

0113006747

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental



**BIOSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO A
PARTIR DE ÓLEO DE *JATROPHA CURCAS* POR *BURKHOLDERIA GLUMAE*
MA13**

Sabrina Costa Carvalho

Orientador: Prof.Dr. Jonas Contiero

Rio Claro (SP)

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Câmpus de Rio Claro

SABRINA COSTA CARVALHO

**BIOSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLI-3-
HIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE ÓLEO DE *JATROPHA*
CURCAS POR *BURKHOLDERIA GLUMAE* MA13**

Trabalho de Formatura apresentado ao
Instituto de Geociências e Ciências
Exatas - Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, para obtenção do grau de
Engenheiro Ambiental.

Rio Claro - SP
2020

SABRINA COSTA CARVALHO

**BIOSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE POLI-3-
HIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE ÓLEO DE *JATROPHA*
CURCAS POR *BURKHOLDERIA GLUMAE* MA13**

Trabalho de Formatura apresentado ao
Instituto de Geociências e Ciências
Exatas - Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, para obtenção do grau de
Engenheiro Ambiental.

Comissão Examinadora

Jonas Contiero

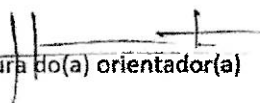
Luciana Fontes Coelho

Sandra Imaculada Maintinguer

Rio Claro, 05 de outubro de 2020.

Sabrina C. Carvalho

Assinatura do(a) aluno(a)


assinatura do(a) orientador(a)

À Liliane Costa e Sergio Carvalho.

*Dedico essa e todas as minhas
conquistas*

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por sempre me incentivarem e acreditarem nos meus sonhos. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço às minhas avós, Lúcia e Benedita, por serem exemplos de força e superação. E à toda minha família por estarem sempre ao meu lado, nos momentos bons e ruins e por vibrarem junto comigo em cada etapa.

Agradeço ao meu namorado e melhor amigo, Joca, por ser meu porto seguro, por caminhar ao meu lado e por nunca me deixar desistir.

Às minhas colegas de faculdade e amigas pra vida, Bea, Giulia, Maria, Lesca e Lari, por serem minhas fiéis parceiras nessa longa jornada universitária. Obrigada UNESP por cruzar nossos caminhos.

Às minhas amigas das antigas, Giu, Sté e Aninha por serem minhas conselheiras e por sempre me apoiarem. Vocês são mulheres incríveis.

À Babi, por ser minha companheirinha e me confortar nos momentos difíceis nessa reta final.

À UNESP, por me proporcionar todo aprendizado e crescimento e por contribuir não somente com minha formação acadêmica mas pessoal.

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero, meu orientador, pelo conhecimento transmitido e pela oportunidade em desenvolver esse projeto,

Aos meus colegas de laboratório, pela paciência, pelas conversas e ensinamentos. Vocês me inspiram.

À vida, por ter me apresentado com tantas pessoas incríveis. Que sorte a minha.

RESUMO

O polihidroxibutirato (PHB) é um polímero biodegradável sintetizado por diversas bactérias como reserva de energia. Possui características semelhantes ao polipropileno, sendo uma potencial alternativa aos plásticos de origem petroquímica. Devido ao alto custo associado a produção do PHB, esforços tem sido feitos na busca de fontes de carbono baratas que resultem em um alto rendimento de produção. Um substrato que apresenta grande potencial é o óleo de *Jatropha curcas*. Entre outras propriedades favoráveis, o óleo de *J. curcas* é não comestível, está amplamente disponível e pode ser produzido a baixo custo. Portanto o presente projeto de pesquisa teve como objetivo geral avaliar a produção de Polihidroxibutiratos (PHB) a partir da linhagem *Burkholderia glumae* MA13 utilizando óleo de *Jatropha curcas* como fonte de carbono. Diferentes fontes de nitrogênio e concentrações de fonte de carbono foram avaliadas a fim de obter os melhores parâmetros de produção. Os cultivos bacterianos foram realizados em frascos agitados a 34°C, 150 rpm por 96 horas. A produção máxima de PHB foi atingida com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, e a uma concentração de 10 g/L de óleo. Foi obtido 56% de acúmulo intracelular de polímero e um rendimento de 0,35 g/g. A *Burkholderia glumae* MA13 demonstrou ser uma linhagem bacteriana adaptada à síntese de PHB a partir de ácidos graxos, assim como óleo de *Jatropha curcas* se mostrou promissor como fonte de carbono.

Palavras-chave: Bioplástico. Polihidroxibutirato. Óleo de *J.curcas*. Fermentação.

ABSTRACT

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable polymer synthesized by several bacteria as an energy reserve. It has characteristics similar to polypropylene, being a potential alternative to plastics of petrochemical origin. Thinking about the high cost associated with the production of PHB, efforts have been made in the search for cheap carbon sources that result in a high production yield. A substrate that has great potential is *Jatropha curcas* oil. Among other favorable properties, *J. curcas* oil is inedible, widely available and can be produced at low cost. Therefore, this research project aimed to evaluate a production of Polyhydroxybutyrates (PHB) from the *Burkholderia glumae* MA13 strain using *Jatropha curcas* oil as a carbon source. Different sources of nitrogen and sources of carbon were evaluated in order to obtain the best production parameters. Bacterial cultures were carried out in flasks shaken at 34 ° C, 150 rpm for 96 hours. The maximum production of PHB was achieved with sodium nitrate as a nitrogen source, and a concentration of 10 g / L of oil. 56% accumulated intracellular polymer accumulation and a yield of 0.35 g / g. The *Burkholderia glumae* MA13 proved to be a bacterial strain adapted to the synthesis of PHB from fatty acids, as well as *Jatropha curcas* oil has shown to be promising as a carbon source.

Keywords: Bioplastic. Polyhydroxybutyrate. *J.curcas* oil. Fermentation

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Polímeros.....	11
3.2 Biopolímeros.....	13
3.3 Polihidroxialcanoatos (PHAs)	15
3.4 Polihidroxibutiratos (PHBs)	17
3.5 Microrganismos produtores de PHA.....	17
3.6 Óleo de <i>Jatropha curcas</i>	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Meios de cultivo.....	21
4.1.1 Meio Lisogênico (LB)	21
4.1.2 Meio Mineral (MM)	21
4.2 Esterilização.....	22
4.3 Microrganismos.....	22
4.4 Cultivo de microrganismos.....	22
4.5 Determinação da biomassa.....	23
4.6 Determinação do óleo residual.....	23
4.7 Determinação de PHAs.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24

5.1 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono (óleo de <i>J.curcas</i>) e diferentes fonte de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio, nitrato de sódio, cloreto de amônio, fosfato de amônio monobásico e nitrato de amônio), por <i>Burkholderia glumae</i> MA13.....	24
5.1.1 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando ureia ((NH ₂) ₂ CO) como fonte de nitrogênio, por <i>Burkholderia glumae</i> MA13.....	24
5.1.2 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄ como fonte de nitrogênio, por <i>Burkholderia glumae</i> MA13.....	28
5.1.3 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando nitrato de sódio (NaNO ₃) como fonte de nitrogênio, por <i>Burkholderia glumae</i> MA13.....	31
5.1.4 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando cloreto de amônio (NH ₄ Cl) como fonte de nitrogênio, por <i>Burkholderia glumae</i> MA13.....	34
5.1.5 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando fosfato de amônio monobásico ((NH ₄)H ₂ PO ₄) como fonte de nitrogênio, por <i>Burkholderia glumae</i> MA13.....	37
5.1.6 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃) como fonte de nitrogênio, por <i>Burkholderia glumae</i> MA13.....	40
5.2 Considerações finais relacionadas aos experimentos de otimização dos parâmetros para produção de P(3HB) a partir de óleo de <i>J.curcas</i> por <i>B.glumae</i> MA13.....	43
5.3 Caracterização do PHA de <i>Burkholderia glumae</i> MA13.....	45
6. CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Os plásticos derivados do petróleo apresentam grande versatilidade de uso e uma ampla gama de aplicações, além disso, características como alta durabilidade, consequência da sua estabilidade estrutural, favorecem o alto consumo desses materiais. Sua utilização mais comum é a produção de embalagens descartáveis, correspondendo a cerca de 40% de todo plástico produzido (KAISER; SCHMID; SCHLUMER, 2018).

Um dos fatores de maior relevância, responsáveis pela grande disseminação na utilização do plástico de origem petroquímica, é o econômico, uma vez que o custo de produção do polímero utilizando petróleo possui custo reduzido em comparação a outras fontes (CHANPRATEEP, 2010; PIATTI; RODRIGUES, 2005). Entretanto, apesar das múltiplas vantagens e aplicações, o plástico está relacionado a impactos de alta magnitude, devido à, principalmente, sua permanência no meio ambiente após o descarte. Em virtude da baixa taxa de biodegradabilidade, esses materiais podem levar até 500 anos para se decompor (RAJMOHAN *et al.*, 2019).

Dado o curto ciclo de vida das embalagens plásticas, à obsolescência programada e a ineficiência da gestão pública de resíduos sólidos, o uso do plástico como matéria prima predominante está associado ao aumento dos níveis de poluição, sobretudo em ambientes aquáticos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2019). Entre os principais impactos ambientais causados pelo errôneo descarte do plástico, pode-se destacar o dano na biota marinha. Aproximadamente 700 espécies, incluindo ameaçadas de extinção, são afetadas pelos detritos plásticos (PARKER, 2019).

Em 2015 apenas 9% dos resíduos plásticos mundiais foram reciclados, enquanto que 12% foram incinerados e 79% foram acumulados em aterros ou ambientes naturais (GEYER *et al.*, 2015). O Brasil é o quarto maior produtor de resíduos plástico do mundo com 11,3 milhões de toneladas por ano, sendo que apenas 1,2% desse total é reciclado (KAZA *et al.*, 2018). Além dos impactos ambientais, a dependência em larga escala do petróleo para a produção de plástico resulta no declínio gradativo das reservas petrolíferas e consequentemente no aumento do preço dos combustíveis fósseis e seus derivados (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Os PHAs são poliésteres biodegradáveis e biocompatíveis sintetizados e acumulados no interior das bactérias como reservas de carbono e energia, quando há carbono em excesso e limitação de um ou mais elementos essenciais ao crescimento bacteriano, como nitrogênio, fósforo, magnésio ou oxigênio. Esses polímeros apresentam propriedades de termoplásticos ou elastômeros, insolúveis em água e não tóxicos (TANIGUCHI *et al.*, 2003).

Dentre os PHAs, o poli(-3-hidroxibutirato) (P3HB) é o mais conhecido e melhor caracterizado, podendo compor até 80% da massa seca celular (RODRIGUES, 2005). Apresenta propriedades físico-químicas parecidas às do polipropileno (PP), o que o torna uma potencial alternativa a este polímero de origem petroquímica (BARHAM, 1990; PANDIAN *et al.*, 2010). Entretanto, o alto custo de produção do PHA dificulta sua comercialização tornando-o até 10 vezes mais caro que plásticos convencionais (KUNIOKA; DOI, 1990). Sua biossíntese depende de vários fatores, como linhagem bacteriana, fonte de carbono, nitrogênio, concentração do substrato, temperatura e agitação. Diante disso, é necessária a otimização do processo fermentativo de modo a encontrar os melhores parâmetros de produção do polímero e garantir um maior rendimento (MARIN, 2017).

Apesar das inúmeras vantagens em comparação ao plástico de origem petroquímica, o alto custo associado a síntese do biopolímero inibem a produção em escala industrial. Os fatores que mais influenciam no custo são a matéria prima, o custo da fermentação, produtividade e rendimento no processo e processamento posterior (CHAUDHRY *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2008). Aproximadamente 50% do custo de produção de PHA provém do custo de sua matéria-prima, portanto, a escolha da fonte de carbono utilizada é essencial para garantir a viabilidade da sua produção em larga escala (KOLLER *et al.*, 2005; HALAMI, 2008).

No intuito de reduzir custos de produção, pesquisadores utilizam óleos vegetais como alternativa de fonte de carbono (ROCHA, 2017; HIDAYAT *et al.*, 2019; YOUSUF; WINTERBURN, 2017). A escolha do óleo vegetal deve levar em consideração o impacto que o mesmo traria no abastecimento a cadeia alimentar global, já que a produção em escala comercial do biopolímero poderia provocar a escassez do óleo e causar inflação em alguns países (SUDESH; IWATA, 2008).

Jatropha curcas, popularmente conhecida como Pinhão Manso, é caracterizada como uma cultura resistente, altamente adaptável, tolerante à seca e com alta adaptabilidade ecológica (OPENSHAW, 2000). É produtora de um óleo não comestível que possui baixa acidez (HASS; MITTELBAACH, 2000), baixa viscosidade (TIWARI; KUMAR; RAHEMAN, 2007), boa estabilidade à oxidação (MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998) e pode ser produzido a baixo custo (ALLEN *et al.*, 2010). Além disso, em estudos anteriores, o óleo de *J. curcas* se mostrou uma potencial matéria prima renovável para a produção de bioplásticos (NG *et al.*, 2011).

Dessa forma, esse trabalho visou avaliar os parâmetros de produção de P(3HB) por *Burkholderia glumae*, utilizando óleo de *Jatropha curcas* como fonte de carbono.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliação da biossíntese de poli(-3-hidroxibutirato) a partir de óleo de *Jatropha curcas* por *Burkholderia glumae* MA13.

2.2.Objetivos específicos

- Avaliação da produção de P(3HB) a partir de óleo de *Jatropha curcas* por *Burkholderia glumae* MA13, em diferentes concentrações de fonte de carbono e fontes de nitrogênio.
- Caracterização do PHA produzido.

3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polímeros

Os polímeros são macromoléculas de cadeia longa, constituídos por unidades menores, chamadas monômeros. Podem ser formados por repetições de unidades idênticas (homopolímeros) ou diferentes subunidades em várias sequências (copolímeros). Ocorrem naturalmente através do metabolismo de seres vivos, como proteínas, DNA e celulose. Quando os polímeros são resultados de modificações

químicas artificiais são chamados de polímeros sintéticos ou plásticos (KERSHAW, 2015; PIATTI; RODRIGUES, 2005).

A maioria dos monômeros utilizados para produção de plásticos, como etileno e propileno, são derivados de hidrocarbonetos fósseis. Diferentes combinações de monômeros produzem resinas plásticas com diferentes características, como resistência ou capacidade de moldagem (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). Uma prática comum na indústria de polímeros é a adição de substâncias denominadas aditivos, que conferem propriedades especiais à resina polimérica (PIATTI e RODRIGUES, 2005).

Os plásticos podem ser divididos em duas categorias principais: termorrígidos e termoplásticos. Os termorrígidos são polímeros que se solidificam irreversivelmente quando aquecidos. Dado sua durabilidade e resistência, são amplamente utilizados em automóveis e na construção civil. Os termoplásticos são polímeros nos quais as moléculas são mantidas juntas por ligações fracas, criando materiais que amolecem quando expostos ao calor. Os termoplásticos podem ser facilmente moldados em produtos como garrafas, sacolas e embalagens (HALDEN, 2010).

Devido à alta massa molecular característica dos polímeros, eles apresentam propriedades interessantes para indústria, como resistência mecânica, resistência térmica, estabilidade frente a substâncias químicas, resistência elétrica e permeabilidade a gases (PIATTI e RODRIGUES, 2005). São utilizados em todos os setores industriais e comerciais, mas seu uso predominante é destinado a produção de embalagens, representando 40% de todo plástico produzido (KAISER; SCHMID; SCHLUMER, 2018).

Existem muitos tipos de plásticos produzidos, sendo os mais comuns: polietileno (PE, alta e baixa densidade), polipropileno (PP), cloreto de polivinila (PVC), poliestireno (PS, incluindo EPS expandido), poliuretano (PUR) e tereftalato de polietileno (PET) (KERSHAW, 2015). Nenhum dos plásticos comumente utilizados são biodegradáveis. Como resultado, eles se acumulam, ao invés de se decompor, em aterros ou em ambientes naturais (BARNES *et al.*, 2009).

Segundo Macarthur (2017), cerca de 8 milhões de toneladas de resíduos plásticos são lançados no mar anualmente, afetando diretamente a vida marinha. Estima-se que 90% das aves marinhas tenham ingerido o polímero (WILCOX *et al.*,

2015; GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). Além disso, em ambientes aquáticos, o plástico sofre intemperismo devido aos raios UVs, sendo fragmentado em pequenas partículas chamadas microplásticos. O polipropileno representa 37% de todo microplástico encontrado nos oceanos (KERSHAW, 2015).

Microplásticos são altamente biodisponíveis para organismos marinhos, seja por ingestão direta ou indiretamente por transferência trófica. Entre muitos os efeitos relacionados ao microplástico, pode-se citar a bioacumulação de aditivos tóxicos, impactando também a vida humana. Muitos aditivos nos plásticos têm sido associados a graves distúrbios de saúde, incluindo distúrbios hormonais. Estudos relataram que os BPAs, aditivo comumente utilizado, estão associados à diabetes em adultos, puberdade precoce e até obesidade (NELMS *et al.*, 2018; RAJMOHAN *et al.*, 2010).

Os métodos de disposição dos resíduos também são desafiadores. A incineração libera gases tóxicos. A reciclagem pode não ser economicamente viável, uma vez que a composição dos materiais variam, a presença de aditivos incorporados dificulta o reaproveitamento e as aplicações do plástico pós reciclagem podem ser limitadas devido às alterações das propriedades durante o processo (ANJUM *et al.*, 2016; CASTILHO; MITCHELL; FREIRE, 2009). Dessa forma aproximadamente 40% dos resíduos plásticos é destinado à aterros sanitários e 32% acumulados em ambientes naturais (MACARTHUR, 2017).

É estimado que o consumo de plástico aumente 5% por ano, intensificando assim os impactos socioambientais que esses polímeros estão associados (RAJMOHAN *et al.*, 2019). Além de estimular políticas ambientais de resíduos sólidos e mitigar os impactos existentes, é necessário investir em alternativas que possam ser utilizadas em substituição do plástico convencional, como os polímeros biodegradáveis, também chamados de bioplásticos (PIATTI; RODRIGUES, 2005).

3.2 Biopolímeros

Os biopolímeros podem ser classificados de três maneiras distintas conforme sua composição e sua capacidade de biodegradação. Existem polímeros biodegradáveis que são produzidos por fontes não renováveis, como os copolímeros de tereftalato de polibutileno; polímeros fabricados com materiais renováveis porém

que não possuem propriedades biodegradáveis, como os polímeros de propanodiol; e por fim, os polímeros biodegradáveis de base verde, como os polihidroxialcanoatos. (DE PAULA *et al*, 2019; AVELLA *et al.*, 2001; CHANPRATEEP, 2010). Conforme definido pela norma ASTM (American Society for Testing and Materials) 6400, os plásticos biodegradáveis são materiais que se degradam em dióxido de carbono, água, biomassa e outros compostos simples, como resultado da ação de microrganismos (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

A biodegradabilidade dos biopolímeros é um fator de interesse ambiental, uma vez que, dependendo das características físico químicas do bioplástico, esse poderia ser utilizado como substituto em embalagens descartáveis, atenuando dessa maneira os inúmeros impactos ambientais que o alto consumo desse material está associado. Enquanto que os plásticos de origem petroquímicas podem demorar centenas de anos para se decompor; os biopolímeros são rapidamente degradados em água e dióxido de carbono, em condições aeróbias; e em metano e outros compostos simples, em ambientes anaeróbios (ANJUM *et al.*, 2016; KERSHAW, 2015; KHANNA; SRIVASTAVA, 2004).

Naturalmente, os biopolímeros são produzidos por uma variedade de microrganismos e plantas. A maioria dos biopolímeros é biocompatível, ou seja, eles não têm efeitos adversos nos sistemas biológicos (ANJUM *et al.*, 2016), podendo ter aplicações na indústria médica e farmacêutica, como na produção de cápsulas de medicamentos; na obtenção de próteses e enxertos de tecidos humanos; na produção de malhas e fibras para suturas em cirurgias e na terapia contra o câncer, sendo utilizados como carreadores de substâncias antitumorais; (KILIÇAI *et al.*, 2011; HSIEH *et al.*, 2011; BRIGHAM *et al* , 2012).

Segundo Lopes (2010), os biopolímeros com resultados mais promissores são os polilactatos (PLA) e os polihidroxialcanoatos (PHA). Os PHA são termoplásticos naturais que ocorrem no interior de uma gama de bactérias, enquanto o PLA é produzido através da polimerização do ácido láctico oriundo da fermentação (LOPES, 2010). Conforme demonstrado na Tabela 1, apesar do alto custo de produção, o PHA possui mais vantagens em comparação com o PLA, devido, principalmente, às características e aplicações do material.

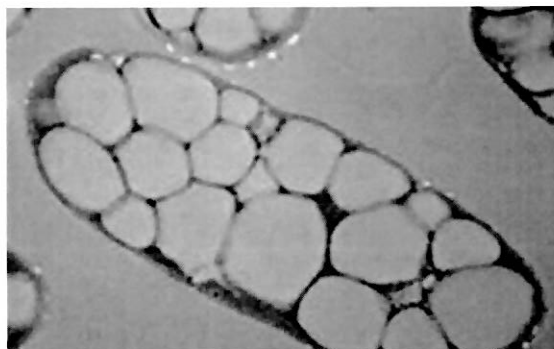
Tabela 1: Comparação entre polilactatos (PLA) e poli-hidroxialcanoatos (PHA)

PLA vs. PHA	PLA	PHA
Estrutura do monômero	Apenas D- e L-ácido láctico (AL)	Pelo menos 130 monômeros
Custo de produção	Comparável com os dos plásticos convencionais como o PET	Pelo menos 2x o do PLA
Propriedades do material	Pobre, pode ser ajustada regulando a proporção de D e L-AL	De rígido, flexível a elástico, completamente controlável
Maturidade tecnológica	A produção de AL está estabelecida, porém a polimerização a PLA é complicada. Apenas uma companhia, NatureWorks, produz PLA em grande escala.	Ao menos 10 companhias no mundo estão produzindo PHA em escala maior que 2000 t por ano via fermentação microbiana.
Investimento	Grande investimento em capital fixo: Nature Works investiu 1 bilhão U\$S nos últimos anos em uma planta de 140000 ton por ano.	Pequeno investimento: plantas atuais de fermentação microbiana aeróbica podem ser utilizadas para a produção de PHA.
Propriedade intelectual	Coberta na maioria das áreas de aplicação e produção	Muito espaço para exploração
Áreas de aplicação	Embalagens, implantes médicos, impressão, vestuário e etc. Ainda limitado pela temperatura de transição vítrea de 65 a 75°C para baratos P(L-LA).	Para quase todas as áreas da indústria de plástico convencional, limitado apenas no alto custo atual.

Fonte: Chen (2009)

3.3 Polihidroxialcanoatos (PHAs)

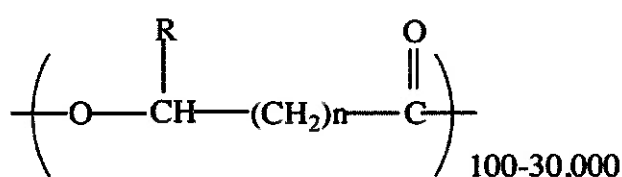
Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres termoplásticos sintetizados por microrganismos como grânulos intracelulares (Figura 1) de reserva de energia (Poli *et al.*, 2011). Os grânulos possuem 0.2 ± 0.5 mm de diâmetro. A biossíntese do polímero ocorre na presença de excesso de carbono e limitação de nutrientes (ANJUM *et al.*, 2016; SHAH *et al.*, 2008; PHILIP; KESHAVERZ; ROY, 2007). São compostos por 10^3 a 10^4 monômeros de ácidos hidroxialcanoatos formando poliésteres de cadeia alifática, possuindo uma grande variedade estrutural (ANDERSON; DAWES, 1990; DE PAULA, 2012). A estrutura geral dos PHAs é mostrada na Figura 2.

Figura 1: Grânulos intracelulares de PHA

Fonte: Tan; Yin; Chen (2017)

O polímero foi descoberto pelo cientista francês Lemoigne em *Bacillus megaterium* na forma de poli (3-hidroxibutirato) (PHB) em 1925 (CHEE *et al.*, 2010). Até o momento, mais de 90 gêneros de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram identificados como produtores de PHAs em condições aeróbias e anaeróbias (RAZA *et al.*, 2018; ZINN *et al.*, 2001).

Figura 2: Estrutura geral do PHA



Fonte: Chen (2009)

Os polihidroxialcanoatos podem ser classificada em dois grupos, baseados no número de átomos de carbono da cadeia dos polímeros ramificados que podem variar de 3 a 14 átomos de carbono: PHA de cadeia curta ou de cadeia média (TAGUCHI; DOI, 2004). Os PHAs de cadeia curta (scl-PHA) são formados por 3 a 5 átomos de carbono, como o poli (3-hidroxibutirato) P (3HB). Já os PHAs de cadeia média (mcl-PHA) consistem em 6 a 14 ou mais de 14 átomos de carbono, tem-se como exemplo o poli (3-hidroxi-hexanoato) (ALDOR; KEASLING, 2003). Existe ainda, os PHA de cadeia longa, porém são incomuns e menos estudados (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011).

As diferentes estruturas do PHA variam de acordo com microrganismo e das condições durante a fase de crescimento, como concentração do substrato, pH e condições de fermentação (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Além disso, as características químicas e físicas do polímero, como ponto de fusão, temperatura de transição vítrea, grau de cristalinidade e capacidade hidrofóbica dependem da composição monomérica e variam consideravelmente entre os PHAs (CRANK *et al.*, 2004)

De forma geral, os PHA são insolúveis em água, possuem boa resistência a raios UV e sedimentam em água, o que facilita a biodegradação anaeróbia em ambientes aquáticos. Além disso, são biocompatíveis e biodegradáveis. A taxa de

biodegradabilidade varia conforme o tipo e composição do polímero, condições do meio ambiente e o tipo de microrganismo, podendo variar de semanas e até mesmo ultrapassar um ano. (RAZA *et al.*, 2018; BUGNICOURT *et al.*, 2014; MASOOD; YASIN; HAMEED, 2014)

3.4 Polihidroxibutiratos (PHBs)

O poli-3-hidroxibutirato (PHB) foi o primeiro PHA a ser descoberto e é o mais conhecido e melhor caracterizado. É um polímero de cadeia curta, composto por monômeros de ácido 3-hidroxibutírico, apresentando o grupo metil no radical R. O PHB possui propriedades mecânicas similares aos polietilenos e polipropilenos, sendo uma boa alternativa para o plástico convencional (ANJUM *et al.*, 2016).

O PHB é biodegradável, apresenta boa resistência à umidade e ótimas propriedades termoplásticas. Devido à alta cristalinidade e baixa flexibilidade é um material altamente quebradiço e rígido, tornando suas aplicações limitadas (ANJUM *et al.*, 2016; DE PAULA, 2012). Entretanto, as propriedades mecânicas do polímero podem ser modificadas, através da produção de polímeros de alto massa molecular, melhorando as características físicas no bioplástico, desse modo diversificando a gama de aplicações (RAZA *et al.*, 2018).

Suas similaridades com o plástico convencional permitem que o polímero seja utilizado como substituto para fabricação de embalagens de uso único, copos e talheres descartáveis, frascos de shampoo, forros de fralda, laminas de barbear, garrafas plásticas e embalagens de alimentos em geral (CHEN, 2009; BATCHA *et al.*, 2014). Devido a biodegradabilidade do polímero, sua substituição em larga escala do plástico convencional traria uma significativa melhora na qualidade ambiental, principalmente nos ambientes aquáticos (ANJUM *et al.*, 2016).

3.5 Microrganismos produtores de PHA

Devido ao alto custo associado à produção do PHA, é necessário investir na pesquisa e otimização de linhagens bacterianas que tenham como característica: alta porcentagem de PHA acumulado em sua biomassa, rápido crescimento em fontes de carbono de baixo custo, alta eficiência de transformação da fonte de carbono em PHA,

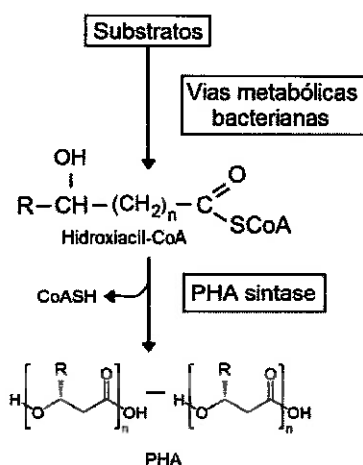
que produza um polímero de fácil extração além de não apresentar riscos à saúde humana (KHANNA; SRIVASTAVA, 2004; DE PAULA, 2012).

Entre as linhagens bacterianas que são conhecidas por acumular uma grande quantidade de PHA pode-se citar: *Cupriavidus necator*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, e *Burkholderia sp.* Porém já foram reportadas mais de 300 espécies que possuem a capacidade de sintetizar PHA (Anjum *et al*, 2016).

Em estudos recentes, a *Burkholderia glumae* 13 obteve resultados satisfatórios com a fermentação utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono, com acúmulo de 49% de polímero na biomassa e um rendimento de 0,3 g de PHB para cada g de substrato (g/g). Os valores obtidos de PHB utilizando óleo foram superiores em comparação ao glicerol nesse estudo (DE PAULA *et al*, 2019). Além disso, Bandeira *et al.* (2020) reportou um rendimento de 0,39 g/g utilizando a cepa *Burkholderia cepacia* e óleo de girassol como substrato.

O conhecimento das vias metabólicas que levam a acumulação do PHA no interior bacteriano é importante para a otimização do processo produtivo, conforme Figura 3. Existem 4 rotas metabólicas para a síntese do polímero, que dependem da fonte de carbono fornecida (MENG *et al.*, 2014). A via de síntese de PHA utilizando óleo como fonte de carbono está ligada ao ciclo da β -oxidação de ácidos graxos. Como intermediários desse ciclo é gerado hidroxiacil-coA, os quais serão reconhecidos e polimerizados pela enzima PHA síntese. A PHA sintase é considerada a enzima chave para o acúmulo de PHA, pois catalisa a etapa decisiva da via metabólica: a polimerização de unidades (R)-3-hidroxiacil-CoA, formando o polihidroxialcanoato (STEINBÜCHEL, 1996; SOLAIMAN; ASHBY, 2005; VANZIN, 2008).

Figura 3: Via metabólica simplificada da síntese de PHA



Fonte: Gomez; Bueno Netto (2001)

3.6 Óleo de *Jatropha curcas*

A utilização de óleos vegetais como fonte de carbono na produção de PHA tem se mostrado promissora. Park e Kim (2011) obtiveram bons resultados com 83% de PHA acumulado no interior das células, utilizando óleo de soja como substrato. Além disso, López-Cuellar *et al.* (2010) conseguiu atingir 92% de PHA usando óleo de canola. Similarmente, Ng *et al.* (2009) reportou um total de 87% de PHB acumulado na fermentação de *C.necator* utilizando óleo de *Jatropha curcas* como principal matéria prima (BATCHA *et al.*, 2014).

Jatropha curcas, é uma arvoreta da família *Euphorbiaceae*, conhecido popularmente no Brasil como pinhão-mansinho. É nativa da América do Sul e Central, mas foi difundida na maioria das regiões tropicais do mundo (GÜBITZ; MITTELBACH; TRABI, 1999). É caracterizada como uma cultura resistente, altamente adaptável a diferentes condições de cultivo, tolerante a seca e com alta adaptabilidade ecológica (OPENSHAW, 2000). Além disso, *J. curcas* é considerada uma espécie de múltiplas aplicabilidades, podendo ser utilizada para controle de erosão e recuperação de terrenos baldios e terras secas, na fabricação de sabão e tintas, assim como na medicina popular (VIRGENS *et al.*, 2017; OPENSHAW, 2000)

A partir da semente, a planta é produtora de um óleo não comestível que possui baixa acidez (HASS; MITTELBACH, 2000), baixa viscosidade (TIWARI; KUMAR;

RAHEMAN, 2007), boa estabilidade à oxidação (MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998) e pode ser produzido a baixo custo (ALLEN *et al.*, 2010). Devido à essas características, seu potencial na produção de biocombustível substituto dos derivados do petróleo tem sido reconhecido (BRITTAINE; LUTALADIO, 2010).

Os principais ácidos graxos encontrados no óleo de *Jatropha curcas* são: oléico (41,5-48,8%), linoléico (34,6-44,4%), ácido palmítico (10,5-13,0%) e ácidos esteáricos (2,3-2,8%) (VIRGENS *et al.*, 2017). A fórmula empírica de cada ácido graxo é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Formula empírica dos ácidos graxos que compõem o óleo de *Jatropha curcas*.

Ácidos graxos	Fórmula Empírica
Oléico	$C_{18}H_{34}O_2$
Linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$
Palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$
Ácidos esteáricos	$C_{18}H_{36}O_2$

Fonte: Adaptado de Oliveira et al (2014)

Segundo NG *et al.* (2011), a composição de ácidos graxos do óleo de *J. curcas* é conhecido por proporcionar um alto rendimento na produção de PHB. Durante a fermentação, as células de *C. necator* utilizam ácidos oleicos ($C_{18:1}$), ácidos palmíticos (C_{16}) e ácidos linoleicos ($C_{18:2}$) para o crescimento celular. Segundo o autor, o teor mínimo de ácido linolênico e alto teor de ácido oleico, linoléico e palmítico no óleo de *J. curcas* justificam o alto acúmulo de PHB que pode ser obtido a partir desse substrato (SALIMON; ABDULLAH, 2008).

Além disso, por ser um óleo não comestível, o óleo de *J. curcas* teria uma vantagem sobre outros óleos vegetais, já que sua utilização em larga escala para a produção de PHB não afetaria a cadeia global de alimentação (BATCHA *et al.*, 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Meios de cultivo

Foram utilizados os meios de cultivo Meio Lisogênico (Luria-Bertani) (LB) e Meio Mineral (MM) (RAMSAY *et al.*, 1990). O pH do meio foi ajustado para 7.

4.1.1 Meio Lisogênico (LB)

Triptona.....	10,0 g/L
Extrato de Levedura.....	5,0 g/L
NaCl.....	5,0 g/L
Para o meio LB sólido foi acrescentado ágar 15-20 g/L	

4.1.2 Meio Mineral (MM)

Na ₂ HPO ₄	3,5g/L
KH ₂ PO ₄	1,5g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,01 g/L
Citrato férrico amoniacal.....	0,06 g/L
Solução de elementos traços.....	1 mL

Solução de elementos traços:

H ₃ BO ₃	0,30 g/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,20 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,10 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03 g/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,03 g/L
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g/L

Ao Meio Mineral foram adicionadas diferentes concentrações de óleo de *Jatropha curcas* como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio, nitrato de sódio, cloreto de amônio, fosfato de amônio monobásico e nitrato de amônio) a concentração fixa de 1 g/L, para a análise das melhores condições na produção de P(3HB).

4.2 Esterilização

Todos os meios de cultivo e soluções utilizadas foram esterilizados em autoclave vertical a 121°C e 1 atm, durante 20 minutos.

4.3 Microrganismos

Utilizou-se a linhagem *Burkholderia glumae* MA13, isolada de solo da Mata Atlântica (DE PAULA, 2012). As linhagens bacterianas foram preservadas em tubos criogênicos contendo glicerol a 40 %, sob congelamento a -80 °C, além de através de estoque em ampolas liofilizadas, seladas à vácuo e mantidas em refrigerador (5-10 °C).

4.4 Cultivo de microrganismos

Os cultivos bacterianos foram realizados em duplicatas em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de MM, para avaliação da produção de PHB a partir do óleo de *Jatropha curcas*. Inicialmente, a linhagem *B. glumae* MA13 foi estriada em meio LB sólido a partir da cultura estoque, durante 24h a 34 °C. Colônias isoladas foram transferidas para 50 mL de LB, sendo incubado em shaker durante 24 h, a 34 °C e 150 rpm. Inóculos de 5 mL deste cultivo foram transferidos para inocular os meios de produção contendo 50 mL de Meio Mineral em cada. Analisou-se a produção do polímero em diferentes concentrações de fonte de carbono (10, 20, 30, 40 e 50 g/L) e em diferentes fontes de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio, nitrato de sódio, cloreto de amônio, fosfato de amônio monobásico e nitrato de amônio) a 1 g/L, totalizando 60 amostras. A fermentação foi conduzida em shaker durante 96 h a 34 °C e 150 rpm.

4.5 Determinação da biomassa

A determinação de concentração de biomassa foi analisada pelo método de gravimetria, através da pesagem de massa seca celular (MSC). Os precipitados ("pellets") obtidos das amostras centrifugadas, provenientes dos cultivos, foram submetidos à secagem em estufa a 105 °C por 24 h e pesados.

4.6 Determinação do óleo residual

As análises das concentrações do óleo de *Jatropha curcas* residual foi determinada gravimetricamente. Amostras de 40 mL do caldo de cultivo foram centrifugadas por 10 minutos, a 10000 RPM e a 4°C após a fermentação, sendo o sobrenadante conduzido a um processo de extração com 4 mL de hexano. Após a separação das fases, a fase superior, contendo hexano e óleo foi transferida para frascos pré tarados, sendo o hexano evaporado em estufa a 65 °C por 24h. Em seguida, os frascos foram pesados novamente. O óleo residual foi calculado através da diferença entre as concentrações iniciais e finais dos frascos pesados. A partir desses dados foi possível calcular o consumo de substrato para cada experimento.

4.7 Determinação de PHAs

A quantificação e composição do polímero PHB foi determinada a partir da cromatografia gasosa de metil-ésteres acoplada a espectrometria de massa (BRANDL *et al.*, 1988; TIMM & STEINBÜCHEL, 1992; HUIJBERTS *et al.*, 1994). Entre 5 - 10 mg de células liofilizadas (pellets) foram submetidas à reação de metanólise em tubos através da adição de 2 mL clorofórmio, 2 mL de metanol acidificado com H₂SO₄ 15% (85:15 v/v) e 100 µL de ácido benzoico como padrão interno. A reação foi conduzida a 85 °C durante 4 h. Após a reação de metanólise, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se 2 mL de água ultrapura aos mesmos, sendo agitados por 30 segundos. Após a separação das fases aquosa (superior) e orgânica (inferior), a primeira foi descartada, utilizando, então, a fase orgânica para a análise de metil-ésteres

Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após o fracionamento de amostra ("Split" 1:100) em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de

massa GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu®), equipado com a coluna Rtx-Wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As temperaturas do injetor e da interface eram 250 e 220°C, respectivamente, utilizando-se hélio como gás de arraste a 0,8 mL/min. As temperaturas do forno foram iniciadas a 80°C, por 3 minutos, elevando a 200°C a uma razão de 10°C/min, e mantendo-se a 200°C por 10 minutos. Foi utilizado o padrão P(3HB-co-3HV) (Sigma-Aldrich®) para geração de curvas de calibração. Além disso, foi calculado o rendimento, YP(3HB) /óleo consumido (g/g), de cada experimento, a fim de se verificar a conversão de substrato consumido (óleo de *Jatropha curcas*) em produto (P(3HB)), através da razão entre a quantidade de P(3HB) (g/L) produzido e a quantidade de óleo consumido (g/L) em cada experimento, levando em consideração tanto a fonte de carbono utilizada para a produção do polímero, como aquela direcionada ao crescimento celular (XR).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono (óleo de *J. curcas*) e diferentes fonte de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio, nitrato de sódio, cloreto de amônio, fosfato de amônio monobásico e nitrato de amônio), por *Burkholderia glumae* MA13.

Foram realizadas 6 fermentações com o objetivo de avaliar os melhores parâmetros para a produção de P(3HB) utilizando óleo de *J. curcas* como fonte de carbono. Em cada fermentação, 5 concentrações de óleo foram testadas (10, 20, 30, 40 e 50 g/L) e uma fonte de nitrogênio diferente foi utilizada a uma concentração fixa de 1g/L. Os experimentos foram conduzidos a 34°C, 150 rpm durante 96 horas.

Os resultados obtidos foram avaliados em função do consumo de óleo (g/l); produção de biomassa ou massa seca celular (MSC (g/l); porcentagem de PHB acumulado no interior da célula (%); concentração de PHB (g/L); rendimento (YPHB (g/g)), calculado em função da quantidade de polímero produzido em relação a quantidade de óleo consumido pela bactéria; e biomassa residual (XR (g/L)), calculado a partir da diferença entre MSC e polímero sintetizado.

5.1.1 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando ureia ((NH₂)₂CO) como fonte de nitrogênio, por *Burkholderia glumae* MA13

Os experimentos foram conduzidos utilizando óleo de *J. curcas* como fonte de carbono em 5 concentrações: 10, 20, 30, 40, 50 g/L, a 34°C, 150 rpm durante 96h. Foi utilizado ureia como fonte de nitrogênio a uma concentração de 1g/L. Os resultados obtidos a partir dos experimentos podem ser observados na Tabela 3. O maior valor de produção de P(3HB) foi obtido na concentração de 50 g/L de óleo de *J. curcas*, sendo observado uma produção de 1,44±0,16 g/L do polímero. Entretanto, devido ao alto valor de consumo de óleo, o rendimento apresentou um valor de apenas 0,05±0,00 g/g para essa concentração de carbono

Naturalmente, conforme a disponibilidade da fonte de carbono aumentou, maior foi o consumo de óleo (Figura 5). Entretanto, esse padrão não foi observado no acúmulo intracelular do polímero (Figura 6 e Figura 7). Os valores obtidos de massa seca celular (MSC) foram altos, atingindo 8,3±0,10 g/l para 40 g/L de óleo (Figura 4). Em trabalhos utilizando a mesma cepa e ácidos graxos como substrato, foi observado valores de MSC em torno de 5 g/L (DE PAULA *et al.*, 2019).

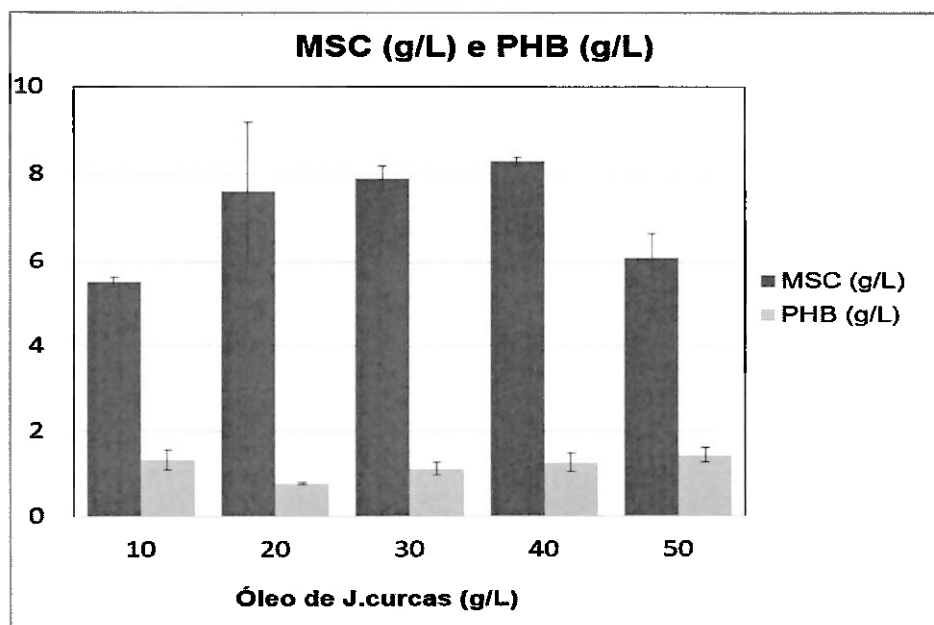
Os maiores valores de acúmulo intracelular de polímero em porcentagem de biomassa e melhor rendimento, 24±3,00 % e 0,14±0,05 (g/g), respectivamente, foram obtidos na concentração de 10 g/L de óleo. Indicando que a o aumento da relação C/N não foi um fator decisivo na produção do polímero para esse experimento.

Tabela 3 :Produção de P(3HB) a partir de óleo de *J. curcas* em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 g/L), contendo 1 g/L de ureia, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.

Óleo de <i>J. curcas</i> (g/L)	Consumo de óleo (g/L)	MSC (g/L)	PHB (%)	PHB (g/L)	Y _{PHB} (g/g)	XR (g/L)
10	9,300±0,20	5,5±0,10	24±3,00	1,33±0,23	0,14±0,02	4,17±0,13
20	17,475±0,27	7,6±1,60	11±2,70	0,78±0,03	0,04±0,00	6,82±1,63
30	22,375±0,12	7,9±0,30	14±2,40	1,12±0,15	0,05±0,00	6,78±0,44
40	27,150±0,80	8,3±0,10	15±2,80	1,27±0,21	0,05±0,00	7,02±0,31
50	30,700±1,85	6,1±0,50	23±0,70	1,44±0,16	0,05±0,00	4,66±0,33

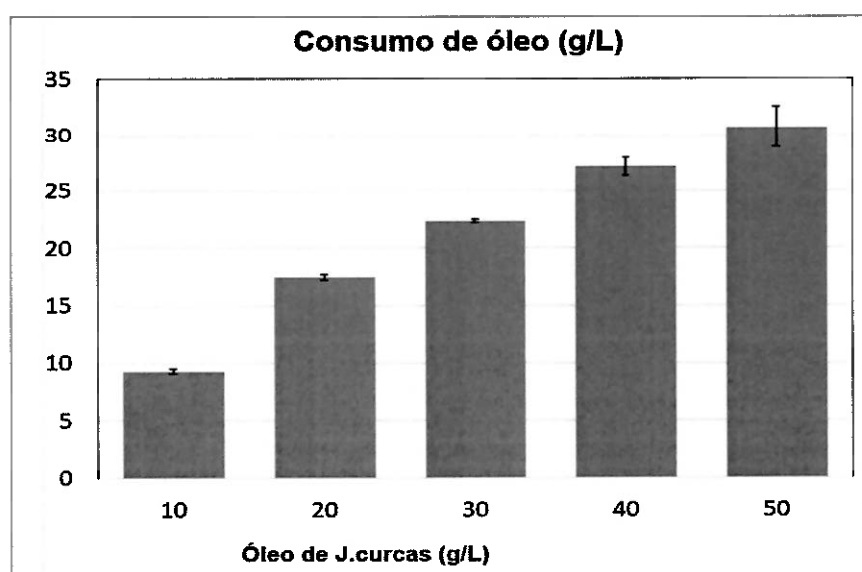
Fonte: Autora (2020)

Figura 4: Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de óleo de *J.curcas* em Meio Mineral, contendo 1 g/L de ureia, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo.



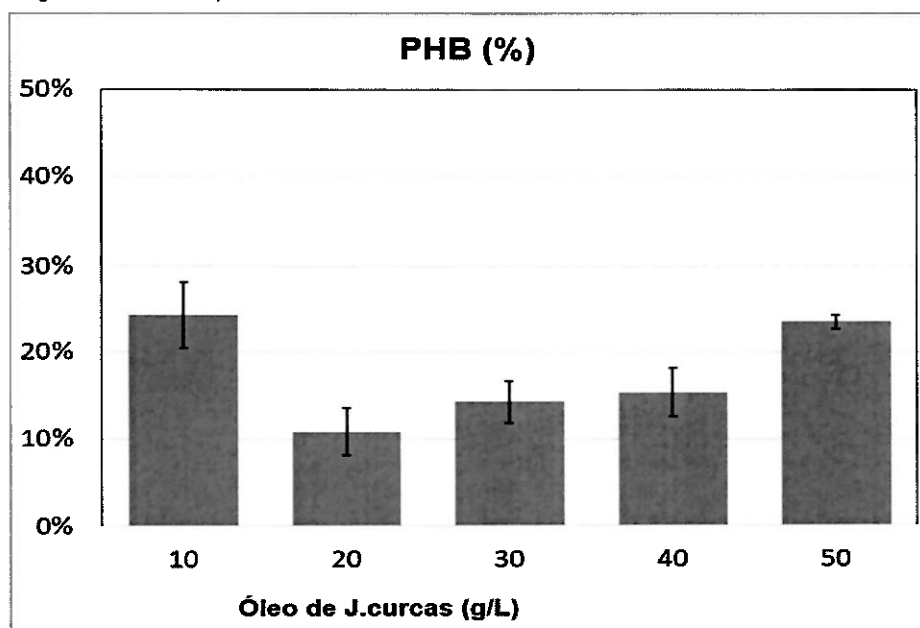
Fonte: Autora (2020)

Figura 5: Consumo de óleo de *J.curcas* (g/L) em Meio Mineral, contendo 1 g/L de ureia, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo.



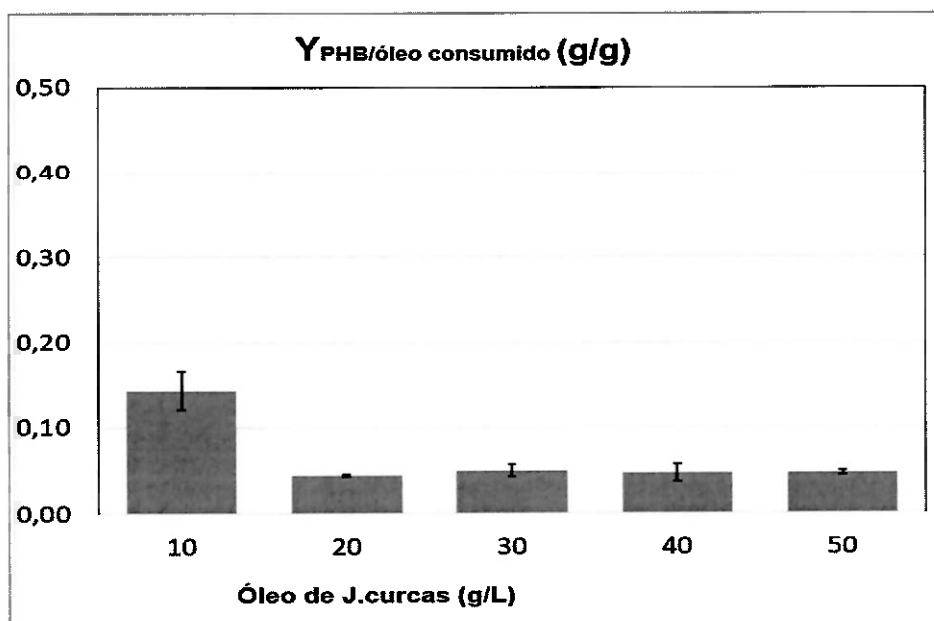
Fonte: Autora (2020)

Figura 6: Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [PHB%] a partir de óleo de *J.curcas* em diferentes concentrações, contendo 1 g/L de ureia, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.



Fonte: Autora (2020)

Figura 7: Rendimento de produção de P(3HB) em razão do óleo consumido $Y_{PHB}/\text{óleo consumido}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de óleo de *J.curcas*, contendo 1 g/L de ureia, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.



Fonte: Autora (2020)

5.1.2 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, por *Burkholderia glumae* MA13

Os experimentos foram conduzidos utilizando óleo de *J. curcas* como fonte de carbono em 5 concentrações: 10, 20, 30, 40, 50 g/L, a 34°C, 150 rpm durante 96h. Foi utilizado sulfato de amônio como fonte de nitrogênio a uma concentração de 1g/L. Os resultados obtidos a partir dos experimentos podem ser observados na Tabela 4. O maior valor de produção de P(3HB) e acúmulo intracelular do polímero foi obtido na concentração de 40 g/L de óleo de *J. curcas*, sendo observado uma produção de $1,47 \pm 0,03$ g/L e um acúmulo de $29 \pm 6\%$. Apesar do alto consumo de óleo, o rendimento apresentou um valor de $0,08 \pm 0,00$ g/g para essa concentração de carbono, sendo o mais alto obtido nesse experimento (Figura 8 e Figura 11).

Naturalmente, conforme a disponibilidade da fonte de carbono aumentou, maior foi o consumo de óleo (Figura 9). Apesar dos resultados obtidos para concentração de 50 g/L de óleo serem divergentes, pode-se observar um padrão crescente no acúmulo intracelular do polímero com o aumento da concentração da fonte de carbono (Figura 10). Para 50 g/L de óleo, o valor da biomassa foi o mais alto, com 6,1 g/L, entretanto, a porcentagem de PHB intracelular foi a mais baixa, com apenas 10%. Indicando que pode ter ocorrido uma falha no processo de extração do polímero.

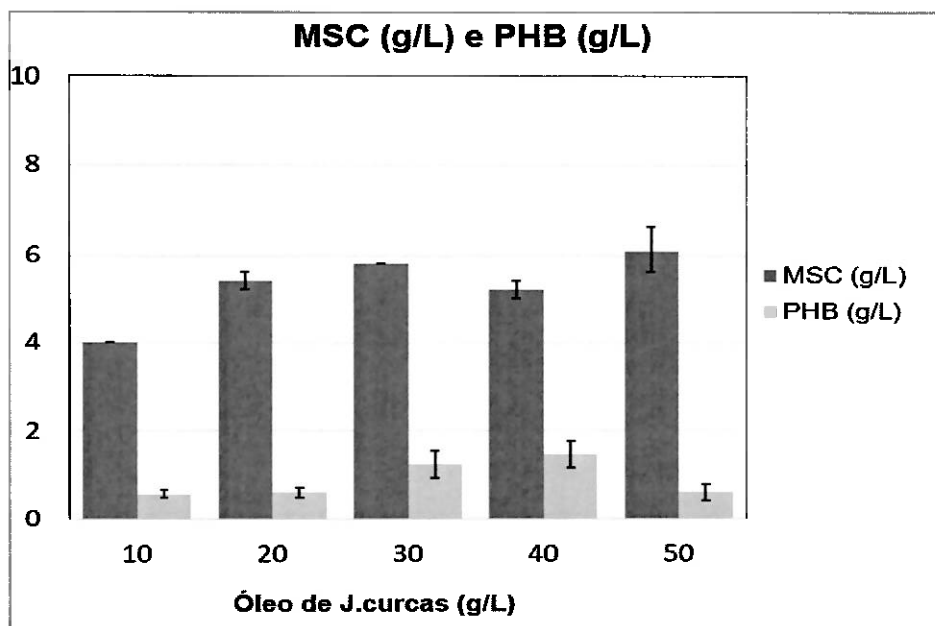
Em relação as outras fontes de nitrogênio testadas, o sulfato de amônio apresentou resultados inferiores em quase todos parâmetros avaliados.

Tabela 4 : Produção de P(3HB) a partir de óleo de *J. curcas* em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 g/L), contendo 1 g/L de sulfato de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.

Óleo de <i>J. curcas</i> (g/L)	Consumo de óleo (g/L)	MSC (g/L)	PHB (%)	PHB (g/L)	V_{PHB} (g/g)	XR (g/L)
10	$9,050 \pm 0,15$	$4,0 \pm 0,00$	$14 \pm 2,10$	$0,58 \pm 0,08$	$0,06 \pm 0,00$	$3,42 \pm 0,08$
20	$14,550 \pm 0,25$	$5,4 \pm 0,20$	$11 \pm 1,70$	$0,61 \pm 0,11$	$0,04 \pm 0,00$	$4,79 \pm 0,08$
30	$18,300 \pm 2,45$	$5,8 \pm 0,00$	$21 \pm 5,00$	$1,24 \pm 0,29$	$0,07 \pm 0,02$	$4,56 \pm 0,29$
40	$20,600 \pm 4,1$	$5,2 \pm 0,20$	$29 \pm 6,00$	$1,47 \pm 0,30$	$0,08 \pm 0,03$	$3,73 \pm 0,50$
50	$25,650 \pm 3,85$	$6,1 \pm 0,50$	$10 \pm 4,00$	$0,61 \pm 0,19$	$0,02 \pm 0,01$	$5,49 \pm 0,69$

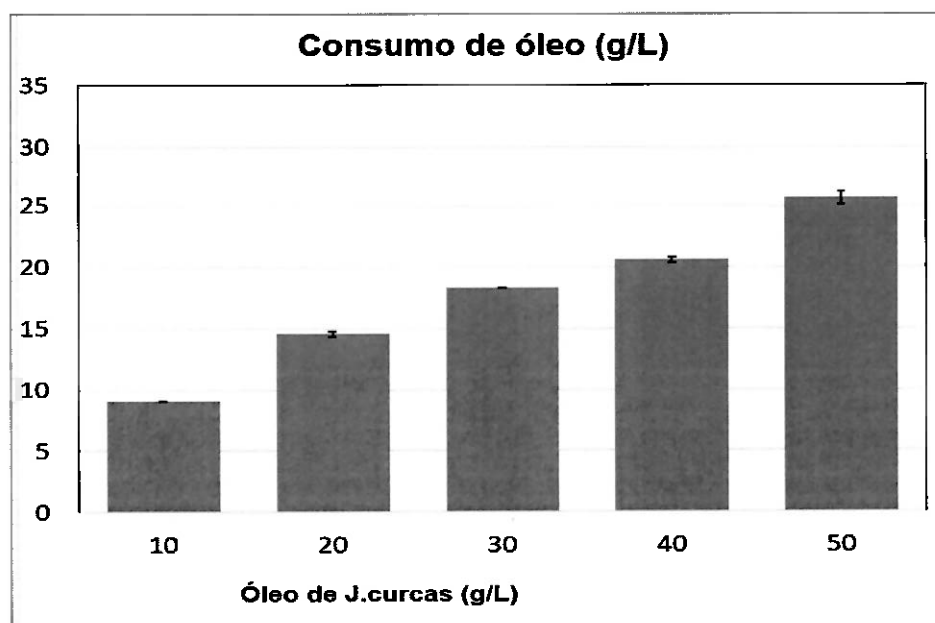
Fonte: Autora (2020)

Figura 8: Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de óleo de *J.curcas* em Meio Mineral, contendo 1 g/L de sulfato de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo.



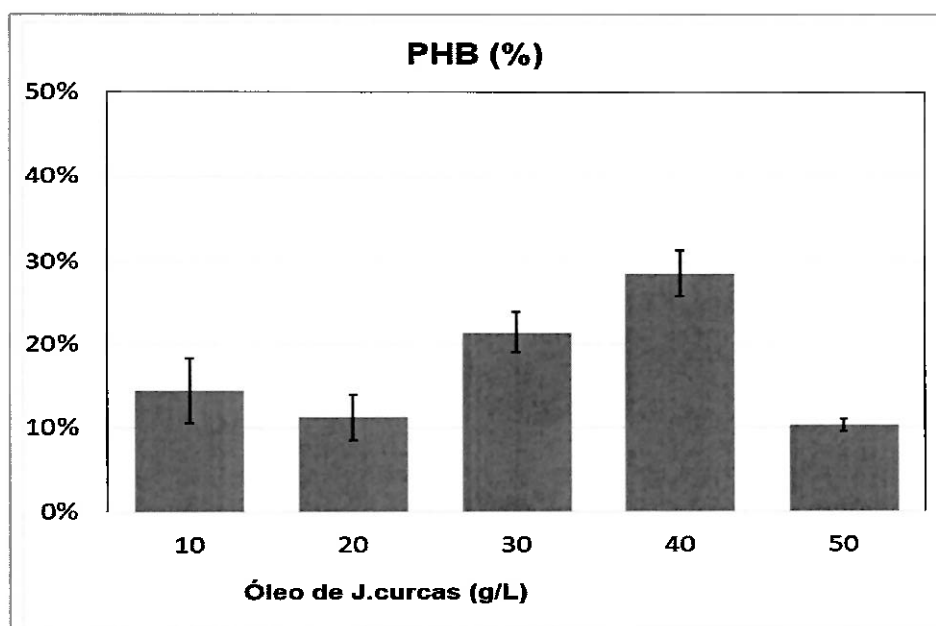
Fonte: Autora (2020)

Figura 9: Consumo de óleo de *J. curcas* (g/L) em Meio Mineral, contendo 1 g/L de sulfato de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo



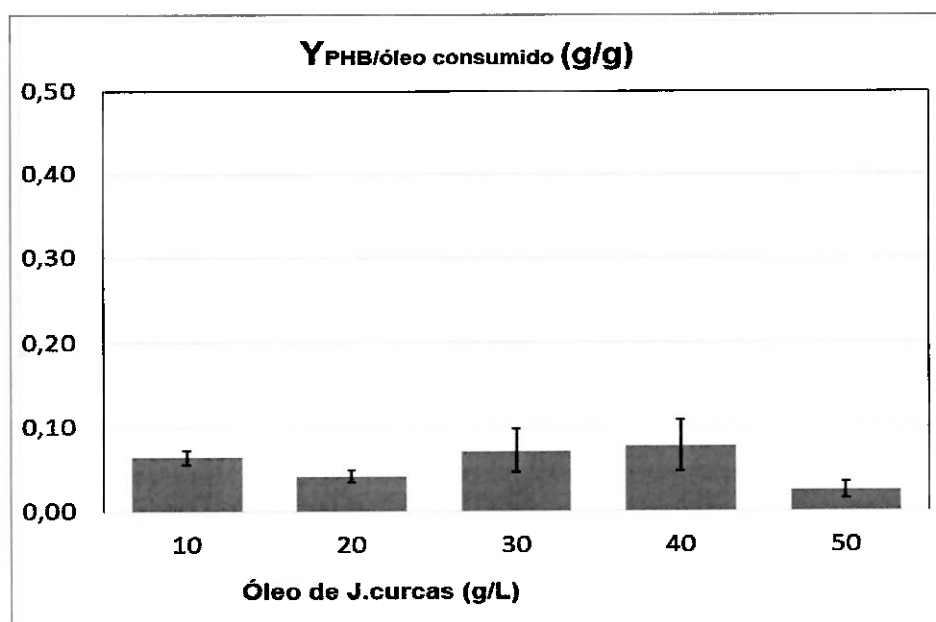
Fonte: Autora (2020)

Figura 10: Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [PHB%] a partir de a partir de óleo de *J.curcas* em diferentes concentrações, contendo 1 g/L de sulfato de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo



Fonte: Autora (2020)

Figura 11: Rendimento de produção de P(3HB) em razão do óleo consumido $Y_{PHB}/\text{óleo consumido}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de óleo de *J.curcas*, contendo 1 g/L de sulfato de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.



Fonte: Autora (2020)

5.1.3 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando nitrato de sódio (NaNO₃) como fonte de nitrogênio, por *Burkholderia glumae* MA13

Os experimentos foram conduzidos utilizando óleo de *J. curcas* como fonte de carbono em 5 concentrações: 10, 20, 30, 40, 50 g/L, a 34°C, 150 rpm durante 96h. Foi utilizado nitrato de sódio como fonte de nitrogênio a uma concentração de 1g/L. Os resultados obtidos a partir dos experimentos podem ser observados na Tabela 5. O maior valor de produção de P(3HB) e acúmulo intracelular do polímero foi obtido na concentração de 10 g/L de óleo de *J. curcas*, sendo observado uma produção de 3,27±0,04 g/L e um acúmulo de 56±1,2%, sendo os mais altos entre as fontes de nitrogênio testadas.

Naturalmente, conforme a disponibilidade da fonte de carbono aumentou, maior foi o consumo de óleo (Figura 13). Entretanto, esse padrão foi invertido em relação ao rendimento e a concentração intracelular do polímero, onde se observa uma redução no valor conforme o aumento da concentração do óleo (Figura 14 e Figura 15). Indicando que o aumento da relação C/N não foi um fator decisivo na produção do polímero para esse experimento, uma vez a menor razão C/N (10/1) resultou nos melhores resultados de produção (Figura 12).

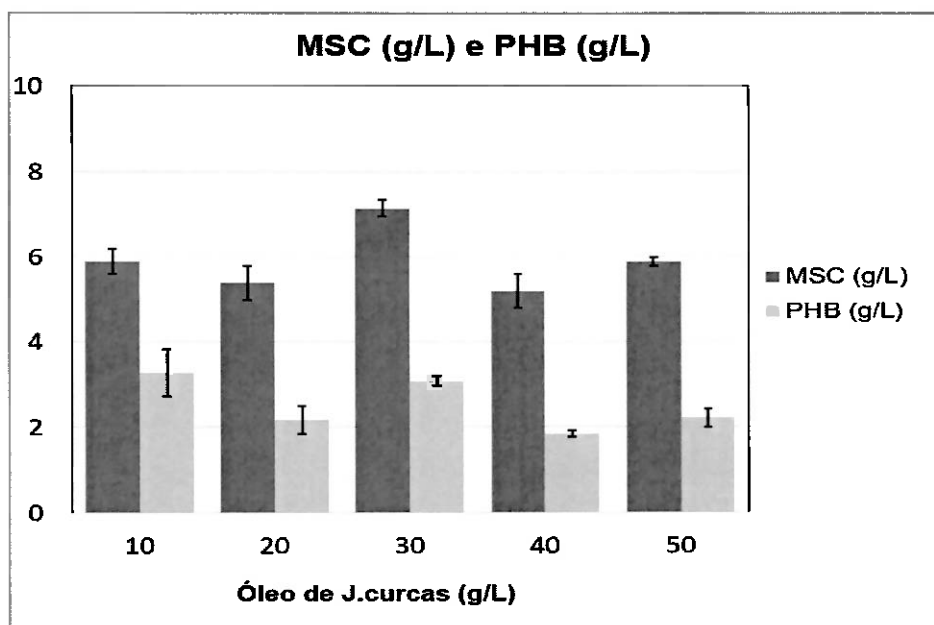
Em todos os parâmetros avaliados, o nitrato obteve bons resultados. O acúmulo de PHB ultrapassou de 35% em todas as concentrações avaliadas. Em um estudo utilizando *Pseudomonas oleovorans* e óleo de *J. curcas* como fonte de carbono, a máxima concentração do polímero foi de 26,06% (ALLEN *et al.*, 2010). Demonstrando a capacidade otimizada da *B. glumae* em sintetizar o polímero.

Tabela 5: Produção de P(3HB) a partir de óleo de *J. curcas* em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 g/L), contendo 1 g/L de nitrato de sódio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.

Óleo de <i>J. curcas</i> (g/L)	Consumo de óleo (g/L)	MSC (g/L)	PHB (%)	PHB (g/L)	Y _{PHB} (g/g)	XR (g/L)
10	9,200±0,30	5,9±0,30	56±1,2	3,27±0,54	0,35±0,04	2,63±0,84
20	13,975±0,52	5,4±0,40	40±3,0	2,16±0,33	0,16±0,02	3,24±0,06
30	15,75±1,95	7,2±0,20	43±2,0	3,08±0,10	0,20±0,03	4,12±0,30
40	25,925±1,57	5,2±0,40	36±1,0	1,85±0,07	0,07±0,00	3,35±0,32
50	27,8±2,35	5,9±0,1	38±4,0	2,21±0,21	0,08±0,01	3,69±0,31

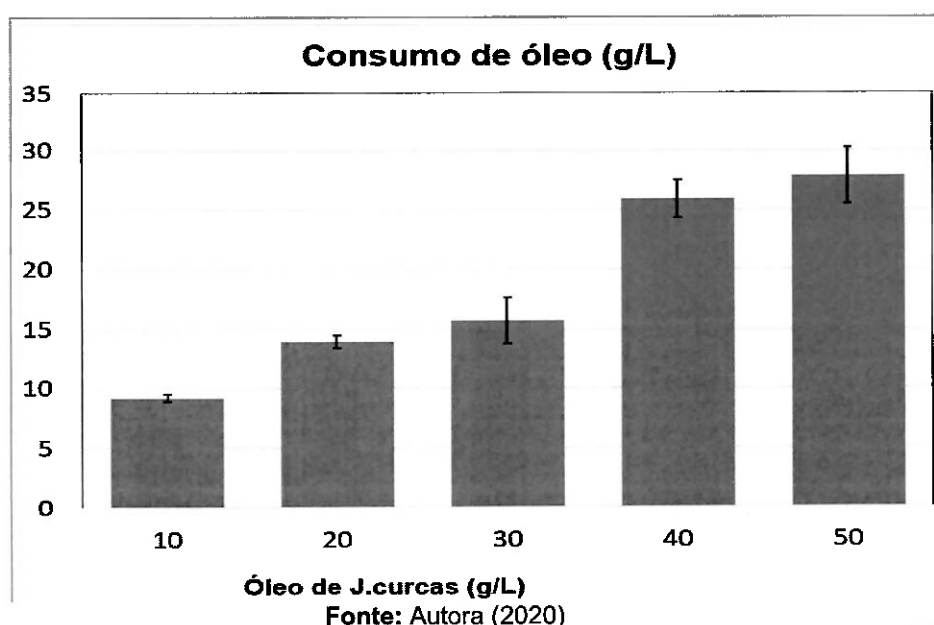
Fonte: Autora (2020)

Figura 12: Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de óleo de *J.curcas* em Meio Mineral, contendo 1 g/L de nitrato de sódio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo.



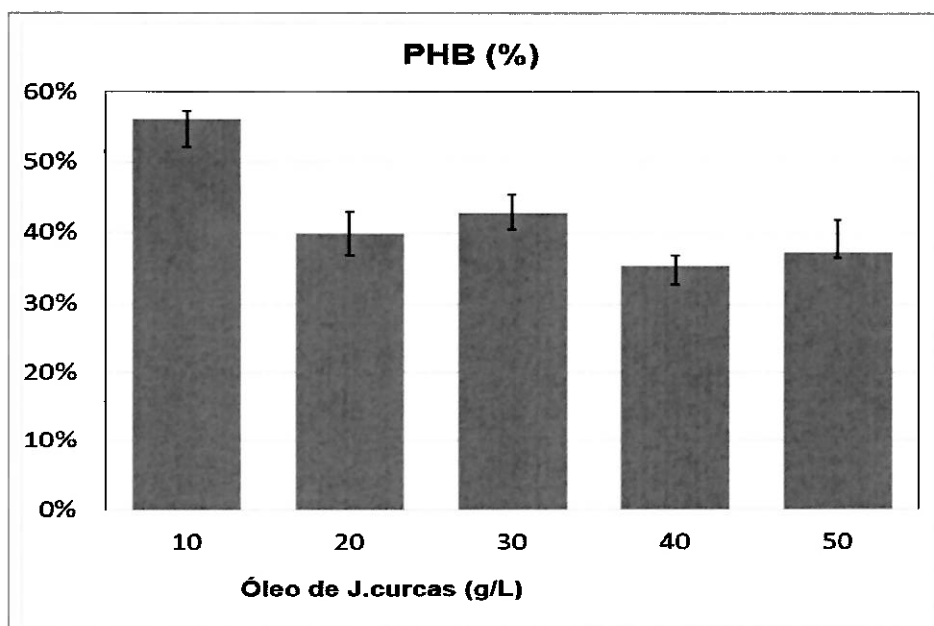
Fonte: Autora (2020)

Figura 13: Consumo de óleo de *J. curcas* (g/L) em Meio Mineral, contendo 1 g/L de nitrato de sódio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo



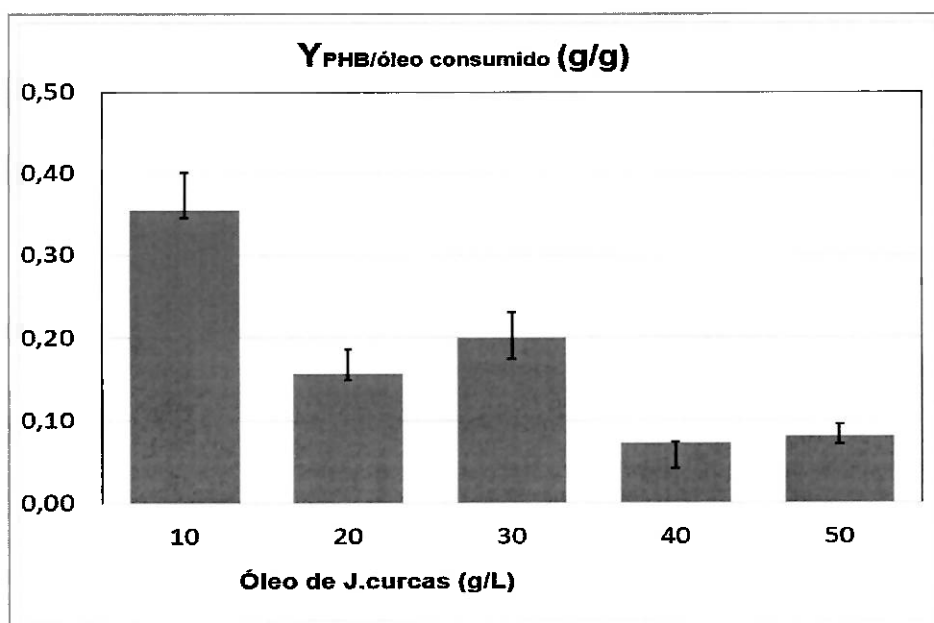
Fonte: Autora (2020)

Figura 14: Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [PHB%] a partir de a partir de óleo de *J.curcas* em diferentes concentrações, contendo 1 g/L de nitrato de sódio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo



Fonte: Autora (2020)

Figura 15: Rendimento de produção de P(3HB) em razão do óleo consumido $Y_{PHB}/\text{óleo consumido}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de óleo de *J.curcas*, contendo 1 g/L de nitrato de sódio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.



Fonte: Autora (2020)

5.1.4 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando cloreto de amônio (NH₄Cl) como fonte de nitrogênio, por *Burkholderia glumae* MA13

Os experimentos foram conduzidos utilizando óleo de *J. curcas* como fonte de carbono em 5 concentrações: 10, 20, 30, 40, 50 g/L, a 34°C, 150 rpm durante 96h. Foi utilizado cloreto de amônio como fonte de nitrogênio a uma concentração de 1g/L. Os resultados obtidos a partir dos experimentos podem ser observados na Tabela 6. O maior valor de produção de P(3HB) e acúmulo intracelular do polímero foi obtido na concentração de 10 g/L de óleo de *J. curcas*, sendo observado uma produção de $1,52 \pm 0,06$ g/L e um acúmulo de $31 \pm 2,00\%$.

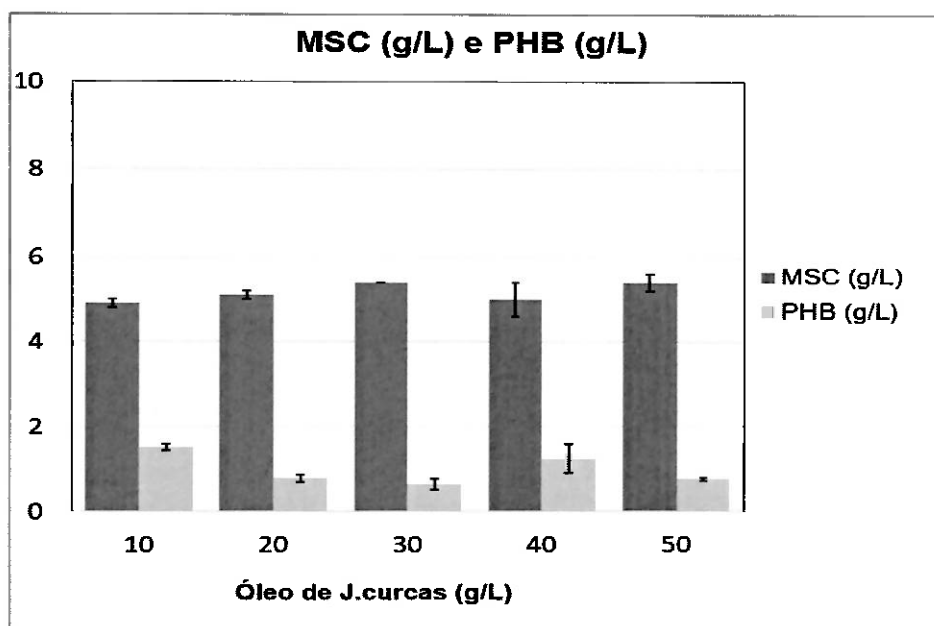
Em nenhum dos parâmetros analisados foi possível estabelecer um padrão nos resultados, os valores não seguiram um aumento linear esperado conforme o aumento da concentração de óleo (Figura 17, Figura 18 e Figura 19). Entretanto, em um estudo utilizando a mesma cepa e glicerol como fonte de carbono, também foi observado uma variância nos resultados obtidos conforme o aumento da concentração da fonte de carbono (DE PAULA *et al.*, 2019). Os maior valores de massa seca celular (MSC) ocorreram na concentração de 30 g/L e 50 g/L de óleo, com $5,4 \pm 0,2$ g/L de biomassa. Enquanto que em relação ao acúmulo intracelular nessas concentrações de óleo, os valores foram baixos, variando de 12-14%, sendo indicativo que a bactéria direcionou o óleo consumido ao crescimento celular (Figura 16).

Tabela 6: Produção de P(3HB) a partir de óleo de *J. curcas* em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 g/L), contendo 1 g/L de cloreto de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.

Óleo de <i>J. curcas</i> (g/L)	Consumo de óleo (g/L)	MSC (g/L)	PHB (%)	PHB (g/L)	Y _{PHB} (g/g)	XR (g/L)
10	$9,075 \pm 0,07$	$4,9 \pm 0,10$	$31 \pm 2,00$	$1,52 \pm 0,06$	$0,17 \pm 0,00$	$3,38 \pm 0,16$
20	$13,825 \pm 2,47$	$5,1 \pm 0,10$	$15 \pm 2,00$	$0,79 \pm 0,09$	$0,06 \pm 0,00$	$4,31 \pm 0,19$
30	$13,200 \pm 2,70$	$5,4 \pm 0,00$	$12 \pm 2,00$	$0,64 \pm 0,13$	$0,05 \pm 0,00$	$4,76 \pm 0,13$
40	$25,150 \pm 8,85$	$5,0 \pm 0,40$	$26 \pm 5,00$	$1,26 \pm 0,34$	$0,07 \pm 0,03$	$3,74 \pm 0,74$
50	$23,35 \pm 1,15$	$5,4 \pm 0,2$	$14 \pm 0,00$	$0,76 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,00$	$4,64 \pm 0,15$

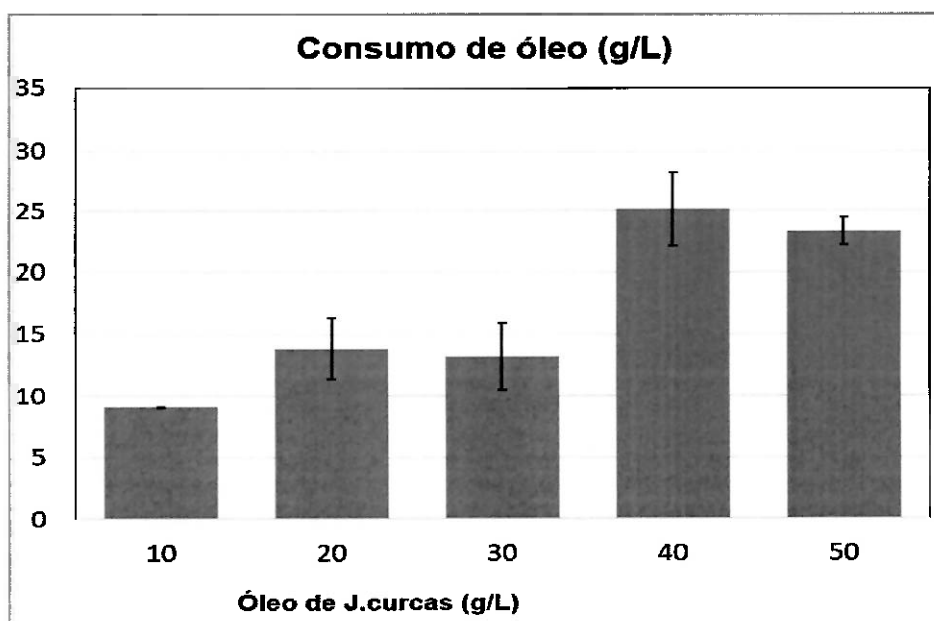
Fonte: Autora (2020)

Figura 16: Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de óleo de *J. curcas* em Meio Mineral, contendo 1 g/L de cloreto de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo.



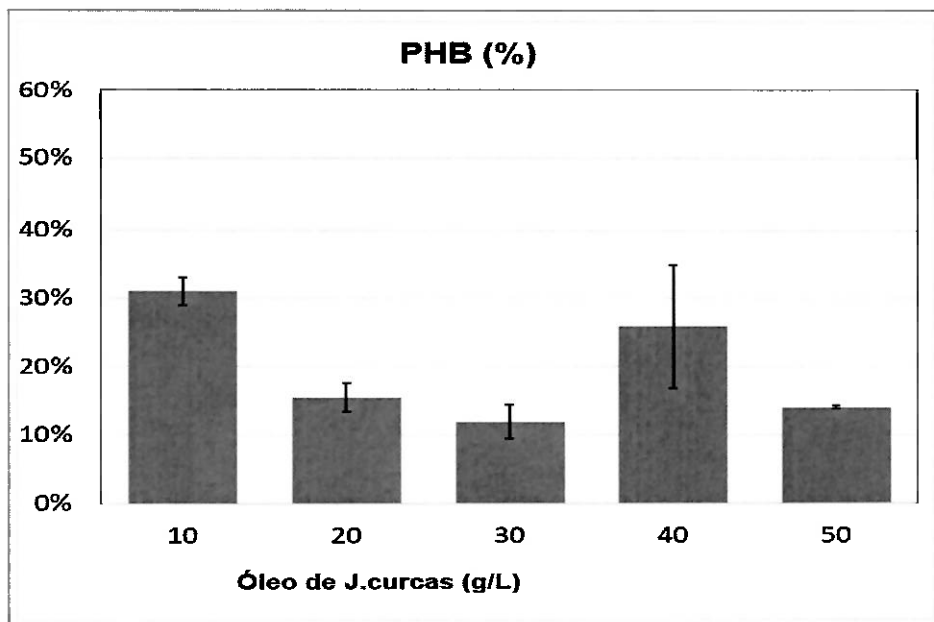
Fonte: Autora (2020)

Figura 17: Consumo de óleo de *J. curcas* (g/L) em Meio Mineral, contendo 1 g/L de cloreto de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo



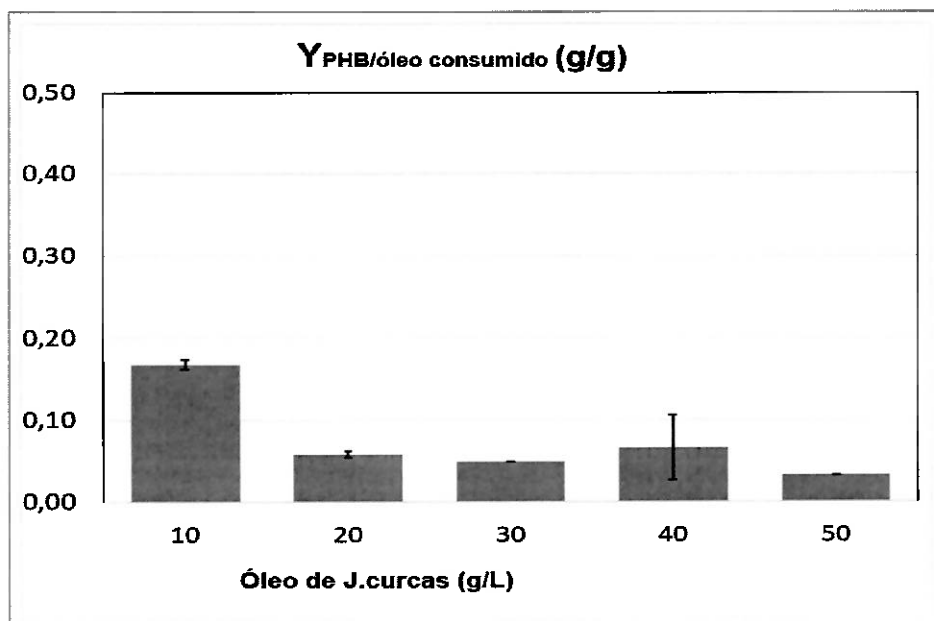
Fonte: Autora (2020)

Figura 18: Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [PHB%] a partir de a partir de óleo de *J.curcas* em diferentes concentrações, contendo 1 g/L de cloreto de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo



Fonte: Autora (2020)

Figura 19: Rendimento de produção de P(3HB) em razão do óleo consumido $Y_{PHB}/\text{óleo consumido}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de óleo de *J.curcas*, contendo 1 g/L de cloreto de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.



Fonte: Autora (2020)

5.1.5 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando fosfato de amônio monobásico ((NH₄)H₂PO₄) como fonte de nitrogênio, por *Burkholderia glumae* MA13

Os experimentos foram conduzidos utilizando óleo de *J. curcas* como fonte de carbono em 5 concentrações: 10, 20, 30, 40, 50 g/L, a 34°C, 150 rpm durante 96h. Foi utilizado fosfato de amônio monobásico como fonte de nitrogênio a uma concentração de 1g/L. Os resultados obtidos a partir dos experimentos podem ser observados na Tabela 7. O maior valor de produção de P(3HB) e acúmulo intracelular do polímero foi obtido na concentração de 30 g/L de óleo de *J. curcas*, sendo observado uma produção de 2,19±0,95 g/L e um acúmulo de 37±6%. Entretanto, devido ao alto valor de consumo de óleo, o rendimento apresentou um valor de apenas 0,11±0,04 g/g para essa concentração de carbono. O melhor rendimento ocorreu em 10 g/L de óleo, com 0,19±0,01 g/g, estando entre um dos mais altos obtidos entre as fontes de nitrogênio.

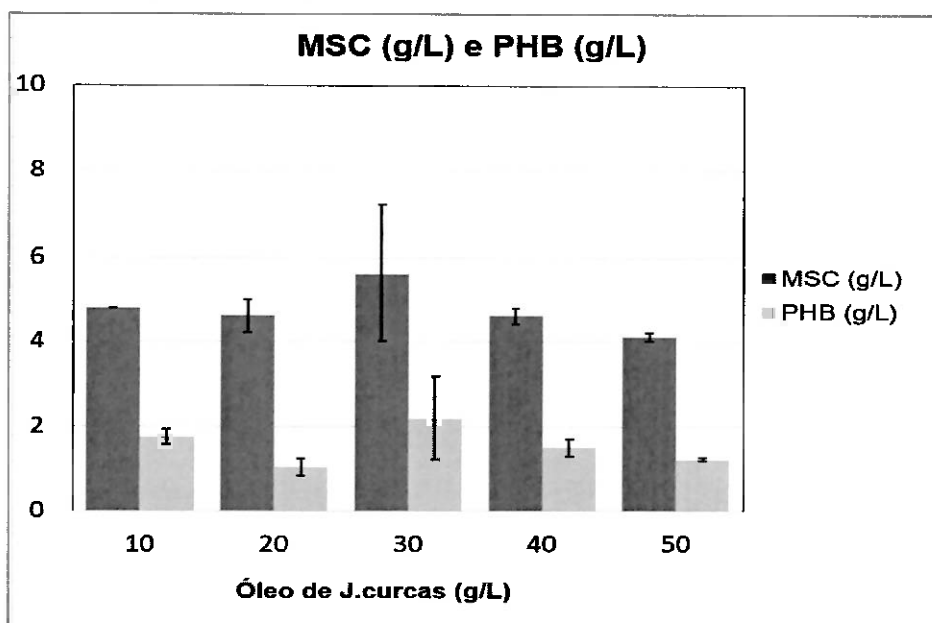
Naturalmente, conforme a disponibilidade da fonte de carbono aumentou, maior foi o consumo de óleo (Figura 21). Entretanto, esse padrão não foi observado no acúmulo intracelular do polímero, variando consideravelmente com o aumento da concentração de óleo (Figura 22 e Figura 23). Os valores obtidos de massa seca celular (MSC) não variaram muito, mantendo-se abaixo da média em relação as outras fontes de nitrogênio analisadas (Figura 20).

Tabela 7: Produção de P(3HB) a partir de óleo de *J. curcas* em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 g/L), contendo 1 g/L de fosfato de amônio monobásico, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.

Óleo de <i>J. curcas</i> (g/L)	Consumo de óleo (g/L)	MSC (g/L)	PHB (%)	PHB (g/L)	Y _{PHB} (g/g)	XR (g/L)
10	9,050±0,00	4,8±0,00	37±3,50	1,75±0,16	0,19±0,01	3,05±0,16
20	14,800±0,65	4,6±0,40	23±6,00	1,04±0,19	0,07±0,01	3,56±0,59
30	19,925±0,97	5,6±1,60	37±6,00	2,19±0,95	0,11±0,04	3,41±0,63
40	22,825±2,675	4,6±0,20	33±0,02	1,50±0,19	0,07±0,00	3,10±0,00
50	23,275±0,22	4,1±0,10	30±0,00	1,23±0,03	0,05±0,00	2,87±0,06

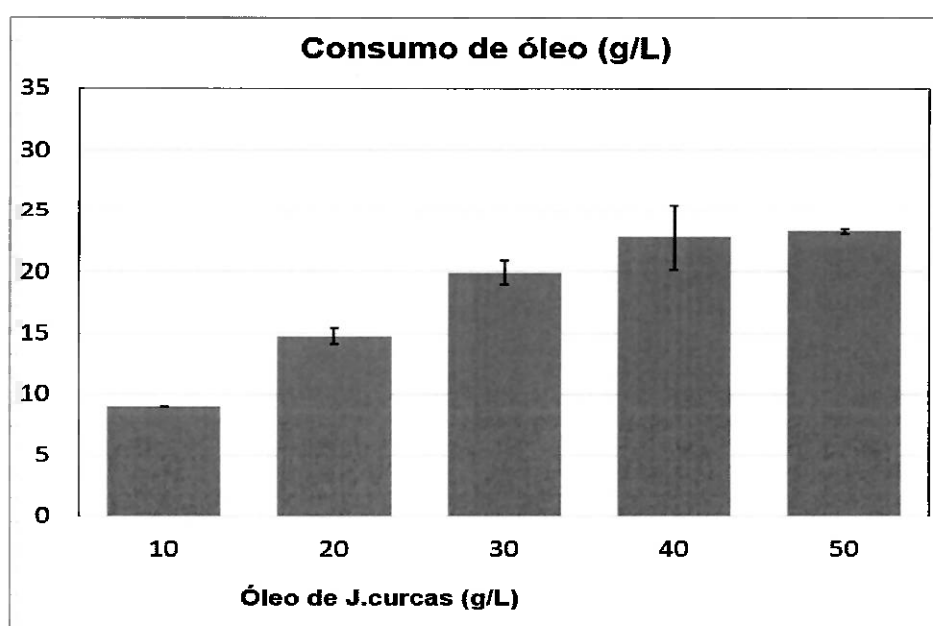
Fonte: Autora (2020)

Figura 20: Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de óleo de *J.curcas* em Meio Mineral, contendo 1 g/L de fosfato de amônio monobásico, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo.



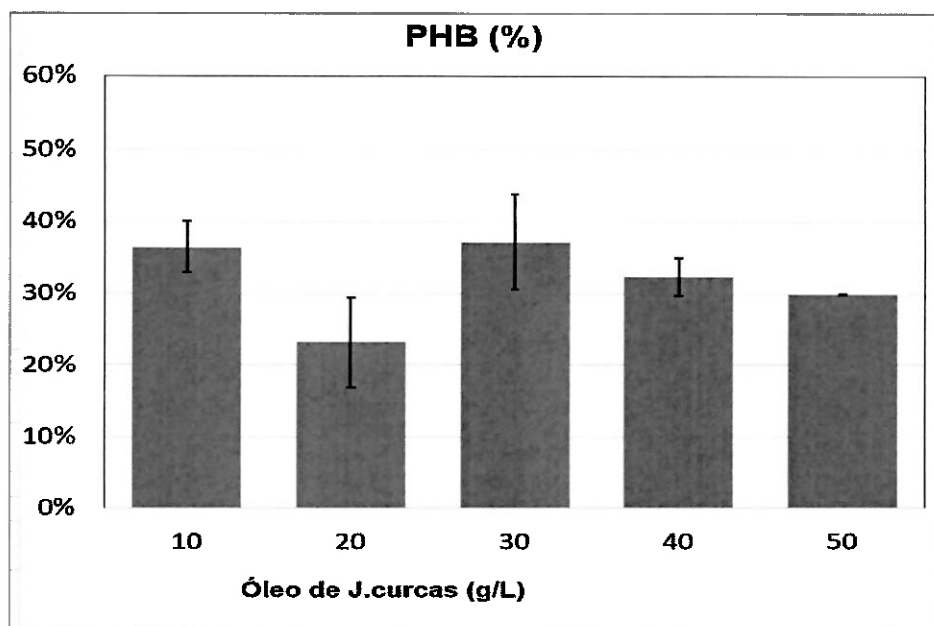
Fonte: Autora (2020)

Figura 21: Consumo de óleo de *J.curcas* (g/L) em Meio Mineral, contendo 1 g/L de fosfato de amônio monobásico, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo



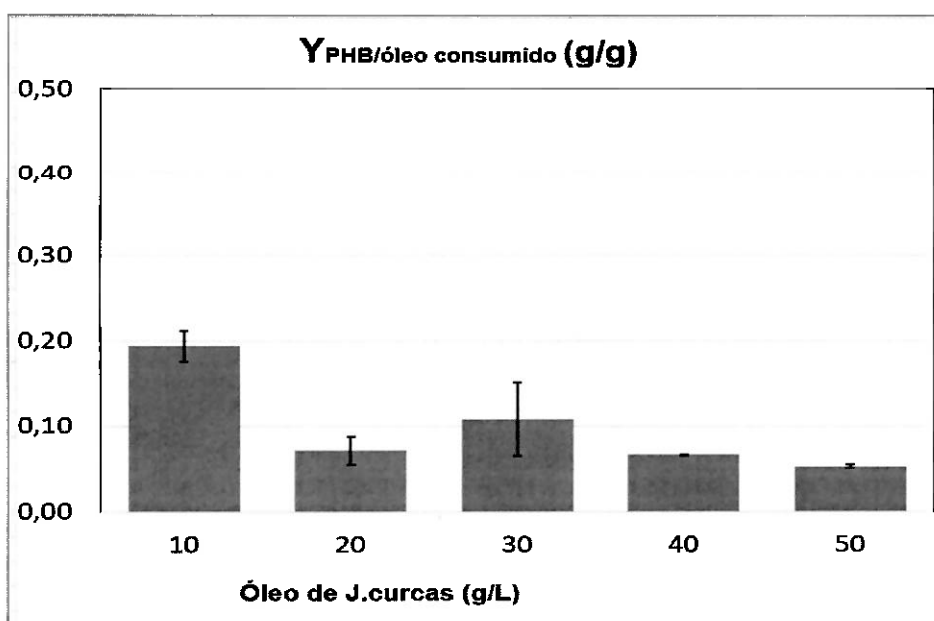
Fonte: Autora (2020)

Figura 22: Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [PHB%] a partir de a partir de óleo de *J.curcas* em diferentes concentrações, contendo 1 g/L de fosfato de amônio monobásico, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo



Fonte: Autora (2020)

Figura 23: Rendimento de produção de P(3HB) em razão do óleo consumido $Y_{PHB}/\text{óleo consumido}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de óleo de *J.curcas*, contendo 1 g/L de fosfato de amônio monobásico, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.



Fonte: Autora (2020)

5.1.6 Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizando nitrato de amônio (NH_4NO_3) como fonte de nitrogênio, por *Burkholderia glumae* MA13

Os experimentos foram conduzidos utilizando óleo de *J. curcas* como fonte de carbono em 5 concentrações: 10, 20, 30, 40, 50 g/L, a 34°C, 150 rpm durante 96h. Foi utilizado nitrato de amônio como fonte de nitrogênio a uma concentração de 1 g/L. Os resultados obtidos a partir dos experimentos podem ser observados na Tabela 8. O maior valor de produção de P(3HB) e acúmulo intracelular do polímero foi obtido na concentração de 10 g/L de óleo de *J. curcas*, sendo observado uma produção de $2,29 \pm 0,53$ g/L e um acúmulo de $36 \pm 5\%$. Nessa concentração também foi observado o maior rendimento, com $0,24 \pm 0,05$ g/g. Indicando que o aumento da relação C/N não foi um fator decisivo na produção do polímero para esse experimento.

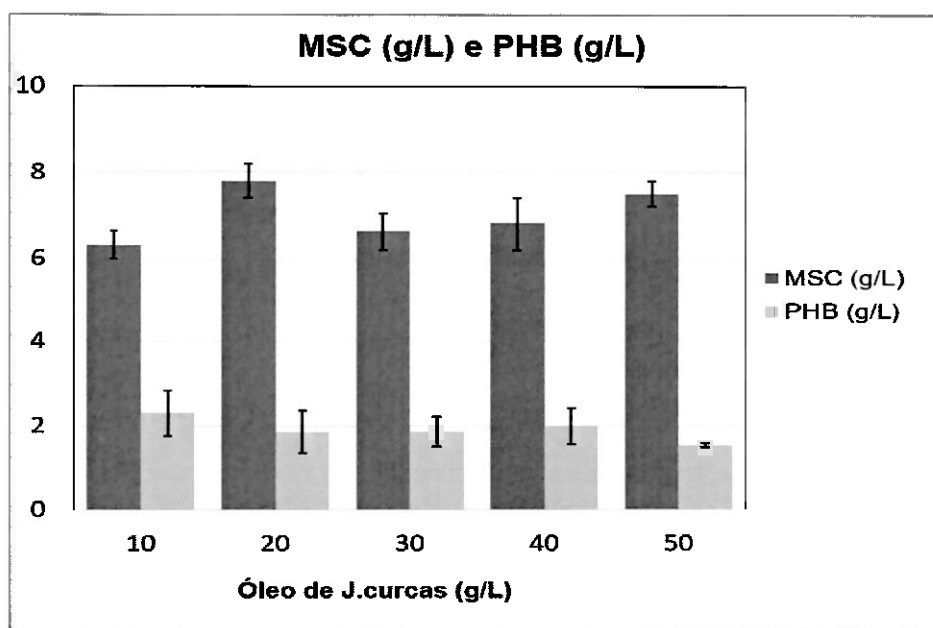
Naturalmente, conforme a disponibilidade da fonte de carbono aumentou, maior foi o consumo de óleo (Figura 25). Entretanto, esse padrão não foi observado no acúmulo intracelular do polímero (Figura 26 e Figura 27). Os valores obtidos de massa seca celular (MSC) foram altos, variando de 6,3 a 7,8 g/L (Figura 24). Em trabalhos utilizando a mesma cepa e ácidos graxos como substrato, foi observado valores de MSC em torno de 5 g/L (DE PAULA *et al.*, 2019).

Tabela 8: Produção de P(3HB) a partir de óleo de *J. curcas* em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 g/L), contendo 1 g/L de nitrato de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.

Óleo de <i>J. curcas</i> (g/L)	Consumo de óleo (g/L)	MSC (g/L)	PHB (%)	PHB (g/L)	Y_{PHB} (g/g)	XR (g/L)
10	$9,625 \pm 0,07$	$6,3 \pm 0,30$	$36 \pm 5,00$	$2,29 \pm 0,53$	$0,24 \pm 0,05$	$4,01 \pm 0,23$
20	$14,800 \pm 0,35$	$7,8 \pm 0,40$	$23 \pm 5,00$	$1,85 \pm 0,50$	$0,13 \pm 0,03$	$5,95 \pm 0,10$
30	$22,400 \pm 0,90$	$6,6 \pm 0,40$	$28 \pm 3,00$	$1,85 \pm 0,34$	$0,80 \pm 0,01$	$4,75 \pm 0,05$
40	$23,400 \pm 2,75$	$6,8 \pm 0,60$	$30 \pm 5,00$	$1,97 \pm 0,41$	$0,09 \pm 0,02$	$4,83 \pm 1,01$
50	$32,550 \pm 3,95$	$7,5 \pm 0,30$	$20 \pm 0,00$	$1,52 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,00$	$5,98 \pm 0,23$

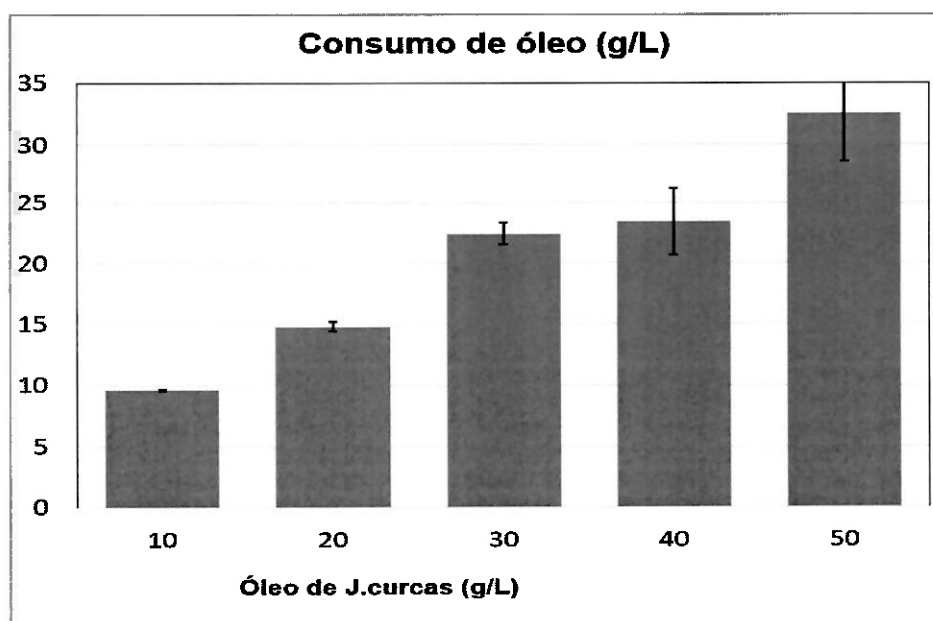
Fonte: Autora (2020)

Figura 24: Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de óleo de *J.curcas* em Meio Mineral, contendo 1 g/L de nitrato de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo.



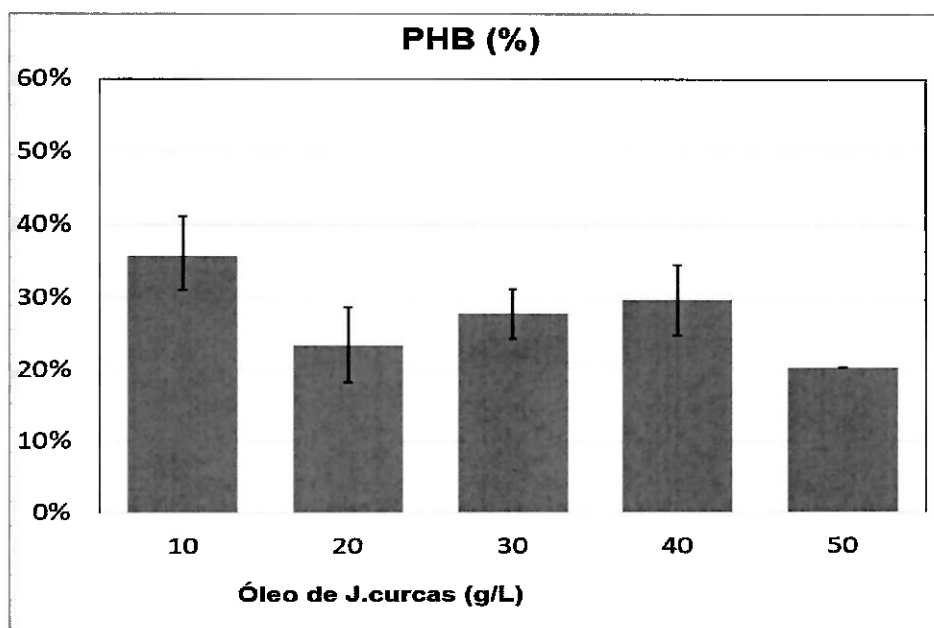
Fonte: Autora (2020)

Figura 25: Consumo de óleo de *J. curcas* (g/L) em Meio Mineral, contendo 1 g/L de nitrato de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13, após 96 h de cultivo



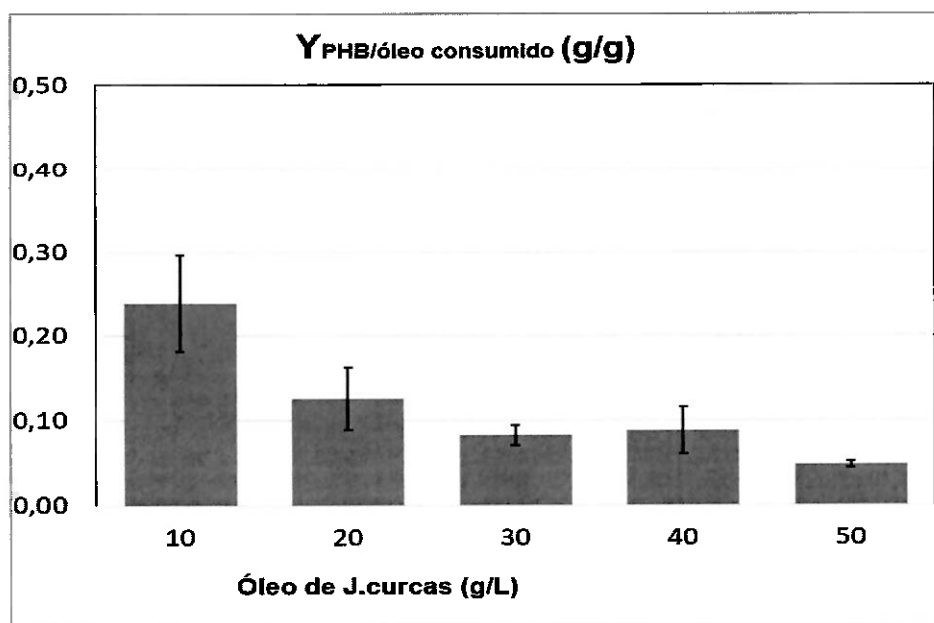
Fonte: Autora (2020)

Figura 26: Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [PHB%] a partir de a partir de óleo de *J.curcas* em diferentes concentrações, contendo 1 g/L de nitrato de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo



Fonte: Autora (2020)

Figura 27: Rendimento de produção de P(3HB) em razão do óleo consumido $Y_{PHB}/\text{óleo consumido}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de óleo de *J.curcas*, contendo 1 g/L de nitrato de amônio, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia glumae* MA13 após 96 h de cultivo.



Fonte: Autora (2020)

5.2 Considerações finais relacionadas aos experimentos de otimização dos parâmetros para produção de P(3HB) a partir de óleo de *J.curcas* por *B.glumae* MA13.

DE PAULA *et al.* (2019) avaliaram a biossíntese de PHA através da linhagem *Burkholderia glumae* MA13 utilizando glicerol bruto. Para o cultivo foi utilizado uma concentração de 10 g/L de glicerol e 1 g/L de sulfato de amônio, como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente. Em uma fermentação de 72h, essa cepa produziu 3,85 g/L de biomassa, 41,40% de acúmulo intracelular do polímero e um rendimento de 0,19 g/g. Além disso, também foi avaliado a produção de PHA utilizando óleo de fritura na mesma concentração. Em um cultivo de 72h, a cepa produziu 5,61 g/L de biomassa, 49,02% de acúmulo intracelular do polímero e um rendimento de 0,3 g/g. Demonstrando que a linhagem possui uma boa capacidade de sintetizar P(3HB) a partir de ácidos graxos.

BATCHA *et al.* (2014) avaliaram a biossíntese de PHA através da linhagem *Cupriavidus necator* utilizando óleo de *Jatropha curcas*. Para o cultivo foi utilizado uma concentração de 12,5 g/L de óleo de *J.curcas* e 1 g/L de ureia, como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente. Em uma fermentação de 90h, a cepa produziu 10 g/L de biomassa, 70% de acúmulo intracelular do polímero e um rendimento de aproximadamente 0,56 g/g. Demonstrando que o óleo de *J.curcas* é uma potencial fonte de carbono alternativa para a produção de do polímero.

No presente estudo, a linhagem *B. glumae* apresentou os melhores resultados com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. O maior acúmulo de polímero ocorreu na concentração de 10 g/L, com 56% de polímero acumulado na biomassa. O rendimento para essa concentração foi de 0,35 g/g, similar ao observado por DE PAULAS *et al.* (2019). Os valores de biomassa variaram de 5,2 a 7,2 g/L, sendo inferior aos reportados por BATCHA *et al.* (2014) conforme a Tabela 9.

De modo geral, não foi possível observar o aumento da produção de polímero com aumento da relação C/N, como reportado por diversos autores (BATCHA *et al.*, 2014; RAZA *et al.*, 2018). Foi observado um rendimento decrescente ao aumentar a quantidade de substrato disponível, sendo uma vantagem, uma vez que, quanto menor a fonte de carbono necessária para biossintetizar o polímero, menor o custo associado a produção. Em 80% das fontes de nitrogênio avaliadas, os melhores resultados foram obtidos na concentração de 10 g/L de óleo de *J.curcas*, conforme a Tabela 10.

Tabela 9: Comparativo entre cultivos realizados por *B.glumae* e *C.necator*. Utilizando diferentes fontes de ácido graxos e fontes de nitrogênio

Microorganismo	Óleo	Concentração óleo (g/L)	Nitrogênio	Concentração nitrogênio (g/L)	MSC (g/L)	PHB (%)	PHB (g/L)	Y _{PHB} (g/g)	Referências
<i>B. glumae</i>	<i>J.curcas</i>	10	Nitrato de sódio	1	5,9	56	3,27	0,35	Autora, 2020
<i>B. glumae</i>	Óleo residual de fritura	10	Sulfato de amônio	1	5,61	49,02	2,75	0,30	DE PAULA et al., 2019
<i>C. necator</i>	<i>J.curcas</i>	12,5	Ureia	1	10	70	7	0,56	BATCHA et al., 2014

Fonte: Autora (2020)

Tabela 10: Melhores resultados obtidos a partir de cultivos com diferentes concentrações de óleo de *Jatropha curcas* por *Burkholderia glumae* MA13, para cada fonte de nitrogênio.

Fonte de nitrogênio	Óleo de <i>J.curcas</i> (g/L)	Consumo de óleo (g/L)	MSC (g/L)	PHB (%)	PHB (g/L)	Y _{PHB} (g/g)
Ureia	10	9,30	5,5	24	1,33	0,14
Sulfato de amônio	40	20,60	5,2	29	1,47	0,08
Nitrato de sódio	10	9,20	5,9	56	3,27	0,35
Cloreto de amônio	10	9,07	4,9	31	1,52	0,17
Fosfato de amônio monobásico	10	9,05	4,8	37	1,75	0,19
Nitrato de amônio	10	9,65	6,3	36	2,29	0,24

Fonte: Autora (2020)

Devido a variância observada nos resultados dos parâmetros analisados, se faz importante a análise conjunta de biomassa e concentração de PHB, uma vez que altos valores de massa seca celular não garantiram altos valores de polímero. Pode-se observar que apesar do cultivo utilizando ureia ter obtido altos valores de MSC, variando de 5,5 a 8,3 g/L, a concentração de P(3HB) não foi satisfatória em comparação a outras fontes de nitrogênio, variando de 0,78 a 1,33 g/L de P(3HB). Enquanto que o cultivo utilizando fosfato de amônio monobásico obteve valores baixos de MSC, variando de 4,1 a 5,6 g/L, a concentração de P(3HB) foi relativamente alta, com valores variando de 1,04 a 2,19 g/L.

5.3 Caracterização do PHA de *Burkholderia glumae* MA13

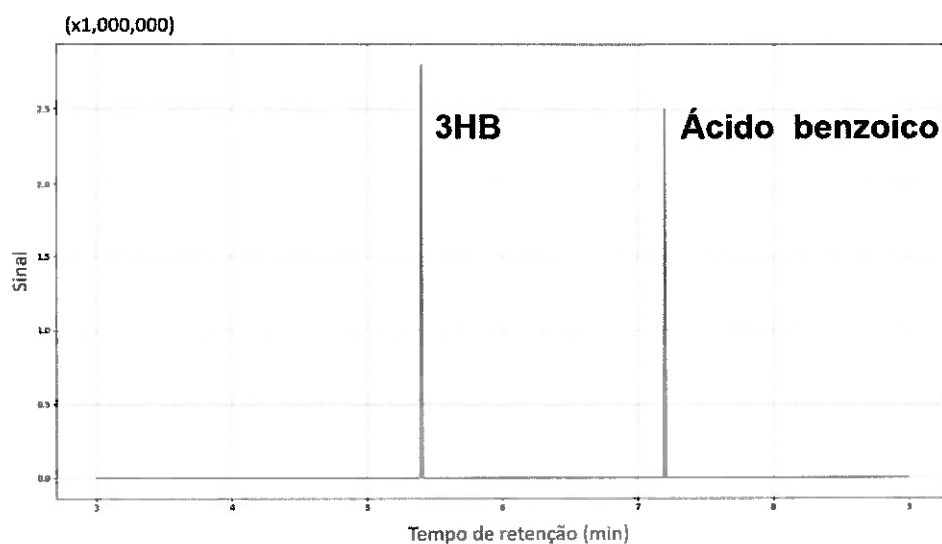
A quantificação e composição do polímero P(3HB) foram obtidas através da análise de metil-ésteres, obtidos a partir da reação de metanólise das células liofilizadas. Sendo o produto dessa reação analisado através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Obteve-se, desse modo, um cromatograma (Figura 28) e um espectro de massa (Figura 29) referentes à biossíntese do P(3HB).

No cromatograma é possível identificar os picos referentes ao tempo de retenção do ácido 3-hidroxialcanóico e ao padrão interno utilizado, ácido benzoico, 5,4 e 7,016 minutos, respectivamente.

No espectro de massa obtido é possível verificar a relação massa por cargas de íon (m/z) para cada fragmento resultante da ionização da molécula 3HB. O pico m/z 43 é referente ao “target” 3HB que foi utilizado como pico base para relativização dos fragmentos da molécula. Foi possível identificar o fragmento de m/z 103, o qual é um fragmento característico de metil-ésteres de ácidos 3-hidroxialcanóicos, derivados de clivagem α do grupo funcional hidroxila. Pode-se observar também o fragmento m/z 87, referente a um íon característico do 3-hidroxibutirato (LEE; CHOI, 1995). Além disso, o fragmento m/z 74 representa a extremidade carbonil da molécula (SILVERSTEIN *et al.*, 1991).

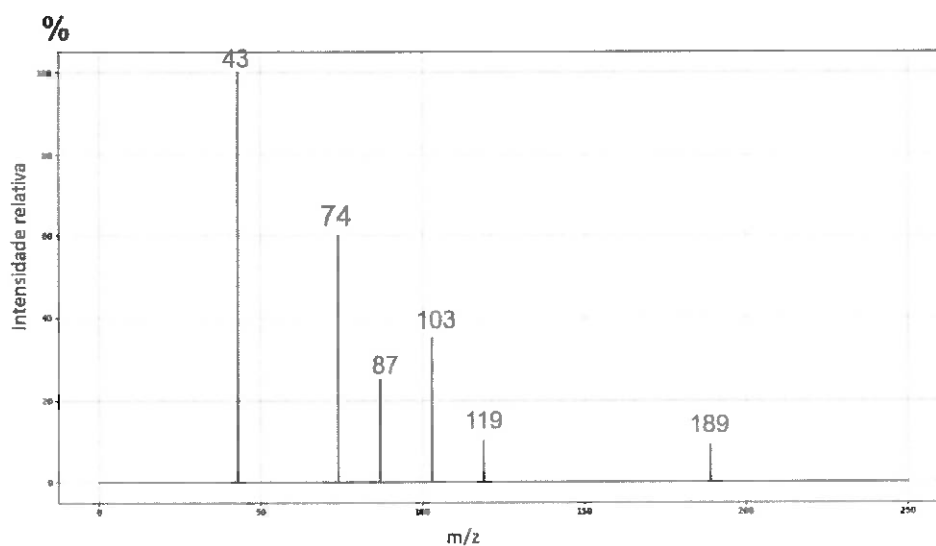
A altura dos picos é relacionado com a intensidade que eles ocorrem em relação a molécula 3HB. Picos adicionais podem estar relacionadas a ruídos de fundo do instrumento. Através da análise conjunta do cromatograma e do espectro de massa pode-se garantir a presença de P(3HB) nas amostras (SILVERSTEIN *et al.*, 1991).

Figura 28: Espectro de cromatografia gasosa de metil-ésteres de 3-hidroxiálcanoatos, indicando o tempo de retenção relativo aos picos de 3HB obtido nos cultivos com *B.glumae* MA13



Fonte: Autora (2020)

Figura 29: Espectro de massa de metil-ésteres de 3-hidroxiálcanoatos (3-hidroxiabutirilpropil-éster)



Fonte: Autora (2020)

6.CONCLUSÕES

Visando a otimização dos parâmetros de produção de P(3HB), a linhagem *Burkholderia glumae* MA13 obteve o maior rendimento, $0,35 \pm 0,04$ g/g e o maior acúmulo de polímero, $56 \pm 1,2$ % da MSC, utilizando 1 g/L de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, a uma concentração de 10 g/L de óleo de *J.curcas*, como fonte de carbono.

Em relação as outras fontes de nitrogênio testadas, foram encontrados melhores resultados também em concentrações menores da fonte de carbono. Indicando que a cepa *B.glumae* teve sua capacidade de biossíntese de P(3HB) aumentada em uma relação C/N mais baixa, considerando apenas a variação da concentração de carbono. A escolha da fonte de nitrogênio mostrou-se importante para a produção de polihidroxialcanoatos, uma vez que para a mesma cepa, obteve-se valores muito distintos para fontes de nitrogênio diferentes.

Foi observada a presença do polímero em todas as fontes de nitrogênio e concentração de óleo testadas. Confirmando que o óleo de *Jatropha curcas* é um potencial substituto para fonte de carbono para a produção do biopolímero polihidroxibutirato por *Burkholderia glumae* MA13.

REFERÊNCIAS

- ALDOR, Ilana S.; KEASLING, Jay D. **Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates**. *Current opinion in biotechnology*, v. 14, n. 5, p. 475-483, 2003.
- ALLEN, Adrian D. et al. **Biosynthesis and characterization of copolymer poly (3HB-co-3HV) from saponified *Jatropha curcas* oil by *Pseudomonas oleovorans***. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 37, n. 8, p. 849-856, 2010.
- ANDERSON, Alistair J.; DAWES, Edwin A. **Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.
- ANDRADY, A. L.; NEAL, M. A. **Applications and societal benefits of plastics**. *Philos. Trans. R. Soc. B*. v.364, p.1977– 1984, 2009.
- ANJUM, Anbreen et al. **Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements**. *International journal of biological macromolecules*, v. 89, p. 161-174, 2016.
- ASTM D6400 - 04. **Standard specification for compostable plastics**. Disponível em: <http://www.astm.org/Standards/D6400.htm>. Acesso em: 02 fev 2020
- AVELLA, M. et al. **European current standardization for plastic packaging recoverable through composting and biodegradation**. *Polymer testing*, v. 20, n. 5, p. 517-521, 2001.
- BANDEIRA, Paloma Pereira Cacique et al. **Evaluation of Polyhydroxyalkanoates Production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia cepacia* Strains Using Sunflower Seed and Oil. *Waste and Biomass Valorization***, v. 11, n. 4, p. 1271-1278, 2020.
- BARHAM, P.J. **Physical properties of poly(hydroxyalkanoates) and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)**. In: *Novel biodegradable microbial polymers*. Dordrecht: Dawes EA, 1990.
- BARNES, David KA et al. **Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences***, v. 364, n. 1526, p. 1985-1998, 2009.
- BATCHA, Abeed Fatima Mohidin et al. **Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) by *Cupriavidus necator* H16 from *jatropha* oil as carbon source. *Bioprocess and biosystems engineering***, v. 37, n. 5, p. 943-951, 2014.
- BRIGHAM, J. C.; SINSKEY, A.J. **Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical**. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, v. 1, n. 1, p. 52-60, 2012.
- BRITTAINE, R.; LUTALADIO, N. ***Jatropha*: a smallholder bioenergy crop: the potential for pro-poor development**. Rome: FAO, 2010.
- BUGNICOURT, Elodie et al. **Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging**. 2014.

CASTILHO, Leda R.; MITCHELL, David A.; FREIRE, Denise MG. **Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation.** *Bioresource technology*, v. 100, n. 23, p. 5996-6009, 2009.

CHANPRATEEP, S. **Current trends biodegradable polyhydroxyalkanoates.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 110, p621-632v, 2010.

CHAUDHRY, Waqas Nasir et al. Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. **Annals of microbiology**, v. 61, n. 3, p. 623-629, 2011.

CHEE, Jiun-Yee et al. **Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics.** *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, v. 2, p. 1395-1404, 2010.

CHEN, Guo-Qiang. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 8, p. 2434-2446, 2009.

CONCEIÇÃO, Marcio Magera et al. **O Plástico Como Vilão Do Meio Ambiente.** *Revista Geociências-UNG-Ser*, v. 18, n. 1, p. 50-53, 2019.

CRANK, Manuela et al. **Techno-economic feasibility of large-scale production of bio-based polymers in Europe (PRO-BIP). Final report.** Department of Science Department of Science, Technology and Society Copernicus Institute, , 2004.

DA SILVA, Gervásio Paulo; MACK, Matthias; CONTIERO, Jonas. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

DE PAULA, F. C. **Polihidroxialcanoatos (PHAs): bioprospecção de micro-organismos e produção a partir de glicerol.** 2012. 221 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) -Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

DE PAULA, Fabrício Coutinho et al. ***Burkholderia glumae* MA13: A newly isolated bacterial strain suitable for polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 20, p. 101268, 2019.

FRANCHETTI, Sandra Mara Martins; MARCONATO, José Carlos. **Polímeros biodegradáveis-uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos.** *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006

GEYER, Roland; JAMBECK, Jenna R.; LAW, Kara Lavender. **Production, use, and fate of all plastics ever made.** *Science advances*, v. 3, n. 7, p. e1700782, 2017.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C.L. Produção de Plásticos Biodegradáveis por Bactérias, *Revista Brasileira de Engenharia Química*, v.17, p. 24-29, 1997

GÜBITZ, Georg M.; MITTELBAACH, Martin; TRABI, Manuela. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource technology**, v. 67, n. 1, p. 73-82, 1999.

HALAMI, Prakash M. **Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 6, p. 805-812, 2008.

HALDEN, Rolf U. Plastics and health risks. **Annual review of public health**, v. 31, p. 179-194, 2010.

HIDAYAT, Nurul et al. **Production of polyhydroxybutyrate from oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysates by *Bacillus cereus* suaeda B-001.** Biocatalysis and agricultural biotechnology, v. 18, p. 101019, 2019.

HSIEH, W.C.; CHEN, W.U.; YANG, S.; CHOU, X. **3D tissue culture and fermentation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from *Burkholderia cepacia* D1.** J. Taiwan Industry. Int. J. Biotech. Well. Indus., v.1, n.1, p. 53-60, 2012. Inst. Chem. Eng., v. 42, p. 883-888, 2011.

JAMBECK, Jenna R. et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768-771, 2015.

KAISER, Katharina; SCHMID, Markus; SCHLUMMER, Martin. **Recycling of polymer-based multilayer packaging: a review.** *Recycling*, v. 3, n. 1, p. 1, 2018.

KAZA, Silpa et al. **What a waste 2.0: a global snapshot of solid waste management to 2050.** The World Bank, 2018.

KERSHAW, Peter. **Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment.** International Maritime Organization, 2015.

KHANNA, Shilpi; SRIVASTAVA, Ashok K. **Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates.** Process biochemistry, v. 40, n. 2, p. 607-619, 2005.

KILIÇAI, E.; DEMIRBILEK, M.; TÜRK, M.; GÜVEN, E.; HAZER, B.; DENKBAS, E.B. **Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHX) based nanoparticles for targeted cancer therapy.** Eur. J. Pharm. Sci., v. 44, p.310-320, 2011.

KIM, Hyung Woo et al. **Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates.** The Journal of Microbiology, v. 45, n. 2, p. 87-97, 2007.

KOLLER, M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.; MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, L.; Varila, P. **Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials.** Biomacromolecules, Washington, v. 6(2), p. 561-565, 2005.

KUNASUNDARI, B., SUDESH, K. **Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates.** Express Polym Lett, v. 5, p. 620-634, 2011.

KUNIOKA, Masao; DOI, Yoshiharu. **Thermal degradation of microbial copolyesters: poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate).** Macromolecules, v. 23, n. 7, p. 1933-1936, 1990.

LEE, E.Y., CHOI, C.Y. Gas chromatography-mass spectrometric analysis and its application to a screening procedure for novel bacterial polyhydroxyalkanoic acids containing long chain saturated and unsaturated monomers. J. Ferment. Bioeng, v. 80, p. 408-414, 1995

LEE, Wing-Hin et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. **Bioresource technology**, v. 99, n. 15, p. 6844-6851, 2008.

LOPES, Mateus Schreiner Garcez. **Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2010.

LÓPEZ-CUELLAR, M. R. et al. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. **International journal of biological macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 74-80, 2011.

MACARTHUR, Ellen. Beyond plastic waste. 2017.

MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K. **Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors.** Food chemistry, v. 62, n. 2, p. 207-215, 1998.

MARIN, Vitor Rodrigues. **Produção de poli-3-hidroxibutirato (P3HB) a partir de glicerol de biodiesel por *Pandorea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13.** 2017.

MASOOD, Farha; YASIN, Tariq; HAMEED, Abdul. Comparative oxo-biodegradation study of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate/polypropylene blend in controlled environments. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 1-8, 2014.

MENG, D. C. et al. Engineering the Diversity of Polyesters. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 29, p. 24-33, 2014.

NELMS, Sarah E. et al. Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. **Environmental Pollution**, v. 238, p. 999-1007, 2018.

NG, Ko-Sin et al. **Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) copolymers using *Jatropha* oil as the main carbon source.** **Process Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1572-1578, 2011.

NG, Ko-Sin et al. **Evaluation of *Jatropha* oil to produce poly (3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* H16.** **Polymer degradation and stability**, v. 95, n. 8, p. 1365-1369, 2010.

OLIVEIRA, Jairo Pinto de et al. **Caracterização físico-química de resíduos oleosos do saneamento e dos óleos e graxas extraídos visando a conversão em biocombustíveis.** **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 597-602, 2014.

OPENSHAW, Keith. **A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise.** **Biomass and bioenergy**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2000.

PANDIAN, S.R.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; RAMESHKUMAR, N.; JEYRAJ, M.; GURUNATHAN, S. **Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3.** **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 705-711, 2010.

PARK, Dae Hoo; KIM, Beom Soo. **Production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil.** **New biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 719-724, 2011.

PARKER, Laura. **The world's plastic pollution crisis explained.** 2019. Disponível em: <https://www.nationalgeographic.com/environment/habitats/plastic-pollution/>. Acesso em: 26 jan. 2020.

PHILIP, Stephen; KESHAVARZ, Tajalli; ROY, Ipsita. **Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications.** **Journal of chemical technology & biotechnology: International research in process, Environmental & clean technology**, v. 82, n. 3, p. 233-247, 2007.

PIATTI, Tania Maria; RODRIGUES, Reinaldo Augusto Ferreira. **Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais.** Maceió: Edufal, p. 51, 2005.

POLI, Annarita et al. **Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea.** **Archaea**, v. 2011, 2011.

RAJMOHAN, Kunju Vaikarar Soundararajan et al. Plastic pollutants: effective waste management for pollution control and abatement. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 12, p. 72-84, 2019.

RAMSAY, B.A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBÉ, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J.A. **Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids.** **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

RAZA, Zulfiqar Ali; ABID, Sharjeel; BANAT, Ibrahim M. **Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 126, p. 45-56, 2018.

ROCHA, Ligia Linardi Niero. **Utilização do óleo residual de fritura na produção de polihidroxialcanoatos.** 2017.

RODRIGUES, Rafael Costa et al. **Condições de cultura para a produção de poli (3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos.** 2005.

SALIMON, Jumat; ABDULLAH, Rozaini. Physicochemical properties of Malaysian *Jatropha curcas* seed oil. **Sains Malaysiana**, v. 37, n. 4, p. 379-382, 2008.

SHAH, Aamer Ali et al. **Biological degradation of plastics: a comprehensive review.** Biotechnology advances, v. 26, n. 3, p. 246-265, 2008.

SILVERSTEIN, Robert M.; BASSLER, G. Clayton. Spectrometric identification of organic compounds. **Journal of Chemical Education**, v. 39, n. 11, p. 546, 1962.

SOLAIMAN, Daniel KY; ASHBY, Richard D. Rapid genetic characterization of poly (hydroxyalkanoate) synthase and its applications. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 532-537, 2005.

STEINBUCHER, ALEXANDER. PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. **Biotechnology**, v. 6, p. 405-464, 1996.

SUDESH, Kumar; IWATA, Tadahisa. **Sustainability of biobased and biodegradable plastics.** CLEAN–Soil, Air, Water, v. 36, n. 5-6, p. 433-442, 2008.

TAGUCHI, Seiichi; DOI, Yoshiharu. **Evolution of polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by “enzyme evolution”:** successful case studies of directed evolution. Macromolecular bioscience, v. 4, n. 3, p. 145-156, 2004.

TAN, D.; YIN, J.; CHEN, G.-Q. Production of polyhydroxyalkanoates. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering.** Elsevier, 2017. p. 655-692.

TANIGUCHI, I., KAGOTANI, K., KIMURA, Y.. **Microbial production of poly(-hydroxyalkanoate)s from waste edible oils.** Green. Chem. v. 5, p. 545-548, 2003.

TIWARI, Alok Kumar; KUMAR, Akhilesh; RAHEMAN, Hifjur. **Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: an optimized process.** Biomass and bioenergy, v. 31, n. 8, p. 569-575, 2007.

VANZIN, César. **Estudo da biossíntese de poli-3-hidroxibutirato-co-hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal.** 2008.

VIRGENS, Ivana Oliveira et al. Revisão: *Jatropha curcas* L.: aspectos morfofisiológicos e químicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

WILCOX, Chris; VAN SEBILLE, Erik; HARDESTY, Britta Denise. Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 38, p. 11899-11904, 2015.

YOUSUF, R. G.; WINTERBURN, J. B. **Waste date seed oil extract as an alternative feedstock for Poly (3-hydroxybutyrate) synthesis.** Biochemical Engineering Journal, v. 127, p. 68-76, 2017.

ZINN, Manfred; WITHOLT, Bernard; EGLI, Thomas. **Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate.** Advanced drug delivery reviews, v. 53, n. 1, p. 5-21, 2001.