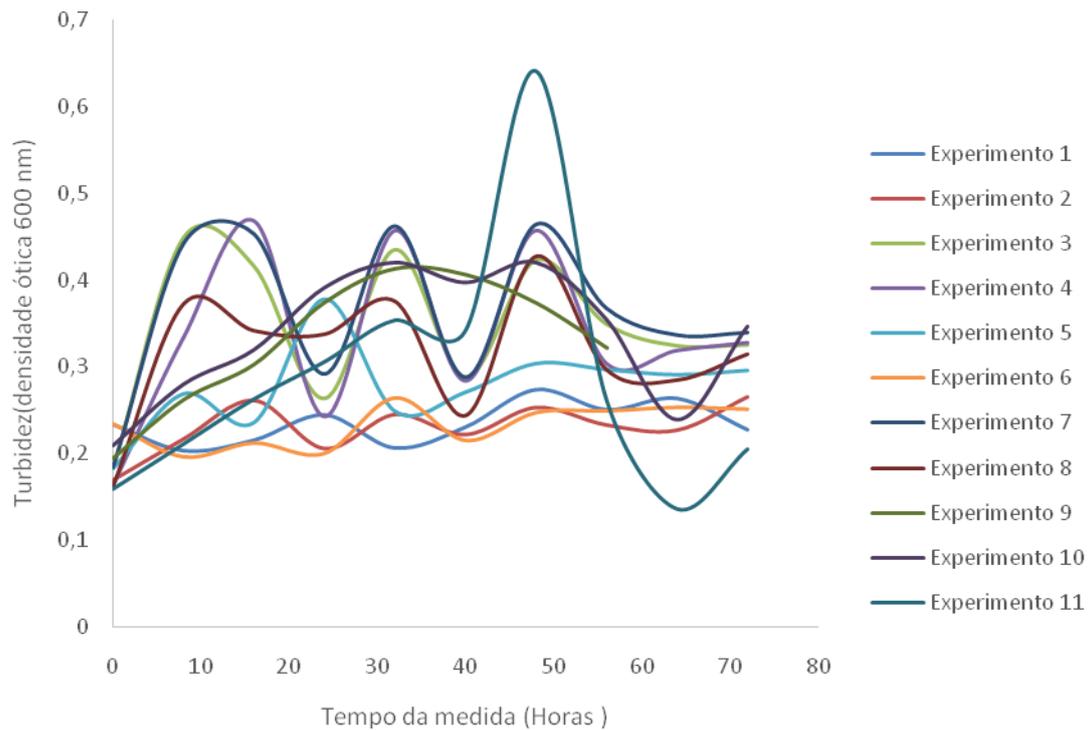


Figura 2: Curva de crescimento de *E. coli* durante o processo fermentativo.

Fonte: Própria.

A dinâmica de crescimento da bactéria *E. coli* se deu de forma oscilatória no intervalo de 72 horas, não evidenciando as quatro fases da curva de crescimento bacteriano proposto pela literatura (fases lag, log, estacionária e de declínio). Contudo, foi verificado que o ciclo bacteriológico desta bactéria se desenvolveu completamente no intervalo entre 20 e 30 horas, conforme a figura 2.

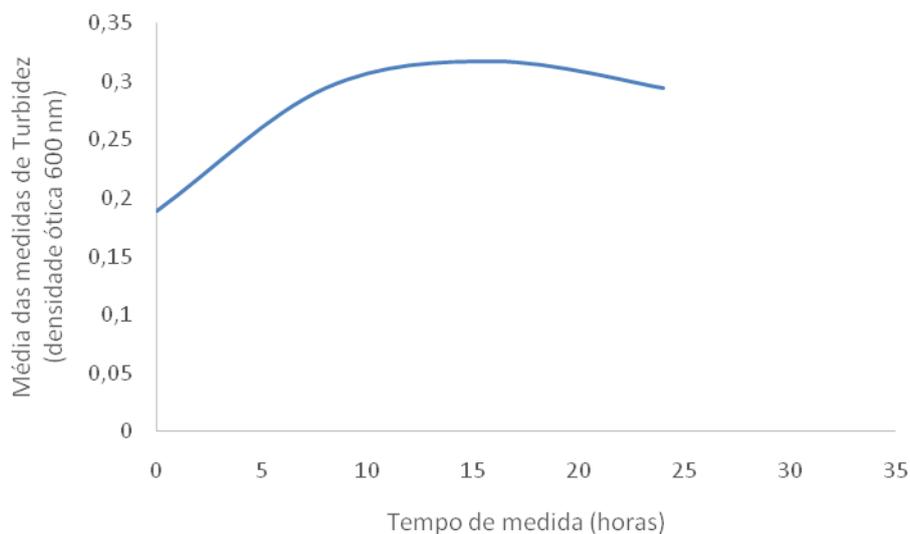


Figura 3: Curva de crescimento de *E. coli* em 24 horas entre os ensaios.

Fonte: Própria.

O crescimento bacteriano da *E. coli* pode ter sido influenciado diretamente pelas características próprias da bactéria durante as fermentações, tendo em vista, segundo Corrêa (2012), que a bactéria apresenta metabolismo microaerófilo, necessitando de concentrações reduzidas de oxigênio para seu ciclo fermentativo, notando que essa variável não foi controlada nos experimentos. Todavia, foi observado um crescimento microbiano, indicando que os nutrientes inseridos na solução traço e o glicerol foram suficientes para suprir o ciclo de vida de tal bactéria.

Segundo Schmidell et al. (2001), o índice de turbidez é uma medida indireta para o crescimento microbiano, a partir da leitura do desvio da luz infravermelha ao encontrar partículas na amostra. Porém tais partículas podem ser outros compostos produzidos pela bactéria em estudo, o que pode ter influenciado nos desvios na curva de crescimento como observado na figura 2.

A análise estatística dos ensaios 9, 10 e 11, pontos centrais, mostrou que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre estes ensaios para a medida de turbidez referente ao crescimento celular evidenciando confiabilidade e reprodutibilidade.

As figuras 4, 5 e 6 demonstram de forma geral que o glicerol e a forma de cultivo (estática ou agitação) tiveram influência significativa na produção de

biomassa da *Echerichia coli*, considerando as médias entre os tempos durante o processo fermentativo.

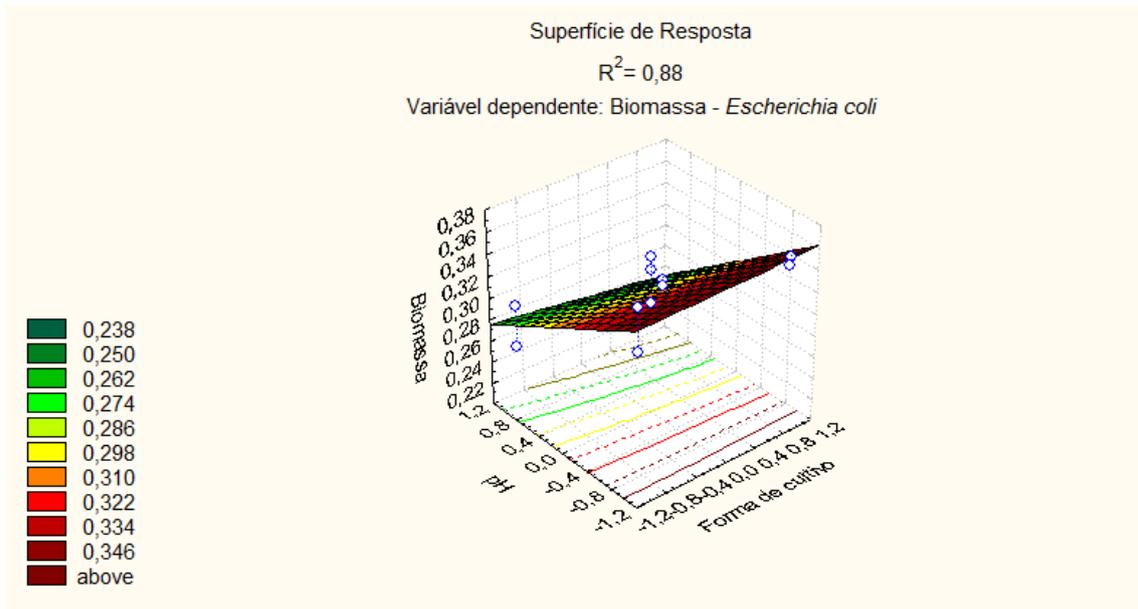


Figura 4: Superfície de resposta da concentração de biomassa da *E. coli*, entre as médias dos tempos de fermentação, em relação as variáveis pH e forma de cultivo

Fonte: Própria.

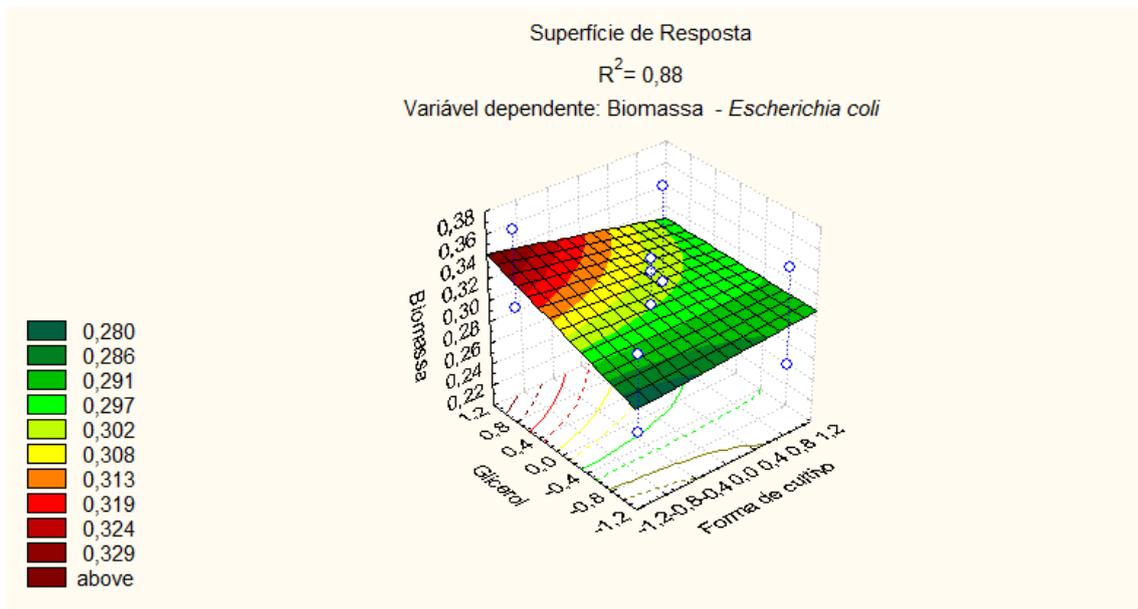


Figura 5: Superfície de resposta da concentração de biomassa da *E. coli*, entre as médias dos tempos de fermentação, em relação as variáveis concentração de glicerol e forma de cultivo.

Fonte: Própria.

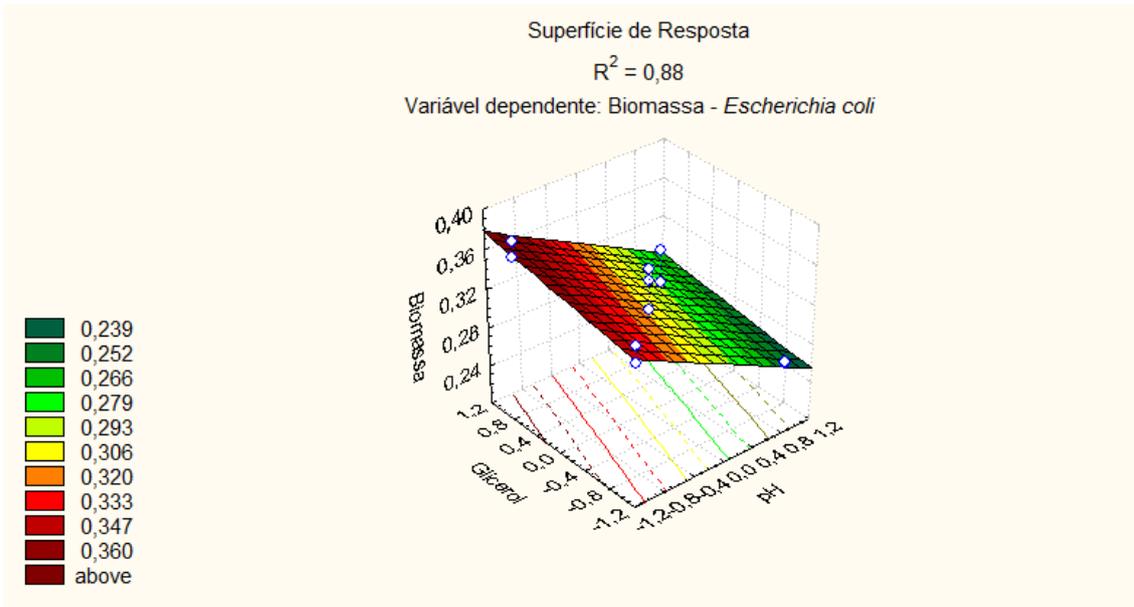


Figura 6: Superfície de resposta da concentração de biomassa da *E. coli*, entre a média dos tempos de fermentação, em relação as variáveis concentração de glicerol e pH.

Fonte: Própria.

A figura 7 mostra que tanto a forma de cultivo (estática ou sob agitação) quanto o pH apresentaram influência significativa na produção de biomassa da *Escherichia coli*, considerando as médias entre os ensaios, durante o processo fermentativo.

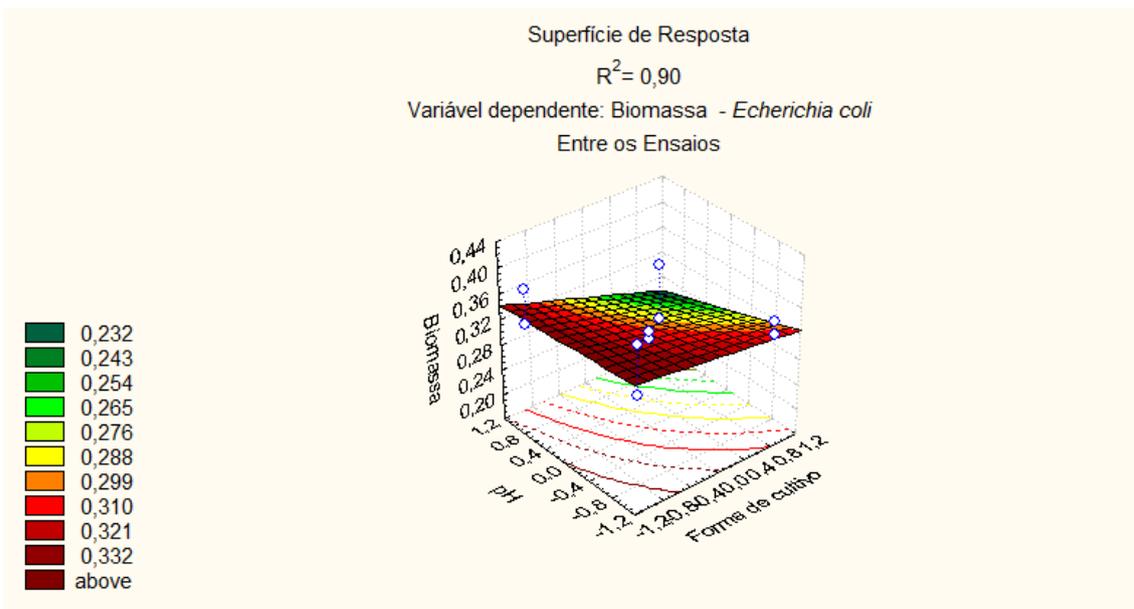


Figura 7: Superfície de resposta da concentração de biomassa da *E. coli* no processo fermentativo, entre a média dos ensaios em relação as variáveis pH e forma de cultivo.

Fonte: Própria.

Comparando as variáveis que tiveram relação significativa (figura7), pH e forma de cultivo, entre os ensaios, se observa que ambas variáveis têm influência nos resultados obtidos e que em menor pH (5,0) e na forma de cultivo estática se obtém resultados mais efetivos de crescimento de biomassa para *E.coli*.

4.2 CURVA DE CRESCIMENTO DE *ARTHROBACTER SP* POR DENSIDADE ÓTICA

Os resultados de crescimento obtidos para a *Arthrobactersp.* estão contidos nas figuras 8 e 9.

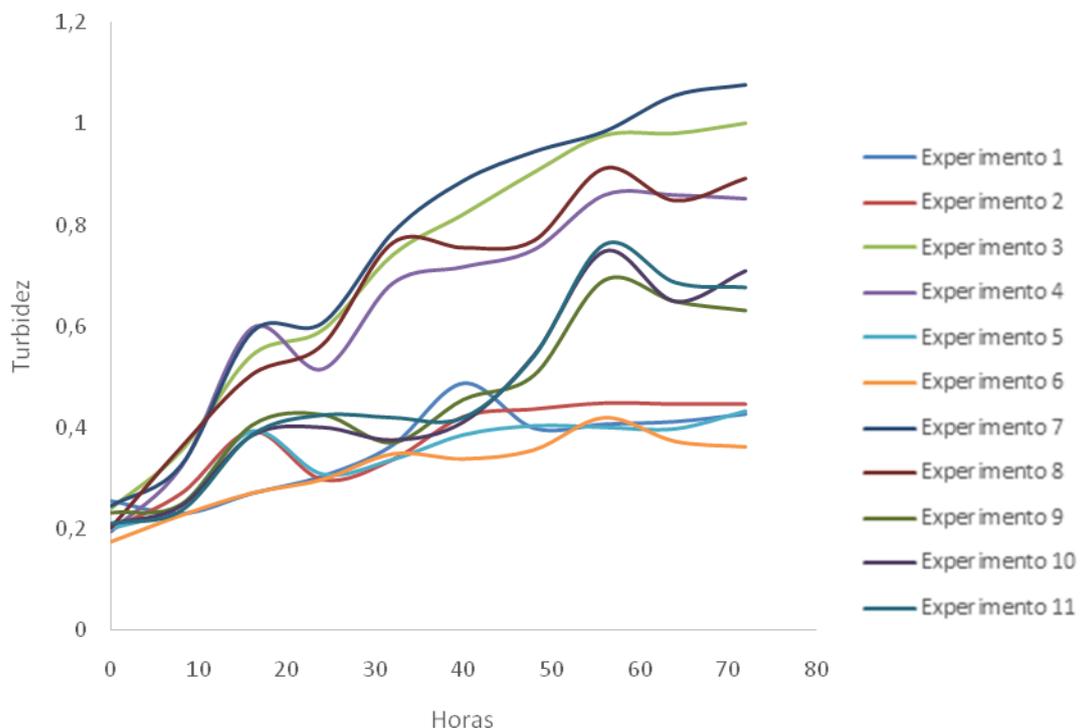


Figura 8: Curva de crescimento da *Arthrobacter sp.* durante o processo fermentativo.

Fonte: Própria.

Observando o crescimento da *Arthrobactersp.* ao final do período de 72 horas, nota-se que o crescimento da bactéria também apresentou um ciclo completo entre 20 e 24 horas de fermentação, figura 8, onde se encontra o primeiro pico de densidade ótica. Os demais resultados superiores podem ter

vido ocasionados pela aeração do meio fermentativo a cada coleta para análise.

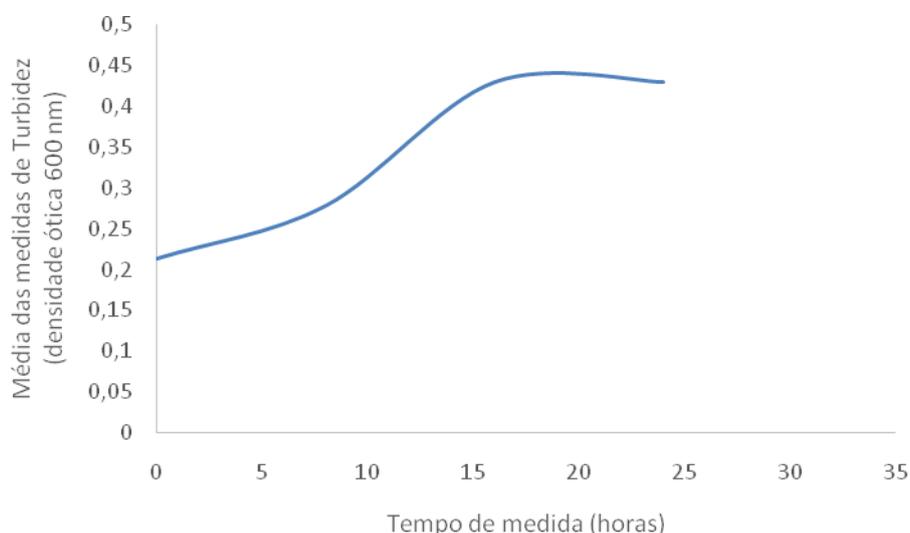


Figura 9: Curva de crescimento de *Arthrobacter sp.* em 24 horas, entre os ensaios.

Fonte: Própria.

Considerando que se trata de uma espécie pouco explorada pela literatura e que a espécie da bactéria utilizada nesta pesquisa não foi identificada, o micro-organismo em estudo, pode ter sido influenciado nos resultados de crescimento microbiano, tendo em vista que as fermentações foram conduzidas na presença de oxigênio; pois segundo Santos (2014) se fossem caracterizadas como *A.globiformis* ou *A.nicotienae*, possuem metabolismo anaeróbio.

De acordo com a avaliação estatística dos resultados de índice de turbidez dos pontos centrais, conclui-se que os ensaios conduzidos para bactéria *Arthrobacter sp.* também apresentaram resultados sem diferenças significativas ($p \geq 0,05$).

As figuras 10, 11 e 12 mostram que o glicerol e a forma de cultivo, ou seja, tanto na forma estática como sob agitação (150 rpm), tiveram influência significativa na produção de biomassa da *Arthrobacter sp.* considerando a médias entre os tempos durante o processo fermentativo.

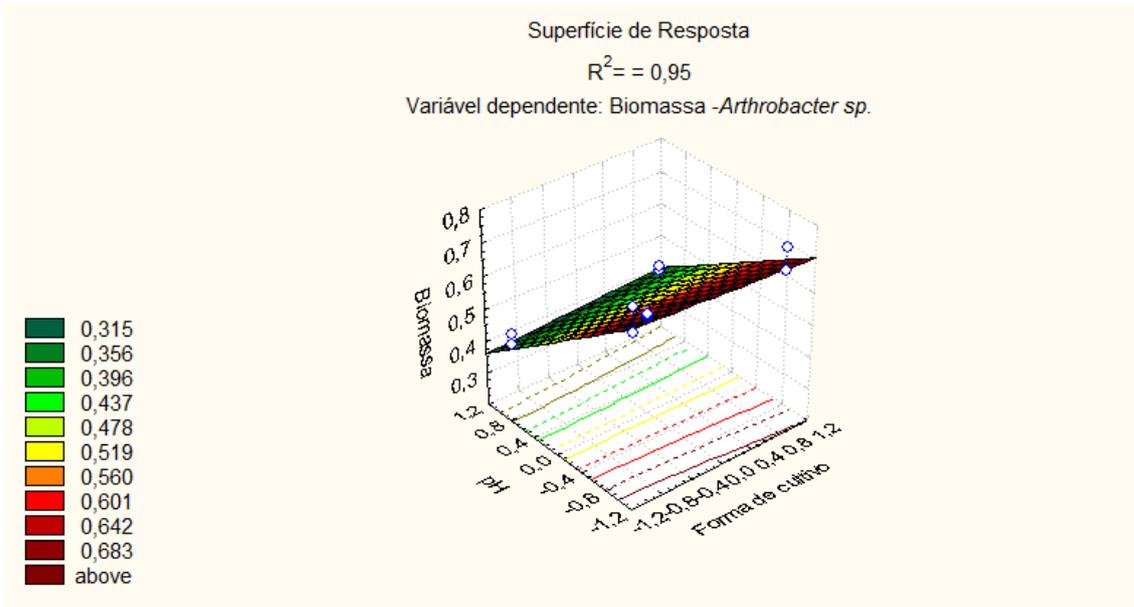


Figura 10: Superfície de resposta da concentração de biomassa da *Arthrobacter sp.*, entre a média dos tempos de fermentação em relação as variáveis pH e forma de cultivo.

Fonte: Própria.

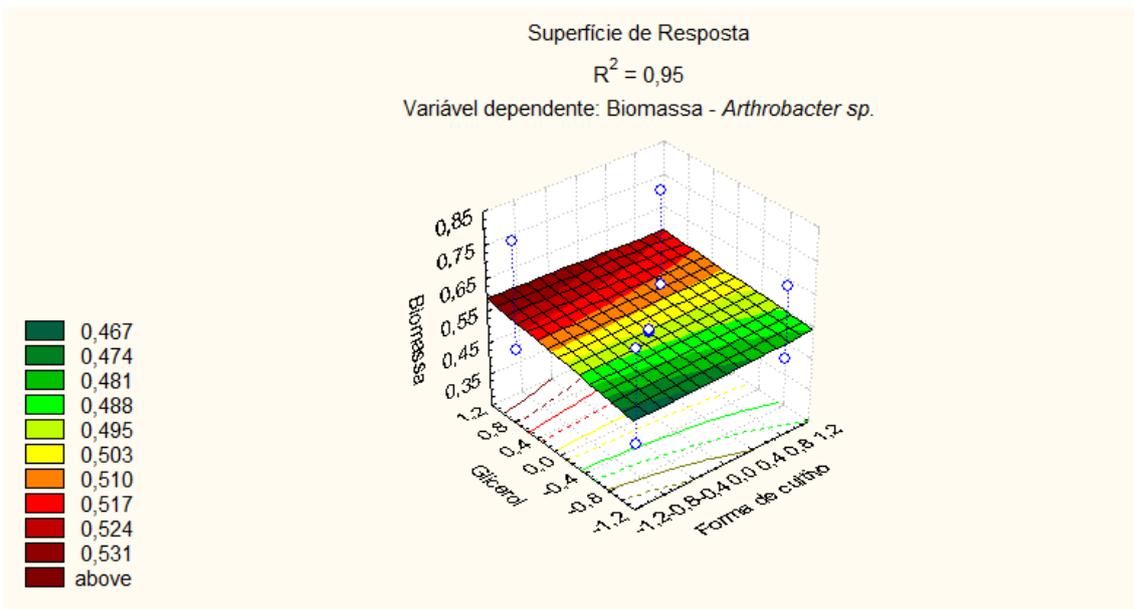


Figura 11: Superfície de resposta da concentração de biomassa da *Arthrobacter sp.*, entre a média dos tempos de fermentação em relação as variáveis concentração de glicerol e forma de cultivo.

Fonte: Própria.

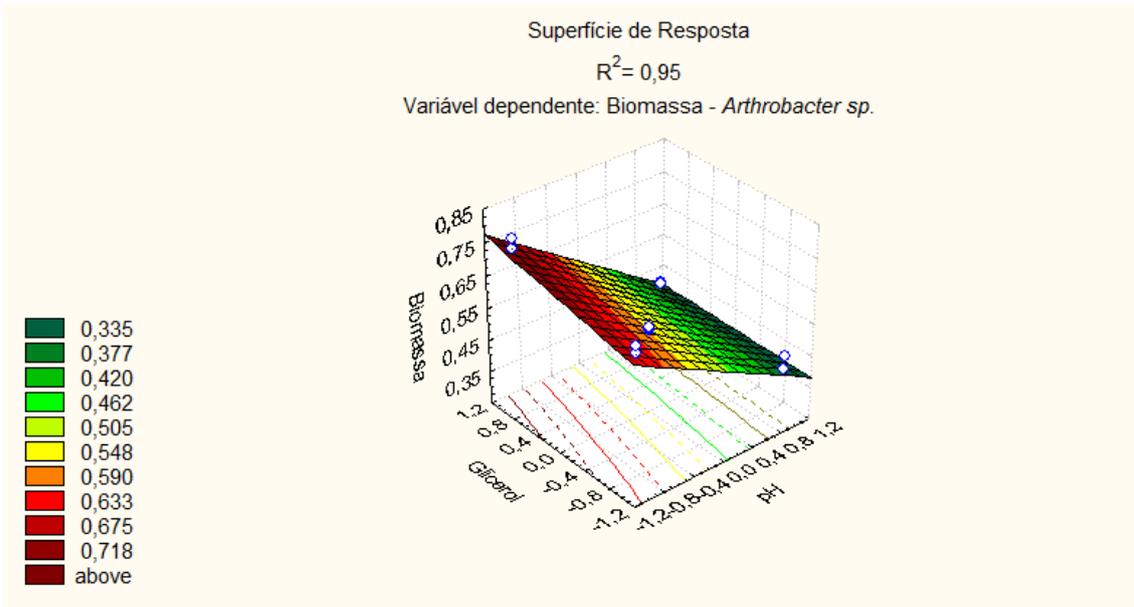


Figura 12: Superfície de resposta da concentração de biomassa da *Arthrobacter sp.*, entre a média dos tempos de fermentação em relação as variáveis concentração de glicerol e pH.

Fonte: Própria.

A figura 13 mostra que tanto a forma de cultivo (estática ou sob agitação) quanto o pH apresentaram influência significativa na produção de biomassa da *Arthrobacter sp.* considerando as médias entre os ensaios, durante o processo fermentativo.

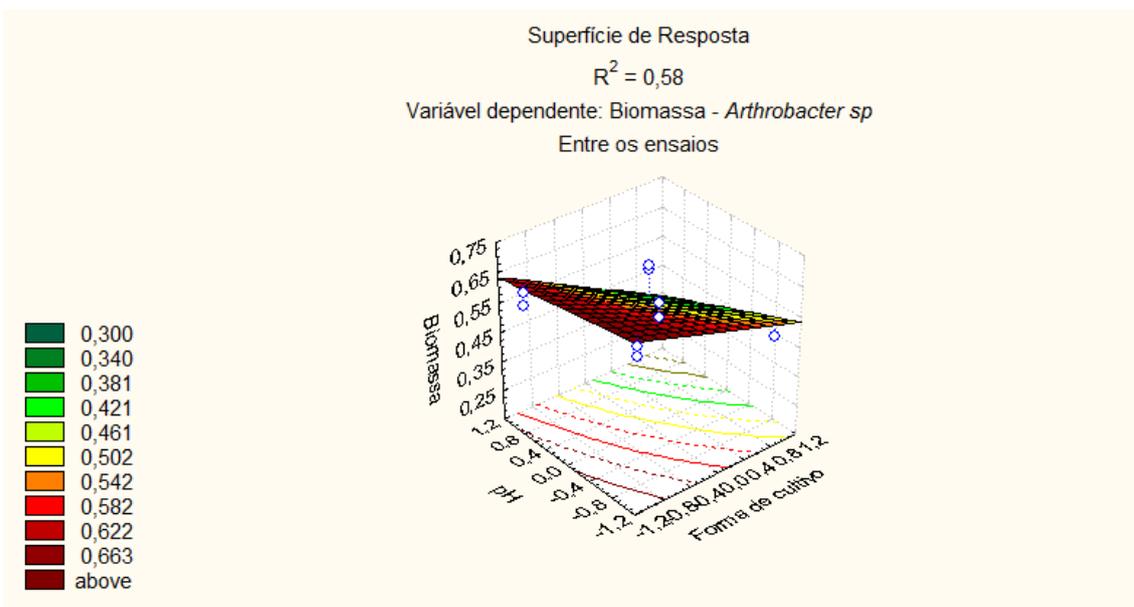


Figura 13: Superfície de resposta da concentração de biomassa da *Arthrobacter sp.* no processo fermentativo, entre a média dos ensaios em relação as variáveis pH e forma de cultivo.

Fonte: Própria.

Comparando as variáveis que tiveram relação significativa (figura 13), pH e forma de cultivo, entre os ensaios, se observa que ambas variáveis têm influência nos resultados obtidos e que em menor pH (5,0) e na forma de cultivo estática se obtém resultados mais efetivos de crescimento de biomassa para *Arthrobacter sp.*

4.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR CROMATOGRAFIA PARA *E. COLI*

Os resultados da concentração de etanol ao final das fermentações para *E. coli* foram apresentados nas figuras 14,15,16 e 17.

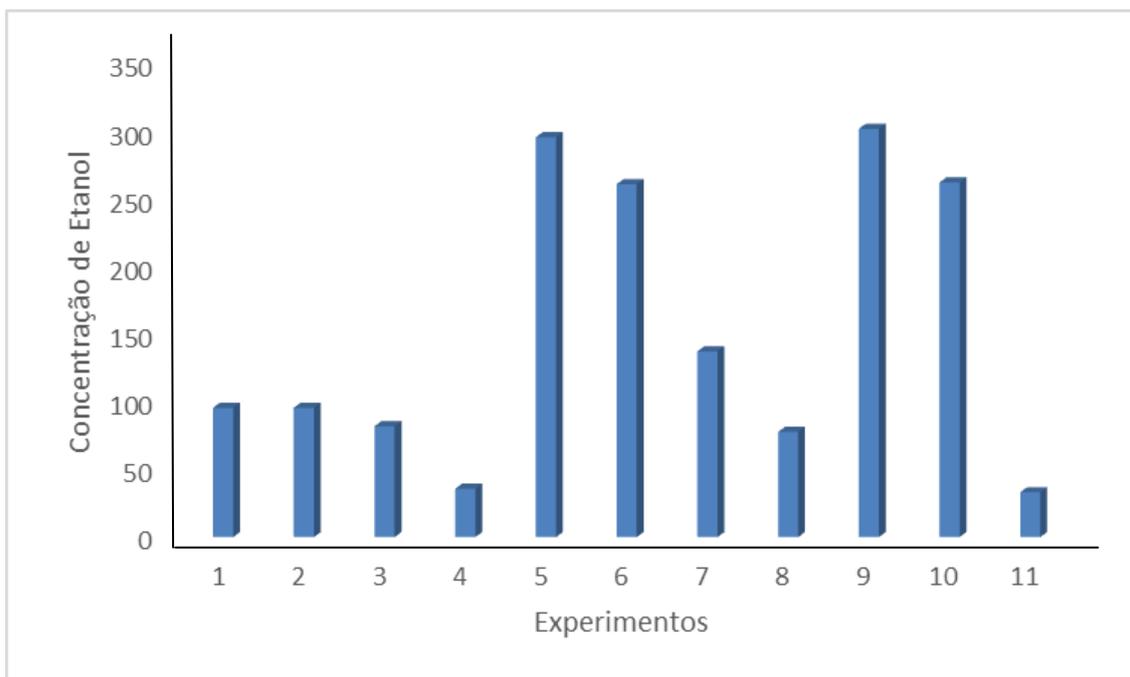


Figura14: Quantidade de etanol produzido pela *E. coli*

Fonte: Própria.

Considerando as condições experimentais propostas pelo planejamento fatorial, observa-se que os experimentos 5 (pH 8, forma de cultivo estático e glicerol 10 g/L) e 9 (pH 6,5, forma de cultivo 75 rpm e glicerol 20 g/L)

obtiveram uma vantagem quantitativa em relação aos demais ensaios, na formação do produto principal dessa pesquisa.

A faixa de pH de desenvolvimento desses experimentos em questão estavam entre 6,5 e 8,0 e a agitação do meio estava contida em faixas intermediárias de 0 a 75 rpm e glicerol entre 10 e 20 g/L.

Segundo Lucatelli, (2009) a literatura propõe uma temperatura ótima de desenvolvimento bacteriano entre 30 e 37 °C e pH ideal entre 7,2 e 7,5. Logo, pode-se concluir que dentro das faixas estudadas nesta pesquisa as fermentações com *E. coli* geraram maiores resultados de concentração de etanol em um nível de pH 8 e sob influência de forma de cultivo de 0 a 75 rpm.

As figuras 15, 16 e 17 mostram que o pH e o glicerol tiveram influência direta na produção de etanol pela *E. coli* durante o processo fermentativo.

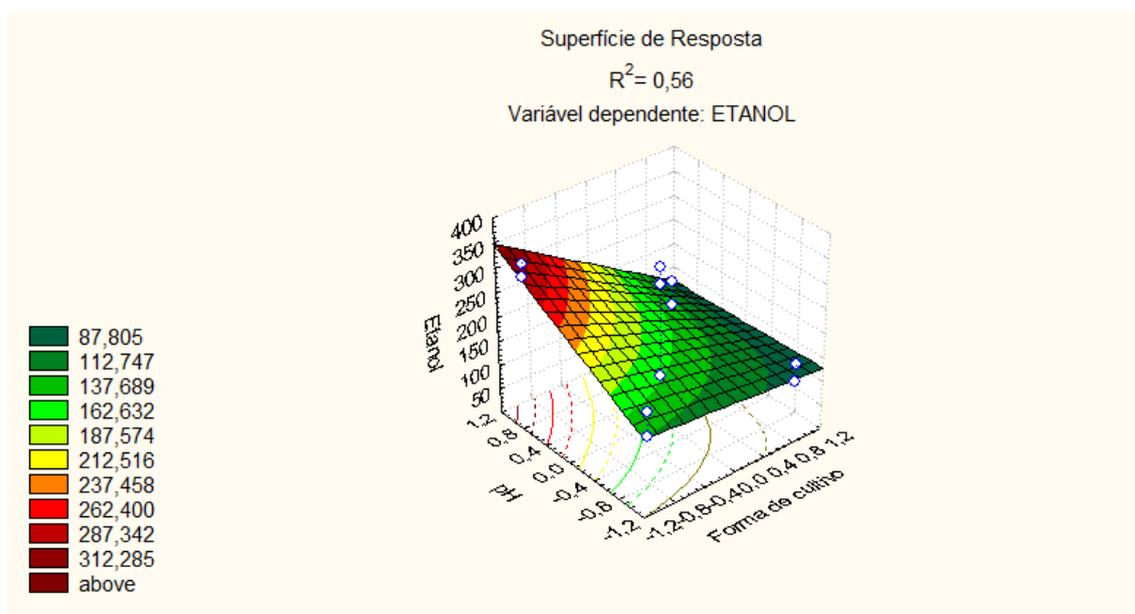


Figura 15: Concentração de etanol produzido por *E. coli* em relação as variáveis pH e forma de cultivo

Fonte: Própria.

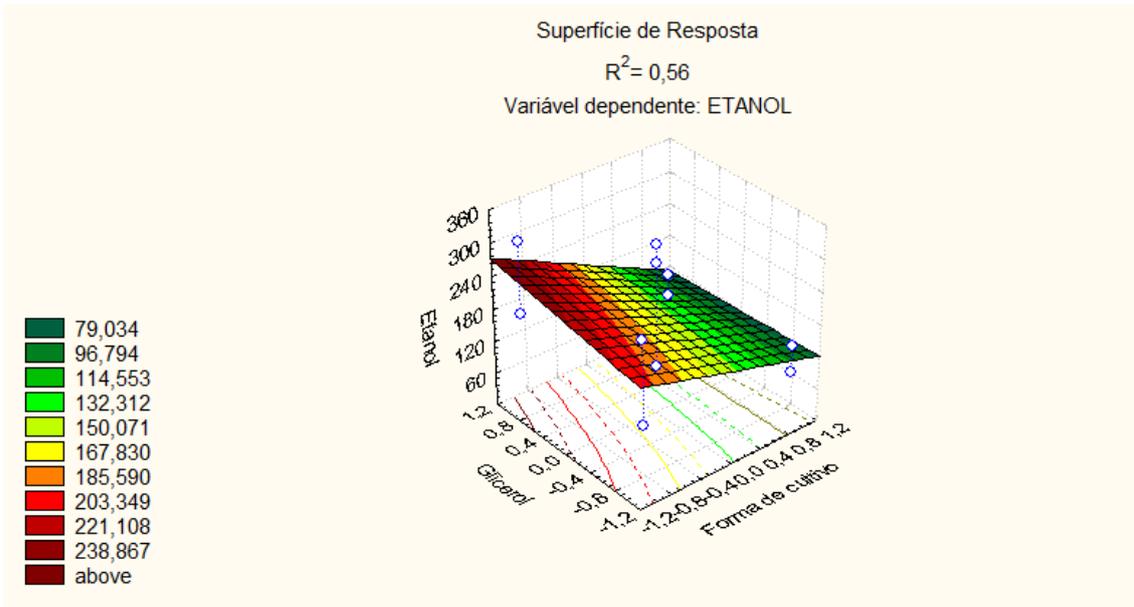


Figura 16: Concentração de etanol produzido por *E. coli* em relação as variáveis glicerol e forma de cultivo.

Fonte: Própria.

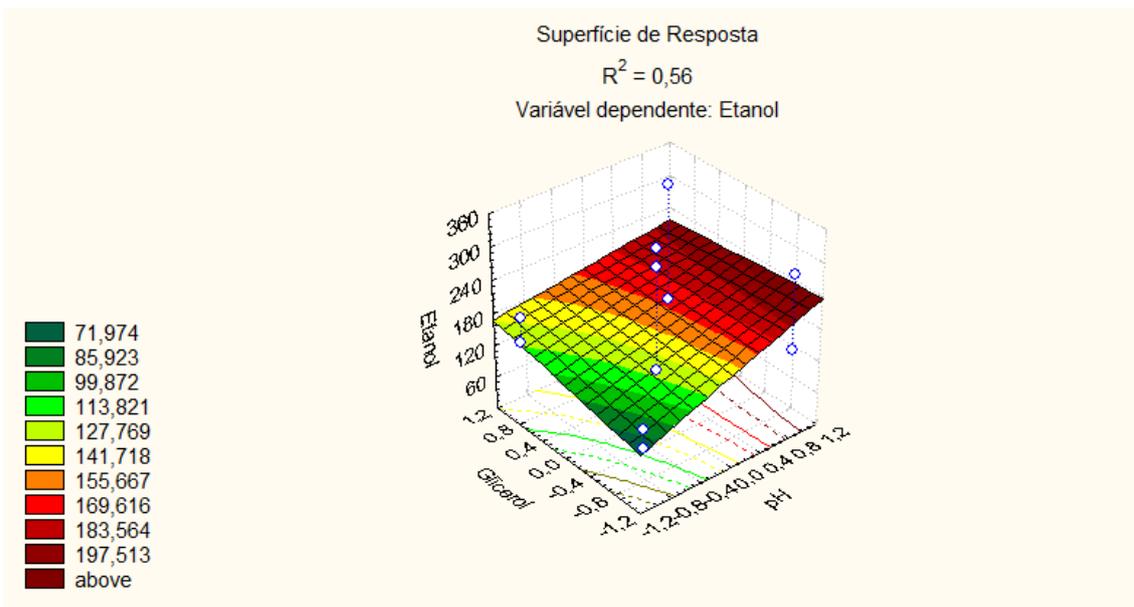


Figura 17: Concentração de etanol produzido por *E. coli* em relação as variáveis glicerol e pH.

Fonte: Própria.

4.4 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR CROMATOGRAFIA PARA *ARTHROBACTER SP.*

Os resultados da concentração de etanol ao final das fermentações para *Arthrobactersp.* foram dispostos nas figuras 18, 19, 20 e 21.

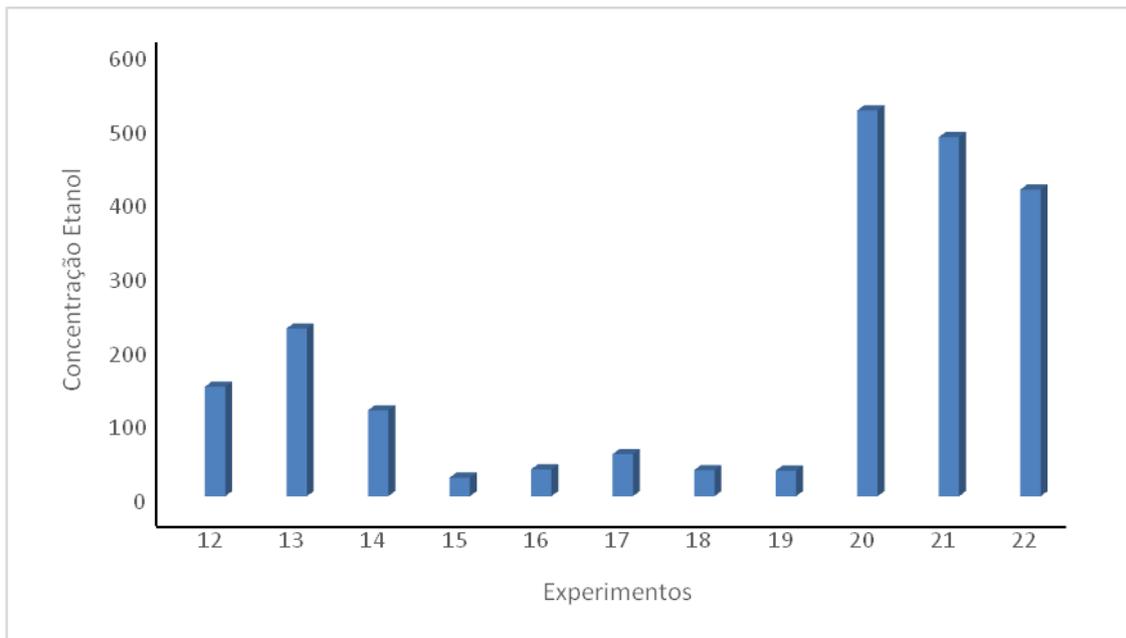


Figura 18: Concentração de etanol produzido pela *Arthrobacter sp.*

Fonte: Própria.

Nos experimentos realizados com a bactéria *Arthrobacter sp.*, foi possível observar maior produção de etanol no ensaio 9, cujas condições de operação consolidavam valores de pH 6,5, forma de cultivo 75 rpm e glicerol 20 g/L. A superfície de resposta, figura 9, gerada pelos resultados obtidos indica que sob agitação de 75 rpm (intermediária), a variável concentração de glicerol possui significativa influência sobre a metabolização do etanol, de modo que a curva abrange toda a faixa de concentração de glicerol estudada para altas concentrações de etanol. Ainda afirma-se que no intervalo de nível de pH moderado de 6,5, como do experimento 9 para *Arthrobacter sp.*, até níveis menores de pH 5 ocorre a formação de elevadas quantidades de etanol.

As figuras 19, 20 e 21 mostram que o pH e a forma de cultivo tiveram influência direta na produção de etanol pela *Arthrobacter sp.* durante o processo fermentativo.

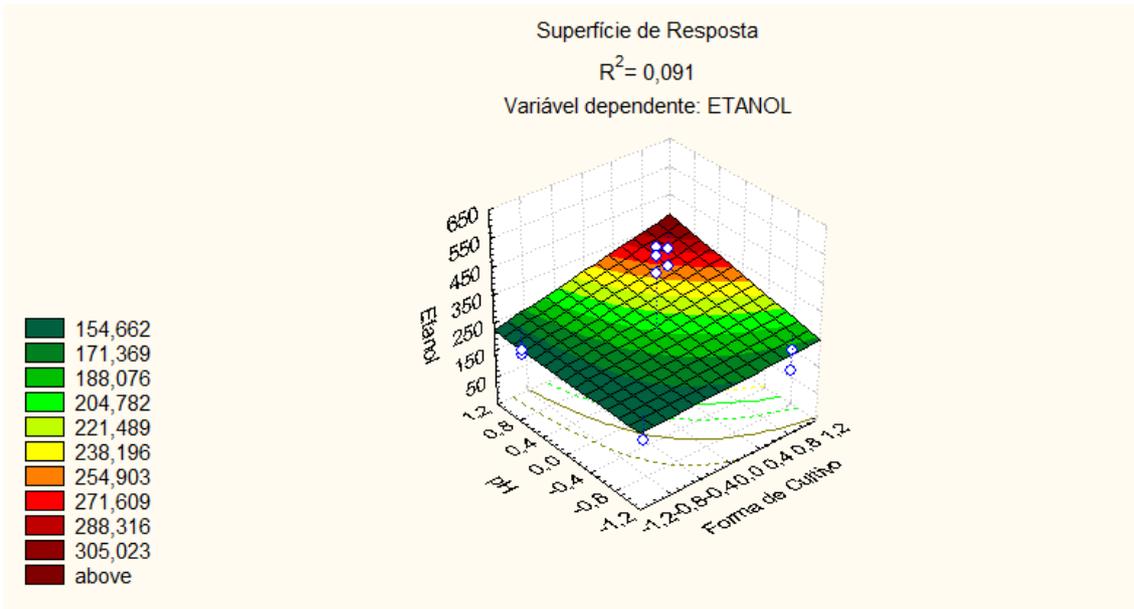


Figura 19: Concentração de etanol produzido por *Arthrobacter sp* em relação as variáveis pH e forma de cultivo.

Fonte: Própria.

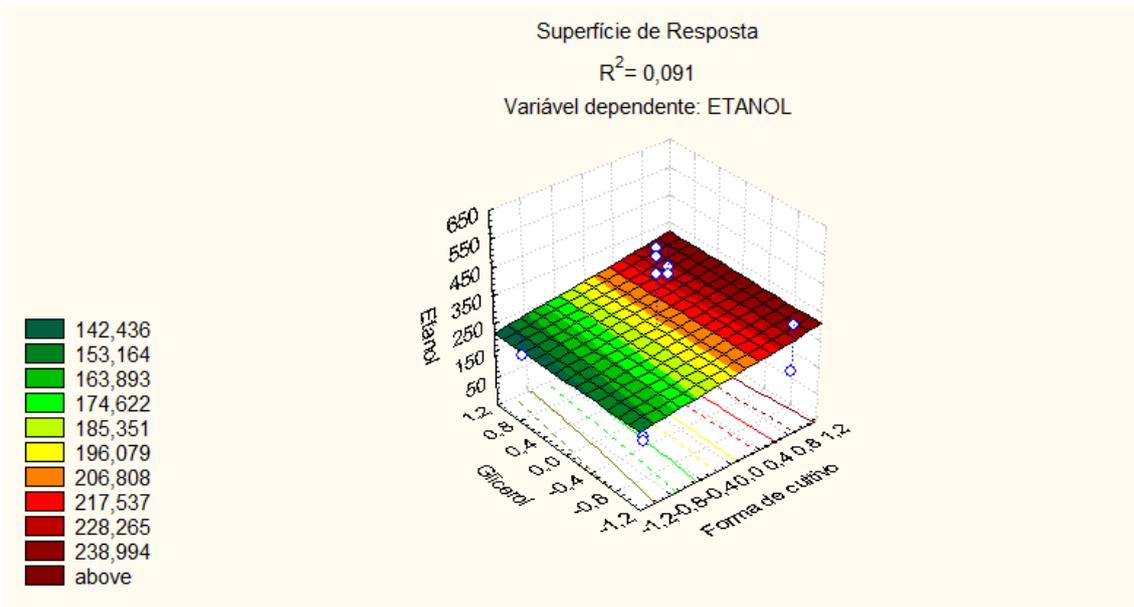


Figura 20: Concentração de etanol produzido por *Arthrobacter sp.* em relação as variáveis glicerol e forma de cultivo.

Fonte: Própria.

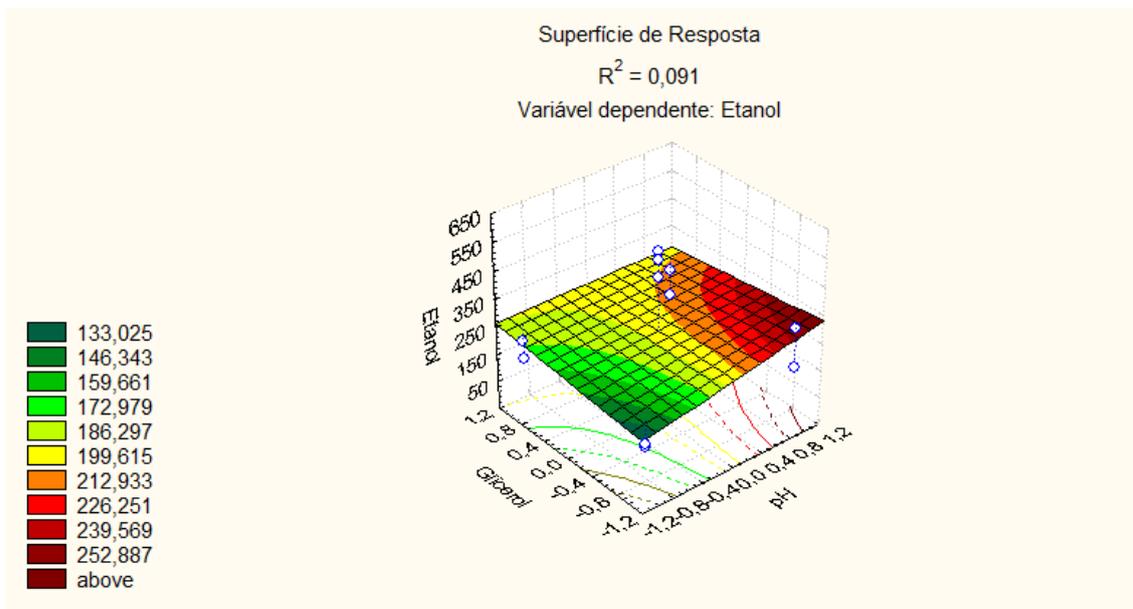


Figura 21: Concentração de etanol produzido por *Arthrobacter sp.* em relação as variáveis glicerol e pH

Fonte: Própria.

4.5 ANÁLISE DO CONSUMO DE GLICEROL BRUTO POR DIFERENÇA DE MASSA PARA *E. COLI*

Considerando a metodologia descrita no item 3.6.2.3 foram determinadas as porcentagens de glicerol consumido nas amostras nos respectivos tempos para bactéria *E. coli*, apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Consumo de glicerol bruto para a bactéria *E. coli*.

EXPERIMENTO	TEMPO (horas)		Consumo (%)
	0	72	
	Glicerol bruto (g)	Glicerol bruto (g)	
1	0,050	0,006	88,087
2	0,136	0,015	88,971
3	0,031	0,012	61,290

4	0,151	0,013	91,733
5	0,036	0,011	69,444
6	0,075	0,008	89,333
7	0,035	0,011	68,571
8	0,151	0,016	89,749
9	0,101	0,011	88,690
10	0,101	0,015	85,615
11	*	*	*

Fonte: Própria.

* Amostra insuficiente para análise.

4.6 ANÁLISE DO CONSUMO DE GLICEROL BRUTO POR DIFERENÇA DE MASSA PARA *ARTHROBACTER SP.*

Os resultados calculados para o consumo de glicerol bruto nos ensaios realizados com *Arthrobacter sp.* estão dispostos na tabela 6.

Tabela 6: Consumo de glicerol bruto para a bactéria *Arthrobacter sp.*

EXPERIMENTO	TEMPO (horas)		Consumo (%)
	0	72	
	Glicerol bruto (g)	Glicerol bruto (g)	
1	0,050	0,018	64,286
2	0,075	0,014	81,333
3	0,050	0,018	64,286
4	0,151	0,024	84,127
5	0,050	0,015	70,238

6	0,151	0,013	91,402
7	0,050	0,010	80,159
8	0,151	0,018	88,095
9	0,033	0,005	84,848
10	0,101	0,016	84,127
11	0,101	0,017	83,135

Fonte: Própria.

Observando os resultados das tabelas 7 e 8, pôde verificar que o glicerol empregado nos experimentos, pode ter participado da rota bioquímica de transformação pelas bactérias em etanol.

Nota-se que para os ensaios que conduziram a uma maior produção de etanol (experimentos 9 de ambas bactérias), houve um elevado consumo de glicerol, reafirmando que as bactérias *E. coli* e *Arthrobacter sp.* se beneficiaram do substrato para conseqüente produção de etanol.

Comparando qualitativamente as bactérias *E. coli* e *Arthrobacter sp.*, conforme observa-se na figura 10, onde foram plotados o melhor resultado das fermentações de cada bactéria em relação a média de cada variável, evidencia-se que *Arthrobacter sp.* se caracteriza como um micro-organismo de alto potencial para produção de etanol a partir do glicerol nas condições estabelecidas neste trabalho.

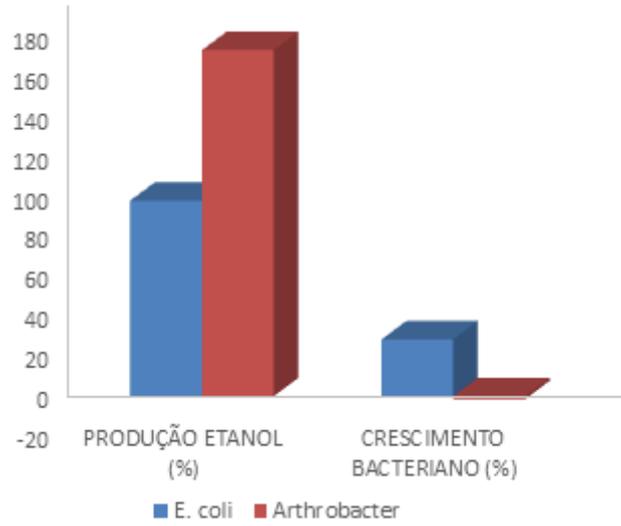


Figura 22: Análise do valor da variável em relação a média dos experimentos.

Fonte: Própria.

5 CONCLUSÃO

Com a presente pesquisa se concluiu que o glicerol, subproduto da indústria de biodiesel, pode ser transformado em um produto de maior valor agregado a partir da biofermentação bacteriológica.

O glicerol foi utilizado pelas bactérias, como fonte de carbono para a produção de etanol. Os micro-organismos estudados, *E. coli* e *Arthrobacter sp.*, desenvolveram-se metabolicamente nos meios de cultivos e sob as faixas de pH, concentração de glicerol e agitação propostos, apontando a eficiência do método.

Concluiu-se que *Arthrobacter sp.* caracteriza-se como um micro-organismo de alto potencial para produção de etanol a partir do glicerol, nas condições estabelecidas neste trabalho.

Os resultados apresentados podem garantir o ponto de partida para novos estudos neste segmento, observando que as análises estatísticas evidenciaram que ampliando as faixas de variação dos fatores independentes, como pH e concentração de glicerol, pode-se obter resultados mais significativos em relação à produção de etanol. Além disso, nota-se que podem ser avaliadas outras variáveis controláveis que interfiram diretamente no ciclo das bactérias, como valores diferentes de temperatura do meio de cultivo e aeração.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, Felipe A.F.; TABUCHI, Stephanie C. T.; MELISSI, Thais S. S.. **Condições de Pré Tratamento do Glicerol proveniente da produção de biodiesel utilizando planejamento experimental PlackettBurman.** In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA, 15., 2010, São José dos Campos. Artigo Científico. Lorena: Eel, 2011. p. 1 - 5. Disponível em: <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2011/anais/arquivos/0236_0543_01.pdf>. Acesso em: 13 out. 2014.

ARAUJO, Lidiane S. **Estudo de oxidoreductase da Arthrobactersp. isolada de sedimento marinho antártico.**2010. Tese (Pós-Doutorado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, 2014. Disponível em: <<file:///D:/Meus%20Documentos/Downloads/TeseCorrigidaLidianeSilvaAraujo.pdf>> . Acesso em : 06 jun. 2015.

BARBOSA, Claudio R. **Avaliação do Glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para a produção de endotoxinas por BacillusThuringiensis var. Israelens.** 2009. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-26092012-155413/en.php>> . Acesso em: 22 out. 2014.

BARROS, Aildil J. S.; LEHFELD, Neide A. S. **Fundamentos de Metodologia Científica: Um guia para a iniciação científica.** 2. ed. São Paulo: Pearson, 2000. Acesso em: 22 out.. 2014.

BARROS, Geraldo S. C.; SILVA, Ana Paula; PONCHIO, Leandro A. **Custos de Produção de Biodiesel no Brasil.** Revista de Política Agrícola, Brasília, v. 1, n. 3, p.36-50, jul. 2006. Acesso em: 15 out. 2014.

BEATRIZ, Adilson; ARAUJO, Yara J. K.; LIMA, Denis P. **Glicerol: Um breve histórico e aplicação em sínteses estereoseletivas.** Química Nova, São Paulo, v. 34, n. 2, p.306-319, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v34n2/25.pdf>> . Acesso em: 22 out. 2014.

CORRÊA, Fernando A. F. **Características dos Patótipos de E. coli e implicações e E. coli patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos.** 2012. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012. Disponível em: <http://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/Ferando_Augusto_1c.pdf?1349206212 > . Acesso em: 13 out. 2014.

COSTA, Janaina B. **Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir do glicerol da reação de formação de biodiesel.** 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. Disponível em:

<<http://oatd.org/oatd/record?record=handle%5C:10183%5C%2F25509> > . Acesso em: 5 nov. 2014.

FRANCO, Robson M. **Escherichia Coli: ocorrência em suínos abatidos na grande rio e sua viabilidade experimental em lingüiçafrescal tipo toscana.** 2002. 153 f. Tese(Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2002.Disponível em: <http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/robson_franco_completa_doutorado.pdf > . Acesso em: 5 nov. 2014.

GIL, Antonio Carlos. **Como elaborar projetos de pesquisa.** São Paulo. Atlas. 2 ed. 1989

LUCATELLI, Adriana. **Comportamento de *Escherichia coli* produtora de toxina de shiga em meios ácidos.** 2009. 22 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Sp, 2009.

MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.I.; LAGE, A.P. **Detecção de cepas patogênicas pela pcr multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarréicos.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p.1-7, out. 2007.Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352007000500005&script=sci_arttext > . Acesso em: 12 nov. 2014.

MENDES, Danylo B.; SERRA, Juan C. V. **Glicerina: Uma Abordagem Sobre a Produção o Tratamento.** Revista Liberato, Novo Hamburgo, V. 13, N. 20, P.59-67, Dez. 2012.Disponível em: <<http://gaia.liberato.com.br/ojs/index.php/revista/article/viewFile/186/176> > . Acesso em: 5 nov. 2014.

MIN, Y. N.; YAN, F.; LIU, F. Z..**Glycerin: A new energy source for poultry.** International Journal Of Poultry Science, Arkansas (usa), v. 9, n. 1, p.1-4, jan. 2010. Disponível em: < <http://www.pjbs.org/ijps/fin1627.pdf?3e3ea140> > . Acesso em: 13 out. 2014.

MOTA, Claudio J. A.; SILVA, Carolina X. A. da; GONCALVES, Valter L. C..**Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção do biodiesel.** Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 3, p.639-648, mar. 2009.Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n3/a08v32n3.pdf>> . Acesso em: 29 out. 2014.

MONTIBELLER, M.J.; MILLÉO, D.A. Isolamento e Seleção de Micro-organismos produtores de Biopolímeros. XIX Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR, Medianeira-PR, nov.2014.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C; CALADO, V.; **Estatística Aplicada e probabilidade para engenheiros**, 2ed., LTC, 2008.

NEIDHARDT FC, INGRAHAM JL, SCHAECHETER M. 1990. **Physiology of the bacterial cell- a molecular approach**. Sinauer Associates (Eds.). Massachusets. Disponível

em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/6912/11/Cap%C3%ADtulo2-Revis%C3%A3o%20Bibliogr%C3%A1fica%289%29.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2015.

OLIVEIRA, Silvio Luiz de. **Metodologia científica**. São Paulo. 202. 282 p.

PIACENTE, Erik A. **Perspectivas do Brasil no mercado internacional de etanol**. 2006. 173 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Planejamento de Sistemas Energéticos, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica, Campinas, 2006. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000380548>> . Acesso em: 22 out. 2014.

PIZZOL, Rosa A.; FERRAZ, Fernando T. **Riqueza e exclusão social: o paradoxo dos royalties do petróleo**. Revista Produção Online, Florianópolis, v. 10, n. 1, p.771-794, Dez. 2009. Disponível em: <<http://www.producaoonline.org.br/rpo/article/download/379/538>> . Acesso em: 15 out. 2014.

RODRÍGUEZ, Miguel A. A. **Biotransformação do Glicerol: Subproduto da produção de Biodiesel**. 2010. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010. Disponível em: <<http://nou-rau.uem.br/nou-rau/document/?code=vtls000207793>> . Acesso em: 13 out. 2014.

SÁ, Tatiana N. M. **Produção de ácido cítrico utilizando glicerol residual da produção de biodiesel como substrato**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/1474/1/2011_dis_tnmsa.pdf> . Acesso em: 13 out. 2014.

SANTOS, Daniele G. **Cultivo de bactérias da rizosfera da cana-de-açúcar e a interferência dos exsudatos da planta em seu desenvolvimento**. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2014. Disponível em: <file:///D:/Meus%20Documentos/Downloads/Danielle_Goncalves_dos_Santos.pdf> . Acesso em: 06 jun. 2015.

SANTOS, Diego T.; SARROUH, Boutros F.; SANTOS, Júlio C. **Potencialidades e Aplicações Da Fermentação Semi-Sólida em Biotecnologia**. Janus, Lorena, v. 4, n. 3, p.164-183, jul. 2006. Disponível em: <<http://publicacoes.fatea.br/index.php/janus/article/viewArticle/44>>. Acesso em: 13 nov. 2014.

SCARMINIO, Ieda Spacino. Como fazer experimentos. São Paulo: Livro Texto, 2001.

SCHMIDELL, Willibaldo. **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Blücher, 2001.

SILVA, Neusely; SILVEIRA, Neline F. A.; YOKOYA, Fumio. **Ocorrência de Escherichia coli 0157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras**. Food Science And Technology, Campinas, v. 23, n. 2, p.1-9, ago. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612003000200011> .Acesso em: 12 nov. 2014.