UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

BIOCONVERSÃO DE ETILENOGLICOL A ÁCIDO GLICÓLICO POR BACTÉRIAS ACÉTICAS

ANELIZE DE OLIVEIRA MORAES

Orientadores: Nei Pereira Junior, *PhD* (EQ/UFRJ)
Ninoska Isabel Bojorge Ramirez, *DSc* (UFF)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
2018

ANELIZE DE OLIVEIRA MORAES

BIOCONVERSÃO DE ETILENOGLICOL A ÁCIDO GLICÓLICO POR BACTÉRIAS ACÉTICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências (*MSc*).

ORIENTADORES

Nei Pereira Junior, *PhD* (EQ/UFRJ)
Ninoska Isabel Bojorge Ramirez, *DSc* (UFF)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
2018

CIP - Catalogação na Publicação

M827b

Moraes, Anelize de Oliveira
Bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico por bactérias acéticas / Anelize de Oliveira Moraes. -- Rio de Janeiro, 2018.
119 f.

Orientador: Nei Pereira Junior.
Coorientadora: Ninoska Isabel Bojorge Ramirez.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.

1. Ácido glicólico. 2. Etilenoglicol. 3. Bactérias acéticas. 4. Gluconobacter oxydans CCT 0552. I. Pereira Junior, Nei, orient. II. Ramirez, Ninoska Isabel Bojorge, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ANELIZE DE OLIVEIRA MORAES

BIOCONVERSÃO DE ETILENOGLICOL A ÁCIDO GLICÓLICO POR BACTÉRIAS ACÉTICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências (*MSc*).

Aprovada em 31/10/2018, por

Nei Pereira Junior, *PhD*

Ninoska Isabel Bojorge Ramirez, *DSc*

Ivaldo Itabaiana Jr., *DSc*

Sorele Batista Fiaux, *DSc*

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2018

Aos meus maiores exemplos de força, fé e amor:
meus pais, Wagner e Maria Aparecida, e minha irmã, Ligiane
dedico esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por todas as bênçãos, força e sabedoria durante toda a minha trajetória.

Aos meus pais maravilhosos, Wagner e Maria Aparecida, e à minha irmã amada, Ligiane, por todo o amor, carinho e compreensão incondicional, por todo apoio emocional e financeiro e por sempre me incentivarem a buscar a melhor versão de mim.

Ao querido professor e orientador, Nei Pereira Junior, por toda a confiança e encorajamento, por todas as relevantes contribuições para o desenvolvimento deste trabalho, por exercer com tamanho amor e competência a sua profissão e por ser enorme fonte de inspiração para mim.

À querida professora e orientadora, Ninoska Isabel Bojorge Ramirez, por todo apoio e confiança no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos mais que especiais que o LADEBIO me deu. Agradeço por terem estado sempre ao meu lado, por todo o apoio nos momentos delicados, por compartilharem comigo todas as minhas dores e alegrias e pela paciência com todos os meus desesperos e exageros. Agradeço por todos os cafés e biscoitinhos no fim da tarde, por todas as noites dormidas no laboratório, por todos os abraços e todos os karaokês. Sem dúvida alguma, vocês tornaram a caminhada até aqui muito mais leve e divertida.

Ao funcionário do LADEBIO, Luiz, por toda a ajuda nos últimos anos.

A todos os familiares e amigos que, mesmo longe, sempre torceram por mim e enviaram as melhores energias.

A todos os professores que tive, pela contribuição na minha formação pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), pela doação de uma das bactérias estudadas na presente dissertação (*Acetobacter aceti* INCQS 00206).

À empresa Ingredion Brasil Ingredientes Industriais Ltda, por ter cedido gentilmente D-Manitol, fonte de carbono utilizada para o crescimento celular, permitindo que o presente trabalho pudesse ser concluído.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

RESUMO

MORAES, Anelize de Oliveira. **Bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico por bactérias acéticas.** Dissertação de mestrado, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – Brasil, 2018.

Orientadores: Nei Pereira Junior e Ninoska Isabel Bojorge Ramirez.

O ácido glicólico é um composto de extrema importância na indústria química e, na atualidade, é produzido majoritariamente a partir de derivados de petróleo. A fim de acompanhar e suprir a demanda crescente, nos últimos anos, novas tecnologias de produção vêm sendo desenvolvidas. Uma alternativa capaz de tornar a rota de síntese renovável, limpa, completamente independente de rotas petroquímicas habituais e integrada ao contexto de Biorrefinaria é pela produção bioquímica desse ácido orgânico a partir de bioetilenoglicol. Neste cenário, o objetivo do presente trabalho é explorar a capacidade de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por bactérias acéticas de diferentes gêneros e desenvolver um processo biotecnológico de formação do ácido orgânico pela avaliação adequada dos parâmetros envolvidos na conversão. O processo foi dividido em duas etapas: crescimento celular e produção de ácido glicólico. Inicialmente, realizou-se a seleção da linhagem de maior crescimento e melhor produção do ácido de interesse, *Gluconobacter oxydans* CCT 0552. Em seguida, os parâmetros associados à bioconversão foram calculados e os efeitos de diferentes fatores do processo foram elucidados. Entre eles: concentração celular, pH, temperatura, suplementação do meio, concentração de substrato e produto, atividade e reutilização celular e forma de condução do processo. Os melhores resultados foram obtidos em biorreator instrumentado de agitação pneumática do tipo coluna de bolhas. Em etapa de bioconversão de etilenoglicol, foram alcançados 32,5 g/L de ácido glicólico, com produtividade volumétrica de 0,67 $gL^{-1}h^{-1}$ e fator de rendimento $Y_{P/S}$ de 1,19 g/g. O presente estudo pode auxiliar pesquisas futuras para o desenvolvimento de um processo economicamente viável e ambientalmente sustentável de geração de ácido glicólico.

Palavras-chave: Ácido glicólico, Etilenoglicol, Bactérias acéticas, *Gluconobacter oxydans* CCT 0552.

ABSTRACT

MORAES, Anelize de Oliveira. **Bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico por bactérias acéticas.** Dissertação de mestrado, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – Brasil, 2018.

Advisors: Nei Pereira Junior e Ninoska Isabel Bojorge Ramirez.

Glycolic acid is an extremely important molecule of chemical industry that is, currently, mostly synthesized from oil derivatives. In order to meet market demand, in the last years, new manufacturing technologies have been developed. An alternative route that is capable of converting its production in renewable, cleaning, completely independent of oil and integrated into the context of Biorefinery is by biochemical generation of this organic acid from bioethylene glycol. In this scenario, this work aims at exploring the ability of acetic acid bacteria in producing glycolic acid from ethylene glycol. Furthermore, its purpose is to develop a biotechnological process of acid formation by appropriate evaluation of parameters involved in the conversion. The process is divided into two main stages: cell growth and glycolic acid generation itself. Initially, screening of the strain with best growth and best acid production was carried out - *Gluconobacter oxydans* CCT 0552. Subsequently, the parameters associated with biotransformation were calculated and the effects of different factors, such as biomass concentration, pH, temperature, medium supplementation, substrate and product concentrations, cellular activity and recycling and process conduction way, were elucidated. The best results were achieved in instrumented and pneumatic agitated bioreactor of bubble column's type. In the stage of bioconversion of ethylene glycol, glycolic acid titer of 32,5 g/L, volumetric productivity of 0,67 $gL^{-1}h^{-1}$ and $Y_{P/S}$ yield of 1,19 g/g were attained. The present study can support future researches for development of a cost-effective and an environmentally sustainable production of glycolic acid.

Keywords: Glycolic acid, Ethylene glycol, Acetic Acid Bacteria, *Gluconobacter oxydans* CCT 0552.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do 1,2-etanodiol....21

Figura 2: Metabolismo principal do etilenoglicol....24

Figura 3: Rota majoritária de produção de monoetilenoglicol....27

Figura 4: Rota alternativa para produção seletiva de monoetilenoglicol....28

Figura 5: Desidratação catalítica do etanol....28

Figura 6: Conversão de celulose a etilenoglicol....30

Figura 7: Demanda global de monoetilenoglicol por aplicações....31

Figura 8: Capacidade de produção global de monoetilenoglicol por região....32

Figura 9: Estrutura química do ácido 2-hidroxietanoico....33

Figura 10: Rota predominante de síntese do ácido glicólico....35

Figura 11: Reação do ácido cloroacético com solução aquosa de hidróxido de sódio....37

Figura 12: Etapas da conversão bioquímica de etilenoglicol a ácido glicólico....38

Figura 13: Síntese químico-enzimática do ácido glicólico....39

Figura 14: Demanda global de ácido glicólico por aplicações....43

Figura 15: Bioconversão provável de etilenoglicol a ácido glicólico por bactérias acéticas do gênero *Gluconobacter*....51

Figura 16: Regressão linear e coeficiente de determinação para a quantificação de biomassa da linhagem *Acetobacter aceti* INCQS 00206 pelo método da turbidimetria. Absorvância a 600 nm....56

Figura 17: Regressão linear e coeficiente de determinação para a quantificação de biomassa da linhagem *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174 pelo método da turbidimetria. Absorvância a 600 nm....56

Figura 18: Regressão linear e coeficiente de determinação para a quantificação de biomassa da linhagem *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 pelo método da turbidimetria. Absorvância a 600 nm....57

Figura 19: Regressão linear e coeficiente de determinação para a quantificação de biomassa da linhagem *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064 pelo método da turbidimetria. Absorvância a 600 nm....57

Figura 20: Cromatograma típico de determinação de ácido glicólico e etilenoglicol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência....58

Figura 21: Biorreator instrumentado e agitado pneumaticamente com volume nominal de 10L e relação altura: diâmetro 6:1 (Electrolab Biotech Ltd.) utilizado nos experimentos....72

Figura 22: Microscopia ótica de células de acetobactérias coradas pela técnica de Gram....74

Figura 23: Crescimento das bactérias acéticas em diferentes temperaturas (26ºC, 28ºC e 30ºC) em meio contendo D-manitol (25 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L), por 24h, em Shaker a 200 rpm....76

Figura 24: Perfil cinético de ativação das bactérias acéticas em D-manitol (25 g/L) como única fonte de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm 77

Figura 25: Perfil cinético de ativação das bactérias acéticas em etilenoglicol (25 g/L) como única fonte de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm 77

Figura 26: Perfil cinético de propagação das bactérias acéticas em D-manitol (25 g/L) como única fonte de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm. Inóculo: 10% (v/v) do cultivo de ativação em D-manitol (25 g/L) 79

Figura 27: Perfil cinético de propagação das bactérias de ácido acético em etilenoglicol (25 g/L) como única fonte de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm. Inóculo: 10% (v/v) do cultivo de ativação em D-manitol (25 g/L) 79

Figura 28: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (23 g/L) e produção de ácido glicólico por ***Acetobacter aceti*** **INCQS 00206**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com inóculo de 3 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) 82

Figura 29: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (22 g/L) e produção de ácido glicólico por ***Gluconobacter oxydans*** **subsp.** ***suboxydans*** **CCT 0174**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com inóculo de 5 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) 82

Figura 30: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (21 g/L) e produção de ácido glicólico por ***Gluconobacter oxydans*** **CCT 0552**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com inóculo de 5 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) 83

Figura 31: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (21 g/L) e produção de ácido glicólico por ***Gluconoacetobacter xylinus*** **CCT 0064**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com inóculo de 5 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) 83

Figura 32: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (14 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com **baixa** concentração celular (1 g/L) e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) 86

Figura 33: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (13 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com **média** concentração celular (3,5 g/L) e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) 86

Figura 34: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (13 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com **alta** concentração celular (6 g/L) e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) 87

Figura 35: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (14 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e **pH inicial 5**, com inóculo de 1,6 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) 88

Figura 36: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (14 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e **pH inicial 6**, com inóculo de 1 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) 89

Figura 37: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (14 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e **pH inicial 7**, com inóculo de 0,8 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) 89

Figura 38: Diagrama de Pareto relacionando a significância dos fatores envolvidos com a produção ácido glicólico por meio do delineamento fatorial 2^3 com três repetições do ponto central 95

Figura 39: Produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de **diferentes concentrações iniciais de etilenoglicol**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, por 24 e 72 horas, com inóculo de 2 g/L 96

Figura 40: Redução percentual de substrato na produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de **diferentes concentrações iniciais de etilenoglicol**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, por 72 horas, com inóculo de 2 g/L 96

Figura 41: Produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de etilenoglicol (10 g/L) em frascos já contendo **diferentes concentrações iniciais de produto** a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, por 72 horas, com inóculo de 2 g/L 98

Figura 42: Perfil cinético de propagação da bactéria *G. oxydans* CCT 0552 em meio contendo D-manitol (25 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) e inóculo de 10% (v/v) do cultivo de ativação em D-manitol (25 g/L) em **biorreator**, agitado pneumaticamente, a 28ºC e aeração suficiente para manter o oxigênio dissolvido 30% acima da saturação 102

Figura 43: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (33 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, adotando-se a estratégia de batelada alimentada, em **biorreator**, agitado pneumaticamente, a 28ºC, pH 5 e aeração suficiente para manter o oxigênio dissolvido 30% acima da saturação, com inóculo de 3 g/L 102

Figura 44: Evolução dos resultados obtidos para produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades químicas e físicas do etilenoglicol 23

Tabela 2: Resultados de conversão e seletividade relevantes da literatura para transformação de celulose e derivados em etilenoglicol 30

Tabela 3: Propriedades físicas e químicas da solução aquosa de ácido glicólico 70% (m/v) . 34

Tabela 4: Resultados relevantes na literatura para produção biotecnológica de ácido glicólico a partir de diferentes substratos e formas de condução de processo 40

Tabela 5: Gêneros e espécies de bactérias acéticas 46

Tabela 6: Principais características das acetobactérias, de acordo com o gênero 47

Tabela 7: Composição do meio de crescimento e manutenção recomendado para bactérias de ácido acético 63

Tabela 8: Temperatura de incubação para cada microrganismo de acordo com o banco de cultura de origem 64

Tabela 9: Parâmetros avaliados para seleção da linhagem 67

Tabela 10: Fatores e níveis usados no planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central 69

Tabela 11: Matriz do planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central 69

Tabela 12: Crescimento das bactérias acéticas em diferentes temperaturas (26ºC, 28ºC e 30ºC) em meio contendo D-manitol (25 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L), por 24h, em Shaker a 200 rpm 75

Tabela 13: Parâmetros associados ao crescimento microbiano na etapa de ativação em presença de D-manitol (25 g/L) como fonte única de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm 77

Tabela 14: Parâmetros associados ao crescimento microbiano na etapa de ativação em presença de etilenoglicol (25 g/L) como fonte única de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm 78

Tabela 15: Parâmetros associados ao crescimento microbiano na etapa de propagação em presença de D-manitol (25 g/L) como fonte única de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm 79

Tabela 16: Parâmetros associados ao crescimento microbiano na etapa de propagação em presença de etilenoglicol (25 g/L) como fonte única de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm 80

Tabela 17: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por bactérias de ácido acético, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, por 72 horas 83

Tabela 18: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol (14 g/L) por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, por 50 horas, com diferentes concentrações celulares 86

Tabela 19: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol (14 g/L) por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm, por 50 horas, com inóculo de 1 g/L em diferentes valores de pH inicial 89

Tabela 20: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol (14 g/L) por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm, por 6 horas, com inóculo de 1 g/L em diferentes valores de pH inicial 90

Tabela 21: Matriz do planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central (C) para a produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm, pH inicial 7, por 48 horas, com inóculo de 2 g/L 92

Tabela 22: Tabela ANOVA do planejamento fatorial 2^3 com três repetições do ponto central para a variável de resposta concentração de ácido glicólico (g/L) 92

Tabela 23: Tabela de Efeitos Estimados do planejamento fatorial 2^3 com três repetições do ponto central para a variável de resposta concentração de ácido glicólico (g/L): Parte I 93

Tabela 24: Tabela de Efeitos Estimados do planejamento fatorial 2^3 com três repetições do ponto central para a variável de resposta concentração de ácido glicólico (g/L): Parte II 94

Tabela 25: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico a partir de diferentes concentrações de etilenoglicol por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, por 72 horas, com inóculo de 2 g/L 96

Tabela 26: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de etilenoglicol (10 g/L), em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, em bateladas sequenciais de 24h cada, com inóculo de 2 g/L 99

Tabela 27: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de etilenoglicol (total de 30 g/L), em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, por 72 horas, com inóculo de aproximadamente 1 g/L em diferentes formas de condução do processo 100

Tabela 28: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de etilenoglicol (33 g/L), adotando-se a estratégia de batelada alimentada, em biorreator agitado pneumaticamente a 28ºC, pH 5 e com aeração suficiente para manter o oxigênio dissolvido 30% acima da saturação, com inóculo de 3 g/L 103

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ	Taxa específica de crescimento
1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
AAB	Bactérias acéticas, sigla do inglês
AAD	Academia Americana de Dermatologia
ABIQUIM	Associação Brasileira da Indústria Química
ALDH	Enzima aldeído desidrogenase solúvel no citoplasma
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
CAS	Chemical Abstracts Service
CCT	Coleção de Culturas Tropical
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EB	Eficiência de bioconversão
EC	Enzyme Commission
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G+C	Guanina + Citosina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IRENA	Agência Internacional para Energias Renováveis
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LADEBIO	Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos
LPS	Lipopolissacarídeos
mADH	Enzima álcool desidrogenase acoplada à membrana citoplasmática
mALDH	Enzima aldeído desidrogenase acoplada à membrana citoplasmática

MEG	Etilenoglicol ou monoetilenoglicol
NAD^+	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
$NADP^+$	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
PET	Polietileno tereftalato
PETROBRAS	Petróleo Brasileiro S.A.
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido poli-D,L-lático
PLGA	Poli (ácido D,L-lático-co-ácido glicólico)
Q_P	Produtividade volumétrica de produto
RID	Detector de índice de refração
RNA	Ácido ribonucleico
RPS	Redução percentual de substrato
t_d	Tempo de duplicação
TI	Cromatografia de troca iônica
USD	Dólar americano
$Y_{P/S}$	Fator de rendimento de produção de ácido glicólico em relação ao consumo de substrato
$Y_{X/S}$	Fator de rendimento de produção celular em relação ao consumo de substrato

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO DO TEMA DA DISSERTAÇÃO 18

2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO 21

2.1. SUBSTRATO: 1,2-ETANODIOL/ETILENOGLICOL 21

2.1.1. Propriedades Gerais 22

2.1.1.1. Propriedades Físicas e Químicas 22

2.1.1.2. Toxicidade 23

2.1.2. Produção de Etilenoglicol 25

2.1.2.1. Produção de Etilenoglicol a Partir de Óxido de Etileno 26

2.1.2.2. Produção de Etilenoglicol a Partir de Celulose 29

2.1.3. Produtos e Aplicações 31

2.1.4. Mercado Mundial 31

2.2. PRODUTO: ÁCIDO 2-HIDROXIETANOICO/ÁCIDO GLICÓLICO 33

2.2.1. Propriedades Gerais 34

2.2.1.1. Propriedades Físicas e Químicas 34

2.2.2. Produção de Ácido Glicólico 34

2.2.2.1. Rotas Químicas: Majoritárias 35

2.2.2.2. Rotas Bioquímicas 37

2.2.3. Produtos e Aplicações 40

2.2.3.1. Produtos de Cuidado Pessoal 41

2.2.3.2. Polímeros Biodegradáveis 42

2.2.4. Mercado Mundial 43

2.3. MICRORGANISMO: BACTÉRIAS ACÉTICAS 44

2.3.1. Taxonomia 45

2.3.2. Aplicações Biotecnológicas à Luz do Genoma da Bactéria *Gluconobacter oxydans* 48

2.3.2.1. Produção de Ácido Glicólico a Partir de Etilenoglicol por Acetobactérias 49

3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS 52

4. MATERIAIS E MÉTODOS 54

4.1. MICRORGANISMOS, SUBSTRATOS E PRODUTO 54

4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS 55

4.2.1. Análise da Correlação Linear Entre Concentração de Células e Absorvância 55

4.2.2. Análise de Ácido Glicólico e Etilenoglicol 58

4.2.3. Análise de Células, Ácido Glicólico e Etilenoglicol nos Meios de Crescimento Celular e Bioconversão 58

4.2.4. Análise da Pureza das Linhagens e do Aspecto Microscópico 59

4.3. CÁLCULO DOS PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DO PROCESSO 59

4.4. REATIVAÇÃO DAS CÉLULAS LIOFILIZADAS E PREPARO DO ESTOQUE DAS BACTÉRIAS ACÉTICAS 62

4.5. PREPARO E COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO 63

4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICROBIANO 64

4.7. ATIVAÇÃO E PROPAGAÇÃO DAS LINHAGENS ESTUDADAS 64

4.7.1. Análise da Ativação Celular em D-Manitol e em Etilenoglicol 64

4.7.2. Análise da Propagação Celular em D-Manitol e em Etilenoglicol 65

4.7.3. Ativação e Propagação dos Microrganismos para o Estudo da Bioconversão de Etilenoglicol a Ácido Glicólico 65

4.8. ESTUDO DA BIOCONVERSÃO DE ETILENOGLICOL A ÁCIDO GLICÓLICO POR BACTÉRIAS ACÉTICAS 66

4.9. SELEÇÃO DA LINHAGEM DE MELHOR CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO 66

4.10. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 67

4.11. AVALIAÇÃO DO pH NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 67

4.12. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE LEVEDURA E DA PEPTONA NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 68

4.13. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SUBSTRATO E DO PRODUTO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 69

4.14. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR EM BATELADAS SEQUENCIAIS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 70

4.15. AVALIAÇÃO DA FORMA DE CONDUÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 70

4.16. CRESCIMENTO DA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 E PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL EM BIORREATOR INSTRUMENTADO 71

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 73

5.1. ASPECTO MICROSCÓPICO DAS BACTÉRIAS ACÉTICAS 73

5.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICROBIANO 74

5.3. CRESCIMENTO MICROBIANO: AVALIAÇÃO DOS PERFIS CINÉTICOS DE ATIVAÇÃO E PROPAGAÇÃO DAS BACTÉRIAS ACÉTICAS ESTUDADAS 76

5.4. ESTUDO DA BIOCONVERSÃO DE ETILENOGLICOL A ÁCIDO GLICÓLICO POR BACTÉRIAS ACÉTICAS 81

5.5. SELEÇÃO DA LINHAGEM DE MELHOR CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO 85

5.6. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 85

5.7. AVALIAÇÃO DO pH NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 88

5.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE LEVEDURA E DA PEPTONA NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 91

5.9. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SUBSTRATO E DO PRODUTO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 95

5.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR EM BATELADAS SEQUENCIAIS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 99

5.11. AVALIAÇÃO DA FORMA DE CONDUÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 99

5.12. CRESCIMENTO DA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 E PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL EM BIORREATOR INSTRUMENTADO 101

5.13. CONSIDERAÇÕES FINAIS 104

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 106

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 109

1. APRESENTAÇÃO DO TEMA DA DISSERTAÇÃO

Os alfa-hidroxiácidos são ácidos orgânicos caracterizados quimicamente pela presença de um grupo hidroxila no carbono adjacente àquele do grupo carboxila. O composto mais simples da família é o ácido 2-hidroxietanoico, popularmente conhecido como ácido glicólico (ANDERSEN, 1998; ELSON, 2002; MILTENBERGER, 2012).

O ácido glicólico é uma das moléculas da Química Fina mais relevante na indústria, podendo ser empregado amplamente em processamento de tecidos e couro, limpeza e revestimento metálico, produção de detergentes e adesivos, como bloco de construção de polímeros biodegradáveis e como constituinte de produtos de cuidado pessoal (KROCHTA, TILLIN & HUDSON, 1988; COTELLESSA, PERIS & CHIMENTI, 1995).

Dentre todas as suas funções, a relevância no setor de cosméticos é evidenciada por sua representatividade no consumo global do ácido orgânico, correspondendo, no ano de 2011, a mais da metade da demanda (MARKET REVIEWS, 2015). O mercado global de ácido glicólico é, portanto, guiado pela contínua inovação em produtos de cuidados pessoais. E, por consequência, a taxa de crescimento anual responde pela demanda cada vez maior em produtos de beleza para pele e cabelo (GVR, 2016).

Atualmente, a produção majoritária do ácido glicólico é realizada pela reação catalítica de formaldeído com gás de síntese (MILTENBERGER, 2012; GETCHEM, 2018). A fim de acompanhar e suprir a demanda, nos últimos anos, novas tecnologias de produção de ácido glicólico têm sido desenvolvidas e soluções economicamente viáveis e ainda ambientalmente sustentáveis têm atraído especial atenção. Dentre elas, as rotas bioquímicas exercem posição de destaque. Os benefícios incluem tanto a especificidade do aparato biológico, que resulta na geração primordial do produto de interesse, quanto o emprego de condições brandas de

temperatura e pressão, que favorecem gastos energéticos menos intensivos se comparados a processos químicos tradicionais (GETCHEM, 2018).

Os principais registros na literatura de produção de ácido glicólico por microrganismos de ocorrência natural são relacionados à oxidação do etilenoglicol (KATAOKA *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 2009a) e à hidrólise da hidroxiacetonitrila (PANOVA *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2010). Em adição, esforços têm sido realizados pela aplicação de engenharia metabólica para possibilitar a síntese a partir de fontes renováveis e abundantes, como glicose e xilose (DENG, MAO & ZHANG, 2015; CABULONG *et al.*, 2018).

Uma alternativa para tornar a rota de produção de ácido glicólico renovável, limpa, completamente independente de rotas petroquímicas habituais e sem imposição de realização de modificações genéticas é pela produção do ácido orgânico a partir de 1,2-etanodiol, também conhecido popularmente como etilenoglicol ou monoetilenoglicol.

Atualmente, a fabricação industrial de etilenoglicol ocorre predominantemente pela hidratação do óxido de etileno proveniente de etileno petroquímico (BARNICKI, 2012; YUE *et al.*, 2012). Todavia, existem rotas renováveis e sustentáveis, dentre as quais se destaca a síntese a partir de etileno gerado pela desidratação catalítica de bioetanol, derivado de matérias-primas sacaríneas, amiláceas ou lignocelulósicas (BAIN & COMPANY, GAS ENERGY, 2014; TECNON ORBICHEM LTD, 2016). Além disso, métodos de produção a partir diretamente de biomassas renováveis ou seus derivados, como a celulose (JI *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2013) e o glicerol (UEDA, NAKAGAWA & TOMISHIGE, 2010; JIANG *et al.*, 2016), também já foram desenvolvidos. Tais abordagens integram a produção de etilenoglicol, e consequentemente, de ácido glicólico produzido a partir deste substrato, ao contexto de Biorrefinaria.

O Brasil apresenta potencial biotecnológico natural e, portanto, posição de destaque mundial no que se refere à viabilidade de produção verde de etilenoglicol. Em 2012, segundo dados da Agência Internacional para Energias Renováveis (IRENA), o custo mundial de produção de etileno petroquímico variava entre USD 600-1300 por tonelada. Em território brasileiro, no mesmo ano, se a rota alcoolquímica fosse aplicada, com a produção de bioetanol a partir do melado da cana-de-açúcar, o custo de produção de bioetileno seria de USD 1200 por tonelada, o que indica que, com avanços científicos, o processo poderia tornar-se competitivo e viável economicamente no país (BAIN & COMPANY, GAS ENERGY, 2014; TECNON ORBICHEM LTD, 2016). Além disso, com a geração constante de resíduos vinculados ao cultivo da cana-de-açúcar, como o bagaço e a palha, estratégias de reaproveitamento para aumento do valor agregado destes materiais seriam de grande

importância. Assim, investimentos em pesquisa e desenvolvimento orientados para o uso adequado destas matérias-primas, denominadas lignocelulósicas, também poderiam possibilitar a produção de etilenoglicol a partir diretamente de celulose, composto majoritário da matriz lignocelulósica, ou a partir de bioetanol de segunda geração (2G), também produzido mediante utilização dos resíduos agrícolas e florestais.

Dentre os microrganismos associados à produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol, encontram-se as acetobactérias (AAB), pertencentes à família *Acetobacteraceae* (ordem *Rhodospirillales* e classe *Alphaproteobacteria*) (GLUILLAMÓN & MAS, 2017; MALIMAS *et al.*, 2017). As bactérias acéticas representam um grupo diferenciado de microrganismos com capacidade de oxidar incompletamente diversos substratos, entre álcoois, açúcares e polióis, mesmo em condições naturais de crescimento (DEPPENMEIER, HOFFMEISTER & PRUST, 2002; DEPPENMEIER & EHRENREICH, 2009). Pelo metabolismo oxidativo, é possível gerar diversas substâncias de interesse industrial, como vinagre (ácido acético) (GULLO, VERZELLONI & CANONICO, 2014); 1,3-dihidroxiacetona (princípio ativo de autobronzeadores) (HU, ZHENG & SHEN, 2011); nanocelulose bacteriana (MIKKELSEN *et al.*, 2009); ácidos aldônicos, em especial ácido glucônico e ácido xilônico (ZHANG *et al.*, 2016a; SAINZ *et al.*, 2016); L-sorbose (precursor da vitamina C) (GIRIDHAR & SRIVASTAVA, 2002); e ácido glicólico (WEI *et al.*, 2009a).

Diante do exposto, o presente trabalho objetiva explorar a capacidade de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por bactérias acéticas de diferentes gêneros e desenvolver um processo biotecnológico de síntese do ácido orgânico pela avaliação adequada dos parâmetros envolvidos na bioconversão.

A presente dissertação de mestrado foi dividida em sete capítulos: inicia-se com este capítulo 1 que versa a apresentação do tema, seguido pelo capítulo 2 com o referencial teórico que apresenta os panoramas gerais do substrato (etilenoglicol) e do produto (ácido glicólico) e as características principais das acetobactérias. A justificativa e os objetivos do trabalho estão apresentados no capítulo 3. No capítulo 4, estão descritas detalhadamente todas as metodologias aplicadas no desenvolvimento da pesquisa e, na sequência, no capítulo 5, são exibidos os resultados obtidos experimentalmente e a discussão dos mesmos, comparando-os, quando procedente, com os resultados reportados na literatura. Por fim, no capítulo 6, estão relatadas as principais conclusões e sugestões para trabalhos futuros e, no capítulo 7, estão registradas as referências bibliográficas citadas no decorrer desta dissertação.

2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1. SUBSTRATO: 1,2-ETANODIOL/ETILENOGLICOL

A molécula 1,2-etanodiol (CAS Nº 107-21-1), também conhecida popularmente como etilenoglicol ou ainda monoetilenoglicol, pertence à família dos glicóis, determinada pela presença de dois grupos hidroxila (-OH) em posições adjacentes de uma cadeia carbônica alifática. De fórmula $C_2H_6O_2$ (62,068 g/mol) e estrutura química apresentada na Figura 1, o etilenoglicol é o mais simples composto do grupo dos glicóis (CURME, 1952; CEPA, 2000; DYE, 2001).

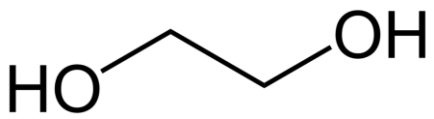

Figura 1: Estrutura química do 1,2-etanodiol

Em 1859, o químico francês Charles-Adolphe Wurtz relatou, pela primeira vez, sua formação mediante a saponificação de diacetato de etileno com hidróxido de potássio. Em seguida, em 1860, Wurtz também constatou a geração de etilenoglicol pela hidratação do óxido de etileno, o que se tornou o alicerce de sua produção industrial (CURME, 1952).

O primeiro propósito de síntese do etilenoglicol, entretanto, foi considerado apenas durante a Primeira Guerra Mundial, quando o dinitrato de etileno, produzido pela nitração do etilenoglicol, passou a ser utilizado como substituto parcial ou integral da nitroglicerina em explosivos, devido à escassez de glicerol na Alemanha (CURME, 1952).

Sua segunda aplicação comercial foi apresentada em 1917, como material anticongelante para sistemas de refrigeração automobilísticos, já que o uso do etilenoglicol é capaz de reduzir o ponto de congelamento da água (CURME, 1952).

A partir de então, a produção de monoetilenoglicol foi largamente estudada e, em 1925, a empresa *Carbide and Carbon Chemicals Corporation* instalou, em South Charleston (West Virginia, EUA), a primeira planta comercial de larga escala para produção de etilenoglicol (CURME, 1952).

A empresa manteve-se como praticamente única produtora até a eclosão da Segunda Guerra Mundial, quando a demanda por etilenoglicol, como agente anticongelante, como fluido refrigerante de motor aeronáutico e como precursor de dinamite, aumentou substancialmente (CURME, 1952). Novos métodos de produção, portanto, foram desenvolvidos e com a descoberta da síntese do óxido de etileno, precursor do etilenoglicol, por oxidação catalítica do etileno, a produção tornou-se economicamente viável e, desde 1953, amplamente difundida pelo mundo (YUE *et al.*, 2012).

2.1.1. Propriedades Gerais

2.1.1.1. Propriedades Físicas e Químicas

O composto 1,2-etanodiol é incolor, exibe odor praticamente imperceptível e sabor adocicado. Apresenta-se em estado líquido a temperatura ambiente, sendo relativamente não volátil. A substância é higroscópica e completamente miscível em água, álcoois alifáticos de cadeia curta, glicerol, ácido acético e acetona. Apresenta leve solubilidade em éter e é quase insolúvel em benzeno, hidrocarbonetos clorados, éter de petróleo e óleos (HHS, 1997; BRENT, 2001).

A viscosidade do fluido é alta, quando em baixas temperaturas, e o poder corrosivo é baixo, quando o mesmo se encontra propriamente inibido. O etilenoglicol não é apropriado para uso em indústrias alimentícias e não deve ser armazenado em recipientes abertos, devido à toxicidade inerente ao metabolismo da molécula. A dose letal determinada para o composto puro é de aproximadamente 1,4 mL/kg (PERRY & GREEN, 1997; BRENT, 2001).

As propriedades físicas do 1,2-etanodiol, assim como as propriedades químicas, são apresentadas mais detalhadamente na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades químicas e físicas do etilenoglicol

	Propriedades	Etilenoglicol
1	Nome IUPAC	1,2-Etanodiol
2	Nomes alternativos	Etilenoglicol Monoetilenoglicol
3	Registro CAS	107-21-1
4	Fórmula Química	$C_2H_6O_2$
5	Massa molar	62,068 g/mol
6	Temperatura de fusão (1 atm)	-13,0ºC
7	Temperatura de ebulição (1 atm)	197,6ºC
8	Temperatura crítica	446,9ºC
9	Temperatura de autoignição	427,0ºC
10	Temperatura inicial de decomposição	240,0ºC
11	Ponto de Flash	
	Método do copo fechado de Pensky-Martens ASTM D93	126,7ºC
	Método do copo aberto de Cleveland ASTM D92	137,8ºC
12	Volume específico crítico	0,191 L/mol
13	Coeficiente de dilatação volumétrica (20ºC)	0,00062 K^{-1}
14	Densidade	
	20ºC	1,1135 g/mL
	25ºC	1,1100 g/mL
15	Calor de combustão (25ºC)	-1053,0 kJ/mol
16	Calor de vaporização (1 atm)	53,2 kJ/mol
17	Limite explosivo inferior	3,2% (v/v)
18	Limite explosivo superior	53,0% (v/v)
19	Índice de refração (25ºC)	1,4306
20	Peso específico (20ºC/20ºC)	1,11
21	Solubilidade em H_2O (20ºC)	100% (m/v)
22	Tensão superficial (25ºC)	0,048 N/m
23	Densidade do vapor	2,1
24	Pressão de vapor (20ºC)	7,5 Pa
25	Viscosidade (20ºC)	0,0198 Pa.s
26	pH	8,8-9,2

Fonte: PERRY & GREEN (1997); YUE *et al.* (2012); YAWS (2015).

2.1.1.2. Toxicidade

Apesar de não exibir toxicidade intrínseca à sua composição, quando presente no organismo, o etilenoglicol é transformado em metabólitos tóxicos, que provocam reações adversas e podem levar, inclusive, à morte. A absorção do etilenoglicol por rota pulmonar ou cutânea é baixa. Entretanto, por via oral, a assimilação ocorre prontamente, com nível máximo entre 1 e 4 horas após a ingestão (BRENT, 2001; COX & PHILLIPS, 2004).

No organismo, a molécula é metabolizada por enzimas situadas no fígado (COX & PHILLIPS, 2004). Primeiramente, o etilenoglicol é transformado em glicolaldeído. O processo, catalisado pela enzima álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1), produz uma molécula de NADH a partir de uma molécula de NAD^+. Em seguida, glicolaldeído é convertido a ácido glicólico, também com a formação de NADH a partir de NAD^+, pela ação catalítica da enzima aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3). O ácido glicólico é oxidado a ácido glioxílico e, em seguida, a ácido oxálico, que, em presença de Ca^{2+}, leva à formação de cristais de oxalato de

cálcio. Devido ao acúmulo de NADH, a formação de lactato a partir de piruvato é também favorecida no organismo. A etapa lenta do processo é a transformação de ácido glicólico em ácido glioxílico, o que causa ainda um acúmulo do primeiro no plasma sanguíneo (BRENT, 2001; COX & PHILLIPS, 2004). O processo sequencial é mostrado na Figura 2.

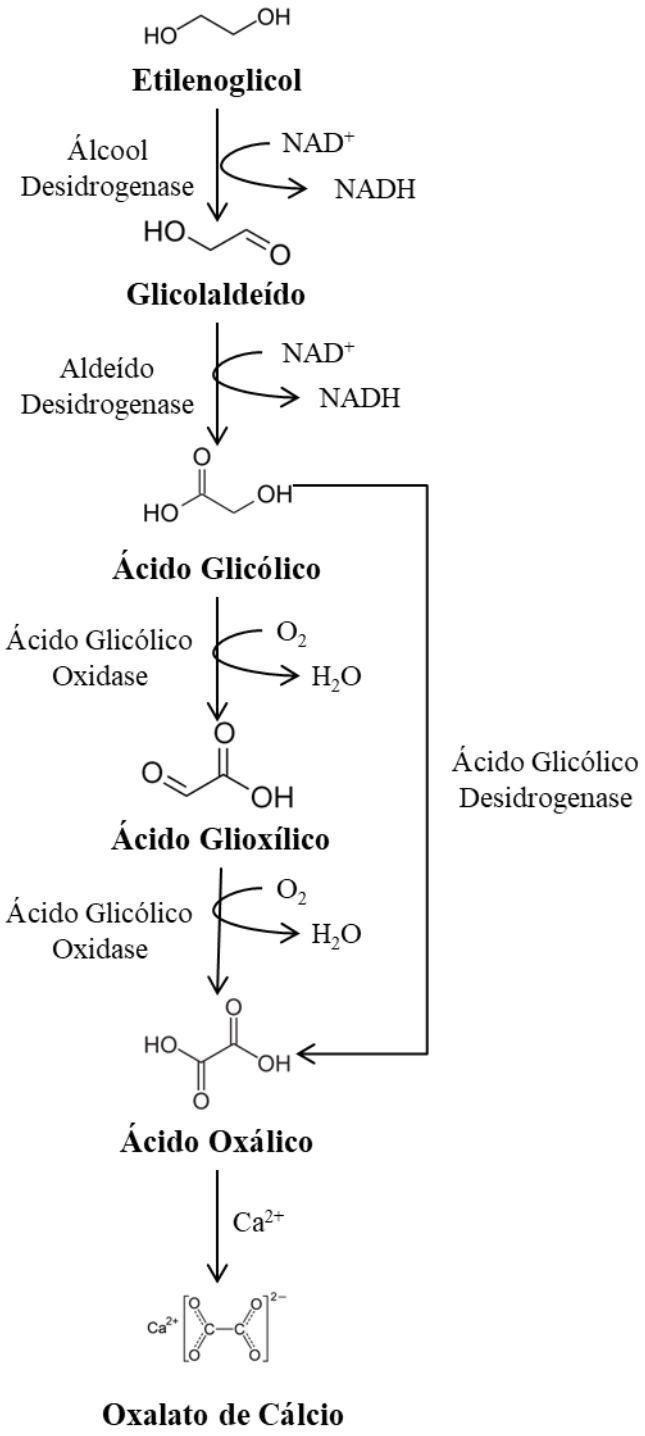

Figura 2: Metabolismo principal do etilenoglicol
NAD^+ e NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado e reduzido, respectivamente. Fonte: Adaptado de BRENT (2001).

A intoxicação por etilenoglicol pode afetar múltiplos órgãos, predominantemente os sistemas nervoso central, cardiopulmonar e renal. Os efeitos danosos ocorrem essencialmente devido aos metabólitos que agem como toxinas celulares e afetam a cadeia de transporte de elétrons, a fosforilação oxidativa, a respiração celular e a replicação do DNA (MOORE, KANEKAR & DHAMIJA, 2008).

Os principais sintomas são causados pelo etilenoglicol diretamente, por seus metabólitos e pela precipitação de oxalato de cálcio. O 1,2-etanodiol causa irritação da mucosa gástrica e depressão do sistema nervoso central, amplificada pela presença dos metabólitos, podendo ocasionar convulsões e coma. Os ácidos orgânicos (ácido glicólico, ácido glioxílico, ácido oxálico e ácido lático), especialmente o ácido glicólico, provocam acidose metabólica, capaz de afetar todos os órgãos, o que resulta na maior ocorrência de morte pela intoxicação com etilenoglicol. Os cristais de oxalato, por sua vez, acumulam-se em diversos órgãos, como cérebro, coração, pulmões e rins, provocando a ocorrência de insuficiência renal anúrica ou oligúrica (redução ou interrupção total da produção de urina), geralmente reversível, e hipocalcemia, devido aos baixos níveis de Ca^{2+} livres no organismo (DAVIS *et al.*, 1997; BRENT, 2001; COX & PHILLIPS, 2004).

Os tratamentos disponíveis para reversão do quadro clínico de intoxicação incluem a ingestão de etanol e do fármaco Fomepizol ($C_4H_6N_2$, 82,106 g/mol, 4-metilpirazol). Ambos atuam na inibição do metabolismo do etilenoglicol, por se tratarem de substratos competitivos e de maior afinidade à enzima álcool desidrogenase, responsável por dar início à rota metabólica do etilenoglicol (BRENT, 2001; COX & PHILLIPS, 2004).

Apesar de relativamente econômico e facilmente disponível, o tratamento com etanol requer maior monitoramento, visto que tal inibidor também apresenta efeitos nocivos ao organismo. O tratamento com Fomepizol, por sua vez, desenvolve efeitos mínimos, como tontura, náusea e dor de cabeça. Além disso, a administração intravenosa mantém o medicamento em níveis estáveis e confiáveis no organismo. Como forma de acelerar a eliminação de etilenoglicol e seus metabólitos, a realização de hemodiálise também exibe resultados eficientes. Em casos de insuficiência renal, o tratamento é mandatório (BRENT, 2001).

2.1.2. Produção de Etilenoglicol

Atualmente, a síntese industrial de etilenoglicol ocorre predominantemente pela hidratação do óxido de etileno. Existem, todavia, rotas alternativas, que vêm sendo

amplamente estudadas devido à crescente demanda por etilenoglicol. Entre elas, é possível citar a geração seletiva de monoetilenoglicol pela hidratação do carbonato de etileno (BARNICKI, 2012; YUE *et al.*, 2012). Além disso, a busca incessante por vias ambientalmente sustentáveis tem levado ao desenvolvimento de tecnologias de produção a partir de biomassas renováveis ou seus derivados, como a celulose (JI *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2013; WANG & ZHANG, 2013) e o glicerol, coproduto da fabricação de biodiesel por óleos vegetais (UEDA, NAKAGAWA & TOMISHIGE, 2010; WANG *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2016). Tais abordagens integram a produção de etilenoglicol ao contexto de Biorrefinaria.

2.1.2.1. Produção de Etilenoglicol a Partir de Óxido de Etileno

O óxido de etileno (CAS Nº 75-21-8, C_2H_4O, 44,053 g/mol) é sintetizado comercialmente pela oxidação (epoxidação) do etileno (CAS Nº 74-85-1, C_2H_4, 28,054 g/mol). Devido a sua alta reatividade, é considerado um intermediário químico multifuncional, sendo utilizado na produção de diversos compostos industrialmente relevantes. Dentre eles, destaca-se o etilenoglicol (SIEMENS, 2015).

A produção global de óxido de etileno atinge 19 milhões de toneladas anualmente e é quase integralmente convertida à geração de glicóis (mono-, di- e tri- etilenoglicol), que juntos representam 77% do consumo de óxido de etileno (BARNICKI, 2012). Por propósitos logísticos e econômicos, a produção de etilenoglicol normalmente é realizada em planta industrial acoplada à conversão do etileno.

A primeira etapa industrial de produção de etilenoglicol, portanto, inicia-se com a oxidação catalítica heterogênea, em fase vapor, do etileno. Normalmente, o etileno é reagido com oxigênio puro comprimido em presença de catalisador a base de Ag suportado em Al_2O_3 em reator multi-tubular de leito fixo, a altas temperaturas (250-275ºC) e pressões (1-2,2 MPa) (BARNICKI, 2012).

O gás de saída do reator apresenta, em geral, 1-2% (v/v) de óxido de etileno, 5-6% (v/v) de CO_2, 5-9% (v/v) de O_2, 15-40% (v/v) de etileno, 5-15% (v/v) de inertes e um percentual variável de metano, que opera como dissipador térmico e assegura que o gás de reciclo satisfaça o limite de explosão. A conversão de etileno varia de 7-15% por passe e a seletividade do processo alcança até 90% (BARNICKI, 2012).

Assim que o gás de saída é resfriado, o processo de produção de etilenoglicol propriamente dito é instaurado. Comercialmente, o óxido de etileno é reagido com água em excesso a 200ºC para produzir glicóis com seletividade molar de 90% monoetilenoglicol, 9%

dietilenoglicol e 1% trietilenoglicol. Os rendimentos de glicóis maiores são decrescentes, no entanto, inevitáveis, em virtude da reatividade preferencial do óxido de etileno com glicóis se comparada à reatividade do óxido com água. Uma forma de minimizar o rendimento dos demais glicóis é, portanto, pela adição de água em abundância, em proporção molar de 20:1. A mistura hidratada é, então, purificada pela passagem por colunas de destilação sucessivas com pressões decrescentes, aquecidas parcialmente pelo calor liberado na hidrólise. A água em excesso é removida e reciclada ao reator e os glicóis são separados, em seguida, por destilação a vácuo. O processo de purificação é de alta intensidade energética (REBSDAT & MAYER, 2012; BARNICKI, 2012). A produção majoritária é mostrada na Figura 3.

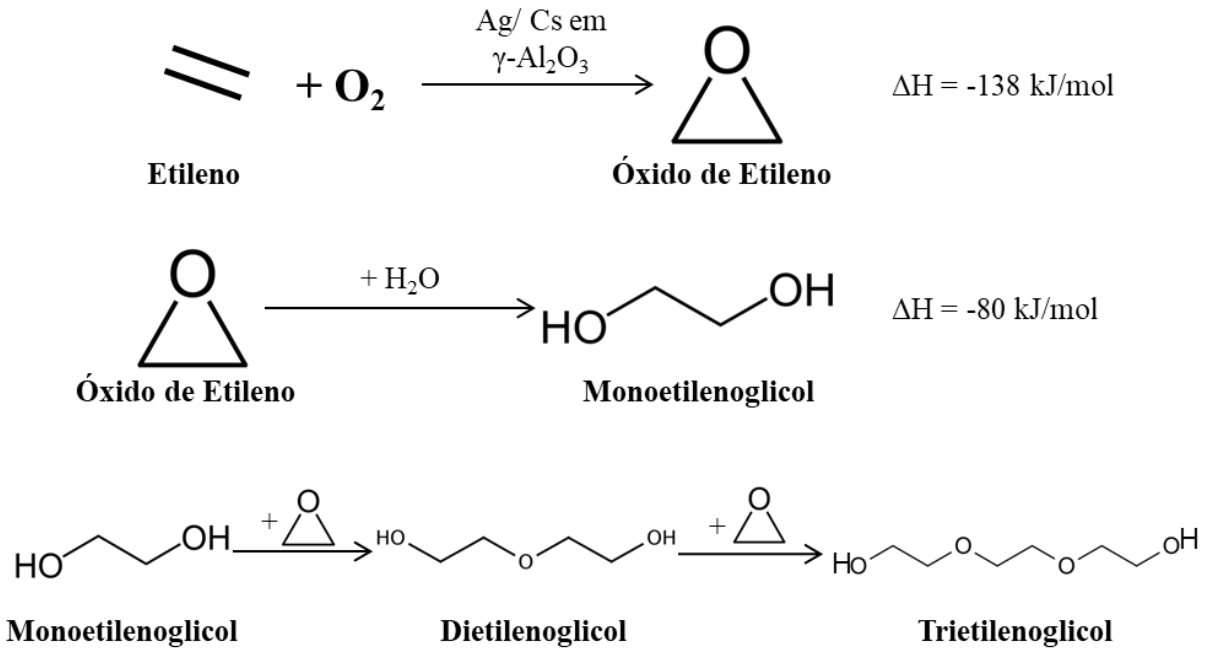

Figura 3: Rota majoritária de produção de monoetilenoglicol
Etapa I: oxidação do etileno; Etapa II: hidratação do óxido de etileno; Etapa III: formação inevitável de coprodutos (di- e trietilenoglicol). Fonte: Adaptado de BARNICKI (2012).

Alternativamente, é possível realizar a síntese do monoetilenoglicol, com alta seletividade (>98%), pela hidratação alcalina do carbonato de etileno que, por sua vez, é produzido pelo tratamento térmico do óxido de etileno com carbonato de potássio para absorção de CO_2 (BARNICKI, 2012). O processo é apresentado na Figura 4.

Para que a produção de etilenoglicol possa ser sustentável e renovável, é possível ainda que sua realização, tanto pela hidratação do óxido de etileno quanto pela hidratação alcalina do carbonato de etileno, inicie-se a partir de etileno gerado pela desidratação catalítica de bioetanol (Figura 5), derivado de matérias-primas sacaríneas, amiláceas ou

lignocelulósicas e produzido por processo fermentativo (BAIN & COMPANY, GAS ENERGY, 2014; TECNON ORBICHEM LTD, 2016).

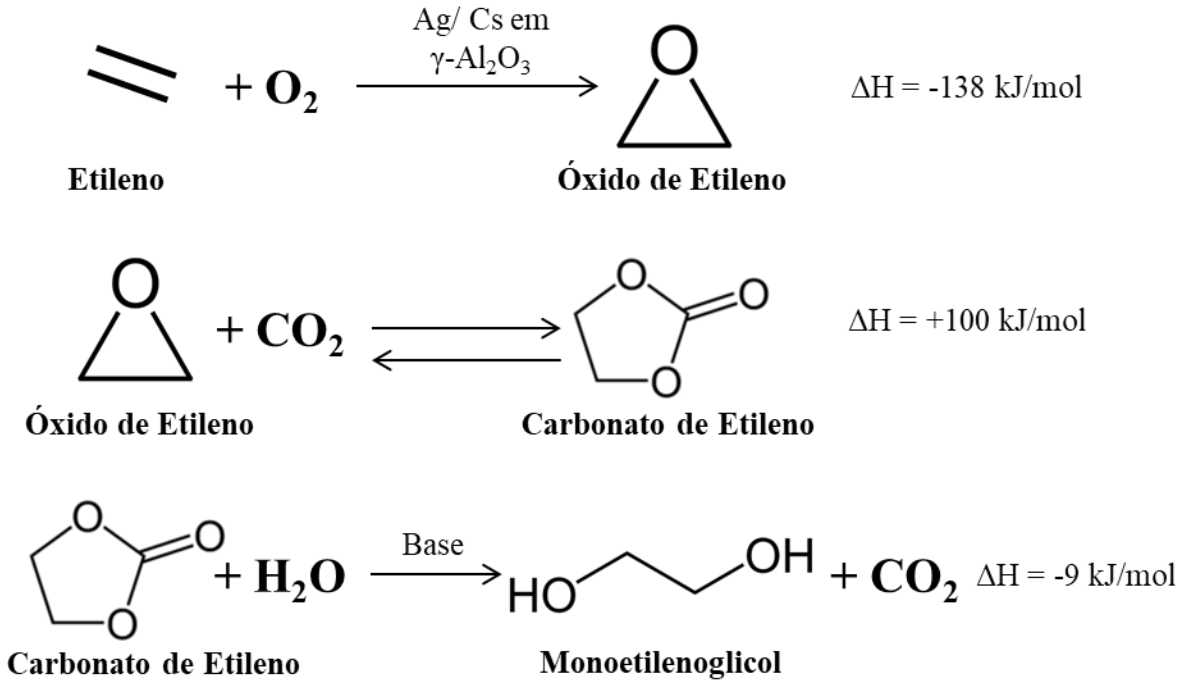

Figura 4: Rota alternativa para produção seletiva de monoetilenoglicol
Etapa I: oxidação do etileno; Etapa II: tratamento térmico do óxido de etileno com o carbonato de potássio; Etapa III: hidratação alcalina do carbonato de etileno. Fonte: Adaptado de BARNICKI (2012).

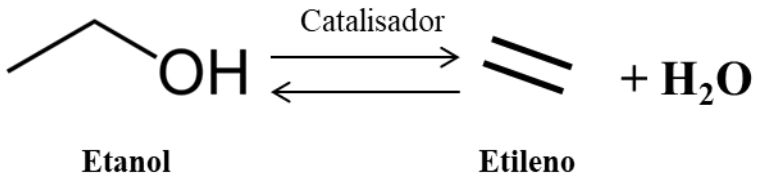

Figura 5: Desidratação catalítica do etanol
Solução sustentável e renovável para produção de etileno e, consequentemente, de seus derivados, óxido de etileno e monoetilenoglicol. Fonte: Adaptado de TECNON ORBICHEM LTD (2016).

Uma vez que o bioetanol é produzido e devidamente purificado, sua conversão a bioetileno é realizada por catalisadores de alumina (óxido de alumínio) ou zeólita (aluminossilicato). O processo de produção de uma tonelada de bioetileno requer 1,74 toneladas de bioetanol, alcançando-se conversão de 99% e seletividade para etileno de 97%. A reação é endotérmica e o mínimo teórico de energia demandado é de 1,6 GJ por tonelada de bioetileno. Também se trata de reação reversível que é favorecida por alta temperatura, baixa pressão e ausência de vapor d'água na corrente de alimentação (TECNON ORBICHEM LTD, 2016).

A rota alcoolquímica já é adotada por algumas empresas, sendo a India Glycols Ltd. a pioneira na produção de bioetilenoglicol (bio-MEG), tanto por bioetanol de primeira geração (1G) quanto por bioetanol de segunda geração (2G), o primeiro produzido a partir do caldo de cana-de-açúcar e o segundo a partir da fração lignocelulósica. A produção de etilenoglicol a partir de bioetanol 1G é datada de 1989, enquanto a produção a partir de bioetanol 2G foi inaugurada em planta demonstrativa em 2016 (BAIN & COMPANY, GAS ENERGY, 2014; TECNON ORBICHEM LTD, 2016; INDIA GLYCOLS, 2018).

2.1.2.2. Produção de Etilenoglicol a Partir de Celulose

A celulose é um homopolímero linear de repetidas unidades de glicose conectadas por ligações glicosídicas do tipo β-1,4. Tal polímero é integrante majoritário do denominado material lignocelulósico - componente essencial da parede celular de plantas – e representa a maior fonte de carbono e energia do planeta. Os materiais lignocelulósicos têm despertado o interesse mundial em consequência de sua abundância, sua economicidade e seu caráter renovável, o que simboliza uma alternativa promissora e sustentável na produção de combustíveis e químicos (WANG & ZHANG, 2013).

A produção de etilenoglicol a partir de celulose, além de englobar todos os benefícios do uso de tal matéria-prima, apresenta uma vantagem adicional: a rota de síntese pode ser realizada em um único vaso reacional, diferentemente do processo petroquímico comercial (WANG & ZHANG, 2013).

A geração de etilenoglicol a partir de celulose envolve duas etapas primordiais (Figura 6). A primeira etapa consiste na conversão hidrolítica da biomassa à glicose. A segunda, na hidrogenólise da glicose ao produto de interesse. Para que o processo possa ser conduzido inteiramente em uma única etapa, um catalisador adequado deve ser empregado. A este, portanto, é demandado que viabilize a realização dos processos de hidrólise e de hidrogenólise com altas conversões e rendimentos (JI *et al.*, 2009).

Em 2008, Ji e colaboradores observaram, pela primeira vez, que carbeto de tungstênio suportado em carbono ativado é capaz de catalisar a conversão de celulose a polióis, majoritariamente etilenoglicol. Quando promovido ainda com pequenas quantidades de níquel, o rendimento pode ser significativamente aumentado (JI *et al.*, 2008). Desde então, diversos estudos foram desenvolvidos e alguns resultados relevantes da literatura para a geração de etilenoglicol são apresentados na Tabela 2.

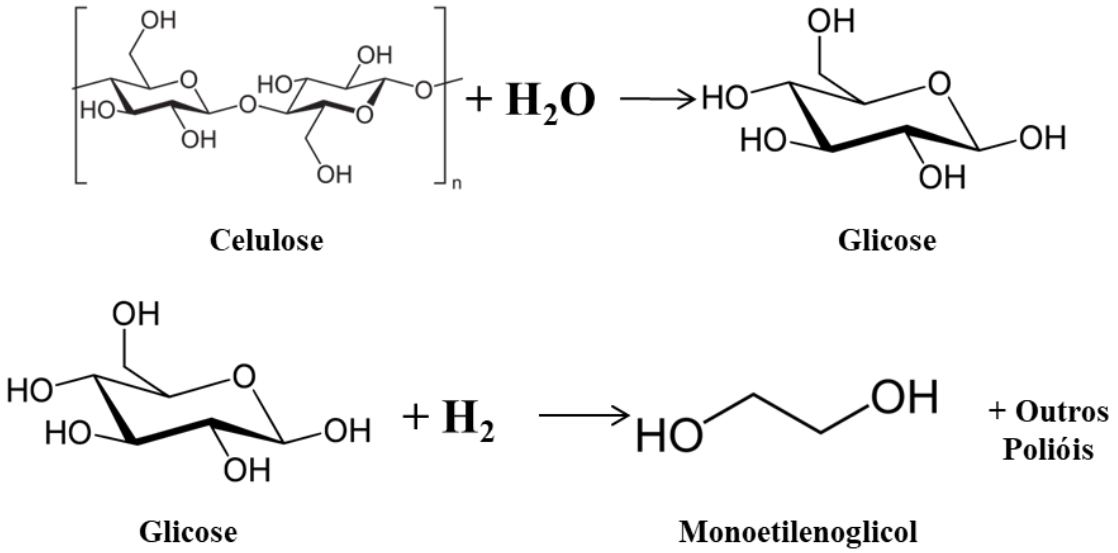

Figura 6: Conversão de celulose a etilenoglicol
Etapa I: hidrólise da celulose; Etapa II: hidrogenólise da glicose. Fonte: Adaptado de JI *et al.* (2009).

Tabela 2: Resultados de conversão e seletividade relevantes da literatura para transformação de celulose e derivados em etilenoglicol

	Matéria-Prima	Conversão	Seletividade	Catalisador	T (ºC)	P (MPa H_2)	t (min)
1	Celulose	100%	61,0%	Ni-W_2C/AC	245	6,0	30
2	Celulose	100%	74,4%	Ni-WC_x/MC	245	6,0	30
3	Celulose	100%	76,1%	Ni–W/SBA	245	6,0	30
4	Celulose	100%	58,5%	Ru/MC+ H_2WO_4	245	6,0	30
5	Celulose	100%	73,0%	Ni-W_2C/AC	245	6,0	30
6	Madeira de Bétula	-	54,3%	Ni-W_2C/AC	235	6,0	240
7	Celulose	100%	70,7%	Ni-WO_3/SBA	230	6,0	360
8	Celulose	100%	65,4%	Raney Ni/H_2WO_4	245	6,0	30
9	Glicose	-	7,0% (B)	Ru-AMT/AC	240	5,0	40
	Glicose		50,2% (SC)				
	Celulose		46,7% (B)				
10	Glicose	100%	44,5%	Ni-AMT/SBA	175	6,0	80
	Celobiose		52,4%		190		30

Legenda: T – temperatura; P – pressão; t – tempo; B – Processo em Batelada; SC – Processo Semicontínuo.
Fonte: 1 JI *et al.* (2008); 2 ZHANG, WANG & ZHANG (2010); 3 ZHENG *et al.* (2010); 4 TAI *et al.* (2012); 5 JI *et al.* (2012); 6 LI *et al.* (2012); 7 CAO *et al.* (2013); 8 TAI *et al.* (2013); 9 ZHAO *et al.* (2013); 10 CAO *et al.* (2016).

É interessante notar que todos os catalisadores descobertos até os dias atuais para produção do composto de interesse possuem tungstênio em sua composição. Além disso, os resultados alcançados são promissores para o avanço de estudos e tecnologias baseadas na conversão catalítica da celulose a etilenoglicol. Neste contexto, ainda é relevante evidenciar a conversão da madeira de bétula, material lignocelulósico de composição 56,1% celulose, 19,8% lignina, 19,3% hemicelulose, 4,5% extrativos e 0,3% cinzas, a etilenoglicol. Sem realização de tratamentos prévios, a síntese alcançou seletividade de 54,3%, o que ratifica o

potencial de matérias-primas lignocelulósicas para produção de químicos industrialmente essenciais (LI *et al.*, 2012).

2.1.3. Produtos e Aplicações

O etilenoglicol é matéria-prima fundamental em diversas aplicações industriais, como na fabricação de fibras de poliéster, tecidos e polietileno tereftalato (PET), usado amplamente para produção de garrafas plásticas. Além disso, ainda é usado como fluido anticongelante, agente de transferência de calor e inibidor de hidratação em gasodutos (PI, 2018).

Em 2016, a demanda global por MEG foi de 26,9 milhões de toneladas. Em termos de aplicação, 14,8 milhões de toneladas foram destinadas para fibras de poliéster, 8,6 milhões de toneladas para PET, 2,15 milhões de toneladas para agentes anticongelantes e 1,35 milhão de toneladas para outras aplicações industriais (PI, 2018). A Figura 7 sumariza as principais demandas por monoetilenoglicol.

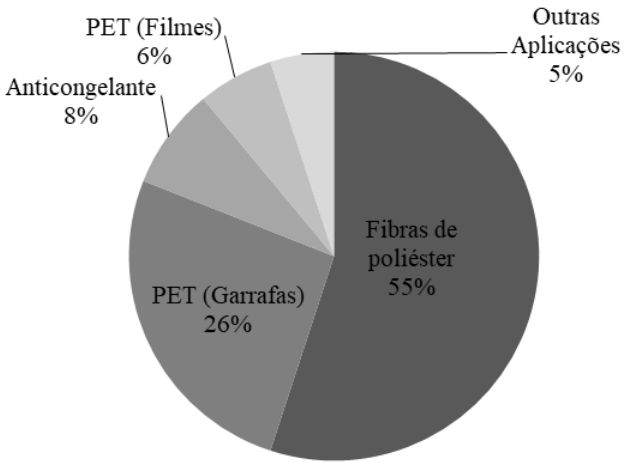

Figura 7: Demanda global de monoetilenoglicol por aplicações
Fonte: Adaptado de PI (2018).

2.1.4. Mercado Mundial

No ano de 2016, a capacidade mundial de produção de etilenoglicol era de 34,8 milhões de toneladas e o mercado era avaliado em 26 bilhões de dólares. No mesmo período, a capacidade de produção era dominada, nesta ordem, por países da Ásia (15,1 milhões de toneladas), do Oriente Médio (11,9 milhões de toneladas), da América (5,7 milhões de toneladas) e da Europa (2,1 milhões de toneladas) (Figura 8) (PI, 2018).

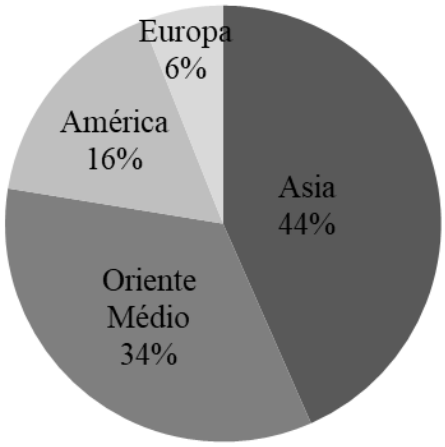

Figura 8: Capacidade de produção global de monoetilenoglicol por região
Fonte: Adaptado de PI (2018).

Para 2022, a expectativa é que o mercado de monoetilenoglicol atinja 37 bilhões de dólares. O incremento é esperado devido ao aumento intenso na demanda por etilenoglicol como matéria-prima para PET, fibras, filmes e agente anticongelante (PI, 2018).

As principais produtoras de monoetilenoglicol são as empresas Saudi Basic Industries Corporation (SABIC – Arábia Saudita), The Dow Chemicals Company (EUA), Royal Dutch Shell (Holanda), Akzo Nobel N.V. (Holanda), Mitsubishi Chemical Corporation (Japão) e Reliance Industries Ltd. (India). Unidas, são responsáveis por mais de 45% do mercado total (GMI, 2017).

No Brasil, segundo dados da Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUIM), a única empresa produtora de monoetilenoglicol é a Oxiteno. A fabricação é realizada em Camaçari (BA) na maior unidade industrial de óxido de etileno e derivados da América Latina (OXITENO, 2015). A capacidade instalada para produção de óxido de etileno é de 440 mil toneladas por ano (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014).

Em termos de rota de produção, existem três empresas mundiais com capacidade estabelecida para geração de etilenoglicol pela rota alcoolquímica: a pioneira e já citada India Glycols Ltd., a Greencol Taiwan Corporation (Taiwan) e a Global Biochem (China). Juntas representam capacidade de produção de cerca de 300 mil toneladas anuais. A produção de etanol é feita por cana-de-açúcar e por milho nas empresas indiana e chinesa e, na indústria taiwanesa, o bioetanol é fornecido pela PETROBRAS em acordo de 143 mil m³ por ano (TECNON ORBICHEM LTD, 2016).

O processo alcoolquímico, apesar de relativamente simples, ainda não apresenta competitividade econômica devido ao maior custo de produção de etileno, se comparado

àquele proveniente da rota petroquímica (BAIN & COMPANY, GAS ENERGY, 2014; TECNON ORBICHEM LTD, 2016). De acordo com a IRENA, em 2012, o custo de produção de bioetileno variava entre USD 1200-2600/t, a depender do país e da matéria-prima utilizada. O Brasil apresenta posição de destaque com um custo de USD 1200/t, considerando-se o melado de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Por outro lado, o custo de produção de etileno petroquímico variava entre USD 600-1300/t, sendo substancialmente menor que aquele referente ao processo sustentável (TECNON ORBICHEM LTD, 2016). De modo inevitável, o custo maior do bioetileno reincide sobre o custo e preço final do bioetilenoglicol. O avanço de tecnologias é, portanto, indispensável para que o processo sustentável e renovável se torne viável também economicamente (TECNON ORBICHEM LTD, 2016).

2.2. PRODUTO: ÁCIDO 2-HIDROXIETANOICO/ÁCIDO GLICÓLICO

Os alfa-hidroxiácidos são ácidos orgânicos caracterizados quimicamente pela presença de um grupo hidroxila no carbono α, ou seja, carbono adjacente àquele do grupo carboxila. O composto mais simples da família é o ácido glicólico (CAS Nº 79-14-1), de nome IUPAC ácido 2-hidroxietanoico. Identifica-se pela fórmula $C_2H_4O_3$ (76,052 g/mol) e pela estrutura química exibida na Figura 9 (ANDERSEN, 1998; ELSON, 2002; MILTENBERGER, 2012).

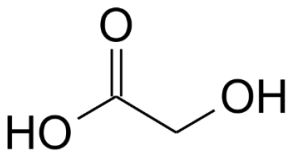

Figura 9: Estrutura química do ácido 2-hidroxietanoico

Naturalmente, o ácido glicólico é encontrado na composição de frutas não maturadas, especialmente uvas, e de caldo de cana-de-açúcar (ANDERSEN, 1998; MILTENBERGER, 2012). Sinteticamente, a primeira obtenção do ácido orgânico é datada de 1851, pelos químicos Adolph Strecker e Nikolai Nikolaevich Sokolov, de origem alemã e russa, respectivamente. A produção foi feita pelo tratamento do ácido hipúrico com ácido nítrico e dióxido de nitrogênio para formação do éster do ácido benzoico e do ácido glicólico que, em seguida, foi aquecido com ácido sulfúrico diluído para separação e formação dos ácidos em questão (GETCHEM, 2018).

2.2.1. Propriedades Gerais

2.2.1.1. Propriedades Físicas e Químicas

O composto ácido 2-hidroxietanoico é um sólido cristalino, em temperatura ambiente, que não apresenta cor ou odor e que pode ser solubilizado livremente em água, metanol, etanol, acetona e acetato de etila. Em solução aquosa, com concentração de 70% (m/v), como vendido comercialmente, apresenta-se com coloração levemente âmbar e odor similar a açúcar queimado. É estável e, portanto, não há risco de decomposição, polimerização ou queima (ANDERSEN, 1998; MILTENBERGER, 2012). A Tabela 3 exibe as propriedades físicas e químicas do ácido 2-hidroxietanoico, quando em solução aquosa 70% (m/v).

Tabela 3: Propriedades físicas e químicas da solução aquosa de ácido glicólico 70% (m/v)

	Propriedades	**Ácido Glicólico**
1	Nome IUPAC	Ácido 2-hidroxietanoico
2	Nomes Alternativos	Ácido glicólico Ácido hidroxiacético
3	Registro CAS	79-14-1
4	Fórmula Química	$C_2H_4O_3$
5	Massa molar	76,052 g/mol
6	Densidade (15,6ºC)	1,27 g/mL
7	Coeficiente de expansão térmica	
	15,6ºC	0,00047
	60ºC	0,00026
8	Viscosidade	
	15,6ºC	11,28 MPa/s
	43,3ºC	3,49 MPa/s
9	Capacidade térmica (25ºC)	0,579 Btu/lb.ft
10	Calor de solução	-11,55 kJ/mol
11	Entalpia (25ºC)	-464,4 Btu/lb.ft
12	Calor de combustão	166,6 kcal/mol
13	Temperatura de precipitação	10ºC
14	Temperatura de ebulição	112ºC
15	pH (25ºC)	0,1
16	Constante de dissociação (25ºC)	0,000147
17	Calor de neutralização	-52,02 kcal/mol
18	Demanda bioquímica de oxigênio DBO (5 dias)	0,175
19	Grau de Biodegradabilidade (7 dias)	89,6%
20	Composto orgânico volátil (101ºC, 45 min)	99,6 (água)

Fonte: DUPONT (2018).

2.2.2. Produção de Ácido Glicólico

O ácido glicólico, além de ser isolado de fontes naturais, também é sintetizado industrialmente por diversas rotas, químicas ou bioquímicas. Atualmente, a produção

majoritária é realizada pela reação catalítica do formaldeído com gás de síntese, devido à economicidade intrínseca ao processo (MILTENBERGER, 2012; GETCHEM, 2018).

Entretanto, também é produzido, em menor escala, pela reação do ácido cloroacético com hidróxido de sódio, seguida de reacidificação. Alternativamente, o ácido glicólico pode ser gerado por processos bioquímicos, que geram menor grau de impurezas e requerem menos energia, visto que ocorrem em condições mais brandas de temperatura e pressão. Entre eles, encontram-se rotas enzimáticas e microbianas, que serão sumarizadas a seguir (GETCHEM, 2018).

2.2.2.1. Rotas Químicas: Majoritárias

Nos dias presentes, a produção de ácido glicólico é predominantemente realizada pela reação catalítica do formaldeído com monóxido de carbono. A concepção do processo foi patenteada em 1939 por Donald John Loder e por Alfred T. Larson, com direitos cedidos à empresa *E. I. du Pont de Nemours & Company* (E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939a; E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939b).

Na invenção, formaldeído, dissolvido em água, é submetido a calor e pressão em atmosfera contendo monóxido de carbono, preferencialmente em presença de catalisador de características ácidas. A obtenção de ácido glicólico é mostrada na Figura 10.

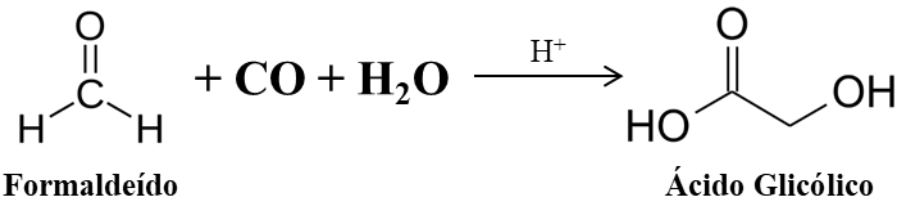

Figura 10: Rota predominante de síntese do ácido glicólico
Fonte: Adaptado de E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY (1939a).

A reação ocorre mesmo na ausência de catalisadores. Entretanto, inicia-se lentamente e, à medida que ácido glicólico e coprodutos, como ácido fórmico, são gerados, passa a ser catalisada pelos próprios componentes da mistura e, como consequência, desenrola-se em maior velocidade. Ao se incorporar um catalisador ácido externo, orgânico ou inorgânico, ao meio reacional, o processo já se inicia mais rapidamente e, ademais, exige menor quantidade de calor e pressão para manter a taxa de produção (E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939a; E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939b).

O formaldeído é dissolvido em água em teor aproximado de 62% (m/v) e o monóxido de carbono deve estar presente em excesso para garantir absorção adequada ao meio e para inibir qualquer decomposição do formaldeído (E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939a; E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939b).

A reação ocorre em amplas faixas de pressão (5-1500 atm) e temperatura (50-350ºC). Maiores valores de pressão, contudo, favorecem o decorrer da reação. O intervalo de temperatura preferível é entre 140-225ºC e a temperatura ótima é função de condições específicas, como quantidade de reagentes (formaldeído, água e monóxido de carbono) e catalisador. Como se trata de reação exotérmica, sistema de resfriamento deve ser empregado para manter a temperatura no intervalo previamente selecionado (E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939a; E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939b).

Em temperatura e pressão pré-estabelecidas, os reagentes mantêm-se na fase líquida e o monóxido de carbono é forçado a solubilizar-se no líquido, reagindo com o formaldeído e a água presentes. A mistura resultante é composta essencialmente por ácido glicólico, ácido fórmico, formaldeído não reagido, catalisador e água (E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939a; E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939b).

Ao final do processo, o produto de interesse, ácido glicólico, é separado da mistura bruta por destilação, preferencialmente realizada a 80-100 mmHg. O ácido glicólico é mantido no produto de fundo da coluna, que deve ser neutralizado para conversão do ácido em sal, a ser prontamente separado, ou deve ser esterificado com álcool adequado para remoção do ácido glicólico em forma de éster (E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939a; E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 1939b).

Outra forma de obtenção química do ácido glicólico é mediante reação do ácido cloroacético com solução aquosa de hidróxido de sódio 50% a 90-130ºC. O produto resultante contém aproximadamente 60% de ácido glicólico e 12-14% de cloreto de sódio. A remoção do sal é realizada por evaporação e o ácido glicólico é extraído com acetona. Tentativas foram executadas para condução do processo em presença de catalisadores ácidos a 150-200ºC com água ou vapor em ambiente pressurizado. O subproduto gerado é, neste caso, ácido clorídrico, que pode ser removido por destilação. A grande desvantagem da reação catalítica é a imprescindibilidade de volumes relativamente elevados de água (MILTENBERGER, 2012). A hidrólise do ácido cloroacético é apresentada na Figura 11.

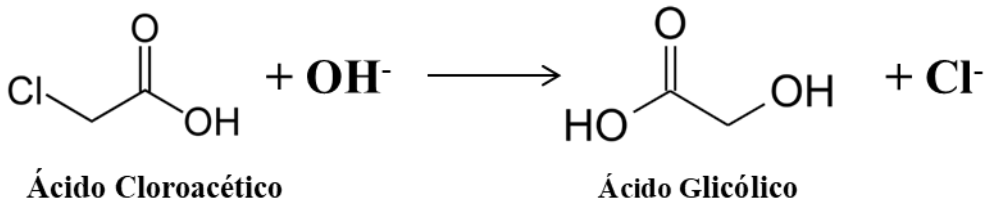

Figura 11: Reação do ácido cloroacético com solução aquosa de hidróxido de sódio
Fonte: Adaptado de MILTENBERGER (2012).

2.2.2.2. Rotas Bioquímicas

Nos últimos anos, novas tecnologias de produção de ácido glicólico vêm sendo incessantemente investigadas a fim de acompanhar a demanda, cada vez maior. Como alternativa complementar aos processos químicos supracitados, novas soluções, economicamente viáveis e ainda ambientalmente sustentáveis, atraem especial atenção. Dentre elas, as rotas bioquímicas, enzimáticas e microbianas, alcançadas com ou sem o auxílio de modificações genéticas, apresentam posição de destaque. Os benefícios incluem a especificidade das "maquinarias biológicas", que resultam na geração primordial do produto de interesse e minimizam os custos com operações de separação, e as condições brandas exigidas pelo processo, que são capazes de reduzir os custos energéticos se comparados a processos químicos. Além disso, a depender do substrato requerido, é possível englobar o aspecto renovável à produção.

Naturalmente, detectou-se produção de ácido glicólico em microrganismos acidófilos e quimiolitotróficos oxidantes de ferro e enxofre. Três bactérias importantes em operações de biomineração, *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidan*s e *Acidithiobacillus caldus*, mostraram-se capazes de sintetizar ácido glicólico por rota metabólica ainda desconhecida (NANCUCHEO & JOHNSON, 2010). As bactérias fototróficas *Rhodomicrobium vannielii* e *Rhodospirillum rubrum*, da família *Rhodospirillaceae*, e a bactéria *Alcaligenes eutrophus*, quando cultivadas na luz em aerobiose, também exibiram aptidão em secretar glicolato (CODD & SMITH, 1974; CODD & TURNBULL, 1975; CODD, BOWIEN & SCHLEGEL, 1976). Ademais, glicolato aparece como produto intermediário no metabolismo de D-xilose e L-arabinose em arqueas do gênero *Sulfolobus* e como um dos metabólitos finais na oxidação de D-arabinose por *Pseudomonas saccharophila* (PALLERONI & DOUDOROFF, 1957; SATO & ATOMI, 2011).

Os principais registros na literatura de produção de ácido glicólico por microrganismos de ocorrência natural são relacionados à oxidação do etilenoglicol (CAS Nº 107-21-1) e à hidrólise da hidroxiacetonitrila (CAS Nº 107-16-4).

Os microrganismos oxidantes de etilenoglicol compreendem *Acetobacter* e *Gluconobacter* (KERSTERS & DE LEY, 1963; DE LEY & KERSTERS, 1964), *Burkholderia* sp. EG13 (GAO *et al.*, 2014), *Pichia naganishii* AKU 4267 e *Rhodotorula* sp. 3Pr-126 (KATAOKA *et al.*, 2001), *Hansenula polymorpha* e *Hansenula miso* (HAHADA & HIRABAYASHI, 1968; SCHNEIDER, LEVY-RICK & LABELLE, 1995). O mecanismo da bioconversão envolve a oxidação do etilenoglicol a glicolaldeído (CAS Nº 141-46-8), seguida da oxidação do glicolaldeído a ácido glicólico (Figura 12).

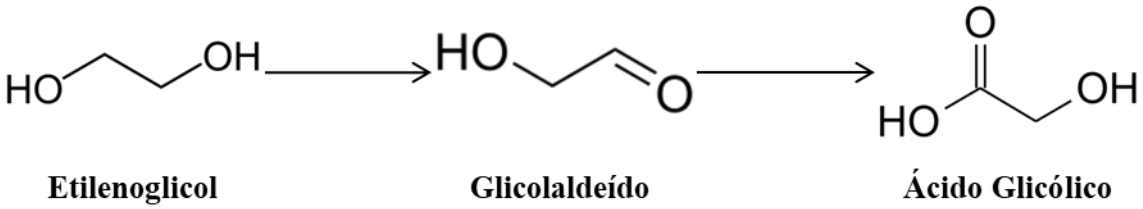

Figura 12: Etapas da conversão bioquímica de etilenoglicol a ácido glicólico
Fonte: Adaptado de WEI *et al.* (2009a).

Já a hidrólise da hidroxiacetonitrila pode ser efetuada enzimaticamente por duas diferentes vias. Na primeira delas, a nitrila é convertida à amida correspondente pela ação da enzima nitrila hidratase (EC 4.2.1.84). Em seguida, a amida é hidrolisada pela enzima amidase (EC 3.5.1.4) e os produtos resultantes são o ácido orgânico correspondente e amônia. Já o segundo caminho enzimático é operado diretamente pela ação da enzima nitrilase (EC 3.5.5.1), capaz de converter a hidroxiacetonitrila a ácido glicólico em apenas uma etapa, também com liberação de amônia (HE *et al.*, 2010). Os microrganismos possuidores de atividade enzimática de conversão de hidroxiacetonitrila a ácido glicólico incluem *Alcaligenes* sp. ECU0401 (HE *et al.*, 2010) e *Rhodococcus* sp. ZJUT-N595 (HU *et al.*, 2007). Além destes, quatro microrganismos com alta atividade hidrolítica para hidroxiacetonitrila tiveram suas enzimas isoladas e patenteadas: *Acidovorax facilis* 72W (E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, 2002, 2007, 2009, 2011a, 2011b), *Brevibacterium casei*, *Gordona* e *Rhodococcus rhodochrous* (HE *et al.*, 2010).

A nitrilase da bactéria *Acidovorax facilis* 72W foi estudada por pesquisadores da empresa *E. I. du Pont de Nemours & Company*. O grupo desenvolveu um método químico-enzimático de produção de ácido glicólico altamente puro que se inicia pela produção química

de hidroxiacetonitrila a partir de formaldeído e cianeto de hidrogênio, com rendimento e pureza acima de 99%. A conversão enzimática de hidroxiacetonitrila a glicolato de amônio é realizada pela nitrilase de *Acidovorax facilis* 72W, expressa em *Escherichia coli*, após modificações genéticas para otimização. O glicolato de amônio é convertido a ácido glicólico por cromatografia de troca iônica (TI). O esquema desenvolvido é mostrado na Figura 13. Técnicas de imobilização também foram aplicadas para melhoramento do processo (PANOVA *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2008; BEN-BASSAT *et al.*, 2008).

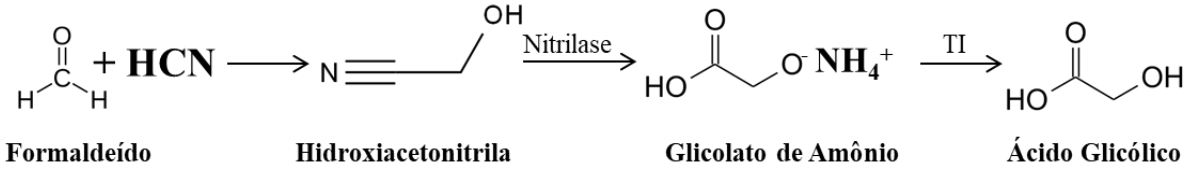

Figura 13: Síntese químico-enzimática do ácido glicólico
Fonte: Adaptado de PANOVA *et al.* (2007).

Em adição às rotas biotecnológicas naturais, esforços têm sido constantemente realizados para possibilitar a produção de ácido glicólico a partir de fontes renováveis e abundantes. Técnicas de engenharia metabólica, aplicadas às espécies *Escherichia coli* (DENG, MAO & ZHANG, 2015; CAM *et al.*, 2016; ALKIM *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2016; CABULONG *et al.*, 2018), *Saccharomyces cerevisiae* (KOIVISTOINEN *et al.*, 2013; SALUSJÃRVI *et al.*, 2017), *Kluyveromyces lactis* (KOIVISTOINEN *et al.*, 2013) e *Corynebacterium glutamicum* (ZAHOOR, OTTEN & WENDISCH, 2014), tornaram viável a obtenção de ácido glicólico a partir de açúcares como D-xilose e glicose.

A primeira patente relacionada ao tema foi publicada em 2009, por Philippe Soucaille, e aborda as modificações realizadas em *Escherichia coli* para obtenção de ácido glicólico a partir de glicose (SOUCAILLE, 2009). Tal método de produção já é realizado em escala piloto, com capacidade de produção de 52,2 g/L, pelas companhias *Metabolic Explorer* e *Roquette* (BECKER *et al.*, 2015). As empresas citadas são responsáveis pelo depósito de patentes relacionadas ao aumento da produção de ácido glicólico por novas modificações genéticas e por melhorias do processo (METABOLIC EXPLORER, 2010; ROQUETTE FRERES, 2012; METABOLIC EXPLORER, 2013).

A Tabela 4 sumariza os resultados encontrados na literatura para produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol, hidroxiacetonitrila e fontes renováveis.

Tabela 4: Resultados relevantes na literatura para produção biotecnológica de ácido glicólico a partir de diferentes substratos e formas de condução de processo

	Microrganismo	Substrato	Operação	AG (g/L)	Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	$Y_{P/S}$
1	*Pichia naganishii* AKU4267[1]	Etilenoglicol	B	105,0	0,875	0,88 mol/mol
2	*Rhodotorula* sp. 3Pr-126[1]	Etilenoglicol	B	110,0	0,917	0,92 mol/mol
3	*Gluconobacter oxydans* DSM 2003[1]	Etilenoglicol	B	70,2	1,46	0,87 mol/mol
4	*Gluconobacter oxydans* DSM 2003[1]	Etilenoglicol	BA	74,5	1,49	0,87 mol/mol
5	*Gluconobacter oxydans* DSM 2003[1]	Etilenoglicol	BARP	93,2	1,86	-
6	*Alcaligenes* sp. ECU0401[1]	Hidroxiacetonitrila	B	55	1,5	0,736 mol/mol
7	*Kluyveromyces lactis*[2]	Xilose (18 g/L) + Etanol (15 g/L)	B	6,7	0,09	-
8	*Burkholderia* sp. EG13[1]	Etilenoglicol	BARP	60	0,5	-
9	*Corynebacterium glutamicum*[2]	Glicose (60 mM) + Acetato (180 mM)	B	5,3	0,1	0,18 g/g
10	*Escherichia coli*[2]	Glicose	BA	56,44	0,47	0,52 g/g
11	*Gluconobacter oxydans* DSM 2003[2]	Etilenoglicol	BA	113,8	2,53	0,929 mol/mol
12	*Escherichia coli*[2]	Xilose	B	4,3	-	0,9 mol/mol
13	*Escherichia coli*[2]	Xilose (5 g/L) + Glicose (2,5 g/L)	B	3,73	-	0,63 g/g
14	*Escherichia coli*[2]	Xilose	B	40,0	0,47	0,63 g/g
15	*Saccharomyces cerevisiae*[2]	Xilose	B	1,0	0,01	-
16	*Escherichia coli*[2]	Xilose	B	4,57	-	0,46 g/g

Legenda: [1]Microrganismo naturalmente ocorrente; [2]Microrganismo geneticamente modificado. B – Batelada; BA – Batelada alimentada; BARP – Batelada alimentada com remoção de produto; AG – Concentração de ácido glicólico produzida; Q_P – Produtividade volumétrica; $Y_{P/S}$ – Fator de rendimento de produção de ácido glicólico em relação ao consumo de substrato. Fonte: 1, 2 KATAOKA *et al.* (2001); 3 WEI *et al.* (2009a); 4, 5 WEI *et al.* (2009b); 6 HE *et al.* (2010); 7 KOIVISTOINEN *et al.* (2013); 8 GAO *et al.* (2014); 9 ZAHOOR, OTTEN & WENDISCH (2014); 10 DENG, MAO & ZHANG (2015); 11 ZHANG *et al.* (2016b); 12 CAM *et al.* (2016); 13 ALKIM *et al.* (2016); 14 PEREIRA *et al.* (2016); 15 SALUSJARVI *et al.* (2017); 16 CABULONG *et al.* (2018).

2.2.3. Produtos e Aplicações

O ácido glicólico possui diversas aplicabilidades. O composto pode ser empregado amplamente em processamento de tecidos e couro, limpeza e revestimento metálico, produção de detergentes e adesivos, como bloco de construção de polímeros biodegradáveis e como constituinte de produtos de cuidado pessoal, especialmente relacionados a propósitos dermatológicos (KROCHTA, TILLIN & HUDSON, 1988; COTELLESSA, PERIS & CHIMENTI, 1995).

Dentre todas as suas funções, a relevância no setor de cosméticos é evidenciada por sua representatividade no consumo global do ácido orgânico, correspondendo, no ano de 2011, a mais da metade da demanda (MARKET REVIEWS, 2015). Além disso, outro uso

relevante, com grande capacidade de crescimento na conjuntura atual, é como precursor na produção de bioplásticos (KROCHTA, TILLIN & HUDSON, 1988). Deste modo, atenção especial será dada aos dermocosméticos e aos biopolímeros.

2.2.3.1. Produtos de Cuidado Pessoal

O ácido glicólico é largamente utilizado em cosméticos dermatológicos para tratamento de acne, cicatriz de acne, manchas de diversos tipos (queratose actínica, melasma, seborreia, manchas de envelhecimento), verrugas e rugas (COTELLESSA, PERIS & CHIMENTI, 1995; SILVA *et al.*, 2001; SHARAD, 2013). É aplicado por dermatologistas e esteticistas em tratamentos superficiais e profundos de destruição das camadas da pele (*peelings*) e, normalmente, é encontrado em loções, cremes e géis com concentrações que variam de 2% a 70% (COTELLESSA, PERIS & CHIMENTI, 1995).

O processo de esfoliação química ou *peeling* químico é definido pela Academia Americana de Dermatologia (AAD) como a aplicação de um ou mais agentes esfoliantes à pele, o que resulta na descamação da epiderme e da derme com consequente regeneração da pele (SCOTT, DITRE & YU, 1996). O *peeling* de ácido glicólico tem efeito anti-inflamatório, antioxidante e queratolítico e auxilia na normalização da queratina, no aumento de ácido hialurônico e na expressão do gene do colágeno na epiderme e na derme (SHARAD, 2013). Seus benefícios incluem a hidratação e a melhora da textura e da cor da pele (SILVA *et al.*, 2001; BISSET, 2009).

A intensidade da esfoliação química é determinada por inúmeros fatores: concentração de ácido glicólico aplicada na pele, pH, quantidade de ácido livre, tipo de solução utilizada (creme, gel ou loção), pele do paciente, local a ser tratado, tempo de exposição e técnica utilizada para aplicação, que inclui o preparo da pele antes da realização do *peeling* (SCOTT, DITRE & YU, 1996; SILVA et al., 2001; SHARAD, 2013).

O *peeling* de ácido glicólico pode ser classificado como muito superficial, superficial e profundo. A distribuição é vinculada aos fatores mencionados e, de modo geral, a esfoliação muito superficial é realizada com ácido glicólico em concentração de 30-50% e tempo de exposição de 1-2 minutos, a esfoliação superficial é feita em concentração de 50-70% e tempo de contato de 2-5 minutos. E, por sua vez, o *peeling* profundo é realizado por 3-15 minutos em concentração de ácido glicólico de 70% (SCOTT, DITRE & YU, 1996; SHARAD, 2013).

Logo, pelo controle do tempo de exposição e da concentração de ácido livre, o médico ou esteticista pode usar o ácido para remover apenas as camadas de células superficiais do

estrato córneo (camada mais externa da pele) ou para remover camadas mais profundas da epiderme ou até mesmo da derme (SCOTT, DITRE & YU, 1996).

O mecanismo exato de ação do ácido glicólico como agente esfoliante ainda é desconhecido. É sabido, entretanto, que, em pequenas concentrações, o ácido reduz a coesão entre as células da camada mais externa da pele, os corneócitos. O mecanismo mais aceitável é que o ácido remove íons cálcio Ca^{2+} por formação de complexos hidrossolúveis (processo de quelação), reduzindo sua concentração na epiderme. Como as caderinas, glicoproteínas expressas nas células epiteliais e responsáveis pela adesão entre as células, são dependentes de Ca^{2+}, ocorre quebra da aderência e consequente descamação da pele (SILVA *et al.*, 2001; BISSET, 2009).

2.2.3.2. Polímeros Biodegradáveis

Os polímeros biodegradáveis são materiais, de origem natural ou sintética, que podem ser degradados pela atividade de microrganismos ou enzimas para dar origem a produtos de menores massas moleculares. Estes produtos são atóxicos e biocompatíveis e, portanto, podem ser metabolizados em outros processos bioquímicos (MAKADIA & SIEGEL, 2011; GARRISON, MURAWSKI & QUIRINO, 2016).

A partir do ácido glicólico, mais especificamente de seu dímero cíclico glicolídeo ($C_4H_4O_4$, 116,07 g/mol, CAS Nº 502-97-6), derivam-se dois polímeros biodegradáveis sintéticos de especial importância em cuidados médicos: o poliglicolídeo (ou ácido poliglicólico, PGA) e o poli (D,L-lactídeo-co-glicolídeo) (ou poli (ácido D,L-lático-co-ácido glicólico, PLGA) (BARROWS, 1986).

O polímero PGA foi o primeiro tipo de sutura absorvível disponível no mercado. A absorção ocorre por hidrólise, na qual o produto formado é o ácido glicólico. A sutura de PGA apresenta boa força de tensão e segurança de nó (TAJIRIAN & GOLDBERG, 2010).

Como se trata de um polímero hidrofílico de alta cristalinidade, o PGA absorve água facilmente e sua taxa de degradação é relativamente rápida. Como consequência, a liberação acelerada de ácido pode provocar a inflamação de tecidos do organismo. Para driblar tal adversidade, foi desenvolvido o PLGA, um copolímero de poliglicolídeo (PGA) e poli (D,L-lactídeo) (PLA), sendo o segundo derivado do dímero cíclico do ácido lático, o lactídeo ($C_6H_8O_4$, 144,126 g/mol, CAS Nº 95-96-5). Devido à presença do PLA, o copolímero PLGA é mais hidrofóbico e, portanto, é hidrolisado mais lentamente. As propriedades físicas do PLGA dependem de múltiplos fatores, como massa molecular inicial, razão lactídeo:

glicolídeo, tamanho do polímero, exposição à água e temperatura de armazenamento (MAKADIA & SIEGEL, 2011).

O PLGA tem sido utilizado em diversas aplicações médicas. Entre elas, é possível citar sua relevância em engenharia de tecido e regeneração óssea, em vacinas e em encapsulamento de medicamentos ou proteínas para controle da liberação no organismo (FREDENBERG *et al.*, 2011).

2.2.4. Mercado Mundial

Em 2011, a demanda global por ácido glicólico era de 40 mil toneladas e o mercado global era avaliado em 93,3 milhões de dólares. Em termos de aplicação, 23,88 mil toneladas foram destinadas para produtos de cuidado pessoal, 9,72 mil toneladas para produtos de limpeza, 4,2 mil toneladas para uso industrial e 2,2 mil toneladas para outras aplicações (TMR, 2018). A Figura 14 sumariza as principais demandas por ácido glicólico.

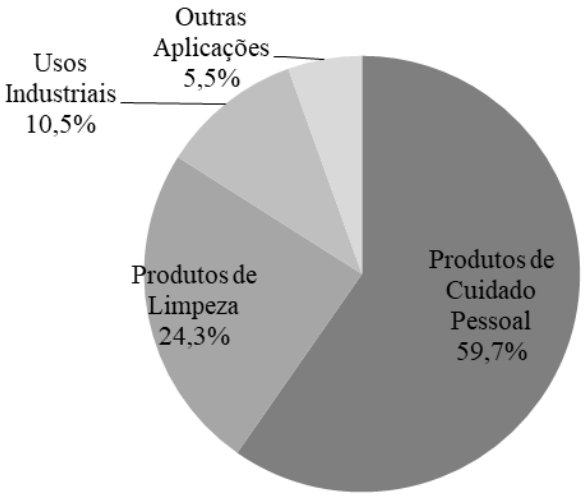

Figura 14: Demanda global de ácido glicólico por aplicações
Fonte: Adaptado de TMR (2018).

As principais produtoras mundiais de ácido glicólico são as empresas Parchem, CrossChem LP, Phibro Animal Health Corporation, DuPont, Griffin International e Chemsolv Inc. Já as principais compradoras incluem grandes fabricantes de cosméticos para pele e cabelo, como Neutrogena, Garnier, St. Ives e Clean & Clear (GVR, 2016).

Geograficamente, o mercado é segmentado em América do Norte, Europa, Ásia e resto do mundo. Em 2015, quando o mercado era avaliado em 159,6 milhões de dólares, a

América do Norte e a Europa respondiam, respectivamente por mais de 35% e mais de 30% da parcela de mercado (GVR, 2016).

Nos anos seguintes, 2016 e 2017, o mercado de ácido glicólico foi avaliado, nesta ordem, em 249,9 e 288,9 milhões de dólares. Até o ano de 2023, é esperado que atinja cerca de 400 milhões de dólares (MRF, 2017; BW, 2018).

O mercado global de ácido glicólico é guiado pela contínua inovação em produtos, majoritariamente direcionados a cuidados pessoais. Por consequência, o crescimento anual responde pela demanda cada vez maior em produtos de beleza, progressivamente mais eficientes devido aos avanços tecnológicos (GVR, 2016).

2.3. MICRORGANISMO: BACTÉRIAS ACÉTICAS

As bactérias de ácido acético (AAB) pertencem à família *Acetobacteraceae* (ordem *Rhodospirillales* e classe *Alphaproteobacteria*), e foram assim denominadas, primordialmente, por possuírem habilidade natural de transformar etanol em ácido acético, em maior ou menor proporção (GLUILLAMÓN & MAS, 2017; MALIMAS *et al.*, 2017). As bactérias acéticas são encontradas em ambientes diversos: adocicados, alcoólicos ou acidificados, e podem ser isoladas em flores, frutas e plantas variadas, em vinagre, em bebidas alcoólicas, entre outros (KERSTERS *et al.*, 2006; DE ROOS & DE VUYST, 2018).

Compreendem um grupo de bacilos gram-negativos e gram-variáveis, estritamente aeróbicos e não formadores de esporos, que podem existir individualmente, em pares ou em cadeias. Formam células irregulares, cujas dimensões variam entre 0,4-1 µm em largura e 0,8-4,5 µm em comprimento. São catalase positiva e oxidase negativa. As bactérias acéticas se desenvolvem muito bem em temperaturas brandas, predominantemente, entre 25 e 30ºC. Há conhecimento, entretanto, de espécies que são termotolerantes. Apesar de crescimento ser notado em faixas baixas de pH (3-4), o melhor desenvolvimento celular ocorre entre pH 5 e 6,5. As bactérias de ácido acético formam um grupo bastante heterogêneo, incluindo organismos sem e com motilidade, os últimos por flagelos polares ou peritríquios. Adicionalmente, apresentam majoritariamente a cadeia linear insaturada C18:1ω7 como ácido graxo do envelope celular (KERSTERS *et al.*, 2006; SENGUN & KARABIYIKLI, 2011; MALIMAS *et al.*, 2017).

2.3.1. Taxonomia

O primeiro gênero de bactérias de ácido acético foi introduzido por Beijerinck, em 1898, e titulado *Acetobacter* (KERSTERS *et al.*, 2006). Em 1935, Asai propôs a divisão das AAB em dois gêneros distintos: *Acetobacter* e *Gluconobacter*, definidas pelas altas capacidades de oxidação de etanol a ácido acético e de glicose a ácido glucônico, respectivamente (ASAI & SHODA, 1958; KERSTERS *et al.*, 2006). A família *Acetobacteraceae* foi introduzida apenas em 1980 por Gillis e De Ley, quando se comprovaram as semelhanças filogenéticas entre os grupos *Acetobacter* e *Gluconobacter* por hibridização DNA-rRNA (GILLIS & DE LEY, 1980). Diversas modificações vêm sendo inseridas à família de bactérias de ácido acético. Preliminarmente, a classificação era fundamentada em aspectos morfológicos e fisiológicos. Com o avanço de técnicas de biologia molecular, como hibridização DNA-DNA, hibridização DNA-rRNA, determinação do conteúdo G+C (guanina + citosina) e análise de sequências genômicas (5S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA e 16S rDNA), a família *Acetobacteracea* vem sendo constantemente modificada, tendo suas espécies reorientadas em gêneros que englobam maior similaridade (SIEVERS & SWINGS, 2005; GLUILLAMÓN & MAS, 2017).

Em 1997, Yamada e colaboradores sugeriram que o gênero *Acetobacter* fosse subdividido em dois: *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*. A subdivisão foi realizada pela comparação entre os sistemas ubiquinona das diferentes espécies. As espécies de *Acetobacter* apresentam ubiquinona Q-9, enquanto o novo gênero *Gluconacetobacter* passou a conter as espécies caracterizadas pela presença de ubiquinona Q-10 (YAMADA, HOSHINO & ISHIKAWA, 1997). Mais recentemente, as bactérias do gênero *Gluconacetobacter* foram segmentadas em dois grupos: os microrganismos pertencentes à espécie *Gluconacetobacter xylinus* foram reintroduzidos no novo gênero *Komagataeibacter*, ao passo que àqueles referentes à espécie *Gluconacetobacter liquefaciens* permaneceram no gênero de origem (YAMADA *et al.*, 2012).

Atualmente, outros novos gêneros foram adicionados e as acetobactérias foram reclassificadas em 19 grupos: *Acetobacter, Acidomonas, Ameyamaea, Asaia, Bombella, Commensalibacter, Endobacter, Gluconacetobacter, Gluconobacter, Granulibacter, Komagataeibacter, Kozakia, Neoasaia, Neokomagataea, Nguyenibacter, Saccharibacter, Swingsia, Swminathania* e *Tantichaorenia*. As espécies conhecidas, de acordo com o gênero, estão listadas na Tabela 5 (GLUILLAMÓN & MAS, 2017). Na Tabela 6, estão sumarizadas as principais propriedades dos gêneros predominantes da família *Acetobacteracea*.

Tabela 5: Gêneros e espécies de bactérias acéticas

Gênero	Espécie
Acetobacter	*(1) A. aceti; (2) A. cerevisiae; (3) A. cibinongensis; (4) A. estunensis; (5) A. fabarum; (6) A. farinalis; (7) A. ghanensis; (8) A. indonesiensis; (9) A. lambici; (10) A. lovaniensis; (11) A. malorum; (12) A. nitrogenifigens; (13) A. oeni; (14) A. okinawensis; (15) A. orientalis; (16) A. orleanensis; (17) A. papayae; (18) A. pasteurianus; (19) A. peroxydans; (20) A. persici; (21) A. pomorum; (22) A. senegalensis; (23) A. sicerae; (24) A. syzygii; (25) A. tropicalis.*
Acidomonas	*(1) Ac. methanolica.*
Ameyamaea	*(1) Am. chiangmaiensis.*
Asaia	*(1) As. astilbis; (2) As. bogorensis; (3) As. krungthepensis; (4) As. lannensis; (5) As. platycodi; (6) As. prunellae; (7) As. siamensis; (8) As. spathodeae.*
Bombella	*(1) B. intestini.*
Commensalibacter	*(1) C. intestini; (2) C. papalotli.*
Endobacter	*(1) E. medicaginis.*
Gluconacetobacter	*(1) Ga. aggeris; (2) Ga. asukensis; (3) Ga. azotocaptans; (4) Ga. diazotrophicus; (5) Ga. entanii; (6) Ga. johannae; (7) Ga. liquefaciens; (8) Ga. sacchari; (9) Ga. takamatsuzukensis; (10) Ga. tumulicola; (11) Ga. tumulisoli.*
Gluconobacter	*(1) G. albidus; (2) G. cerevisiae; (3) G. cerinus; (4) G. frateurii; (5) G. japonicus; (6) G. kanchanaburiensis; (7) G. kondonii; (8) G. morbifer; (9) G. nephelii; (10) G. oxydans; (11) G. roseus; (12) G. spahericus; (13) G. thailandicus; (14) G. uchimurae; (15) G. wancherniae.*
Granulibacter	*(1) Gr. bethesdensis.*
Komagataeibacter	*(1) Km. europaeus; (2) Km. hansenii; (3) Km. intermedius; (4) Km. kakiaceti; (5) Km. kombuchae; (6) Km. maltaceti; (7) Km. medellinensis; (8) Km. nataicola; (9) Km. oboediens; (10) Km. rhaeticus; (11) Km. saccharivorans; (12) Km. sucrofermentans; (13) Km. swingsii; (14) Km. xylinus.*
Kozakia	*(1) K. baliensis.*
Neoasaia	*(1) N. chiangmaiensis.*
Neokomagataea	*(1) Nk. tanensis; (2) Nk. thailandica.*
Nguyenibacter	*(1) N. vanlangensis.*
Saccharibacter	*(1) Sa. floricola.*
Swaminathania	*(1) S. salitolerans.*
Swingsia	*(1) S. samuiensis.*
Tanticharoenia	*(1) T. sakaeratensis.*

Fonte: GLUILLAMÓN & MAS (2017).

Tabela 6: Principais características das acetobactérias, de acordo com o gênero

Característica	***Acetobacter***	***Asaia***	***Gluconacetobacter***	***Gluconobacter***	***Komagataeibacter***
	1	2	3	4	5
Flagelação	per[a]	per	per	pol[a]	N
Oxidação de:					
Acetato a CO_2 e H_2O	+	w	+	-	+
Lactato a CO_2 e H_2O	+	w	+	-	+
Crescimento em:					
30% D-Glicose (m/v)	-	+	-	-[b]	nd
1% D-Glicose (m/v)	+	+	+	+	+
Glutamato-ágar	-	+	+	-	+
Manitol-ágar	vw	+	+	+	+
Rafinose	-	+	-	-	nd
Metanol	-	-	-	-	nd
0,35% Ácido acético (m/v) (pH 3,5)	+	-	+	+	+
1% KNO_3 (m/v)	-	-	-	-	-
Assimilação de amônia em:					
D-Glicose	-	+	+	+	nd
D-Manitol	-	+	+	+	+
Etanol	w	-	-	-	nd
Produção de:					
Ácido acético a partir de etanol	+	-	+	+	+
Pigmento marrom solúvel em água	-	-	+	-[b]	-
Dihidroxiacetona a partir de glicerol	+	w	+	+	+
Polissacarídeo, tipo levana, a partir de sucrose	-	-	-	-	-
2-keto-D-gluconato	+	+	+	+	+
5-keto-D-gluconato	+	+	+	+	+
2,5-diketo-D-gluconato	-	-	+	-[b]	-
Produção de ácido a partir de:					
D-Manitol	-	+	-	+	-
D-Sorbitol	-	+(d)	-	+	-
Dulcitol	-	+(d)	-	w	nd
Glicerol	-	+	-	+	nd
Rafinose	-	+	-	-	nd
Principal ubiquinona	Q-9	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
DNA G+C (%mol)	57,2	60,2	64,9	60,3	62,5

Legenda: pol – polar; per – perítriquio; n – nenhum; + positivo; - negativo; w – fracamente positivo; vw – muito fracamente positivo; d – atrasado; nd – não determinado. 1 *Acetobacter aceti* NBRC 14818T; 2 *Asaia bogorensis* NBRC 16594T; 3 *Gluconacetobacter liquefaciens* NBRC 12388T; 4 *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819T; 5 *Komagataeibacter xylinus* JCM 7644T. [a] Algumas espécies do gênero não são móveis; [b] Algumas espécies do gênero são positivas. Fonte: YAMADA, 2016; GLUILLAMÓN & MAS, 2017.

2.3.2. Aplicações Biotecnológicas à Luz do Genoma da Bactéria *Gluconobacter oxydans*

As bactérias acéticas representam um grupo diferenciado de microrganismos com capacidade de oxidar incompletamente diversos substratos, entre álcoois, açúcares e polióis, mesmo em condições naturais de crescimento (DEPPENMEIER, HOFFMEISTER & PRUST, 2002; DEPPENMEIER & EHRENREICH, 2009).

O processo biotecnológico, denominado fermentação oxidativa, é realizado por dois caminhos metabólicos alternativos em bactérias do gênero *Gluconobacter* e, portanto, envolve dois sistemas enzimáticos distintos em localização e função (MACAULEY, MCNEIL & HARVEY, 2001; DEPPENMEIER, HOFFMEISTER & PRUST, 2002; PRUST *et al.*, 2005).

O metabolismo oxidativo, propriamente dito, é catalisado por desidrogenases ligadas à membrana citoplasmática, com sítio ativo direcionado para o periplasma. A oxidação dos substratos é não-fosforilativa e as enzimas integram a cadeia respiratória, tendo o oxigênio como aceptor final de elétrons. Devido à localização das enzimas, os substratos não precisam ser transportados até o citoplasma e, consequentemente, os produtos são facilmente liberados ao meio por porinas presentes na membrana externa das bactérias gram-negativas. Este processo é responsável pela oxidação rápida de importantes substratos e os rendimentos obtidos em produto são praticamente seus valores teóricos (MACAULEY, MCNEIL & HARVEY, 2001; DEPPENMEIER, HOFFMEISTER & PRUST, 2002; PRUST *et al.*, 2005).

Em 1982, White e Claus observaram a formação de membranas intracitoplasmáticas em células de *Gluconobacter* após a fase exponencial de crescimento, tanto em glicerol quanto em sorbitol. Concomitantemente, foi observada melhora na atividade das desidrogenases ligadas à membrana. A formação das membranas intracitoplasmáticas, que é influenciada, provavelmente, pela baixa eficiência de fosforilação ou em resposta ao estresse celular, estimula o aumento do número de desidrogenases ligadas à membrana. Como consequência, há melhoramento da atividade das desidrogenases e as células em fase estacionária podem apresentar melhor potencial de conversão que células em fase exponencial de crescimento (MACAULEY, MCNEIL & HARVEY, 2001).

O segundo sistema enzimático de oxidação requer a captação do substrato para o interior celular. As enzimas solúveis no citoplasma são $NADP^+$ dependentes e oxidam o substrato a intermediários fosforilados que, em seguida, são metabolizados pela via das pentoses-fosfato. Tais enzimas são demandadas para a manutenção das células em fase estacionária e, em bactérias do gênero *Gluconobacter*, a via das pentoses-fosfato é a rota mais importante para ruptura fosforilativa de açúcares e polióis a dióxido de carbono

(MACAULEY, MCNEIL & HARVEY, 2001; DEPPENMEIER, HOFFMEISTER & PRUST, 2002; PRUST *et al.*, 2005).

Por conta de seu maquinário metabólico ímpar, as bactérias acéticas ocupam posição de destaque industrial, com variadas e importantes aplicações biotecnológicas. Um dos grandes benefícios do uso de AAB compreende a possibilidade de oxidação assimétrica de diversos substratos, ocasionando em formação de produtos regio- e estéreo- seletivos (DEPPENMEIER, HOFFMEISTER & PRUST, 2002; ROMANO *et al.*, 2002; KELIANG & DONGZHI, 2006).

Os produtos de interesse formados através do metabolismo oxidativo de bactérias de ácido acético englobam: (1) Vinagre (ácido acético) a partir de etanol (GULLO, VERZELLONI & CANONICO, 2014); (2) 1,3-Dihidroxiacetona (princípio ativo de autobronzeadores) a partir de glicerol (HU, ZHENG & SHEN, 2011; LIU *et al.*, 2013; DIKSHIT & MOHOLKAR, 2016); (3) Nanocelulose bacteriana (MIKKELSEN *et al.*, 2009; REINIATI, HRYMAK & MARGARITIS, 2017; CHANDRASEKARAN, BARI & SINHA, 2017); (4) Ácidos aldônicos, em especial ácido glucônico e ácido xilônico a partir de glicose e xilose, respectivamente (ZHANG *et al.*, 2016a; SAINZ *et al.*, 2016; YAO, HOU & BAO, 2017); (5) L-sorbose (precursor da vitamina C) a partir de D-sorbitol (KOSSEVA, BESCHKOV & POPOV, 1991; YANG & LIM, 1997; GIRIDHAR & SRIVASTAVA, 2002); (6) Ácido glicólico a partir de etilenoglicol, bioconversão tema do presente trabalho, que será discutida mais amplamente abaixo.

2.3.2.1. Produção de Ácido Glicólico a Partir de Etilenoglicol por Acetobactérias

Em 1887, Adrian J. Brown relatou pela primeira vez a formação de ácido glicólico por etilenoglicol a partir da bactéria *Acetobacter aceti* (BROWN, 1887). Em 1897, Seifert constatou oxidação similar em *Acetobacter pasteurianus e Acetobacter kiitzingianus* e, em 1925, Visser’t Hoot relatou a produção do ácido orgânico pelas bactérias *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter melogenous* e *Gluconobacter oxydans*, a partir do mesmo substrato (KERSTERS & DE LEY, 1963; DE LEY & KERSTERS, 1964).

K. Kersters e J. De Ley dedicaram-se, nos anos 1960, ao estudo da oxidação de glicóis em diversas bactérias de ácido acético (KERSTERS & DE LEY, 1963; DE LEY & KERSTERS, 1964). Em 1963, os pesquisadores noticiaram que células em fase estacionária de 14 espécies de bactérias acéticas eram capazes de oxidar lentamente etilenoglicol como

substrato. O produto formado, devidamente identificado, era novamente ácido glicólico (KERSTERS & DE LEY, 1963).

Kersters e De Ley mencionaram a possibilidade de formação de glicolaldeído como intermediário do processo metabólico e que, provavelmente, o mesmo seria oxidado instantaneamente a ácido glicólico, visto que não obtiveram êxito na detecção do aldeído no meio fermentado. Além disso, reportaram que o ácido orgânico não era oxidado por diversas bactérias acéticas e deduziram, portanto, que as bactérias acéticas são incapazes ou fracamente capazes de produzir ácido oxálico a partir de etilenoglicol (DE LEY & KERSTERS, 1964).

Recentemente, Wei e colaboradores estudaram a produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. Em batelada, alcançaram 70,2 g/L de ácido glicólico, com produtividade volumétrica de 1,46 $gL^{-1}h^{-1}$ e rendimento de 0,87 mol/mol. Já em batelada alimentada, a concentração de ácido obtida foi de 74,5 g/L com produtividade volumétrica de 1,49 $gL^{-1}h^{-1}$ e rendimento de 0,87 mol/mol. Em processo de batelada alimentada com remoção de produto, o grupo reportou concentração final de ácido glicólico de 93,2 g/L e produtividade volumétrica de 1,86 $gL^{-1}h^{-1}$ (WEI *et al.*, 2009a; WEI *et al.*, 2009b). Por melhoramento genético da bactéria *Gluconobacter oxydans* DSM 2003, Zhang e equipe alcançaram 73,3 g/L de ácido glicólico em batelada, com produtividade volumétrica de 1,63 $gL^{-1}h^{-1}$ e rendimento molar de 93,5%. Em batelada alimentada, aprimoraram a produção para 113,8 g/L de ácido glicólico, com produtividade volumétrica de 2,53 $gL^{-1}h^{-1}$ e rendimento molar de 92,9% (ZHANG *et al.*, 2016b).

Apesar de avanços recentes em produção, o mecanismo de conversão de etilenoglicol a ácido glicólico por bactérias de ácido acético ainda não é completamente elucidado. Em 2012, Wei e colaboradores estudaram o funcionamento das enzimas acopladas à membrana citoplasmática, álcool desidrogenase (mADH) e aldeído desidrogenase (mALDH), na oxidação de álcoois, dióis e polióis em células de *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. A investigação foi realizada pela comparação entre o funcionamento de células naturalmente ocorrentes e de células geneticamente modificadas por silenciamento dos genes responsáveis pela codificação das enzimas mADH e mALDH (WEI *et al.*, 2012).

Os pesquisadores mostraram que sem a enzima álcool desidrogenase, nenhum acúmulo de ácido glicólico era observado, o que indica que a mADH é a única capaz de oxidar etilenoglicol a glicolaldeído e é indispensável na bioconversão. A enzima aldeído desidrogenase mALDH também se mostrou envolvida no processo. Em sua ausência, entretanto, apesar do acúmulo de glicolaldeído no meio fermentado, ainda foi possível notar a

formação de ácido glicólico. É possível, portanto, que enzimas aldeído desidrogenases solúveis (ALDH) e atuantes em aldeídos de cadeia curta desempenhem papel tão relevante quanto a mALDH na segunda etapa reacional (WEI *et al*., 2012).

Schweiger e colaboradores estudaram, em 2007, a superprodução e a caracterização de duas enzimas solúveis, capazes de oxidar aldeídos, da bactéria *Gluconobacter oxydans* 621H. Em maior ou menor proporção, mostraram que ambas as enzimas possuem atividade para oxidação de glicolaldeído. A maior atividade é obtida com a enzima denominada *Gox1122*, a qual apresenta melhor atuação em aldeídos alifáticos de cadeia curta e utiliza NADP como cofator (SCWEIGER, VOLLAND & DEPPENMEIER, 2007).

De modo genérico, é possível afirmar, com base nos estudos anteriores especificados para a bactéria *Gluconobacter oxydans*, que a conversão oxidativa de etilenoglicol a ácido glicólico por bactérias acéticas é dividida em duas etapas. A primeira delas é realizada exclusivamente pela enzima álcool desidrogenase ligada à membrana (mADH) e compreende a formação de glicolaldeído. A segunda etapa pode ser realizada pela enzima aldeído desidrogenase também ligada à membrana (mALDH) e por enzimas solúveis no citoplasma celular com habilidade de oxidar aldeído (ALDH). Assim, ocorre a conversão de glicolaldeído ao produto final, ácido glicólico. Portanto, de acordo com a via metabólica, por estequiometria, é possível produzir 1 mol de ácido glicólico a partir de 1 mol de etilenoglicol.

As enzimas atuantes no processo podem operar em ampla faixa de substratos sendo, portanto, inespecíficas (WEI *et al*., 2012). O processo mais provável é descrito na Figura 15.

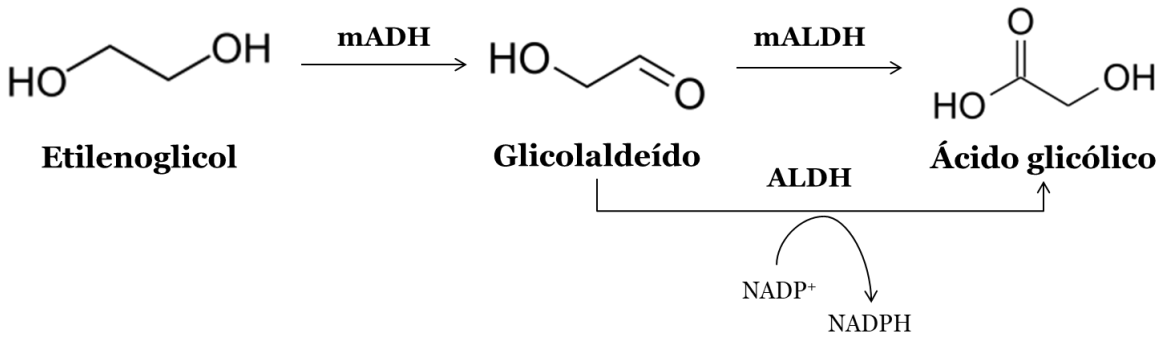

Figura 15: Bioconversão provável de etilenoglicol a ácido glicólico por bactérias acéticas do gênero *Gluconobacter*
mADH – enzima álcool desidrogenase ligada à membrana; mALDH – enzima aldeído desidrogenase ligada à membrana; ALDH – enzima aldeído desidrogenase solúvel; $NADP^+$ e NADPH – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado e reduzido, respectivamente.

3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

O ácido glicólico é uma molécula da Química Fina de significativa importância industrial, principalmente quando se refere à formulação de produtos de cuidado pessoal. A fim de acompanhar a demanda crescente, nos últimos anos, novas tecnologias de produção de ácido glicólico têm sido desenvolvidas. Entre elas, soluções ambientalmente sustentáveis têm atraído destaque especial.

A produção de ácido glicólico atual é majoritariamente realizada por via química a partir de derivados do petróleo. Por rota bioquímica, é possível produzir o ácido orgânico, entre alternativas, pelo metabolismo de oxidação incompleta do etilenoglicol por bactérias acéticas. Para que o processo seja completamente alternativo e independente de fontes petroquímicas, além de renovável e sustentável, o substrato, etilenoglicol, pode ser produzido por catálise química de biomassas vegetais, como a celulose e o glicerol, e por etileno produzido a partir de bioetanol gerado por fermentação a partir de matérias-primas sacaríneas, amiláceas ou lignocelulósicas.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivos:

GERAL:

- Avaliar a capacidade de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por bactérias acéticas de diferentes gêneros e desenvolver um processo biotecnológico de síntese do ácido orgânico pela avaliação dos parâmetros envolvidos na bioconversão.

ESPECÍFICOS:

- Avaliar o crescimento em diferentes fontes de carbono e a produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por quatro espécies de acetobactérias (*Acetobacter aceti* INCQS 00206, *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174, *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 e *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064);
- Selecionar a linhagem de melhor crescimento e maior eficiência de conversão de etilenoglicol a ácido glicólico;
- Examinar fatores associados ao processo, como temperatura, pH e concentração celular, definindo-os em níveis adequados e viáveis experimentalmente;
- Empregar técnica de planejamento experimental para melhoramento do meio de bioconversão com a linhagem selecionada;
- Investigar possível efeito inibitório do substrato e do produto na atividade microbiana;
- Avaliar a atividade e a possibilidade de reutilização celular para produção de ácido glicólico;
- Definir a melhor forma de condução do processo;
- Conduzir as etapas de crescimento celular e bioconversão em biorreator instrumentado, agitado pneumaticamente, para controle eficiente das variáveis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos que compõem esta dissertação foram divididos em duas etapas, ambas realizadas nas dependências dos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ.

A primeira fase consistiu na seleção da linhagem de maior crescimento e melhor produção de ácido glicólico. A segunda, que dá continuidade à primeira, já com o microrganismo selecionado (*Gluconobacter oxydans* CCT 0552), baseou-se na análise de fatores essenciais à bioconversão e no melhoramento da geração biotecnológica de ácido glicólico a partir de etilenoglicol. Todos os materiais e as metodologias utilizados serão devidamente descritos a seguir.

4.1. MICRORGANISMOS, SUBSTRATOS E PRODUTO

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram adquiridos liofilizados, pelo LADEBIO, dos bancos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS – FIOCRUZ) e da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (CCT), a saber:

- *Acetobacter aceti* INCQS 00206 (referência ATCC 23747);
- *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174;
- *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 (referência ATCC 621);
- *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064 (referência ATCC 23767).

Os substratos foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich e são eles: D-Manitol ≥98% e etilenoglicol ≥99% (*ReagentPlus*®) para composição dos meios de crescimento celular e de bioconversão, respectivamente. Para que o presente trabalho pudesse ser concluído, D-Manitol ≥98% foi ainda gentilmente cedido pela empresa Ingredion Brasil Ingredientes Industriais Ltda. Além disso, adquiriu-se, também da empresa Sigma-Aldrich, ácido glicólico 99% (*ReagentPlus*®) para avaliação do efeito inibitório do produto no processo de bioconversão, descrito no item 4.13.

4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1. Análise da Correlação Linear Entre Concentração de Células e Absorvância

A concentração celular de cada linhagem foi analisada por turbidimetria, técnica em que a massa seca de células é correlacionada linearmente com a absorvância obtida em espectrofotômetro (Shimadzu UV 1800) a 600 nm.

Para determinação da massa seca, as quatro linhagens foram ativadas em meio contendo 25 g/L D-manitol, 5 g/L extrato de levedura e 3 g/L peptona. Frascos Erlenmeyer de volume nominal de 500 mL e volume reacional de 200 mL foram incubados em agitador Shaker (New Brunswick™ Innova® 44) a 28ºC e 200 rpm. Os cultivos foram conduzidos até metade da fase exponencial de crescimento e o tempo de ativação foi variado de acordo com a linhagem, sendo de 28 horas para *A. aceti*, 12 horas para *G. oxydans* e *G. oxydans* subsp. *suboxydans* e 16 horas para *Ga. xylinus*. Alíquotas de 10 mL das suspensões celulares obtidas foram pipetadas, em triplicata, em tubos Falcon de 15 mL. Os tubos foram, então, centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos para retirada do sobrenadante. As células foram suspendidas em água para lavagem e o processo de centrifugação foi repetido para nova retirada do sobrenadante. Os tubos foram levados à estufa a 50ºC até que a massa permanecesse constante.

Para elaboração da curva de regressão linear padrão, várias diluições foram preparadas a partir da mesma suspensão celular utilizada para determinação da massa seca. As diluições foram avaliadas em espectrofotômetro a 600 nm e os valores de absorvância foram correlacionados linearmente com a massa seca de células. As curvas de correlação linear para cada bactéria estão apresentadas na Figura 16, Figura 17, Figura 18 e Figura 19.

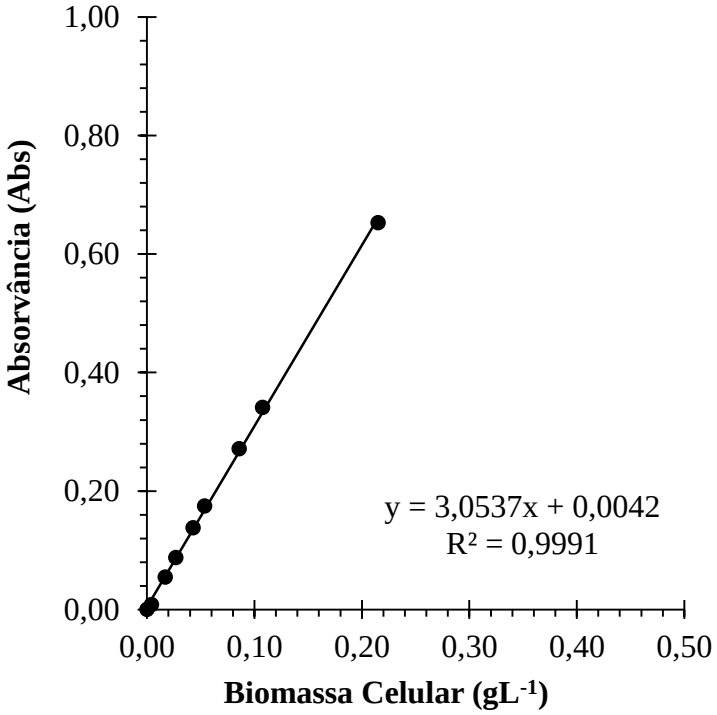

Figura 16: Regressão linear e coeficiente de determinação para a quantificação de biomassa da linhagem *Acetobacter aceti* INCQS 00206 pelo método da turbidimetria. Absorvância a 600 nm

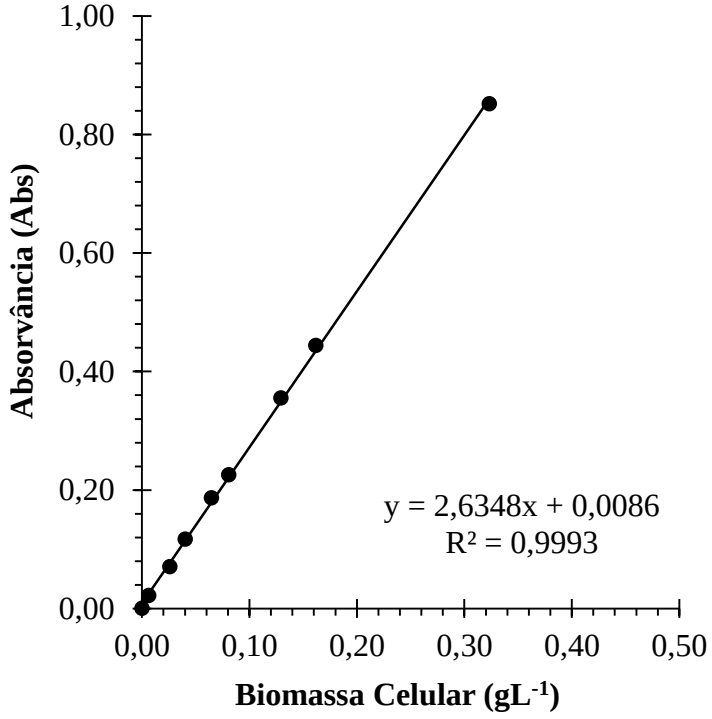

Figura 17: Regressão linear e coeficiente de determinação para a quantificação de biomassa da linhagem *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174 pelo método da turbidimetria. Absorvância a 600 nm

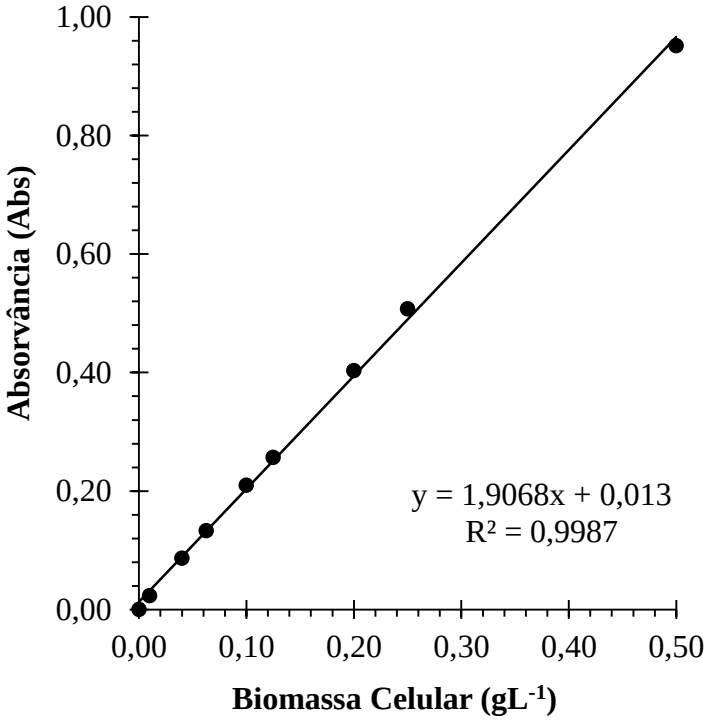

Figura 18: Regressão linear e coeficiente de determinação para a quantificação de biomassa da linhagem *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 pelo método da turbidimetria. Absorvância a 600 nm

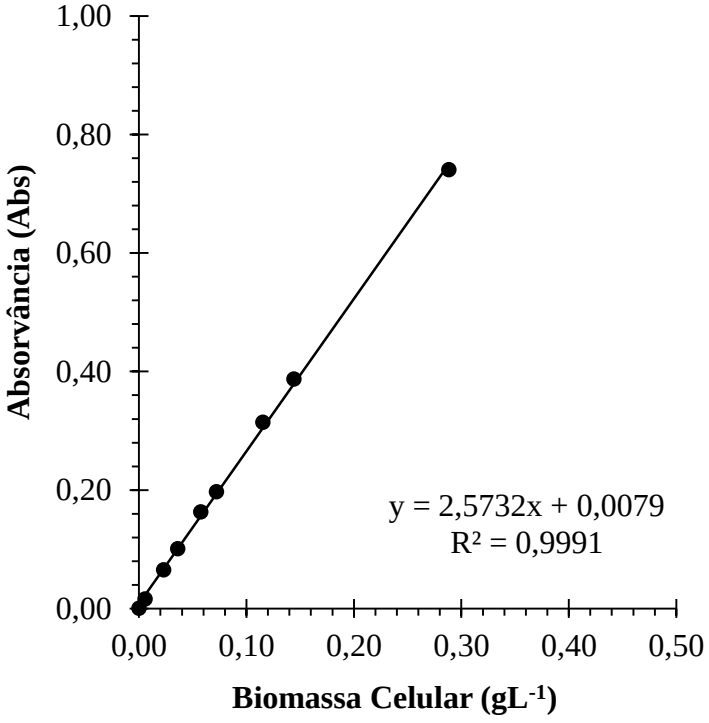

Figura 19: Regressão linear e coeficiente de determinação para a quantificação de biomassa da linhagem *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064 pelo método da turbidimetria. Absorvância a 600 nm

4.2.2. Análise de Ácido Glicólico e Etilenoglicol

As concentrações de ácido glicólico e etilenoglicol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As análises foram efetuadas em cromatógrafo líquido Shimadzu e os analitos foram separados pela coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad) e quantificados por um detector de índice de refração (RID). A coluna foi aquecida a 55ºC e a fase móvel utilizada foi H_2SO_4 5 mM em fluxo de 0,6 mL/min. As concentrações de ácido glicólico e etilenoglicol foram calculadas baseadas em uma curva padrão e o cromatograma típico da determinação de ambos está apresentado na Figura 20.

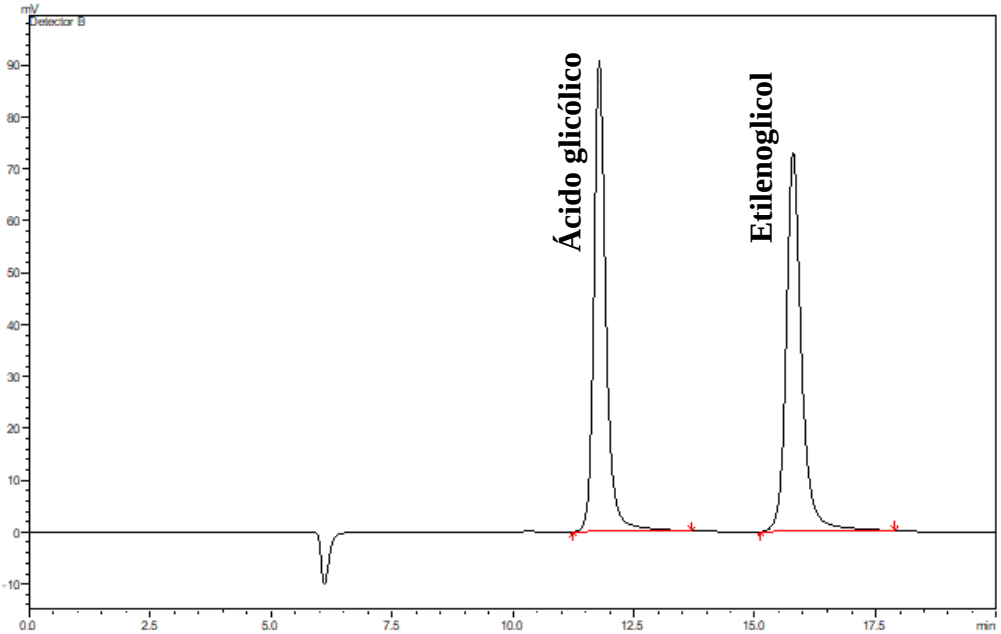

Figura 20: Cromatograma típico de determinação de ácido glicólico e etilenoglicol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.2.3. Análise de Células, Ácido Glicólico e Etilenoglicol nos Meios de Crescimento Celular e Bioconversão

Para determinação das concentrações de célula, ácido glicólico e etilenoglicol nos meios de crescimento e bioconversão, alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para análise de ácido glicólico e etilenoglicol por CLAE. De modo que todos analitos estivessem em concentração entre 0,5 g/L e 10 g/L para satisfazer a curva padrão do equipamento, as amostras foram diluídas em água deionizada.

Após a retirada completa do sobrenadante, as células foram suspendidas e, caso necessário, diluídas em água deionizada para análise em espectrofotômetro a 600 nm. Água

deionizada foi ainda utilizada para zerar o equipamento e o resultado, em absorvância, foi comparado com a curva de regressão linear de acordo com a bactéria e, então, convertido a concentração de massa seca de células.

4.2.4. Análise da Pureza das Linhagens e do Aspecto Microscópico

A ausência de contaminação no crescimento dos microrganismos e na produção de ácido glicólico foi avaliada pelo método de coloração de Gram. A técnica consiste em gotejar a amostra contendo as células em uma lâmina de vidro e secar em bico de Bunsen. Em seguida, aplicam-se as soluções de cristal violeta (Gram I), de iodo inorgânico (Gram II), de álcool 95% (Gram III) e de fucsina (Gram IV), nesta ordem. Cada reagente é deixado na lâmina por um minuto e, entre um e outro, é feito lavagem com água deionizada. Ao final, a lâmina é novamente rinsada com água deionizada e seca em bico de Bunsen. O resultado da técnica de coloração de Gram foi observado em microscópio eletrônico (Leica DM2000).

4.3. CÁLCULO DOS PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DO PROCESSO

Os parâmetros avaliados durante o processo de crescimento celular foram os tempos de ativação e propagação, a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação. Para o crescimento em etilenoglicol, o fator de rendimento $Y_{X/S}$ e a redução percentual de substrato também foram analisados. Já no processo de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol, avaliaram-se a concentração final de ácido glicólico, o fator de rendimento $Y_{P/S,}$ a produtividade volumétrica Q_P, a redução percentual de substrato e a eficiência de bioconversão.

Os tempos de ativação e de propagação foram determinados como sendo o tempo da metade da fase exponencial de crescimento.

A taxa específica de crescimento foi determinada pela Equação 1:

$$\mu = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt}$$

Equação 1

Em que:

μ: Taxa específica de crescimento (h^{-1});

X: Concentração de células (g/L);

t: Tempo (h).

O tempo de duplicação foi obtido pela Equação 2:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Equação 2

Em que:

t_d: Tempo de duplicação (h);

μ: Taxa específica de crescimento (h^{-1}).

O fator de rendimento $Y_{X/S}$ para o crescimento celular em etilenoglicol foi determinado pela Equação 3:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

Equação 3

Em que:

$Y_{X/S}$: Fator de rendimento de produção celular ($g_{célula}/g_{substrato}$);

X: Concentração celular final (g/L);

X_0: Concentração celular inicial (g/L);

S: Concentração de substrato final (g/L);

S_0: Concentração de substrato inicial (g/L).

A redução percentual de substrato (RPS) para o etilenoglicol foi calculada pela Equação 4:

$$RPS\ (\%) = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100$$

Equação 4

Em que:

RPS: Redução percentual de substrato (%);

S: Concentração de substrato final (g/L);

S_0: Concentração de substrato inicial (g/L).

O fator de rendimento $Y_{P/S}$ para a produção de ácido glicólico foi obtido pela Equação 5:

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Equação 5

Em que:

$Y_{P/S}$: Fator de rendimento de produção de ácido glicólico em relação ao consumo de substrato ($g_{produto}/g_{substrato}$);

P: Concentração de produto final (g/L);

P_0: Concentração produto inicial (g/L);

S: Concentração de substrato final (g/L);

S_0: Concentração de substrato inicial (g/L).

A produtividade volumétrica ou taxa de formação de produto foi obtida pela Equação 6:

$$Q_P = \frac{P - P_0}{t}$$

Equação 6

Em que:

Q_P: Produtividade volumétrica de produto ($gL^{-1}h^{-1}$);

P: Concentração de produto final (g/L);

P_0: Concentração de produto inicial (g/L);

t: Tempo de conversão (h).

Por último, a eficiência de bioconversão foi calculada de acordo com a via metabólica de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol, considerando, por estequiometria, que 1 mol de etilenoglicol é capaz de produzir 1 mol de ácido glicólico. A produção teórica foi

determinada supondo que todo o substrato inicial foi consumido e convertido no produto de interesse. A Equação 7 apresenta o cálculo para eficiência de bioconversão.

$$EB = \frac{P - P_0}{P_T} \times 100$$

Equação 7

Em que:

EB: Eficiência de bioconversão (%);

P: Concentração de produto final (g/L);

P_0: Concentração de produto inicial (g/L);

P_T: Concentração de produto teórico (g/L), considerando 100% de consumo de substrato e 100% de conversão de substrato a produto.

4.4. REATIVAÇÃO DAS CÉLULAS LIOFILIZADAS E PREPARO DO ESTOQUE DAS BACTÉRIAS ACÉTICAS

Todas as cepas liofilizadas adquiridas foram entregues em ampolas de vidro devidamente vedadas. A abertura das ampolas para reativação de cada bactéria foi feita separadamente, em ambiente estéril, para que não houvesse riscos de contaminação cruzada, de modo a garantir a pureza de cada linhagem.

Cada ampola, inicialmente, teve sua superfície externa desinfetada com álcool etílico 70%. Então, o rompimento do vidro foi realizado por choque térmico, alternando-se passagens da ampola em fogo (bico de Bunsen) e em gotejamento de água deionizada estéril gelada. Após a abertura, 1 mL do meio de crescimento foi adicionado para reidratação e suspensão celular, por cerca de 10 minutos. O conteúdo foi transferido para Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultura líquido. As linhagens foram incubadas em Shaker (New Brunswick™ Innova® 44) em condições ideais de crescimento, determinadas pelos bancos de culturas.

Após observação de turvação, as culturas crescidas foram propagadas em frascos Erlenmeyer de volume nominal de 500 mL e volume reacional de 150 mL, contendo 10% (v/v) do meio de reativação (todo o conteúdo do frasco). Novamente, os frascos foram incubados em Shaker para crescimento e, quando a turvação foi observada, as células foram centrifugadas assepticamente, para recuperação, a 10000 rpm por 10 minutos a 10ºC. O

sobrenadante foi retirado e as células foram suspendidas em metade de seu volume inicial (75 mL), em meio caldo manitol complementado com 20% (v/v) de glicerol estéril, agente crioprotetor para congelamento e armazenamento das culturas. A nova suspensão foi distribuída em criotubos estéreis de 2 mL, estocados por 24 horas a -20ºC para adaptação e, posteriormente, a -80ºC. Para as etapas posteriores, o conteúdo de dois criotubos foi utilizado como inóculo.

Assim que a linhagem foi selecionada, um novo estoque, mais concentrado, foi preparado para a bactéria de interesse, *Gluconobacter oxydans* CCT 0052. As células foram ativadas em frascos Erlenmeyer de volume nominal de 500 mL e volume reacional de 200 mL. Após incubação em Shaker, a 200 rpm e 28ºC por 16 horas, o conteúdo de 3 frascos (600 mL) foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e suspendido em 100 mL de meio de cultivo complementado com 20% (v/v) de glicerol estéril. A partir de então, apenas um criotubo passou a ser utilizado como inóculo.

4.5. PREPARO E COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO

O meio de hidratação, manutenção e crescimento das bactérias de ácido acético utilizadas neste trabalho foi o meio recomendado pelos bancos da Fundação André Tosello e da Fundação Oswaldo Cruz, além dos bancos internacionais *American Type Culture Collection* (ATCC) e *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) e está apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Composição do meio de crescimento e manutenção recomendado para bactérias de ácido acético

Componente	Concentração
D-Manitol	25 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
Peptona	3 g/L

Em cada preparo, os componentes foram pesados em balança semi-analítica e dissolvidos em água deionizada. Todos os meios, após solubilização completa, foram transferidos para recipientes apropriados (Erlenmeyer e frascos de penicilina), fechados com tampões espumados, cobertos com papel jornal ou alumínio e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121ºC (1 atm).

A agitação do Shaker foi mantida em 200 rpm para todas as culturas. As temperaturas de incubação foram variadas de acordo com as recomendações de crescimento para cada

linhagem a partir do banco de cultura de obtenção das mesmas e estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8: Temperatura de incubação para cada microrganismo de acordo com o banco de cultura de origem

Microrganismo	Temperatura
Acetobacter aceti INCQS 00206	26ºC
Gluconobacter oxydans subsp. *suboxydans* CCT 0174	28ºC
Gluconobacter oxydans CCT 0552	28ºC
Gluconoacetobacter xylinus CCT 0064	30ºC

4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICROBIANO

Da Tabela 8, é possível observar que as temperaturas de incubação variam entre 26ºC e 30ºC a depender do microrganismo analisado. A fim de avaliar o efeito da temperatura no crescimento microbiano, células das quatro bactérias estudadas foram ativadas em Shaker por 24 horas sob agitação de 200 rpm a 26ºC, 28ºC e 30ºC.

Os ensaios foram realizados em duplicata em frascos de penicilina de 50 mL contendo 20 mL de meio de crescimento. O inóculo utilizado, neste caso, foi de 700 µL do conteúdo do criotubo. Alíquotas foram retiradas nos pontos inicial e final (0h e 24h) para análise de células por espectrofotometria a 600 nm.

Partindo-se de mesmas concentrações iniciais, verificadas pelas primeiras amostragens, as concentrações celulares finais foram avaliadas estatisticamente no *software* STATISTICA, versão 8.0 (STATSOFT, Inc.).

4.7. ATIVAÇÃO E PROPAGAÇÃO DAS LINHAGENS ESTUDADAS

4.7.1. Análise da Ativação Celular em D-Manitol e em Etilenoglicol

Para ativação dos microrganismos utilizados neste trabalho, optou-se por estudar o comportamento cinético de todos na presença de D-manitol, fonte de carbono original do meio de crescimento, e de etilenoglicol, substrato empregado no processo de bioconversão.

Os meios foram preparados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de volume reacional com a fonte de carbono em concentração inicial de 25 g/L, suplementada com extrato de levedura e peptona, como descrito na Tabela 7. Os cultivos foram realizados em duplicata e mantidos a 28ºC e 200 rpm em agitador Shaker. Alíquotas de 1 mL foram

retiradas em intervalos de tempo pré-determinados (a cada 4 horas) para análise de células e etilenoglicol, como especificado no item 4.2.3. Ao meio de ativação, adicionou-se o conteúdo de dois criotubos como inóculo.

4.7.2. Análise da Propagação Celular em D-Manitol e em Etilenoglicol

A propagação das cepas estudadas foi analisada, mais uma vez, em presença de D-manitol e de etilenoglicol, em concentrações de 25 g/L. As condições empregadas foram similares àquelas da etapa de ativação celular (frascos Erlenmeyer de volume nominal de 500 mL contendo 200 mL de meio a 28ºC e 200 rpm em Shaker). O inóculo aplicado para avaliação cinética de propagação celular, tanto em D-manitol quanto em etilenoglicol, foi de 10% (v/v) do cultivo de ativação contendo D-manitol como fonte exclusiva de carbono. O tempo de ativação foi variado de acordo com a linhagem, sendo de 28 horas para *A. aceti*, 12 horas para *G. oxydans* e *G. oxydans* subsp. *suboxydans* e 16 horas para *Ga. xylinus*. Os cultivos também foram realizados em duplicata, com retirada de amostras de 1 mL a cada 4 horas para análise de células e de etilenoglicol.

4.7.3. Ativação e Propagação dos Microrganismos para o Estudo da Bioconversão de Etilenoglicol a Ácido Glicólico

Todos os ensaios de bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico realizados no presente trabalho foram conduzidos com células crescidas, tanto em etapa de ativação quanto de propagação, em presença de D-manitol (25 g/L) como fonte exclusiva de carbono. O crescimento microbiano foi realizado em frascos Erlenmeyer de volume nominal de 500 mL e volume reacional de 200 mL em Shaker a 28ºC e 200 rpm.

Para os ensaios do item 4.8, as células dos diferentes microrganismos foram apenas ativadas até metade da fase exponencial de crescimento, por tempo variado de acordo com a linhagem, sendo de 28 horas para *A. aceti*, 12 horas para *G. oxydans* e *G. oxydans* subsp. *suboxydans* e 16 horas para *Ga. xylinus*. Para os ensaios seguintes, já com a bactéria selecionada (*Gluconobacter oxydans* CCT 0552), as células foram ativadas e propagadas por 12 horas e 16 horas, respectivamente.

Após o tempo necessário de cultivo, o meio foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, retirado e as células foram suspendidas nos meios de bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico. A fim de elevar a taxa de consumo de

etilenoglicol e de produção de ácido glicólico, o inóculo foi concentrado em especificações relatadas em cada uma das seções a seguir.

4.8. ESTUDO DA BIOCONVERSÃO DE ETILENOGLICOL A ÁCIDO GLICÓLICO POR BACTÉRIAS ACÉTICAS

O estudo comparativo de avaliação da capacidade de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol pelas bactérias acéticas aqui estudadas foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio reacional.

Os experimentos foram conduzidos em Shaker a 28ºC e 200 rpm, com pH inicial 6, alcançado por tamponamento com fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4, 136,086 g/mol) e fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4, 174,2 g/mol) 0,1M. Para primeira avaliação, o pH 6 foi selecionado por ser próximo ao pH original do meio de crescimento e manutenção celular.

O processo de bioconversão foi conduzido por 72 horas, com retirada de alíquotas de 1 mL em intervalos de tempo estipulados previamente para análise de células, etilenoglicol e ácido glicólico. A concentração teórica inicial de substrato (etilenoglicol) empregada foi de 25 g/L em todos os experimentos. Suplementação de extrato de levedura e peptona foi adicionada ao meio em concentração semelhante àquela do meio de crescimento (5 g/L e 3 g/L, respectivamente). E, para que baixa concentração celular não fosse fator limitante, o inóculo utilizado em cada experimento foi de 5 g/L de células, conforme descrito no item 4.7.3. Para o ensaio contendo o microrganismo *Acetobacter aceti* INCQS 00206, inóculo de 3 g/L foi empregado. Para atingir tais concentrações celulares, utilizou-se o conteúdo de 400 mL do meio de ativação contendo D-manitol como fonte de carbono, em tempos variados de acordo com o microrganismo.

4.9. SELEÇÃO DA LINHAGEM DE MELHOR CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO

Com os perfis cinéticos de ativação e propagação celular e de bioconversão, realizou-se a seleção da linhagem de melhor crescimento e produção de ácido glicólico. Os parâmetros avaliados durante o processo de crescimento celular e de síntese de ácido glicólico, calculados conforme mostrado no item 4.3, estão listados na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros avaliados para seleção da linhagem

Crescimento celular	Produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol
Tempo de ativação/propagação	Concentração de ácido glicólico
Taxa específica de crescimento	Fator de rendimento $Y_{P/S}$
Tempo de duplicação	Produtividade volumétrica Q_P
Fator de rendimento $Y_{X/S}$	Redução percentual de substrato
Redução percentual de substrato	Eficiência de bioconversão

A partir de aqui, todos os experimentos foram conduzidos utilizando-se apenas uma das bactérias estudadas preliminarmente: *Gluconobacter oxydans* CCT 0552.

4.10. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração celular no processo de obtenção do produto de interesse a partir de etilenoglicol por *Gluconobacter oxydans* CCT 0552, foram realizados três experimentos, todos em duplicata, com diferentes concentrações celulares. Os meios foram preparados em frascos Erlenmeyer de volume nominal de 125 mL e volume reacional de 50 mL, contendo teoricamente 15 g/L de etilenoglicol e suplementação de extrato de levedura e peptona em concentrações de 5 g/L e 3 g/L, respectivamente. As condições foram ajustadas a 28ºC e 200 rpm em Shaker e pH inicial 6, mais uma vez alcançado por tamponamento com KH_2PO_4 e K_2HPO_4 0,1M. Amostras de 1 mL foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados por 50 horas para determinação de células, etilenoglicol e ácido glicólico.

O fator de interesse foi avaliado em três níveis, 1,02±0,00 g/L, 3,50±0,13 g/L e 6,16±0,88 g/L, os quais foram denominados baixa, média e alta concentração celular, respectivamente. As concentrações celulares foram alcançadas por centrifugação, nesta ordem, de 100 mL, 200 mL e 400 mL do meio de propagação em D-manitol.

4.11. AVALIAÇÃO DO pH NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

Para avaliar o efeito do pH na geração de ácido glicólico por *Gluconobacter oxydans* CCT 0552, concomitantemente aos testes de análise da concentração celular, foram realizados também três experimentos, todos em duplicata, com diferentes valores de pH inicial do meio. Os meios foram preparados em frascos Erlenmeyer de volume nominal de 125 mL e volume

reacional de 50 mL, contendo teoricamente 15 g/L de etilenoglicol e complemento de 5 g/L de extrato de levedura e 3 g/L peptona. As condições de bioconversão foram ajustadas a 28ºC e 200 rpm em Shaker. Amostras de 1 mL foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados por 50 horas para determinação de células, etilenoglicol e ácido glicólico. As concentrações celulares foram obtidas a partir de centrifugação de 100 mL do meio de propagação em D-manitol e variaram, nos ensaios, entre 0,8 e 1,6 g/L.

O fator de interesse foi avaliado em três níveis, pH inicial 5, 6 e 7, todos ajustados por tamponamento com fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4) 0,1M.

4.12. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE LEVEDURA E DA PEPTONA NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

Visando melhorar a produção de ácido glicólico e avaliar o efeito da suplementação de extrato de levedura e peptona no meio de bioconversão, realizou-se um planejamento fatorial de dois níveis e três fatores (2^3) com três repetições do ponto central, totalizando 11 experimentos. Os fatores avaliados na produção de ácido glicólico foram etilenoglicol, extrato de levedura e peptona. A variável de resposta mensurada foi a concentração de ácido glicólico (g/L) em 48 horas de processo.

Os experimentos foram conduzidos em Shaker a 28ºC e 200 rpm em frascos Erlenmeyer de 125 mL de volume nominal contendo 50 mL de volume reacional com pH inicial 7, ajustado com tampão de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4) 0,1M. Para garantir que o mesmo inóculo, de 2 g/L, fosse adicionado a todos os frascos, 1600 mL do meio de propagação foram centrifugados e as células foram suspendidas em 150 mL de tampão pH 7 (0,1 M) e, então, 10 mL foram pipetados aos frascos já contendo 40 mL de volume reacional. A quantificação de substrato e produto foi obtida por CLAE e a concentração celular por turbidimetria.

Os níveis do planejamento experimental são apresentados em valores reais e codificados na Tabela 10. Os valores codificados de -1, 0 e +1 representam, nesta ordem, os pontos de mínimo, central e de máximo. A matriz do planejamento em valores reais é apresentada na Tabela 11.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado no *software* STATISTICA, versão 8.0 (STATSOFT, Inc.).

Tabela 10: Fatores e níveis usados no planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central

Fator (g/L)	Ponto de Mínimo -1	Ponto Central 0	Ponto de Máximo +1
Etilenoglicol	10,0	15,0	20,0
Extrato de levedura	0,0	2,5	5,0
Peptona	0,0	1,5	3,0

Tabela 11: Matriz do planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central

Corrida	Etilenoglicol (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	Peptona (g/L)
1	10,0	0,0	0,0
2	20,0	0,0	0,0
3	10,0	5,0	0,0
4	20,0	5,0	0,0
5	10,0	0,0	3,0
6	20,0	0,0	3,0
7	10,0	5,0	3,0
8	20,0	5,0	3,0
9	15,0	2,5	1,5
10	15,0	2,5	1,5
11	15,0	2,5	1,5

4.13. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SUBSTRATO E DO PRODUTO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

A fim de investigar o efeito do substrato na produção de ácido glicólico pela bactéria *Gluconobacter oxydans* CCT 0552, foram realizados experimentos, por 72 horas, em frascos Erlenmeyer de volume nominal de 125 mL com 50 mL de volume reacional em diferentes concentrações de etilenoglicol: 0, 10 g/L, 25 g/L, 50 g/L, 75 g/L e 100 g/L. Ademais, para examinar o possível efeito inibitório do produto no meio de bioconversão, foram realizados experimentos em condições semelhantes com concentração de etilenoglicol de 10 g/L e adição de diferentes concentrações de ácido glicólico externo: 0, 25 g/L, 50 g/L e 100 g/L.

Todos os testes foram realizados em Shaker a 28ºC e 200 rpm e pH inicial 7, ajustado com tampão de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4) 0,2M. Nestes experimentos, diferentemente dos anteriores, optou-se por aumentar a molaridade da solução tampão, visto que as concentrações mais elevadas de etilenoglicol, em teoria, poderiam levar a uma maior produção de ácido, o que auxiliaria em uma maior diminuição do pH do meio, necessitando, assim, o uso de um meio tamponado mais forte.

Para garantir que o mesmo inóculo (2 g/L) fosse adicionado a todos os frascos, novamente 1600 mL do meio de propagação foram centrifugados e as células foram suspendidas em 150 mL de tampão pH 7 (0,2 M) e, então, 10 mL foram pipetados aos frascos já contendo 40 mL de volume reacional. Nestes ensaios, não houve adição de extrato de

levedura e peptona ao meio de bioconversão. Amostras foram retiradas em periodicidade estipulada previamente para quantificação de substrato e de produto por CLAE e de células por turbidimetria.

4.14. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR EM BATELADAS SEQUENCIAIS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

Com o objetivo de examinar a atividade celular e, consequentemente, a possibilidade de reutilização da bactéria *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 em bateladas sequenciais de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol, ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL de volume nominal contendo 50 mL de volume reacional.

Os experimentos foram realizados em duplicata em Shaker a 28ºC e 200 rpm e pH inicial 7, ajustado com tampão de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4) 0,1M. Inóculo de 2 g/L de células foi novamente adicionado ao meio de bioconversão contendo aproximadamente 10 g/L de etilenoglicol. Após 24 horas, as células, já em contato com etilenoglicol, foram novamente centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos e transferidas para um novo meio de produção, também contendo 10 g/L do substrato. Depois de mais 24 horas, o processo foi repetido, totalizando 72 horas de ensaio e três bateladas sequenciais. Alíquotas foram retiradas nos pontos iniciais e finais de cada batelada para análise de células, etilenoglicol e ácido glicólico e comparação da eficiência celular em cada etapa do processo.

4.15. AVALIAÇÃO DA FORMA DE CONDUÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

Com o propósito de comparar o processo de bioconversão em batelada e batelada alimentada para definir a melhor estratégia de condução, experimentos foram executados em frascos Erlenmeyer de 500 mL de volume nominal contendo 225 mL de volume reacional.

Os experimentos foram realizados em duplicata em Shaker a 28ºC e 200 rpm e pH inicial 7, ajustado com tampão de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4) 0,1M. Os ensaios foram conduzidos por 72 horas com retiradas de amostras em períodos pré-definidos para avaliação de células, etilenoglicol e ácido glicólico. O processo

em batelada foi realizado com concentração inicial de etilenoglicol de 30 g/L, enquanto o processo em batelada alimentada foi realizado com concentração inicial de etilenoglicol de 10 g/L com duas alimentações de 10 g/L em 24 e 48 horas, totalizando a mesma concentração adicionada na batelada simples.

Inicialmente, as células foram ativadas e propagadas em meio contendo D-manitol, em condições já relatadas. O conteúdo de 200 mL de meio de propagação foi centrifugado e as células foram, então, suspendidas no meio de bioconversão. Para testar ainda a possibilidade de condução do processo de produção de ácido glicólico no mesmo frasco utilizado para o crescimento celular, com o intuito de avaliar a economicidade do processo, os mesmos ensaios foram realizados no mesmo frasco Erlenmeyer utilizado para propagação celular, apenas com adição de etilenoglicol e solução tampão de pH inicial 7, excluindo a etapa de centrifugação celular. Em todos os experimentos, o inóculo da bioconversão foi de aproximadamente 1 g/L.

4.16. CRESCIMENTO DA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 E PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL EM BIORREATOR INSTRUMENTADO

A fim de avaliar tanto o crescimento da bactéria *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 quanto a produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol em condições controladas de pH, temperatura e aeração, ensaios de propagação celular e bioconversão foram realizados em biorreator instrumentado e pneumaticamente agitado do tipo coluna de bolhas (Figura 21), com volume nominal de 10 L e relação altura: diâmetro 6:1 (Electrolab Biotech Ltd.).

A ativação microbiana foi realizada em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de volume reacional. Os cultivos foram mantidos a 28ºC e 200 rpm em Shaker por aproximadamente 16 horas. Em seguida, a propagação celular foi conduzida em biorreator com volume reacional de 9 L e inóculo de 10% (v/v) do meio de ativação. Ambas as etapas de crescimento celular foram realizadas em meio contendo 25 g/L de D-manitol, 5 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de peptona. Alíquotas foram retiradas a cada cinco horas para análise microbiana e, após 20 horas, as células, já em fase estacionária, foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos e suspendidas no meio de bioconversão. A bioconversão foi, então, conduzida, também em biorreator, com volume reacional de 5 L, para elevar a concentração celular obtida na fase de propagação.

O ensaio de bioconversão foi executado em meio tamponado com KH_2PO_4 e K_2HPO_4 0,1 M em pH 5, contendo as células suspendidas e o substrato, etilenoglicol. O experimento foi realizado em batelada alimentada, com adição do substrato de 10 em 10 g/L, por 48 horas. Amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados para avaliação de células, de ácido glicólico e de etilenoglicol simultaneamente à realização do experimento. As considerações necessárias foram realizadas para normalizar o volume perdido do biorreator durante o processo de bioconversão.

Em ambas as etapas operadas no biorreator instrumentado, a temperatura do processo foi mantida em 28ºC, a aeração foi ajustada de modo a garantir que o oxigênio dissolvido no meio estivesse sempre 30% acima da saturação e o pH foi controlado automaticamente no valor de 5 com adição de NaOH 8M.

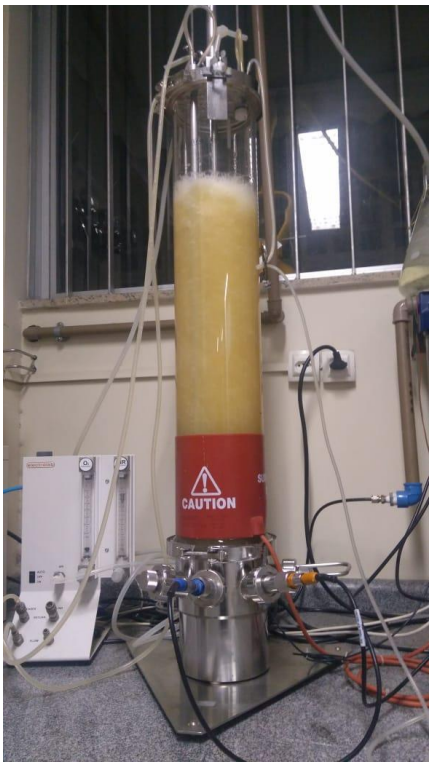

Figura 21: Biorreator instrumentado e agitado pneumaticamente com volume nominal de 10L e relação altura: diâmetro 6:1 (Electrolab Biotech Ltd.) utilizado nos experimentos

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente capítulo, os resultados obtidos com o decorrer do projeto serão apresentados. A linhagem de melhor crescimento celular e maior produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol foi selecionada. Em continuidade, experimentos de avaliação de fatores relevantes ao processo de bioconversão foram, então, conduzidos. Análises de reutilização celular e forma de condução do processo foram realizadas em frascos agitados e, finalmente, ensaios de crescimento celular e de produção de ácido glicólico foram executados em biorreator instrumentado de agitação pneumática do tipo coluna de bolhas.

A seguir, as discussões pertinentes a cada tópico serão devidamente abordadas.

5.1. ASPECTO MICROSCÓPICO DAS BACTÉRIAS ACÉTICAS

A Figura 22 apresenta a microscopia ótica das células das bactérias de ácido acético estudadas, coradas pela metodologia de Gram. É possível confirmar pelo aspecto rosáceo que se trata de bactérias Gram-negativas, caracterizadas pela estrutura de sua parede celular, composta por uma ou poucas camadas de peptideoglicana e uma membrana externa de lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e fosfolipídeos (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012). Além disso, as imagens permitem ainda avaliar morfologicamente que as linhagens aqui estudadas possuem, de fato, estrutura de bacilos.

Ao final de cada etapa, a técnica de Gram foi utilizada para comprovar a ausência de contaminação no crescimento microbiano.

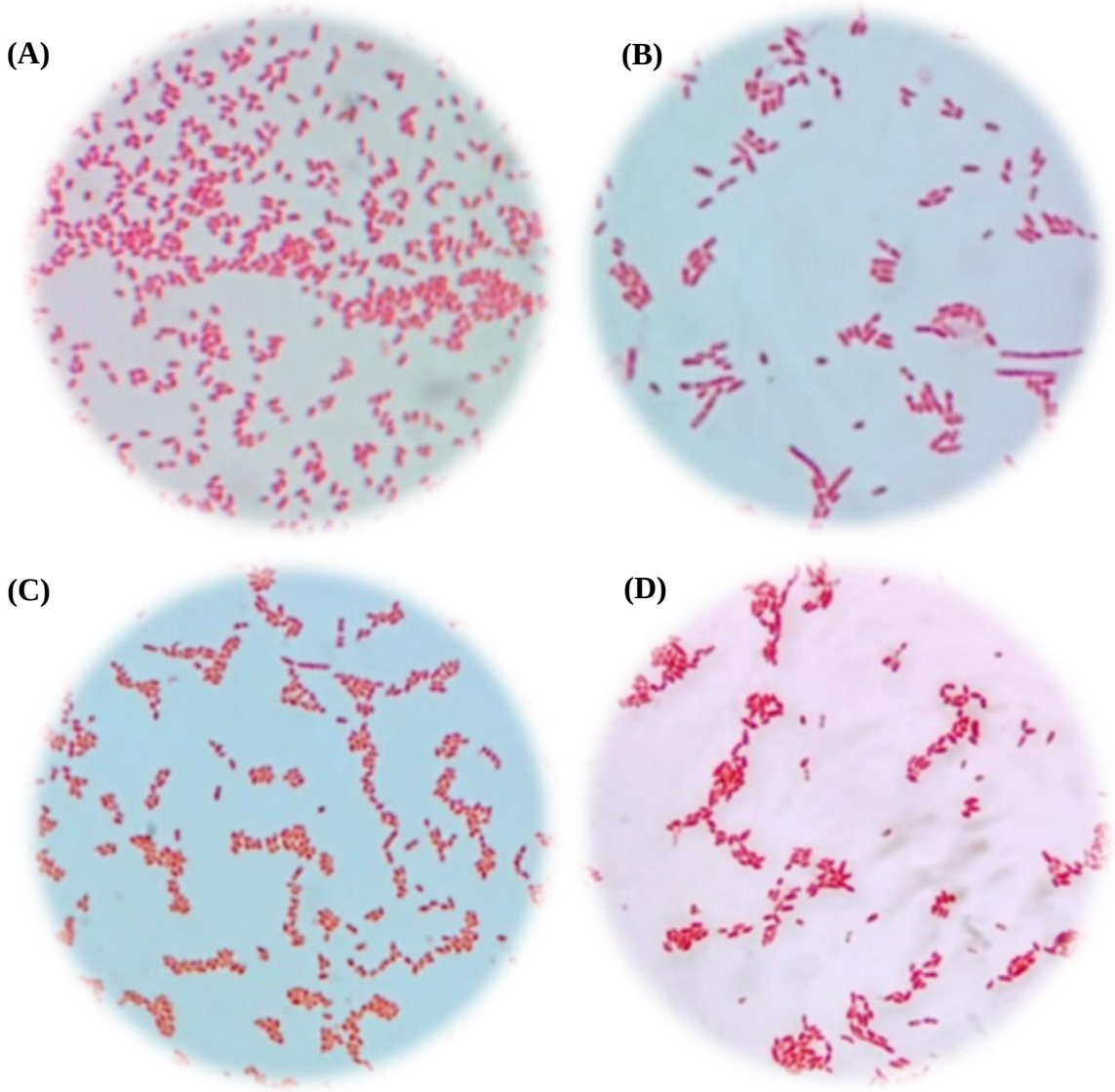

Figura 22: Microscopia ótica de células de acetobactérias coradas pela técnica de Gram
(A) *Acetobacter aceti* INCQS 00206, **(B)** *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174, **(C)** *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 e **(D)** *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064.

5.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO MICROBIANO

A Tabela 12 apresenta o crescimento em 24 horas das quatro cepas investigadas quando expostas a diferentes temperaturas, sob agitação de 200 rpm, partindo-se da mesma concentração celular inicial para cada uma delas.

Nota-se, de antemão, que, diferentemente das temperaturas recomendadas pelos bancos de origem dos microrganismos aqui avaliados, a bactéria *Acetobacter aceti* INCQS 00206 apresenta maior crescimento a 30ºC, enquanto as bactérias *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174 e *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 desenvolvem-se melhor a

26ºC. A temperatura não parece influenciar significativamente o crescimento da linhagem *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064, na faixa avaliada.

Tabela 12: Crescimento das bactérias acéticas em diferentes temperaturas (26ºC, 28ºC e 30ºC) em meio contendo D-manitol (25 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L), por 24h, em Shaker a 200 rpm

Microrganismo	Temperatura (ºC)	Biomassa celular inicial (g/L)	Biomassa celular final (g/L)
A. aceti INCQS 00206	26	0,01±0,00	0,62±0,01
	28		0,74±0,00
	30		0,79±0,00
G. oxydans subsp. *suboxydans* CCT 0174	26	0,05±0,00	1,35±0,02
	28		1,18±0,02
	30		1,01±0,00
G. oxydans CCT 0552	26	0,02±0,00	1,63±0,02
	28		1,58±0,00
	30		1,39±0,01
Ga. xylinus CCT 0064	26	0,02±0,00	0,97±0,04
	28		0,97±0,00
	30		0,96±0,01

Para melhor avaliação estatística, os dados obtidos foram aplicados no *software* STATISTICA, versão 8.0 (STATSOFT, Inc.). Como a análise se vincula a um só fator (temperatura) em 3 níveis (26ºC, 28ºC e 30ºC) com duas repetições de cada um, optou-se por utilizar a abordagem de Análise de Variância Univariável (ANOVA). A significância estatística foi determinada pelo valor de p menor que 0,05, considerando intervalo de confiança de 95%.

Na faixa avaliada (26ºC a 30ºC), a temperatura mostrou-se estatisticamente significativa no crescimento celular das seguintes linhagens: *Acetobacter aceti* INCQS 00206 (valor de p = 0,004387), *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174 (valor de p = 0,006136) e *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 (valor de p = 0,004971). Por outro lado, o crescimento da bactéria *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064 é, de fato, semelhante estatisticamente em qualquer uma das temperaturas avaliadas (valor de p = 0,976991).

A Figura 23 exibe a influência da temperatura na concentração das quatro acetobactérias em 24 horas de cultivo.

Como já discutido pela Tabela 12, a Figura 23 ressalta o maior crescimento da linhagem *Acetobacter aceti* INCQS 00206 a 30ºC e das bactérias do gênero *Gluconobacter* a 26ºC. Para apenas uma delas (*Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174), entretanto, o crescimento é consideravelmente divergente daquele observado na temperatura intermediária, de 28ºC. Ainda assim, para que o estudo comparativo de crescimento das bactérias acéticas pudesse ser mais bem elucidado, optou-se por conduzir todo o processo de

crescimento das quatro linhagens, além dos estudos de bioconversão, em temperatura de 28ºC.

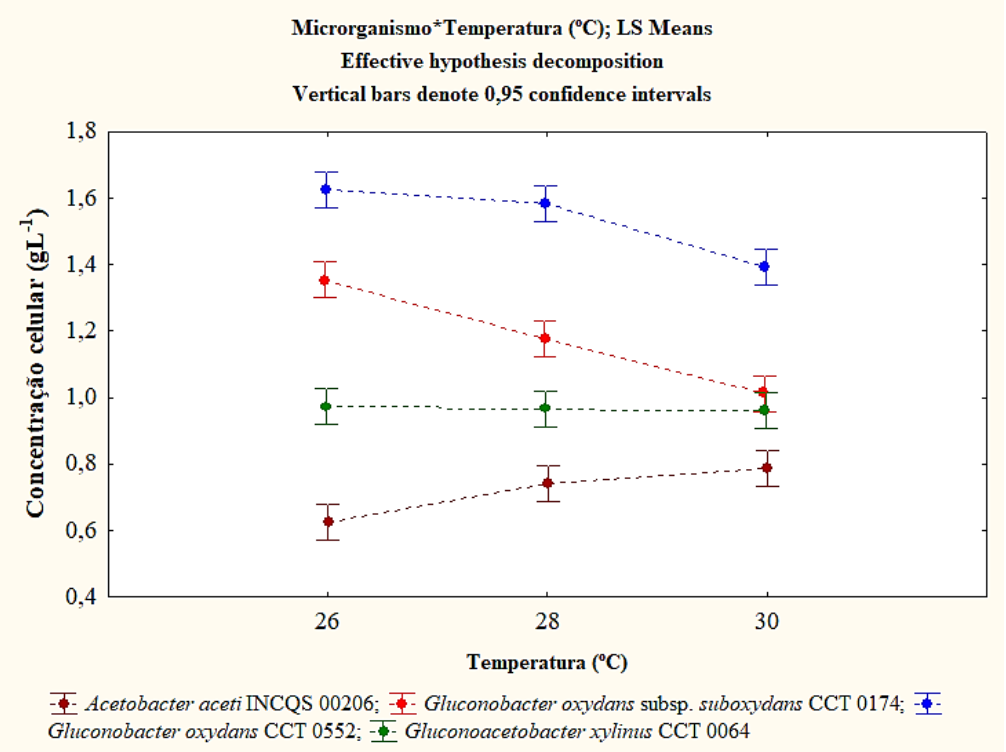

Figura 23: Crescimento das bactérias acéticas em diferentes temperaturas (26ºC, 28ºC e 30ºC) em meio contendo D-manitol (25 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L), por 24h, em Shaker a 200 rpm

5.3. CRESCIMENTO MICROBIANO: AVALIAÇÃO DOS PERFIS CINÉTICOS DE ATIVAÇÃO E PROPAGAÇÃO DAS BACTÉRIAS ACÉTICAS ESTUDADAS

O levantamento dos perfis cinéticos de ativação e propagação das linhagens aqui examinadas foi realizado, em frascos, em meios contendo D-manitol ou etilenoglicol como única fonte de carbono. D-manitol foi utilizado por se tratar de fonte de carbono não repressora e de recomendação dos bancos de microrganismos CCT e INCQS. Já a incorporação do etilenoglicol em substituição ao D-manitol como fonte de carbono no meio de crescimento celular ocorreu a fim de se avaliar a multiplicação da biomassa microbiana em presença do substrato utilizado no processo de bioconversão, propriamente dito.

Os perfis cinéticos obtidos de ativação em D-manitol e em etilenoglicol são apresentados na Figura 24 e na Figura 25, respectivamente. Já a Tabela 13 e a Tabela 14 mostram os parâmetros associados ao crescimento microbiano na etapa de ativação em D-manitol e em etilenoglicol.

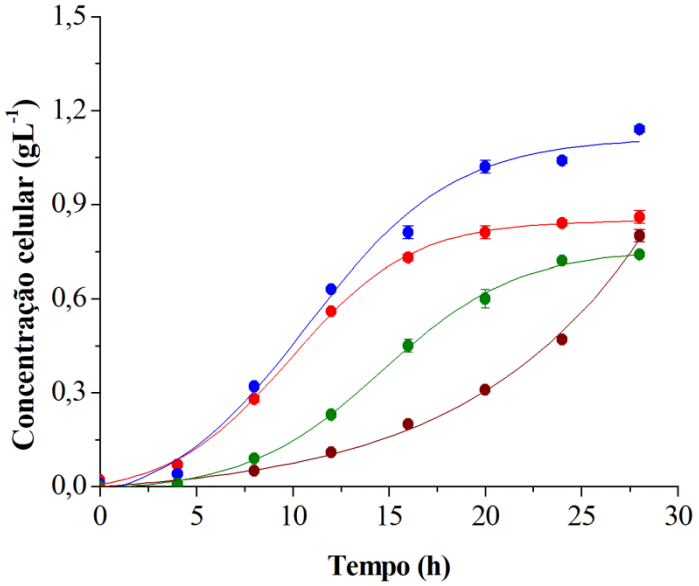

Figura 24: Perfil cinético de ativação das bactérias acéticas em D-manitol (25 g/L) como única fonte de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm
Legenda: ● *Acetobacter aceti* INCQS 00206; ● *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174; ● *Gluconobacter oxydans* CCT 0552; ● *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064.

Tabela 13: Parâmetros associados ao crescimento microbiano na etapa de ativação em presença de D-manitol (25 g/L) como fonte única de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm

Linhagem	Ativação (h)	μ (h^{-1})	t_d (h)
A. aceti INCQS 00206	28	0,102	6,8
G. oxydans subsp. *suboxydans* CCT 0174	12	0,147	4,7
G. oxydans CCT 0552	12	0,189	3,7
Ga. xylinus CCT 0064	16	0,129	5,4

μ: taxa específica de crescimento e t_d: tempo de duplicação

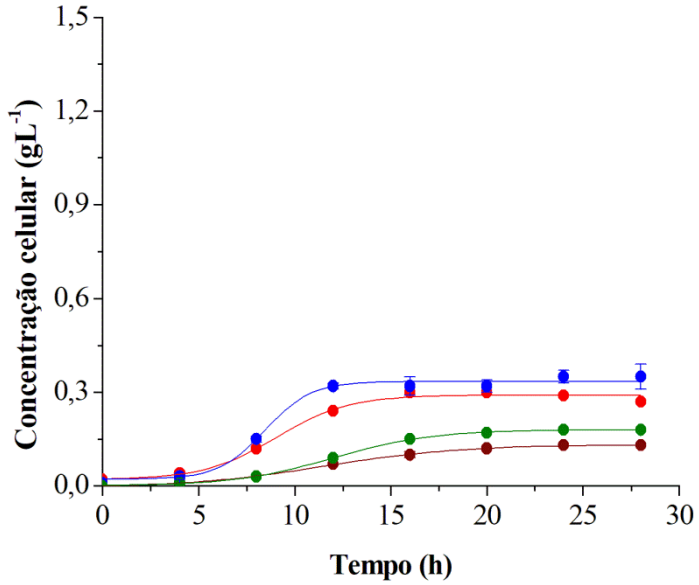

Figura 25: Perfil cinético de ativação das bactérias acéticas em etilenoglicol (25 g/L) como única fonte de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm
Legenda: ● *Acetobacter aceti* INCQS 00206; ● *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174; ● *Gluconobacter oxydans* CCT 0552; ● *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064.

Tabela 14: Parâmetros associados ao crescimento microbiano na etapa de ativação em presença de etilenoglicol (25 g/L) como fonte única de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm

Linhagem	Ativação (h)	μ (h^{-1})	t_d (h)	RPS (%)	$Y_{X/S}$ (g/g)
A. aceti INCQS 00206	12	0,134	5,2	3,55%	0,16
G. oxydans subsp. *suboxydans* CCT 0174	10	0,164	4,2	11,20%	0,10
G. oxydans CCT 0552	8	0,307	2,2	18,25%	0,08
Ga. xylinus CCT 0064	12	0,156	4,4	17,90%	0,04

μ: taxa específica de crescimento, t_d: tempo de duplicação, RPS: redução percentual de substrato e $Y_{X/S}$: rendimento de células em relação ao substrato consumido.

Primeiramente, constata-se que, independentemente da fonte de carbono escolhida, a fase de aclimatação celular (fase Lag) é de aproximadamente 4 horas para todas as situações, exceto para a ativação em D-manitol da linhagem *Acetobacter aceti* INCQS 00206. Ao listar as principais características de acetobactérias, YAMADA (2016) e GLUILLAMÓN & MAS (2017) apontam que bactérias do gênero *Acetobacter* crescem muito lentamente em meio contendo D-manitol (Tabela 6). De fato, o desenvolvimento da biomassa microbiana da cepa *Acetobacter aceti* INCQS 00206 ocorreu mais lentamente. Entretanto, em 28h, como se pode ver na Figura 24, a concentração celular mostra-se comparável a das demais linhagens.

Da Figura 24 e da Figura 25, pode-se notar que o maior crescimento em ambas as fontes de carbono é referente à bactéria *Gluconobacter oxydans* CCT 0552. Em presença de etilenoglicol, esta é a que apresenta a maior taxa específica de crescimento. Entretanto, nenhuma das bactérias foi capaz de consumir integralmente o etilenoglicol disponível no meio, sendo a maior redução percentual de substrato, também pertencente à bactéria *Gluconobacter oxydans* CCT 0552, de apenas 18,25%.

Na etapa de ativação celular, todas as bactérias aqui estudadas apresentaram crescimento superior em presença de D-manitol. Por conta disso, a etapa de propagação celular foi conduzida após ativação em D-manitol como fonte de carbono exclusiva. Ademais, apesar da verificação anterior relacionada ao uso de etilenoglicol, o crescimento nesta fonte em etapa de propagação ainda foi avaliado para observar como as células se desempenhariam em presença de etilenoglicol após crescimento preliminar em D-manitol.

Os perfis cinéticos obtidos de propagação em D-manitol e em etilenoglicol são apresentados na Figura 26 e na Figura 27, respectivamente. A Tabela 15 e a Tabela 16 revelam os parâmetros associados ao crescimento microbiano na etapa de propagação em D-manitol e em etilenoglicol.

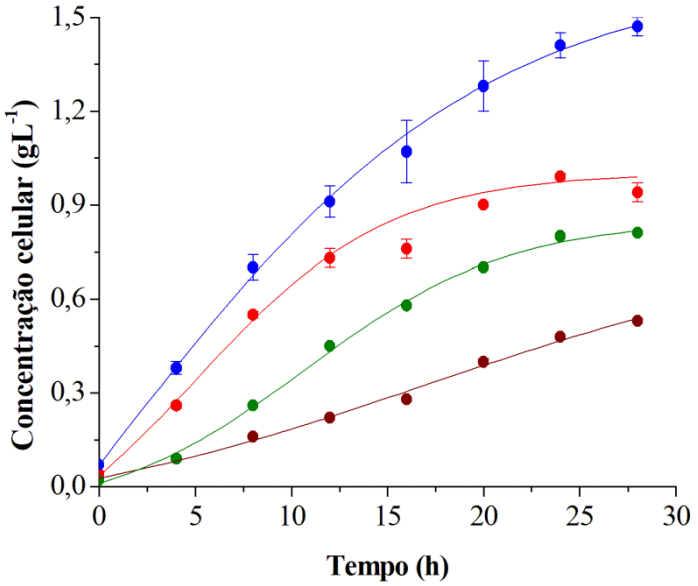

Figura 26: Perfil cinético de propagação das bactérias acéticas em D-manitol (25 g/L) como única fonte de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm. Inóculo: 10% (v/v) do cultivo de ativação em D-manitol (25 g/L) Legenda: ● *Acetobacter aceti* INCQS 00206; ● *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174; ● *Gluconobacter oxydans* CCT 0552; ● *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064

Tabela 15: Parâmetros associados ao crescimento microbiano na etapa de propagação em presença de D-manitol (25 g/L) como fonte única de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm

Linhagem	Propagação (h)	μ (h^{-1})	t_d (h)
A. aceti INCQS 00206	16	0,100	6,9
G. oxydans subsp. *suboxydans* CCT 0174	8	0,136	5,1
G. oxydans CCT 0552	12	0,130	5,3
Ga. xylinus CCT 0064	12	0,101	6,8

μ: taxa específica de crescimento e t_d: tempo de duplicação

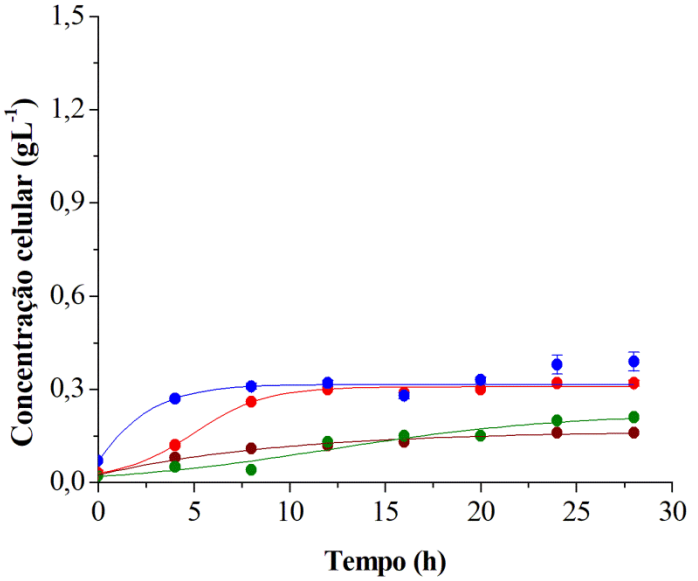

Figura 27: Perfil cinético de propagação das bactérias de ácido acético em etilenoglicol (25 g/L) como única fonte de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm. Inóculo: 10% (v/v) do cultivo de ativação em D-manitol (25 g/L) Legenda: ● *Acetobacter aceti* INCQS 00206; ● *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174; ● *Gluconobacter oxydans* CCT 0552; ● *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064

Tabela 16: Parâmetros associados ao crescimento microbiano na etapa de propagação em presença de etilenoglicol (25 g/L) como fonte única de carbono, em frascos a 28ºC e 200 rpm

Linhagem	Propagação (h)	μ (h^{-1})	t_d (h)	RPS (%)	$Y_{X/S}$ (g/g)
A. aceti INCQS 00206	14	0,067	10,4	10,34%	0,06
G. oxydans subsp. *suboxydans* CCT 0174	6	0,195	3,5	9,35%	0,14
G. oxydans CCT 0552	4	0,196	3,5	22,23%	0,06
Ga. xylinus CCT 0064	12	0,080	8,7	13,61%	0,06

μ: taxa específica de crescimento, t_d: tempo de duplicação, RPS: redução percentual de substrato e $Y_{X/S}$: rendimento de células em relação ao substrato consumido.

Na etapa de propagação celular, é possível notar que o tempo necessário para atingir a fase exponencial de crescimento é inferior àquele da etapa de ativação. Observa-se, inclusive, a ausência de fase Lag, o que se deve ao fato de as células já terem sido previamente ativadas.

Mesmo assim, é interessante analisar que, ainda que as células não tenham tido contato anterior com etilenoglicol, a fase de aclimatação, nesta fonte de carbono, também foi inexistente. Tal observação deve-se, provavelmente, ao fato de que as enzimas responsáveis por assimilar etilenoglicol são inespecíficas e atuam em ampla faixa de substrato (AMEYAMA & ADACHI, 1982a e 1982b). Logo, apresentam atividade antes do contato com esta fonte de carbono, o que faz com que sua incorporação seja imediata, tratando-se, portanto, de enzimas constitutivas.

Da Figura 26 e da Figura 27, novamente, percebe-se, tal como para a etapa de ativação celular, que o maior crescimento, tanto em D-manitol como em etilenoglicol, se refere à *Gluconobacter oxydans* CCT 0552. Além disso, esta foi a única linhagem cujo crescimento em etapa de propagação em D-manitol foi superior àquele já notado em etapa anterior, de ativação celular.

Em relação à propagação em etilenoglicol, a concentração celular alcançada foi similar àquela da fase de ativação para todas as acetobactérias. Repetidamente, o consumo de substrato foi reduzido, sendo a maior redução percentual, referente à bactéria *Gluconobacter oxydans* CCT 0552, de somente 22,23%.

Em ambas as etapas, o crescimento mostrou-se superior em presença de D-manitol. Possivelmente, tal fonte de carbono é assimilada, por bactérias acéticas, mais satisfatoriamente que o substrato da bioconversão, etilenoglicol. Além disso, a redução do pH do meio devido à formação de ácido glicólico, constatada por cromatografia líquida de alta eficiência, pode também ter influenciado negativamente no desenvolvimento celular em etilenoglicol. Apesar de serem acidófilas, o decaimento intenso do pH, devido à privação de agentes tamponantes no meio de crescimento, pode ter afetado a manutenção de atividades vitais e, consequentemente, o desenvolvimento das bactérias acéticas analisadas.

Ademais, como a formação de ácido glicólico foi detectada no meio de crescimento celular, fica claro que apenas parte da fonte de carbono consumida foi convertida a biomassa celular. É possível ainda que o crescimento em etilenoglicol como fonte exclusiva de carbono, tanto em etapa de ativação quanto de propagação, seja devido à presença de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) no meio de cultura. Mas, como não foram realizados ensaios controle em meio contendo apenas extrato de levedura e peptona, não se pode afirmar a qual componente do meio o crescimento é cabido.

Em consequência dos resultados aqui obtidos, todos os ensaios de bioconversão realizados no presente trabalho foram conduzidos com células crescidas, tanto em etapa de ativação quanto de propagação, em presença de D-manitol como fonte única de carbono. Logo, o primeiro contato com o substrato etilenoglicol era feito diretamente na etapa de bioconversão. Além disso, como o crescimento celular foi separado da produção de ácido glicólico, as células obtidas no primeiro estágio eram centrifugadas e concentradas no meio de bioconversão a fim de elevar a taxa de consumo de etilenoglicol e de produção de ácido glicólico.

Por fim, é importante avaliar que, apesar de ter sido consideravelmente maior em D-manitol, o crescimento de bactérias acéticas é notavelmente limitado.

5.4. ESTUDO DA BIOCONVERSÃO DE ETILENOGLICOL A ÁCIDO GLICÓLICO POR BACTÉRIAS ACÉTICAS

Os ensaios de bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico por bactérias acéticas foram conduzidos em frascos, com concentração real de substrato inicial variando entre 21 e 23 g/L. Os perfis de consumo de etilenoglicol e produção de ácido glicólico são apresentados na Figura 28, Figura 29, Figura 30 e Figura 31. Os parâmetros associados ao processo são sumarizados na Tabela 17.

Todas as acetobactérias foram capazes de sintetizar ácido glicólico em menor ou maior quantidade. O resultado positivo é observado em virtude da presença de enzimas, ligadas à membrana citoplasmática, que são responsáveis pelas desidrogenações alcoólica e aldeídica envolvidas no metabolismo oxidativo do etilenoglicol: álcool desidrogenase mADH e aldeído desidrogenase mALDH, respectivamente (WEI *et al.*, 2012). Deste modo, corrobora-se a aptidão natural de bactérias acéticas em converter etilenoglicol a ácido glicólico.

Os resultados da bioconversão mostraram ainda que o ácido glicólico produzido não foi consumido posteriormente pelas acetobactérias, o que indica que o ácido de interesse é o

produto final da bioconversão e confirma a capacidade de bactérias acéticas de oxidar incompletamente diversos substratos, incluindo o etilenoglicol (DEPPENMEIER, HOFFMEISTER & PRUST, 2002; DEPPENMEIER & EHRENREICH, 2009).

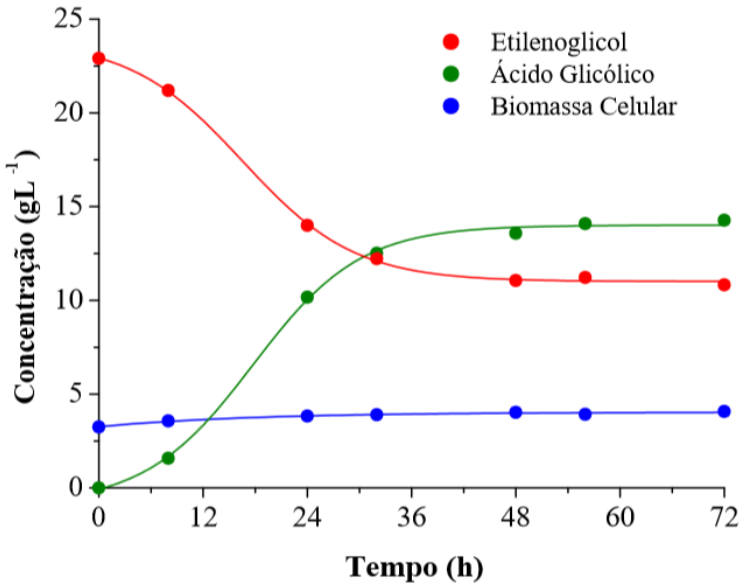

Figura 28: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (23 g/L) e produção de ácido glicólico por ***Acetobacter aceti* INCQS 00206**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com inóculo de 3 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L)

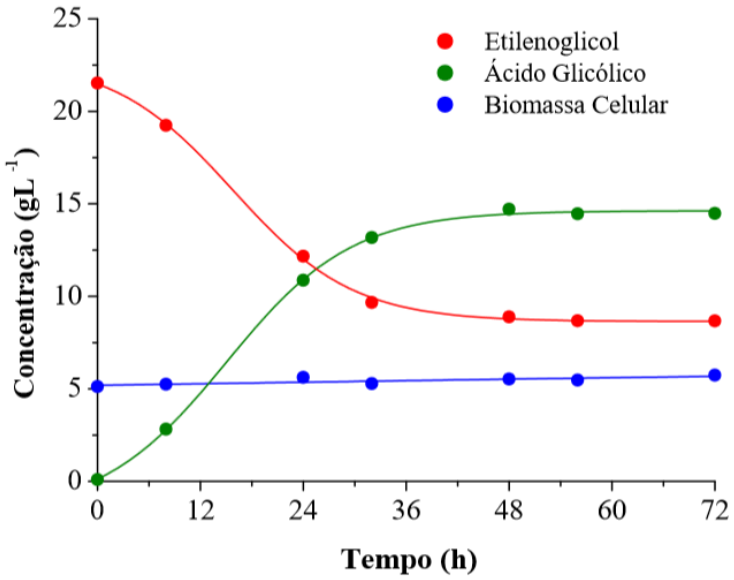

Figura 29: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (22 g/L) e produção de ácido glicólico por ***Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com inóculo de 5 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L)

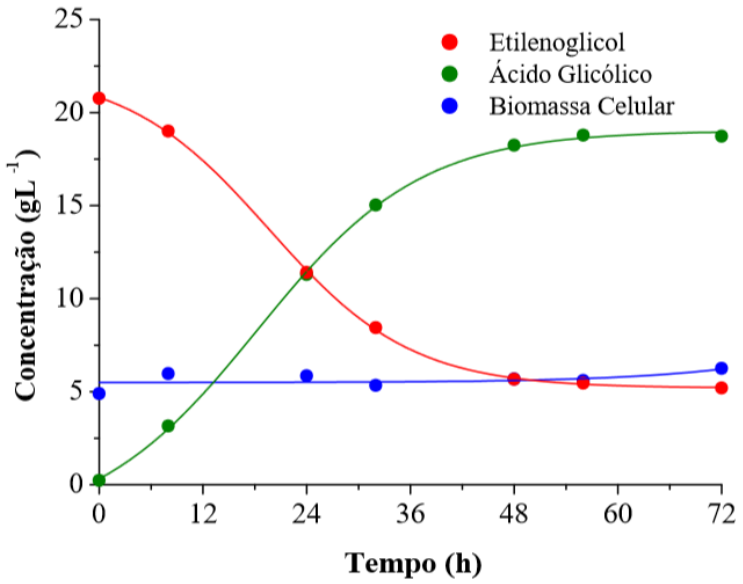

Figura 30: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (21 g/L) e produção de ácido glicólico por ***Gluconobacter oxydans* CCT 0552**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com inóculo de 5 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L)

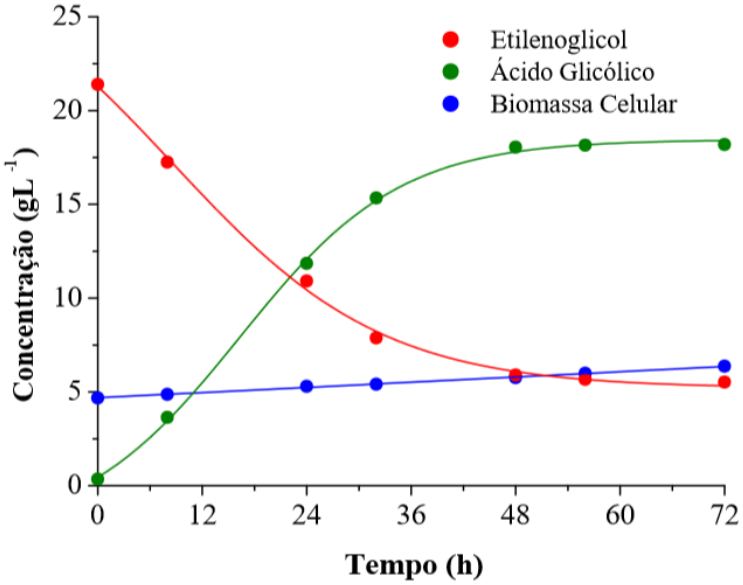

Figura 31: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (21 g/L) e produção de ácido glicólico por ***Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com inóculo de 5 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L)

Tabela 17: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por bactérias de ácido acético, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, por 72 horas

Linhagem	AG (g/L)	Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	EB (%)
A. aceti INCQS 00206	14,27	0,20	1,18	53%	51%
G. oxydans subsp. *suboxydans* CCT 0174	14,48	0,20	1,12	60%	55%
G. oxydans CCT 0552	18,73	0,26	1,19	75%	73%
Ga. xylinus CCT 0064	18,19	0,25	1,12	74%	68%

AG: ácido glicólico produzido, Q_P: produtividade volumétrica, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato consumido, RPS: redução percentual de substrato e EB: eficiência de bioconversão.

Pela Tabela 17, observa-se que duas linhagens destacam-se na produção do ácido orgânico: *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 e *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064. Em torno de 18 g/L de ácido glicólico foram gerados na etapa de bioconversão por ambas as bactérias, sendo os resultados, portanto, comparáveis.

Com base nos parâmetros calculados, é interessante analisar que bactérias diferenciadas apenas pela subespécie (*Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* CCT 0174 e *Gluconobacter oxydans* CCT 0552) assimilam etilenoglicol e, consequentemente, produzem ácido glicólico, em quantidades variadas. Ou seja, para avaliar o potencial produtor de bactérias acéticas é necessário investigar acuradamente cada uma delas. Não se pode antecipar apenas pelo gênero e, até mesmo pela espécie, qual dispõe de maior habilidade de conversão.

Além disso, uma reflexão interessante refere-se ao aumento do consumo de substrato quando comparado às etapas de ativação e propagação celular. O aumento significativo da redução percentual de substrato no processo de bioconversão pode ser justificado por dois fatores: o aumento da concentração do inóculo por meio de centrifugação das células e o ajuste inicial do pH do meio reacional por tamponamento. É provável que ambos influenciem, em maior ou menor parcela, no consumo de etilenoglicol e, por conseguinte, na geração do ácido de interesse.

É importante mencionar que foi observado um decaimento do pH do meio ao longo da bioconversão e que este se manteve entre 3 e 4 ao final das 72 horas. Obviamente, tal fato se deve à produção de ácido glicólico. Entretanto, salienta que o tampão utilizado não foi capaz de manter o pH do meio regulado por todo o tempo de bioconversão. Por conta disso, o pH ajustado é considerado apenas o pH inicial do meio, indicando que o mesmo pode variar, visto que não há controle instrumentado do processo em frascos agitados.

No mais, em todos os ensaios realizados, a produção de ácido glicólico foi praticamente concluída no tempo de 48 horas. Nas últimas 24 horas de experimento, o consumo de etilenoglicol, assim como a produção de ácido glicólico, mostrou-se praticamente inalterável, o que pode ser observado na Figura 28, Figura 29, Figura 30 e Figura 31. Presume-se que o aumento na concentração de ácido glicólico e a redução do pH do meio sejam capazes de inibir a bioconversão, fazendo com que uma quantidade negligenciável de substrato seja convertida no período de 48 a 72 horas. Além disso, é necessário avaliar se há perda de atividade celular neste intervalo (de 48 a 72 horas), o que também pode interferir na interrupção do processo.

5.5. SELEÇÃO DA LINHAGEM DE MELHOR CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO

Para seleção da linhagem, primeiramente, foram avaliados os parâmetros associados à bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico pelas quatro acetobactérias. Como já mencionado no item 5.4, duas obtiveram principal destaque: *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 e *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064, sendo a primeira moderadamente melhor que a segunda. No entanto, devido à ausência de réplicas para os ensaios mencionados, não foi possível selecionar a melhor linhagem com base apenas nos parâmetros do processo de bioconversão.

Dessa forma, optou-se por levar em consideração na seleção a linhagem que também apresentasse o melhor crescimento nas etapas de ativação e propagação celular, tanto em D-manitol quanto em etilenoglicol. Como já abordado no item 5.3, a linhagem *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 apresentou o maior crescimento celular em todas as ocasiões. Quando a comparação é realizada entre as cepas *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 e *Gluconoacetobacter xylinus* CCT 0064, todos os parâmetros associados ao crescimento celular são mais satisfatórios para a primeira.

Como consequência das observações aqui expostas, a bactéria ***Gluconobacter oxydans* CCT 0552** foi eleita para dar continuidade ao presente trabalho. Logo, a partir de aqui, todos os experimentos foram realizados exclusivamente com a cepa selecionada.

5.6. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

Os experimentos de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por diferentes concentrações celulares de *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 foram conduzidos em frascos, com concentração real de substrato inicial variando entre 13 e 14 g/L. O fator de interesse foi avaliado em três níveis, 1,02±0,00 g/L, 3,50±0,13 g/L e 6,16±0,88 g/L, os quais foram denominados baixa, média e alta concentração celular, respectivamente. Os perfis de consumo de etilenoglicol e produção de ácido glicólico são apresentados na Figura 32, Figura 33 e Figura 34. Os parâmetros associados ao processo são mostrados na Tabela 18.

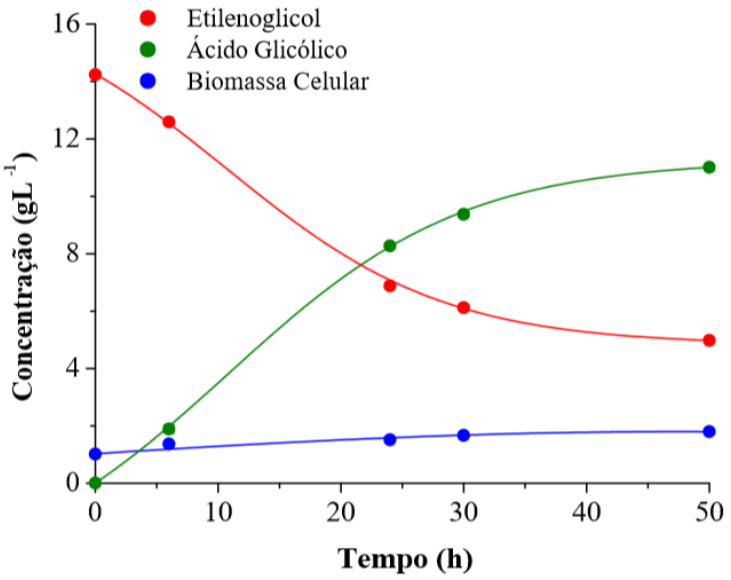

Figura 32: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (14 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com **baixa** concentração celular (1 g/L) e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L)

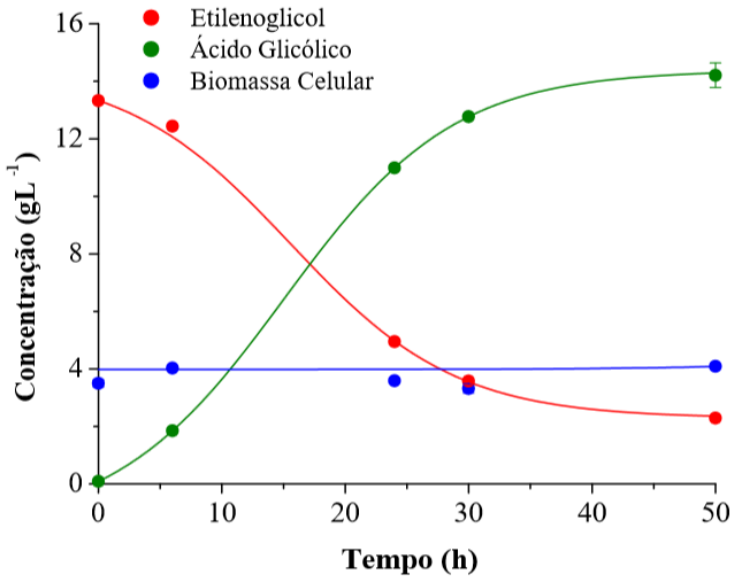

Figura 33: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (13 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com **média** concentração celular (3,5 g/L) e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L)

Tabela 18: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol (14 g/L) por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, por 50 horas, com diferentes concentrações celulares

Biomassa celular (g/L)	AG (g/L)	Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	EB (%)
1,02±0,00 (Baixa)	11,01±0,01	0,22	1,19	65%	63%
3,50±0,13 (Média)	14,21±0,43	0,28	1,28	83%	86%
6,16±0,88 (Alta)	15,44±0,37	0,31	1,31	87%	93%

AG: ácido glicólico produzido, Q_P: produtividade volumétrica, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato consumido, RPS: redução percentual de substrato e EB: eficiência de bioconversão.

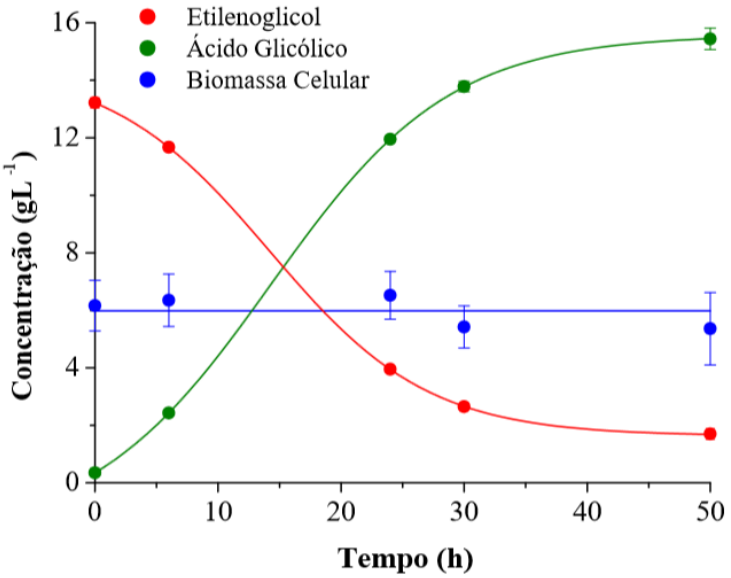

Figura 34: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (13 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 6, com **alta** concentração celular (6 g/L) e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L)

Da Tabela 18, é possível observar que o aumento da concentração celular provocou um aumento também da bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico, o que já era esperado, visto que o maquinário enzimático de assimilação e transformação de substrato em produto é adicionado em maior quantidade. Assim, há maior probabilidade de contato efetivo entre célula e etilenoglicol e, desta forma, o resultado incide em maior síntese do produto de interesse, o que é notado pela elevação de todos os parâmetros associados à bioconversão.

Além disso, em maiores concentrações celulares, deve-se considerar ainda o efeito diluidor, tanto do substrato (etilenoglicol) quanto do produto (ácido glicólico), entre as células do meio de bioconversão. Ou seja, a concentração de substrato e produto por biomassa celular é reduzida significativamente e, por consequência, possíveis efeitos inibitórios são minimizados, o que opera favoravelmente ao desenvolvimento do bioprocesso.

Após esta etapa, alguns experimentos foram conduzidos para modificação do meio de crescimento a fim de alcançar uma maior concentração celular nas etapas de ativação e propagação e, como consequência, favorecer o processo de bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico. Planejamentos experimentais foram realizados para avaliar a importância dos fatores D-manitol, extrato de levedura e peptona no crescimento microbiano, além de sais adicionados, de acordo com meios existentes na literatura para bactérias do gênero *Gluconobacter* (WEI *et al.*, 2009b; ZHANG *et al.*, 2016a; YAO, HOU & BAO, 2017), a saber: $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 e $MgSO_4.7H_2O$. Os resultados não estão apresentados visto que as alterações na composição do meio não ocasionaram em ganhos expressivos de biomassa

celular. Logo, optou-se por dar continuidade nos experimentos utilizando o meio original de crescimento, com 25 g/L de D-manitol, 5 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de peptona.

Embora o aumento dos parâmetros associados à bioconversão tenha sido observado, a melhoria da produção de ácido glicólico não se mostrou proporcional ao incremento da biomassa celular. Consequentemente, devido à alta demanda por fonte de carbono para crescimento de biomassa microbiana, visto que o desenvolvimento celular, mesmo em D-manitol, é limitado, os demais experimentos em frasco não foram conduzidos com altas concentrações celulares.

5.7. AVALIAÇÃO DO pH NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

Para avaliar o efeito do pH inicial no processo de bioconversão, experimentos de produção de ácido glicólico por *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 foram conduzidos em frascos, com concentração real de etilenoglicol inicial de aproximadamente 14 g/L. A variável de interesse foi avaliada em três níveis, pH 5, pH 6 e pH 7, alcançados por tamponamento do meio com KH_2PO_4 e K_2HPO_4 0,1 M. Os perfis cinéticos de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol são exibidos na Figura 35, Figura 36 e Figura 37 e os parâmetros associados ao processo são mostrados na Tabela 19.

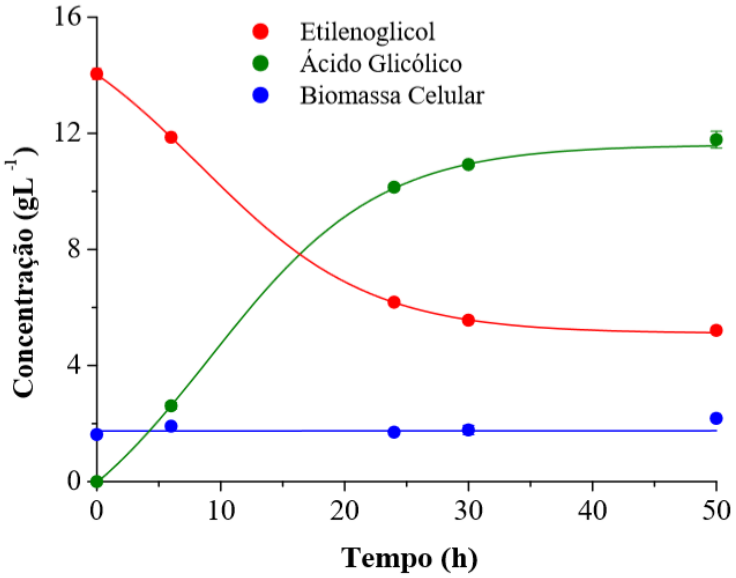

Figura 35: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (14 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e **pH inicial 5**, com inóculo de 1,6 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L)

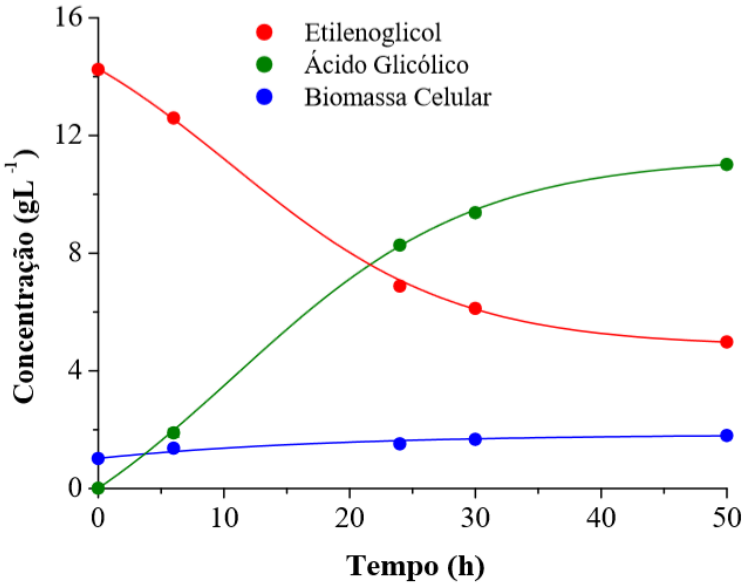

Figura 36: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (14 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e **pH inicial 6**, com inóculo de 1 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L)

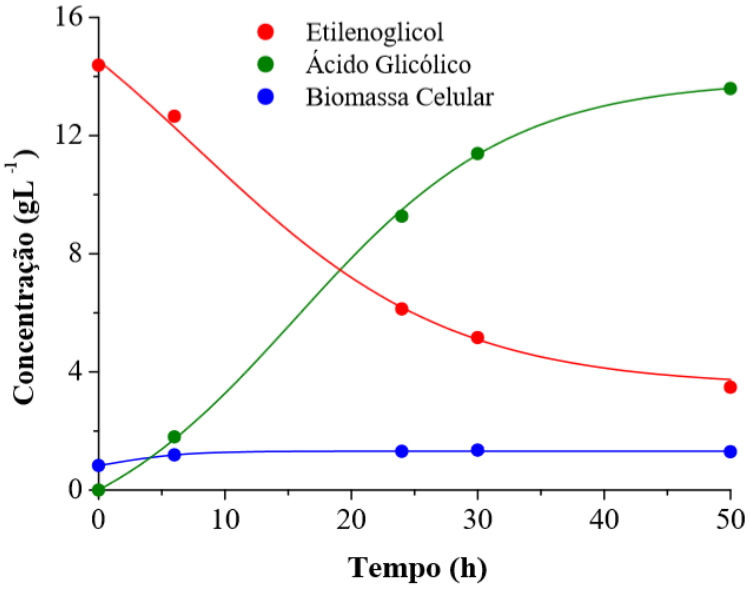

Figura 37: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (14 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e **pH inicial 7**, com inóculo de 0,8 g/L de células e suplementação de extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L)

Tabela 19: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol (14 g/L) por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm, por 50 horas, com inóculo de 1 g/L em diferentes valores de pH inicial

pH inicial	AG (g/L)	Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	EB (%)
5	11,78±0,29	0,24	1,33	63%	68%
6	11,01±0,01	0,22	1,19	65%	63%
7	13,59±0,04	0,27	1,25	76%	77%

AG: ácido glicólico produzido, Q_P: produtividade volumétrica, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato consumido, RPS: redução percentual de substrato e EB: eficiência de bioconversão.

Pela Tabela 19, pode-se notar que a maior produção de ácido glicólico ao final do processo foi determinada para pH inicial 7, no qual também são observadas as maiores redução percentual de substrato, eficiência de bioconversão e produtividade volumétrica. Apesar de se tratar de bactérias acidófilas, é possível que ajustando o pH inicialmente em 7, o tamponamento do meio tenha mais força para suportar a produção de ácido, já que o tempo necessário para decaimento até faixas de pH mais baixas, que inibem a produção de mais ácido, será maior que aquele em meios ajustados a pH inicial 5 e 6.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, esperava-se, portanto, que o meio com pH ajustado inicialmente em 6 trouxesse resultados mais promissores que aquele ajustado em 5, o que não foi observado na prática. A explicação provável deve-se à variação da biomassa microbiana nos ensaios. Teoricamente, a mesma quantidade inicial de células foi adicionada a cada um dos experimentos, realizados em duplicata. Contudo, já na primeira amostra, no tempo inicial de bioconversão, nota-se uma diferença significativa de concentração celular: 1,62±0,00 g/L em pH 5, 1,02±0,00 em pH 6 e 0,83±0,00 em pH 7. Pelo pequeno erro nas análises, é provável que tenha ocorrido variação da biomassa celular quando em contato com o meio tamponado. Novamente, por se tratar de bactérias acidófilas, a adaptação em pH menor, ou seja, 5, mostrou-se mais conveniente à manutenção celular. Já é sabido que a concentração celular atua como fator de influência na produção de ácido glicólico. Por consequência, apesar do decaimento do pH, é possível que a maior concentração celular presente em pH inicial 5 tenha sido determinante na concentração final de ácido.

Pode-se compreender, portanto, que os fatores concentração celular e pH inicial são importantes na bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico e, além disso, apresentam influência quando avaliados conjuntamente.

Adicionalmente, nos tempos iniciais do processo, quando se pode garantir que o pH do meio está próximo ao pH ajustado, a maior produção de ácido é alcançada em pH 5, sendo significativamente superior às demais. Tal comprovação pode ser observada na Tabela 20.

Tabela 20: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol (14 g/L) por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm, por 6 horas, com inóculo de 1 g/L em diferentes valores de pH inicial

pH inicial	AG (g/L)	Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	EB (%)
5	2,61±0,11	0,43	1,20	16%	15%
6	1,89±0,14	0,31	1,13	12%	11%
7	1,80±0,09	0,30	1,04	12%	10%

AG: ácido glicólico produzido, Q_P: produtividade volumétrica, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato consumido, RPS: redução percentual de substrato e EB: eficiência de bioconversão.

As principais justificativas são relacionadas à melhor manutenção celular, como já observado anteriormente, e ao pH ótimo de atuação das enzimas responsáveis pela bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico. Segundo estudo de AMEYAMA & ADACHI (1982a), a enzima álcool desidrogenase ligada à membrana da bactéria *Gluconobacter suboxydans* apresenta estabilidade e atividade integral entre pH 5 e 8. Já a enzima aldeído desidrogenase ligada à membrana da bactéria *Gluconobacter suboxydans* exibe atividade máxima de oxidação do aldeído em pH 4 (AMEYAMA & ADACHI, 1982b). Assim, é provável que o pH inicial 5, para a faixa estudada, expresse o maior efeito sinérgico entre a atuação das duas enzimas necessárias no processo de bioconversão.

Logo, para os demais experimentos em frascos, optou-se por utilizar pH inicial 7 e para ensaios realizados em biorreatores instrumentados, o pH foi ajustado em 5 durante todo o bioprocesso.

5.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE LEVEDURA E DA PEPTONA NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

Para geração de um bioproduto de interesse, faz-se necessária a avaliação da composição de seu meio de produção. A realização deste tipo de análise é fundamental para examinar, entre outros fatores, a concentração ideal de substrato, para aumentar a síntese sem gerar grandes desperdícios de matéria-prima, e a essencialidade da suplementação do meio, a fim de reduzir o custo do processo, eliminando nutrientes que são dispensáveis e/ou influenciam negativamente na produção da biomolécula.

Nesta lógica, para avaliar o efeito do substrato e da adição de nutrientes ao meio de produção de ácido glicólico, realizou-se um planejamento fatorial com três fatores e dois níveis (2^3) e três repetições do ponto central. Os fatores avaliados foram etilenoglicol (substrato), extrato de levedura e peptona (suplementação do meio) e a variável de resposta escolhida foi a concentração de ácido glicólico em 48 horas de processo. A matriz do planejamento fatorial já com os valores da variável de resposta está apresentada na Tabela 21.

A princípio, observa-se que a concentração de ácido glicólico variou de 11,58 g/L a 19,91 g/L, respectivamente, para os experimentos 3 e 2, contendo 10 g/L de etilenoglicol e 5 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de etilenoglicol, sem adição de nutrientes. Aqui, portanto, é possível avaliar que a geração de ácido glicólico está diretamente relacionada à

concentração de etilenoglicol, para a faixa estudada de substrato, e que a suplementação pode estar afetando de modo negativo no processo de bioconversão.

Tabela 21: Matriz do planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central (C) para a produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm, pH inicial 7, por 48 horas, com inóculo de 2 g/L

Corrida	Variáveis Independentes			Variável de Resposta
	Etilenoglicol (g/L)	**Extrato de Levedura (g/L)**	**Peptona (g/L)**	**Ácido Glicólico (g/L)**
1	10,0	0,0	0,0	11,98
2	**20,0**	**0,0**	**0,0**	**19,91**
3	**10,0**	**5,0**	**0,0**	**11,58**
4	20,0	5,0	0,0	18,64
5	10,0	0,0	3,0	11,92
6	20,0	0,0	3,0	18,84
7	10,0	5,0	3,0	11,61
8	20,0	5,0	3,0	18,52
9 (C)	15,0	2,5	1,5	15,18
10 (C)	15,0	2,5	1,5	15,29
11 (C)	15,0	2,5	1,5	15,36

Para melhor compreensão, os dados obtidos foram aplicados no *software* STATISTICA, versão 8.0 (STATSOFT, Inc.). A significância estatística foi determinada pelo valor de *p* menor que 0,05, considerando intervalo de confiança de 95%. Para análise, inclui-se no modelo a interação entre os três fatores por apresentar maior complexidade e escolheu-se termo ANOVA para o erro *Puro Erro* a fim de avaliar o erro experimental.

A Análise de Variância (ANOVA) está apresentada na Tabela 22.

Tabela 22: Tabela ANOVA do planejamento fatorial 2^3 com três repetições do ponto central para a variável de resposta concentração de ácido glicólico (g/L)

ANOVA; R^2=0.99967; Adj=0.9989
2^{3-0} Design; MS Pure Error=0.0076738
DV: Ácido glicólico

Factor	SS	df	MS	F	*p*
(1) Etilenoglicol	103.8648	1	103.8648	13534.92	0.000074
(2) Extrato de Levedura	0.6614	1	0.6614	86.19	0.011404
(3) Peptona	0.1824	1	0.1824	23.77	0.039595
1 by 2	0.0951	1	0.0951	12.40	0.072047
1 by 3	0.1678	1	0.1678	21.87	0.042805
2 by 3	0.1347	1	0.1347	17.55	0.052527
1*2*3	0.0930	1	0.0930	12.12	0.073542
Lack of Fit	0.0194	1	0.0194	2.53	0.252445
Pure Error	0.0153	2	0.0077		
Total SS	105.2341	10			

É possível observar que os fatores etilenoglicol (1), extrato de levedura (2) e peptona (3) e a interação entre etilenoglicol e peptona (1 *by* 3) são estatisticamente significativos, visto

que o valor de *p* é menor que 0,05. Além disso, considerando que o coeficiente de determinação do ajuste apresenta valor muito próximo de 1 (R^2 *Adj* = 0,9989) e a falta de ajuste (*Lack of Fit*) não mostra relevância estatística (valor de *p* = 0,252445), pode-se afirmar que o modelo obtido consegue explicar adequadamente os dados observados.

A Tabela 23 apresenta os efeitos estimados dos fatores.

Tabela 23: Tabela de Efeitos Estimados do planejamento fatorial 2^3 com três repetições do ponto central para a variável de resposta concentração de ácido glicólico (g/L): Parte I

Effect Estimates; R^2=0.99967; Adj=0.9989
2^{3-0} Design; MS Pure Error=0.0076738
DV: Ácido glicólico

Factor	Effect	Std. Err. Pure Err	t(2)	*p*	-95% Cnf. Limt	+95% Cnf. Limt
Mean/Interc.	15.34742	0.026413	581.0657	0.000003	15.23377	15.46106
(1) Etilenoglicol	7.20641	0.061943	116.3397	0.000074	6.93990	7.47293
(2) Extrato de Levedura	-0.57507	0.061943	-9.2838	0.011404	-0.84159	-0.30855
(3) Peptona	-0.30197	0.061943	-4.8750	0.039595	-0.56849	-0.03546
1 by 2	-0.21811	0.061943	-3.5212	0.072047	-0.48463	0.04842
1 by 3	-0.28970	0.061943	-4.6768	0.042805	-0.55622	-0.02318
2 by 3	0.25951	0.061943	4.1894	0.052527	-0.00701	0.52603
1*2*3	0.21562	0.061943	3.4809	0.073542	-0.05090	0.48214

Verifica-se que, dentre as variáveis estatisticamente significativas para a produção de ácido glicólico, apenas a concentração de etilenoglicol (1) exibe efeito positivo, o que indica que um aumento de tal fator provoca um aumento na variável de resposta. As demais variáveis relevantes - extrato de levedura (2), peptona (3) e a interação entre etilenoglicol e peptona (1 *by* 3) – influenciam negativamente o bioprocesso e, por consequência, causam uma redução na concentração de ácido glicólico em 48 horas. Como o objetivo do trabalho é maximizar a concentração de ácido glicólico, conclui-se que o extrato de levedura e a peptona podem ser retirados do meio de produção sem ocasionar perda na produtividade do processo, visto que a concentração mínima avaliada para ambos foi de 0 g/L. Logo, por conta da análise estatística realizada, o extrato de levedura e a peptona foram eliminados da composição do meio de bioconversão.

Adicionalmente, como a tabela de efeitos estimados é apresentada para as variáveis escalonadas (variando de -1 a +1), os maiores valores em módulo indicam maior influência daquele termo na variável de resposta. Logo, o fator que mais influencia na produção de ácido glicólico é, como esperado, a concentração de substrato.

A Tabela 24 apresenta os coeficientes do modelo de regressão em termos das variáveis escalonadas (-1 a 1). O modelo resultante está apresentado na Equação 8.

Tabela 24: Tabela de Efeitos Estimados do planejamento fatorial 2^3 com três repetições do ponto central para a variável de resposta concentração de ácido glicólico (g/L): Parte II

Effect Estimates; R^2=0.99967; Adj=0.9989 2^{3-0} Design; MS Pure Error=0.0076738 DV: Ácido glicólico				
Factor	Coeff.	Std. Err. Coeff.	-95% Cnf. Limt	+95% Cnf. Limt
Mean/Interc.	15.34742	0.026413	15.23377	15.46106
(1) Etilenoglicol	3.60321	0.030971	3.46995	3.73647
(2) Extrato de Levedura	-0.28753	0.030971	-0.42079	-0.15427
(3) Peptona	-0.15099	0.030971	-0.28425	-0.01773
1 by 2	-0.10906	0.030971	-0.24231	0.02420
1 by 3	-0.14485	0.030971	-0.27811	-0.01159
2 by 3	0.12975	0.030971	-0.00351	0.26301
1*2*3	0.10781	0.030971	-0.02545	0.24107

$$\boldsymbol{Y} = 3{,}60321 \times \boldsymbol{X1} - 0{,}28753 \times \boldsymbol{X2} - 0{,}15099 \times \boldsymbol{X3} - 0{,}10906 \times \boldsymbol{X1} \times \boldsymbol{X2} - 0{,}14485 \times \boldsymbol{X1} \times \boldsymbol{X3} + 0{,}12975 \times \boldsymbol{X2} \times \boldsymbol{X3} + 0{,}10781 \times \boldsymbol{X1} \times \boldsymbol{X2} \times \boldsymbol{X3}$$

Equação 8: Modelo de regressão em termos das variáveis escalonadas

Em que:

Y: Ácido glicólico;

X1: Etilenoglicol;

X2: Extrato de Levedura;

X3: Peptona.

O diagrama de Pareto, exibido na Figura 38, confirma os dados mencionados anteriormente. Assim sendo, a concentração de etilenoglicol é o fator mais relevante para a determinação da concentração de ácido glicólico e o menos importante, que já não apresenta significância estatística, é a interação entre os três fatores estudados.

Por meio das investigações aqui realizadas, é possível confirmar um conceito fundamental para exploração do processo de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol pela bactéria *Gluconobacter oxydans* CCT 0552. Considerando que não há necessidade de adicionar suplementação ao meio, infere-se que o microrganismo em questão não requer aumento de sua população durante o processo de produção do ácido de interesse. Logo, pode-se constatar que a conversão enzimática ocorre independentemente do desenvolvimento celular e, portanto, caracteriza processo de formação de produto não associado ao crescimento bacteriano. A resposta obtida está de acordo com relatos anteriores da literatura, visto que, em 1989, KULHANEK já mencionava que o processo de desidrogenação microbiana é passível de ocorrer mesmo em condições de ausência de crescimento. Assim, ratifica-se, aqui, que o processo de produção de ácido glicólico é

dividido em duas etapas primordiais: crescimento do microrganismo e bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico.

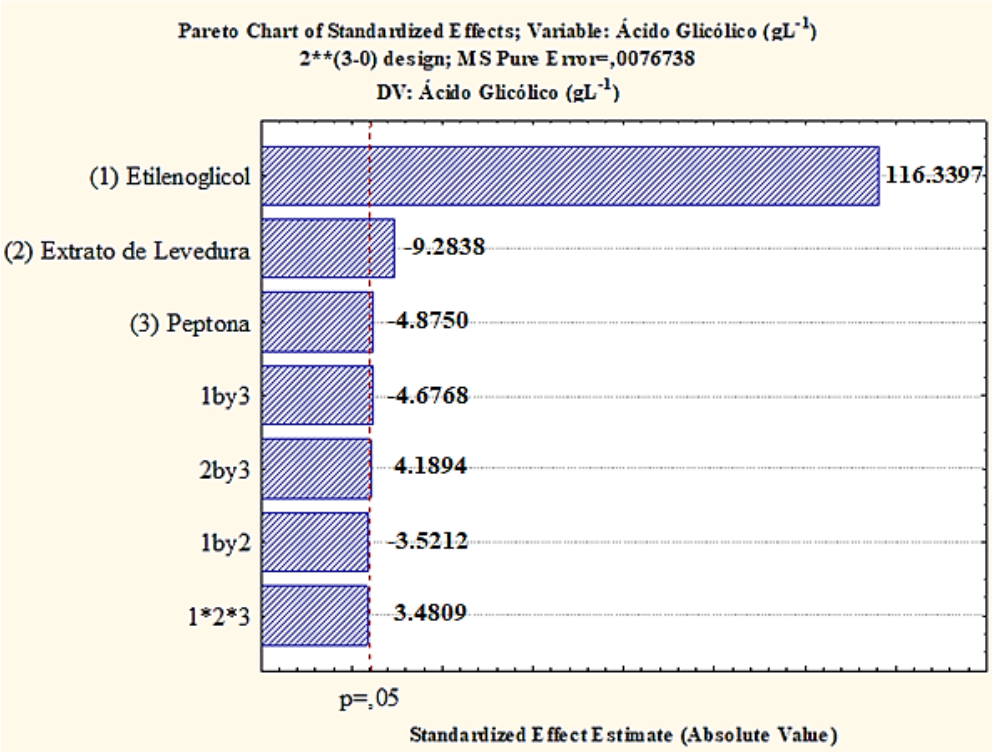

Figura 38: Diagrama de Pareto relacionando a significância dos fatores envolvidos com a produção ácido glicólico por meio do delineamento fatorial 2^3 com três repetições do ponto central

5.9. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SUBSTRATO E DO PRODUTO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

Para avaliar o efeito do substrato em concentrações mais elevadas na bioconversão, experimentos de produção de ácido glicólico por *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 foram conduzidos em frascos, com concentrações iniciais de etilenoglicol de 10, 25, 50, 75 e 100 g/L. A concentração de ácido glicólico nos tempos de 24 e 72 horas é apresentada na Figura 39, enquanto a redução percentual de substrato ao final da bioconversão é exibida na Figura 40. Os demais parâmetros associados ao processo são exibidos detalhadamente na Tabela 25.

Pela Figura 39, é possível presumir que o efeito inibitório causado pela presença de substrato é mínimo, visto que, em 24 horas de processo, concentrações similares de ácido glicólico são atingidas, mesmo para elevadas concentrações de etilenoglicol.

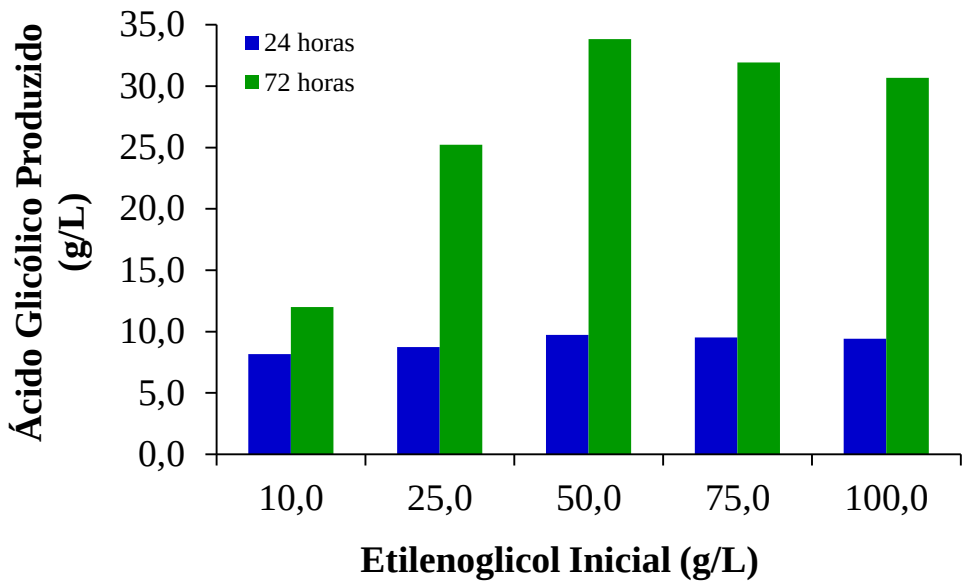

Figura 39: Produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de **diferentes concentrações iniciais de etilenoglicol**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, por 24 e 72 horas, com inóculo de 2 g/L

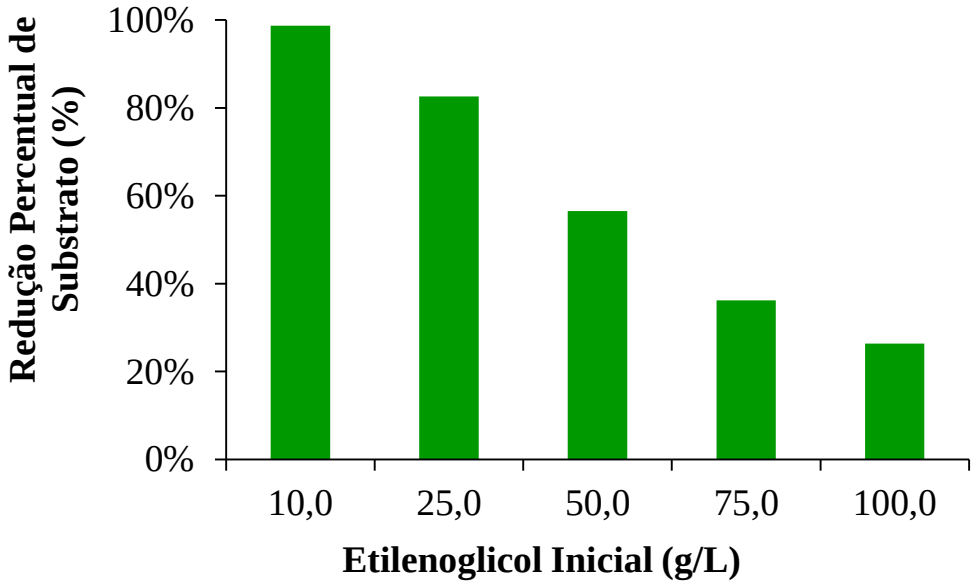

Figura 40: Redução percentual de substrato na produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de **diferentes concentrações iniciais de etilenoglicol**, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, por 72 horas, com inóculo de 2 g/L

Tabela 25: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico a partir de diferentes concentrações de etilenoglicol por *G. oxydans* CCT 0552, em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, por 72 horas, com inóculo de 2 g/L

Etilenoglicol (g/L)	AG (g/L)	Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	EB (%)
10,0	12,0	0,17	1,22	99%	98%
25,0	25,2	0,35	1,21	83%	81%
50,0	33,8	0,47	1,19	57%	55%
75,0	31,9	0,44	1,17	36%	35%
100,0	30,7	0,43	1,16	26%	25%

AG: ácido glicólico produzido, Q_P: produtividade volumétrica, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato consumido, RPS: redução percentual de substrato e EB: eficiência de bioconversão.

Em 72 horas, ou seja, ao final da bioconversão, alcançou-se a maior concentração de produto para todas as situações estudadas. Pode-se observar, pela Figura 39 e também pela Tabela 25, que a maior concentração de ácido glicólico (33,8 g/L) foi revelada para uma concentração inicial de etilenoglicol de 50 g/L.

Percebe-se que a adição de substrato em concentrações acima de 50 g/L não é vantajosa para o processo em questão, posto que não há o seu consumo completo (57%) além de ser baixa a eficiência de bioconversão (55%). Por outro lado, observa-se que as concentrações de ácido atingidas para concentrações de substrato acima de 50 g/L são todas da mesma ordem, em torno de 30 g/L. Tal fato pode indicar que, apesar de não haver efeito inibitório expressivo provocado pelo substrato, a presença do próprio produto é capaz de atuar contrariamente na continuidade do processo de bioconversão.

Em termos de redução percentual de substrato, é possível notar, pela Figura 40, que a mesma é drasticamente reduzida ao aumentar-se a concentração de etilenoglicol. Assim, para concentrações de etilenoglicol de até 50 g/L, verifica-se que as variáveis concentração de ácido glicólico e eficiência de conversão aumentam em sentido inverso. Portanto, embora a melhor produção de ácido tenha sido alcançada para 50 g/L de etilenoglicol, a redução percentual de substrato, para este caso, é de apenas 57%. Logo, a fim de se equilibrar a produção, de modo que se alcance uma concentração ponderada de produto sem provocar grandes desperdícios de substrato, a opção mais adequada seria trabalhar com cargas inferiores de etilenoglicol.

Para avaliar especificamente o efeito do produto na etapa de bioconversão, experimentos de geração de ácido glicólico por *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 foram conduzidos em frascos, com concentração inicial de etilenoglicol de 10 g/L, a qual se sabe ser integralmente consumida, e concentrações de ácido glicólico adicionado de 0, 25, 50 e 100 g/L. A concentração de ácido glicólico produzida em 72 horas é apresentada na Figura 41.

Pela Figura 41, corrobora-se que a presença do ácido orgânico no meio de bioconversão provoca um decaimento acentuado na produção de mais ácido glicólico. Portanto, é possível verificar que a atividade da bactéria *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 é inibida pelo produto da bioconversão.

A ponderação está de acordo com a literatura, visto que os ácidos orgânicos são conhecidos como agentes antimicrobianos. A dimensão dos danos celulares depende do microrganismo, do ambiente em que se encontra e de características relacionadas ao ácido orgânico presente no meio, como tamanho da cadeia carbônica, composição de cadeia lateral, pKa e hidrofobicidade (IMMERSEEL *et al.*, 2007).

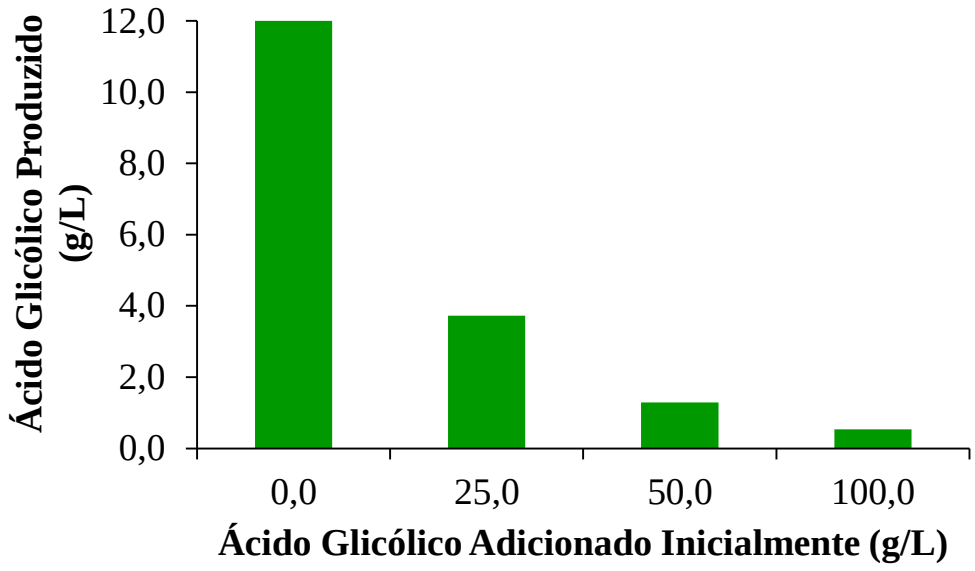

Figura 41: Produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de etilenoglicol (10 g/L) em frascos já contendo **diferentes concentrações iniciais de produto** a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, por 72 horas, com inóculo de 2 g/L

Quando o pH extracelular encontra-se muito baixo, ácidos orgânicos fracos permanecem em sua forma protonada, ou seja, não dissociada, a qual apresenta maior lipofilicidade e, assim, pode difundir-se na membrana plasmática até o citoplasma celular com maior facilidade. O ambiente celular interno, por sua vez, apresenta pH tradicionalmente próximo ao neutro para que o microrganismo seja capaz de executar suas funções metabólicas vitais. Uma vez que o ácido orgânico protonado está localizado no citoplasma, portanto, ele é dissociado e sua forma ionizada pode causar acidificação e acúmulo de ânions no interior celular (RICKE, 2003; IMMERSEEL *et al.*, 2007; ULLAH *et al.*, 2012). Os principais impactos da ionização são notados na membrana plasmática e em funções específicas associadas à replicação e síntese proteica. O próton (H^+) pode ser removido do interior celular com consumo de adenosina trifosfato (ATP), o que provoca esgotamento energético. O acúmulo de ânions, entretanto, é inevitável e conhecido como a causa primordial da toxicidade. Os microrganismos mais resistentes à influência dos ácidos orgânicos são aqueles que permitem que o pH intracelular seja reduzido sem que suas funções metabólicas sejam afetadas (RICKE, 2003).

Diante do exposto, a inibição da formação de mais ácido glicólico, portanto, pode ser entendida como uma resposta do microrganismo para preservação de suas funções vitais.

5.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR EM BATELADAS SEQUENCIAIS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

Para avaliar especificamente a atividade da bactéria *Gluconobacter oxydans* CCT 0552, sem influência do produto no meio de bioconversão, experimentos de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol foram realizados, em frascos, sequencialmente, totalizando 72 horas de ensaio. Três bateladas com carga inicial de 10 g/L de substrato e duração de 24 horas cada foram conduzidas em série. Os parâmetros associados a cada etapa do processo são exibidos na Tabela 26.

É possível observar pela Tabela 26 que as células comportaram-se de maneira similar nos três ensaios realizados, produzindo praticamente a mesma quantidade de ácido glicólico nas três bateladas. Pode-se concluir, assim, que a atividade microbiana é mantida estável ao menos nas primeiras 72 horas após sua ativação. E, portanto, a redução do desempenho bacteriano em tempos finais de bioconversão, já observada em ensaios anteriores, é cabida unicamente à inibição provocada pelo ácido glicólico.

Experimentos mais extensos devem ser realizados para avaliar a capacidade de reutilização celular por tempos mais prolongados. Caso o resultado seja igualmente positivo, técnicas de imobilização celular poderiam ser desenvolvidas às bactérias em questão e aplicadas para reaproveitamento mais efetivo da atividade celular.

Tabela 26: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de etilenoglicol (10 g/L), em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, em bateladas sequenciais de 24h cada, com inóculo de 2 g/L

Batelada	AG (g/L)	Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	EB (%)
1	10,09±0,18	0,42	1,26	80	82
2	9,04±0,24	0,38	1,28	76	79
3	10,01±0,17	0,42	1,34	77	84

AG: ácido glicólico produzido, Q_P: produtividade volumétrica, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato consumido, RPS: redução percentual de substrato e EB: eficiência de bioconversão.

5.11. AVALIAÇÃO DA FORMA DE CONDUÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL PELA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552

Para analisar a forma de condução do processo, ensaios de produção de ácido glicólico por *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 foram conduzidos em frascos, com concentrações

iniciais de etilenoglicol de 30 g/L e de 10 g/L com alimentações de 10 g/L em 24 e 48 horas a fim de se alcançar também 30 g/L de substrato. As estratégias de batelada e batelada alimentada foram realizadas em meio de crescimento celular e em meio exclusivo de bioconversão.

De experimentos prévios, de avaliação da suplementação no meio de bioconversão, mostrados no item 5.8, observou-se que o extrato de levedura e a peptona influenciam negativamente na produção de ácido glicólico. Entretanto, a variação em termos de concentração final de ácido glicólico não se mostrou expressivamente discrepante. Logo, optou-se por estudar a bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico também no mesmo frasco do crescimento celular com o propósito de avaliar possíveis economias no processo, caso as etapas pudessem ser conduzidas em mesmo vaso reacional, sem grandes perdas de produtividade.

Para tanto, os ensaios foram realizados em concentrações celulares equivalentes àquela obtida no meio de crescimento celular. Os parâmetros associados à produção de ácido glicólico em batelada e batelada alimentada são apresentados na Tabela 27.

Tabela 27: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de etilenoglicol (total de 30 g/L), em frascos a 28ºC, 200 rpm e pH inicial 7, por 72 horas, com inóculo de aproximadamente 1 g/L em diferentes formas de condução do processo

Meio	Condução do Processo	AG (g/L)	Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	EB (%)
Crescimento + Bioconversão	B	15,18±0,33	0,21	1,12	48%	44%
	BA	14,50±0,06	0,20	1,16	46%	44%
Exclusivo de Bioconversão	B	20,67±0,02	0,29	1,30	57%	61%
	BA	17,64±0,35	0,25	1,27	51%	53%

B: batelada, BA: batelada alimentada, AG: ácido glicólico produzido, Q_P: produtividade volumétrica, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato consumido, RPS: redução percentual de substrato e EB: eficiência de bioconversão.

Pela Tabela 27, é possível perceber que os ensaios realizados em meio exclusivo de bioconversão apresentaram melhores resultados, visto que este foi concebido puramente para o desenvolvimento do bioprocesso em questão. A diferença deve-se à presença de D-manitol, provavelmente remanescente no meio de crescimento, que compete em consumo com o substrato da bioconversão. Assim, como o D-manitol é mais facilmente assimilado pela bactéria, ocorre grande perda de produtividade no processo principal. Como consequência, é preferível que as duas etapas (crescimento e bioconversão) sejam conduzidas separadamente.

Em relação à estratégia de produção, batelada ou batelada alimentada, observa-se, novamente, que a inibição pelo substrato não é acentuada, posto que não há diferença entre adicionar etilenoglicol aos poucos ou em uma única alimentação. Inclusive, a adição completa

de substrato ao início do processo mostrou-se mais adequada no que concerne à avaliação dos parâmetros. Por outro lado, como em nenhum dos casos o substrato foi integralmente assimilado, adotar a estratégia de batelada alimentada pode ser mais favorável quando as medições de concentração são acompanhadas em tempo real. Assim, é possível adicionar mais etilenoglicol apenas quando aquele já adicionado estiver sido completamente consumido.

Possivelmente, a baixa concentração celular (aproximadamente 1 g/L) em todos os frascos de bioconversão foi crucial para o baixo consumo do substrato. Para melhor avaliação, o ensaio de batelada alimentada foi conduzido com concentrações celulares superiores em biorreator instrumentado. Para que fosse possível trabalhar com concentrações maiores de células, o crescimento microbiano também foi conduzido em biorreator instrumentado para avaliar se haveria melhora de produção de biomassa microbiana. Os resultados são descritos a seguir.

5.12. CRESCIMENTO DA BACTÉRIA G*luconobacter oxydans* CCT 0552 E PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO A PARTIR DE ETILENOGLICOL EM BIORREATOR INSTRUMENTADO

Para analisar o crescimento microbiano em D-manitol como fonte exclusiva de carbono e a produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol em condições controladas de temperatura, pH e aeração, ensaios foram conduzidos em biorreator instrumentado, agitado pneumaticamente, do tipo coluna de bolhas. O perfil cinético do crescimento da bactéria *Gluconobacter oxydans* CCT 0552, em etapa de propagação celular, é mostrado na Figura 42. Em seguida, após 20 horas, quando já em fase estacionária, as células foram devidamente centrifugadas e suspendidas no meio de bioconversão, contendo tampão fosfato 0,1 M e etilenoglicol. A estratégia de condução adotada na bioconversão foi de batelada alimentada, como já justificado anteriormente, com alimentações em períodos adequados de 10 g/L. O perfil cinético de produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol é exibido na Figura 43.

Pelo perfil cinético da Figura 42, é possível observar o aumento da concentração de *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 em relação ao ensaio realizado em frasco, exibido na Figura 26. Enquanto, em 15 horas, a concentração não ultrapassava 1,0 g/L em frascos agitados, no biorreator instrumentado foi possível atingir 2,5 g/L de células. O resultado superior demonstra, entre outros fatores, a importância da aeração no processo de desenvolvimento microbiano. Além disso, é necessário informar que a concentração celular

inicial no biorreator foi de 0,03 g/L contra 0,06 g/L em frasco, mesmo utilizando-se o mesmo inóculo de 10% (v/v) do cultivo de ativação. A diferença é vinculada, principalmente, a fatores externos que provocaram a perda parcial de atividade do estoque utilizado nesta fase de experimentos. Caso a mesma concentração tivesse sido atingida, é possível que maiores concentrações de biomassa microbiana fossem detectadas em biorreator. Entretanto, ainda assim, é notável o aumento da produção celular.

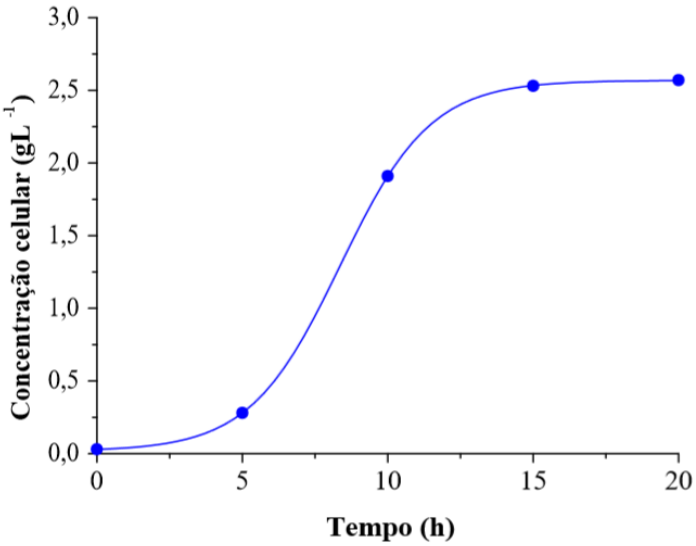

Figura 42: Perfil cinético de propagação da bactéria *G. oxydans* CCT 0552 em meio contendo D-manitol (25 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e peptona (3 g/L) e inóculo de 10% (v/v) do cultivo de ativação em D-manitol (25 g/L) em **biorreator**, agitado pneumaticamente, a 28ºC e aeração suficiente para manter o oxigênio dissolvido 30% acima da saturação

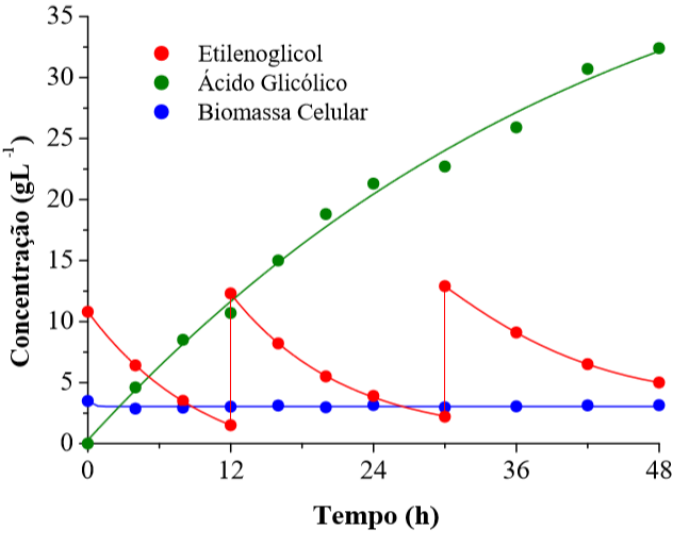

Figura 43: Perfil cinético de consumo de etilenoglicol (33 g/L) e produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552, adotando-se a estratégia de batelada alimentada, em **biorreator**, agitado pneumaticamente, a 28ºC, pH 5 e aeração suficiente para manter o oxigênio dissolvido 30% acima da saturação, com inóculo de 3 g/L

WEI *et al.* (2009a), em meio não otimizado, contendo 80 g/L de sorbitol, 20 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 2 g/L de KH_2PO_4 e 5 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, alcançaram 6 g/L de células de *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 em biorreator agitado mecanicamente após 22 horas. Neste trabalho, utilizando-se 25 g/L de D-manitol, 5 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de peptona, foi possível atingir 2,5 g/L de células em 15 horas. Proporcionalmente, comparando-se apenas os meios não otimizados, é viável alegar que o meio aqui utilizado é promissor para o crescimento de bactérias do gênero *Gluconobacter*. WEI *et al.* (2009a) fizeram uso de fonte de carbono (no caso, sorbitol) e extrato de levedura em concentrações, respectivamente, de 3,2 e 4 vezes maiores do que as utilizadas no presente estudo. Nestas condições, atingiram concentração celular de apenas 2,4 vezes maior. Assim sendo, é possível que pelo melhoramento adequado do meio aqui usado, maiores concentrações celulares possam ser alcançadas, o que reflete em melhor potencial na fase de bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico.

Já no processo de bioconversão propriamente dito, exibido na Figura 43, foi possível atingir 32,4 g/L de ácido glicólico após 48 horas, o que representa fator de rendimento $Y_{P/S}$ de 1,19 g/g, produtividade volumétrica Q_P de 0,67 $gL^{-1}h^{-1}$, redução percentual de substrato RPS de 84% e eficiência de bioconversão EB de 82%. A concentração celular durante toda a conversão permaneceu em torno de 3 g/L. Os parâmetros associados a cada etapa da bioconversão (batelada simples, 1ª e 2ª alimentações) são mostrados na Tabela 28.

Tabela 28: Parâmetros associados à produção de ácido glicólico por *G. oxydans* CCT 0552 a partir de etilenoglicol (33 g/L), adotando-se a estratégia de batelada alimentada, em biorreator agitado pneumaticamente a 28ºC, pH 5 e com aeração suficiente para manter o oxigênio dissolvido 30% acima da saturação, com inóculo de 3 g/L

Etapa	Tempo (h)	AG (g/L)	Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (g/g)	RPS (%)	EB (%)
Batelada Simples	12	10,7	0,89	1,16	86	81
1ª Alimentação	18	12,0	0,67	1,18	83	80
2ª Alimentação	18	9,7	0,54	1,22	61	61
Global	48	32,4	0,67	1,19	84	82

AG: ácido glicólico produzido, Q_P: produtividade volumétrica, $Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato consumido, RPS: redução percentual de substrato e EB: eficiência de bioconversão.

Da Figura 43 e da Tabela 28, nota-se que, a cada alimentação, a conversão era reduzida, já que tempos mais elevados passaram a ser necessários para o consumo efetivo de substrato. Como a atividade celular permanece estável nas primeiras 72 horas após ativação, infere-se que a redução do poder catalítico esteja relacionada exclusivamente à presença de glicolato no meio, conhecido inibidor da bioconversão. Para trabalhos futuros, uma estratégia

interessante a ser adotada, que possibilitaria o alcance de maiores concentrações de ácido e produtividades, seria a remoção instantânea de produto do meio de síntese.

WEI e colaboradores estudaram a produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. Em batelada, com 7,8 g/L de células, alcançaram 70,2 g/L de ácido glicólico, com produtividade volumétrica de 1,46 $gL^{-1}h^{-1}$ e rendimento de 0,87 mol/mol. Já em batelada alimentada, a concentração de ácido obtida foi de 74,5 g/L com produtividade volumétrica de 1,49 $gL^{-1}h^{-1}$ e rendimento de 0,87 mol/mol (WEI *et al.*, 2009a; WEI *et al.*, 2009b).

Os resultados alcançados por WEI *et al.* (2009a; 2009b) comprovam, assim como no presente trabalho, que não há diferença significativa entre conduzir o processo em batelada ou batelada alimentada, o que é fundamentado no fato de que o substrato, etilenoglicol, não inibe a atividade das células de *Gluconobacter oxydans* CCT 0552, mesmo em altas concentrações. Além disso, observa-se, novamente, que maiores concentrações celulares estão diretamente relacionadas a ganhos em produtividade. No presente trabalho, alcançou-se metade da concentração de ácido glicólico e da produtividade por se utilizar também metade da concentração celular. Assim, para que a etapa de bioconversão seja mais satisfatória, são necessárias pesquisas de avaliação do crescimento microbiano, por meio de melhorias do meio de cultivo e/ou melhoramentos genéticos do microrganismo.

5.13. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro trabalho desenvolvido pelos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO/EQ/UFRJ) com o objetivo de sintetizar bioquimicamente ácido glicólico a partir de etilenoglicol. Adicionalmente, é a primeira vez em que o LADEBIO dedicou-se ao estudo de bactérias acéticas. Neste contexto, a presente pesquisa insere-se como base preliminar à investigação mais aprofundada do potencial de bactérias acéticas na bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico.

A partir de aqui, já se comprova experimentalmente que as bactérias de ácido acético apresentam aptidão natural para consumo de etilenoglicol e produção do ácido de interesse. O resultado positivo é observado em virtude da presença de enzimas, ligadas à membrana, que são responsáveis pelas desidrogenações alcoólica e aldeídica envolvidas no metabolismo oxidativo do etilenoglicol (mADH e mALDH, respectivamente).

Pela avaliação dos parâmetros associados ao bioprocesso, foi possível observar a influência de diversos fatores na produção biotecnológica de ácido glicólico. Entre eles,

concentração celular, pH, temperatura, suplementação do meio, concentração de substrato e produto, atividade celular e forma condução do processo foram devidamente analisados e a atuação de cada um pôde ser melhor compreendida.

É verdadeiro que ainda há muito a evoluir para que o bioprocesso estudado possa ser viabilizado a nível industrial. Além disso, para o que o processo seja completamente sustentável e ambientalmente amigável, ainda faz-se necessário o estudo da avaliação da produção de bioetilenoglicol por bioetanol, celulose ou glicerol. Apesar de ainda haver lacunas em aberto, o presente estudo pode auxiliar pesquisas futuras para o desenvolvimento de um processo economicamente viável e ambientalmente sustentável de geração de ácido glicólico. No mais, a evolução dos resultados aqui obtidos é evidenciada na Figura 44.

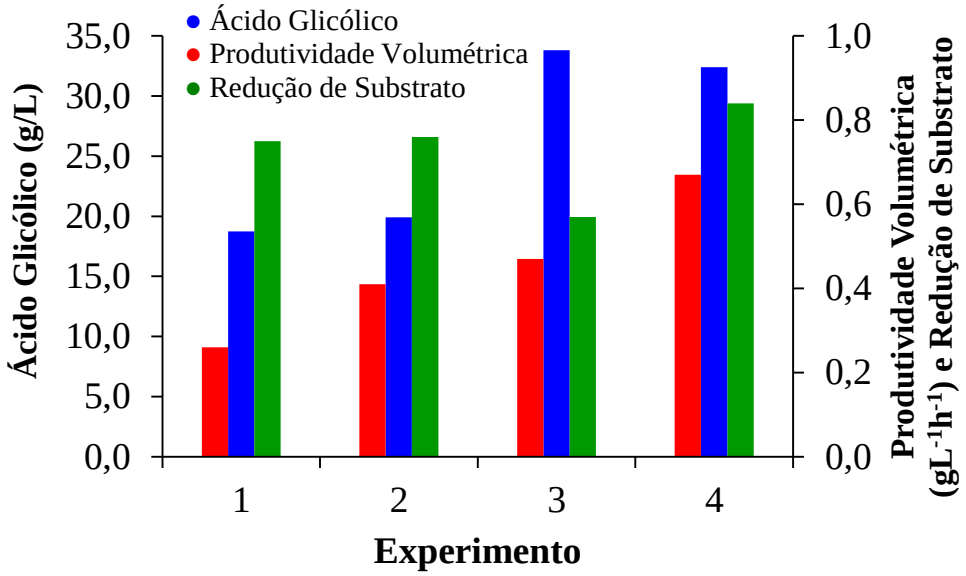

Figura 44: Evolução dos resultados obtidos para produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por *Gluconobacter oxydans* CCT 0552

Legenda: **(1)** Seleção da linhagem (28ºC, 200 rpm, pH inicial 6, 5 g/L de células, com suplementação); **(2)** Avaliação do meio de bioconversão (28ºC, 200 rpm, pH inicial 7, 2 g/L de células); **(3)** Avaliação da concentração de substrato no meio de bioconversão (28ºC, 200 rpm, pH inicial 7, 2 g/L de células); **(4)** Biorreator agitado pneumaticamente (28ºC, pH 5, 3 g/L de células, DO 30% acima da saturação).

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Algumas interpretações pertinentes foram alcançadas com o desenvolvimento do presente trabalho a respeito da produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol por bactérias acéticas. As principais conclusões obtidas são listadas a seguir na sequência da realização dos experimentos.

- Todas as bactérias acéticas crescem, mesmo que limitadamente, em D-manitol, fonte de carbono recomendada para o desenvolvimento celular. Entretanto, em etilenoglicol, substrato utilizado na bioconversão, o crescimento celular é muito pequeno. Apesar disso, após crescimento em D-manitol, a assimilação de etilenoglicol é imediata, visto que as enzimas responsáveis por sua incorporação são inespecíficas e constitutivas, podendo atuar em uma grande gama de substratos;
- Todas as bactérias acéticas são naturalmente capazes, em menor ou maior proporção, de converter etilenoglicol a ácido glicólico, produto final do metabolismo oxidativo incompleto. A produção do ácido orgânico é independente do gênero e da espécie e deve ser avaliada separadamente para cada subespécie. Dentre as linhagens estudadas, a bactéria que apresentou maior crescimento nas fontes de carbono estudadas e melhor produção de ácido glicólico a partir de etilenoglicol foi *Gluconobacter oxydans* CCT 0552;
- Tanto a concentração celular quanto o pH do meio de bioconversão podem influenciar na produção de ácido glicólico. É provável que maiores concentrações celulares promovam maior contato efetivo entre células e substrato, o que ocasiona em maior bioconversão de etilenoglicol a ácido glicólico. O pH, por sua vez, é capaz de interferir tanto na manutenção celular quanto no efeito sinérgico de atividade das enzimas envolvidas na síntese de ácido glicólico: álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase;

- Não há necessidade de suplementação do meio de bioconversão com extrato de levedura e peptona. De fato, o crescimento bacteriano não é determinante para a produção de ácido glicólico, tratando-se de processo de produção não associado ao crescimento microbiano. Além disso, a condução das duas etapas envolvidas no processo (crescimento celular e síntese de ácido glicólico) em um único vaso reacional não é interessante e resulta em perda de concentração final do produto de interesse, produtividade e rendimento;
- A atividade celular da bactéria *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 é preservada em bateladas sequenciais por ao menos 72 horas, o que possibilita a realização de estudos futuros por tempos mais extensos que visam reutilização e imobilização celular. Ademais, a concentração de etilenoglicol no meio de bioconversão não é inibitória à atividade celular e, por consequência, as estratégias de condução da produção de ácido glicólico, batelada e batelada alimentada, não apresentam resultados significativamente diferentes. Por outro lado, o próprio ácido glicólico pode inibir a atividade celular e dificultar a continuidade do bioprocesso;
- É possível mais que dobrar a produção de biomassa celular de *Gluconobacter oxydans* CCT 0552 quando as células são cultivadas com melhor aeração do sistema. Além disso, a etapa de bioconversão, quando realizada em biorreator instrumentado com ajuste de temperatura, pH e aeração, também mostra-se satisfatória, elevando a concentração de ácido glicólico e a produtividade do processo.

No mais, abaixo são registradas algumas sugestões para trabalhos futuros.

- Analisar o impacto de diferentes fontes de carbono e de adição e/ou remoção de nutrientes no meio de crescimento celular visando melhora da produção de biomassa microbiana;
- Investigar mais profundamente a possibilidade de reutilização celular como uma alternativa para elevação da concentração de células em etapa de produção de ácido glicólico sem incluir maiores custos ao processo. Além disso, em caso positivo, avaliar a viabilidade de emprego de técnicas de imobilização celular;
- Ensaiar procedimentos de remoção instantânea do produto do meio de bioconversão a fim de reduzir sua influência inibitória;
- Investigar técnicas para separação e purificação do ácido glicólico produzido, visando sua utilização no setor de cosméticos;

- Realizar a produção de ácido glicólico em escala piloto para o levantamento de parâmetros técnicos e análise do escalonamento do processo;
- Aplicar ferramentas de biologia molecular com o objetivo de alcançar conversão mais eficiente de etilenoglicol a ácido glicólico;
- Examinar a produção de ácido glicólico a partir de bioetilenoglicol produzido a partir de bioetanol ou celulose, de modo que o processo possa ser integrado completamente ao contexto de Biorrefinaria.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKIM, C.; TRICHEZ, D.; CAM, Y.; SPINA, L.; FRANÇOIS, J. M.; WALTHER, T. The synthetic xylulose-1 phosphate pathway increases production of glycolic acid from xylose-rich sugar mixtures. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 201-211, 2016.

AMEYAMA, M.; ADACHI, O. Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. **Methods in Enzymology**, v. 89, p. 450-457, 1982a.

AMEYAMA, M.; ADACHI, O. Aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. **Methods in Enzymology**, v. 89, p. 491-497, 1982b.

ANDERSEN, F. A. Final report on the safety assessment of glycolic acid, ammonium, calcium, potassium, and sodium glycolates, methyl, ethyl, propyl, and butyl glycolates, and lactic acid, ammonium, calcium, potassium, sodium, and tea-lactates, methyl, ethyl, isopropyl, and butyl lactates, and lauryl, myristyl, and cetyl lactates. **International Journal of Toxicology**, v. 17, p. 1-241, 1998.

ASAI, T.; SHODA, K. The taxonomy of *Acetobacter* and allied oxidative bacteria. **The Journal of General and Applied Microbiolog**y, v. 4, p. 289-311, 1958.

BAIN & COMPANY; GAS ENERGY. Potencial de diversificação da indústria química brasileira – Relatório 4: Tensoativos. 1 ed. Rio de Janeiro, Brasil, 2014.

BARNICKI, S. D. Synthetic Organic Compounds. In: KENT, J. A. Handbook of industrial chemistry and biotechnology. 12 ed. EUA: Springer, 2012, p. 307-390. 1562p.

BARROWS, T. H. Degradable implant materials: a review of synthetic absorbable polymers and their applications. **Clinical Materials**, v. 1, p. 233-257, 1986.

BECKER, J.; LANGE, A.; FABARIUS, J.; WITTMANN, C. Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 36, p. 168-175, 2015.

BEN-BASSAT, A.; WALLS, A. M.; PLUMMER, M. A.; SIGMUND, A. E.; SPILLAN, W. L.; DICOSIMO, R. Optimization of biocatalyst specific activity for glycolic acid production. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 350, p. 1761-1769, 2008.

BISSET, D. L. Common cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 435-445, 2009.

BRENT, J. Current management of ethylene glycol poisoning. **Drugs**, v. 61, p. 979-988, 2001.

BROWN, A. J. LXII – Further notes of the chemical action of *Bacterium aceti*. **Journal of the Chemical Society**, v. 51, p. 638-643, 1887.

BW, Business Wire. Global glycolic acid market report 2018 – forecasts to 2023. 2018. Disponível em: <https://www.businesswire.com/news/home/20180601005297/en/Global-Glycolic-Acid-Market-Report-2018-->. Acesso em: 15 de junho de 2018.

CABULONG, R. B.; LEE, W.; BAÑARES, A. B.; RAMOS, K. R. M.; NISOLA, G. M.; VALDEHUESA, K. N. G.; CHUNG, W. Engineering *Escherichia coli* for glycolic acid production from D-xylose through the Dahms pathway and glyoxylate bypass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 2179-2189, 2018.

CAM, Y.; ALKIM, C.; TRICHEZ, D.; TREBOSC, V.; VAX, A.; BARTOLO, F.; BESSE, P.; FRANÇOIS, J. M.; WALTHER, T. Engineering of a synthetic metabolic pathway for the assimilation of D-xylose into value-added chemicals. **ACS Synthetic Biology**, v. 5, p. 607-618, 2016.

CAO, Y.; WANG, J.; KANG, M.; ZHU, Y. Catalytic conversion of glucose and cellobiose into ethylene glycol over various tungsten-based catalysts. **Journal of Fuel Chemistry and Technology**, v. 44, p. 845-852, 2016.

CAO, Y.; WANG, J.; LI, Q.; YIN, N.; LIU, Z.; KANG, M.; ZHU, Y. Hydrolytic hydrogenation of cellulose over Ni-WO_3/SBA-15 catalysts. **Journal of Fuel Chemistry and Technology**, v. 41, p. 943-949, 2013.

CEPA, Canadian Environmental Protection Act. Priority substances list: state of the science report for ethylene glycol. Canada, 2000.

CHANDRASEKARAN, P. T.; BARI, N. K.; SINHA, S. Enhanced bacterial cellulose production from *Gluconobacter xylinus* using super optimal broth. **Cellulose**, v. 24, p. 4367-4381, 2017.

CODD, G. A.; BOWIEN, B.; SCHLEGEL, H. G. Glycollate production and excretion by *Alcaligenes eutrophus*. **Archives of Microbiology**, v. 110, p. 167-171, 1976.

CODD, G. A.; SMITH, B. M. Glycollate formation and excretion by the purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **FEBS Letters**, v. 48, p. 105-108, 1974.

CODD, G. A.; TURNBULL, F. Enzymes of glycollate formation and oxidation in two members of the *Rhodospirillaceae* (purple non-sulphur bacteria). **Archives of Microbiology**, v. 104, p. 155-158, 1975.

COTELLESSA, C.; PERIS, K.; CHIMENTI, S. Glycolic acid and its use in dermatology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 5, p. 215-217, 1995.

COX, R. D.; PHILLIPS, W. J. Ethylene glycol toxicity. **Military Medicine**, v. 169, p. 660-663, 2004.

CURME, G. O. Glycols. Nova York, EUA: Reinhold Publishing Corporation, 1952. 398p.

DAVIS, D. P.; BRAMWELL, K. J.; HAMILTON, R. S.; WILLIAMS, S. R. Ethylene glycol poisoning: case report of a record-high level and a review. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 15, p. 653-667, 1997.

DE LEY, J.; KERSTERS, K. Oxidation of aliphatic glycols by acetic acid bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 28, p. 164-180, 1964.

DE ROOS, J.; DE VUYST, L. Acetic acid bacteria in fermented food and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 115-119, 2018.

DENG, Y.; MAO, Y.; ZHANG, X. Metabolic engineering of *E. coli* for efficient production of glycolic acid from glucose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 256-262, 2015.

DEPPENMEIER, U.; EHRENREICH, A. Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 69-80, 2009.

DEPPENMEIER, U.; HOFFMEISTER, M.; PRUST, C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 233-242, 2002.

DIKSHIT, P. K.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic analysis of dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans* MTCC 904. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 948-957, 2016.

DUPONT. DuPont™ Glycolic acid. Disponível em: <https://chemical-centre.com/d/982327/d/glycolicacidbrochure-extended.pdf>. Acesso em: 14 de junho de 2018.

DYE, R. F. Ethylene glycols technology. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 18, p. 571-579, 2001.

E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, Wilmington (EUA). Chauhan, S., Landenberg (EUA). DiCosimo, R., Rockland (EUA). Fallon, R. D., Elkton (EUA). Gavagan, J. E., Wilmington (EUA). Payne, M. S., Wilmington (EUA). Method for producing glycolic acid from glycolonitrile using nitrilase. Int. Cl. C12P 7/40. US 6.416.980 B1. 23 de fevereiro de 2001, 9 de julho de 2002. **United States Patent**.

E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, Wilmington (EUA). DiCosimo, R., Chadds Ford (EUA). Payne, M. S., Wilmington (EUA). Panova, A., Hockessin (EUA). Thompson, J., Wilmington (EUA). O'Keefe, D. P., Ridley Park (EUA). Enzymatic production of glycolic acid. Int. Cl. C12P 7/42, C12P 7/40, C12N 9/80, C12N 15/74. US 7.198.927 B2. 21 de dezembro de 2005, 3 de abril de 2007. **United States Patent**.

E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, Wilmington (EUA). DiCosimo, R., Chadds Ford (EUA). Panova, A., Hockessin (EUA). Thompson, J. S., West Chester (EUA). Fallon, R. D., Elkton (EUA). Foo, T., Wilmington (EUA). Gallagher, G., Wilmington (EUA). Li, X., Newark (EUA). Fox, G. C., Wilmington (EUA). Zaher, J. J., Newark (EUA). Payne, M. S., Wilmington (EUA). O'Keefe, D. P., Ridley Park (EUA). Process for producing glycolic acid from formaldehyde and hydrogen cyanide. Int. Cl. C12P 7/42. US 2009/0004710 A1. 12 de agosto de 2008, 1 de janeiro de 2009. **United States Patent Application Publication**.

E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, Wilmington (EUA). DiCosimo, R., Chadds Ford (EUA). Panova, A., Hockessin (EUA). Arthur, S. D., Wilmington (EUA). Keith, H., Hockessin (EUA). Process for enzymatically converting glycolonitrile to glycolic acid. Int. Cl. C12P 7/62, C12N 9/00, C12N 9/78, C07K 14/00. US 7.867.739 B2. 24 de abril de 2009, 11 de janeiro de 2011a. **United States Patent**.

E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, Wilmington (EUA). DiCosimo, R., Chadds Ford (EUA). Ben-Bassat, A., Wilmington (EUA). Immobilized microbial nitrilase for production of glycolic acid. Int. Cl. C12P 21/06, C12N 9/00, C12N 9/78, C07H 21/04. US 7.867.748 B2. 2 de fevereiro de 2010, 11 de janeiro de 2011b. **United States Patent**.

E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, Wilmington (EUA). Larson, A. T., Wilmington (EUA). Process for the preparation of glycolic acid. EUA 2.153.064. 3 de novembro de 1937, 4 de abril de 1939a. **United States Patent Office**.

E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY, Wilmington (EUA). Loder, D., Wilmington (EUA). Process for manufacture of glycolic acid. EUA 2.152.852. 31 de dezembro de 1936, 4 de abril de 1939b. **United States Patent Office**.

ELSON, M. L. Glycolic acid. In: MOY, R.; LUFTMAN, D.; KAKITA, L. S. Glycolic acid peels. Nova York, EUA: Marcel Dekker, Inc. 2002. v. 1, p. 29-32. 160p.

FREDENBERG, S.; WAHLGREN, M.; RESLOW, M.; AXELSSON, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – a review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, p. 34-52, 2011.

GAO, X.; MA, Z.; YANG, L.; MA, J. Enhanced bioconversion of ethylene glycol to glycolic acid by a newly isolated *Burkholderia* sp. EG13. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 1572-1580, 2014.

GARRISON, T. F.; MURAWSKI, A.; QUIRINO, R. L. Bio-based polymers with potential for biodegradability. **Polymers**, v. 8, p. 262-283, 2016.

GETCHEM. Glycolic acid preparation. Disponível em: <http://www.getchem.com/ui/cases/106.html>. Acesso em: 14 de junho de 2018.

GILLIS, M.; DE LEY, J. Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, p. 7-27, 1980.

GIRIDHAR, R. N.; SRIVASTAVA, A. K. Productivity improvement in L-sorbose biosynthesis by fedbatch cultivation of *Gluconobacter oxydans*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 34-38, 2002.

GLUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Acetic acid bacteria. In: KONIG, H.; UNDEN, G.; FROHLICH, J. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. 2 ed. Suiça: Springer, 2017, p. 43-64. 710p.

GMI, Global Market Insights. Monoethylene glycol market size by grade (polyester, industrial, antifreeze, low conductivity), by application (polyester fiber, PET, antifreeze & coolants, chemical intermediates), industry analysis report, regional outlook (U.S., Canada, Germany, UK, France, Spain, Italy, Russia, China, India, Japan, Australia, Indonesia, Malaysia, South Korea, Brazil, Mexico, South Africa, GCC), growth potential, price trends, competitive market share & forecast, 2017-2024. 2017. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/monoethylene-glycol-meg-market>. Acesso em: 13 de junho de 2018.

GULLO, M.; VERZELLONI, E.; CANONICO, M. Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: process and biotechnological aspects. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1571-1579, 2014.

GVR, Grand View Research. Glycolic acid market analysis by application (personal care, household, industrial), and segment forecasts to 2024. 2016. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/glycolic-acid-industry>. Acesso em: 15 de junho de 2018.

HAHADA, T.; HIRABAYASHI, T. Utilization of alcohols by *Hansenula miso*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 32, p. 1175-1180, 1968.

HE, Y.; XU, J.; SU, J.; ZHOU, L. Bioproduction of glycolic acid from glycolonitrile with a new bacterial isolate of *Alcaligenes* sp. ECU0401. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1428-1440, 2010.

HHS, U.S. Department of Health and Human Services. Toxicological profile for ethylene glycol and propylene glycol. EUA: Research Triangle Institute, 1997.

HU, J.; WANG, Y.; ZHENG, Y.; SHEN, Y. Isolation of glycolonitrile-hydrolyzing microorganism based on colorimetric reaction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 244-249, 2007.

HU, Z.; ZHENG, Y.; SHEN, Y. Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7177-7182, 2011.

INDIA GLYCOLS. India Glycols limited takes a major step towards second generation green PET: commissions India's first 2G-alcohol plant. Disponível em: <http://www.indiaglycols.com/PDF/Plant-inaugurated-in-Kashipur.pdf>. Acesso em: 13 de junho de 2018.

IMMERSEEL, F. V.; RUSSELL, J. B.; FLYTHE, M. D.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. **Avian Pathology**, v. 35, p. 182-188, 2007.

JI, N.; ZHANG, T.; ZHENG, M.; WANG, A.; WANG, H.; WANG, X.; CHEN, J. G. Direct catalytic conversion of cellulose into ethylene glycol using nickel-promoted tungsten carbide catalysts. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, p. 8510-8513, 2008.

JI, N.; ZHANG, T.; ZHENG, M.; WANG, A.; WANG, H.; WANG, X.; SHU, Y.; STOTTLEMYER, A. L.; CHEN, J. G. Catalytic conversion of cellulose into ethylene glycol over supported carbide catalysts. **Catalysis Today**, v. 147, p. 77-85, 2009.

JI, N.; ZHENG, M.; WANG, A.; ZHANG, T.; CHEN, J. G. Nickel-promoted tungsten carbide catalysts for cellulose conversion: effect of preparation methods. **Chemistry & Sustainability, Energy & Materials**, v. 5, p. 939-944, 2012.

JIANG, T.; KONG, D.; XU, K.; CAO, F. Hydrogenolysis of glycerol aqueous solution to glycols over Ni-Co bimetallic catalyst: effect of ceria promoting. **Applied Petrochemical Research**, v. 6, p. 135-144, 2016.

KATAOKA, M.; SASAKI, M.; HIDALGO, A. G. D.; NAKANO, M.; SHIMIZU, S. Glycolic acid production using ethylene glycol-oxidizing microorganisms. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, p. 2265-2270, 2001.

KELIANG, G.; DONGZHI, W. Asymmetric oxidation by *Gluconobacter oxydans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 135-139, 2006.

KERSTERS, K.; DE LEY, J. The oxidation of glycols by acetic acid bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 71, 311-331, 1963.

KERSTERS, K.; LISDIYANTI, P.; KOMAGATA, K.; SWINGS, J. The family *Acetobacteraceae*: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconoacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. **Prokaryotes**, v. 5, p. 163-200, 2006.

KOIVISTOINEN, O. M.; KUIVANEN, J.; BARTH, D.; TURKIA, H.; PITKÃNEN, J.; PENTTILÃ, M.; RICHARD, P. Glycolic acid production in the engineered yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. **Microbial Cell Factories**, v. 12, p. 82-97, 2013.

KOSSEVA, M.; BESCHKOV, V.; POPOV, R. Biotransformation of D-sorbitol to L-sorbose by immobilized cells *Gluconobacter suboxydans* in a bubble column. **Journal of Biotechnology**, v. 19, p. 301-308, 1991.

KROCHTA, J. M.; TILLIN, S. J.; HUDSON, J. S. Thermochemical conversion of polysaccharides in concentrated alkali to glycolic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 23-32, 1988.

KULHANEK, M. Microbial dehydrogenations of monosaccharides. **Advances in Applied Microbiology**, v. 34, p. 141-182, 1989.

LI, C.; ZHENG, M.; WHANG, A.; ZHANG, T. One-pot catalytic hydrocracking of raw woody biomass into chemicals over supported carbide catalysts: simultaneous conversion of cellulose, hemicellulose and lignin. **Energy & Environmental Science**, v. 5, p. 6383-6390, 2012.

LIU, Y.; SUN, Y.; TAN, C.; LI, H.; ZHENG, X.; JIN, K.; WANG, G. Efficient production of dihydroxyacetone from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Gluconobacter frateurii*. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 384-389, 2013.

MACAULEY, S.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 21, p. 1-25, 2001.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, p. 1377-1397, 2011.

MALIMAS, T.; VU, H. T. L.; MURAMATSU, Y.; YUKPHAN, P.; TANASUPAWAT, S.; YAMADA, Y. Systematics of acetic acid bacteria. In: SENGUN, I. Y. Acetic acid bacteria: fundamentals and food applications. 1 ed. EUA: CRC Press, 2017, p. 3-43. 358p.

MARKET REVIEWS. Global glycolic acid market to reach $203.34 M by 2018. **Focus on Surfactants**, v. 2015, p. 7, 2015.

METABOLIC EXPLORER, Saint Beauzire (FR). Dischert, W., Vic-le-Comte (FR). Soucaille, P., Deyme (FR). Method for producing high amount of glycolic acid by fermentation. Int. Cl. C12N 1/00, C12N 15/90, C12N 1/20, C12P 7/42. EP 2 233 562 A1. 24 de março de 2009, 29 de setembro de 2010. **European Patent Application**.

METABOLIC EXPLORER, Saint Beauzire (FR). Dischert, W., Vic-le-Comte (FR). Figge, R., Le Crest (FR). Soucaille, P., Deyme (FR). Use of inducible promoters in the production of glycolic acid. Int. Cl. C12P 7/42, C12N 15/70. US 2013/0089903 A1. 15 de junho de 2010, 11 de abril de 2013. **United States Patent Application Publication**.

MIKKELSEN, D.; FLANAGAN, B. M.; DYKES, G. A.; GIDLEY, M. J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconoacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 576-583, 2009.

MILTENBERGER, K. Hydroxycarboxylic acids, aliphatic. In: ELVERS, B. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weihein, Alemanha: Wiley-VCH, 2012, v. 18, p. 481-492.

MOORE, M. M.; KANEKAR, S. G.; DHAMIJA, R. Ethylene glycol toxicity: chemistry, pathogenesis, and imaging. **Radiology Case Reports**, v. 3, p. 1-5, 2008.

MRF, Market Research Future. Glycolic acid market research report-forecast to 2023. 2017. Disponível em: <https://www.marketresearchfuture.com/reports/glycolic-acid-market-3141>. Acesso em: 15 de junho de 2018.

NANCUCHEO, I.; JOHNSON, D. B. Production of glycolic acid by chemolithotrophic iron- and sulfur-oxidizing bacteria and its role in delineating and sustaining acidophilic sulfide mineral-oxidizing consortia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 461-467, 2010.

OXITENO. Relatório de sustentabilidade 2015. Disponível em: <http://www.oxiteno.com/webcenter/portal/Oxiteno/pt-br/sustentabilidade/relatorio-de-sutentabilidade>. Acesso em 13 de junho de 2018.

PALLERONI, N. J.; DOUDOROFF, M. Metabolism of carbohydrates by *Pseudomonas saccharophila*: III. Oxidation of D-arabinose. **Journal of Bacteriology**, v. 74, p. 180-185, 1957.

PANOVA, A.; MERSINGER, L. J.; LIU, Q.; FOO, T.; ROE, D. C.; SPILLAN, W. L.; SIGMUND, A. E.; BEN-BASSAT, A.; WAGNER, L. W.; O'KEEFE, D. P.; WU, S.; PETRILLO, K. L.; PAYNE, M. S.; BRESKE, S. T.; GALLAGHER, F. G.; DICOSIMO, R. Chemoenzymatic synthesis of glycolic acid. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1462-1474, 2007.

PEREIRA, B.; LI, Z.; DE MEY, M.; LIM, C. G.; ZHANG, H.; HOELTGEN, C.; STEPHANOPOULOS, G. Efficient utilization of pentoses for bioproduction of the renewable two-carbon compounds ethylene glycol and glycolate. **Metabolic engineering**, v. 34, p. 80-87, 2016.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W. Perry's Chemical Engineers' Handbook. 7 ed. EUA: McGraw-Hill, 1997.

PI, Plastics Insight. Mono-ethylene glycol (MEG): Production, market, price and its properties. Disponível em: <https://www.plasticsinsight.com/resin-intelligence/resin-prices/mono-ethylene-glycol-meg/>. Acesso em: 13 de junho de 2018.

PRUST, C.; HOFFMEISTER, M.; LIESEGANG, H.; WIEZER, A.; FRICKE, W. F.; EHRENREICH, A.; GOTTSCHALK, G.; DEPPENMEIER, U. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 195-200, 2005.

REBSDAT, S.; MAYER, D. Ethylene glycol. In: ELVERS, B. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weihein, Alemanha: Wiley-VCH, 2012, v. 13, p. 531-546.

REINIATI, I.; HRYMAK, A. N.; MARGARITIS, A. Kinetics of cell growth and crystalline nanocellulose production by *Komagataeibacter xylinus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 127, p. 21-31, 2017.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, p. 632-639, 2003.

ROMANO, A.; GANDOLFI, R.; NITTI, P.; ROLLINI, M.; MOLINARI, F. Acetic acid bacteria as enantioselective biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 235-240, 2002.

ROQUETTE FRERES, Lestrem (FR). Dischert, W., Vic-le-Comte (FR). Colomb, C., Clermont-Ferrand (FR). Soucaille, P., Deyme (FR). Fermentation process for producing glycolic acid. Int. Cl. C12P 7/42. US 2012/0178136 A1. 25 de setembro de 2009, 12 de julho de 2012. **United States Patent Application Publication**.

SAINZ, F.; NAVARRO, D.; MATEO, E.; TORIJA, M. J.; MAS, A. Comparison of D-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 222, p. 40-47, 2016.

SALUSJÃRVI, L.; TOIVARI, M.; VEHKOMÃKI, M.; KOIVISTOINEN, O.; MOJZITA, D.; NIEMELÃ, K.; PENTTILÃ, M.; RUOHONEN, L. Production of ethylene glycol or glycolic acid from D-xylose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v. 101, p. 8151-8163, 2017.

SATO, T.; ATOMI, H. Novel metabolic pathways in *Archae*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 307-314, 2011.

SCHNEIDER, H.; LEVY-RICK, S.; LABELLE, J. L. Oxidation of alcohols to acids and ketones by *Hansenula polymorpha*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 299-300, 1995.

SCOTT, E. J. V.; DITRE, C. M.; YU, R. J. Alpha-hydroxyacids in the treatment of signs of photoaging. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 217-226, 1996.

SCWEIGER, P.; VOLLAND, S.; DEPPENMEIER, U. Overproduction and characterization of two distinct aldehyde-oxidizing enzymes from *Gluconobacter oxydans* 621H. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 147-155, 2007.

SENGUN, I. Y.; KARABIYIKLI, S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. **Food Control**, v. 22, p. 647-656, 2011.

SHARAD, J. Glycolic acid peel therapy – a current review. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 6, p. 281-288, 2013.

SIEMENS. Case study: Process analytics in ethylene oxide and ethylene glycol plants. EUA: Siemens Industry Inc, 2015.

SIEVERS, M.; SWINGS, J. Family II. *Acetobacteraceae*. In: GARRITY, G. M. (Editor Chefe); BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume II: The Proteobacteria, Part C – The Alpha, Beta, Delta, and Epsilonproteobacteria. 2 ed. EUA: Springer, 2005, p. 41-50. 1256p.

SILVA, M. R.; HEXSEL, D. M.; RUTOWITSCH, M. S.; ZECHMEISTER, M. Hydroxy acids and retinoids in cosmetics. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 460-466, 2001.

SOUCAILLE, P., Deyme (FR). Glycolic acid production by fermentation from renewable resources. Int. Cl. C12P 7/62, C12P 7/42. US 2009/0155867 A1. 9 de junho de 2006, 18 de junho de 2009. **United States Patent Application Publication**.

TAI, Z.; ZHANG, J.; WHANG, A.; PANG, J.; ZHENG, M.; ZHANG, T. Catalytic conversion of cellulose to ethylene glycol over a low-cost binary catalyst of raney Ni and tungstic acid. **Chemistry & Sustainability, Energy & Materials**, v. 6, p. 652-658, 2013.

TAI, Z.; ZHANG, J.; WHANG, A.; ZHENG, M.; ZHANG, T. Temperature-controlled phase-transfer catalysis for ethylene glycol production from cellulose. **Chemical Communications**, v. 48, p. 7052-7054, 2012.

TAJIRIAN, A. L.; GOLDBERG, D. J. A review of sutures and other skin closure materials. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 12, p. 296-302, 2010.

TECNON ORBICHEM LTD. Handbook of commercial bio-based chemicals. Reino Unido, 2016.

TMR, Transparency Market Research. Glycolic acid market for personal care, household cleaning, industrial and other applications: global industry analysis, size, share, growth, trends and forecast 2012-2018 SAMPLE. Disponível em: <http://www.sbdi.co.kr/cart/data/info/Transparency_Market_Research_Glycolic_Acid_-_Global_Industry_Analysis_Size_Share_Growth_Trends_and_Forecast_2012-2018_Sample.pdf>. Acesso em: 15 de junho de 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10 ed. Brasil: Artmed Editora SA, 2012. 894p.

UEDA, N.; NAKAGAWA, Y.; TOMISHIGE, K. Conversion of glycerol to ethylene glycol over Pt-modified Ni catalyst. **Chemistry Letters**, v. 39, p. 506-507, 2010.

ULLAH, A.; ORIJ, R.; BRUL, S.; SMITS, G. J. Quantitative analysis of the modes of growth inhibition by weak organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8377-8387, 2012.

WANG, A.; ZHANG, T. One-pot conversion of cellulose to ethylene glycol with multifunctional tungsten-based catalysts. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, p. 1377-1386, 2013.

WANG, S.; YIN, K.; ZHANG, Y.; LIU, H. Glycerol hydrogenolysis to propylene glycol and ethylene glycol on zirconia supported noble metal catalysts. **ACS Catalysis**, v. 3, p. 2112-2121, 2013.

WEI, G.; YANG, X.; GAN, T.; ZHOU, W.; LIN, J.; WEI, D. High cell density fermentation of *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 for glycolic acid production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, p. 1029-1034, 2009a.

WEI, G.; YANG, X.; ZHOU, W.; LIN, J.; WEI, D. Adsorptive bioconversion of ethylene glycol to glycolic acid by *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, p. 127-131, 2009b.

WEI, L.; ZHOU, J.; ZHU, D.; CAI, B.; LIN, J.; HUA, Q.; WEI., D. Functions of membrane-bound alcohol dehydrogenases and aldehyde dehydrogenase in the bio-oxidation of alcohols in *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 1156-1164, 2012.

WU, S.; FOGIEL, A. J.; PETRILLO, K. L.; JACKSON, R. E.; PARKER, K. N.; DICOSIMO, R.; BEN-BASSAT, A.; O'KEEFE, D. P.; PAYNE, M. S. Protein engineering of nitrilase for chemoenzymatic production of glycolic acid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, p. 717-720, 2008.

YAMADA, Y. Systematics of acetic acid bacteria. In: MATSUSHITA, K.; TOYAMA, H.; TONOUCHI, N.; OKAMOTO-KAINUMA, A. Acetic acid bacteria: ecology and physiology. 1 ed. Japão: Springer, 2016, p. 1-50. 350p.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, p. 1244-1251, 1997.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P.; VU, H. T. L.; MURAMATSU, Y.; OCHAIKUL, D.; TANASUPAWAT, S.; NAKAGAWA, Y. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, p. 397-404, 2012.

YANG, F.; LIM, Y. Kinetic study of the bioconversion of D-sorbitol to L-sorbose by *Acetobacter pasteurianus*. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 233-236, 1997.

YAO, R.; HOU, W.; BAO, J. Complete oxidative conversion of lignocellulose derived non-glucose sugars to sugar acids by *Gluconobacter oxydans*. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1188-1192, 2017.

YAWS, C. L. The Yaws Handbook of Physical Properties for Hydrocarbons and Chemicals. 2 ed. EUA: Elsevier, 2015. 832p.

YUE, H.; ZHAO, Y.; MA, X.; GONG, J. Ethylene glycol: properties, synthesis, and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 4089-4380, 2012.

ZAHOOR, A.; OTTEN, A.; WENDISCH, V. F. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for glycolate production. **Journal of Biotechnology**, v. 192, p. 366-375, 2014.

ZHANG, H.; LIU, G.; ZHANG, J.; BAO, J. Fermentative production of high titer gluconic acid and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 123-131, 2016a.

ZHANG, H.; SHI, L.; MAO, X.; LIN, J.; WEI, D. Enhancement of cell growth and glycolic acid production by overexpression of membrane-bound alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. **Journal of Biotechnology**, v. 237, p. 18-24, 2016b.

ZHANG, Y.; WANG, A.; ZHANG, T. A new 3D mesoporous carbon replicated from commercial silica as a catalyst support for direct conversion of cellulose into ethylene glycol. **Chemical Communications**, v. 46, p. 862-864, 2010.

ZHAO, G.; ZHENG, M.; ZHANG, J.; WANG, A.; ZHANG, T. Catalytic conversion of concentrated glucose to ethylene glycol with semicontinuous reaction system. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 9566-9572, 2013.

ZHENG M.; WANG, A.; JI, N.; PANG, J.; WANG, Z.; ZHANG, T. Transition metal-tungsten bimetallic catalysts for the conversion of cellulose into ethylene glycol. **Chemistry & Sustainability, Energy & Materials**, v. 3, p. 63-66, 2010.