



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**SÍNTESE, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS
DE ORIGEM MICROALGAL PARA DESENVOLVIMENTO DE
NANOFIBRAS**

Eng^a. Roberta Guimarães Martins

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
ORIENTADOR

Prof^a. Dr^a. Michele Greque de Moraes
CO-ORIENTADORA

RIO GRANDE, RS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**SÍNTESE, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS
DE ORIGEM MICROALGAL PARA DESENVOLVIMENTO DE
NANOFIBRAS**

Eng^a. Roberta Guimarães Martins

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
doutor em Engenharia e Ciência de
Alimentos.

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
ORIENTADOR

Prof^a. Dr^a. Michele Greque de Moraes
CO-ORIENTADORA

RIO GRANDE, RS

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, se não fossem eles eu não estaria aqui e por todo apoio que sempre me deram.

Ao Lucas que muitas vezes tive que deixa-lo em segundo plano para poder terminar meus estudos.

Aos meus familiares e minha segunda família (agregados) pelo apoio e por torcerem e vibrarem com as minhas conquistas.

À minha dinda, por sempre acreditar e torcer pelas minhas vitórias.

Ao Igor e sua família, que sempre acreditaram no meu potencial e me apoiaram em todos os momentos de indecisão da vida.

Aos meus orientadores Jorge e Michele por terem me orientado, pelos conselhos, por acreditar no meu potencial e me fazer crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao grupo de PHB, Bruna, Juliana, Carolina, Mariana, Aline e Kamila, pelo aprendizado e ajuda a cada dia.

Aos iniciantes científicos Pâmela, Vitor, Igor, Cecília, Vagner, Ana Luíza e Jéssica, por terem me ajudado durante os experimentos e muitas vezes me substituírem por eu não estar presente.

Ao colegas do LEB, Ana Claudia, Adriano, Luíza, Gabriel, Joice, Roque, Cris, Célia, Aninha, Lucielen, Ana Paula, Gustavo, Barbara, Etiele, Lisiane e demais pela disposição de ajudar em vários momentos e pelos momentos de distração.

Aos colegas que não estão mais no LEB ou que pertencem a outros laboratórios, Lúcia, Felipe, Élide, Sandri, Wiliam, Chico, Vanessa, César, Cris, Rodi, Fabrício, Ricardo, Inajara e demais, pelos conhecimentos adquiridos e momentos de descontração.

À Islanda por entender as minhas correrias e estar sempre disposta a ajudar.

Aos colegas do IFRS que estavam sempre me perguntando se eu já era doutora.

Aos amigos Muriel, Bernardo, Simone e Rodrigo por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim, pelos momentos de alegria e amizade.

Aos amigos Rafael, Rodrigo, Vanessa, Isadora, Lorena e Henrique por me receberem como irmã emprestada.

Às professoras Glaucia e Patricia e suas equipes por me receberem em seus laboratórios.

Aos colegas do ENGEBIO que me receberam de braços abertos e me ensinaram muito sobre PHB.

A FURG pelo ensino gratuito e ao povo brasileiro por pagar seus impostos para permitir este estudo.

A CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO GERAL

Pesquisas com microalgas estão crescendo devido aos possíveis bioprodutos oriundos de sua biomassa, bem como as suas diferentes aplicabilidades. Microalgas podem ser cultivadas para a produção de biopolímeros com características de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Nanofibras produzidas por *electrospinning* a partir de poli- β -hidroxibutirato (PHB) geram produtos com aplicabilidade na área de alimentos e médica. O objetivo deste trabalho foi selecionar microalgas com maior potencial para síntese de biopolímeros, em diferentes meios de cultivo, bem como purificar poli- β -hidroxibutirato e desenvolver nanofibras. Este trabalho foi dividido em cinco artigos: (1) Seleção de microalgas produtoras de biopolímeros; (2) Produção de biopolímeros pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 em cultivo com diferentes fontes de carbono e redução de nitrogênio; (3) Síntese de biopolímeros pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 em cultivos autotróficos e mixotróficos; (4) Purificação de poli- β -hidroxibutirato extraído da microalga *Spirulina* sp. LEB 18; e (5) Produção de nanofibras a partir de poli- β -hidroxibutirato de origem microalgal. Foram estudadas as microalgas *Cyanobium* sp., *Nostoc ellipsosporum*, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans*. Os biopolímeros foram extraídos nos tempos de 5, 10, 15, 20 e 25 d de cultivo a partir de digestão diferencial. Para os experimentos com diferentes nutrientes, foi utilizado como fonte de carbono, bicarbonato de sódio, acetato de sódio, glicose e glicerina modificando-se as concentrações de nitrogênio e fósforo. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores fechados de 2 L. A concentração inicial de inóculo foi $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ e os ensaios foram mantidos em estufa termostatizada a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ com iluminância de $41,6 \mu\text{mol}_{\text{fótons}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12 h claro/escuro. Para a purificação de PHB, foi utilizada a biomassa da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, cultivada em meio Zarrouk. Após a extração do biopolímero bruto, a amostra foi desengordurada com hexano e purificada com 1,2-carbonato de propileno. Foram determinadas as purezas e as propriedades térmicas no PHB purificado. O biopolímero utilizado para produzir as nanofibras apresentava 70 % de pureza. A técnica para produção de nanofibras foi o *electrospinning*. As microalgas que apresentaram máxima produtividade foram *Nostoc ellipsosporum* e *Spirulina* sp. LEB 18 com rendimento de biopolímero 19,27 e 20,62 % em 10 e 15 d, respectivamente, na fase de máximo crescimento celular. O maior rendimento de biopolímeros (54,48 %) foi obtido quando se utilizou $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 , $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 . A condição que proporcionou maior pureza do PHB foi a $130 \text{ }^\circ\text{C}$ e 5 min de contato entre o solvente (1,2-carbonato de propileno) e o PHB. As análises térmicas para todas as amostras foram semelhantes em relação ao PHB padrão (Sigma-Aldrich). A purificação com 1,2-carbonato de propileno foi eficiente para o PHB extraído de microalga, alcançando pureza acima de 90 %. A condição que apresentou menores diâmetros de nanofibras foi ao utilizar solução contendo 20 % de biopolímero solubilizado em clorofórmio. As condições do *electrospinning* que apresentou nanofibras com diâmetros de 470 e 537 nm foram, vazão $150 \mu\text{L.h}^{-1}$, diâmetro do capilar 0,45 mm e voltagens entre 24,1 e 29,6 kV, respectivamente. A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 produz PHB ao utilizar menores concentrações de nutrientes no meio de cultivo, que pode ser purificado com 1,2-carbonato de propileno. Este biopolímero possui aplicabilidade para produção de nanofibras.

Palavras-chave: carbono, *electrospinning*, nitrogênio, *Spirulina*, 1,2-carbonato de propileno.

ABSTRACT

Research with microalgae are increasing due to their byproducts and different applicability. Cyanobacteria can be cultivated for the production of biopolymers that are biocompatible and biodegradable. Nanofibres produced by electrospinning from poly- β -hydroxybutyrate (PHB) generate fibers with applications in the areas of food and health. The aim of this study was to determine which microalgae and cultivation conditions attained the highest biopolymers concentrations, to purify the extracted biopolymer PHB and to develop PHB nanofibers. The work was shared in five articles: (1) selection of microalgae that produce biopolymers; (2) biopolymer production by *Spirulina* strain LEB 18 in culture with different sources of carbon and reduced nitrogen; (3) biopolymer synthesis by *Spirulina* strain LEB 18 in autotrophics and mixotrophics cultures; (4) purification of poly- β -hydroxybutyrate extracted from *Spirulina* strain LEB 18; and (5) production of nanofibers from purified poly- β -hydroxybutyrate from microalgae. The microalgae *Cyanobium* strain, *Nostoc ellipsosporum*, *Spirulina* strain LEB 18 and *Synechococcus nidulans*, were studied. The biopolymers were extracted at 5, 10, 15, 20 and 25 d of culture by differential digestion. For the experiments with different nutrients sodium bicarbonate, sodium acetate, glucose, and glycerin were used as carbon sources, and the concentrations of nitrogen and phosphorus were varied. The cultivation was carried out in 2 L closed photobioreactors. The initial inoculum concentration was 0.15 g L^{-1} and the tests were kept in a temperature controlled oven at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ with illuminance of $41.6 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and photoperiod of 12 h light/dark. To purify the PHB biomass from *Spirulina* strain LEB 18, cultured in Zarrouk medium, was used and the extraction was performed with sodium hypochlorite. The sample was defatted with hexane and purified with 1,2- propylene carbonate. For the purified PHB samples thermal properties and purity were determined. The biopolymer used to produce nanofibers was purified over 70 %. The technique for producing nanofibers was electrospinning, which involves using high voltage in the polymer solution. Microalgae that showed the maximum productivity were *Nostoc ellipsosporum* and *Spirulina* strain LEB 18 with biopolymer yield of 19.27 and 20.62 % at 10 and 15 d, respectively, in the phase of maximum cell growth. The highest yield of biopolymers (54.48 %) was obtained when using $8.4 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, $0.05 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ and $0.1 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$. The thermal analysis for all samples were similar with respect to the standard PHB (Sigma-Aldrich).The highest purity of PHB was attained using 1,2-propylene carbonate at $130 \text{ }^\circ\text{C}$ and contact time with the solvent of 5 min. Purification with 1,2-propylene carbonate was effective for PHB, increasing purity above 90 %. The lowest fiber diameters were obtained using 20 % of biopolymer dissolved in chloroform, a flow of $150 \mu\text{L h}^{-1}$, a capillary diameter of 0.45 mm and different voltages of 24.1 and 29.6 kV. These conditions produced fibers with diameters of 470 and 537 nm, respectively. The *Spirulina* sp. LEB 18 produces PHB to use lower concentrations of nutrients in the culture medium, which can be purified with 1,2-propylene carbonate. This biopolymer has applicability for the production of nanofibers.

Key words: carbon, electrospinning, nitrogen, *Spirulina*, 1,2-propylene carbonate.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1: SELEÇÃO DE MICROALGAS PRODUTORAS DE BIOPOLÍMEROS

Tabela 1 – Composição dos meios de cultivo das microalgas.....	53
Tabela 2 – Rendimento de biopolímeros bruto (% , m/m*) para as microalgas em diferentes tempos de cultivo.	57
Tabela 3 – Produtividade de biopolímeros bruto ($P_{bb} - g_{bp}.L^{-1}.d^{-1}$) para as microalgas em diferentes tempos de cultivo.	58

ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS PELA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18 EM CULTIVOS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E REDUÇÃO DE NITROGÊNIO

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk.....	68
Tabela 2 – Concentração celular máxima ($X_{máx}$, $g.L^{-1}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$, d^{-1}), produtividade celular máxima ($P_{máx}$, $g.L^{-1}.d^{-1}$) e rendimento de biopolímeros bruto (η , % $g_{biopolímero}.g_{biomassa}^{-1}$) extraído da cianobactéria <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivadas com diferentes fontes de carbono ($g.L^{-1}$).....	74

ARTIGO 3: SÍNTESE DE BIOPOLÍMEROS PELA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18 EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk.....	84
Tabela 2 – Concentração celular máxima ($X_{máx}$), produtividade celular máxima ($P_{máx}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) e rendimento de biopolímeros bruto (η) a partir do delineamento experimental fatorial completo 2^2 ao utilizar a microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 com $8,4 g.L^{-1}$ de bicarbonato de sódio.....	89
Tabela 3 – Concentração celular máxima ($X_{máx}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$), produtividade celular máxima ($P_{máx}$) e rendimento de biopolímeros bruto (η) a partir do delineamento experimental fatorial completo 2^2 ao utilizar a microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 com $2,44 mL.L^{-1}$ de glicerina.....	90

ARTIGO 4: PURIFICAÇÃO DE POLI- β -HIDROXIBUTIRATO EXTRAÍDO DA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk.....	101
---	-----

Tabela 2 – Tempo de contato do biopolímero bruto com o hexano (T, h), volume de hexano utilizado para a extração (V, mL), perda de massa lipídica (P_{ml} , %), pureza do biopolímero (P_u , %), perda de massa (P_m , %), temperatura inicial de degradação (T_0 , °C), temperatura de máxima degradação ($T_{máx}$, °C), temperatura final de degradação (T_f , °C), temperatura de fusão (T_m , °C) para o PHB purificado da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e desengordurado sob diferentes condições.	104
Tabela 3 – Tempo de contato do biopolímero com o solvente (T, min), pureza do biopolímero (P_u , %), perda de massa (P_m , %), temperatura inicial de degradação (T_0 , °C), temperatura de máxima degradação ($T_{máx}$, °C), temperatura final de degradação (T_f , °C), temperatura de fusão (T_m , °C) para o PHB extraído da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 ao utilizar temperatura de 130 °C na cinética de purificação.	105

ARTIGO 5: PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS A PARTIR DE POLI- β -HIDROXIBUTIRATO DE ORIGEM MICROALGAL

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk.	119
Tabela 2 – Diâmetro das fibras desenvolvidas pelo processo de <i>electrospinning</i> em diferentes condições.	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	30
Figura 2 – Microalga <i>Synechococcus nidulans</i>	30
Figura 3 – Microalga <i>Cyanobium</i>	31
Figura 4 – Microalga <i>Nostoc ellipsosporum</i>	32
Figura 5 – Via metabólica para produção de poli-β-hidroxi- <i>butirato</i>	37
Figura 6 – Diagrama esquemático do processo de <i>electrospinning</i>	40

ARTIGO 1: SELEÇÃO DE MICROALGAS PRODUTORAS DE BIOPOLÍMEROS

Figura 1 – Curvas de crescimento das microalgas <i>Cyanobium</i> sp. (a), <i>Nostoc ellipsosporum</i> (b), <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (c) e <i>Synechococcus nidulans</i> (d) com 5 (■), 10 (●), 15 (▲), 20 (◆) e 25 (+) d de cultivo.	56
--	----

ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS PELA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18 EM CULTIVOS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E REDUÇÃO DE NITROGÊNIO

Figura 1 – Curvas de crescimento da cianobactéria <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em função do tempo para os experimentos realizados com redução de nitrogênio (0,25 g.L ⁻¹) em meio de cultivo contendo: bicarbonato de sódio (16,8 g.L ⁻¹) e glicose (a), bicarbonato de sódio (16,8 g.L ⁻¹) e acetato de sódio (b), glicose (c) e acetato de sódio (d). As concentrações de glicose e acetato de sódio variaram em 0,2 g.L ⁻¹ (+), 0,4 g.L ⁻¹ (■) e 0,6 g.L ⁻¹ (●).	72
Figura 2 – Curvas de crescimento da cianobactéria <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em função do tempo para os experimentos com meio de cultivo contendo redução de nitrogênio (0,25 g.L ⁻¹) e bicarbonato de sódio nas concentrações: 8,4 g.L ⁻¹ (+), 16,8 g.L ⁻¹ (■), 25,2 g.L ⁻¹ (●) e meio Zarrouk padrão (▲).	73

ARTIGO 3: SÍNTESE DE BIOPOLÍMEROS PELA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18 EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

Figura 1 – Curvas de crescimento da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (a), concentração de NaHCO ₃ (b), concentração de NaNO ₃ (c) e concentração de K ₂ HPO ₄ (d) em meio de cultivo Zarrouk com 8,4 g.L ⁻¹ de NaHCO ₃ . Experimento 1 - 0,05 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ e 0,1 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ (●), Experimento 2 - 0,05 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ e 0,9 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ (■),	
---	--

Experimento 3 - 2,5 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ e 0,1 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ (▲), Experimento 4 - 2,5 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ e 0,9 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ (◆) e Experimentos 5, 6 e 7 (triplicata) - 1,225 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ e 0,5 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ (+).....	88
Figura 2 – Gráfico de pareto do delineamento experimental fatorial completo 2 ² quando se utilizou 8,4 g.L ⁻¹ de bicarbonato de sódio como fonte de carbono.	89
Figura 3 – Curvas de crescimento da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (a), concentração de glicerina (b), concentração de NaNO ₃ (c) e concentração de K ₂ HPO ₄ (d) em meio de cultivo Zarrouk com 2,44 mL.L ⁻¹ de glicerina. Experimento 1 - 0,05 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ e 0,1 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ (●), Experimento 2 - 0,05 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ e 0,9 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ (■), Experimento 3 - 2,5 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ e 0,1 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ (▲), Experimento 4 - 2,5 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ e 0,9 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ (◆) e Experimento 5, 6 e 7 (triplicata) - 1,225 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ e 0,5 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ (+).	91
Figura 4 – Gráfico de pareto do delineamento experimental fatorial 2 ² quando se utilizou 2,44 mL.L ⁻¹ de glicerina como fonte de carbono.	92

ARTIGO 4: PURIFICAÇÃO DE POLI-β-HIDROXIBUTIRATO EXTRAÍDO DA MICROALGA *Spirulina* sp.LEB 18

Figura 1 – Análise termogravimétrica (TGA) do PHB purificado em diferentes tempos e volumes de hexano. 1 h com 1:50 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), 2 h com 1:25 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), 2 h com 1:50 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), PHB padrão (---).	104
Figura 2 – Análise térmica diferencial (DTA) do PHB purificado em diferentes tempos e volumes de hexano. 1 h com 1:50 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), 2 h com 1:25 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), 2 h com 1:50 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), PHB padrão (---).	105
Figura 4 – Análise térmica diferencial (DTA) da cinética de purificação do PHB a temperatura de 130 °C com 1,2-carbonato de propileno e do PHB padrão e tempo de contato do solvente com a amostra de: 45 min (---), 30 min (---), 15 min (---), 5 min (---) e PHB padrão (---).....	106
Figura 5 – Análise termogravimétrica (TGA) da cinética de purificação do PHB a temperatura de 150 °C com 1,2-carbonato de propileno e do PHB padrão e tempo de contato do solvente com a amostra de: 30 min (---), 15 min (---), 5 min (---) e PHB padrão (---).	107

Figura 6 – Análise térmica diferencial (DTA) da cinética de purificação do PHB a temperatura de 150 °C com 1,2-carbonato de propileno e do PHB padrão e tempo de contato do solvente com a amostra de: 30 min (---), 15 min (---), 5 min (---) e PHB padrão (---).....	108
Figura 7 – Análise termogravimétrica (TGA) do PHB. Somente extraído com hipoclorito de sódio (---), extraído com hipoclorito de sódio e desengordurado com hexano (---) e extraído com hipoclorito de sódio, desengordurado com hexano e purificado com 1,2-carbonato de propileno (---).....	110
Figura 8 – Análise térmica diferencial (DTA) do PHB. Somente extraído com hipoclorito de sódio (---), extraído com hipoclorito de sódio e desengordurado com hexano (---) e extraído com hipoclorito de sódio, desengordurado com hexano e purificado com 1,2-carbonato de propileno (---).....	111

ARTIGO 5: PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS A PARTIR DE POLI- β -HIDROXIBUTIRATO DE ORIGEM MICROALGAL

Figura 1 – Imagens das nanofibras produzidas a partir de PHB purificado da cianobactéria <i>Spirulina</i> sp. LEB 18, visualizadas em microscópio digital, resultante das amostras 3 (a), 6 (b) e 7 (c).....	124
--	-----

NOMENCLATURA

- C_{bp} – Concentração de biopolímero ($g.L^{-1}$)
- C_{bb} – Concentração de biopolímero bruto ($g.L^{-1}$)
- CO_2 – Dióxido de carbono (gás carbônico)
- d - dias
- Fe – Ferro
- m_a – Massa da amostra (g)
- m_{bb} – Massa final de biopolímeros bruto (g)
- m_{ma} – Massa da biomassa microalgal (g)
- Mg - Magnésio
- N - Nitrogênio
- $NaHCO_3$ – Bicarbonato de sódio
- $NaNO_3$ – Nitrato de sódio
- O_2 – Oxigênio
- P – Fósforo
- P_{bb} – Produtividade de biopolímero ($g_{bp}.L^{-1}.d^{-1}$)
- P_c – Produtividade celular ($g.L^{-1}.d^{-1}$)
- PCL - Policaprolactona
- PE – Polietileno
- PET – Polietileno tereftalato
- PHA – Polihidroxialcanoato
- PHB – Polihidroxibutirato
- PHB-HV – Poli-hidroxibutirato-hidroxivalerato
- PLASTIVIDA – Instituto Sócio-Ambiental dos Plásticos
- P_m – Perda de massa (%)
- P_{ml} – Perda de massa lipídica (%)
- PP – Polipropileno
- PS – Poliestireno
- P_u – Pureza (%)
- PVC – Cloreto de polivinila
- t – Tempo (d)
- TCA – Ciclo tricarbóxico
- V – Volume (mL)

X – Concentração celular (g.L^{-1})

X_{max} – Concentração celular máxima (g.L^{-1})

η – Rendimento de biopolímeros bruto (%)

μ_{max} – Velocidade específica máxima de crescimento (d^{-1})

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	7
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
NOMENCLATURA.....	15
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL, OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	21
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	23
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3. JUSTIFICATIVA	25
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
1. Microalgas	29
1.1. Microalga <i>Spirulina</i>	29
1.2. Microalga <i>Synechococcus</i>	30
1.3. Microalga <i>Cyanobium</i>	31
1.4. Microalga <i>Nostoc</i>	31
2. Cultivo de Microalgas.....	32
2.1. Fatores que Influenciam no Cultivo de Microalgas	32
2.2. Fonte de Nutrientes	33
2.2.1. Fonte de Carbono	33
2.2.2. Fonte de Nitrogênio	33
2.2.3. Fonte de Fósforo.....	34
3. Fotossíntese.....	34
4. Polímeros	35
4.1. Biopolímeros	36
4.2. Poli- β -hidroxibutirato (PHB)	36
4.3. Degradação de Biopolímeros	38
5. Nanotecnologia	39
5.1. Nanofibras	39
5.2. <i>Electrospinning</i>	40

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ARTIGO 1: SELEÇÃO DE MICROALGAS PRODUTORAS DE BIOPOLÍMEROS	49
RESUMO	49
ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. Micro-organismos e Meio de Cultivo	52
2.2. Condições de Cultivo.....	53
2.3. Determinações Analíticas	53
2.4. Determinação da Produtividade de Biopolímeros Bruto	54
2.5. Extração de Biopolímeros Bruto	54
2.6. Análise Estatística.....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4. CONCLUSÃO.....	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS PELA MICROALGA <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 EM CULTIVOS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E REDUÇÃO DE NITROGÊNIO	65
RESUMO	65
ABSTRACT	65
1. INTRODUÇÃO.....	67
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	68
2.1. Micro-organismo e Meio de Cultivo	68
2.2. Condições de Cultivo.....	69
2.3. Determinações Analíticas	69
2.4. Determinação dos Parâmetros Cinéticos	69
2.5. Extração de Biopolímeros Bruto	70
2.6. Análise Estatística.....	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4. CONCLUSÃO.....	77
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ARTIGO 3: SÍNTESE DE BIOPOLÍMEROS PELA MICROALGA <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS	81
RESUMO.....	81
ABSTRACT.....	81
1. INTRODUÇÃO	83
2. MATERIAL E MÉTODOS	84
2.1. Micro-organismo e Meio de Cultivo.....	84
2.2. Condições de Cultivo	85
2.3. Determinações Analíticas.....	85
2.3.1. Concentração Celular	85
2.3.2. Concentração de Nutrientes.....	85
2.4. Determinação dos Parâmetros Cinéticos.....	86
2.5. Extração de Biopolímeros Bruto	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
3.1. Cultivos Autotróficos	87
3.2. Cultivos Mixotróficos	90
4. CONCLUSÃO	93
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ARTIGO 4: PURIFICAÇÃO DE POLI- β -HIDROXIBUTIRATO DA MICROALGA <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	97
RESUMO.....	97
ABSTRACT.....	97
1. INTRODUÇÃO	99
2. MATERIAL E MÉTODOS	100
2.1. Micro-organismo e Meio de Cultivo.....	100
2.2. Extração de Biopolímeros Bruto	101
2.3. Purificação de PHB	102
2.4. Determinação do PHB.....	102
2.5. Caracterização Térmica do PHB	103
2.5.1. Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA).....	103
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
3.1. Purificação de PHB	103
3.2. Padronização da Purificação de PHB	105

3.3. Comparação do PHB Bruto, Desengordurado e Purificado.....	110
4. CONCLUSÃO.....	111
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
ARTIGO 5: PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS A PARTIR DE POLI- β - HIDROXIBUTIRATO DE ORIGEM MICROALGAL	115
RESUMO	115
ABSTRACT	115
1. INTRODUÇÃO.....	117
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	118
2.1. Micro-organismo e Meio de Cultivo	118
2.2. Extração de Biopolímeros Bruto	119
2.3. Desengorduramento de Biopolímeros Bruto	120
2.4. Purificação do PHB	120
2.5. Determinação do PHB	120
2.6. Preparo das Soluções para o Electrospinning	121
2.7. Processo de Electrospinning	121
2.8. Caracterização das Fibras	121
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
4. CONCLUSÃO.....	125
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL.....	129
1. CONCLUSÃO GERAL	131
2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	131
CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

**CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL,
OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA**

1. INTRODUÇÃO GERAL

A biotecnologia ocupa posição de destaque no desenvolvimento de novos produtos, como os biopolímeros. Sua importância é reconhecida pelo seu caráter multidisciplinar, pois engloba o uso da microbiologia, da bioquímica e da engenharia.

Os polímeros são utilizados na maioria das indústrias para os mais variados fins, devido à sua resistência química, elasticidade e alta durabilidade. A desvantagem do uso dos polímeros petroquímicos é a dificuldade de degradação desse material no meio ambiente. A indústria alimentícia e de bebidas são as que utilizam maior quantidade deste polímero, sendo embalagens o setor que mais utiliza plástico, o qual geralmente são polímeros sintéticos de origem petroquímica.

A produção de polímeros oriundos de fontes não renováveis, como o petróleo, está crescendo cada vez mais e causando diversos problemas. Estes materiais, devido à disposição inadequada, causam inúmeros danos ambientais e podem proliferar espécies danosas ao ser humano.

Em geral, os polímeros biodegradáveis são derivados de produtos vegetais e animais, tais como a celulose, amido, quitina, entre outros, que ocorrem em grande abundância na natureza. Estes decompõem-se em componentes mais simples pela atividade dos micro-organismos ao entrar em contato com o solo, umidade, ar e luz solar. Ao contrário do que ocorre com os polímeros petroquímicos, que permanecem por longo período sem sofrer alteração.

Dentre as diferentes fontes alternativas para a produção de polímeros biodegradáveis, as microalgas se destacam, pois seu cultivo não demanda grandes áreas de terra e pode ocupar locais impróprios para a agricultura, não competindo com a produção de alimentos. As microalgas necessitam de menores quantidades de água, podendo esta ser salina, alcalina, ou até mesmo residual.

Os biopolímeros produzidos pelas microalgas podem ser utilizados para a produção de nanofibras para aplicação, principalmente, na indústria alimentícia e na área médica. As nanofibras podem exibir funcionalidades nas propriedades mecânicas, elétricas e térmicas dos produtos. Os biopolímeros auxiliam na redução da poluição ambiental e ao mesmo tempo podem ser utilizados para melhoramento de embalagens alimentícias e propriedades dos alimentos com a incorporação de nanofibras (WEISS et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Selecionar microalgas com maior potencial para síntese de biopolímeros, em diferentes condições de cultivo, bem como purificar poli- β -hidroxibutirato e desenvolver nanofibras.

2.2. Objetivos Específicos

1- Selecionar microalgas produtoras de biopolímeros, assim como estudar a fase de crescimento celular em que ocorre a máxima produção;

2- Estimular a síntese de biopolímeros a partir da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, cultivada com diferentes fontes de carbono e redução de nitrogênio;

3- Estudar a produção de biopolímeros a partir da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, cultivada com bicarbonato de sódio e glicerina e diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo;

4- Purificar e caracterizar o poli- β -hidroxibutirato sintetizado a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18;

5- Produzir nanofibras a partir de poli- β -hidroxibutirato de origem microalgal.

3. JUSTIFICATIVA

Os crescentes desastres climáticos que estão ocorrendo demonstram a necessidade de diminuir a poluição ambiental. Ao mesmo tempo, novas tecnologias são necessárias para a implantação de materiais biodegradáveis, que sejam produzidos e consumidos sem agressão ao meio ambiente. A maior parte do lixo polimérico é depositada em aterros sanitários. Devido à sua prolongada degradação, esse lixo compromete a circulação de gases e líquidos, dificultando a estabilização das áreas dos aterros.

Levando em consideração os prejuízos ambientais associados ao uso dos polímeros convencionais, é necessário desenvolver novas tecnologias a fim de minimizar este problema. Pesquisas voltadas para a melhoria da qualidade de vida levam à busca por plásticos descartáveis que não danifiquem o meio ambiente, tendo como solução os polímeros biodegradáveis.

Segundo a PLASTIVIDA (Instituto Sócio-Ambiental dos Plásticos), o Brasil descarta anualmente, 2,2 milhões de toneladas de plásticos pós-consumo. Apenas 17,2 % destes resíduos são reciclados. A Alemanha, país líder em reciclagem na Europa, recicla 32,1 %.

A utilização de polímeros biodegradáveis é uma das alternativas para redução da poluição que está sendo gerada pelos plásticos petroquímicos. Outro fator que alerta para a necessidade de se produzir os biopolímeros biodegradáveis, é que o polímero convencional tem origem a partir de um recurso não renovável, o petróleo, enquanto que os polímeros biodegradáveis são obtidos a partir de substratos renováveis (LIMA et al., 2001).

Os plásticos biodegradáveis são polímeros que se degradam completamente pelo ataque de micro-organismos em curto período de tempo. Além de serem biodegradáveis apresentam características na área médica de biocompatibilidade com células e tecidos e são produzidos a partir de recursos renováveis e possuem propriedades termoplásticas e características físicas e mecânicas semelhantes ao polipropileno (KONAGESLI Jr., 2009). Trata-se de polímeros que se decompõem sob a ação do sol, da umidade do ar, em prazos que variam de poucos meses até cinco anos.

Os polímeros biodegradáveis podem ser produzidos por microalgas. Estas são capazes de produzir um tipo de poli-hidroxialcanoato (PHA), como o poli- β -hidroxibutirato (PHB), quando cultivada em condições diferenciadas de seus nutrientes, como excesso de carbono e limitação de nitrogênio e fósforo. As microalgas podem contribuir para redução dos

gases responsáveis pelo efeito estufa, como gás carbônico (CO₂), pois apresentam a capacidade de biofixar o CO₂ como fonte de carbono para o seu crescimento.

O PHB também pode ser utilizado no desenvolvimento de nanofibras pelo método de *electrospinning*. Em função do pequeno diâmetro, em escala nano ou micro, grande comprimento e superfície de contato, as nanofibras possuem potenciais aplicações em embalagens para alimentos, nanocompostos, materiais para roupas, biosensores poliméricos condutivos, nanoeletrônicos, membranas hidrofóbicas, membranas filtrantes, nanocatálises e suportes para engenharia de tecidos (RAMAKRISHNA et al., 2005).

Neste sentido, o crescimento microalgal visa à redução de algumas fontes de nutrientes no meio de cultivo para a produção de biopolímeros, bem como utilizar para o desenvolvimento de nanofibras.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pesquisa o cultivo de microalgas desde 1996. Já foram estudados substratos alternativos para o crescimento, configurações de biorreatores e modos de cultivo, efeito de fatores como temperatura, iluminância, taxa de renovação e concentração de corte no crescimento e composição da biomassa de *Spirulina*. O sul do Brasil apresenta uma potencialidade para o cultivo de *Spirulina* para a produção de biopolímero como o PHB entre outros produtos, devido à alcalinidade da água da Lagoa Mangueira.

A partir de uma parceria entre o LEB, empresas, prefeituras e organizações não governamentais, foi construída a maior planta de produção de microalgas no país. Esta planta opera, desde 2004, no extremo sul do Brasil, às margens da Lagoa Mangueira, possuindo 3 biorreatores de 15 m³, com uma produção mensal de 50 – 70 kg de biomassa.

Em 2007, o LEB (FURG) em parceria com as universidades UFRGS (Brasil) e Philipps University (Alemanha) começaram os estudos a cerca da produção de biopolímeros e desenvolvimento de nanofibras. O presente trabalho busca aprimorar a síntese de novos produtos a partir de microalgas, com a produção de biopolímeros e sua aplicação em nanofibras, dando continuidade ao trabalho de Morais (2008).

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Microalgas

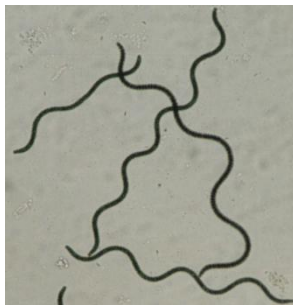
Microalgas são micro-organismos fotossintéticos, eucarióticos ou procarióticos, geralmente unicelulares, gram-negativos, coloridos devido à presença dos pigmentos fotossintéticos e vivem, em sua maioria, em ambientes aquáticos (OLAIZOLA, 2003; TOMASELLI, 1997). As microalgas procarióticas recebem o nome de cianobactérias. As estruturas celulares e o mecanismo para a fotossíntese nestes organismos são semelhantes aos dos vegetais superiores (LEHNINGER et al., 1995). As cianobactérias foram os primeiros organismos fototróficos emissores de oxigênio, sendo responsável pela conversão da atmosfera terrestre anóxica em óxica (MADIGAN et al., 2010). Para a produção de biomassa com determinadas características desejadas, a composição do meio de cultivo é um fator fundamental. A deficiência de nutrientes no meio pode fazer com que as microalgas adaptem seu metabolismo à nova condição (MATA et al., 2010).

As microalgas são utilizadas como suplemento alimentar na dieta humana (MORAIS et al., 2006) e animal (VONSHAK, 1997). Alguns cultivos são empregados no tratamento de efluentes (VALDERRAMA et al., 2002) e para fixação de gás carbônico e gases de combustão (RADMANN et al., 2011; ROSA et al., 2011). A biomassa de microalga foi pesquisada para utilização pelo potencial antitumoral (LOPES et al., 2004) e hipocolesterolêmico (COLLA et al., 2008) e também pode ser utilizada como fonte de biocombustíveis (SUALI; SARBATLY, 2012; ANDRADE, 2009), para produção de biopolímeros (LAYCOCK et al., 2014; MORAIS, 2008), produção de nanofibras (MORAIS et al., 2010), entre outros bioprodutos.

1.1. Microalga *Spirulina*

A microalga *Spirulina* (Figura 1) é uma cianobactéria filamentosa, que forma tricomas cilíndricos multicelulares, com 1 a 12 μm de diâmetro e se dispõem na forma espiralada, com até 1 mm de comprimento. A forma dos tricomas pode mudar em função de fatores ambientais e físico-químicos de cultivo como, meio de cultura e temperatura e cepa microalgal (VONSHAK, 1997). A maioria das espécies vive em ambientes perifíticos e bentônicos (BICUDO; MENEZES, 2006).

Figura 1 – Microalga *Spirulina* sp. LEB 18.



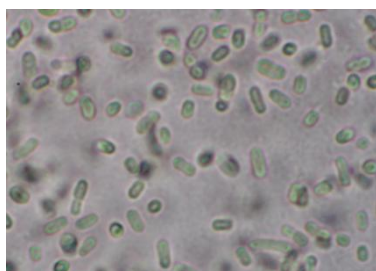
Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

Em 1981 a microalga *Spirulina* foi legalmente aceita pelo FDA (Food and Drug Administration), através do certificado GRAS (Generally Recognized as Safe), considerada fonte de proteínas, vitaminas e minerais, podendo ser legalmente comercializada como alimento ou complemento alimentar desde que precisamente qualificada, livre de contaminantes e de adulteração (FOX, 1996). Esta microalga também é reconhecida como alimento pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), podendo ser utilizada na alimentação sem oferecer risco à saúde. A microalga *Spirulina* está sendo estudada para produção de biopolímeros como os poli-hidroxicanoatos, dentre estes, o poli- β -hidroxibutirato (SHRIVASTAV et al., 2010; PANDA et al., 2005).

1.2. Microalga *Synechococcus*

A microalga *Synechococcus* (Figura 2) é uma cianobactéria da família *Synechococcaceae*, unicelular, aeróbia fotossintética, presente em oceano e responsável por cerca de um quarto da produção de oxigênio. As células são do tipo cilíndricas a longo-cilíndricas. A reprodução da microalga *Synechococcus* é assexuada, ocorrendo por fissão binária, semelhante às bactérias (BICUDO; MENEZES, 2006; MARGULIS; SCHWARTZ, 2001).

Figura 2 – Microalga *Synechococcus nidulans*



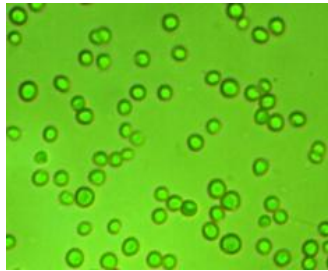
Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

A microalga *Synechococcus nidulans*, pode ser utilizada para produção de ácidos graxos poli-insaturados, podendo realçar e melhorar a função imunológica (RADMANN; COSTA, 2008). Nishioka et al. (2001), cultivou a microalga *Synechococcus* sp. MA19, para produção de biopolímero (poli- β -hidroxibutirato).

1.3. Microalga *Cyanobium*

A microalga *Cyanobium* (Figura 3) é uma cianobactéria da classe *Cocconeae*, unicelular. Apresentam-se solitárias ou em pares após a divisão celular. Seu tamanho varia entre 0,4-2,4 μm de comprimento e aproximadamente 0,25-0,4 μm de largura. São aeróbias fotossintéticas, encontradas em ambientes marinhos e água doce. Sua reprodução é assexuada, ocorrendo por fissão binária, transversal ao longo do eixo, resultando em duas células filhas isomórficas (KOMÁREK et al., 1999).

Figura 3 – Microalga *Cyanobium*



Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

A microalga *Cyanobium* pode ser consumida como ração animal, além de ser utilizada para produção de biocombustíveis e biofixação de CO_2 da atmosfera (HENRARD, 2009).

1.4. Microalga *Nostoc*

A microalga *Nostoc* (Figura 4) é uma cianobactéria pertencente à família *Nostocaceae*. Encontrada em diversos ambientes, como solos, rochas úmidas, fundo de lagos e nascentes e raramente em habitats marinhos. Suas células são macro ou microscópicas, coloniais e arredondadas. Os tricomas encontram-se soltos ou em emaranhados e sempre envoltos por mucilagem. A reprodução é realizada pela fragmentação dos tricomas ou pela

germinação dos acinetos. A maioria das espécies vivem nos perifítons onde ocorre, principalmente, sobre plantas, pedras e rochas (BICUDO; MENEZES, 2006).

Figura 4 – Microalga *Nostoc ellipsosporum*



Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

A microalga *Nostoc* foi estudada para produção de biopolímeros e copolímeros como poli- β -hidroxibutirato (SHARMA et al., 2007) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (BHATI; MALLICK, 2012).

2. Cultivo de Microalgas

As primeiras pesquisas sobre cultivo de microalgas foram marcadas pela descoberta das relações das algas com o meio físico e químico (LOURENÇO, 2006). A composição bioquímica da biomassa das microalgas não é determinada somente pela natureza de cada espécie algal, dependendo de fatores como, intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes, agitação, entre outros (MIAO; WU, 2004). Pesquisas relacionadas com a interação entre intensidade luminosa, temperatura, agitação e concentração de nutrientes podem contribuir para a otimização do cultivo, pois o crescimento de microalgas deriva de diversas reações bioquímicas e biológicas (DUARTE, 2001).

2.1. Fatores que Influenciam no Cultivo de Microalgas

A luz é normalmente, o fator mais importante que afeta os organismos fotossintéticos. As cianobactérias crescem fotoautotroficamente dependendo da luz como principal fonte de energia (REINEHR, 2003). A luz solar é distribuída ao longo de toda a faixa visível, e as clorofilas absorvem apenas parte desse espectro. Os pigmentos como carotenóides e ficobiliproteínas permitem que o organismo capture quantidades maiores da luz disponível, aumentando a eficiência fotossintética (MADIGAN et al., 2010).

A temperatura de cultivo é o fator mais importante para todos os organismos vivos, afetando o metabolismo, requerimento de nutrientes, concentração de biomassa, energia de ativação das reações assim como outras propriedades físicas da célula. (VONSHAK, 1997).

As cianobactérias exibem clara dependência ao pH do meio de crescimento. Suas respostas variam de acordo com a espécie. Para a grande maioria das cianobactérias a taxa fotossintética é dada como função do oxigênio dissolvido, que exhibe variabilidade em faixa ampla de pH (REINEHR, 2003). O carbono inorgânico, fundamental para o processo de fotossíntese, constitui fonte relacionada ao pH. Em pH abaixo de 5,0, apenas o CO₂ é consumido pela microalga, entre 7 e 9 o bicarbonato passa a ser importante e acima de 9,5 destaca-se o carbonato (RAVEN, 1990).

2.2. Fonte de Nutrientes

2.2.1. Fonte de Carbono

O carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para algas. Sua elevada demanda decorre do fato de que o carbono faz parte dos principais componentes sintetizados pela célula, como, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e vitaminas (LOURENÇO, 2006).

O dióxido de carbono é a fonte de carbono para o crescimento fotossintético e autotrófico de algas. Em lagos naturais, as fontes de carbono utilizadas pelas microalgas são CO₂ atmosférico ou carbonatos (VONSHAK, 1997). Diversos meios de cultura não envolvem a adição de fontes de carbono, assumindo que o carbono já existente na água e a difusão natural de CO₂ do ar atmosférico para o meio de cultura, seriam suficientes para suprir as demandas das microalgas (LOURENÇO, 2006). Sob condições heterotróficas e mixotróficas, algumas espécies de microalgas podem metabolizar uma variedade de fontes de carbono, como glicose, melão, ácido acético e ainda, compostos presentes em resíduos industriais (KUMAR et al., 2010).

2.2.2. Fonte de Nitrogênio

O nitrogênio, após o carbono, é o elemento com maior participação, em termos quantitativos, na matéria seca da alga (RICHMOND, 1990). Este componente é fundamental

para três classes de substâncias estruturais das células: proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintéticos (clorofilas e ficobilinas), podendo também ser encontrado em formas inorgânicas não assimiladas (nitrito, nitrato e amônio) (LOURENÇO, 2006).

Se o suprimento de nitrogênio é abundante em cultivos, verifica-se tendência de aumento nas concentrações de proteínas e de clorofila nas células. Contrariamente, quando as concentrações de nitrogênio disponíveis para microalgas são baixas, verifica-se redução marcante da taxa de divisão celular, além da concentração de proteínas e clorofila (LOURENÇO et al., 1998). Quando o meio de cultivo apresentar pouco nitrogênio, ocorre reação intracelular, que as microalgas liberam clorofila para o meio, auxiliando no crescimento celular. Ao liberar a clorofila para o meio de cultivo, a célula microalgal torna-se amarelada (JIANG et al., 2011).

2.2.3. Fonte de Fósforo

O fósforo está associado à realização dos processos que envolvem trocas energéticas nas células. ATP (moléculas de energia na forma de adenosina trifosfato), açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas são os principais componentes estruturais que apresentam fósforo em algas. O fósforo possui duas funções fundamentais na célula: transferir energia e constituir moléculas estruturais (LOURENÇO, 2006).

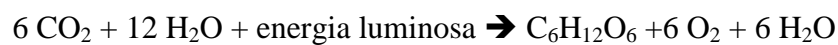
Modificações morfológicas, como dimensões das células e dos tricomas foram observadas em cianobactérias sujeitas à falta de fósforo. Estudos ultraestruturais indicaram a perda de corpos poli-fosfatados em células de algas procarióticas e eucarióticas com carência de fosfato. A deficiência de fósforo aparentemente induz a supressão na formação de heterocistos em algumas cianobactérias (VONSHAK, 1997). Em cultivos, o fósforo tende a ser adicionado aos meios de cultura como fosfatos ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4) ou como pentóxido de fosfato (P_2O_5) (LOURENÇO, 2006).

3. Fotossíntese

A fotossíntese é o principal processo biológico que ocorre na Terra, que consiste na conversão de energia luminosa em energia química. A fotossíntese requer pigmentos sensíveis à luz, as clorofilas. A absorção da energia luminosa pelas clorofilas inicia o processo de conversão fotossintética da energia, sendo o resultado líquido a energia química (ATP)

(MADIGAN et al., 2010). Os organismos capazes de realizar a fotossíntese são as bactérias verdes e púrpuras, as cianobactérias, as algas e as plantas (MARZZOCO; TORRES, 2010).

A fotossíntese contribui simultaneamente para gerar atmosfera aeróbia e fonte de energia prontamente utilizável, dois fatores fundamentais para a manutenção da vida no planeta (MARZZOCO; TORRES, 2010). Os organismos fotossintéticos convertem dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) em carboidratos como a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e oxigênio molecular (O_2) (CAMPBELL; FARRELL, 2006). A reação global da fotossíntese pode ser assim descrita:



A equação representa dois processos, um deles é a oxidação da água para produzir oxigênio (reações de luz), o qual precisa da energia solar. As reações de luz também geram NADPH, que é o agente redutor necessário nas reações no escuro. O outro processo, a fixação de CO_2 para fornecer açúcares (reações no escuro), não utiliza a energia solar diretamente, mas indiretamente na forma de ATP e NADPH produzidos no decorrer das reações de luz (CAMPBELL; FARRELL, 2006).

4. Polímeros

Os polímeros utilizados para fabricação de materiais plásticos são geralmente polietileno (PE), polipropileno (PP), cloreto de polivinil (PVC) e poliestireno (PS). Estes polímeros são encontrados como principais materiais do lixo doméstico, destacando-se o PE e o PP como responsáveis por 60 % deste tipo de resíduo (MICHAELI et al., 2008; REDDY et al., 2003).

Os polímeros podem ser facilmente moldados em quase todas as formas desejadas incluindo fibras e filmes finos. Os polímeros têm alta resistência química e possui a característica de elasticidade, por isso podem ser utilizados para embalagens de materiais (REDDY et al., 2003), correspondendo a um terço de todo o consumo brasileiro (CANEVAROLO Jr., 2010). Os setores que utilizam polímeros em maiores quantidades são as embalagens em geral, construção civil, a indústria automobilística e máquinas e equipamentos. Os resíduos poliméricos apresentam, geralmente, degradabilidade lenta, de maneira que não conseguem ser digeridos nos círculos biológicos (MICHAELI et al., 2008).

4.1. Biopolímeros

A degradação dos biopolímeros é causada por um sistema biológico (DURÁN et al., 2006). Algumas formas de aditivação dos polímeros convencionais permitem a obtenção de polímeros fotodegradáveis, que se degradam na presença de raios ultravioleta. A incorporação de materiais biodegradáveis aos polímeros convencionais é outra forma de aditivação. Dessa forma, permite-se a degradação de pelo menos parte do material descartado e a destruição de sua estrutura, reduzindo-o a partículas menores. Diversos materiais que reúnem as características de termoplasticidade e biodegradabilidade têm sido estudados, dentre eles: polilactato, poliglicolato, poli-ε-caprolactona (PCL), álcool polivinílico, poli-hidroxicanoatos (PHAs) (LIMA et al., 2001).

Os PHAs são poliésteres de ácido hidroxialcanóicos, biodegradáveis, que podem ser obtidos a partir de fontes de carbono renováveis, sendo produzidos por diversas bactérias e cianobactérias como material de reserva na forma de grânulos intracelulares (DURÁN et al., 2006; WANG et al., 2013). Os PHAs não são tóxicos, possuem características de termoplasticidade e biodegradabilidade. Estes polímeros têm um alto grau de polimerização e são cristalinos, opticamente ativos, isotáticos e insolúveis em água. Estas características fazem com que estes biopolímeros tenham alta competitividade com o polipropileno, que é um plástico derivado do petróleo (REDDY et al., 2003).

A síntese de PHA normalmente ocorre quando há excesso de fonte de carbono, energia disponível e limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células microbianas (N, P, Mg, Fe, entre outros) (LIMA et al., 2001).

4.2. Poli-β-hidroxi-butilato (PHB)

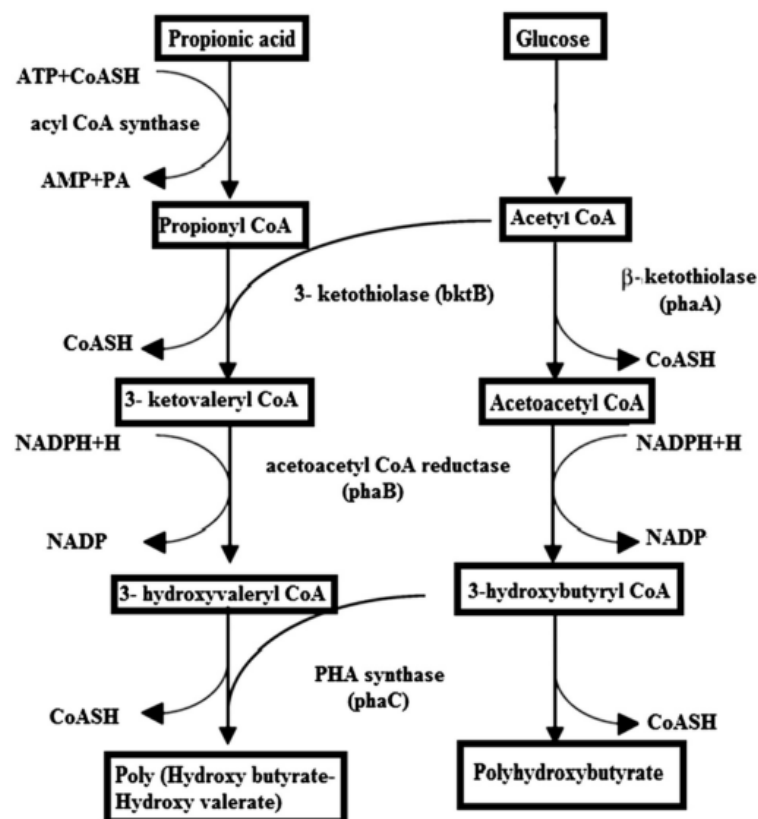
Dentre os PHAs, o PHB foi o primeiro homopolímero a ser identificado (DURÁN et al., 2006). O PHB (poli-β-hidroxi-butilato) e seu copolímero PHB-HV (poli-3-hidroxi-butilato-co-3-hidroxi-valerato) têm despertado interesse científico e tecnológico, pois além de serem termoplásticos biodegradáveis, podem ser sintetizados por fermentação submersa a partir de matérias-primas renováveis (LIMA et al., 2001).

O PHB oferece boa barreira à transmissão de luz, dispensando o uso de pigmentos e absorvedores de UV (ultra violeta) para proteção de alimentos facilmente oxidáveis, o que é comum o uso de pigmentos em PP (polipropileno), PET (polietileno tereftalato) e PVC (policloreto de vinila). O PHB pode substituir o PP e outros polímeros sintéticos em

embalagens para acondicionamento de alimentos como margarina, maionese e requeijão (BUCCI, 2003).

Na síntese de PHB a partir de acetil-CoA (acetil coenzima A – um intermediário entre as vias de degradação de carboidratos e o ciclo de Krebs) estão envolvidas três enzimas. A β -*ketotiolase* que catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando uma molécula de acetoacetil-CoA; esta, por sua vez, é reduzida a D(-)-3-hidroxiacetil-CoA numa reação estereoespecífica catalisada pela enzima *3-cetoacetil-CoA redutase NADPH dependente*. O último passo compreende a polimerização da unidade D(-)-3-hidroxiacetil-CoA a um polímero em crescimento, numa reação catalisada pela enzima *PHA sintase*. No entanto, β e muitos outros PHAs são compostos por 3 hidroxil ácidos graxos (Figura 5) (BALAJI et al., 2013; LIMA et al., 2001).

Figura 5 – Via metabólica para produção de poli- β -hidroxibutirato.



Fonte: Balaji et al. (2013)

A enzima-chave para regulação dessa via metabólica é a β -*ketotiolase*. Em condições balanceadas de crescimento, onde todos os nutrientes necessários à multiplicação celular estão disponíveis, espera-se que os níveis de coenzima A (CoA) livre sejam altos,

devido à grande demanda por grupos acetil pelo ciclo de Krebs para formação de esqueletos carbônicos e a geração de energia. Quando algum nutriente se torna limitante à multiplicação dos micro-organismos, a demanda por acetil diminui, e com isso os níveis de CoA livre se tornam reduzidos, diminuindo a inibição sobre β -*acetotiolase* e desencadeando a síntese de PHB (LIMA et al., 2001).

4.3. Degradação de Biopolímeros

Os PHAs são degradados sob exposição ao solo, compostagem ou sedimentos marinhos. A biodegradação é dependente de fatores tal como a atividade microbiana no meio ambiente, a exposição da área de superfície, umidade, temperatura, pH do meio, massa molar do polímero (BOOPATHY, 2000), entre outros.

Degradação é o conjunto de reações que envolvem quebra de ligações primárias da cadeia principal do polímero e formação de outras, com conseqüente mudança da estrutura química e redução da massa molar. Essa alteração química normalmente implica em mudanças das propriedades físico-químicas (CANEVAROLO Jr., 2010). A biodegradação dos PHAs sob condições aeróbias resulta em dióxido de carbono e água, enquanto que em condições anaeróbias os produtos da degradação são dióxido de carbono e metano (REDDY et al., 2003).

A degradação intracelular deve ser realizada por todos os micro-organismos capazes de acumular esse polímero, e corresponde à reutilização do material acumulado sob condições em que uma fonte externa de carbono não está mais disponível. Enquanto a *PHB despolimerase* extracelular é capaz de degradar PHB em estado altamente cristalino, a *PHB despolimerase* intracelular só é capaz de degradar grânulos em estado nativo (LIMA et al., 2001).

Materiais poliméricos diferem na velocidade e na forma de degradação, determinadas pela energia requerida para a quebra, e pela localização da ligação. Polímeros com fortes ligações covalentes na cadeia principal (C-C) e com grupos não hidrolisáveis requerem longo tempo e/ou catalisadores para sua degradação. Moléculas com grupos hidrolisáveis (C-O-C, C-N-C) são degradadas mais facilmente e mais rapidamente (DURÁN et al., 2006).

Em estudos realizados por Bucci et al. (2007), foi verificado que o biopolímero PHB foi degradado em torno de 90 d, onde utilizaram como meio de degradação resíduos de esgotos. Quando utilizaram compostagem de estrume de aves, a degradação microbiana foi

gradual e uniforme. Para um sistema de anaerobiose, a degradação foi completa após 90 d. A degradação pode ocorrer em períodos maiores (anos), por isso representa um problema ambiental menor que outros polímeros como o PP (polipropileno), PE (polietileno), PS (poliestireno), PET (polietileno tereftalo), entre outros, que pode levar centenas de anos para se degradar.

5. Nanotecnologia

A nanotecnologia, para a comunidade acadêmica, referencia a ciência e a engenharia sobre os materiais, estruturas e dispositivos em que pelo menos uma das dimensões seja em nanômetros (RAMAKRISHNA et al., 2005), que pode alcançar de 10 a 1000 nm (WEISS et al., 2006).

Estudos vem sendo realizados no sentido de concretizar as novas ideias que surgem na área de nanotecnologia. O impacto da nanotecnologia é grande em diversas áreas, como materiais e fabricação, nanoeletrônica e tecnologia de computadores, medicina e saúde, aeronáutica e exploração espacial, energia e meio ambiente, biotecnologia e agricultura, segurança nacional, embalagens, entre outras (DURÁN et al., 2006).

A ciência e tecnologia, em escala nano, vêm revolucionando, pois os materiais nanométricos podem apresentar novos comportamentos e/ou propriedades diferentes daquelas que geralmente apresentam em escala macroscópica (DURÁN et al., 2006). Por se tratar de tecnologia interdisciplinar, une as áreas da física, química, biologia e medicina. O campo de aplicação da nanotecnologia é vasto, porém os grandes destaques estão na nanoeletrônica, nanobiotecnologia e nanomateriais. A união das várias áreas torna a nanotecnologia uma ciência complexa e diferenciada das demais. Suas aplicações abrangem os mais distintos campos, cujas aplicações visam ampliar a capacidade humana de manipular a matéria através dos átomos (CADIOLI; SALLA, 2006).

5.1. Nanofibras

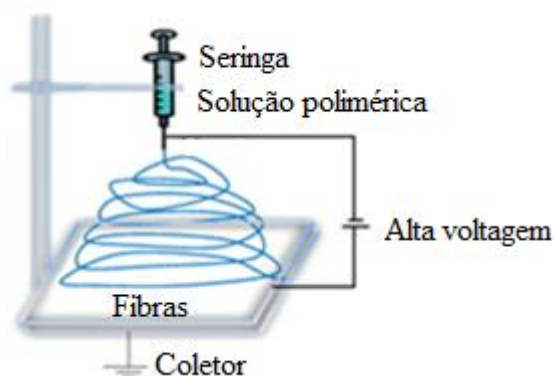
Alguns dos principais poliésteres alifáticos de interesse para o desenvolvimento de sistemas micro a nano-estruturados são os homopolímeros de ácido lático (PLA) e glicólico (PGA) e seus copolímeros (PLGA), poli-ε-caprolactona (PCL) e poli-hidroxialcanoatos (PHA) (DURÁN et al., 2006).

As nanofibras poliméricas podem ser produzidas por diversas técnicas, como *drawing*, *template synthesis*, separação por fases, *self-assembly* e *electrospinning*. O *electrospinning* é uma das técnicas mais utilizadas para produção de nanofibras, pois apresenta potencial aumento de escala, repetibilidade e fácil controle do dimensionamento das fibras, além de apresentar baixo custo. Produz nanofibras longas e seu processo é utilizado continuamente. A desvantagem é a instabilidade do jato (RAMAKRISHNA et al., 2005).

5.2. *Electrospinning*

No processo de *electrospinning* (Figura 6), o polímero é injetado pela ponta da pipeta formando nanofibras devido à alta tensão. O jato é eletricamente carregado, formando as fibras, onde estas são depositadas no coletor (RAMAKRISHNA et al., 2005).

Figura 6 – Diagrama esquemático do processo de *electrospinning*.



Fonte: Rogina, (2014)

Geralmente, as nanofibras poliméricas podem alcançar diâmetros variados, apresentando diferentes funcionalidades com relação às propriedades mecânicas, elétricas e térmicas. As fibras podem ser um material ideal para produção de tecidos, próteses médicas, roupas protetoras e dispositivos elétricos. Este processo tecnológico pode ter aplicações dentro da indústria de alimentos para produzir novos materiais ou melhorar as propriedades dos produtos existentes (WEISS et al., 2006).

A indústria alimentícia pode utilizar nanofibras produzidas por *electrospinning* para embalagens alimentícias oriundas de materiais naturais para construção de matrizes de alimentos artificiais. Para suportes (*scaffolds*) como nano e micro estruturas em engenharia de tecidos (WEISS et al., 2006).

Meng et al. (2011) utilizaram processo de *electrospinning* para produção de nanofibras a partir de quitosana e PLGA (ácido lático-co-ácido glicólico). Nanofibras de PE (polietileno) com incorporação de biomassa microalgal foram produzidas a partir do processo de *electrospinning*, obtendo nanofibras com diâmetro de 107 ± 12 nm (MORAIS, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. R. **Biosistema para produção de biomassa microalgal e biometano**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande – RS, 2009.

BALAJI, S.; GOPI, K.; MUTHUVELAN, B. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, p. 278-285, 2013.

BHATI, R.; MALLICK, N. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by a N_2 -fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* Agardh. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 505-512, 2012.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**. 2ª edição. São Carlos – SP. Editora Rima, 2006.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 63-67, 2000.

BUCCI, D. Z.; TAVARES, L. B. B.; SELL, I. Biodegradation and physical evaluation of PHB packaging. **Polymer Testing**, v. 26, p. 908-915, 2007.

BUCCI, D. Z. **Avaliação de embalagens de PHB (poli(ácido 3-hidroxibutírico)) para alimentos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis – SC, 2003.

CADIOLI, L. P.; SALLA, L. D. **Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia**, v. 1, n. 1, 2006. Disponível em:

sare.unianhanguera.edu.br/index.php/rcext/article/view/393/393. Acessado em: novembro de 2012.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 5ª edição, São Paulo. Editora Thomson, 2006.

CANEVAROLO Jr., S. V. C. **Ciência dos Polímeros – Um Texto Básico para Tecnólogos e Engenheiros**. 3ª edição, São Paulo: Artliber, 2010.

COLLA, L. M.; MUCCILLO-BAISCH, A. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerol in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 405-411, 2008.

DUARTE, I. C. S. **Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella* sp (Chlorophyta, Chlorococcales)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista – USP, Rio Claro – SP, 2001.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia**. São Paulo. Editora Artliber, 2006.

FOX, R. D. ***Spirulina* Production & Potencial**. France, Edisud, 1996.

HENRARD, A. S. A. **Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp.**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande – RS, 2009.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. **Applied Energy**, v. 88, p. 3336-3341, 2011.

KOMÁREK, J.; KOPECKÝ, J.; CEPÁK, V. Generic characters of the simplest cyanoprokariotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*. **Cryptogamie Algologie**, v. 20 n. 3, p. 209-222, 1999.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F. X.; LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 371-380, 2010.

LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer**, v. 39, p. 397-442, 2014.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2^a ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biociologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

LOPES, T. M.; COSTA, J. A. V.; TRINDADE, G. S. Differences in the sensibility of multi-drug resistant (MDR) and non-MDR human tumor cells to different concentrations of *Spirulina platensis*. In: **Les Cyanobactéries pour la Santé, la Science et le Développement**, Embiez Island, 2004.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos-SP, 2006.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; MARQUEZ, U. M. L.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Phycology**, v. 34, p. 798-811, 1998.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12^a edição, Porto Alegre. Editora Artmed, 2010.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Cinco Reinos: Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra**. 3ª Edição. Editora Guanabara Koogan, 2001.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3ª edição, São Paulo. Editora Guanabara Koogan, 2010.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MENG, Z. X.; XU, X. X.; ZHENG, W.; ZHOU, H. M. LI, L.; ZHENG, Y. F.; LOU, X. Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 97-102, 2011.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v.110, p.85-93, 2004.

MICHAELI, W.; GREIF, H.; KAUFMANN, H.; VOSSEBÜRGER, F-J. **Tecnologia dos Plásticos**. 1ª edição, 3ª reimpressão, São Paulo. Editora Edgard Blücher LTDA, 2008.

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V. WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2872-2876, 2010.

MORAIS, M. G. **Bioengenharia microalgal na utilização de gás de combustão e extração de biopolímeros para desenvolvimento de nanofibras**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande – RS, 2008.

MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: características físico-química, sensorial e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 333.340, 2006.

NISHIOKA, M. NAKAI, K.; MIYAKE, M.; ASADA, Y.; TAYA, M. Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate-limited conditions. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1095-1099, 2001.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering Journal**, v. 20, p. 459-466, 2003.

PANDA, B.; SHARMA, L.; MALLICK, N. Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum* and *Spirulina platensis* under phosphate limitation. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 1376-1379, 2005.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO_x and NO_x resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3132-3136, 2011.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W-E.; LIM, T-C.; MA, Z. **An introduction to electrospinning and nanofibers**. Danvers – USA, World Scientific, 2005.

RAVEN, J. A. Sensing pH? **Plant, Cell and Environment**, v.13, p.721-729, 1990.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI.; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003.

REINEHR, C. O. **Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em modo semicontínuo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande – RS, 2003.

RICHMOND, A. Cell response to environmental factors. **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boston: CRC Press, 1990.

ROGINA, A. Electrospinning process: versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and composite systems applied in tissue engineering and drug delivery. **Applied Surface Science**, v. 296, p. 221-230, 2014.

ROSA, A. P. C.; CARVALHO, L. F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3071-3073, 2011.

SHARMA, L.; SINGH, A. K.; PANDA, B.; MALLICK, N. Process optimization for poly- β -hydroxybutyrate production in a nitrogen fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 987-993, 2007.

SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. K.; MISHRA, S. Polyhydroxyalcanoates (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 255-260, 2010.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgal to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 4316-4342, 2012.

TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*). In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997.

VALDERRAMA, L. T.; DEL CAMPO, C. M.; RODRIGUEZ, C. M.; BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemma minuscule*. **Water Research**, v. 36, p. 4185-4192, 2002.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, Cell-biology and Biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; McCLEMENTS, D. J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 9, p. 107-116, 2006.

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O presente trabalho foi desenvolvido em cinco etapas, onde cada uma gerou um artigo:

ARTIGO 1: SELEÇÃO DE MICROALGAS PRODUTORAS DE BIOPOLÍMEROS

ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS PELA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18 EM CULTIVOS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E REDUÇÃO DE NITROGÊNIO

ARTIGO 3: SÍNTESE DE BIOPOLÍMEROS PELA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18 EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

ARTIGO 4: PURIFICAÇÃO DE POLI- β -HIDROXIBUTIRATO EXTRAÍDO DA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18

ARTIGO 5: PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS A PARTIR DE POLI- β -HIDROXIBUTIRATO DE ORIGEM MICROALGAL

SELEÇÃO DE MICROALGAS PRODUTORAS DE BIOPOLÍMEROS

RESUMO

As microalgas são estudadas devido ao seu potencial biotecnológico. O cultivo de microalgas visa a obtenção de compostos naturais como biopolímeros, vitaminas, proteínas, entre outros. Devido à grande quantidade de lixo polimérico acumulado, uma das soluções é a utilização de polímeros biodegradáveis que podem ser produzidos a partir de cianobactérias. O objetivo deste trabalho foi selecionar microalgas produtoras de biopolímeros, assim como estudar a fase de crescimento celular em que ocorre máxima produção. Foram estudadas as microalgas *Cyanobium* sp., *Nostoc ellipsosporum*, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans*. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores fechados de 2 L, mantidos em câmara termostatizada a 30 °C com iluminância de $41,6 \mu\text{mol}_{\text{fótons}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h claro/escuro. Os biopolímeros foram extraídos nos tempos de 5, 10, 15, 20 e 25 d de cultivo, a partir de digestão diferencial. As microalgas que apresentaram maior produtividade foram *Nostoc ellipsosporum* e *Spirulina* sp. LEB 18 com rendimento de biopolímeros bruto de 19,27 e 20,62 % em 10 e 15 d, respectivamente, na fase de máximo crescimento celular.

Palavras-chave: cianobactéria, poli-hidroxicanoato, produtividade.

ABSTRACT

Microalgae are studied because of their biotechnological potential. The cultivation of microalgae aims to obtain natural compounds such as biopolymers, vitamins, proteins, among others. Due to the large amount of plastic waste accumulated, one solution is to use biodegradable plastics that can be produced from cyanobacteria. The aim of this work was to select microalgae for biopolymers production, and also study the phase of cell growth that occur the maximum production. The microalgae *Cyanobium* strain, *Nostoc ellipsosporum*, *Spirulina* strain LEB 18 and *Synechococcus nidulans*, were studied. The cultivation was carried out in 2 L closed photobioreactors, thermostatically maintained at 30°C with illuminance of $41.6 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 12 h light/dark. The biopolymers were extracted at 5, 10, 15, 20 and 25 d of culture by differential digestion. Microalgae that showed the maximum productivity were *Nostoc ellipsosporum* and *Spirulina* strain LEB 18 with biopolymer yield of 19.27 and 20.62 % at 10 and 15 d, respectively, in the phase of maximum cell growth.

Key words: cyanobacteria, polyhydroxyalkanoates, productivity.

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias foram os primeiros organismos fototróficos capazes de produzir oxigênio. Responsáveis pela conversão da atmosfera terrestre anóxica em óxica (MADIGAN et al., 2010). Para a produção de biomassa com características específicas, a manipulação das condições de cultivo é um fator fundamental (MATA et al., 2010).

As microalgas são utilizadas para os mais variados fins, como suplemento na alimentação humana (MORAIS et al., 2006) e animal (SILVA et al., 2010). Alguns cultivos são empregados no tratamento de efluentes (CÓRDOBA et al., 2008), na fixação de gás carbônico e gases de combustão (MORAIS; COSTA, 2008; RADMANN et al., 2011). A biomassa da microalga *Spirulina* foi pesquisada para utilização no potencial hipocolesterolêmico (COLLA et al., 2008), como fonte de biocombustíveis (OLTRA, 2011), ou para produção de biopolímeros (GOO et al., 2013; SAMANTARAY; MALLICK, 2012). Os mais variados gêneros e espécies de microalgas são utilizadas para a produção de biopolímeros, como *Dunaliella tertiolecta* (GOO et al., 2013), *Aulosira fertilissima* (SAMANTARAY; MALLICK, 2012), *Nostoc muscorum* (BHATI; MALLICK, 2012), *Spirulina subsalsa* (SHRIVASTAV et al., 2010), *Synechocystis* sp. (PANDA et al., 2006), *Spirulina platensis* (JAU et al., 2005) e *Synechococcus* sp. (NISHIOKA et al., 2001).

As bactérias e microalgas possuem a capacidade de produzir poli-hidroxicanoatos (PHAs) (BHATI; MALLICK, 2012; MOHAMMADI et al., 2012) que são poliésteres biodegradáveis com grande potencial de utilização como material polimérico (LAYCOCK et al., 2014). Os polímeros biodegradáveis são uma alternativa de substituição dos polímeros petroquímicos (CHANPRATEEP, 2010).

A redução do consumo de produtos poliméricos é difícil devido as suas propriedades versáteis. Entretanto é possível substituir os polímeros petroquímicos por materiais alternativos que tenham propriedades poliméricas semelhantes além de rápida degradação após o descarte (CHANPRATEEP, 2010).

Os PHAs podem mudar o cenário do impacto global climático positivamente pela redução da quantidade de uso dos polímeros não biodegradáveis. Uma ampla variedade da composição de diferentes monômeros de poli-hidroxicanoatos tem sido descrito, bem como as perspectivas futuras para suas aplicações devido a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (CHANPRATEEP, 2010).

Culturas mistas, microalgas e bactérias, para produção de PHAs estão emergindo pelo potencial uso residual para cultivo e baixo custo de instalações para a produção

rentável de poli-hidroxicarboxilatos. O cultivo de microalgas não demanda grandes quantidades de terra e pode ocupar áreas impróprias para agricultura, não competindo com a produção de alimentos, devido a possibilidade de utilizar fotobiorreatores verticais que maximiza a produção de biomassa (SATYANARAYANA et al., 2011; NONHEBEL, 2005).

O objetivo deste trabalho foi selecionar microalgas produtoras de biopolímeros, assim como estudar a fase de crescimento celular em que ocorre máxima produção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismos e Meio de Cultivo

As microalgas utilizadas foram *Cyanobium* sp., *Nostoc ellipsosporum*, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans*. A microalga *Nostoc ellipsosporum* (B1453-79) foi cedida pela Universidade de Göttingen (Alemanha). As cianobactérias *Cyanobium* sp. (HENRARD et al., 2011), *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008) e *Synechococcus nidulans* (RADMANN et al., 2011) pertencem à Coleção de Cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi isolada da Lagoa Mangueira (33°30'12"S, 53°08'58"W) localizada na cidade de Santa Vitória do Palmar/RS (Brasil). A cianobactéria *Synechococcus nidulans* foi isolada da lagoa de estabilização da Usina Termelétrica Presidente Médici, localizada na cidade de Candiota/RS (Brasil) (24°36'13"S, 52°32'43"W). Os inóculos das microalgas *Cyanobium* sp. e *Nostoc ellipsosporum* foram mantidos em meio de cultivo BG-11 (RIPPKA et al., 1979) e as microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans* foram mantidas em meio de cultivo Zarrouk (ZARROUK, 1966), formulados de acordo com a Tabela 1. Todos os inóculos foram adaptados aos seus respectivos meios de cultivo, durante 30 d antes do início dos experimentos.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultivo das microalgas.

Meio Zarrouk		Meio BG-11	
Reagentes	Concentração (g.L ⁻¹)	Reagentes	Concentração (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,80	NaNO ₃	1,500
K ₂ HPO ₄	0,50	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,040
NaNO ₃	2,50	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
K ₂ SO ₄	1,00	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036
NaCl	1,00	Citrato férrico amoniacal	0,006
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20	EDTA dissódico	0,001
CaCl ₂	0,04	Na ₂ CO ₃	0,020
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	Ácido cítrico	0,006
EDTA	0,08	Solução A5 + Co	1,00 mL
Solução A5	1,00 mL		
Solução B6	1,00 mL		

Fonte: Rippka et al. (1979); Zarrouk, (1966).

Solução A₅: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂.4H₂O: 1,81; ZnSO₄.7H₂O: 0,22; CuSO₄.5.H₂O: 0,08; Na₂MoO₄: 0,02.

Solução B₆: (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,96; K₂Cr₂(SO₄)₄.24H₂O: 96,00; NiSO₄.7H₂O: 47,85; Na₂WO₄.2H₂O: 17,94; TiOSO₄.H₂SO₄.8H₂O: 61,10; Co(NO₃)₂.6H₂O: 43,98.

Co: (g.L⁻¹): Co(NO₃)₂.6H₂O: 0,05.

2.2. Condições de Cultivo

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores fechados de 2 L, com volume útil 1,5 L e agitação contínua através da injeção de ar estéril, para evitar a precipitação da biomassa. Para *Nostoc ellipsosporum*, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans* a concentração inicial foi 0,15 g.L⁻¹, porém para a *Cyanobium* sp. foi 0,2 g.L⁻¹. Os cultivos foram mantidos em câmara termostaticada a 30 °C durante 5, 10, 15, 20 e 25 d. Totalizando 15 experimentos para cada microalga. A iluminância utilizada foi 41,6 μmol_{fótons}.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12 h claro/escuro, mantida através de lâmpadas fluorescentes de 40 W.

2.3. Determinações Analíticas

Diariamente, foram coletadas amostras assepticamente para acompanhamento da concentração celular e pH. A concentração celular foi determinada através da densidade

óptica a 670 nm em espectrofotômetro (Quimis Q798DRM, Brasil), com curva de calibração que relaciona densidade óptica com peso seco da biomassa microalgal (COSTA et al., 2006). A determinação do pH foi realizada em pHmetro digital (Quimis Q400H, Brasil), segundo metodologia da AOAC (2000).

2.4. Determinação da Produtividade de Biopolímeros Bruto

A produtividade de biopolímeros bruto (P_{bb}) foi obtida segundo a Equação 1, onde C_{bbt} é a concentração de biopolímeros bruto (g.L^{-1}) no tempo t (d), C_{bb5} é a concentração de biopolímeros bruto (g.L^{-1}) no tempo de 5 d, t é o tempo (d) e t_5 é o tempo em 5 d.

$$P_{bb} = \frac{C_{bbt} - C_{bb5}}{t - t_5} \quad (1)$$

2.5. Extração de Biopolímeros Bruto

Após 5, 10, 15, 20 e 25 d de experimento, os cultivos foram centrifugados a 7500 rpm por 20 min em temperatura ambiente (Hitachi-Japão) para separar a biomassa úmida com o biopolímero do meio de cultivo. Após, para cada 1 g de biomassa seca, foi adicionado 100 mL de água destilada e 25 mL de hipoclorito de sódio (10-12 % de cloro ativo (m/v)) na biomassa úmida e mantido sob agitação por 10 min. A suspensão resultante foi levada à centrifugação (7500 rpm por 20 min em temperatura ambiente). A seguir descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 100 mL de água destilada. Centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se este processo adicionando 50 mL de acetona. O precipitado final (biopolímeros bruto) foi seco em estufa a 35 °C por 48 h. O rendimento foi calculado, a partir da Equação 2, onde: η é o rendimento de biopolímeros bruto em relação a biomassa microalgal (%), m_{bb} é a massa final de biopolímeros bruto obtida da extração da biomassa microalgal (g) e m_{ma} é a biomassa microalgal (g).

$$\eta = \frac{m_{bb} * 100}{m_{ma}} \quad (2)$$

2.6. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram tratados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias dos parâmetros analisados, com nível de confiança de 95 %.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

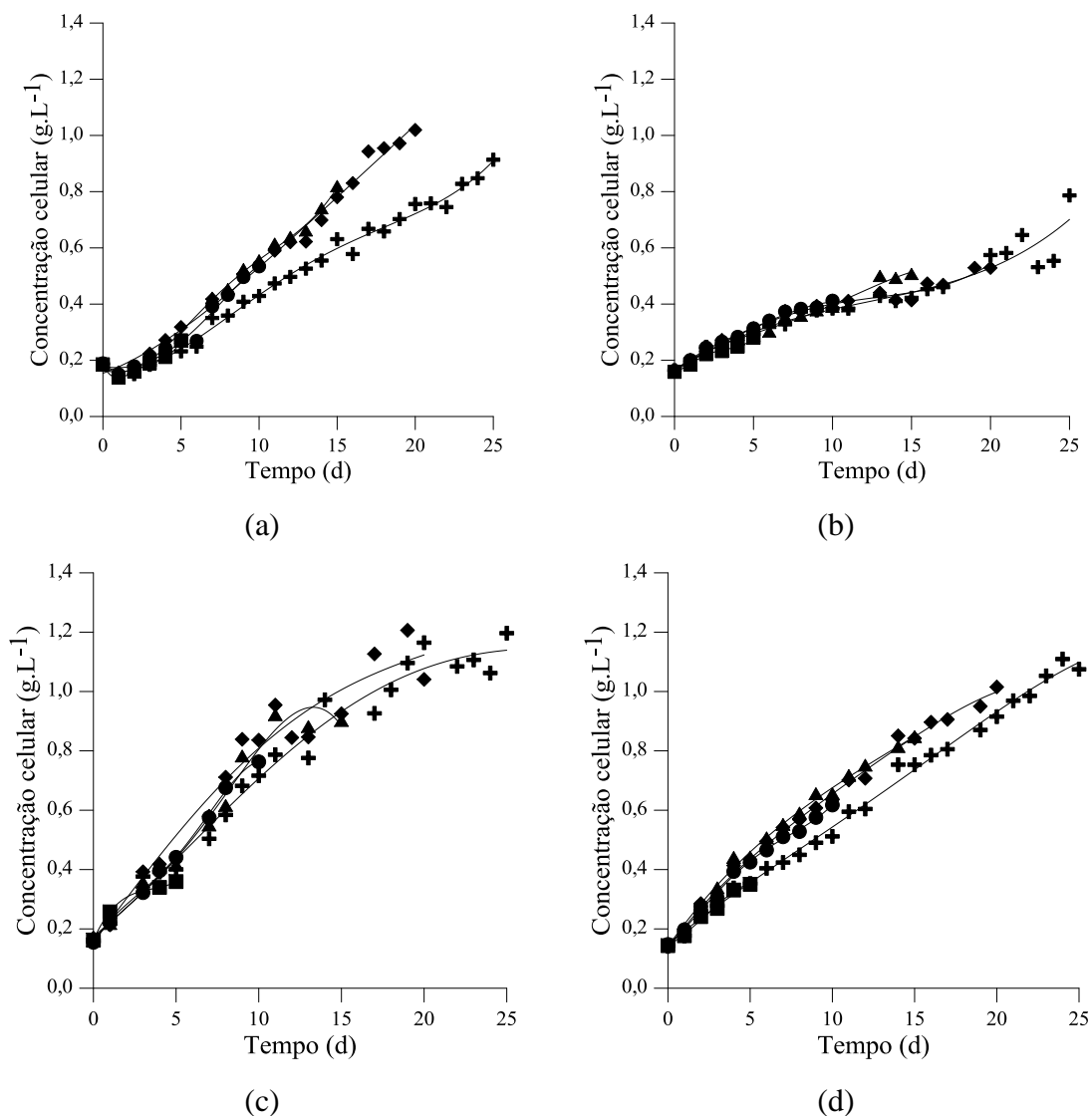
As curvas de crescimento das cianobactérias *Cyanobium* sp., *Nostoc ellipsoforum*, *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans* (Figura 1) apresentaram comportamentos diferentes, pois cada espécie possui suas características específicas de crescimento, bem como utilizam diferentes meios de cultivo. Em testes preliminares, observou-se que a microalga *Cyanobium* sp. quando cultivada em baixas concentrações de biomassa ($0,15 \text{ g.L}^{-1}$) foto inibe seu crescimento, por este motivo realizou-se os ensaios com concentração de biomassa inicial igual a $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ o que evitou a morte celular e proporcionou a fase lag de crescimento.

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 1c) apresentou início da fase estacionária de crescimento, aos 20 d de cultivo. Para *Cyanobium* sp., *Nostoc ellipsoforum* e *Synechococcus nidulans*, a fase estacionária de crescimento não foi observada ao final de 25 d de cultivo. Para verificar as fases de crescimento das microalgas *Cyanobium* sp., *N. ellipsoforum* e *S.nidulans*, seria necessário manter o cultivo por um tempo maior. Para uma produção em grande escala, seria inviável um cultivo tão longo para produção de biopolímeros. Sharma; Mallick (2005) cultivaram a microalga *Nostoc muscorum* em meio BG-11 com deficiência de fósforo e adição de fontes de carbono exógenas e constataram aumento na produção de PHB. Foram encontrados rendimentos de até 8,6 % (PHB) quando a extração do biopolímero foi realizada no início da fase estacionária de crescimento da microalga (21 d de cultivo), enquanto que na fase logarítmica o rendimento foi 6,1 %. Samantaray; Mallick (2012) cultivaram a microalga *Aulosira fertilissima* durante 14 d e observaram um acúmulo de 6,4 % de PHB no final da fase logarítmica de crescimento.

A microalga *Nostoc ellipsoforum* apresentou um comportamento em seu crescimento celular diferente, quando comparada às demais microalgas em estudo. Durante os primeiros 8 d de cultivo apresentou crescimento celular, após cessou e permaneceu até o 17º d e em seguida apresentou um novo crescimento celular. Isto pode ter ocorrido, porque quando as microalgas se encontram em limitação de determinado nutriente, excretam o substrato em

falta, da sua própria célula para o meio de cultivo, possibilitando a continuidade do crescimento. Se ocorrer a falta de carbono, o micro-organismo pode consumir o próprio biopolímero. Neste caso, acredita-se que o biopolímero possa ter sido consumido, pois após o 10º dia de cultivo, o rendimento de biopolímero reduziu (Tabela 2). Outro nutriente que pode ter influenciado, foi o nitrogênio, o qual é possível a sua liberação no meio de cultivo a partir de aminoácidos das ficobiliproteínas e da clorofila para que ocorra a manutenção celular (JIANG et al., 2011; WU et al., 2001).

Figura 1 – Curvas de crescimento das microalgas *Cyanobium* sp. (a), *Nostoc ellipsosporum* (b), *Spirulina* sp. LEB 18 (c) e *Synechococcus nidulans* (d) com 5 (■), 10 (●), 15 (▲), 20 (◆) e 25 (+) d de cultivo.



A cianobactéria *Nostoc ellipsosporum* apresentou concentração celular inferior às demais, porém obteve maiores rendimentos de biopolímeros bruto (Tabela 2) e

consequentemente maior produtividade de biopolímeros bruto (Tabela 3). Esta microalga apresentou capacidade de acumular quantidades de grânulos de biopolímeros intracelular, em relação às demais cianobactérias estudadas.

Tabela 2 – Rendimento de biopolímeros bruto (% , m/m*) para as microalgas em diferentes tempos de cultivo.

Tempo (d)	Microalga			
	<i>Cyanobium</i> sp.	<i>N. ellipso</i> <i>sporum</i>	<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	<i>S. nidulans</i>
5	3,68±0,23 ^{aAB}	9,04±3,24 ^{aC}	5,82±2,02 ^{aB}	1,18±0,23 ^{aA}
10	3,17±0,26 ^{abA}	19,27±1,18 ^{bB}	10,23±0,93 ^{aC}	8,83±0,06 ^{bC}
15	2,75±0,40 ^{bA}	17,79±1,32 ^{bB}	20,62±3,17 ^{bB}	1,00±0,33 ^{bA}
20	2,91±0,15 ^{abA}	13,41±3,80 ^{abB}	11,83±1,67 ^{aB}	10,21±1,95 ^{aB}
25	3,12±0,30 ^{abA}	10,69±2,84 ^{aB}	11,86±2,43 ^{aB}	11,01±1,49 ^{bB}

Para letras iguais as médias não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Letras minúsculas comparam os resultados nas colunas. Letras maiúsculas comparam os resultados nas linhas.

*Valores referentes às médias dos resultados obtidos das triplicatas com seus respectivos desvios padrões.

Dentre as microalgas em estudo, destacou-se a *Nostoc ellipso*
sporum e a *Spirulina* sp. LEB 18. Estas apresentaram os maiores rendimentos de biopolímeros bruto (PHB), bem como não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si. Entretanto, a *Nostoc ellipso*
sporum alcançou rendimento de biopolímeros bruto de 19,27 % em 10 d e a *Spirulina* sp. LEB 18 de 20,62 % em 15 d de cultivo. A produtividade de biopolímeros bruto da *Nostoc ellipso*
sporum foi 2,05 g.L⁻¹.d⁻¹ no tempo de 10 d, enquanto que a *Spirulina* sp. LEB 18 foi 1,48 g.L⁻¹.d⁻¹ no tempo de 15 d (Tabela 3). Panda et al. (2006) verificaram que a cianobactéria *Synechocystis* sp. PCC 6803 acumulava em suas células o biopolímero PHB. Foi constatado que essa microalga, sob deficiência de fósforo e/ou nitrogênio, cultivada em meio BG-11 com adição de fontes de carbono exógenas, apresentou maior rendimento (4,5 %) de PHB no início da fase estacionária de crescimento aos 21 d de cultivo, enquanto que na fase logarítmica o rendimento foi 2,9 %.

A microalga *Cyanobium* sp. não obteve resultados significantes ($p > 0,05$) para a produção de biopolímeros bruto. A cianobactéria *Synechococcus nidulans* apresentou maior rendimento de PHB (11,01 ± 1,49 %) em um tempo maior de cultivo (25 d) em relação às microalgas *Nostoc ellipso*
sporum e *Spirulina* sp. LEB 18. Dessa forma torna-se menos interessante o cultivo de *Synechococcus nidulans* em relação à *Nostoc ellipso*
sporum e *Spirulina* sp. LEB 18. Rendimentos menores (3 %) de PHB foram encontrados por Sankhla et

al. (2010) na fase estacionária de crescimento, quando estudaram a produção de PHB por *Brevibacillus invocatus* MTCC 9039.

Tabela 3 – Produtividade de biopolímeros bruto ($P_{bb} - g_{bp}.L^{-1}.d^{-1}$) para as microalgas em diferentes tempos de cultivo.

Tempo (d)	Microalga			
	<i>Cyanobium</i> sp.	<i>N. elliposporum</i>	<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	<i>S. nidulans</i>
5	-	-	-	-
10	<0,01	2,05	0,88	1,53
15	<0,01	0,87	1,48	<0,01
20	<0,01	0,29	0,40	0,60
25	<0,01	0,08	0,30	0,49

Os menores rendimentos obtidos em tempos de cultivo maiores que 10 d (*Nostoc elliposporum*) e 15 d (*Spirulina* sp. LEB 18) podem ser devido à depleção de nutrientes do meio, especialmente carbono, que conduz ao consumo de biopolímeros para o crescimento e manutenções celulares. Os resultados obtidos demonstraram a influência do tempo de cultivo na produção dos biopolímeros. Essa diferença de rendimento está associada ao fato de que a produção do biopolímero depende da disponibilidade da fonte de carbono e energia que variam em função do tempo de cultivo. Bhati; Mallick (2012) estudaram a microalga *Nostoc muscorum* Agardh para a produção de PHB-HV, apresentando rendimentos de 16,6 % em 10 d de incubação. Para a mesma microalga foram observados diferentes rendimentos de biopolímeros em tempos distintos utilizando variadas fontes de carbono. Quando utilizou meio BG-11 com acréscimo de propionato, o maior rendimento foi 12,6 % em 21 d e adicionando valerato 16,6 % em 10 d. Os maiores rendimentos foram no final da fase exponencial de crescimento. Mallick et al. (2007) estudaram a produção de PHB-HV em *Nostoc muscorum* utilizando meio BG-11 com adição de propionato, obtendo 28,2 % de biopolímeros em 14 d de cultivo (final da fase exponencial de crescimento).

Várias microalgas, principalmente as cianobactérias, são capazes de acumular biopolímeros intracelular, principalmente o poli- β -hidroxibutirato e o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) que pertencem ao grupo dos poli-hidroxicanoatos. Ao modificar as condições de cultivo, principalmente os nutrientes, consegue-se desviar as vias

metabólicas fazendo com que o micro-organismo sintetize maiores quantidades de biopolímeros.

Estudos estão sendo realizados com misturas fotossintéticas de bactérias e algas que acumulam PHA em condições com diferentes concentrações de nutrientes e tem alcançado rendimentos de PHB de 20 %. A utilização de culturas fotossintéticas mistas (microalgas e bactérias) surgiu como um sistema alternativo para a produção de PHA, com o potencial avanço de minimizar custos através da utilização da energia solar (FRADINHO et al., 2013).

A biomassa desengordurada da microalga *Dunaliella tertiolecta* foi utilizada para a produção de biopolímeros utilizando diferentes concentrações salinas, obtendo rendimentos de 82 % (GOO et al., 2013). Rendimentos altos de biopolímeros podem ser alcançados pelas microalgas. Assim é possível observar que diversas microalgas são capazes de acumular intracelularmente grânulos de PHB. Porém, comportamentos distintos são verificados, devido a utilização de diferentes microalgas, fontes e concentrações de nutrientes e condições de cultivo.

4. CONCLUSÃO

A fase de crescimento que propiciou o maior acúmulo de grânulos de PHB foi a fase de maior crescimento celular. Dentre as microalgas estudadas, as que mais produziram biopolímeros foram *Nostoc ellipsosporum* (19,27 %) e *Spirulina* sp. LEB 18 (20,62 %), nos tempos de 10 e 15 d, respectivamente. Portanto, é necessário mais estudos sobre as condições de cultivo e aumento de escala para verificar a potencial atuação da *Nostoc ellipsosporum* e *Spirulina* sp. LEB 18 para a produção de biopolímeros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC – **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 17th ed., HORWITZ, W. ed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

BHATI, R.; MALLICK, N. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by a N₂-fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* Agardh. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 505-512, 2012.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.

COLLA, L. M.; MUCCILO-BAISCH, A. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerol in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 405-411, 2008.

CÓRDOBA, L. T.; BOCANEGRA, A. R. D.; LLORENTE, B. R.; HERNÁNDEZ, E. S.; ECHEGOYEN, F. B.; BORJA, R.; BEJINES, F. R.; MORCILLO, M. F. C. Batch culture growth of *Chlorella zofingiensis* on effluent derived from two-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid waste. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 1-8, 2008.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; DALCANTON, F.; REICHERT, C. C.; DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic, cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 61c, p. 105-110, 2006.

FRADINHO, J. C.; DOMINGOS, J. M. B.; CARVALHO, G.; OEHMEN, A.; REIS, M. A. M. Polyhydroxyalkanoates production by a mixed photosynthetic consortium of bacteria and algae. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 146-153, 2013.

GOO, B. G.; BAEK, G.; CHOI, D. J.; PARK, Y. I.; SYNYTSYA, A.; BLEHA, R.; SEONG, D. H.; LEE, C. G.; PARK, J. K. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 343-350, 2013.

HENRARD, A. A.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium* sp.. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4897-4900, 2011.

IAU, M-H.; YEW, S-P.; TOH, P. S. Y.; CHONG, A. S. C.; CHU, W-L.; PHANG, S-M.; NAJIMUDIN, N.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 144-151, 2005.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. **Applied Energy**, v. 88, p. 3336-3341, 2011.

LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 397-442, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12^a edição, editora Artmed, Porto Alegre, 2010.

MALLICK, N.; GUPTA, S.; PANDA, B.; SEN, R. Process optimization for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production by *Nostoc muscorum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 125-130, 2007.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MOHAMMADI, M.; HASSAN, M. A.; PHANG, L-Y.; SHIRAY, Y.; MAN, H. C.; ARIFFIN, H. Intracellular polyhydroxyalkanoates recovery by cleaner halogen-free methods towards zero emission in the palm oil mill. **Journal of Cleaner Production**, v. 37, p. 353-360, 2012.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1038-1042, 2008.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift Naturforschung**, v. 63c, p. 144-150, 2008.

MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecido com *Spirulina platensis*: características físico-química, sensorial e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 333-340, 2006.

NISHIOKA, M. NAKAI, K.; MIYAKE, M.; ASADA, Y.; TAYA, M. Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate-limited conditions. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1095-1099, 2001.

NONHEBEL, S. Renewable energy and food supply: will there be enough land? Renewable and Sustainable **Energy Reviews**, v. 9, p. 191-201, 2005.

OLTRA, C. Stakeholder perceptions of biofuels from microalgae. **Energy policy**, v. 39, p. 1774-1781, 2011.

PANDA, B. JAIN, P.; SHARMA, L.; MALLICK, N. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1296-1301, 2006.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO_x and NO_x resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3132-3136, 2011.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

SAMANTARAY, S.; MALLICK, N. Production and characterization of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) polymer from *Aulosira fertilissima*. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 803-814, 2012.

SANKHLA, I. S.; BHATI, R.; SINGH, A. K.; MALLICK, N. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxivalerate) co-polymer production from a local isolate, *Brevibacillus invocatus* MTCC 9039. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1947-1953, 2010.

SATYANARAYANA, A. B.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*, v. 35, p. 291-311, 2011.

SHARMA, L.; MALLICK, N. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1304-1310, 2005.

SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. K.; MISHRA, S. Polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, p. 255-260, 2010.

SILVA, M. J.; FIGUEIREDO, B. R. S.; RAMOS, R. T. C.; MEDEIROS, E. S. F. Food resources used by three species of fish in the semi-arid region of Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 8, n. 4, p. 825-833, 2010.

WU, G. F.; WU, Q. Y.; SHEN, Z. Y. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Bioresource Technology*, v. 76, p. 85-90, 2001.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler.** Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS PELA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18 EM CULTIVOS COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E REDUÇÃO DE NITROGÊNIO

RESUMO

Os problemas ambientais relacionados aos resíduos poliméricos estão se tornando mais visíveis com o passar do tempo. Uma alternativa para diminuir os problemas causados por estes descartes é a utilização de biopolímeros, que possam ser sintetizados por microalgas. O objetivo deste trabalho foi estimular a síntese de biopolímeros a partir da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, cultivada com diferentes fontes de carbono e redução de nitrogênio. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores fechados de 2 L. A concentração inicial de inóculo foi $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ e os ensaios foram mantidos em estufa termostatizada a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ com iluminância de $41,6 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{fótons}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12 h claro/escuro. Foram estudados cultivos autotróficos e mixotróficos, utilizando glicose, acetato de sódio e bicarbonato de sódio como fonte de carbono. Os maiores rendimentos de biopolímeros bruto (44,19 %) foram obtidos quando se utilizou cultivo autotrófico, com $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio e redução de 90 % da fonte de nitrogênio, representando aumento de 3,9 vezes o rendimento dos biopolímeros bruto em relação ao experimento sem a redução de nitrogênio.

Palavras-chave: biopolímeros, carbono, microalga, nitrogênio.

ABSTRACT

Environmental problems related to polymeric waste are becoming more visible over time. An alternative to reduce the problems caused by these discharges is the use of biopolymers, which can be synthesized by microalgae. The aim of this work was to stimulate the synthesis of biopolymers from the cyanobacterium *Spirulina* strain LEB 18, growing in different sources of carbon and reduced nitrogen. The cultures were carried out in 2 L closed photobioreactors. The initial inoculum concentration was 0.15 g L^{-1} and the tests were kept in a controlled oven at 30°C with illuminance of $41.6 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and photoperiod of 12 h light/dark. Mixotrophic and autotrophic cultures were studied using glucose, sodium acetate and sodium bicarbonate as a carbon source. The highest yields of crude biopolymers (44.19 %) were obtained when using autotrophic cultures, with 8.4 g L^{-1} sodium bicarbonate and 90 % of nitrogen reduction. This condition increase 3.9 times the yield of crude biopolymers compared to the experiment without the reduction of nitrogen.

Key words: biopolymers, carbon, microalgae, nitrogen.

1. INTRODUÇÃO

Com o avanço do preço internacional do barril de petróleo e a localização das reservas mundiais, é necessário o desenvolvimento de tecnologias que explorem matérias-primas renováveis. Após o suprimento de necessidades energéticas, a maior demanda pelo uso de derivados de petróleo como matéria-prima consiste na produção de polímeros (SILVA et al., 2007). Uma alternativa para reduzir a demanda de recursos não renováveis (petróleo) e, conseqüentemente, diminuir a emissão de gás carbônico (CO₂) para a atmosfera seria utilizando microalgas (ANDRADE et al., 2008) para a produção de alguns bioprodutos, como, os biopolímeros.

Grande parte do lixo polimérico é depositada em aterros sanitários, que devido a sua dificuldade de degradação, acabam comprometendo a circulação de gases e líquidos. Desta forma a decomposição de outros materiais constituintes do lixo é dificultada, desestabilizando as áreas dos aterros. Estas áreas estão em escassez, sendo necessária a busca por polímeros que não causem esses problemas (LIMA et al., 2001). Surge como alternativa a utilização de biopolímeros (poli-hidroxiclcanoatos – PHA), o qual se degradam em dióxido de carbono e água por ataque bacteriano em curto período de tempo, de 3 meses a 1 ano. Além de serem biodegradáveis apresentam características biocompatíveis com células e tecidos, possuem propriedades termoplásticas e características físicas e mecânicas semelhantes ao polipropileno (KONAGESKI Jr., 2009; ABE; DOI, 1999).

As microalgas sintetizam alguns poli-hidroxiclcanoatos, como o poli-β-hidroxi-butirato (PHB), que além de não ser tóxico, possui características de termoplasticidade e pode ser produzido por recursos renováveis. Este polímero apresenta alto grau de polimerização, são cristalinos, opticamente ativos, isotáticos e insolúveis em água (HAZER et al., 2012; REDDY et al., 2003).

As cianobactérias tem potencial para produção de biopolímeros e o seu rendimento pode ser incrementado através da limitação de nutrientes, condições estressantes de cultivo, cepas recombinadas (SHRIVASTAV et al., 2010), controle de fluxo metabólico e uso de diferentes biorreatores (SILVA et al., 2007). O cultivo de microalgas não demanda grandes quantidades de terra e pode ocupar áreas impróprias para agricultura, não competindo com a produção de alimentos (NONHEBEL, 2005).

A deficiência de nutrientes no meio pode fazer com que as microalgas adaptem seu metabolismo à nova condição (MATA et al., 2010). A síntese de biopolímeros, normalmente ocorre quando há excesso de fonte de carbono e energia, e limitação, de pelo

menos, um dos nutrientes necessários à multiplicação das células microbianas (nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro, entre outros) (LIMA et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi estimular a síntese de biopolímeros a partir da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, cultivada com diferentes fontes de carbono e redução de nitrogênio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e Meio de Cultivo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi isolada da Lagoa Mangueira (33°30'12"S, 53°08'58"W) localizada na cidade de Santa Vitória do Palmar/RS (Brasil) (MORAIS et al., 2008). O cultivo foi realizado em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) formulado de acordo com a Tabela 1. O meio utilizado nos experimentos foi modificado alterando a fonte de carbono e nitrogênio.

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk.

Reagentes	Concentração (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,50
NaNO ₃	2,50
K ₂ SO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
EDTA	0,08
Solução A5	1,0 mL
Solução B6	1,0 mL

Fonte: Zarrouk, (1966).

Solução A₅: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂.4H₂O: 1,81; ZnSO₄.7H₂O: 0,22; CuSO₄.5.H₂O: 0,08; Na₂MoO₄: 0,02.

Solução B₆: (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,96; K₂Cr₂(SO₄)₄.24H₂O: 96,0; NiSO₄.7H₂O: 47,85; Na₂WO₄.2H₂O: 17,94; TiOSO₄.H₂SO₄.8H₂O: 61,1; Co(NO₃)₂.6H₂O: 43,98.

2.2. Condições de Cultivo

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores fechados de 2 L, com agitação contínua através da injeção de ar estéril, para evitar a precipitação da microalga. A concentração inicial da biomassa foi $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ e volume inicial 1,5 L. Os cultivos foram mantidos em câmara termostatizada a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 d. A iluminância utilizada foi $41,6 \mu\text{mol}_{\text{fótons}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12 h claro/escuro, mantida através de lâmpadas fluorescentes de 40 W.

Foram realizados cultivos autotróficos e mixotróficos, utilizando glicose e acetato de sódio como fonte de carbono orgânica e bicarbonato de sódio como fonte de carbono inorgânica. A fonte de nitrogênio foi reduzida em 90 % comparado ao meio Zarrouk. As fontes de carbono e concentrações utilizadas foram bicarbonato de sódio (8,4; 16,8; $25,2 \text{ g.L}^{-1}$), glicose (0,2; 0,4; $0,6 \text{ g.L}^{-1}$) e acetato de sódio (0,2; 0,4; $0,6 \text{ g.L}^{-1}$). Realizou-se ensaios misturando glicose (0,2; 0,4; $0,6 \text{ g.L}^{-1}$) com $16,8 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio e acetato de sódio (0,2; 0,4; $0,6 \text{ g.L}^{-1}$) com $16,8 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio. Foram realizados experimentos com meio Zarrouk padrão (Tabela 1) para comparação dos rendimentos de biopolímeros bruto. Todos os inóculos foram adaptados por 30 d em seus respectivos meios de cultivo.

2.3. Determinações Analíticas

Diariamente foram coletadas amostras assepticamente para acompanhamento da concentração celular e pH. A concentração celular foi determinada através da densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro (Quimis Q798DRM, Brasil), com curva de calibração que relaciona densidade óptica com peso da biomassa microalgal (COSTA et al., 2006). A determinação do pH foi realizada em pHmetro digital (Quimis Q400H, Brasil), segundo metodologia da AOAC (2000).

2.4. Determinação dos Parâmetros Cinéticos

A partir das curvas de crescimento celular da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, foram obtidas a concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$, g.L^{-1}), produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$, $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}). A produtividade celular foi

obtida segundo a Equação 1 (BAILEY; OLLIS, 1986), onde X é a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t (d) e X_0 é a concentração celular de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t_0 (d).

$$P_c = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad (1)$$

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi calculada por regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento (SCHMIDELL et al., 2001) de acordo com a Equação 2.

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

2.5. Extração de Biopolímeros Bruto

No 15º d de cultivo com a cianobactéria, este foi centrifugado a 7500 rpm por 20 min em temperatura ambiente (Hitachi-Japão) para separar a biomassa úmida com o biopolímero do meio de cultivo. Após, para cada 1 g de biomassa seca, foi adicionado 100 mL de água destilada e 25 mL de hipoclorito de sódio (10-12 % de cloro ativo (m/v)) na biomassa úmida e mantido sob agitação por 10 min. A suspensão resultante foi levada à centrifugação (7500 rpm por 20 min em temperatura ambiente). A seguir descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 100 mL de água destilada. Centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se este processo adicionando 50 mL de acetona. O precipitado final (biopolímeros bruto) foi seco em estufa a 35 °C por 48 h. O rendimento foi calculado, a partir da Equação 3, onde: η é o rendimento de biopolímeros bruto em relação a biomassa microalgal (%), m_{bb} é a massa final de biopolímeros bruto obtida da extração da biomassa microalgal (g) e m_{ma} é a biomassa microalgal (g).

$$\eta = \frac{m_{\text{bb}} * 100}{m_{\text{ma}}} \quad (3)$$

2.6. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram tratados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias dos parâmetros analisados, com nível de confiança de 95 %.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

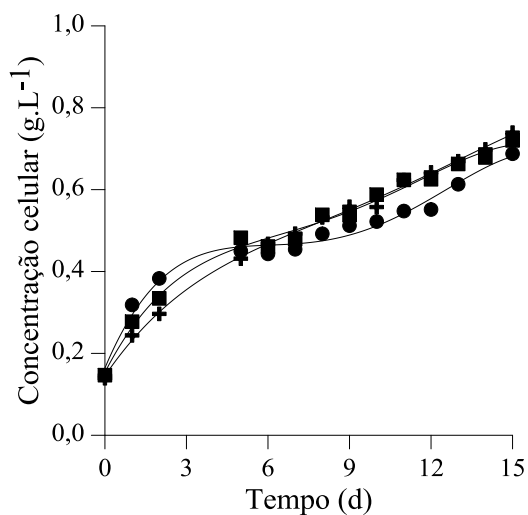
As curvas de crescimento da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 ao utilizar diferentes meios de cultivo, foram semelhantes, não apresentando diferença em relação à fonte de carbono utilizada (Figuras 1 e 2).

Os ensaios não apresentaram fase lag de crescimento, pois o inóculo de cada microalga foi adaptado com seu respectivo meio de cultivo. Independente da fonte de carbono utilizada não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na velocidade específica máxima de crescimento dos cultivos (Tabela 2). Na fase exponencial, mesmo o experimento contendo a máxima concentração de carbono, apresentou condições favoráveis ao crescimento celular sem limitação nutricional.

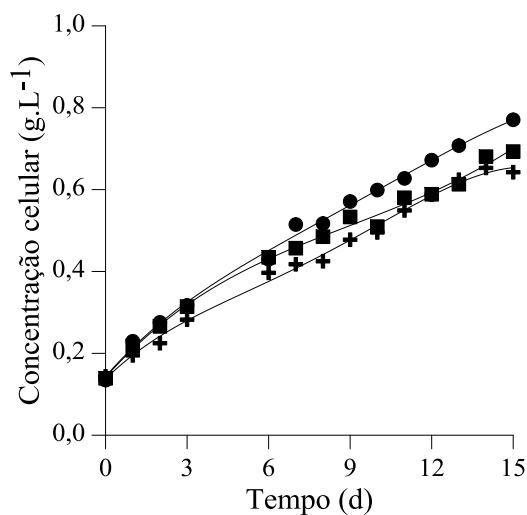
O cultivo que obteve máximo crescimento celular foi o que utilizou apenas bicarbonato de sódio como fonte de carbono ($0,86 \text{ g.L}^{-1}$) e concentração reduzida em 90 % da fonte de nitrogênio (Figura 2). O ensaio com meio Zarrouk padrão apresentou $\mu_{\text{máx}}$ maior ($0,12 \text{ d}^{-1}$) em relação aos demais ensaios. Como o bicarbonato de sódio é a fonte de carbono original do meio de cultivo, as células já possuem as enzimas necessárias para utilizar esse nutriente estimulando o máximo crescimento celular, comparado aos ensaios que possuíam duas fontes de carbono.

Os experimentos foram finalizados ao 15º d devido ao início da fase estacionária de crescimento. Bioquimicamente porque nesta fase, geralmente a produção de biocompostos intracelulares ocorre nas fases de mínimo crescimento microbiano. No caso de biopolímeros, como eles são materiais de reserva energética sua produção ocorre durante a fase exponencial, paralelo ao crescimento, pois assim o micro-organismo garante sua sobrevivência nas próximas etapas em que ocorre a limitação das fontes de nutrientes.

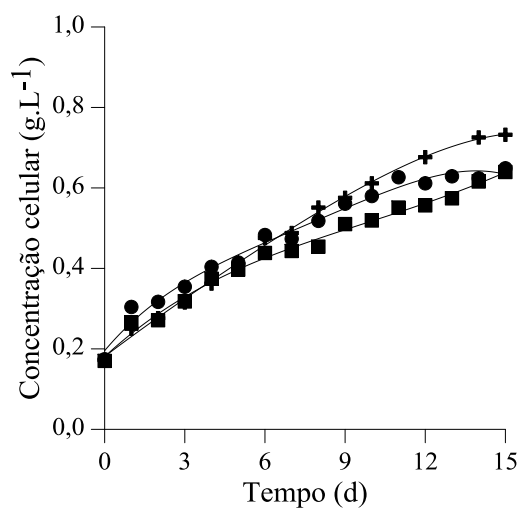
Figura 1 – Curvas de crescimento da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 em função do tempo para os experimentos realizados com redução de nitrogênio ($0,25 \text{ g.L}^{-1}$) em meio de cultivo contendo: bicarbonato de sódio ($16,8 \text{ g.L}^{-1}$) e glicose (a), bicarbonato de sódio ($16,8 \text{ g.L}^{-1}$) e acetato de sódio (b), glicose (c) e acetato de sódio (d). As concentrações de glicose e acetato de sódio variaram em $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ (+), $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ (■) e $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ (●).



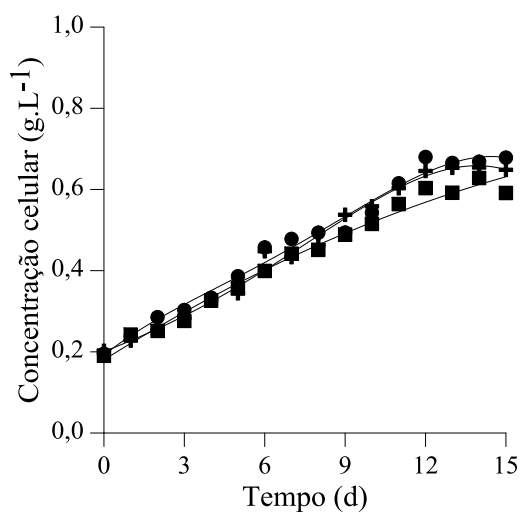
(a)



(b)

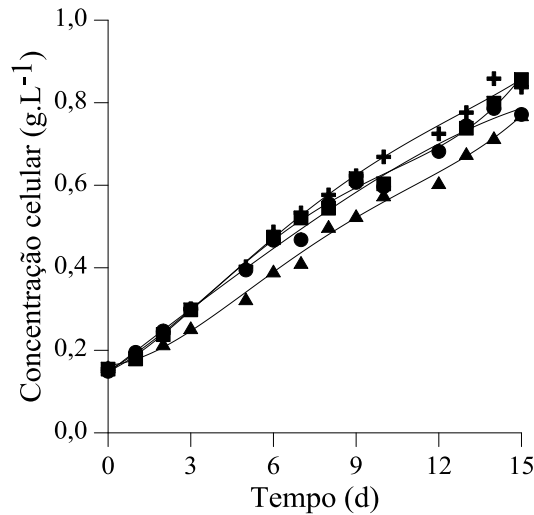


(c)



(d)

Figura 2 – Curvas de crescimento da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 em função do tempo para os experimentos com meio de cultivo contendo redução de nitrogênio ($0,25 \text{ g.L}^{-1}$) e bicarbonato de sódio nas concentrações: $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ (+), $16,8 \text{ g.L}^{-1}$ (■), $25,2 \text{ g.L}^{-1}$ (●) e meio Zarrouk padrão (▲).



Anteriormente foram realizadas extrações de biopolímeros bruto a cada 5 d durante 25 d, o qual se verificou que no tempo de 15 d (final da fase exponencial e início da fase estacionária) obteve-se maior rendimento de biopolímeros bruto. Sharma; Mallick (2005) estudaram diferentes condições de cultivo para a cianobactéria *Nostoc muscorum* para a produção de biopolímeros, obtendo maiores rendimentos na fase estacionária de crescimento (8,6 %). Este fato também foi verificado por Panda et al. (2006), quando utilizaram *Synechocystis* sp. PCC 6803, obtendo rendimentos de 4,5 % na fase estacionária de crescimento.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18. A fonte de nitrogênio influencia diretamente na síntese de biopolímeros. Ao reduzir em 90 % o nitrato de sódio (NaNO_3), obteve-se um aumento de 3,9 vezes o rendimento final de biopolímeros bruto (10,26 – 40,0 %).

No experimento contendo meio de cultivo Zarrouk padrão as quantidades de bicarbonato de sódio e nitrato de sódio foram $16,8 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,5 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Devido à alta concentração de nitrogênio, este experimento não apresentava condições próprias para síntese de biopolímeros bruto (10,26 %). No experimento contendo $16,8 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 e redução de 90 % da fonte de nitrogênio, o rendimento de biopolímeros bruto foi 40 %. Observou-se também que no ensaio com meio Zarrouk padrão a $\mu_{\text{máx}}$ foi o dobro do ensaio com redução de nitrogênio.

Tabela 2 – Concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$, g.L⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d⁻¹), produtividade celular máxima ($P_{m\acute{a}x}$, g.L⁻¹.d⁻¹) e rendimento de biopolímeros bruto (η , % g_{biopolímero}·g_{biomassa}⁻¹) extraído da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 cultivadas com diferentes fontes de carbono (g.L⁻¹).

Fonte de carbono	Concentração da fonte de carbono				
		$X_{m\acute{a}x}$	$\mu_{m\acute{a}x}$	$P_{m\acute{a}x}$	η
Glicose e 16,8 g.L ⁻¹ bicarbonato de sódio	0,2	0,74±0,12 ^a	0,06±0,00 ^{abc}	0,10±0,01 ^{bc}	11,33±1,09 ^{aA}
	0,4	0,72±0,11 ^a	0,06±0,00 ^{bcd}	0,13±0,02 ^{ab}	12,30±0,22 ^{aA}
	0,6	0,69±0,16 ^a	0,04±0,00 ^a	0,17±0,01 ^a	10,05±1,34 ^{aA}
Acetato de sódio e 16,8 g.L ⁻¹ bicarbonato de sódio	0,2	0,65±0,15 ^a	0,09±0,00 ^{ef}	0,05±0,02 ^{de}	11,58±0,27 ^{aA}
	0,4	0,69±0,10 ^a	0,09±0,00 ^{def}	0,08±0,02 ^{cde}	11,32±3,17 ^{aA}
	0,6	0,77±0,17 ^a	0,08±0,00 ^{cdef}	0,09±0,00 ^{bcd}	11,93±0,69 ^{aA}
Bicarbonato de sódio	8,4	0,86±0,01 ^a	0,07±0,01 ^{cdef}	0,05±0,01 ^{cde}	44,19±0,15 ^{bA}
	16,8	0,86±0,17 ^a	0,06±0,01 ^{bcd}	0,06±0,02 ^{cde}	40,00±1,88 ^{bB}
	25,2	0,79±0,01 ^a	0,09±0,00 ^{def}	0,05±0,00 ^{de}	37,57±3,16 ^{bB}
Glicose	0,2	0,73±0,06 ^a	0,08±0,00 ^{def}	0,08±0,00 ^{cde}	11,31±0,20 ^{aA}
	0,4	0,64±0,07 ^a	0,05±0,00 ^{ab}	0,10±0,01 ^{bcd}	10,38±2,88 ^{aA}
	0,6	0,65±0,01 ^a	0,07±0,00 ^{cde}	0,13±0,02 ^{ab}	10,77±0,47 ^{aA}
Acetato de sódio	0,2	0,65±0,11 ^a	0,09±0,01 ^f	0,04±0,00 ^e	7,64±0,46 ^{aA}
	0,4	0,63±0,05 ^a	0,07±0,01 ^{cdef}	0,05±0,01 ^{cde}	8,18±0,70 ^{aA}
	0,6	0,68±0,03 ^a	0,08±0,00 ^{cdef}	0,04±0,00 ^{de}	7,83±0,01 ^{aA}
Meio Zarrouk Padrão	16,8	0,77±0,01 ^a	0,12±0,00 ^g	0,04±0,00 ^{de}	10,26±0,60 ^a

*Letras minúsculas levam em consideração todos os experimentos, letras maiúsculas levam em consideração as suas respectivas fontes de carbono. Letras iguais, na mesma coluna, não houve diferença significativa com nível de confiança de 95 %.

**desvio padrão 0,00 significa menor que 0,006.

Os valores da $\mu_{m\acute{a}x}$ estão relacionados ao metabolismo, pois quando a energia é utilizada para o crescimento celular, a velocidade específica máxima de crescimento é maior (ensaios com meio Zarrouk padrão). Quando o metabolismo é desviado para a síntese de biopolímeros, obtém-se valores intermediários de $\mu_{m\acute{a}x}$ (0,06 d⁻¹ a 0,09 d⁻¹). Jiang et al. (2011)

ao utilizar águas residuárias juntamente com meio F/2 para a microalga *Nannochloropsis* sp. produziu maiores teores de lipídios (30,3 %), obtendo velocidade específica máxima de crescimento de $0,33 \text{ d}^{-1}$. Os teores de lipídios foram menores (23,2 %), quando a $\mu_{\text{máx}}$ foi $0,54 \text{ d}^{-1}$. Ao cultivar a cianobactéria *Cyanobium* sp. em meio BG-11, em modo semicontínuo com adição de $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 , o valor de $\mu_{\text{máx}}$ encontrado foi $0,13 \text{ d}^{-1}$ (HENRARD et al., 2011).

Os valores de $P_{\text{máx}}$ foram encontrados entre o 2º e o 8º d de cultivo, pois nesta etapa inicial os nutrientes estavam disponíveis em maior concentração, já que a cianobactéria foi previamente adaptada com seu respectivo meio de cultivo. A produtividade no início dos ensaios se deve também à produção de poli- β -hidroxibutirato intracelular não ocorrer no início do cultivo, não concorrendo com a produtividade neste período. Nos ensaios que não se utilizou fontes orgânicas de carbono, as $P_{\text{máx}}$ foram obtidas entre o 5º e o 8º d de cultivo. Produtividades celulares semelhantes ($0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foram encontradas por Henrard et al. (2011) quando utilizou a cianobactéria *Cyanobium* sp. Ao utilizar a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com acréscimo de 10 g.L^{-1} de NaHCO_3 , foi encontrada $P_{\text{máx}}$ de $0,08 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (ANDRADE et al., 2008).

O ensaio que apresentou maior rendimento de biopolímeros bruto foi quando se utilizou a concentração de $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio e 10 % de nitrogênio ($0,25 \text{ g.L}^{-1}$) (Tabela 2). Observou-se também que o incremento na concentração de NaHCO_3 de $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ para $16,8 \text{ g.L}^{-1}$ e $25,2 \text{ g.L}^{-1}$ proporcionou redução no rendimento de biopolímeros. Apesar da microalga necessitar alta concentração de fonte de carbono para estimular a síntese de biopolímeros, o excesso também pode prejudicar. Alta concentração de carbono faz com que o acetil-CoA entre na via de biossíntese de PHB, entretanto quando em excesso CoA livre inibe a ação da enzima β -cetotiolase que é responsável pela síntese de PHB. A adição de fontes orgânicas de carbono (glicose e acetato de sódio) no meio não estimulou o crescimento celular nem maior síntese de biopolímeros. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) no rendimento de biopolímeros ao adicionar o bicarbonato de sódio em cultivos contendo glicose e acetato de sódio. Na disponibilização de duas fontes endógenas de carbono, é esperado que a microalga dê preferência à utilização de uma delas. Nesse caso, como a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 é geralmente mantida em meio Zarrouk, já possui as estruturas necessárias ao consumo deste nutriente (bicarbonato de sódio), e assim a adição de duas fontes de carbono é dispensável. Jau et al. (2005) obtiveram 10 % de PHB a partir do cultivo de *Spirulina platensis* UMACC 161, utilizando 9 g.L^{-1} de bicarbonato de sódio e acréscimo de 0,5 % de acetato de sódio sem a presença de nitrogênio. Quando os mesmos autores utilizaram

NaHCO₃ com adição de CO₂, os rendimentos foram em torno de 3 %. Rendimentos de 47,4 % de PHB foram encontrados por Sharma et al. (2007) quando utilizaram a cianobactéria *Nostoc muscorum* em meio BG-11 sem fonte de nitrogênio e contendo acetato de sódio e glicose.

A microalga *Nostoc muscorum* Agarth foi utilizada para produção de biopolímeros (P(3HB-co-3HV)) utilizando diferentes fontes de carbono, como glicose, acetato, frutose, propionato e valerato. Ao utilizar 0,4 % de acetato e 0,4 % de glicose, os rendimentos de biopolímeros obtidos foram 28 e 26%, respectivamente. Porém, ao adicionar 0,4 % de valerato e 0,4 % de acetato, com restrição da fonte de nitrogênio, os rendimentos chegaram a 60 % (BHATI; MALLICK, 2012). Rendimentos menores (9,5 %) foram encontrados por Panda et al. (2006) ao utilizar a microalga *Synechocystis* sp. PCC 6803 em meio BG-11. Entretanto, quando foi cultivada sob deficiência de nitrogênio e fósforo adicionando acetato de sódio, o rendimento aumentou para 14,6 e 25,7 %, respectivamente.

O rendimento de biopolímeros microalgal é bem variável de acordo com as condições utilizadas. A cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 ao crescer em diferentes fontes de carbono (glicose, acetato de sódio e bicarbonato de sódio) e concentração da fonte de nitrogênio diferenciada, obteve rendimentos de biopolímeros bruto de 7,64 a 44,19 %. Estudos realizados por Samantaray; Mallick (2012) com a microalga *Aulosira fertilissima* para a otimização da produção de PHB utilizou variáveis como citrato (0,2 – 0,4 %), acetato (0,2 – 0,4 %), K₂HPO₄ (0 – 20 mg.L⁻¹) e período de incubação (2 – 14 d) encontrando rendimentos de 17,0 a 85,5 %.

Ao diminuir a quantidade de nitrogênio do meio de cultivo da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 houve maior produção de biopolímeros bruto. Para o cultivo autotrófico (16,8 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio) com redução de 90 % da fonte de nitrogênio apresentou 74,35 % mais biopolímeros bruto em comparação ao ensaio contendo quantidades de nitrogênio do meio padrão (Tabela 2). A microalga *Spirulina* é fonte produtora de proteínas (OGBONDA et al., 2007), necessitando de grande quantidade de nitrogênio para o seu crescimento. Quando a fonte de nitrogênio se torna escassa, a cianobactéria desvia suas vias metabólicas, produzindo biopolímeros (SHARMA et al., 2007), entre outros bioprodutos. Isso porque, na presença de maiores concentrações de nitrogênio, as microalgas produzem proteínas e não PHB.

Para que as microalgas sejam capazes de acumular biopolímeros é necessário desviar a via metabólica. As cianobactérias realizam a síntese de PHB por metabolismo diferente das bactérias. Isto ocorre devido à falta do ciclo tricarboxílico (TCA) completo, o qual desvia a acetil-CoA do TCA para a síntese de PHB. O acetil-CoA derivado para a

formação de PHB pode ser usado para diferentes biossínteses. A interrupção do TCA em cianobactérias serve para predominar o fornecimento de intermediários em vias biossintéticas tal como síntese de aminoácidos, carotenóides, clorofila e PHB, o qual pode ser uma fonte de armazenamento de reserva de carbono (SHRIVASTAV et al., 2010).

Na síntese de PHB a partir de acetil-CoA estão envolvidas três enzimas. β -cetotiolase, que catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando uma molécula de acetoacetil-CoA. Esta, por sua vez, é reduzida a D(-)-3-hidroxiacetil-CoA numa reação catalisada pela enzima 3-cetoacetil-CoA redutase NADPH dependente. O último passo compreende a polimerização da unidade D(-)-3-hidroxiacetil-CoA a produção do polímero, numa reação catalisada pela enzima PHA sintase (LIMA et al., 2001). A enzima chave para regulação da síntese de PHB é a β -cetotiolase. Com isso, os níveis de CoA aumentam desencadeando a síntese de poli- β -hidroxiacetirato.

4. CONCLUSÃO

O máximo rendimento de biopolímeros bruto alcançado foi 44,19 % quando a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada com 8,4 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio e redução de 90 % da fonte de nitrogênio. A redução dos nutrientes no meio de cultivo reduz os custos de produção de biopolímeros a partir de microalgas.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; DOI, Y. Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 185-192, 1999.

ANDRADE, M. R.; CAMERINI, F. V.; COSTA, J. A. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2031-2034, 2008.

AOAC – **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 17th ed., HORWITZ, W. ed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2^a ed., McGraw-Hill, Singapore, p. 397-398, 1986.

BHATI, R.; MALLICK, N. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by a N₂-fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* Agarth. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 505-512, 2012.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; DALCANTON, F.; REICHERT, C. C.; DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic, cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 61c, p. 105-110, 2006.

HAZER, D. B.; KILIÇAY, E.; HAZER, B. Poly(3-hydroxyalkanoate)s: Diversification and biomedical applications. A state of the art review. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 637-647, 2012.

HENRARD, A. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium* sp.. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4897-4900, 2011.

JAU, M.-H.; YEW, S.-P.; TOH, P. S. Y.; CHONG, A. S. C.; CHU, W.-L.; PHANG, S.-M.; NAJIMUDIN, N.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 144-151, 2005.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipids production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. **Applied Energy**, v. 88, p. 3336-3341, 2011.

KONAGESKI Jr., V. A. K.; DAGOSTINI, L.; RENZ, M. **Plásticos biodegradáveis: revisão sobre métodos de preparação e propriedades da biodegradação**. Departamento de Biologia e Química, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, 2009. <http://www.scribd.com/doc/3033642/PLASTICOS-BIODEGRADAVEIS>, acessado em 26 de agosto de 2012.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial** – Processos Fermentativos e Enzimáticos, v. 3. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for Biodiesel Production and other Applications: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p. 217–232, 2010.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 63c, p. 144-150, 2008.

NONHEBEL, S. Renewable energy and food supply: will there be enough land? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 9, p. 191-201, 2005.

OGBONDA, K. H.; AMINIGO, R. E.; ABU, G. O. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2207-2211, 2007.

PANDA, B.; JAIN, P.; SHARMA, L.; MALLICK, N. Optimization of cultural and nutrition conditions for accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1296-1301, 2006.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI.; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003.

SAMANTARAY, S.; MALLICK, N. Production and characterization of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) polymer from *Aulosira fertilissima*. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 803-814, 2012.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SHARMA, L.; SINGH, A. K.; PANDA, B.; MALLICK, N. Process optimization for poly-beta-hydroxybutyrate production in a nitrogen fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 987-993, 2007.

SHARMA, L.; MALLICK, N. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light-dark cycles, N and P status and carbon source. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1304-1310, 2005.

SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. K.; MISHRA, S. Polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 255-260, 2010.

SILVA, L. F.; GÓMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACINO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Griseb.** Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

SÍNTESE DE BIOPOLÍMEROS PELA MICROALGA *Spirulina* sp. LEB 18 EM CULTIVOS AUTOTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

RESUMO

Micro-organismos fotossintéticos, como as cianobactérias possuem capacidade de produzir biopolímeros, como o PHB (poli- β -hidroxibutirato), o qual possui características de biocompatibilidade e biodegradabilidade. O objetivo do trabalho foi estudar a produção de biopolímeros a partir da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, cultivada com bicarbonato de sódio e glicerina em diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo. A microalga utilizada foi *Spirulina* sp. LEB 18, cultivada em meio Zarrouk alterando as concentrações das fontes de carbono, nitrogênio e fósforo. Os cultivos autotróficos foram realizados com 8,4 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio e os cultivos mixotróficos com 2,44 mL.L⁻¹ de glicerina. O delineamento experimental fatorial completo 2² variou as concentrações das fontes de nitrogênio (0,05 g.L⁻¹ a 2,5 g.L⁻¹ de NaNO₃) e fósforo (0,1 g.L⁻¹ a 0,9 g.L⁻¹ de K₂HPO₄). A extração dos biopolímeros bruto foi realizada com hipoclorito de sódio e sucessivas lavagens com água e acetona. Tanto o bicarbonato de sódio quanto a glicerina estimularam a síntese de biopolímeros, porém o experimento que apresentou maior rendimento de biopolímeros bruto (54,48 %) foi quando se utilizou 8,4 g.L⁻¹ de NaHCO₃, 0,05 g.L⁻¹ de NaNO₃ e 0,1 g.L⁻¹ de K₂HPO₄. A variável nitrogênio apresentou diferença significativa para os dois delineamentos, enquanto que o fósforo não se mostrou significativo. A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 produz biopolímeros com a redução das fontes de nutrientes, reduzindo os custos do meio de cultivo e gerando produtos de alto valor agregado.

Palavras-chave: bicarbonato de sódio, cultivo autotrófico, nitrogênio.

ABSTRACT

Photosynthetic microorganisms, such as cyanobacteria are capable of producing biopolymers such as PHB (poly- β -hydroxybutyrate), which has characteristics of biocompatibility and biodegradability. The objective of this study was to stimulate the synthesis of biopolymers from the cyanobacterium *Spirulina* strain. LEB 18 cultured with sodium bicarbonate and glycerin in different concentrations of nitrogen and phosphorus. *Spirulina* strain LEB 18 was cultured in Zarrouk changing concentrations of carbon, nitrogen and phosphorus. The autotrophic culture was performed with 8.4 g L⁻¹ sodium bicarbonate and mixotrophic cultures with 2.44 glycerin mL L⁻¹. The factorial experimental design 2² varied concentrations of nitrogen (0.05 g L⁻¹ to 2.5 g L⁻¹ NaNO₃) and phosphorus (0.1 g L⁻¹ to 0.9 g L⁻¹ K₂HPO₄). The crude biopolymer extraction was performed with sodium hypochlorite and successive washing with water and acetone. Sodium bicarbonate and glycerin stimulated the synthesis of biopolymers, but the experiment that showed the highest yield of crude biopolymers (54.48 %) was the one that used 8.4 g L⁻¹ de NaHCO₃, 0.05 g L⁻¹ de NaNO₃ e 0.1 g L⁻¹ de K₂HPO₄. The variable nitrogen showed significant differences for both designs, while the phosphorous was not significant. *Spirulina* strain LEB 18, produces biopolymers with the reduction of nutrient sources, reducing the costs of culture medium and .generating products with high added value.

Key words: autotrophic culture, nitrogen, sodium bicarbonate.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas possuem capacidade para produção de diferentes compostos de interesse, como biocombustíveis, bioenergia, biomateriais, fármacos, carboidratos (DESAI; ATSUMI, 2013), ácidos graxos (TALEB et al., 2013) e biopolímeros (WANG et al., 2013). Alguns cultivos também são empregados na fixação de dióxido de carbono e gases de combustão (RADMANN et al., 2011; ROSA et al., 2011).

As microalgas podem ser consideradas um sistema alternativo, devido à sua natureza fotoautotrófica para a produção de biopolímeros, dentre estes, o poli- β -hidroxibutirato (PHB). Várias espécies de cianobactérias acumulam grânulos intracelulares de PHB como reserva de energia e carbono internamente as suas células quando estão em condições de estresse (BALAJI et al., 2013).

O PHB pertence ao grupo dos poli-hidroxialcanoatos (PHA), são poliésteres biodegradáveis que podem ser produzidos a partir de recursos renováveis ou resíduos biológicos (LAYCOCK et al., 2014). Possuem também a característica de serem termoplástico e biocompatível com células e tecidos (BALAJI et al., 2013). As fontes de carbono e nitrogênio afetam diretamente a síntese de PHA (CAMPOS et al., 2014). A glicerina pode ser acrescentada para a produção de PHB, que é fonte obtida de subproduto da produção de biodiesel (ASHBY et al., 2012; DOBROTH et al., 2011) e o bicarbonato de sódio é utilizado como fonte de carbono inorgânica para o crescimento celular de microalgas (ZARROUK, 1966).

Devido ao requerimento mínimo de nutrientes e à habilidade de crescer em presença de CO₂ e luz solar, as cianobactérias têm atraído interesse crescente na biossíntese para produzir combustíveis, produtos químicos (WANG et al., 2013) e serem exploradas como fonte alternativa para produção de PHB. A biomassa pode ser convertida em polímeros biodegradáveis a partir da energia solar que pode ajudar na redução dos custos de produção, o qual é um fator limitante para a substituição de polímeros sintéticos por biopolímeros biodegradáveis (SHRIVASTAV et al., 2010).

A biodegradação é dependente de vários fatores tal como atividade microbiana do ambiente, área de superfície de exposição, umidade, temperatura e pH (BALAJI et al., 2013). A degradabilidade destes materiais, após seu uso, permite que eles permaneçam no ciclo natural do carbono. As alterações químicas devem ser acompanhadas a partir da assimilação microbiana dos produtos da degradação, resultando em CO₂ e água. Se outros produtos são

formados, estes devem ser associados aos processos metabólicos normais dos micro-organismos (INNOCENTINI-MEI; MARIANI, 2005).

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de biopolímeros a partir da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com bicarbonato de sódio e glicerina e diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e Meio de Cultivo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi isolada da Lagoa Mangueira (33°30'12"S, 53°08'58"W) localizada na cidade de Santa Vitória do Palmar/RS (Brasil) (MORAIS et al., 2008). O cultivo foi realizado em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) formulado de acordo com a Tabela 1. O meio utilizado nos experimentos foi modificado alterando a fonte de carbono, nitrogênio e fósforo.

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk.

Reagentes	Concentração (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,50
NaNO ₃	2,50
K ₂ SO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
EDTA	0,08
Solução A5	1,0 mL
Solução B6	1,0 mL

Fonte: Zarrouk, (1966).

Solução A₅: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂.4H₂O: 1,81; ZnSO₄.7H₂O: 0,22; CuSO₄.5.H₂O: 0,08; Na₂MoO₄: 0,02.

Solução B₆: (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,96; K₂Cr₂(SO₄)₄.24H₂O: 96,0; NiSO₄.7H₂O: 47,85; Na₂WO₄.2H₂O: 17,94; TiOSO₄.H₂SO₄.8H₂O: 61,1; Co(NO₃)₂.6H₂O: 43,98.

2.2. Condições de Cultivo

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores fechados de 2,0 L, com agitação contínua através da injeção de ar estéril, para evitar a precipitação da microalga. A concentração inicial da biomassa foi $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ e volume inicial de 1,5 L. Os cultivos foram mantidos em câmara termostaticada a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 d. A iluminância utilizada foi $41,6 \mu\text{mol}_{\text{fótons}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12 h claro/escuro, mantida através de lâmpadas fluorescentes de 40 W.

Foram realizados cultivos autotróficos e mixotróficos, utilizando bicarbonato de sódio e glicerina, respectivamente. As concentrações utilizadas foram $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e $2,44 \text{ mL.L}^{-1}$ de glicerina, que correspondem a 1,2 g de carbono no meio de cultivo. As fontes de nitrogênio e fósforo variaram de acordo com delineamento experimental fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central. A fonte de nitrogênio (NaNO_3) variou de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ a $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ e a fonte de fósforo (K_2HPO_4) variou de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ a $0,9 \text{ g.L}^{-1}$. Os inóculos foram adaptados por 30 d no meio de cultivo com as menores concentrações de nutrientes.

2.3. Determinações Analíticas

2.3.1. Concentração Celular

Diariamente foram coletadas amostras assepticamente para acompanhamento da concentração celular e pH. A concentração celular foi determinada através da densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro (Quimis Q798DRM, Brasil), com curva de calibração que relaciona densidade óptica com peso da biomassa microalgal (COSTA et al., 2006). A determinação do pH foi realizada em pHmetro digital (Quimis Q400H, Brasil), segundo metodologia da AOAC (2000).

2.3.2. Concentração de Nutrientes

A cada 4 d foram determinados os consumos de carbono orgânico, carbono inorgânico, nitrogênio e fósforo. O carbono orgânico total (TOC) foi determinado em analisador TOC-L (Shimadzu, Japão), segundo metodologia SHIMADZU. O carbono inorgânico determinou-se através da alcalinidade, segundo método padrão for the

Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998). As concentrações de nitrogênio (CATALDO et al., 1975) e fósforo (PhosVer® 3, Hach, USA) foram determinadas utilizando métodos colorimétricos.

2.4. Determinação dos Parâmetros Cinéticos

A partir das curvas de crescimento celular da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 foram obtidas a concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$, g.L⁻¹), produtividade máxima ($P_{m\acute{a}x}$, g.L⁻¹.d⁻¹) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d⁻¹). A produtividade celular (P_c) foi obtida segundo a Equação 1 (BAILEY; OLLIS, 1986), onde X é a concentração de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t (d) e X_0 é a concentração celular de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t_0 (d).

$$P_c = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad (1)$$

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi calculada por regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento (SCHMIDELL et al., 2001) de acordo com a Equação 2.

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

2.5. Extração de Biopolímeros Bruto

No 15º d de cultivo, a cianobactéria foi centrifugada a 7500 rpm por 20 min em temperatura ambiente (Hitachi-Japão) para separar a biomassa úmida com o biopolímero do meio de cultivo. Após, para cada 1 g de biomassa seca, foi adicionado 100 mL de água destilada e 25 mL de hipoclorito de sódio (10-12 % de cloro ativo (m/v)) na biomassa úmida e mantido sob agitação por 10 min. A suspensão resultante foi levada à centrifugação (7500 rpm por 20 min em temperatura ambiente). A seguir descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 100 mL de água destilada. Centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se este processo adicionando 50 mL de acetona. O precipitado final (biopolímeros bruto) foi seco em estufa a 35 °C por 48 h. O rendimento foi calculado, a

partir da Equação 3, onde: η é o rendimento de biopolímeros bruto em relação a biomassa microalgal (%), m_{bb} é a massa final de biopolímeros bruto obtida da extração da biomassa microalgal (g) e m_{ma} é a biomassa microalgal (g).

$$\eta = \frac{m_{bb} * 100}{m_{ma}} \quad (3)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cultivos Autotróficos

As curvas de crescimento da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 1a) ao utilizar $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 em diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo, foram diferentes quando se variou a concentração da fonte de nitrogênio (NaNO_3), limitando o crescimento celular na menor concentração ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3). Esta limitação deve-se à microalga *Spirulina* sp. LEB 18 possuir grande quantidade de proteína na sua biomassa, necessitando de nitrogênio para o seu crescimento celular. Os experimentos não apresentaram fase lag de crescimento porque o inóculo foi adaptado com as menores concentrações de nutrientes ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4), fazendo com que os experimentos iniciassem na fase exponencial de crescimento.

Os experimentos que apresentaram maior concentração celular ($X_{m\acute{a}x}$) também apresentaram maior produtividade celular ($P_{m\acute{a}x}$) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) (Tabela 2). Porém apresentaram menor rendimento de biopolímeros bruto (Tabela 2).

O crescimento celular se mostrou inversamente proporcional à produção de biopolímeros bruto (ensaios 3, 4, 5, 6 e 7) enquanto que os experimentos que apresentaram menores crescimentos celulares, foram quando se utilizou concentrações inferiores de nitrogênio apresentando maiores rendimentos finais de biopolímeros bruto (ensaios 1 e 2). Deve-se ao desvio metabólico ocasionado pela limitação de nitrogênio, que estimula uma situação de estresse ocasionando a síntese de biopolímeros.

Figura 1 – Curvas de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (a), concentração de NaHCO_3 (b), concentração de NaNO_3 (c) e concentração de K_2HPO_4 (d) em meio de cultivo Zarrouk com $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3 . Experimento 1 - $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (●), Experimento 2 - $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (■), Experimento 3 - $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (▲), Experimento 4 - $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (◆) e Experimentos 5, 6 e 7 (triplicata) - $1,225 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (+).

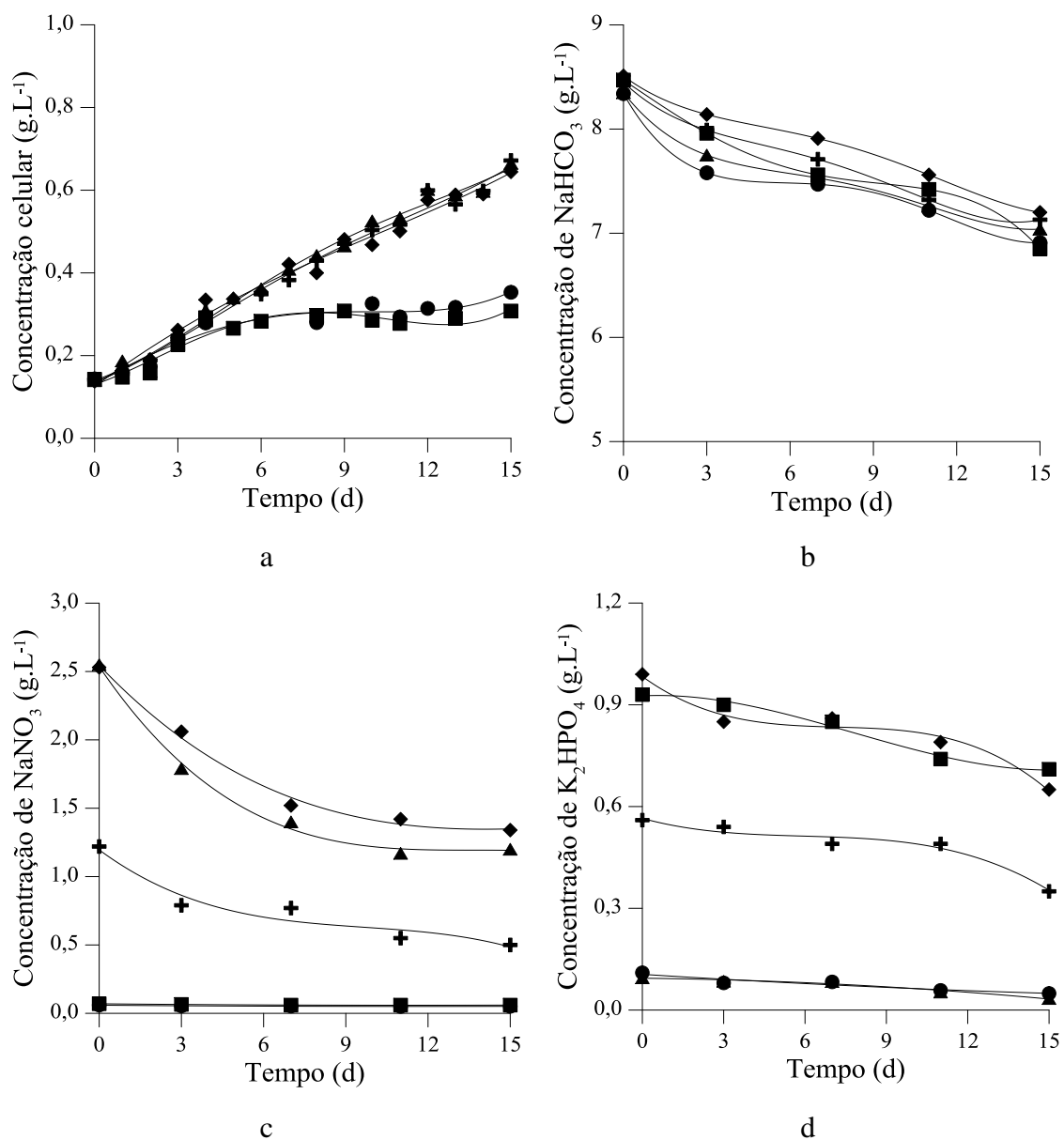
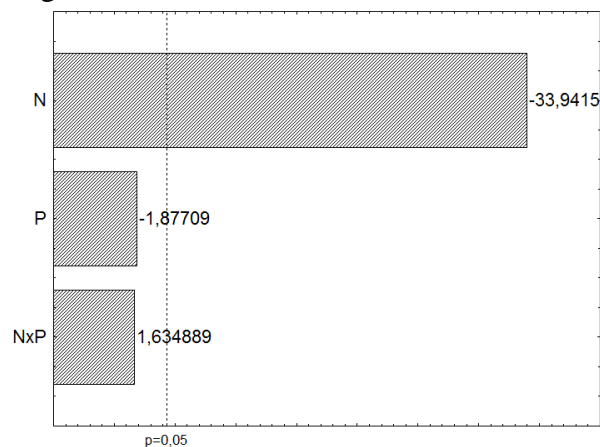


Tabela 2 – Concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$), produtividade celular máxima ($P_{m\acute{a}x}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e rendimento de biopolímeros bruto (η) a partir do delineamento experimental fatorial completo 2^2 ao utilizar a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio.

Ensaio	NaNO_3 (g.L^{-1})	K_2HPO_4 (g.L^{-1})	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L^{-1})	$P_{m\acute{a}x}$ ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d^{-1})	η (%)
1	0,05	0,1	0,35	0,067	0,052	54,48
2	0,05	0,9	0,31	0,066	0,048	50,42
3	2,5	0,1	0,66	0,089	0,099	12,63
4	2,5	0,9	0,64	0,075	0,095	12,35
5	1,225	0,5	0,67	0,070	0,105	11,14
6	1,225	0,5	0,69	0,068	0,099	12,38
7	1,225	0,5	0,65	0,070	0,100	13,45

A única variável que apresentou diferença significativa foi a fonte de nitrogênio, como mostra o gráfico de pareto (Figura 2). O experimento que obteve maior rendimento de biopolímeros bruto foi o ensaio 1, onde utilizou $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (Tabela 2). O delineamento utilizando o bicarbonato de sódio apresentou efeitos negativos em relação à variável nitrogênio (NaNO_3). Ao passar do nível superior ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) para o nível inferior ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$) houve incremento no rendimento de biopolímeros bruto em 33,94 %. Ao utilizar diferentes concentrações de fósforo o efeito foi menor, com incremento de 1,88 % ao passar do nível superior ($0,9 \text{ g.L}^{-1}$) para o nível inferior ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) de K_2HPO_4 .

Figura 2 – Gráfico de pareto do delineamento experimental fatorial completo 2^2 quando se utilizou $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio como fonte de carbono.



3.2. Cultivos Mixotróficos

As curvas de crescimento da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 3a) cultivadas com 2,44 mL.L⁻¹ de glicerina foram semelhantes quando se utilizou diferentes concentrações da fonte de fósforo (K₂HPO₄). Porém o crescimento celular nas menores concentrações de nitrogênio (0,05 g.L⁻¹ de NaNO₃) não foi observado, tendo a morte celular a partir do 2º dia de cultivo. Os experimentos não apresentaram fase lag de crescimento. Isto ocorreu porque o inóculo foi adaptado com as menores concentrações de nutrientes (0,05 g.L⁻¹ de NaNO₃ e 0,1 g.L⁻¹ de K₂HPO₄), fazendo com que o crescimento celular nos experimentos iniciasse na fase exponencial de crescimento.

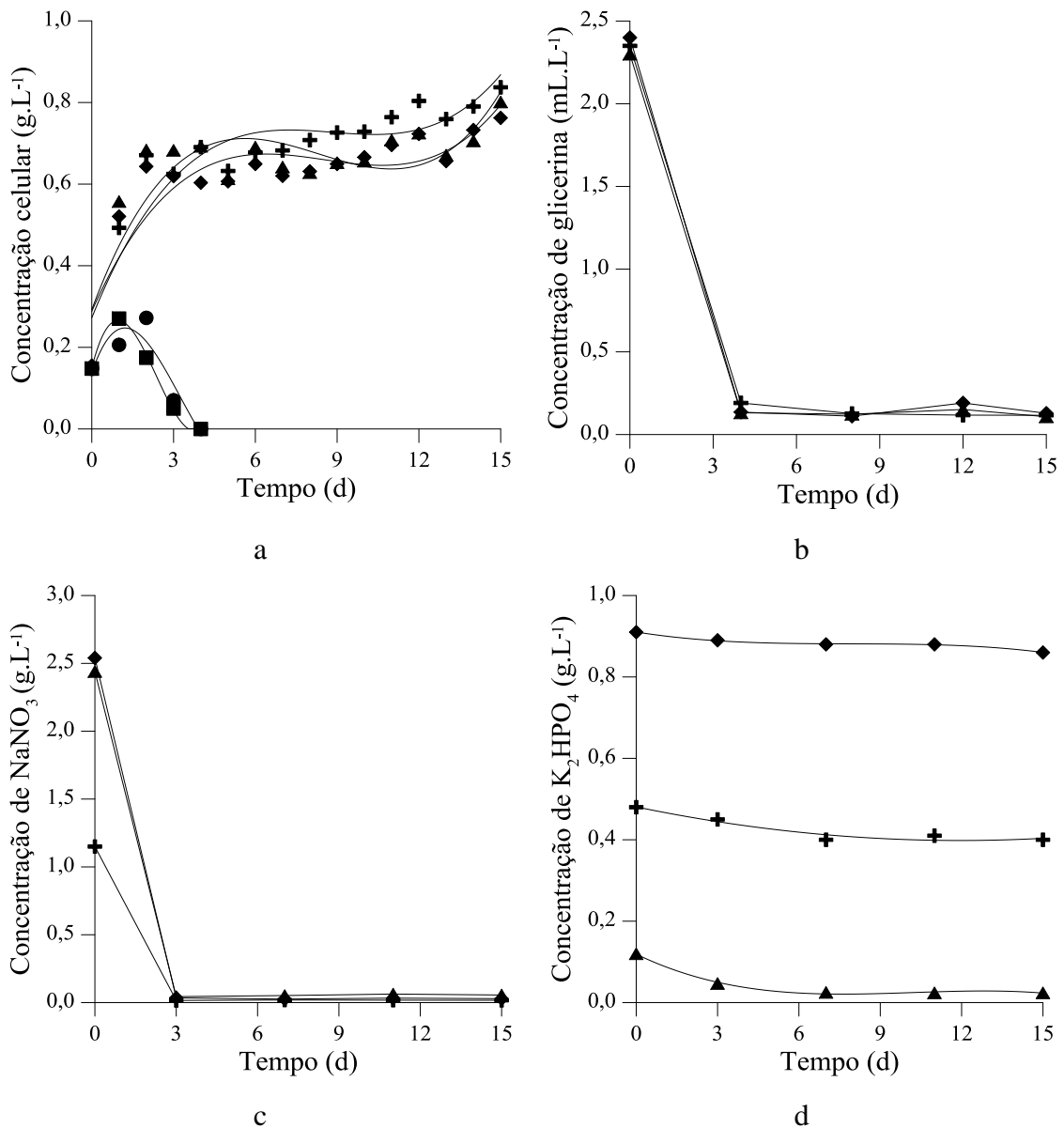
Os experimentos apresentaram concentração celular ($X_{m\acute{a}x}$), produtividade celular máxima ($P_{m\acute{a}x}$) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) (Tabela 3) bem semelhantes. Porém apresentaram rendimentos de biopolímeros bruto significativamente iguais (Tabela 3). As produtividades máximas foram obtidas entre o 1º e o 2º dia de cultivo, quando se obteve a maior taxa de crescimento celular (Figura 3a).

Tabela 3 – Concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), produtividade celular máxima ($P_{m\acute{a}x}$) e rendimento de biopolímeros bruto (η) a partir do delineamento experimental fatorial completo 2² ao utilizar a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com 2,44 mL.L⁻¹ de glicerina.

Ensaio	NaNO ₃ (g.L ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	$P_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d ⁻¹)	η (%)
1	0,05	0,1	*	*	*	*
2	0,05	0,9	*	*	*	*
3	2,5	0,1	0,80	0,41	0,043	16,17
4	2,5	0,9	0,76	0,36	0,046	19,37
5	1,225	0,5	0,87	0,40	0,055	18,25
6	1,225	0,5	0,85	0,30	0,056	16,21
7	1,225	0,5	0,79	0,33	0,053	19,15

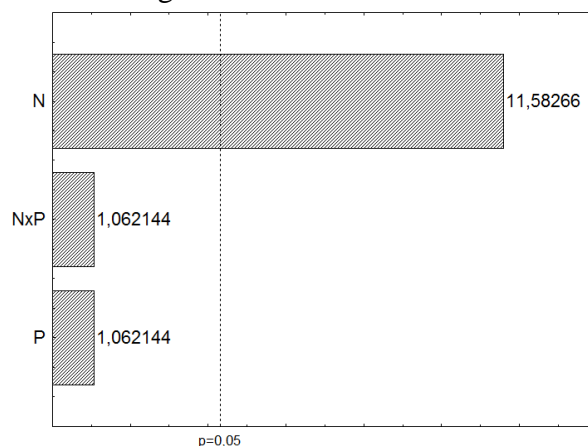
*Nestes ensaios a microalga morreu no 2º dia de cultivo, impossibilitando a determinação dos parâmetros cinéticos e rendimento de biopolímeros bruto.

Figura 3 – Curvas de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (a), concentração de glicerina (b), concentração de NaNO_3 (c) e concentração de K_2HPO_4 (d) em meio de cultivo Zarrouk com $2,44 \text{ mL.L}^{-1}$ de glicerina. Experimento 1 - $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (●), Experimento 2 - $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (■), Experimento 3 - $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (▲), Experimento 4 - $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (◆) e Experimento 5, 6 e 7 (triplicata) - $1,225 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 e $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (+).



O delineamento experimental mostrou que a única variável que apresentou diferença significativa foi a fonte de nitrogênio, como mostra o gráfico de pareto (Figura 4). Porém este resultado foi obtido porque as células da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 entraram em lise celular no 2º d de cultivo. Logo a fonte de nitrogênio influenciou no crescimento celular e não no rendimento de biopolímeros.

Figura 4 – Gráfico de pareto do delineamento experimental fatorial 2^2 quando se utilizou $2,44 \text{ mL.L}^{-1}$ de glicerina como fonte de carbono.



As células da cianobactéria em estudo, foram isoladas e adaptadas para o meio de cultivo Zarrouk com bicarbonato de sódio. Ao utilizar glicerina e quantidades mínimas de nitrogênio ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$), estas células não conseguiram se adaptar, pois a microalga possui alta concentração de proteína em sua biomassa e necessita de nitrogênio para as suas necessidades nutricionais e fisiológicas. O crescimento celular ao utilizar glicerina foi limitado. O consumo da glicerina (Figura 3b) e do nitrogênio (Figura 3c) pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18, ocorreram nos primeiros dias de cultivo, enquanto que o fósforo (Figura 3d) não apresentou consumo acentuado. Nos experimentos com NaHCO_3 , os consumos de bicarbonato de sódio (Figura 1b), nitrogênio (Figura 1c) e fósforo (Figura 1d) foram gradativos, não chegando a limitação dos nutrientes. Os consumos diferenciados das fontes de nutrientes pela mesma cianobactéria, mostra que os cultivos mixotróficos necessitam de quantidades maiores de nutrientes (carbono e nitrogênio) em relação ao cultivos autotróficos, devido ao seu metabolismo estar adaptado ao consumo de bicarbonato de sódio.

Nos experimentos realizados não houve diferença significativa na interação entre a fonte de nitrogênio (N) e fósforo (P). Segundo Bougaran et al. (2010), a taxa de crescimento é inalterada pela interação N-P, embora o nitrogênio seja um fator determinante para o crescimento celular. As microalgas quando expostas à limitação de nitrogênio utilizam a clorofila intracelular como fonte endógena e as células se tornam amareladas, que ocorre para satisfazer as necessidades fisiológicas e nutricionais (JIANG et al., 2011).

As cianobactérias têm potencial de produzir biopolímeros como poli-hidroxialcanoatos (PHA) a partir de dióxido de carbono (CO_2), como única fonte de carbono, e o rendimento de PHA pode ser aumentado por vários meios tais como: nutrientes limitantes, condições de estresse, cepas recombinantes, através da enzima PHA sintase *in vitro*, entre

outros (SHRIVASTAV et al., 2010). Wang et al. (2013) realizaram experimentos com CO₂ e NaHCO₃ com a cianobactéria *Synechocystis* sp. e verificaram que as taxas de produção de 3HB foram semelhantes, sintetizando 446,5 mg.L⁻¹ de 3HB após 18 d e 533,4 mg.L⁻¹ em 21 d de cultivo, utilizando como fonte de carbono NaHCO₃ adicionada de 0,5 mL (1M de NaHCO₃) a cada 24 h.

Rendimentos de biopolímeros de 45 a 62 % foram obtidos quando se utilizou 10 % de glicerol bruto a cultura mista microbiana (DOBROTH et al., 2011). Campos et al. (2014) ao utilizarem a bactéria *Cupriavidus necator* IPT 026, com 15 g.L⁻¹ de glicerina bruta (obtida da produção de biodiesel) e 10 g.L⁻¹ de nitrogênio, obtiveram rendimentos máximos de 2,81 g.L⁻¹ de PHA. *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 obteve 1,1 g.L⁻¹ de rendimento de biopolímeros ao utilizar 1 % de glicerina (ASHBY et al., 2012). Neste estudo com a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, a concentração de glicerina (2,44 mL.L⁻¹) utilizada foi consumida nos primeiros dias de cultivo, o que pode ter interferido para o baixo rendimento final de biopolímeros bruto.

O cultivo autotrófico produz mais biopolímeros ao utilizar menores quantidades de carbono em relação aos cultivos mixotróficos. A microalga em pH alcalino, assimila o carbono na forma de bicarbonato de sódio, o qual pode ser adicionado ao meio de cultivo na forma de CO₂, auxiliando na redução do efeito estufa.

4. CONCLUSÃO

Cultivos autotróficos e mixotróficos estimulam a síntese de biopolímeros. A cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 produziu maiores rendimentos de biopolímeros bruto (54,48 %) quando utilizou bicarbonato de sódio como fonte de carbono e limitação de nitrogênio (0,05 g.L⁻¹ de NaNO₃), enquanto que a fonte de fósforo não influenciou significativamente. A glicerina apresentou rendimento de biopolímeros inferiores aos encontrados com bicarbonato de sódio, porém por ser um resíduo da indústria de biodiesel, agrega valor ao produto final, auxiliando na redução deste resíduo gerado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC – **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 17th ed., HORWITZ, W. ed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

APHA – **Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed., CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D.; eds. Washington: American Public Health Association, 1998.

ASHBY, R. A.; SOLAIMAN, D. K. Y.; STRAHAN, G. D.; ZHU, C.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. Glycerine and levulinic acid: renewable co-substrates for the fermentative synthesis of short-chain poly(hydroxyalkanoates) biopolymers. **Bioresource technology**, v. 118, p. 272-280, 2012.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2^a ed., McGraw-Hill, Singapore, p. 397-398, 1986.

BALAJI, S.; GOPI, K.; MUTHUVELAN, B. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, p. 278-285, 2013.

BOUGARAN, G.; BERNARD, O.; SCIANDRA, A. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. **Journal of Theoretical Biology**, v. 265, p. 443-454, 2010.

CAMPOS, M. I.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; DRUZIAN, J. I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial crops and products**, v, 52, p. 338-346, 2014.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; DALCANTON, F.; REICHERT, C. C.; DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic, cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.61c, p. 105-110, 2006.

DESAI, S. H.; ATSUMI, S. Photosynthetic approaches to chemical biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. 1031-1036, 2013.

DOBROTH, Z. T.; HU, S.; COATS, E. R.; McDONALD, A. G. Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3352-3359, 2011.

INNOCENTINI-MEI, L. H.; MARIANI, P. D. S. C. **Visão Geral Sobre Polímeros ou Plásticos Ambientalmente Biodegradáveis** (PADs). Campinas, 2005.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. **Applied Energy**, v. 88, p. 3336-3341, 2011.

LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 397-442, 2014.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrosphira* strain. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 63c, p. 144-150, 2008.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO_x and NO_x resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3132-3136, 2011.

ROSA, A. P. C.; CARVALHO, L. F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3071-3073, 2011.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SHIMADZU. <http://www.shimadzu.com/an/toc/lab/toc-14.html>, acessado em 14 de novembro de 2013.

SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. K.; MISHRA, S. Polyhydroalkanoates (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 255-260, 2010.

TALEB, A. F.; MOHTASHAMI, S. K.; TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M.; BAGHERI, A.; ZEINALABEDINI, M.; MIRZAEI, H. H.; MIRZAJANZADEH, M.; SHAFAROUDI, S. M.; BAKHTIARI, S. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, p. 258-267, 2013.

WANG, B.; PUGH, S.; NIELSEN, D. R.; ZHANG, W.; MELDRUM, D. R. Engineering cyanobacteria for photosynthetic production of 3-hydroxybutyrate directly from CO₂. **Metabolic Engineering**, v. 16, p. 68-77, 2013.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler.** Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

PURIFICAÇÃO DE POLI- β -HIDROXIBUTIRATO DA MICROALGA *Spirulina* sp.

LEB 18

RESUMO

Poli- β -hidroxibutirato (PHB) é um homopolímero do grupo dos poli-hidroxicanoatos (PHA). Este tipo de biopolímero pode ser produzido a partir de micro-organismos fotoautotróficos, como as cianobactérias. O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar o poli- β -hidroxibutirato sintetizado a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18. O micro-organismo utilizado foi *Spirulina* sp. LEB 18, cultivada em meio Zarrouk. A extração do biopolímero foi realizada com hipoclorito de sódio e sucessivas lavagens com água e acetona. Para a purificação a amostra foi desengordurada com hexano e após solubilizada em 1,2-carbonato de propileno. Foram determinadas as purezas e as propriedades térmicas (TGA e DTA) no PHB purificado. O biopolímero que apresentou maior pureza foi quando se utilizou 1,2-carbonato de propileno à 130 °C e tempo de contato com o solvente de 5 min. As análises térmicas para todas as amostras foram semelhantes em relação ao PHB padrão. A purificação com 1,2-carbonato de propileno foi eficiente para o PHB, alcançando pureza acima de 90 %.

Palavras-chave: 1,2-carbonato de propileno, cianobactéria, pureza.

ABSTRACT

Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is a homopolymer from the group of polyhydroxyalkanoates (PHA). This type of biopolymer can be produced from photoautotrophic microorganisms such as cyanobacteria. The objective of this work was to purify and characterize poly- β -hydroxybutyrate synthesized from *Spirulina* strain. LEB 18. The microorganism used was *Spirulina* strain LEB 18 cultured in medium Zarrouk. The biopolymer extraction was performed with sodium hypochlorite and successive washing with water and acetone. For purification the sample was defatted with hexane and further purified with 1,2-propylene carbonate. For the purified PHB samples thermal properties (TGA and DTA) and purity were determined. The highest purity of PHB was attained using 1,2-propylene carbonate at 130°C and contact time with the solvent of 5 min. The thermal analyses for all samples were comparable to commercial PHB. Purification with 1,2-propylene carbonate was effective for PHB, increasing purity above 90 %.

Key-words: 1,2-propylene carbonate, cyanobacterium, purity.

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas estão sendo realizadas com ênfase no uso de substratos alternativos, métodos de extração, espécies geneticamente modificadas e culturas mistas, com o intuito de produzir biopolímeros, como o PHB, a partir de cianobactérias (BALAJI et al., 2013). Algumas espécies de microalgas possuem potencial para acúmulo do homopolímero PHB sob condições fotoautotróficas. O poli- β -hidroxibutirato (PHB) é o biopolímero mais estudado dentre os PHAs, os quais são poliésteres biológicos e biodegradáveis. Os poli-hidroxicanoatos (PHA) são acumulados como fonte e reserva de energia intracelular em micro-organismos e, por serem biodegradáveis e biocompatíveis com células e tecidos, são potenciais substitutos dos polímeros petroquímicos (BALAJI et al., 2013; SCHMIDT, 2011; QUINES, 2010).

Os biopolímeros variam em relação à sua tenacidade e flexibilidade. De acordo com sua formulação, podem ser utilizados de diversas formas semelhantes a muitos polímeros petroquímicos não biodegradáveis atualmente em uso (BALAJI et al., 2013). Os PHAs não são tóxicos, possuem características de termoplasticidade e podem ser produzidos por recursos renováveis (REDDY et al., 2003). Suas características físicas e mecânicas são semelhantes ao polipropileno (KONAGESKI Jr., 2009).

As expectativas neste século, para a demanda de materiais poliméricos, são de duas a três vezes maior, como consequência do aumento do seu consumo, especialmente nos países em desenvolvimento (BALAJI et al., 2013). O PHB apresenta propriedades e características adequadas para aplicações comerciais (DOBROTH et al., 2011), como, sacolas plásticas, materiais médicos (DESAI; ATSUMI, 2013) e embalagens alimentícias (ARRIETA et al., 2014). O emprego de polímeros biodegradáveis naturais ou sintéticos no mercado ainda não é significativo, mas deverá ser mais expressivo no futuro, uma vez que estes polímeros quando descartados são totalmente biodegradados a CO₂ e água (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Os produtos obtidos de sistemas fermentativos, normalmente envolvem compostos de células e fragmentos celulares, sais, carboidratos, lipídios, aminoácidos, proteínas, vitaminas, corantes, ácidos orgânicos, além de vários outros, advindos do próprio meio reacional ou como resultado da ação microbiana (PASTORE et al., 2013). Existem bioprodutos que requerem maior grau de pureza, oriundos de processos mais complexos de purificação. Em resultado à variedade de características descritas, as etapas de purificação são

tão ou mais desafiantes que o estudo e o desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há processos de purificação de aplicação geral (PESSOA Jr.; KILIKIAN, 2005).

Os métodos mais utilizados para a produção e recuperação de PHB têm se revelado pouco práticos e rentáveis, porque grandes quantidades de solventes são consumidos e o processo de precipitação é complexo. Além disso, os solventes só podem ser reciclados utilizando métodos caros e pouco eficientes, uma vez que os solventes têm ponto de ebulição baixo para ser separado por destilação ou são miscíveis com a água, formando uma mistura azeotrópica. Os solventes muitas vezes são prejudiciais à saúde e seu uso envolve um alto risco de explosão. Por esta razão, o uso de 1,2-carbonato de propileno surge como alternativa de solvente para a extração/purificação de PHB, tendo em vista que é de baixa toxicidade (HEINZLE; LAFFERTY, 1979). Outro fator importante do uso do 1,2-carbonato de propileno é que este pode ser recuperado com facilidade devido ao seu alto ponto de ebulição de 240 °C (QUINES, 2010), minimizando os custos de produção do PHB.

O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar poli- β -hidroxibutirato sintetizado a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e Meio de Cultivo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi isolada da Lagoa Mangueira (33°30'12"S, 53°08'58"W) localizada na cidade de Santa Vitória do Palmar/RS (Brasil) (MORAIS et al., 2008) e cultivada em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) formulado de acordo com a Tabela 1.

Os cultivos foram realizados em condições ambientais, em fotobiorreatores abertos de 15 m³ com volume útil de 10 m³ e agitação contínua com auxílio de pás rotativas. A biomassa foi separada do meio de cultivo por filtração em malhas de 200 mesh.

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk.

Reagentes	Concentração (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,50
NaNO ₃	2,50
K ₂ SO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
EDTA	0,08
Solução A5	1,0 mL
Solução B6	1,0 mL

Fonte: Zarrouk, (1966).

Solução A₅: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂.4H₂O: 1,81; ZnSO₄.7H₂O: 0,22; CuSO₄.5.H₂O: 0,08; Na₂MoO₄: 0,02.

Solução B₆: (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,96; K₂Cr₂(SO₄)₄.24H₂O: 96,0; NiSO₄.7H₂O: 47,85; Na₂WO₄.2H₂O: 17,94; TiOSO₄.H₂SO₄.8H₂O: 61,1; Co(NO₃)₂.6H₂O: 43,98.

2.2. Extração de Biopolímeros Bruto

A biomassa foi centrifugada a 7500 rpm por 20 min em temperatura ambiente (Hitachi-Japão) para separar a biomassa úmida com o biopolímero do meio de cultivo. Após, para cada 1 g de biomassa seca, foi adicionado 100 mL de água destilada e 25 mL de hipoclorito de sódio (10-12 % de cloro ativo (m/v)) na biomassa úmida e mantida sob agitação por 10 min. A suspensão resultante foi levada à centrifugação (7500 rpm por 20 min em temperatura ambiente). A seguir descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 100 mL de água destilada. Centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se este processo adicionando 50 mL de acetona. O precipitado final (biopolímeros bruto) foi seco em estufa a 35 °C por 48 h.

2.3. Purificação de PHB

Primeiramente foi realizado um pré-tratamento com 100 e 200 mL de hexano para cada 4 g do biopolímero bruto, a 60 °C por 1 e 2 h, sob agitação em rota evaporador, para extrair os lipídios existentes na amostra. Após, o precipitado contendo biopolímero bruto foi filtrado a vácuo e seco em estufa a 30 °C por 24 h para posterior pesagem.

O solvente utilizado para a purificação de PHB foi 1,2-carbonato de propileno (Sigma-Aldrich). Para a purificação do biopolímero foi utilizado o método baseado na Patente US 4140741 A (HEINZLE e LAFFERTY, 1979), Fiorese (2008) e Quines (2010).

Inicialmente foi pesado 10 g do biopolímero bruto desengordurado. Em seguida, foi ressuspenso em 60 mL de 1,2-carbonato de propileno aquecido até as temperaturas de 130 °C e 150 °C. O tempo de contato do solvente com o biopolímero bruto desengordurado foi 5, 15, 30 e 45 min para cada temperatura de estudo. Os ensaios foram realizados em rota evaporador sob agitação constante. A mistura 1,2-carbonato de propileno e biopolímero bruto foi filtrada à quente utilizando filtro qualitativo. A massa retida no filtro foi lavada com 50 mL de 1,2-carbonato de propileno aquecido na mesma temperatura da purificação. O filtrado permaneceu em repouso até atingir a temperatura ambiente. Após, foi adicionado 200 mL de acetona à suspensão contendo o PHB e 1,2-carbonato de propileno. A suspensão foi agitada em agitador magnético por 105 min, para posterior filtração à temperatura ambiente. O material polimérico retido no filtro foi lavado com água destilada e a membrana filtrante contendo o biopolímero foram secos em estufa a 65 °C por 24 h.

2.4. Determinação do PHB

A determinação da concentração de PHB foi realizada por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise proposto por Brandl et al. (1988). Ao PHB purificado foram acrescidos 2 mL de metanol acidificado (H_2SO_4 15 %), contendo 0,4 g.L⁻¹ de ácido benzoico e 2 mL de clorofórmio. A amostra foi agitada em vórtex e aquecida a 100 °C por 1 h. Decorrido este tempo, foram agitados novamente em vórtex, voltando ao aquecimento por mais 1 h e 20 min. As amostras foram submetidas ao resfriamento para interromper a reação. Após adicionou-se 1 mL de água destilada, sendo a mistura agitada em vórtex por 30 s, para formação de duas fases. A fase orgânica contendo clorofórmio e PHB foi separada para análise em cromatógrafo gasoso. Para a curva padrão de PHB, o polímero padrão (PHB – Sigma-Aldrich) foi submetido à metanólise conforme descrito por Brandl et al. (1988).

A coluna utilizada para a determinação de PHB foi de sílica fundida (\varnothing 0,53 mm x 30 m) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo utilizado foi CG-90 equipado com detector de ionização de chama (DIR ar-hidrogênio), utilizando nitrogênio como gás de arraste com fluxo constante de 30 mL.min⁻¹ e as temperaturas de injeção, detecção e coluna foram 200, 230 e 120 °C, respectivamente.

Para determinação da pureza (P_u) do PHB extraído, desengordurado e purificado utilizou-se a Equação 1. Onde m_{PHB} é a massa de PHB (g) detectada pela cromatografia e m_a é a massa total de biopolímero (g) utilizada para a análise cromatográfica.

$$P_u = \frac{m_{\text{PHB}}}{m_a} \quad (1)$$

2.5. Caracterização Térmica do PHB

2.5.1. Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

A análise termogravimétrica (TGA) e a análise térmica diferencial (DTA) do PHB foram determinadas em analisador DTG-60 (Shimadzu, Japão). A amostra foi pesada (\pm 4 mg) e colocada para aquecimento até 500 °C com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio com fluxo constante de 30 mL.min⁻¹.

As temperaturas, inicial de degradação térmica (T_0), máxima de degradação ($T_{\text{máx}}$) e final de degradação (T_f) foram determinadas a partir da primeira derivada das curvas TGA. A perda de massa (P_m) foi calculada pela diferença de massa entre a T_0 e a T_f . A temperatura de fusão foi determinada a partir da curva DTA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Purificação de PHB

A amostra que apresentou maior redução de gordura no PHB extraído com hipoclorito de sódio da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi quando se utilizou 1:25 (biopolímero/hexano) sob agitação por 2 h. Porém, se obteve maior pureza de PHB ao utilizar 1:50 (biopolímero/hexano) (Tabela 2). Entretanto, ao utilizar apenas 1 h de agitação, não foi

suficiente para extrair a gordura existente na amostra. Por isso, para os demais ensaios foram utilizados a proporção 1:25 para 2 h de agitação.

Tabela 2 – Tempo de contato do biopolímero bruto com o hexano (T, h), volume de hexano utilizado para a extração (V, mL), perda de massa lipídica (P_{ml} , %), pureza do biopolímero (P_u , %), perda de massa (P_m , %), temperatura inicial de degradação (T_0 , °C), temperatura de máxima degradação ($T_{máx}$, °C), temperatura final de degradação (T_f , °C), temperatura de fusão (T_m , °C) para o PHB purificado da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e desengordurado sob diferentes condições.

T	V	P_{ml}	P_u	TGA			DTA	
				P_m	T_0	$T_{máx}$	T_f	T_m
1	100	*	*	*	*	*	*	*
1	200	18,46	66,9	66,7	282,2	287,1	294,4	176,5
2	100	19,45	69,4	69,7	281,2	286,6	293,7	176,3
2	200	17,05	70,2	70,1	279,2	285,7	293,2	174,4
PHB padrão		-	-	92,8	269,1	277,9	287,9	178,7

*A amostra permaneceu com grande quantidade de gordura, não conseguindo realizar a purificação.

As análises térmicas apresentaram resultados bem semelhantes para os diferentes testes e ao PHB padrão (Sigma-Aldrich). A temperatura inicial de degradação (T_0) variou de 279,2 a 282, °C e a temperatura de fusão (T_m) encontrada nas amostras foram entre 174,4 a 176,5 °C (Figuras 1 e 2). Isto deve-se ao método ser eficiente para a purificação de PHB, chegando a resultados próximos ao PHB padrão, com pureza de 70 %.

Figura 1 – Análise termogravimétrica (TGA) do PHB purificado em diferentes tempos e volumes de hexano. 1 h com 1:50 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), 2 h com 1:25 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), 2 h com 1:50 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), PHB padrão (---).

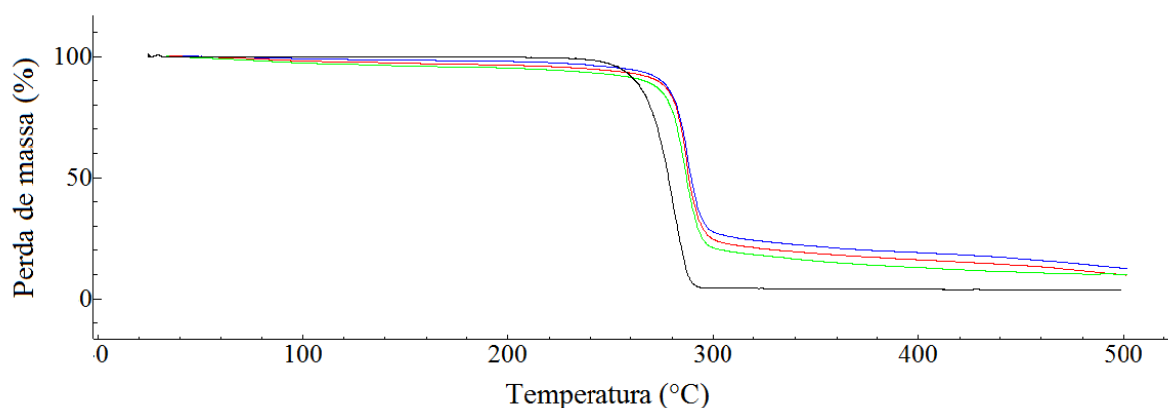
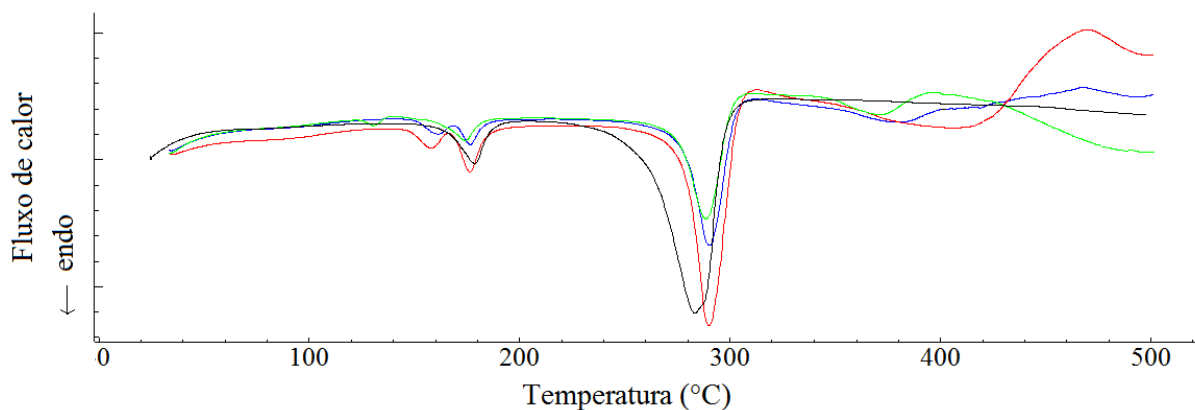


Figura 2 – Análise térmica diferencial (DTA) do PHB purificado em diferentes tempos e volumes de hexano. 1 h com 1:50 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), 2 h com 1:25 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), 2 h com 1:50 (biopolímero-g/hexano-mL) (---), PHB padrão (---).



3.2. Padronização da Purificação de PHB

As cinéticas de purificação com 1,2-carbonato de propileno a 130 °C (Tabela 3, Figuras 3 e 4) e 150°C (Tabela 4, Figuras 5 e 6) mostraram-se eficientes. Quanto menor a temperatura de contato do solvente com o biopolímero, maiores foram os índices de pureza. Os resultados encontrados para as análises térmicas termogravimétrica e diferencial apresentaram-se próximas do PHB padrão (Figuras 3, 4, 5 e 6).

Tabela 3 – Tempo de contato do biopolímero com o solvente (T, min), pureza do biopolímero (P_u , %), perda de massa (P_m , %), temperatura inicial de degradação (T_0 , °C), temperatura de máxima degradação ($T_{máx}$, °C), temperatura final de degradação (T_f , °C), temperatura de fusão (T_m , °C) para o PHB extraído da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 ao utilizar temperatura de 130 °C na cinética de purificação.

T	P_u	TGA				T_m
		P_m	T_0	$T_{máx}$	T_f	
45	82,1	79,3	283,7	293,1	303,4	174,0
30	86,3	84,0	283,8	293,0	303,5	175,3
15	86,7	85,6	283,7	293,0	303,2	174,5
5	92,4	86,0	287,5	292,5	305,6	175,6
PHB padrão	-	92,8	269,1	277,9	269,1	178,7

Figura 3 – Análise termogravimétrica (TGA) da cinética de purificação do PHB a temperatura de 130 °C com 1,2-carbonato de propileno e do PHB padrão e tempo de contato do solvente com a amostra de: 45 min (---), 30 min (---), 15 min (---), 5 min (---) e PHB padrão (---).

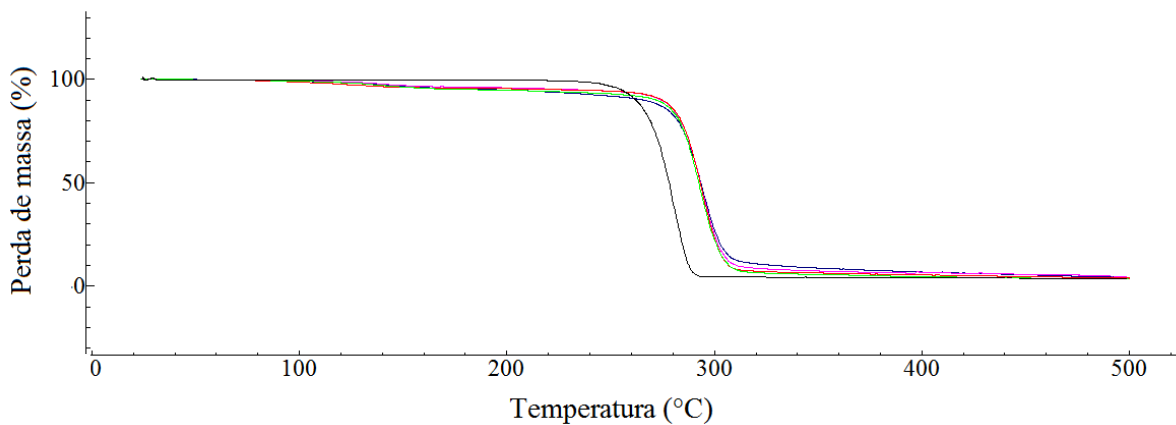


Figura 4 – Análise térmica diferencial (DTA) da cinética de purificação do PHB a temperatura de 130 °C com 1,2-carbonato de propileno e do PHB padrão e tempo de contato do solvente com a amostra de: 45 min (---), 30 min (---), 15 min (---), 5 min (---) e PHB padrão (---).

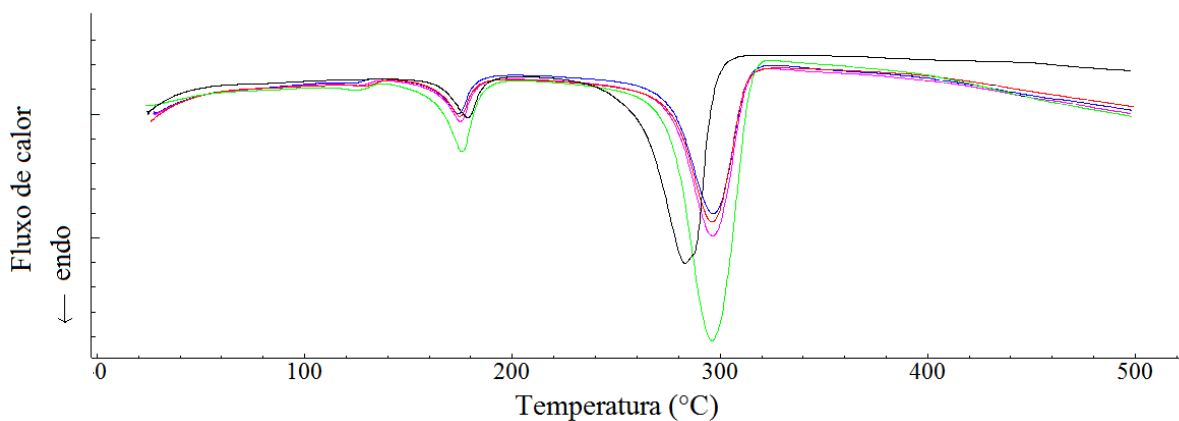


Tabela 4 – Tempo de contato do biopolímero com o solvente (T, min), pureza do biopolímero (P_u , %), perda de massa (P_m , %), temperatura inicial de degradação (T_0 , °C), temperatura de máxima degradação ($T_{máx}$, °C), temperatura final de degradação (T_f , °C), temperatura de fusão (T_m , °C) para o PHB extraído da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 ao utilizar temperatura de 150 °C na cinética de purificação.

T	P_u	TGA				T_m
		P_m	T_0	$T_{máx}$	T_f	
45	*	*	*	*	*	*
30	56,3	60,3	279,3	282,9	288,7	175,2
15	54,1	56,0	277,4	282,1	288,3	174,5
5	51,4	52,2	277,3	281,5	287,8	173,2
PHB padrão	-	92,8	269,1	277,9	269,1	178,7

*A amostra que utilizou 45 min de contato do biopolímero com o solvente (1,2-carbonato de propileno) não apresentou quantidade de amostra suficiente para realizar as análises.

Figura 5 – Análise termogravimétrica (TGA) da cinética de purificação do PHB a temperatura de 150 °C com 1,2-carbonato de propileno e do PHB padrão e tempo de contato do solvente com a amostra de: 30 min (---), 15 min (---), 5 min (---) e PHB padrão (---).

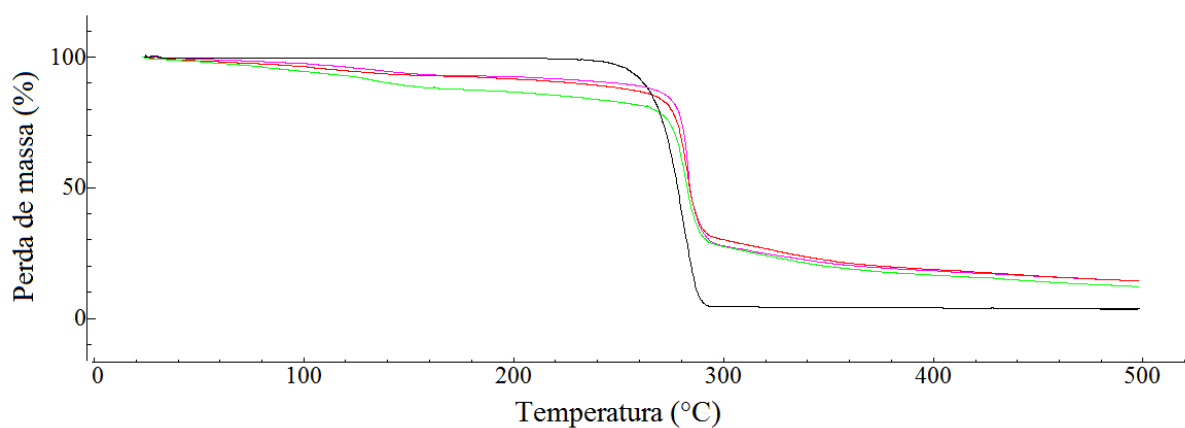
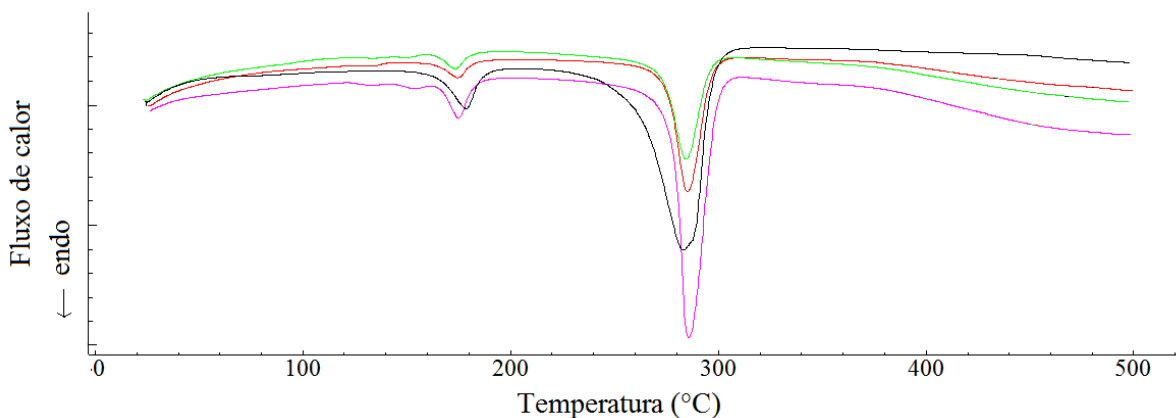


Figura 6 – Análise térmica diferencial (DTA) da cinética de purificação do PHB a temperatura de 150 °C com 1,2-carbonato de propileno e do PHB padrão e tempo de contato do solvente com a amostra de: 30 min (---), 15 min (---), 5 min (---) e PHB padrão (---).



A cinética de purificação de PHB com 1,2-carbonato de propileno a 150 °C mostrou-se eficiente, porém, quanto maior o tempo de contato do solvente com o biopolímero, maiores foram os índices de pureza encontrados (56,3 %) (Tabela 4). Em relação à cinética de purificação a 130 °C, as purezas foram superiores. Segundo Quines (2010) as variáveis que mais influenciam na pureza do PHB é a temperatura de aquecimento e o tempo de contato do biopolímero com o solvente na recuperação. A temperatura inferior (130 °C) proporcionou índices de purezas superiores aos encontrados com temperatura de 150 °C, onde pode ter ocorrido a quebra das cadeias moleculares do biopolímero.

Ao comparar as cinéticas de purificação de PHB a 130 e 150 °C em diferentes tempos de contato do solvente com o polímero, verificou-se diferenças significativas em relação a pureza e diferenças não significantes em relação as propriedades térmicas. Ao utilizar temperatura de 150 °C, pode ocorrer a quebra das cadeias poliméricas, reduzindo a massa molar das amostras e consequentemente a temperatura inicial de degradação (T_0). Segundo Fiorese et al. (2009), as massas molares foram reduzidas com o aumento das temperaturas de extração do PHB da bactéria *Cupriavidus necator* com 1,2-carbonato de propileno.

A temperatura inicial de degradação (T_0) na cinética de purificação com temperatura de 150 °C apresentou em média 5 °C de diferença em relação à cinética de 130 °C, como mostram as Tabelas 3 e 4. As estruturas cristalinas do PHB permaneceram

semelhantes ao PHB padrão, pois as temperaturas de fusão (T_m) apresentaram diferença máxima de 5,5 °C.

O grau de pureza de 84 % foi obtido por Fiorese et al. (2009) com a combinação de temperatura de 130 °C e tempo de contato de 30 min, ao extrair PHB da bactéria *Cupriavidus necator* com 1,2-carbonato de propileno. A extração a temperatura de 130 °C com *Cupriavidus necator* apresentou pureza de 75 % em 30 min (QUINES, 2010). Estudos realizados com PHB a partir de *Cupriavidus necator* DSM 545 obteve pureza de 84 % ao utilizar 1,2-carbonato de propileno para a extração a 150 °C e tempo de contato de 45 min. Valores de temperaturas para purificação com 1,2-carbonato de propileno variando entre 100 e 120 °C e tempos curtos de extração podem promover recuperação incompleta de PHB (HEINZLE; LAFFERTY, 1979). No presente trabalho foi realizado apenas determinação de pureza de acordo com as Tabelas 3 e 4. Não foram realizadas cinéticas com temperaturas menores que 130 °C, pois segundo McChalicher et al. (2010) são necessárias temperaturas superiores a 125 °C para dissolver o PHB em 1,2-carbonato de propileno.

PHBs apresentam diferentes resultados em relação às propriedades térmicas, devido aos métodos de extração e os micro-organismos que o sintetizam. PHB extraído de *E. coli* recombinante, obteve intervalo de degradação entre 250 e 340 °C com temperatura máxima em 295 °C, enquanto que a temperatura de fusão foi 173 °C (RAMACHANDER et al., 2002). PHB produzido por *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, apresentou temperatura inicial de degradação de 260 °C (ZHU et al., 2012). *Ralstonia eutropha* sintetizou PHB com temperatura de fusão de 175 °C (LUO et al., 2006). A cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou intervalo de degradação entre 277,3 a 305,6 °C, temperatura máxima de degradação entre 281,5 a 293,1 °C e temperatura de fusão entre 173,2 e 175,6 °C. Estas características são importantes para determinar a aplicação de cada biopolímero produzido, pois quanto maior a temperatura de fusão, mais cristalino se apresenta o polímero, o qual influencia nas características de flexibilidade do material.

PHB comercial da Biomer apresentou temperatura de fusão 167,7 °C, temperatura inicial de degradação 268 °C e temperatura máxima de degradação 285 °C (ARRIETA et al., 2014). PHB comercial da Tianjin TianLu Co. Ltd (China) obteve temperatura de fusão de 180 °C e temperatura inicial de degradação 260 °C (ZHIJIANG et al., 2011). PHB da Biocycle (PHB Industrial S. A.) que apresentou temperatura de fusão 174 °C e acentuada degradação térmica acima de 270 °C (MACHADO et al., 2010). O PHB padrão (Sigma-Aldrich) utilizado neste estudo apresentou temperatura de fusão 178,7°C, intervalo de degradação 269,1 a 287,9 °C e temperatura de máxima degradação 277,9 °C. O PHB padrão da Sigma-Aldrich se

mostrou mais cristalino em relação aos PHBs extraídos e purificados, tendo em vista que sua temperatura de fusão foi superior (178,7 °C). Sendo a temperatura de degradação do PHB compreendida entre 250 °C e 300 °C e temperatura de fusão entre 170 °C e 200 °C (GRASSIE et al., 1984).

3.3. Comparação do PHB Bruto, Desengordurado e Purificado

As Figuras 7 e 8 apresentam os termogramas de três amostras distintas para comparação do PHB bruto extraído com hipoclorito de sódio; PHB bruto extraído com hipoclorito de sódio e desengordurado com hexano; e PHB bruto extraído com hipoclorito de sódio, desengordurado com hexano e purificado com 1,2-carbonato de propileno.

Figura 7 – Análise termogravimétrica (TGA) do PHB. Somente extraído com hipoclorito de sódio (---), extraído com hipoclorito de sódio e desengordurado com hexano (---) e extraído com hipoclorito de sódio, desengordurado com hexano e purificado com 1,2-carbonato de propileno (---).

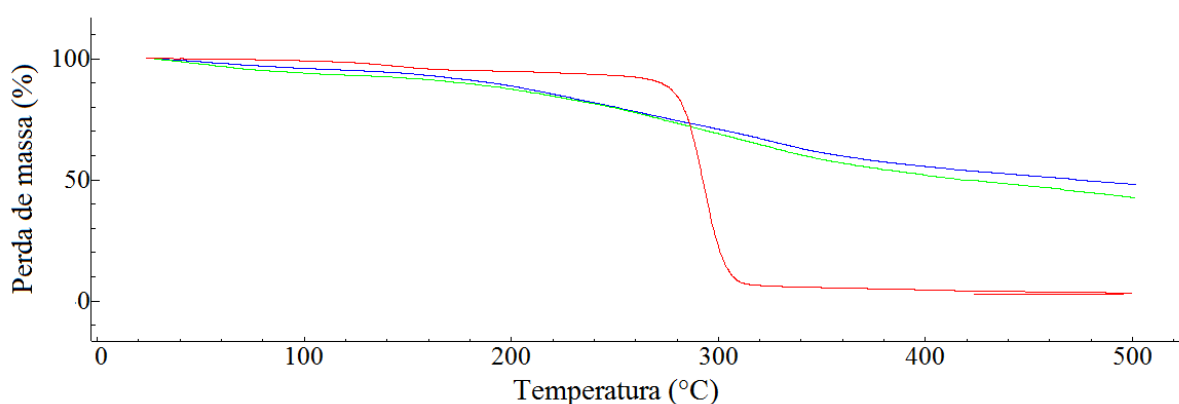
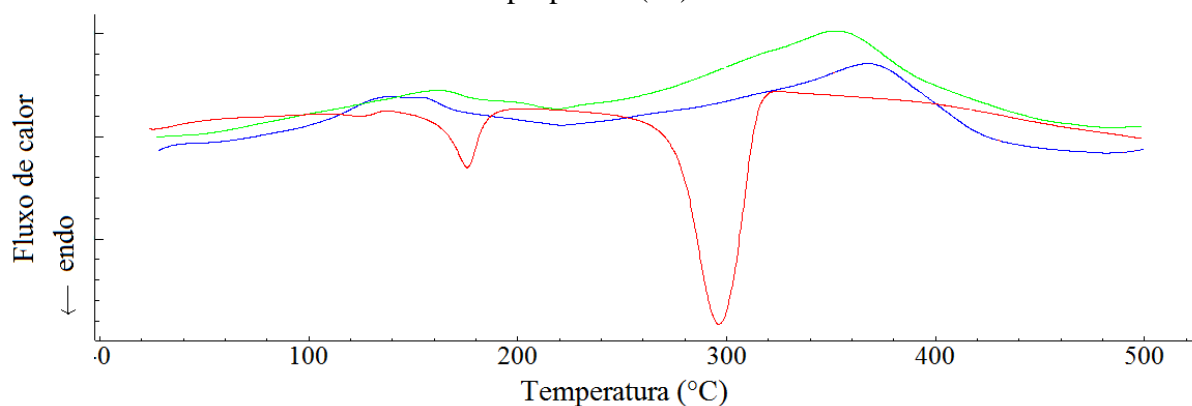


Figura 8 – Análise térmica diferencial (DTA) do PHB. Somente extraído com hipoclorito de sódio (---), extraído com hipoclorito de sódio e desengordurado com hexano (---) e extraído com hipoclorito de sódio, desengordurado com hexano e purificado com 1,2-carbonato de propileno (---).



Ao observar as Figuras 7 e 8 verifica-se que a extração com hipoclorito de sódio e a extração com hipoclorito de sódio e desengorduramento com hexano, não é suficiente para se obter o PHB com elevada pureza, pois não consegue-se definir o polímero pelos termogramas. Não apresentando os pontos de degradação (Figura 7) e de fusão (Figura 8) definidos. Ao utilizar a extração com hipoclorito de sódio, desengorduramento com hexano e posterior purificação com 1,2-carbonato de propileno, este apresentou acentuada mudança nas características da amostra, observando-se picos acentuados no ponto de degradação (Figura 7) e fusão (Figura 8). Com este método é possível purificar o biopolímero (PHB) sintetizado pela cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18. Segundo estudos realizados por SCHMIDT 2011 e QUINES 2010, o 1,2-carbonato de propileno é o solvente utilizado para a extração de PHB, porém como trabalhou-se com microalgas, é necessário fazer alguns tratamentos anteriores ao uso do carbonato. Tendo em vista que as cianobactérias produzem muitos bioprodutos, mesmo desviando a sua via metabólica para a síntese desejada, além de possuir clorofila em sua estrutura, que é responsável pela coloração verde, característica das microalgas.

4. CONCLUSÃO

O método de extração que combina hipoclorito de sódio, hexano e 1,2-carbonato de propileno foi eficiente para a purificação do biopolímero poli- β -hidroxibutirato extraído da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18. A maior pureza de PHB encontrada foi 92,4 % ao utilizar temperatura de 130 °C e tempo de contato do solvente com o PHB de 5 min. As análises térmicas de purificação, mostraram que todos os ensaios realizados apresentam-se dentro do estabelecido pela literatura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRIETA, M. P.; LÓPEZ, J.; HERNANDEZ, A.; RAYÓN, E. Ternary PLA-PHB-limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. **European Polymer Journal**, v. 50, p. 255-270, 2014.

BALAJI, S.; GOPI, K.; MUTHUVELAN, B. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, p. 278-285, 2013.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977-1982, 1988.

DESAI, S. H.; ATSUMI, S. Photosynthetic approaches to chemical biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. 1031-1036, 2013.

DOBROTH, Z. T.; HU, S.; COATS, E. R.; McDONALD, A. G. Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3352-3359, 2011.

FIGLIARESE, M. L.; FREITAS, F.; PAIS, J.; RAMOS, A. M.; ARAGÃO, G. M. F.; REIS, M. A. M. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, p. 454-461, 2009.

FIGLIARESE, M. L. **Estratégias de cultivo, recuperação e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha***. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006

GRASSIE, N.; MURRAY, E. J.; HOLMES, P. A. Thermal degradation of poly((-D)- β -hydroxybutyric acid): Part 3 – The reaction mechanism. **Polymer Degradation and Stability**, v. 6, p. 127-134, 1984.

HEINZLE, E.; LAFFERTY, R. M. Use of cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-(β -hydroxybutyric acid). Patent US 4140741 A, 1979.

INNOCENTINI-MEI, L. H.; MARIANI, P. D. S. C. **Visão Geral Sobre Polímeros ou Plásticos Ambientalmente Biodegradáveis** (PADs). Campinas, 2005.

KONAGESKI Jr., V. A.; DAGOSTINI, L.; RENZ, M. **Plásticos biodegradáveis: revisão sobre métodos de preparação e propriedades da biodegradação**. Departamento de Biologia e Química, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, 2009. <http://www.scribd.com/doc/3033642/PLASTICOS-BIODEGRADAVEIS>. Acessado em: setembro de 2012.

LUO, R.; CHEN, J.; ZHANG, L.; CHEN, G. Polyhydroxyalkanoates copolyesters produced by *Ralstonia eutropha* PHB-4 harboring a low-substrate-specificity PHA synthase PhaC_{2ps} from *Pseudomonas stutzeri* 1317. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 218-225, 2006.

MACHADO, M. L. C.; PEREIRA, N. C.; MIRANDA, L. F.; TERENCE, M. C. Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 65-71, 2010.

MCCHALICHER, C. W. J.; SRIENC, F.; ROUSE, D. P. Solubility and degradation of polyhydroxyalkanoate biopolymers in propylene carbonate. **American Institute of Chemical Engineers**, v. 56, n. 6, p. 1616-1625, 2010.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrosphira* strain. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 63, p. 144-150, 2008.

PESSOA Jr., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri-SP:Manole, 2005.

QUINES, L. K. M. **Extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* DSM 545 com 1,2-carbonato de propileno**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

RAMACHANDER, T. V. N.; ROHINI, D.; BELHEKAR, A.; RAWAL, S. K. Synthesis of PHB by recombinant *E. coli* harboring an approximately 5kb genomic DNA fragment from *Streptomyces aureofaciens* NRRL 2209. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 63-69, 2002.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI,; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p.137-146, 2003.

SCHMIDT, M. **Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* DSM 545 em meio suplementado com óleo de soja miniemulsionado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler**. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

ZHIJIANG, C.; CHENGWEI, H.; GUANG, Y. Crystallization behavior, thermal property and biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) grafting copolymer. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, p. 1602-1609, 2011.

ZHU, C.; NOMURA, C. T.; PERROTTA, J. A.; STIPANOVIC, A. J.; NAKAS, J. P. The effect of nucleating agents on physical properties of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHB-co-HV) produced by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. **Polymer Testing**, v. 31, p. 579-585, 2012.

PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS A PARTIR DE POLI- β -HIDROXIBUTIRATO DE ORIGEM MICROALGAL

RESUMO

As microalgas apresentam grande potencial para síntese de biocompostos com alto valor agregado, como os biopolímeros. Estes biopolímeros podem ser utilizados para desenvolver nanofibras que possuem grande área superficial e melhoram as propriedades mecânicas de barreira e permeação de gases e vapores. O objetivo deste trabalho foi produzir nanofibras a partir de poli- β -hidroxibutirato (PHB) de origem microalgal. O biopolímero (PHB) utilizado para produzir as nanofibras foi extraído da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e purificado com 1,2-carbonato de propileno, que apresentavam pureza superior a 70 %. A técnica para produção de nanofibras foi o *electrospinning*. A condição que apresentou menores diâmetros das nanofibras foi ao utilizar solução 20 % de PHB solubilizado em clorofórmio, vazão 150 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, diâmetro do capilar 0,45 mm e voltagens entre 24,1 e 29,6 kV que levou a obtenção de nanofibras com diâmetros de 470 e 537 nm, respectivamente.

Palavras-chave: biopolímero, *electrospinning*, *Spirulina*.

ABSTRACT

Microalgae have great potential to sintetize biocompounds with high added value, such as biopolymers. These biopolymers can be used to develop nanofibers which has a high surface area and improved mechanical and permeation barrier properties of gases and vapors. The aim of this work was to produce nanofibers from poly- β -hydroxybutyrate (PHB) of microalgal origin. The biopolymer used to produce the nanofibers was extracted from *Spirulina* sp. LEB 18 and purified with 1,2-propylene carbonate. The biopolymer used to produce nanofibers was purified over 70 %. The technique for producing nanofibers was electrospinning. The lowest fiber diameters were obtained using 20 % of biopolymer dissolved in chloroform, a flow of 150 $\mu\text{L h}^{-1}$, a capillary diameter of 0.45 mm and voltages between 24.1 and 29.6 kV. Obtaining nanofibers with diameters of 470 and 537 nm, respectively.

Key words: biopolymer, electrospinning, *Spirulina*.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas e/ou cianobactérias podem produzir metabólitos específicos, como biopolímeros, de acordo com as condições de cultivo. O uso de microalgas é um método ambientalmente correto. Além de auxiliar na redução do efeito estufa através da biofixação de CO₂, a biomassa microalgal formada pode ser utilizada para a síntese de polímeros biodegradáveis (NETO et al., 2011).

Vários polímeros podem ser utilizados para o desenvolvimento de nanofibras, como, ácido glicólico, ácido-L-actídeo, policaprolactona, poli- β -hidroxibutirato, tereftalato de etileno, óxido de polietileno, polivinilpirrolidona, poliestireno, álcool polivinílico, poliuretanos, celulose, colágeno, gelatina, quitosana, entre outros (FENG et al., 2014; FERNANDES et al., 2014; LI et al., 2014; MATATAGUI et al., 2014; NETO et al., 2011; CHEN et al., 2009).

As nanofibras podem ser produzidas pelo método de *electrospinning* (MATATAGUI et al., 2014). A técnica funciona pelo princípio eletrostático, aplicando alta voltagem em soluções poliméricas. Esses polímeros são posicionados entre eletrodos, os quais são ligados à alta tensão. A solução forma um fio que, devido ao campo de alta tensão, colapsa e forma um jato saindo deste fio em direção ao eletrodo oposto. Este processo origina fibras de dimensões nanométricas, que durante o processo contínuo produz a matriz de nanofibras (NETO et al., 2011). Os diferentes parâmetros para a realização do processo (diâmetro do capilar, distância entre o capilar e o coletor, intensidade do campo elétrico, composição e geometria do coletor), permitem a alteração do diâmetro das fibras, densidade, alinhamento e morfologia (ROGINA, 2014).

A grande quantidade de polímeros biodegradáveis sintéticos e naturais com capacidade de formação de nanofibras leva à produção de nanoestruturas com respostas biológicas e propriedades mecânicas específicas. O *electrospinning* é um método de baixo custo, possui facilidade para a formação da estrutura fibrosa, onde os parâmetros de processo dependem das propriedades dos polímeros e são específicos para cada sistema (ROGINA, 2014).

As nanofibras possuem a vantagem de apresentarem grande área superficial, além de melhorarem substancialmente as propriedades mecânicas, as propriedades de barreiras de diversos gases e vapores e também o aumento da taxa de biodegradabilidade (FAPESP, 2014), de filmes plásticos.

A nanotecnologia surgiu pela união de diferentes grupos de pesquisa em seus campos específicos, permitindo a concepção de diferentes produtos. A nanobiotecnologia é uma área emergente da nanotecnologia que tem contribuído em avanços significativos para diferentes áreas, como medicina preventiva, curativa ou diagnóstica, farmacêutica, agricultura, alimentos, embalagens, entre outros (FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012). Existem várias aplicações de nanomateriais em embalagens de alimentos e segurança alimentar, como, nanocompósitos em polímeros/argila como material de embalagens de alta barreira, nanopartículas de prata como potencial agente antimicrobiano, nanosensores e ensaios baseados em nanomateriais para detecção de mudanças na estrutura química e microbiológica de alimentos (gases, pequenas moléculas orgânicas e patógenos de origem alimentar) (DUNCAN, 2011).

O objetivo deste trabalho foi produzir nanofibras a partir de poli- β -hidroxibutirato de origem microalgal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e Meio de Cultivo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi isolada da Lagoa Mangueira (33°30'12"S, 53°08'58"W) localizada na cidade de Santa Vitória do Palmar/RS (Brasil) (MORAIS et al., 2008) e cultivada em meio de cultivo Zarrouk (ZARROUK, 1966) formulado de acordo com a Tabela 1.

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores abertos de 15 m³ com volume útil de 10 m³ e agitação contínua com auxílio de pás rotativas, em condições ambientais. A biomassa foi coletada por filtração em malhas com 200 mesh.

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk.

Reagentes	Concentração (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,50
NaNO ₃	2,50
K ₂ SO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
EDTA	0,08
Solução A5	1,0 mL
Solução B6	1,0 mL

Fonte: Zarrouk, (1966).

Solução A₅: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂.4H₂O: 1,81; ZnSO₄.7H₂O: 0,22; CuSO₄.5.H₂O: 0,08; Na₂MoO₄: 0,02.

Solução B₆: (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,96; K₂Cr₂(SO₄)₄.24H₂O: 96,0; NiSO₄.7H₂O: 47,85; Na₂WO₄.2H₂O: 17,94; TiOSO₄.H₂SO₄.8H₂O: 61,1; Co(NO₃)₂.6H₂O: 43,98.

2.2. Extração de Biopolímeros Bruto

A biomassa foi centrifugada a 7500 rpm por 20 min em temperatura ambiente (Hitachi-Japão) para separar a biomassa úmida com o biopolímero do meio de cultivo. Após, para cada 1 g de biomassa seca, foi adicionado 100 mL de água destilada e 25 mL de hipoclorito de sódio (10-12 % de cloro ativo (m/v)) na biomassa úmida e mantida sob agitação por 10 min. A suspensão resultante foi levada à centrifugação (7500 rpm por 20 min em temperatura ambiente). A seguir descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 100 mL de água destilada. Centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se este processo adicionando 50 mL de acetona. O precipitado final (biopolímeros bruto) foi seco em estufa a 35 °C por 48 h.

2.3. Desengorduramento de Biopolímeros Bruto

O biopolímero bruto extraído foi desengordurado por 2 h em hexano, a 60 °C, sob agitação em rota evaporador. Após foi filtrado a vácuo e seco em estufa a 30 °C por 24 h.

2.4. Purificação do PHB

O solvente utilizado para a purificação de PHB foi 1,2-carbonato de propileno (Sigma-Aldrich). Para a purificação do biopolímero foi utilizado o método baseado na Patente US 4140741 A (HEINZLE e LAFFERTY, 1979), Fiorese (2008) e Quines (2010).

Inicialmente foi pesado 10 g do biopolímero bruto desengordurado. Em seguida, foi ressuspenso em 60 mL de 1,2-carbonato de propileno aquecido até a temperatura de 130 °C. O tempo de contato do solvente com o biopolímero bruto desengordurado foi 5 min. A suspensão foi agitada em rota evaporador. A mistura 1,2-carbonato de propileno e biopolímero bruto foi filtrada à quente utilizando filtro qualitativo. A massa retida no filtro foi lavada com 50 mL de 1,2-carbonato de propileno aquecido a 130 °C. O filtrado permaneceu em repouso até atingir a temperatura ambiente. Após foi adicionado 200 mL de acetona à suspensão contendo o PHB e 1,2-carbonato de propileno. A suspensão foi agitada em agitador magnético por 105 min, para posterior filtração à temperatura ambiente. O material polimérico retido no filtro foi lavado com água destilada e a membrana filtrante contendo o biopolímero foram secos em estufa a 65 °C por 24 h.

2.5. Determinação do PHB

A determinação da concentração de PHB foi realizada por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise proposto por Brandl et al. (1988). Ao PHB purificado foram acrescidos 2 mL de metanol acidificado (H_2SO_4 15 %), contendo 0,4 g.L⁻¹ de ácido benzoico e 2 mL de clorofórmio. A amostra foi agitada em vórtex e aquecida a 100 °C por 1 h. Decorrido este tempo, foram agitados novamente em vórtex, voltando ao aquecimento por mais 1 h e 20 min. As amostras foram submetidas ao resfriamento para interromper a reação. Após, adicionou-se 1 mL de água destilada, sendo a mistura agitada em vórtex por 30 s para formação de duas fases. A fase orgânica contendo clorofórmio e PHB foi separada para análise em cromatógrafo gasoso. Para a curva padrão de PHB, o polímero padrão (PHB – Sigma-Aldrich) foi submetido à metanólise conforme descrito por Brandl et al. (1988).

A coluna utilizada para a determinação de PHB foi de sílica fundida (\varnothing 0,53 mm x 30 m) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo utilizado foi CG-90 equipado com detector de ionização de chama (DIR ar-hidrogênio), utilizando nitrogênio como gás de arraste com fluxo constante de $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e as temperaturas de injeção, detecção e coluna foram 200, 230 e $120 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

Para determinação da pureza (P_u) do PHB extraído, desengordurado e purificado utilizou-se a Equação 1. Onde m_{PHB} é a massa de PHB (g) detectada pela cromatografia e m_a é a massa total de biopolímero (g) utilizada para a análise cromatográfica.

$$P_u = \frac{m_{\text{PHB}}}{m_a} \quad (1)$$

2.6. Preparo das Soluções para o *Electrospinning*

Soluções de poli- β -hidroxibutirato (PHB) purificado da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 em concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 % (m/v) foram preparadas e dissolvidas em clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas em agitador magnético durante 24 h à temperatura ambiente. Foram utilizados apenas o PHB com pureza superior a 70 %.

2.7. Processo de *Electrospinning*

No processo de *electrospinning*, o eletrodo de polaridade positiva foi conectado à extremidade do capilar e o isolamento foi conectado ao coletor de alumínio. As soluções foram injetadas por capilar com diâmetro de 0,45 e 0,55 mm. As distâncias entre o coletor e o capilar variaram entre 100, 150 e 200 mm. O potencial elétrico aplicado foi 18,6; 24,1 e 29,6 kV. A vazão da solução foi 150 e $300 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, controlada por bomba ligada ao capilar. A umidade variou de 45 a 60 %. Todos os experimentos foram conduzidos a temperaturas entre 21 e $23 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.8. Caracterização das Fibras

A morfologia das fibras foi observada em microscópio digital (Carl Zeiss Scope.A1, Alemanha). O diâmetro das nanofibras foi determinado pela média de 30 diferentes

fibras para cada 3 imagens e avaliados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação entre médias dos diâmetros, com nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanofibras foram produzidas a partir da técnica do *electrospinning*, que consiste na aplicação de alta voltagem em solução polimérica para a dispersão das fibras no coletor. Primeiramente se produziu fibras com o PHB bruto da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 apenas extraído com hipoclorito de sódio, porém como possui muitas impurezas e estas não eram solúveis em clorofórmio, acabou evitando a passagem da solução pelo capilar, fazendo com que o processo não obtivesse continuidade. A partir destes resultados, foram utilizados apenas PHB com pureza superior a 70 %, que utilizou uma etapa de desengorduramento e posterior purificação com 1,2-carbonato de propileno.

Para a formação das nanofibras, foram testadas diferentes distâncias entre o capilar e o coletor. Deve-se levar em consideração que esta distância tem que ser suficiente para que o solvente evapore até a deposição das fibras no coletor, caso contrário, a umidade une estas, formando fibras não uniformes e fundidas. A distância de 100 mm não foi suficiente para a total evaporação do solvente, enquanto que com 200 mm as fibras se dispersavam para a parte externa do coletor, pois resultam em fibras muito finas e leves, fazendo com que se dispersem da área utilizada para a coleta. A distância fixada foi 150 mm, que apresentou fibras coletadas adequadamente, além de conseguir evaporar o solvente no decorrer do percurso (capilar-coletor) do processo.

As soluções poliméricas com 5, 10 e 15 % (m/v) de PHB foram testadas, porém apresentaram maior percentual de gotas (spray) em relação ao número de fibras formadas, enquanto que em soluções de 20 e 25 % de PHB foi possível a formação de nanofibras, conforme mostra a Tabela 2. O diâmetro das fibras aumenta ao aumentar a concentração e houve uma maior incidência de defeitos nas concentrações poliméricas mais baixas. Este fenômeno ocorre porque, quanto menor a concentração da solução polimérica, mais difícil as fibras secarem antes de chegar ao coletor. Quando úmidas, podem resistir ao processo de solidificação (GONÇALVES et al., 2009).

Soluções com concentrações maiores que 25 % não foram utilizadas, pois apresentaram alta viscosidade dificultando a passagem da solução polimérica pelo capilar. Diferentes diâmetros do capilar (0,45 e 0,55 mm) foram testados para a solução de 25 % de

PHB, porém nos capilares de 0,45 mm não foi possível a passagem da solução devido à obstrução na ponta do capilar decorrente da alta viscosidade da solução.

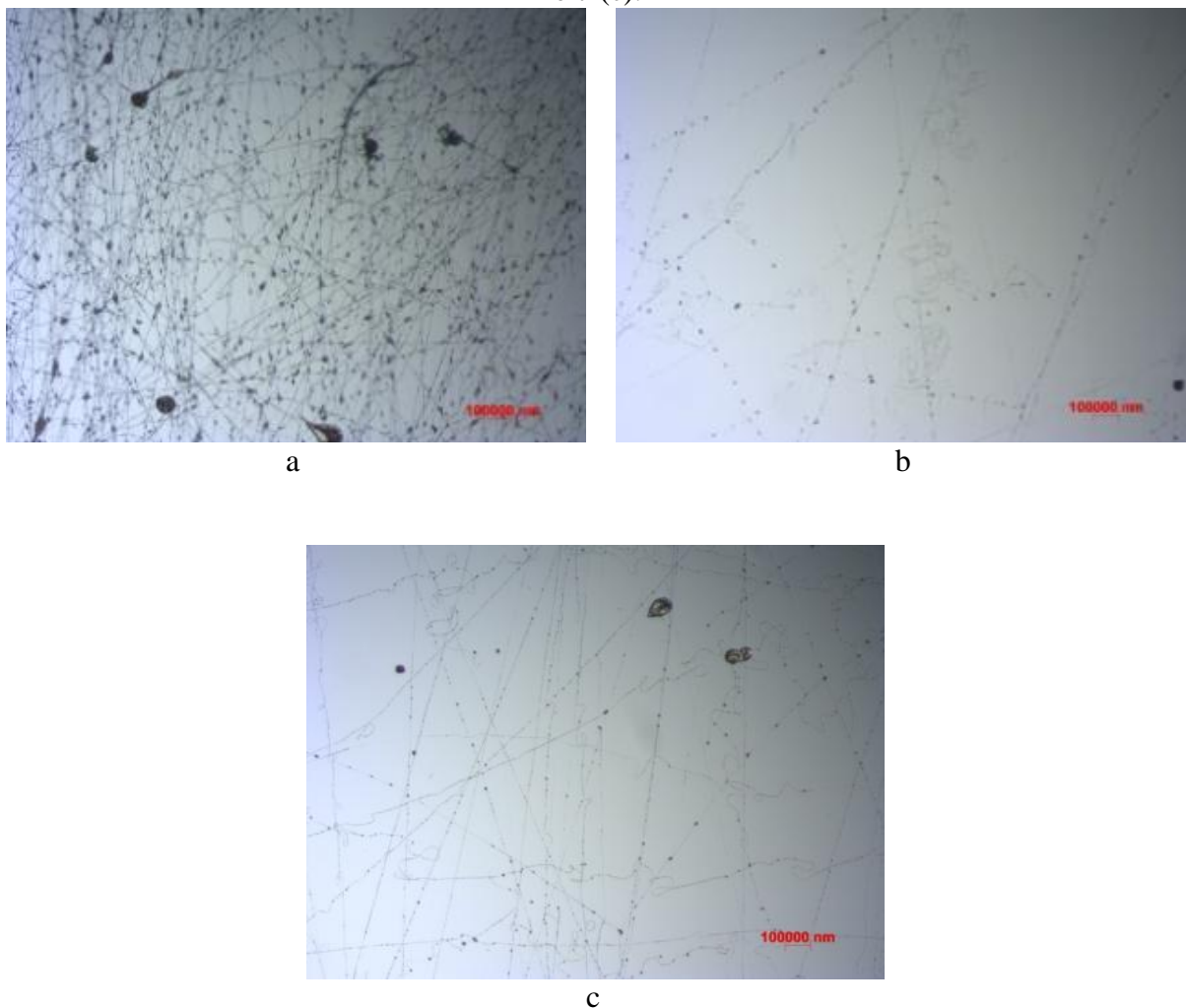
Tabela 2 – Diâmetro das fibras desenvolvidas pelo processo de *electrospinning* em diferentes condições.

Amostra	Concentração da solução de PHB (%)	Tensão (kV)	Vazão ($\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)	Diâmetro do capilar (mm)	Diâmetro das fibras (nm)
1	25	24,1	300	0,55	1756 \pm 166 ^a
2	25	24,1	150	0,55	941 \pm 201 ^b
3	20	24,1	300	0,55	1460 \pm 257 ^c
4	20	24,1	150	0,55	1127 \pm 210 ^d
5	20	24,1	300	0,45	882 \pm 100 ^{be}
6	20	24,1	150	0,45	470 \pm 53 ^f
7	20	29,6	150	0,45	537 \pm 100 ^f
8	20	18,6	150	0,45	793 \pm 121 ^e

As nanofibras produzidas a partir da técnica do *electrospinning* apresentaram diâmetros variados em diferentes condições de processo. Todos os parâmetros em estudo influenciaram na formação destas, porém para o diâmetro das nanofibras os parâmetros que mais influenciaram foram a voltagem, a vazão e o diâmetro do capilar. Quanto maior o diâmetro do capilar, conseqüentemente maior o diâmetro das fibras (Tabela 2).

Quando foi variada apenas a vazão e fixados os demais parâmetros, verificou-se que, ao reduzir a vazão, diminui-se o diâmetro das nanofibras, como pode-se observar entre as amostras 1 e 2, 5 e 6 que apresentaram redução do diâmetro em torno de 50 %. Ao variar a voltagem da fonte de alimentação de 24,1 para 29,6 kV não se obteve diferença significativa ($p>0,05$), obtendo diâmetros de nanofibras de 470 e 537 nm, respectivamente. Enquanto que a menor voltagem utilizada (18,6 kV) resultou em nanofibras com diâmetros maiores (793 nm). Em todas as condições utilizadas, ocorreram presença de gotas na estrutura. Porém os ensaios 6 e 7 apresentaram menores diâmetros (470 e 537 nm), bem como menores quantidades de gotas em relação as demais amostras (Figura 1 b e 1 c).

Figura 1 – Imagens das nanofibras produzidas a partir de PHB purificado da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, visualizadas em microscópio digital, resultante das amostras 3 (a), 6 (b) e 7 (c).



Vários estudos já foram realizados para produção de nanofibras a partir da técnica de *electrospinning*, porém em grande parte são utilizados biopolímeros comerciais, que apresentam massa molar fixa. O PHB purificado da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 apresenta faixa de massas molares diferentes que estão relacionados com o método de extração e purificação. Gonçalves et al. (2009) que produziram nanofibras a partir de PHB da Biocycle, com diâmetros de 500 nm, apresentando gotas em sua estrutura, conseguiram reduzir a quantidade de gotas ao aumentar a concentração da solução polimérica. Neste estudo, ao utilizar solução polimérica com 20 % de PHB obteve-se menores diâmetros, em comparação as soluções de 25 %.

4. CONCLUSÃO

O poli- β -hidroxibutirato purificado da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 é eficiente para a produção de nanofibras. As condições que apresentaram menores diâmetros foi utilizando solução polimérica com concentração 20 % (p/v), vazão $150 \mu\text{L.h}^{-1}$, diâmetro do capilar 0,45 mm e voltagens de 24,1 e 29,6 kV, obtendo nanofibras de 470 e 537 nm, respectivamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977-1982, 1988.

CHEN, H.; LIU, Z.; CEBE, P. Chain confinement in electrospun nanofibers of PET with carbon nanotubes. **Polymer**, v. 50, p. 872-880, 2009.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, 1-24, 2011.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 32-53, 2012.

FAPESP, agencia.fapesp.br/10426, acessado em 22/01/2014.

FENG, H.; HOU, D.; HUANG, Y.; HU, X. Facile synthesis of porous InNbO_4 nanofibers by electrospinning and their enhanced visible-light-driven photocatalytic properties. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 592, p. 301-305, 2014.

FERNANDES, J. G.; CORREIA, D. M.; BOTELHO, G.; PADRÃO, J.; DOURADO, F.; RIBEIRO, C.; LANCEROS-MÉNDEZ, S.; SENCADAS, V. PHB-PEO electrospun fiber

membranes containing chlorhexidine for drug delivery applications. **Polymer Testing**, v. 34, p. 64-71, 2014.

FIGLIANO, M. L. **Estratégias de cultivo, recuperação e caracterização de poli(3-hidroxi-butirato) por *Ralstonia eutropha***. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GONÇALVES, J.; BRANCIFORTI, M. C.; BRETAS, R. E. S.; AGNELLI, J. A. M. Caracterização das mantas de poli(3-hidroxi-butirato) obtidas pelo método de eletrospinning. **10^a CBPOL** (Congresso Brasileiro de Polímeros), 2009.

HEINZLE, E.; LAFFERTY, R. M. **Use of cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-(β -hydroxybutyric acid)**. Patent US 4140741 A, 1979.

LI, M.; WANG, L.-J.; LI, D.; CHENG, Y.-L.; ADHIKARI, B. Preparation and characterization of cellulose nanofibers from de-pectinated sugar beet pulp. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 136-143, 2014.

MATATAGUI, D.; FERNÁNDEZ, M. J.; FONTECHA, J.; SAYAGO, I.; GRÀCIA, I.; CANÉ, C.; HORRILLO, M. C.; SANTOS, J. P. Characterization of an array of love-wave gas sensors developed using electrospinning technique to deposit nanofibers as sensitive layers. **Talanta**, v. 120, p. 408-412, 2014.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, p. 144-150, 2008.

NETO, C. A.; STILLINGS, C.; WENDORFF, J. H.; COSTA, J. A. V.; RUDISILE, M. M.; MORAIS, M. G.; PRANKE, P. H. L.; DERSCH, R. **Matrizes de micro e/ou nanofibras biodegradáveis para desenvolvimento de suporte para células tronco ou diferenciadas oriundas de biopolímeros extraídos de microalga(s) e/ou cianobactéria(s)**. Patente PI 0904515-5 A2, 2011.

QUINES, L. K. M. **Extração de poli(3-hidroxi-butirato) produzido por *Cupriavidus necator* DSM 545 com 1,2-carbonato de propileno.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

ROGINA, A. Electrospinning process: versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. **Applied Surface Science**, v. 296, p. 221-230, 2014.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler.** Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL

1. CONCLUSÃO GERAL

Dentre as microalgas estudadas, as que mais produziram biopolímeros foram *Nostoc ellipsosporum* (19,27 %) e *Spirulina* sp. LEB 18 (20,62 %), nos tempos de 10 e 15 d, respectivamente. A fase de crescimento que propiciou o maior acúmulo de grânulos de PHB foi a fase final de maior crescimento celular.

Cultivos autotróficos e mixotróficos estimulam a síntese de biopolímeros. Porém a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 produz maiores rendimentos de biopolímeros (54,48 %) quando utiliza bicarbonato de sódio como fonte de carbono e limitação de nitrogênio (0,05 g.L⁻¹ de NaNO₃).

O solvente 1,2-carbonato de propileno foi eficiente para a purificação do biopolímero poli- β -hidroxibutirato extraído da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18. A maior pureza de PHB encontrada foi 92,4 % ao utilizar temperatura de 130 °C e tempo de contato do solvente com o biopolímero de 5 min.

O poli- β -hidroxibutirato purificado da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 pode ser utilizado para o desenvolvimento de nanofibras. As condições que resultaram em menores diâmetros foram ao utilizar solução polimérica 20 %, vazão 150 $\mu\text{L.h}^{-1}$, diâmetro do capilar 0,45 mm e voltagens de 24,1 e 29,6 kV, obtendo nanofibras de 470 e 537 nm, respectivamente.

2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar outras microalgas produtoras de biopolímeros;
- Estudar diferentes fontes e concentrações de nutrientes do meio de cultivo;
- Realizar produção em escala piloto com as melhores condições de cultivo para posterior purificação do biopolímero;
- Avaliar diferentes condições de purificação com o solvente 1,2-carbonato de propileno, bem como precipitação do biopolímero com água;
- Avaliar a produção de nanofibras a partir de blendas de PHB com diferentes polímeros e solventes;
- Avaliar a biodegradabilidade do biopolímero a partir de filmes plásticos em solos de compostagem;
- Produzir filmes plásticos para a caracterização em relação às propriedades mecânicas e microbiológicas.

**CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

ABE, H.; DOI, Y. Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 185-192, 1999.

ANDRADE, M. R. **Biosistema para produção de biomassa microalgal e biometano**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande – RS, 2009.

ANDRADE, M. R.; CAMERINI, F. V.; COSTA, J. A. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2031-2034, 2008.

AOAC – **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 17th ed., HORWITZ, W. ed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

APHA – **Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed., CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D.; eds. Washington: American Public Health Association, 1998.

ARRIETA, M. P.; LÓPEZ, J.; HERNANDEZ, A.; RAYÓN, E. Ternary PLA-PHB-limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. **European Polymer Journal**, v. 50, p. 255-270, 2014.

ASHBY, R. A.; SOLAIMAN, D. K. Y.; STRAHAN, G. D.; ZHU, C.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. Glycerine and levulinic acid: renewable co-substrates for the fermentative synthesis of short-chain poly(hydroxyalkanoates) biopolymers. **Bioresource technology**, v. 118, p. 272-280, 2012.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2^a ed., McGraw-Hill, Singapore, p. 397-398, 1986.

BALAJI, S.; GOPI, K.; MUTHUVELAN, B. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, p. 278-285, 2013.

BHATI, R.; MALLICK, N. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by a N₂-fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* Agardh. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 505-512, 2012.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**. 2^a edição. São Carlos – SP. Editora Rima, 2006.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 63-67, 2000.

BOUGARAN, G.; BERNARD, O.; SCIANDRA, A. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. **Journal of Theoretical Biology**, v. 265, p. 443-454, 2010.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977-1982, 1988.

BUCCI, D. Z.; TAVARES, L. B. B.; SELL, I. Biodegradation and physical evaluation of PHB packaging. **Polymer Testing**, v. 26, p. 908-915, 2007.

BUCCI, D. Z. **Avaliação de embalagens de PHB (poli(ácido 3-hidroxibutírico)) para alimentos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis – SC, 2003.

CADIOLI, L. P.; SALLA, L. D. **Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia**, v. 1, n. 1, 2006. Disponível em: sare.unianhanguera.edu.br/index.php/rcext/article/view/393/393. Acessado em: novembro de 2012.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. 5^a edição, São Paulo. Editora Thomson, 2006.

CAMPOS, M. I.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; DRUZIAN, J. I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial crops and products**, v, 52, p. 338-346, 2014.

CANEVAROLO Jr., S. V. C. **Ciência dos Polímeros – Um Texto Básico para Tecnólogos e Engenheiros**. 3ª edição, São Paulo: Artliber, 2010.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications. Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.

CHEN, H.; LIU, Z.; CEBE, P. Chain confinement in electrospun nanofibers of PET with carbon nanotubes. **Polymer**, v. 50, p. 872-880, 2009.

COLLA, L. M.; MUCCILO-BAISCH, A. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerol in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 405-411, 2008.

CÓRDOBA, L. T.; BOCANEGRA, A. R. D.; LLORENTE, B. R.; HERNÁNDEZ, E. S.; ECHEGOYEN, F. B.; BORJA, R.; BEJINES, F. R.; MORCILLO, M. F. C. Batch culture growth of *Chlorella zofingiensis* on effluent derived from two-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid waste. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 1-8, 2008.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; DALCANTON, F.; REICHERT, C. C.; DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic, cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 61c, p. 105-110, 2006.

DESAI, S. H.; ATSUMI, S. Photosynthetic approaches to chemical biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. 1031-1036, 2013.

DOBROTH, Z. T.; HU, S.; COATS, E. R.; McDONALD, A. G. Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3352-3359, 2011.

DUARTE, I. C. S. **Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella sp* (Chlorophyta, Chlorococcales)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista – USP, Rio Claro – SP, 2001.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, 1-24, 2011.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia**. São Paulo. Editora Artliber, 2006.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 32-53, 2012.

FAPESP, agencia.fapesp.br/10426, acessado em 22/01/2014.

FENG, H.; HOU, D.; HUANG, Y.; HU, X. Facile synthesis of porous InNbO_4 nanofibers by electrospinning and their enhanced visible-light-driven photocatalytic properties. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 592, p. 301-305, 2014.

FERNANDES, J. G.; CORREIA, D. M.; BOTELHO, G.; PADRÃO, J.; DOURADO, F.; RIBEIRO, C.; LANCEROS-MÉNDEZ, S.; SENCADAS, V. PHB-PEO electrospun fiber membranes containing chlorhexidine for drug delivery applications. **Polymer Testing**, v. 34, p. 64-71, 2014.

FIGLIARESE, M. L.; FREITAS, F.; PAIS, J.; RAMOS, A. M.; ARAGÃO, G. M. F.; REIS, M. A. M. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent

extraction with 1,2-propylene carbonate. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, p. 454-461, 2009.

FIORESE, M. L. **Estratégias de cultivo, recuperação e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha***. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

FOX, R. D. ***Spirulina* Production & Potencial**. France, Edisud, 1996.

FRADINHO, J. C.; DOMINGOS, J. M. B.; CARVALHO, G.; OEHMEN, A.; REIS, M. A. M. Polyhydroxyalkanoates production by a mixed photosynthetic consortium of bacteria and algae. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 146-153, 2013.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006

GOO, B. G.; BAEK, G.; CHOI, D. J.; PARK, Y. I.; SYNYTSYA, A.; BLEHA, R.; SEONG, D. H.; LEE, C. G.; PARK, J. K. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 343-350, 2013.

GONÇALVES, J.; BRANCIFORTI, M. C.; BRETAS, R. E. S.; AGNELLI, J. A. M. Caracterização das mantas de poli(3-hidroxibutirato) obtidas pelo método de eletrofição. **10^a CBPOL**, 2009.

GRASSIE, N.; MURRAY, E. J.; HOLMES, P. A. Thermal degradation of poly(-(D)- β -hydroxybutyric acid): Part 3 – The reaction mechanism. **Polymer Degradation and Stability**, v. 6, p. 127-134, 1984.

HAZER, D. B.; KILIÇAY, E.; HAZER, B. Poly(3-hydroxyalkanoate)s: Diversification and biomedical applications. A state of the art review. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 637-647, 2012.

HEINZLE, E.; LAFFERTY, R. M. **Use of cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-(β -hydroxybutyric acid)**. Patent US 4140741 A, 1979.

HENRARD, A. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium* sp.. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4897-4900, 2011.

HENRARD, A. S. A. **Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp.**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande – RS, 2009.

INNOCENTINI-MEI, L. H.; MARIANI, P. D. S. C. **Visão Geral Sobre Polímeros ou Plásticos Ambientalmente Biodegradáveis (PADs)**. Campinas, 2005.

JAU, M-H.; YEW, S-P.; TOH, P. S. Y.; CHONG, A. S. C.; CHU, W-L.; PHANG, S-M.; NAJIMUDIN, N.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 144-151, 2005.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. **Applied Energy**, v. 88, p. 3336-3341, 2011.

KOMÁREK, J.; KOPECKÝ, J.; CEPÁK, V. Generic characters of the simplest cyanoprokariotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*. **Cryptogamie, Algol.**, v. 20 n. 3, p. 209-222, 1999.

KONAGESKI Jr., V. A. K.; DAGOSTINI, L.; RENZ, M. **Plásticos biodegradáveis: revisão sobre métodos de preparação e propriedades da biodegradação**. Departamento de Biologia e Química, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, 2009. <http://www.scribd.com/doc/3033642/PLASTICOS-BIODEGRADAVEIS>, acessado em 26 de agosto de 2012.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F. X.; LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 371-380, 2010.

LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 397-442, 2014.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2^a ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LI, M.; WANG, L-J.; LI, D.; CHENG, Y-L.; ADHIKARI, B. Preparation and characterization of cellulose nanofibers from de-pectinated sugar beet pulp. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 136-143, 2014.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biociologia Industrial** – Processos Fermentativos e Enzimáticos, v. 3. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

LOPES, T. M.; COSTA, J. A. V.; TRINDADE, G. S. Differences in the sensibility of multi-drug resistant (MDR) and non-MDR human tumor cells to different concentrations of *Spirulina platensis*. In: **Les Cyanobactéries pour la Santé, la Science et le Développement**, Embiez Island, 2004.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos-SP, 2006.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; MARQUEZ, U. M. L.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Phycology**, v. 34, p. 798-811, 1998.

LUO, R.; CHEN, J.; ZHANG, L.; CHEN, G. Polyhydroxyalkanoates copolyesters produced by *Ralstonia eutropha* PHB-4 harboring a low-substrate-specificity PHA synthase PhaC_{2Ps}

from *Pseudomonas stutzeri* 1317. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 218-225, 2006.

MACHADO, M. L. C.; PEREIRA, N. C.; MIRANDA, L. F.; TERENCE, M. C. Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli-3-hidroxi-butirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 65-71, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12ª edição, editora Artmed, Porto Alegre, 2010.

MALLICK, N.; GUPTA, S.; PANDA, B.; SEN, R. Process optimization for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production by *Nostoc muscorum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 125-130, 2007.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Cinco Reinos: Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra**. 3ª Edição. Editora Guanabara Koogan, 2001.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3ª edição, São Paulo. Editora Guanabara Koogan, 2010.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MATATAGUI, D.; FERNÁNDEZ, M. J.; FONTECHA, J.; SAYAGO, I.; GRÀCIA, I.; CANÉ, C.; HERRILLO, M. C.; SANTOS, J. P. Characterization of an array of love-wave gas sensors developed using electrospinning technique to deposit nanofibers as sensitive layers. **Talanta**, v. 120, p. 408-412, 2014.

MCCHALICHER, C. W. J.; SRIENC, F.; ROUSE, D. P. Solubility and degradation of polyhydroxyalkanoate biopolymers in propylene carbonate. **American Institute of Chemical Engineers**, v. 56, n. 6, p. 1616-1625, 2010.

MENG, Z. X.; XU, X. X.; ZHENG, W.; ZHOU, H. M. LI, L.; ZHENG, Y. F.; LOU, X. Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 97-102, 2011.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v.110, p.85-93, 2004.

MICHAELI, W.; GREIF, H.; KAUFMANN, H.; VOSSEBÜRGER, F-J. **Tecnologia dos Plásticos**. 1ª edição, 3ª reimpressão, São Paulo. Editora Edgard Blücher LTDA, 2008.

MOHAMMADI, M.; HASSAN, M. A.; PHANG, L-Y.; SHIRAY, Y.; MAN, H. C.; ARIFFIN, H. Intracellular polyhydroxyalkanoates recovery by cleaner halogen-free methods towards zero emission in the palm oil mill. **Journal of Cleaner Production**, v. 37, p. 353-360, 2012.

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V. WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina (Arthrospira)*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2872-2876, 2010.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1038-1042, 2008.

MORAIS, M. G. **Bioengenharia microalgal na utilização de gás de combustão e extração de biopolímeros para desenvolvimento de nanofibras**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande – RS, 2008.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Z. Naturforsch.**, v. 63c, p. 144-150, 2008.

MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecido com *Spirulina platensis*: características físico-química, sensorial e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 333-340, 2006.

NETO, C. A.; STILLINGS, C.; WENDORFF, J. H.; COSTA, J. A. V.; RUDISILE, M. M.; MORAIS, M. G.; PRANKE, P. H. L.; DERSCH, R. **Matrizes de micro e/ou nanofibras biodegradáveis para desenvolvimento de suporte para células tronco ou diferenciadas oriundas de biopolímeros extraídos de microalga(s) e/ou cinaobactéria(s)**. Patente PI 0904515-5 A2, 2011.

NISHIOKA, M. NAKAI, K.; MIYAKE, M.; ASADA, Y.; TAYA, M. Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate-limited conditions. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1095-1099, 2001.

NONHEBEL, S. Renewable energy and food supply: will there be enough land? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 9, p. 191-201, 2005.

OGBONDA, K. H.; AMINIGO, R. E.; ABU, G. O. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2207-2211, 2007.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering Journal**, v. 20, p. 459-466, 2003.

OLTRA, C. Stakeholder perceptions of biofuels from microalgae. **Energy policy**, v. 39, p. 1774-1781, 2011.

PANDA, B. JAIN, P.; SHARMA, L.; MALLICK, N. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1296-1301, 2006.

PANDA, B.; SHARMA, L.; MALLICK, N. Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum* and *Spirulina platensis* under phosphate limitation. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 1376-1379, 2005.

PESSOA Jr., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri-SP:Manole, 2005.

PLASTIVIDA. http://planetasustentavel.abril.com.br/noticia/lixo/conteudo_246465.shtml. Acessado em: setembro de 2012.

QUINES, L. K. M. **Extração de poli(3-hidroxi-butirato) produzido por *Cupriavidus necator* DSM 545 com 1,2-carbonato de propileno**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO_x and NO_x resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3132-3136, 2011.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

RAMACHANDER, T. V. N.; ROHINI, D.; BELHEKAR, A.; RAWAL, S. K. Synthesis of PHB by recombinant *E. coli* harboring an approximately 5kb genomic DNA fragment from *Streptomyces aureofaciens* NRRL 2209. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 63-69, 2002.

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W-E.; LIM, T-C.; MA, Z. **An introduction to electrospinning and nanofibers**. Danvers – USA, World Scientific, 2005.

RAVEN, J. A. Sensing pH? **Plant, Cell and Environment**, v.13, p.721-729, 1990.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI.; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003.

REINEHR, C. O. **Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em modo semicontínuo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande – RS, 2003.

RICHMOND, A. Cell response to environmental factors. **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boston: CRC Press, 1990.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

ROGINA, A. Electrospinning process: versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. **Applied surface science**, v. 296, p. 221-230, 2014.

ROSA, A. P. C.; CARVALHO, L. F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3071-3073, 2011.

SAMANTARAY, S.; MALLICK, N. Production and characterization of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) polymer from *Aulosira fertilissima*. **J. Appl. Phycol.**, v. 24, p. 803-814, 2012.

SANKHLA, I. S.; BHATI, R.; SINGH, A. K.; MALLICK, N. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxivalerate) co-polymer production from a local isolate, *Brevibacillus invocatus* MTCC 9039. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1947-1953, 2010.

SATYANARAYANA, A. B.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research**, v. 35, p. 291-311, 2011.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SCHMIDT, M. **Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* DSM 545 em meio suplementado com óleo de soja miniemulsionado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SHARMA, L.; SINGH, A. K.; PANDA, B.; MALLICK, N. Process optimization for poly-beta-hydroxybutyrate production in a nitrogen fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 987-993, 2007.

SHARMA, L.; MALLICK, N. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1304-1310, 2005.

SHIMADZU. <http://www.shimadzu.com/an/toc/lab/toc-14.html>, acessado em 14 de novembro de 2013.

SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. K.; MISHRA, S. Polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 255-260, 2010.

SILVA, M. J.; FIGUEIREDO, B. R. S.; RAMOS, R. T. C.; MEDEIROS, E. S. F. Food resources used by three species of fish in the semi-arid region of Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 4, p. 825-833, 2010.

SILVA, L. F.; GÓMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACINO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgal to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 4316-4342, 2012.

TALEB, A. F.; MOHTASHAMI, S. K.; TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M.; BAGHERI, A.; ZEINALABEDINI, M.; MIRZAEI, H. H.; MIRZAJANZADEH, M.; SHAFAROU DI, S. M.; BAKHTIARI, S. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, p. 258-267, 2013.

TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*). In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) **Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997.

VALDERRAMA, L. T.; DEL CAMPO, C. M.; RODRIGUEZ, C. M.; BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemma minuscula*. **Water Research**, v. 36, p. 4185-4192, 2002.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, Cell-biology and Biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997.

WANG, B.; PUGH, S.; NIELSEN, D. R.; ZHANG, W.; MELDRUM, D. R. Engineering cyanobacteria for photosynthetic production of 3-hydroxybutyrate directly from CO₂. **Metabolic Engineering**, v. 16, p. 68-77, 2013.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; McCLEMENTS, D. J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 9, p. 107-116, 2006.

WU, G. F.; WU, Q. Y.; SHEN, Z. Y. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 85-90, 2001.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler**. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

ZHIJIANG, C.; CHENGWEI, H.; GUANG, Y. Crystallization behavior, thermal property and biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) grafting copolymer. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, p. 1602-1609, 2011.

ZHU, C.; NOMURA, C. T.; PERROTTA, J. A.; STIPANOVIC, A. J.; NAKAS, J. P. The effect of nucleating agents on physical properties of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHB-co-HV) produced by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. **Polymer Testing**, v. 31, p. 579-585, 2012.