
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VÍTOR RODRIGUES MARIN

**PRODUÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (P3HB) A
PARTIR DE GLICEROL DE BIODIESEL POR *Pandorea*
sp. MA03 E *Burkholderia cepacia* MA13**

A large, abstract geometric design in the bottom half of the page, composed of various shades of blue and white triangles and polygons, creating a complex, crystalline pattern.

Rio Claro
2017

VÍTOR RODRIGUES MARIN

PRODUÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (P3HB) A PARTIR DE GLICEROL DE
BIODIESEL POR *Pandorea* sp. MA03 E *Burkholderia cepacia* MA13

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Co-orientador: Dr. Fabrício Coutinho de Paula

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Rio Claro
2017

547.87 Marin, Vítor Rodrigues
M337p Produção de poli-3-hidroxibutirato (P3HB) a partir de glicerol de
biodiesel por *Pandorea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13 / Vítor
Rodrigues Marin. - Rio Claro, 2017
62 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero
Coorientador: Fabrício Coutinho de Paula

1. Polímeros. 2. Biopolímeros. 3. Biocombustíveis. 4. Fermentação
bacteriana. 5. PHAs. 6. Metabólitos secundários. I. Título.

**Aos meus avós, pais e irmã, sem os
quais minha jornada seria irrealizável.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Angelo e Marta e minha irmã Thais, pela confiança, pelo apoio e amor incondicional e respeito as minhas decisões durante toda minha vida;

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero, meu orientador, pela oportunidade, ensinamentos, orientação, paciência e conhecimentos passados que contribuíram a minha formação acadêmica;

Ao Dr. Fabrício Coutinho de Paula pela grande ajuda, paciência, amizade, ensinamentos e contribuição não apenas a este trabalho como também minha formação como pesquisador;

À agência FAPESP (Processo 2013/22378-5) pelo financiamento durante a realização deste projeto;

A todos meus amigos: Bigo, Olinda, Reto, Branca, Mack, Porteira, Carolina, Rapunzel, Aveia, Ina, Gaga, Bafo, Cobra, Ébão, Bolha e tantos outros que me fogem a memória, pelas noites mal dormidas, tristezas e alegrias que guardo com tanto carinho em meus pensamentos;

À UNESP e todos os meus professores que contribuíram em minha formação;

Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia e todos seus membros, professores, técnicos, funcionários e alunos que compartilharam ensinamentos e risadas, tornando os meses de convivência tão prazerosos;

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Microbiologia Industrial, Carolina, Roberta, Luciana, Daiane, Vinícius, Susan, Graziela, Paulo, Lorenzo, pela ajuda, companheirismo, conhecimento e risadas compartilhadas;

A todos que fizeram parte de desses anos de minha vida e deste trabalho, contribuindo direta ou indiretamente, meus sinceros agradecimentos.

For instance, on the planet Earth, man had always assumed that he was more intelligent than dolphins because he had achieved so much—the wheel, New York, wars and so on—whilst all the dolphins had ever done was muck about in the water having a good time. But conversely, the dolphins had always believed that they were far more intelligent than man—for precisely the same reasons.

Douglas Adams

RESUMO

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são atualmente os biopolímeros provenientes da fermentação microbiana que recebem mais atenção tanto no segmento científico como no industrial, e este destaque se deve principalmente por suas características termoplásticas. Entre os diversos tipos de PHAs, o polihidroxibutirato (P3HB) é o mais produzido dentre as linhagens isoladas do ambiente, sendo amplamente estudado. Suas propriedades físico-químicas, tais como, seu peso molecular, cristalinidade, rigidez, ponto de fusão e temperatura de transição vítrea são comparáveis ao polipropileno (PP), um polímero produzido em ampla escala de origem petroquímica. Devido as similaridades fica claro que o PH3B se apresenta como um eficiente substituto para o polipropileno. Atualmente, têm sido relatados vários trabalhos sobre a produção de PHAs utilizando subprodutos e efluentes industriais como insumos de cultivo, como por exemplo, a produção de P3HB através do uso de glicerol bruto, proveniente da produção de biodiesel. Aliado também as peculiaridades de sua produção, os polihidroxialcanoatos também possuem curto tempo de degradação no ambiente, bem como sua quebra em substâncias não tóxicas. A biossíntese de PH3B em linhagens bacterianas envolve vários fatores, como a limitação da fonte de nitrogênio e o excesso da fonte de carbono, fazendo-se necessário uma otimização dos processos para garantir taxas de produção elevadas. Neste trabalho as linhagens *Pandorea* sp MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13 foram avaliadas quanto a sua produção de PH3B. A avaliação foi realizada utilizando um delineamento composto central do tipo rotacional (DCCR) levando as seguintes variáveis em questão: temperatura, concentração de sulfato de amônio e glicerol bruto. No planejamento realizado a linhagem *Pandorea* sp foi utilizada.

Palavras-chave: Biodiesel. PHA. P3HB. Glicerol. *Burkholderia cepacia*. *Pandorea* sp.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	Poli-3-hidroxibutirato (PHB)	11
1.2	Produção de P3HB.....	13
1.3	Biodiesel e Glicerol.....	14
1.4	Histórico de produção de PHAs.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1	Meios de Cultivo.....	19
3.1.1	Meio Lisogênico (Luria-Bertani) (LB).....	19
3.1.2	Meio-Mineral.....	19
3.1.3	Esterilização.....	20
3.2	Micro-organismos.....	20
3.3	Cultivo de Micro-organismos.....	21
3.3.1	Delineamento Composto Central Rotacional.....	21
3.3.2	Cultivo das linhagens <i>Pandorea</i> sp. MA03 e <i>Burkholderia cepacia</i> MA13.....	25
3.4	Determinação de Biomassa.....	26
3.5	Determinação de Glicerol.....	26
3.6	Determinação de PH3B.....	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	Cultivos da linhagem <i>Pandorea</i> sp. MA03 utilizando planejamento experimental.....	29
4.2	Cultivos da linhagem <i>Burkholderia cepacia</i> MA13 utilizando planejamento experimental.....	37
4.3	Cinética de produção de P3HB a partir de glicerol bruto.....	45
4.4	Considerações finais a respeito dos planejamentos experimentais realizados com as linhagens <i>Pandorea</i> sp. MA03 e <i>Burkholderia cepacia</i> MA13.....	48

4.5 Análise dos polímeros de <i>Pandorea</i> sp. MA03 e <i>Burkholderia cepacia</i> MA13.....	52
5 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A importância dos combustíveis fósseis na matriz energética brasileira é evidente quando se analisam os dados relativos aos volumes de produção e aos valores movimentados na comercialização desses produtos (MONTEIRO, AMBROZIN & KURI, 2009). Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP) só em janeiro de 2017 foram observadas produções de petróleo e gás natural com valores de 2.687 mil barris por dia (Mbbl/d) e 109,9 milhões de metro cúbicos por dia (MMm³/d), respectivamente. Entre os produtos derivados do petróleo, considerando apenas a indústria de plásticos, observou-se, no Brasil, uma produção de aproximadamente 6,59 milhões de toneladas de transformados de plásticos, segundo relatório referente ao ano de 2015 da Agência Brasileira da Indústria de Plástico (Abliplast). Estes dados são exemplos parciais, mas que evidenciam a consolidação de uma sociedade caracterizada pelo alto consumo de produtos de origem petroquímica, gerando desafios para as administrações públicas, devido ao descarte inapropriado dos mesmos, associado à baixa taxa de biodegradabilidade. Esta dependência tem levado muitos países a buscar novas reservas naturais de maneira a prolongar o fluxo da matéria prima, países como Angola, Brasil, Estados Unidos, Indonésia, Nigéria e Noruega vem desenvolvendo e utilizando novas tecnologias para a extração de petróleo na camada Pré-Sal (SILVA, MACK & CONTIERO, 2009). Torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas para a obtenção de combustíveis de demais fontes, especialmente aquelas provenientes de recursos renováveis, denominados biocombustíveis.

Atualmente, as tecnologias mais difundidas e comumente aplicadas na obtenção de combustíveis a partir de fontes renováveis são a produção de etanol, através da fermentação de açúcares provenientes da cana-de-açúcar, milho e beterraba; e a produção de biodiesel, obtida através da transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com álcool para a produção de ésteres (YAZDANI & GONZALEZ, 2007). No entanto, os altos custos de produção de biodiesel dificultam sua introdução no mercado. Tanto óleos vegetais como gordura animal podem ser utilizados no processo de transesterificação, do qual se obtém o biodiesel, tal fato é uma característica favorável aos seus custos de produção comparado ao óleo diesel comercializado. A seleção de

matéria-prima de baixo custo é importante para a obtenção de biodiesel, porém, a utilização de subprodutos e rejeitos gerados na produção de biocombustíveis também deve ser estabelecida em uma biorrefinaria economicamente viável (YUSTE & DOURADO, 2006; KAMM & KAMM, 2007). Dentre os subprodutos obtidos durante a produção de biocombustíveis, o glicerol é produzido em altas quantidades, tanto no processo de obtenção do biodiesel (THOMPSON & HE, 2006) como na produção de etanol (ALDIGUIER et al., 2004). Durante o processo de transesterificação, para cada 100 kg de biodiesel produzido são obtidos em média 10 kg de glicerol.

O crescimento acelerado das indústrias do biodiesel, com o consequente aumento na produção de glicerol, resultou em uma queda vertiginosa nos preços deste produto, provocando a falência de importantes indústrias especializadas em sua produção e refino (YASDANI & GONZALEZ, 2007). Contudo, o aumento exponencial da oferta do glicerol, além do impacto comercial negativo observado, ainda remete à preocupação com o descarte de seu excedente de mercado no ambiente. Portanto, para um aumento da viabilidade econômica na produção do biodiesel, torna-se essencial o desenvolvimento de estratégias de conversões químicas e biológicas do glicerol em produtos de interesse de mercado, agregando valores à produção do biodiesel e amenizando os custos no tratamento de efluentes (McCOY, 2006). Assim, torna-se interessante a descoberta de novos micro-organismos capazes de transformar o glicerol em produtos de maior valor agregado. Entre os produtos obtidos a partir da aplicação do glicerol bruto em processos químicos e microbiológicos, pode-se destacar o 1,3-propanodiol, 1,2-propanodiol, dihidroxiacetonas, poliglicerois, ácido succínico e, recentemente, biopolímeros (PACHAURI & HE, 2006). Dentre os biopolímeros conhecidos, os polihidroxialcanoatos (PHAs) são os de maior destaque na área industrial devido seu potencial termoplástico (MARANGONI, 2000).

O interesse industrial na produção de PHAs está diretamente associado à suas propriedades físico-químicas: caracterizados como termoplásticos ou elastômeros, não tóxicos e biocompatíveis. São utilizados na indústria de embalagens bem como na área médica e farmacêutica, onde são usados na produção de cápsulas de medicamentos e drogas agrícolas, bem como na produção de próteses e enxertos, até sendo avaliados

como carregadores de substâncias antitumorais, na terapia contra o câncer (HSIEH et al., 2011).

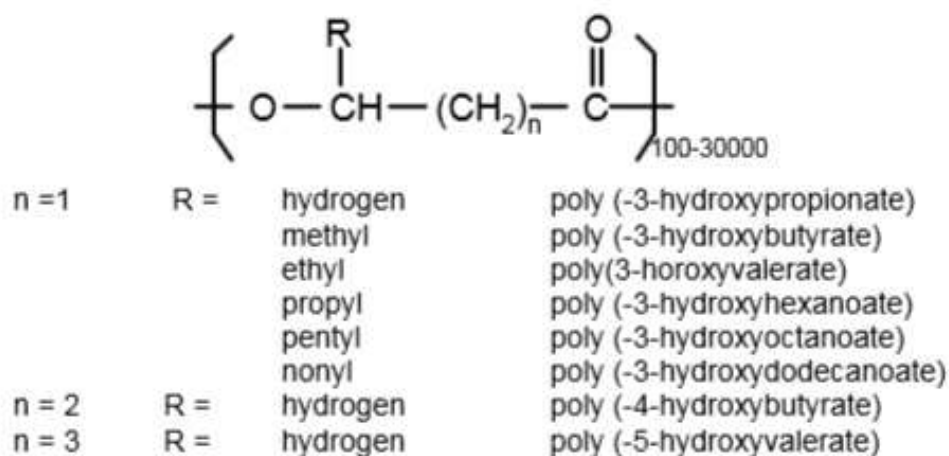
O mais conhecido, dentre os PHAs, é o poli-3-hidroxibutirato (P3HB), um poliéster formado por uma cadeia curta de carbonos, formados por uma vasta quantidade de bactérias e arqueas (VALENTIN & STEINBÜCHEL, 1995; STEINBÜCHEL & FÜCHTENBUSCH, 1998; MADISON & HUISMAN, 1999; EGGERS & STEINBÜCHEL, 2013). O P3HB, assim como os demais PHAs, são armazenados em grânulos no citoplasma das células quando algum nutriente se encontra ausente e há um excesso de carbono. Tais grânulos servem como reserva de carbono e energia e podem ser consumidos durante o metabolismo caso o elemento limitante esteja disponível ou na escassez de uma fonte de carbono (ANDERSON & DAWES, 1990). Como a biossíntese de P3HB em linhagens bacterianas envolve vários fatores, como limitação da fonte de nitrogênio e o excesso da fonte de carbono, é necessária a otimização de processos para alcançar as maiores taxas de produção de polímero. Para isso, o planejamento experimental e a análise estatística fornecem informações mais precisas sobre os fatores determinantes do processo fermentativo, permitindo a interação entre os mesmos. Dessa forma, o principal objetivo deste projeto é obter as condições ótimas na produção de P3HB por novas linhagens isoladas, *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13, utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono.

1.1 Poli-3-hidroxibutirato (PHB)

O polihidroxibutirato, P3HB, foi o primeiro dos PHAs descobertos e é também o mais caracterizado e bem estudado (Figura 1). Trata-se de um polímero de cadeia carbônica curta armazenado em grânulos no interior da célula em várias espécies conhecidas de bactérias, chegando a somar cerca até 80% de peso da massa seca celular. Possui características mecânicas similares a plásticos convencionais de origem petroquímica, como o polipropileno. Entretanto, mesmo que possa ser retirado das células, e moldado em fibras e lâminas, bem como combinado a outros compostos afim de formar heteropolímeros, o polihidroxibutirato é mais quebradiço e cristalino se comparado a

outros PHAs de cadeias carbônicas longas (KHOSRAVI-DARANI et al, 2013; KABILAN et al, 2012).

Figura 1 - Estrutura geral dos polihidroxicanoatos



Fonte: (OJUMU et al, 2004).

De maneira geral, os PHAs são obtidos na forma de polímeros de 10^3 a 10^4 monômeros, podendo ser acumulados por bactérias gram-positivas e negativas na forma de grânulos citoplasmáticos com 0,2 – 0,5 μm de diâmetro (STEINBÜCHEL & FÜCHTENBUCH, 1998). O P3HB, um polímero de curta cadeia carbônica, conhecido desde 1926, devido aos estudos de Lemoigne, outrora ignorado graças a disponibilidade de recursos petroquímicos, ganha grande destaque devido sua capacidade de utilizar insumos de cultivo como o glicerol bruto, proveniente da produção de biodiesel, o que garante sua viabilidade no mercado (CHANPRATEEP, 2010).

A utilização de insumos como o glicerol bruto é uma forma alternativa viável para a produção destes polímeros, isso pois a fonte de carbono chega a cerca de 40% dos custos totais de produção (CAVALHEIRO et al, 2009). Além disso, a possibilidade de usar um insumo como glicerol, que é proveniente de uma fonte renovável de energia, garante uma valorização não apenas do produto em questão, mas também como de toda a cadeia de produção de biodiesel. De maneira geral, a produção do P3HB na região citoplasmática de uma célula na forma de grânulos se dá pelo excesso de fonte de

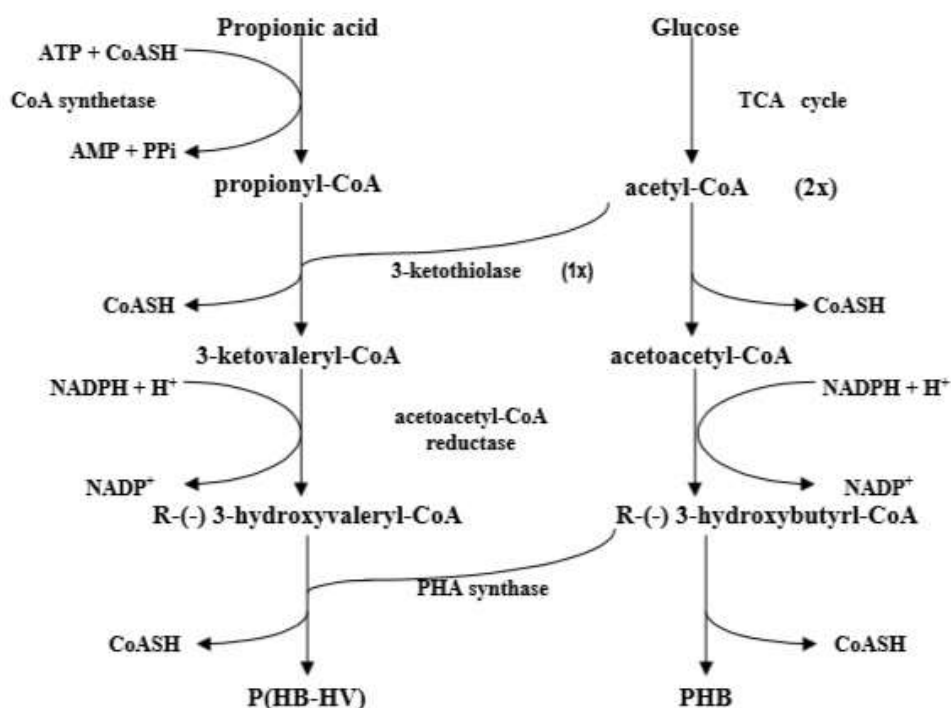
carbono no meio e pela ausência de algum nutriente essencial ao crescimento celular, como nitrogênio, por exemplo.

Atualmente são conhecidas várias bactérias capazes de produzir o poli-3-hidroxibutirato, mesmo assim, a busca por novos organismos detentores de condições ótimas de produção é constante. As condições de otimização envolvem vários fatores como a alta porcentagem de acúmulo de polímero, o crescimento rápido do micro-organismo associado a uma fonte de carbono barata e uma alta taxa de transformação dessa fonte no subproduto desejado. Além desses fatores, a busca por organismos não patogênicos, que não ofereçam risco a seus manipuladores, a população e ambiente em geral, bem como organismos que permitam uma extração fácil do polímero do interior da célula, o que permitiria uma redução nos custos de produção, visto que a extração ocupa grande parcela dos gastos.

1.2 Produção de P3HB

A busca por condições ótimas de cultivo revela a necessidade de se decifrar os passos metabólicos que levam a produção dos biopolímeros, a bactéria *Cupriavidus necator*, por sua vez, possui essa via amplamente conhecida e estudada. O P3HB, nesta espécie, é sintetizado a partir de acetil-CoA por uma ação sequencial de três enzimas (Figura 2). A primeira enzima, 3-cetothiolase, promove a condensação de dois grupos acetil-CoA de maneira reversa formando acetoacetil-CoA. Em seguida, a acetoacetil-CoA redutase atua na redução deste em R(-)-3-hidroxibutiril-CoA, esse composto por sua vez sofre ação da PHA sintase que transforma-o em P3HB. Pesquisas mostram que em *C. necator* foi detectado um acúmulo de cerca de 80% no peso da massa seca celular de PHB (OJUMU et al, 2004).

Figura 2 - Vias metabólicas de P3HB e P3HB-co-3HV em *Cupriavidus necator*



Fonte: (OJUMU et al, 2004).

De maneira geral, uma linhagem bacteriana ideal para a produção de PHAs deve apresentar uma baixa demanda por oxigênio, propiciando cultivos com um crescimento com alta densidade de células e pouca limitação por oxigênio, resultando em acúmulo de polímeros de alto peso molecular (CHEN, 2003).

1.3 Biodiesel e glicerol

O uso de óleos vegetais como combustível foi testado por Rudolf Diesel, responsável pelo desenvolvimento dos motores movidos a óleo proveniente do petróleo, em meados de 1900. No entanto, os baixos preços do petróleo e a facilidade na extração mantiveram o uso de óleos vegetais apenas como medida emergencial até a década de 40. Atualmente, com o aumento dos preços dos produtos petroquímicos, os impactos ambientais causados pelo seu uso e extração e a crescente probabilidade de escassez da matéria prima vem trazendo novamente ao foco das atenções os agora chamados biodieseis (FANGRUI & MILFORD, 1999).

A produção de biodiesel teve seu início nos anos 90 no continente Europeu, colocando-se como o maior mercado consumidor e produtor. Segundo o *European Biodiesel Board* a produção total da União Européia no ano de 2013 foi superior a 10,000 mil toneladas, sendo a Alemanha a responsável pela maior parcela, devido seu mercado automotivo bem estabelecido. No Brasil, a lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005, introduziu na matriz energética brasileira, o biodiesel, tornando obrigatório, a partir de 2008, o uso de um percentual intermediário de 2% (B2) a ser adicionado no óleo diesel comercializado. A partir de 2013 o percentual em questão foi alterado para 5% (B5) em todo território nacional. Tal medida do governo federal provocou um elevado investimento voltado para o aumento da capacidade instalada de refinarias no objetivo de suprir a demanda de biocombustível esperada na adoção do B2 e B5 (GAZZONI, 2007). O resultado do elevado potencial de produção instalado levou o governo federal, juntamente com o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), antecipar para janeiro de 2010 a adoção do B5. Atualmente o percentual intermediário utilizado é de 7%, adotado de novembro de 2014 e segundos dados da ANP, a previsão é de que este seja de 10% até março de 2019. (BRASIL, 2016).

A produção de biocombustíveis gera vários subprodutos, dentre eles o glicerol, em altas quantidades, tanto no processo de obtenção de biodiesel (THOMPSON & HE, 2006) quanto na produção de etanol (ALDIGUIER et al, 2004). A obtenção de biodiesel se dá por um processo de transesterificação, ao término desse processo, para cada 100kg do combustível produzidos são obtidos 10 kg de glicerol bruto. O crescente incentivo na produção de biodiesel provocou, por consequência um aumento na obtenção de glicerol, provocando uma queda acentuada no seu preço de mercado, o que provocou a falência de importantes indústrias da área de refino de glicerol (YASDANI & GONZALEZ, 2007). Com o aumento da oferta de glicerol no mercado agrava-se também um problema ambiental, que é o descarte do excedente de mercado no meio ambiente. Faz-se necessário, para o aumento da viabilidade econômica da produção de biodiesel por biorefinarias, o desenvolvimento de estratégias de conversões químicas e biológicas do glicerol em produtos de interesse, de forma a agregar valor na produção de biodiesel e amenizando os custos no tratamento de efluentes afetados (McCOY, 2006). Dentre as técnicas conhecidas, a conversão biológica apresenta vantagens se comparada a

química, isso pois possui uma maior especificidade de ação na obtenção do produto e demanda condições de pressão e temperatura mais amenas durante os bio-processos.

1.4 Histórico de produção de PHAs

O primeiro relato referente aos PHAs data de 1888, descritos por Beijerinck como grânulos brilhantes no interior de células bacterianas (*apud* CHOWDHURY, 1963). Porém, foi só em 1923 que a composição desses grânulos foi obtida, Maurice Lemoigne, trabalhando com a espécie *Bacillus megaterium*, determinou o composto ácido 3-hidroxibutírico (P3HB). Em 1958, Macre e Wilkinson concluíram que tais biopolímeros serviam como reserva de carbono e energia após verificar o armazenamento de um homopolímero em *B. megaterium* em uma situação de cultivo onde as proporções de glicose e nitrogênio no meio eram elevadas.

A história da comercialização dos biopolímeros se iniciou em 1959 com a empresa W. R. Grace and Company, ela produziu PHB nos Estados Unidos para possível aplicação comercial. No entanto encerrou seus processos pouco tempo depois devido à pouca eficiência nos métodos e produção e a falta de técnicas de purificação apropriadas. Em 1970, o PHBV, um copolímero sob o nome de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), passou a ser comercializado pela Imperial Chemical Industries Ltda., no Reino Unido, com nome de Biopol™ (SURIYAMONGKOL et al., 2007). Em 1996 a tecnologia foi vendida para a Monsanto e mais tarde para a Metabolix, Inc. O Governo americano financiou um projeto envolvendo engenharia genética para a melhora do metabolismo de *Escherichia coli* para uma melhor conversão de açúcares em P3HB. Em 2008, a Metabolix Inc. anunciou a produção combinada de biopolímeros e energia de biomassa através do uso de gramíneas, com objetivo de obter PHA a cerca de 20% do peso de massa seca celular, com 75% de recuperação do polímero (*apud* CHANPRATEEP, 2010). Mais tarde, a Metabolix Inc. se fundiria a Daniels Midland Company, em 2010, dando origem a Telles Company e vindo a ser a maior produtora de PHAs da atualidade. Outras empresas e associações foram formadas, como o acordo entre Procter & Gamble, Kaneka Coporation, Universidade de Tsingua na China e o Instituto Riken no Japão, que culminou no desenvolvimento de polímeros como o PHB e PHB-HHx criando a marca Nodax™, vendida em 1993. No Japão, a Mitsubishi Gas Chemical tem feito progressos na

produção de PHB através de metanol, sob o nome BioGreen™. A alemã Biomer Inc. já produz PHB em escala comercial desde 1995. No Canadá, a empresa Biomatera Inc. se especializou na produção de PHA através da fermentação de resíduos industriais, aplicando os produtos na fabricação de cápsulas medicamentosas e cosméticas, além da utilização do polímero em matrizes de regeneração de tecidos (CHANPRATEEP, 2010). O Brasil por sua vez com a PHB Industrial S.A., em Serrana, usa cana de açúcar para a produção de biopolímero (Biocycle™) que surgiu como um investimento entre a empresa Irmãos Biagi, produtora de açúcar, e a The Balbo Group, produtores de álcool proveniente de cana de açúcar (CHANPRATEEP, 2010).

2 OBJETIVOS

Avaliar as condições ótimas de temperatura, fontes de carbono e nitrogênio para a produção de P3HB a partir de glicerol de biodiesel por *Pandorea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* M013, utilizando planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR).

Avaliar a cinética de produção de P3HB durante 120h a partir de glicerol de biodiesel pelas linhagens *Pandorea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios de Cultivo

Foram utilizados os meios de cultivo Meio Lisogênico (Luria-Bertani) (LB) e Meio Mineral (MM).

3.1.1 Meio Lisogênico (LB)

Triptona..... 10,0 g/L

Extrato de Levedura..... 5,0 g/L

NaCl..... 5,0 g/L

O meio LB sólido foi obtido com a adição de ágar 15-20 g/L.

3.1.2 Meio mineral

O Meio Mineral, utilizado na a produção de PHAs, apresentava a seguinte composição (RAMSAY et al., 1990):

Na_2HPO_4 3,5 g/L

KH_2PO_4 1,5 g/L

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L

Citrato férrico amoniacal..... 0,06 g/L

Solução de elementos traços..... 1 mL

Para a obtenção do meio sólido foram adicionados 15-20 g/L de ágar.

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 glicerol, como fonte de carbono, e (NH₄)₂SO₄, como fonte de nitrogênio, para a obtenção das melhores condições na produção de P3HB.

3.1.3 Esterilização

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

3.2 Micro-organismos

Utilizaram-se as linhagens isoladas a partir de solo de Mata Atlântica, *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13. As linhagens bacterianas foram mantidas em placas de Petri e preservadas em tubos criogênicos contendo glicerol a 20%, sob congelamento a -20 °C e -80 °C; sendo realizada a manutenção de viabilidade das culturas microbianas periodicamente. Realizou-se também a preservação destas linhagens bacterianas através de liofilização, sendo estocadas em ampolas seladas a vácuo e mantidas em refrigerador (5-10 °C).

3.3 Cultivo de micro-organismos

3.3.1 Delineamento Composto Central Rotacional

A linhagens *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13 foram avaliadas em meios de cultivo através de um delineamento composto central do tipo rotacional. O planejamento para cada linhagem foi constituído de 18 experimentos; com 8 ensaios nos níveis propostos, 4 réplicas do ponto central e mais 6 referentes aos pontos axiais. As variáveis estudadas foram temperatura (X_1), concentrações de sulfato de amônio (X_2) e glicerol bruto (X_3); obtendo-se como resposta a produção de P3HB (g/L).

Os níveis das variáveis estudadas apresentaram-se na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a seguinte equação de codificação:

$$\text{Equação Geral:} \quad X_n = \frac{(x - x_0)}{\frac{x_{+1} - x_{-1}}{2}} \quad (1)$$

Onde:

X_n é o valor da variável no experimento na forma codificada;

x_0 é o valor real da variável no ponto central;

x_{+1} é o valor real da variável no nível superior;

x_{-1} é o valor real da variável no nível inferior.

Assim, nos planejamentos realizados temos a variável temperatura (X_1) nos níveis 30°C (-1), 33,5°C (0) e 37°C (+1). Da mesma forma, os valores de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_2) estão divididos nos níveis 1,0; 2,0 e 3,0 g/L; e por fim o glicerol bruto nos valores 15, 20 e 25 g/L. As equações codificadas nos experimentos são demonstradas pelas equações 2, 3 e 4:

$$X_1 = X - 33,5/3,5 \quad (2)$$

$$X_2 = X - 2/1 \quad (3)$$

$$X_3 = X - 20/5 \quad (4)$$

Os valores dos pontos axiais ($\pm\alpha$) foram definidos pela equação abaixo:

$$a = \pm(2^k)^{1/4} \quad (5)$$

Onde k é igual ao número de fatores (variáveis) do planejamento experimental. Como os planejamentos realizados apresentam 3 variáveis ($k = 3$), $\alpha = \pm 1,6818$. Para os valores reais tem-se:

$$X_a = X_0 + a[(X_{+1} - X_{-1})/2] \quad (6)$$

Na tabela 1, pode ser observada a matriz obtida no planejamento experimental realizado, com as variáveis em seus respectivos níveis reais e codificados.

Tabela 1: Delineamento composto central rotacional com variáveis independentes codificadas X_1 = temperatura; X_2 = concentração de sulfato de amônio e X_3 = concentração de glicerol.

Tratamentos	Variáveis codificadas		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

Variáveis independentes	Níveis reais				
	-1,68	-1	0	1	1,68
X_1 =Temperatura (°C)	27,6	30	33,5	37	39,4
X_2 =Sulfato de amônio (g/L)	0,3	1	2	3	3,7
X_3 =Glicerol bruto (g/L)	11,6	15	20	25	28,4

Fonte: Dados do trabalho.

As análises estatísticas foram efetuadas utilizando o *Software Statistica 7.0*, sendo realizada para a resposta uma análise de regressão múltipla, através do método dos mínimos quadrados, partindo-se da equação original:

$$Y = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + cX_3 + dX_1^2 + eX_1X_2 + fX_1X_3 + gX_2^2 + hX_2X_3 + iX_3^2 \quad (7)$$

Onde:

Y é a resposta estudada;

β_0 é o valor médio da resposta;

a, b, c, d, e, f, g, h, i são constantes ou parâmetros da equação;

X_1 é a temperatura (°C);

X_2 é a concentração de sulfato de amônio (g/L);

X_3 é a concentração de glicerol (g/L).

A partir da equação original (7) foi realizada uma aplicação estatística da estimativa dos parâmetros através dos valores de t de Student, sendo eliminados aqueles com nível de significância superior a 5%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes. O valor da distribuição t de Student foi definido como a relação entre o valor do parâmetro estimado e o seu desvio padrão. Eliminando os parâmetros não significativos, definiu-se para cada uma das respostas estudadas uma equação representativa dos efeitos das variáveis do processo que mais afetam a resposta avaliada.

O valor de F (Fisher) foi determinado pela razão entre o quadrado médio da equação ajustada (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR), como mostra a Equação 8. O valor obtido para F pode ser usado para a realização de um teste de hipótese para a

verificação da adequação aos dados experimentais. Assim, se o valor de F calculado é maior que o valor de F tabelado, rejeita-se a hipótese de nulidade do modelo obtido, sendo este considerado significativo. Quanto maior o valor de F, melhor será o ajuste do modelo em questão.

$$F = \frac{QME}{QMR} \quad (8)$$

O quadrado médio da equação (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR) são dados pelas Equações 9 e 10, respectivamente.

$$QME = \frac{\text{Soma dos quadrados dos valores preditos}}{\text{Número de graus de liberdade da equação}} \quad (9)$$

$$QMR = \frac{\text{Soma dos quadrados do resíduo}}{\text{Número de graus de liberdade do resíduo}} \quad (10)$$

O coeficiente de correlação quadrático R^2 e a comparação entre o F calculado (F_C) e o F tabelado (F_T) foram utilizados para a constatação da significância ou não do modelo.

3.3.2 Cultivo das linhagens *Pandorea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13

As linhagens avaliadas foram estriadas a partir de cultura estoque em Meio Lisogênico sólido, sendo incubados durante 48 h a 30°C. Colônias isoladas foram transferidas para 50 mL de Meio Lisogênico, durante 6-8 h a 180 rpm, até que fosse atingida a densidade óptica ($\lambda=610$ nm) de $0,65 \pm 0,02$ de absorbância, visando a padronização do pré-inóculo (10^8 UFC). Utilizou-se 1,5 mL do cultivo para inocular 50 mL de meio mineral, contendo glicerol bruto (Biocapital S. A., Charqueada-SP) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o qual foi incubado durante

72 h a 180 rpm para cada temperatura teste do planejamento experimental. Os experimentos de cinética de produção de P3HB, para ambas as linhagens, foram conduzidos a 33,5 °C e 180 rpm, em 50 mL de meio mineral até 120 h, sendo analisados amostras referentes aos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h. Todas as fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 250 mL e o pH inicial dos meios de cultivo foi ajustado para 7,0 utilizando HCl 2M / NaOH 2M. O Meio Lisogênico também foi utilizado para a preservação e manutenção de culturas estoque. Após o término das fermentações, duas amostras de 10 mL e 40 mL de cada cultivo foram centrifugadas a 1050 x g e 11800 x g por 10 minutos, respectivamente. A primeira amostra foi utilizada para a determinação do consumo de glicerol e quantificação de biomassa. As células da segunda amostra foram congeladas e liofilizadas para a determinação da quantidade de P3HB.

3.4 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 (“pelletes”) obtidos das amostras centrifugadas, provenientes dos cultivos, foram submetidos à secagem em estufa a 105 °C por 24 h. A biomassa residual (X_R) foi obtida através da diferença entre os valores de massa seca celular e polímero (g/L) obtidos nos cultivos realizados.

3.5 Determinação de glicerol

A determinação das concentrações de glicerol foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se o cromatógrafo Prominence UFLC (Shimadzu®), acoplado aos detectores ultravioleta (SPD-20A UV/Vis®) e índice de refração (RID-10A®), equipado com a coluna Rezex ROA (300 x 7,8 mm) (Phenomenex®). As condições empregadas na análise foram: volume de injeção: 20µL; temperatura da coluna (forno): 65°C; e eluente: H₂SO₄ 0,0025M a uma vazão de 0,6 mL/min. O consumo do substrato utilizado foi calculado através da diferença entre as concentrações iniciais e finais de glicerol, observadas nos meios de cultivos, para seus respectivos experimentos fermentativos.

3.6 Determinação de P3HB

A análise quantitativa e qualitativa de P3HB foram determinadas através de cromatografia gasosa de propil-ésteres (RIIS & MAI, 1988) acoplada a espectrometria de massas. Entre 5 a 10 mg de células liofilizadas foram submetidas a reação de propanólise em tubos, aos quais se adicionaram 2 mL de uma solução de HCl em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2 dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido benzóico em propanol (40 g/L), como padrão interno. Os tubos foram fechados fortemente, sendo vedados com fita de PTFE, agitados e submetidos a 4 h de reação a 80°C, com agitação após os primeiros 40 minutos de propanólise. Ao final da reação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se 4 mL de água ultrapura aos mesmos, sendo agitados vigorosamente 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 propil-ésteres. Para análise das amostras, um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após o fracionamento de amostra ("split" 1:20) em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu®), equipado com a coluna Rtx®-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As temperaturas do injetor e da interface foram 250 e 280°C, respectivamente, utilizando-se hélio como gás de arraste a 0,8 mL/min. As análises foram conduzidas empregando-se um programa de temperaturas do forno com 100°C por 3 minutos, elevando-se a temperatura até 210°C a uma razão de 8°C/min e mantendo-se a 210°C por 15 minutos. Foi utilizado o padrão P3HB (Sigma-Aldrich®) para a geração de curvas de calibração. O PHA total foi calculado, sendo expresso em porcentagem da massa seca celular (P3HB%) e em gramas de polímero por litro de cultivo (g/L).

Além disso, foi realizado o cálculo de rendimento global ($Y^{\text{O}_{\text{HB/GLY}}}$), para verificar a conversão de substrato consumido em produto (g/g). O rendimento global é obtido através da razão entre a quantidade de P3HB (g/L) produzida e o glicerol consumido em cultivo (g/L), levando em consideração tanto a fonte de carbono utilizada para a produção de polímero, como aquela direcionada ao crescimento celular (X_R). O cálculo do rendimento global máximo foi obtido a partir da equação 11, utilizando os valores de rendimento teórico e de biomassa residual máximos. O rendimento teórico máximo considera que a fonte de carbono é totalmente direcionada à produção de polímero,

sendo obtido a partir da razão entre a quantidade de P3HB (g/L) produzida e a fonte de carbono utilizada somente para a produção de polímero. Para o cálculo de rendimento teórico máximo, têm-se 2 mols de glicerol ($M = 92$ g/mol) envolvidos na produção de 1 mol de P3HB ($M = 86$ g/mol), obtendo-se o valor de $Y_{HB/GLY}^T = 0,47$. O valor teórico de produção de biomassa residual a partir de glicerol foi considerado $Y_{X/GLY} = 0,50$ (YAMANE, 1993; GOMEZ et al., 1996).

$$Y_{HB/GLY}^O = \frac{PHB}{PHB \left(\frac{1}{Y_{HB/GLY}^T} - \frac{1}{Y_{X/GLY}} \right) + \frac{100}{Y_{X/GLY}}} \quad (11)$$

Onde:

$Y_{HB/GLY}^O$ é o rendimento global máximo (g/g);

$Y_{HB/GLY}^T$ é o rendimento teórico máximo (g/g);

$Y_{X/GLY}$ é o rendimento de glicerol em biomassa residual (XR) (g/g);

e PHB é a quantidade de polímero em porcentagem da massa seca celular (PHB%).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivos da linhagem *Pandorea* sp. MA03 utilizando planejamento experimental

Na tentativa de avaliar o processo de produção de P3HB pela linhagem *Pandora* sp. MA03, foi realizado um delineamento composto central do tipo rotacional para esta linhagem. Este planejamento foi constituído de 18 experimentos; com 8 ensaios nos níveis propostos, 4 réplicas do ponto central e mais 6 referentes aos pontos axiais. As variáveis estudadas foram temperatura (X_1), concentrações de sulfato de amônio (X_2) e glicerol bruto (X_3); obtendo-se como resposta a produção de P3HB (g/L). Para cada variável, além dos pontos axiais, foram analisados 3 níveis. Assim, nos planejamentos realizados a variável temperatura (X_1) foi avaliada em 30°C (-1), 33,5°C (0) e 37°C (+1). Da mesma forma, os valores de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_2) estão divididos nos níveis 1,0; 2,0 e 3,0 g/L; e por fim o glicerol bruto nos valores 15, 20 e 25 g/L. Os ensaios fermentativos foram realizados segundo especificações do item 3.3.2, sendo conduzidos até 72 h.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos nos cultivos com a linhagem *Pandora* sp. MA03, utilizando delineamento composto central. O maior valor de produção de polímero foi obtido no experimento 14, com 28,4 g/L de glicerol bruto e 2 g/L de sulfato de amônio, a 33,5°C. Neste ensaio foi observada uma produção de aproximadamente 1,34 g/L de P3HB, quando pôde ser observado um rendimento de 0,078 g/g. No experimento 11, onde foi utilizada a menor concentração de sulfato de amônio, foi observado um acúmulo intracelular de polímero de 58,85 %, demonstrando a necessidade da limitação de nitrogênio para o aumento da concentração celular de P3HB.

Tabela 2 - Resultados dos cultivos de *Pandorea* sp. MA03 em meio mineral após 72 h, através de delineamento composto central rotacional.

Experimento	Temperatura (°C)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Glicerol (g/L)	Consumo de glicerol (g/L)	MSC (g/l)	P3HB (%MSC)	P3HB (g/L)	X _R (g/L)	Y ⁰ _{HB/GLY} (g/g)
1	30,0	1,0	15,0	10,42	0,60	46,96	0,282	0,318	0,027
2	30,0	1,0	25,0	14,63	0,93	47,18	0,439	0,491	0,030
3	30,0	3,0	15,0	15,00	2,71	29,78	0,807	1,903	0,054
4	30,0	3,0	25,0	15,40	3,00	36,00	1,080	1,920	0,070
5	37,0	1,0	15,0	12,95	1,48	41,27	0,611	0,869	0,047
6	37,0	1,0	25,0	12,46	1,60	42,19	0,675	0,925	0,054
7	37,0	3,0	15,0	15,00	2,75	37,45	1,030	1,720	0,069
8	37,0	3,0	25,0	14,32	3,35	35,79	1,199	2,151	0,084
9	27,6	2,0	20,0	11,23	1,61	38,04	0,612	0,998	0,055
10	39,4	2,0	20,0	10,81	2,57	16,05	0,412	2,158	0,038
11	33,5	0,3	20,0	2,62	0,42	58,85	0,247	0,173	0,094
12	33,5	3,7	20,0	17,20	2,95	17,69	0,522	2,428	0,030
13	33,5	2,0	11,6	11,60	1,46	54,64	0,798	0,662	0,069
14	33,5	2,0	28,4	17,23	2,44	55,054	1,343	1,097	0,078
15	33,5	2,0	20,0	18,78	1,70	57,65	0,980	0,720	0,052
16	33,5	2,0	20,0	18,62	1,74	56,72	0,987	0,753	0,053
17	33,5	2,0	20,0	18,14	1,84	53,34	0,981	0,859	0,054
18	33,5	2,0	20,0	18,89	1,89	52,32	0,988	0,901	0,052

Fonte: Dados do trabalho

A partir dos resultados de produção de polímero obtidos neste delineamento, realizou-se uma regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, criando a seguinte equação geral para a síntese de P3HB em *Pandoraea* sp. MA03:

$$Y = 0,978 + 0,042X_1 + 0,188X_2 + 0,116X_3 - 0,139X_1^2 - 0,028X_1X_2 - 0,025X_1X_3 - 0,184X_2^2 + 0,028X_2X_3 + 0,059X_3^2 \quad (12)$$

Para verificar a confiabilidade deste modelo, foi realizado um teste de hipótese de nulidade (H_0). Os valores de p (nível de significância) abaixo de 5% (p -valor < 0,05) rejeitam H_0 , criando uma hipótese alternativa (H_1), a qual afirma que o modelo obtido é significativo. Isto pode ser confirmado a partir de um teste de Hartley, cuja estatística tem distribuição F (Fisher-Snedecor) obtida do quociente entre a maior e menor variância. Assim, o valor de F calculado (F_C) obtido para o experimento é comparado a F tabelado (F_T), este último determinado através dos graus de liberdade associados ao numerador e denominador da estatística do teste. Se $F_C > F_T$, rejeita-se H_0 . Na tabela 3,

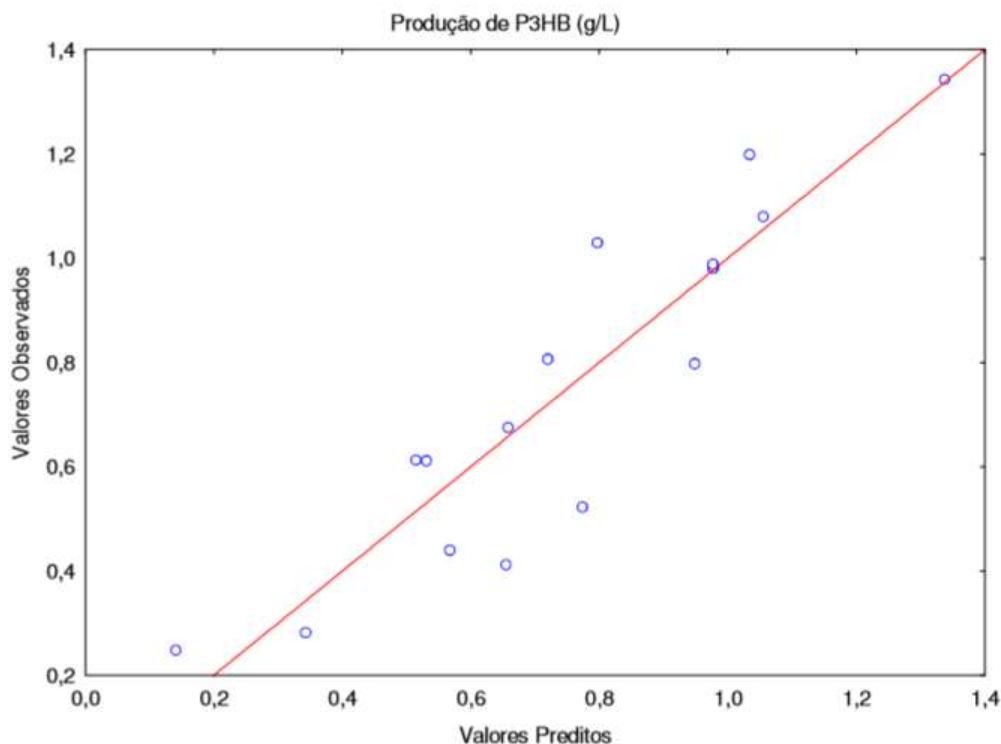
pode ser verificado que F calculado é maior que F tabelado, assim o modelo obtido acima é validado. O coeficiente de determinação (R^2) mede o ajuste da reta de regressão à nuvem de pontos e, neste caso, indica que 83,65% da variação total das respostas pode ser explicada pela equação obtida.

Tabela 3: Análise de variância para a produção de P3HB nos cultivos de *Pandoraea* sp. MA03 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F_c	p-valor
Regressão	1,447618	9	0,160846	4,546450	0,022106
Resíduos	0,283028	8	0,035378		
Total	1,730646				

Na figura 3 pode ser visualizado os valores observados neste experimento em função aqueles preditos pela equação geral.

Figura 3-Valores observados em função dos valores preditos para a produção de P3HB, obtidos nos cultivos de *Pandoraea* sp. MA03 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental.



Fonte: Dados do trabalho

Neste modelo, foram eliminados os parâmetros da equação com nível de significância acima de 5% para o teste t de student, desconsiderando as variáveis relacionadas aos mesmos. Na tabela 4 observam-se apenas os parâmetros e variáveis mais significativos para o delineamento realizado.

Tabela 4- Resultados da regressão múltipla para a produção de P3HB obtidos nos cultivos de *Pandoraea* sp. MA03 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental.

Fator	Parâmetro	t de Student	p-valor
Constante β_0	1,040864	15,59042	0,000000
X_2	0,188293	4,13830	0,001166
X_3	0,115662	2,54201	0,024561
X_1^2	-0,151093	-3,26834	0,006109
X_2^2	-0,196171	-4,24344	0,000959
$R^2=0,79$	$F_C = 12,05$		$F_T(4,13) = 3,18$

Fonte: Dados do trabalho

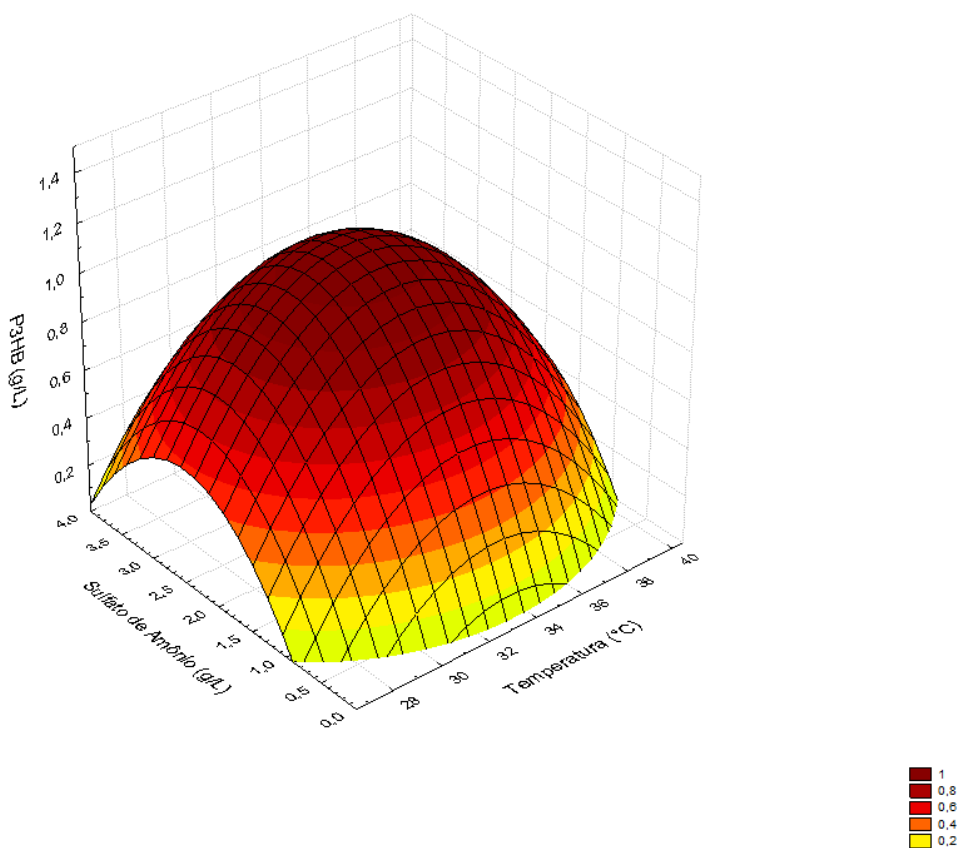
Na eliminação dos parâmetros não significativos, nota-se um aumento no valor de F calculado ($F_C = 12,05$) em relação a F tabelado, afirmando a significância do modelo ajustado, para o qual obteve-se a seguinte equação:

$$Y = 1,041 + 0,188X_2 + 0,116X_3 - 0,151X_1^2 - 0,196X_2^2 \quad (13)$$

Nos cultivos realizados, pode ser verificado a influência da variável glicerol bruto (X_3), com um discreto aumento nos valores de MSC e acúmulo de polímero, a partir do ajuste de sua concentração de 15 a 25 g/L. As variáveis estatisticamente mais significativas para este processo, nos níveis propostos para este planejamento, foram a temperatura (X_1) e concentração de sulfato de amônio (X_2). Nestes experimentos, notou-se um efeito positivo sobre o acúmulo de polímero no sentido das menores concentrações de sulfato de amônio. Ao contrário, o aumento nos valores de temperatura nas proximidades do ponto central, favorece o acúmulo intracelular de polímero, assim como o aumento de seus valores até 37 °C, também influencia de forma positiva o crescimento celular, resultando em maiores biomassas. Estes dados podem ser melhores visualizados a partir dos gráficos de superfície de resposta,

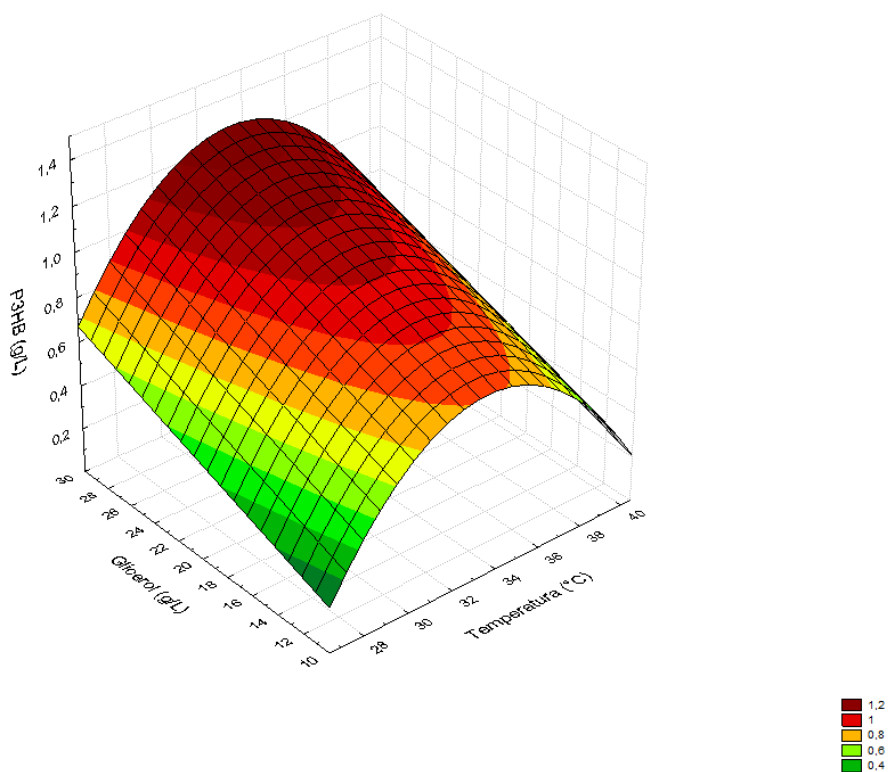
obtidos a partir da equação ajustada deste planejamento, para as variáveis deste estudo.

Figura 4 - Superfície de resposta para a produção de P3HB em função da temperatura e concentrações de sulfato de amônio, nos cultivos de *Pandoraea* sp. MA03 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental



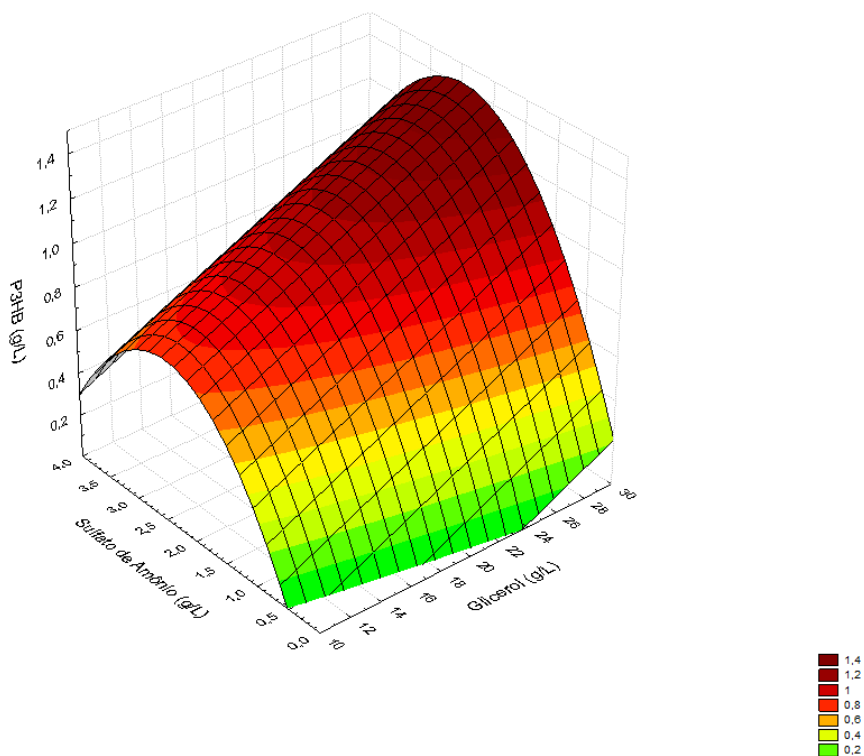
Fonte: Dados do trabalho

Figura 5 -Superfície de resposta para a produção de P3HB em função da temperatura e concentrações de glicerol, nos cultivos de *Pandoraea* sp. MA03 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental.



Fonte: Dados do trabalho

Figura 6 - Superfície de resposta para a produção de P3HB em função das concentrações de glicerol e sulfato de amônio, nos cultivos de *Pandoraea* sp. MA03 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental.



Fonte: Dados do trabalho

4.2 Cultivos da linhagem *Burkholderia cepacia* MA13 utilizando planejamento experimental

Foi realizado um delineamento composto central do tipo rotacional para avaliar a produção de P3HB pela linhagem *Burkholderia cepacia* MA13, com o objetivo de verificar a influência das variáveis temperatura, fonte de nitrogênio (sulfato de amônio) e fonte de carbono (glicerol de biodiesel), na tentativa de obter condições ótimas de cultivo. Assim como nos ensaios posteriores (item 8.1), o planejamento foi constituído de 18 experimentos; com 8 ensaios nos níveis propostos, 4 réplicas do ponto central e mais 6 referentes aos pontos axiais. As variáveis estudadas foram temperatura (X_1), concentrações de sulfato de amônio (X_2) e glicerol bruto (X_3); obtendo-se como resposta a produção de P3HB (g/L). Para cada variável, além dos pontos axiais, foram analisados 3 níveis. Assim, nos planejamentos realizados a variável temperatura (X_1) foi avaliada em 30°C (-1), 33,5°C (0) e 37°C (+1). Da mesma forma, os valores de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_2) estão divididos nos níveis 1,0; 2,0 e 3,0 g/L; e por fim o glicerol bruto nos valores 15, 20 e 25 g/L. Os ensaios fermentativos foram realizados segundo especificações do item 3.3.2, sendo conduzidos até 72 h.

Os resultados obtidos nos cultivos de *Burkholderia cepacia* MA13 podem ser observados na tabela 5. Como pode ser verificado o maior valor de produção de P3HB foi obtido no experimento 14, com 28,4 g/L de glicerol bruto e 2 g/L de sulfato de amônio, a 33,5 °C, onde foi observada uma produção de 3,23 g/L de polímero, e um rendimento de 0,166 g/g. O maior acúmulo intracelular de polímero foi observado no experimento 11, sendo obtidos 82,70% da MSC, evidenciando a necessidade da limitação da fonte de nitrogênio para o acúmulo de P3HB.

Tabela 5 - Resultados dos cultivos de *Burkholderia cepacia* MA13 em meio mineral após 72 h, através de delineamento composto central rotacional.

Experimento	Temperatura (°C)	(NH ₄) ₂ S O ₄ (g/L)	Glicerol (g/L)	Consumo de glicerol (g/L)	MSC (g/l)	P3HB (%MSC)	P3HB (g/L)	X _R (g/L)	Y ⁰ _{HB/GLY} (g/g)
1	30,0	1,0	15,0	10,42	0,60	46,96	0,282	0,318	0,027
2	30,0	1,0	25,0	14,63	0,93	47,18	0,439	0,491	0,030
3	30,0	3,0	15,0	15,00	2,71	29,78	0,807	1,903	0,054
4	30,0	3,0	25,0	15,40	3,00	36,00	1,080	1,920	0,070
5	37,0	1,0	15,0	12,95	1,48	41,27	0,611	0,869	0,047
6	37,0	1,0	25,0	12,46	1,60	42,19	0,675	0,925	0,054
7	37,0	3,0	15,0	15,00	2,75	37,45	1,030	1,720	0,069
8	37,0	3,0	25,0	14,32	3,35	35,79	1,199	2,151	0,084
9	27,6	2,0	20,0	11,23	1,61	38,04	0,612	0,998	0,055
10	39,4	2,0	20,0	10,81	2,57	16,05	0,412	2,158	0,038
11	33,5	0,3	20,0	2,62	0,42	58,85	0,247	0,173	0,094
12	33,5	3,7	20,0	17,20	2,95	17,69	0,522	2,428	0,030
13	33,5	2,0	11,6	11,60	1,46	54,64	0,798	0,662	0,069
14	33,5	2,0	28,4	17,23	2,44	55,054	1,343	1,097	0,078
15	33,5	2,0	20,0	18,78	1,70	57,65	0,980	0,720	0,052
16	33,5	2,0	20,0	18,62	1,74	56,72	0,987	0,753	0,053
17	33,5	2,0	20,0	18,14	1,84	53,34	0,981	0,859	0,054
18	33,5	2,0	20,0	18,89	1,89	52,32	0,988	0,901	0,052

Fonte: Dados do trabalho

Utilizando os valores de produção de P3HB (g/L) como resposta, obtidos neste delineamento, realizou-se uma regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, criando uma equação geral para a síntese de P3HB por *Burkholderia cepacia* MA13:

$$Y = 2,431 + 0,391X_1 + 0,427X_2 + 0,363X_3 - 0,756X_1^2 - 0,213X_1X_2 - 0,003X_1X_3 - 0,182X_2^2 + 0,220X_2X_3 + 0,039X_3^2 \quad (14)$$

Foi realizado um teste de hipótese de nulidade (H_0), para verificar a confiabilidade do modelo obtido. Os valores de p (nível de significância) abaixo de 5% (p-valor < 0,05)

rejeitam H_0 , criando uma hipótese alternativa (H_1), a qual afirma que o modelo obtido é significativo. Isto pode ser confirmado a partir de um teste de Hartley, cuja estatística tem distribuição F (Fisher-Snedecor) obtida do quociente entre a maior e menor variância. Assim, o valor de F calculado (F_C) obtido para o experimento é comparado a F tabelado (F_T), este último determinado através dos graus de liberdade associados ao numerador e denominador da estatística do teste. Se $F_C > F_T$, rejeita-se H_0 . No teste de hipótese de nulidade, realizado para o delineamento composto central dos experimentos de *Burkholderia cepacia* MA13, pode ser verificado na tabela 6 que F calculado é maior que F tabelado, assim o modelo obtido acima é validado. O coeficiente de determinação (R^2) mede o ajuste da reta de regressão à nuvem de pontos, indicando que 84,61% da variação total das respostas pode ser explicada pela equação obtida.

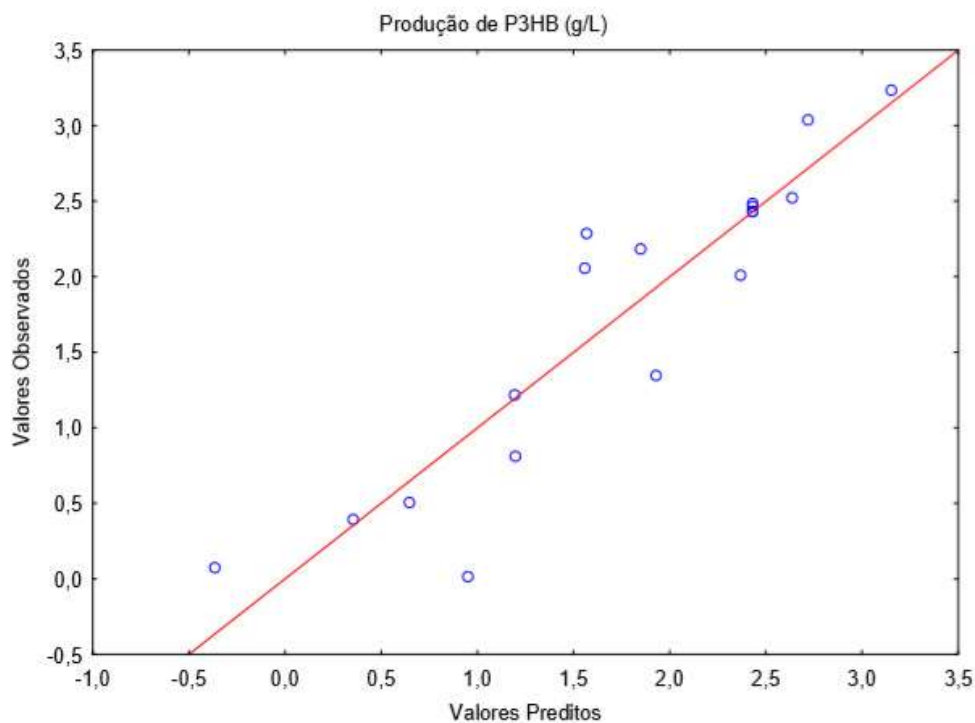
Tabela 6 - Análise de variância para a produção de P3HB nos cultivos de *Burkholderia cepacia* MA13 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Fc	p-valor
Regressão	14,92054	9	1,657838	4,885581	0,017886
Resíduos	2,71466	8	0,339333		
Total	17,63520				

$R^2=84,61\%$; $F_{9,8;0,05}=3,39$
 Fonte: Dados do trabalho

Na figura 7 pode ser visualizado os valores observados neste experimento em função daqueles preditos pela equação geral.

Figura 7 - Valores observados em função dos valores preditos para a produção de P3HB, obtidos nos cultivos de *Burkholderia cepacia* MA13 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental.



Fonte: Dados do trabalho

No modelo obtido para *Burkholderia cepacia* MA13 foram eliminados os parâmetros da equação com nível de significância acima de 5% para o teste t de student, desconsiderando as variáveis relacionadas aos mesmos. Na tabela 7 observam-se apenas os parâmetros e variáveis mais significativos para o delineamento realizado.

Tabela 7- Resultados da regressão múltipla para a produção de P3HB obtidos nos cultivos de *Burkholderia cepacia* MA13 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental.

Fator	Parâmetro	t de student	p-valor
Constante β_0	2,304273	13,35235	0,000000
X_1	0,391331	2,62019	0,021179
X_2	0,427297	2,86100	0,013372
X_3	0,363363	2,43292	0,030165
X_1^2	-0,730956	-4,89085	0,000295
$R^2=0,78$	$F_C = 11,22$		$FT(4,13) = 3,18$

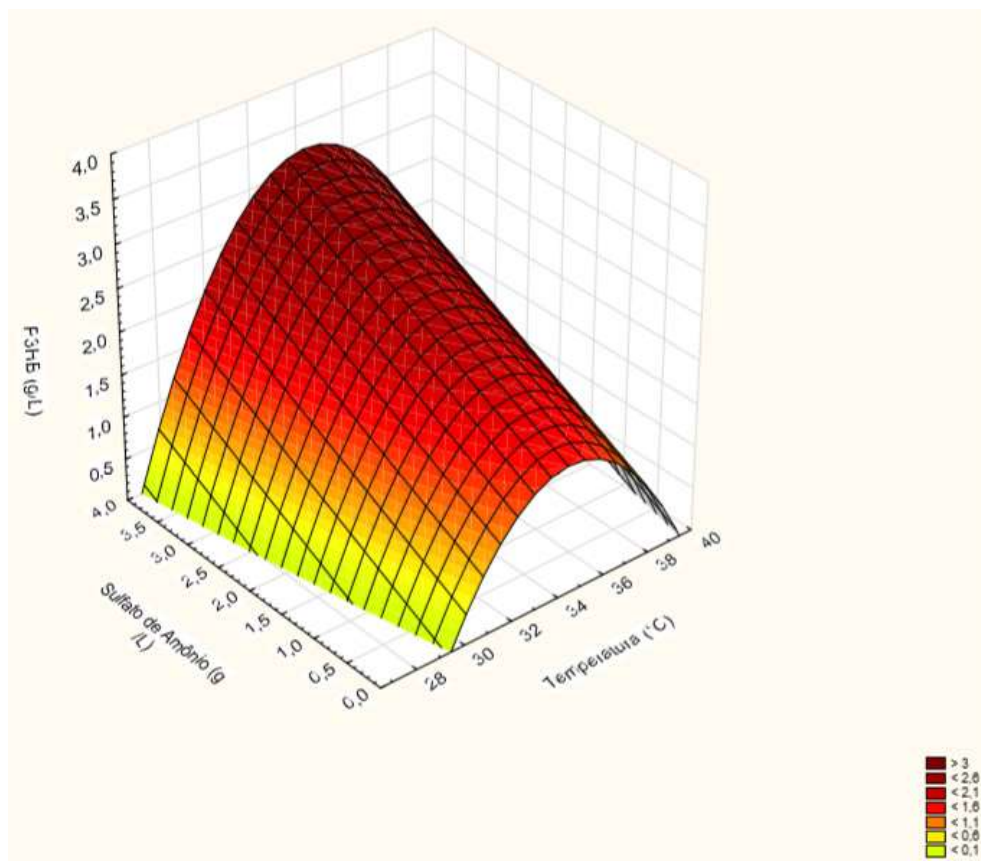
Fonte: Dados do trabalho

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, notou-se um aumento no valor de F calculado ($F_C = 11,22$) em relação a F tabelado, afirmando a significância do modelo ajustado, para o qual obteve-se a seguinte equação:

$$Y = 2,304 + 0,391X_1 + 0,427X_2 + 0,363X_3 - 0,731X_1^2 \quad (15)$$

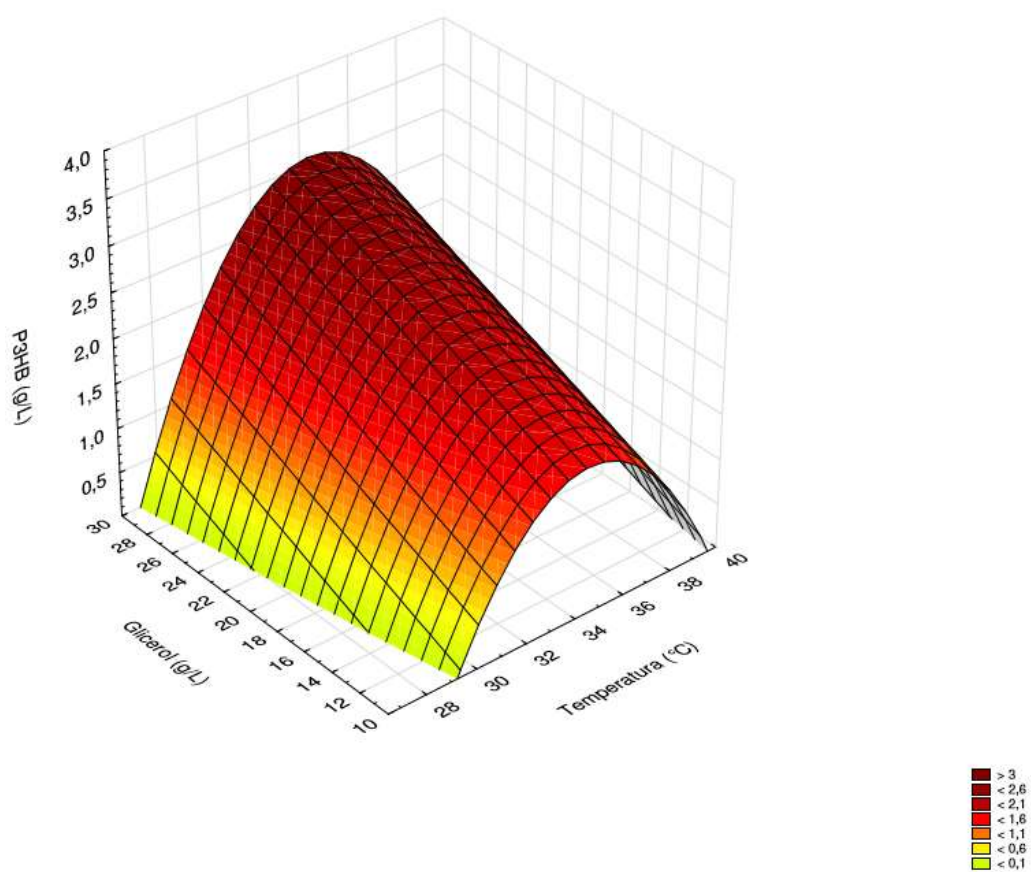
Nos cultivos realizados com *Burkholderia cepacia* MA13 pode ser verificado a influência da variável temperatura (X_1), com valores ótimos próximos de 34 °C, onde pode ser verificado um metabolismo mais apropriado para o crescimento celular, e consequente acúmulo de biomassa. Temperaturas com valores próximos dos pontos axiais deste planejamento parecem inibir o crescimento celular de *Burkholderia cepacia* MA13. Tais resultados podem ser verificados a partir dos gráficos de superfície de resposta, obtidos a partir da equação ajustada obtida para as variáveis deste planejamento (Figuras 8 e 9). Por outro lado, as variáveis concentração de sulfato de amônio (X_2) e concentração de glicerol bruto (X_3) exercem efeito positivo na produção de P3HB (g/L), sendo observados maiores valores de polímero, à medida que se aumenta os valores destas variáveis nos níveis propostos para o planejamento (Figuras 8, 9 e 10).

Figura 8 - Superfície de resposta para a produção de P3HB em função da temperatura e concentrações de sulfato de amônio, nos cultivos de *Burkholderia cepacia* MA13 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental.



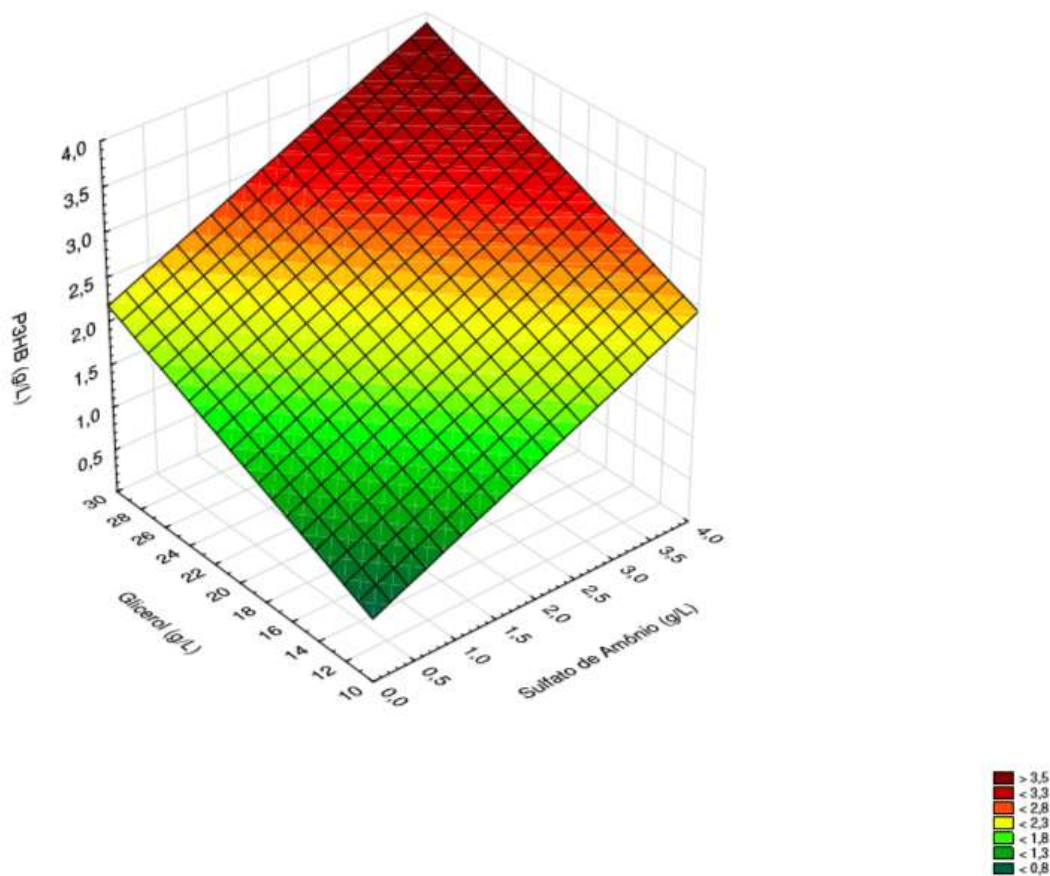
Fonte: Dados do trabalho

Figura 9 - Superfície de resposta para a produção de P3HB em função da temperatura e concentrações de glicerol, nos cultivos de *Burkholderia cepacia* MA13 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental.



Fonte: Dados do trabalho

Figura 10 - Superfície de resposta para a produção de P3HB em função das concentrações de glicerol e sulfato de amônio, nos cultivos de *Burkholderia cepacia* MA13 em meio mineral após 72 h, utilizando planejamento experimental.

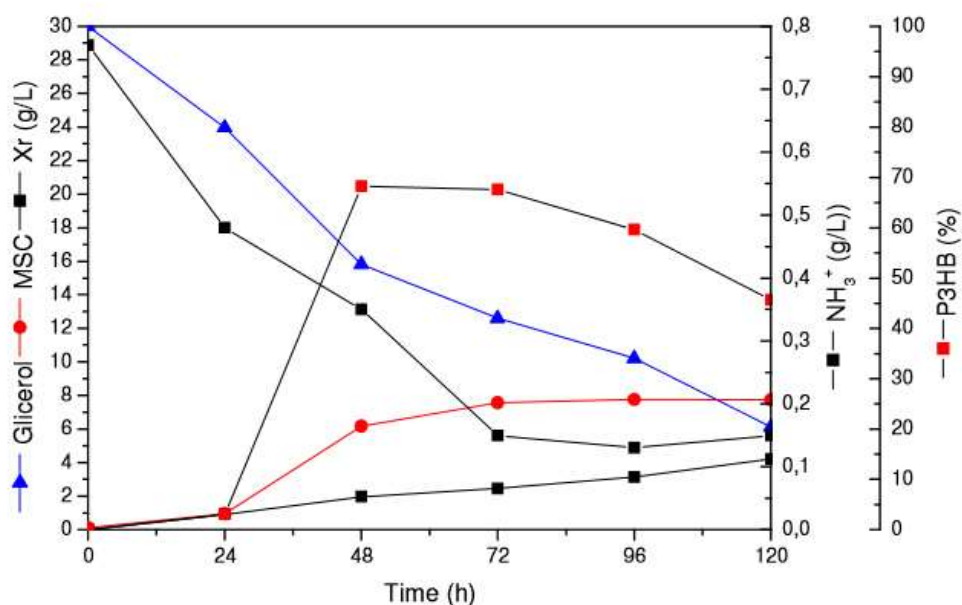


Fonte: Dados do trabalho

4.3 Cinética da produção de P3HB a partir de glicerol bruto

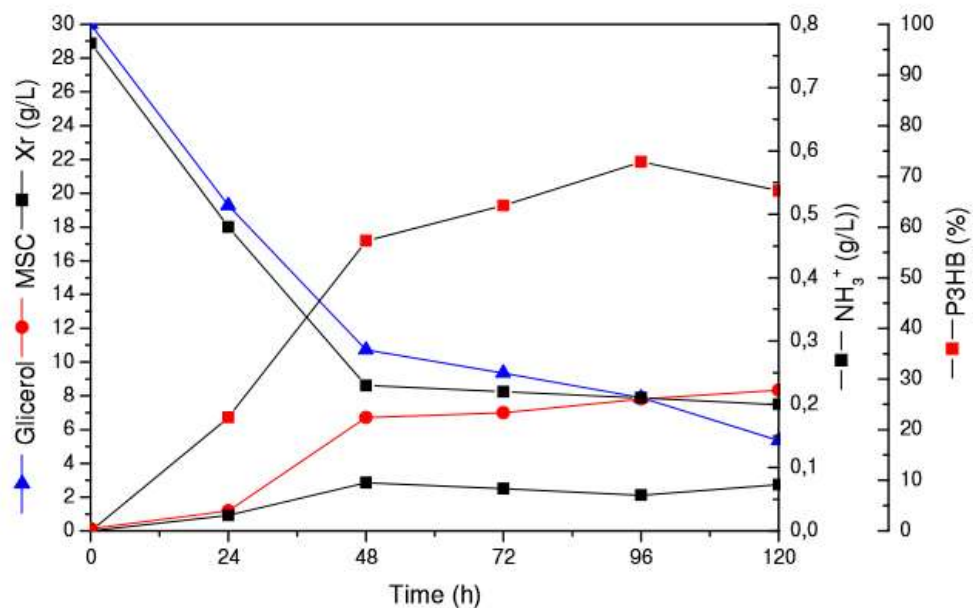
Foram realizados experimentos de cinética de produção de P3HB a partir de glicerol bruto pelas linhagens *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13. Estes experimentos foram conduzidos a 33,5 °C e 180 rpm, em meio mineral contendo 30 g/L de glicerol bruto e 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nas figuras 11 e 12 podem ser observados os perfis de cultivo de ambas as linhagens durante 120 h.

Figura 11 - Cinética da produção de P3HB a partir de glicerol bruto pela linhagem *Pandoraea* sp. MA03. Cultivos realizados a 33,5 °C e 180 rpm, durante 120 h.



Fonte: Dados do trabalho

Figura 12 - Cinética da produção de P3HB a partir de glicerol bruto pela linhagem *Burkholderia cepacia* MA13. Cultivos realizados a 33,5 °C e 180 rpm, durante 120 h.



Fonte: Dados do trabalho

Tabela 9 - Cinética da produção de P3HB a partir de glicerol bruto pela linhagem *Pandoraea* sp. MA03. Cultivos realizados a 33,5 °C e 180 rpm, durante 120 h.

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	NH ₃ ⁺ (g/L)	MSC (g/L)	P3HB (%MSC)	P3HB (g/L)	X _R (g/L)	Y ^O _{HB/GLY} (g/g)
0	30,00	0,77	0,12	0,00	0,000	0,000	0,000
24	23,96	0,48	0,94	3,06	0,029	0,911	0,005
48	15,82	0,35	6,18	68,21	4,215	1,965	0,297
72	12,61	0,15	7,56	67,56	5,107	2,453	0,294
96	10,22	0,13	7,76	59,60	4,625	3,135	0,234
120	6,13	0,15	7,74	45,67	3,535	4,205	0,148

Fonte: Dados do trabalho

Tabela 10 - Cinética da produção de P3HB a partir de glicerol bruto pela linhagem *Burkholderia cepacia* MA13. Cultivos realizados a 33,5 °C e 180 rpm, durante 120 h.

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	NH ₃ ⁺ (g/L)	MSC (g/l)	P3HB (%MSC)	P3HB (g/l)	X _R (g/L)	Y ^O _{HB/GLY} (g/g)
0	30,00	0,77	0,14	0,00	0,000	0,000	0,000
24	19,28	0,48	1,20	22,40	0,269	0,931	0,025
48	10,72	0,23	6,72	57,31	3,852	2,868	0,200
72	9,36	0,22	7,00	64,23	4,496	2,504	0,218
96	7,90	0,21	7,82	72,84	5,696	2,124	0,258
120	5,36	0,20	8,34	67,20	5,605	2,735	0,227

Fonte: Dados do trabalho

Devido aos resultados obtidos nos planejamentos experimentais anteriores, realizados com as linhagens *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13, a partir dos quais foram observados os maiores acúmulos intracelulares de P3HB nos cultivos com menores concentrações de sulfato de amônio, objetivou-se realizar uma cinética de produção deste polímero, prolongando o tempo de cultivo até que fossem encontradas limitações nesta fonte de nitrogênio, onde fosse possível verificar a influência desta variável no perfil de acúmulo de P3HB. Os cultivos foram realizados a 33,5 °C, utilizando 30 g/L de glicerol bruto e 3 g/L de (NH₄)₂SO₄, para que fosse possível uma oferta inicial considerável de fonte de carbono e nitrogênio, além de temperatura de cultivo adequada ao metabolismo destas linhagens, no intuito de obter maiores valores de biomassa antes da fase de acúmulo. A partir dos valores apresentados nas tabelas 9 e 10, assim como os perfis de cultivo apresentados nas figuras 11 e 12, podem ser observados maiores acúmulos de polímeros quando valores abaixo de 0,30 g/L de NH₃⁺ foram alcançados, evidenciando a necessidade de limitação da fonte de nitrogênio para que o acúmulo de polímero seja mais significativo nas linhagens deste estudo.

Foram obtidos valores de acúmulo de 68,21 % por *Pandoraea* sp. MA03 e 72,84 % por *Burkholderia cepacia*. O aumento da concentração de (NH₄)₂SO₄ para 3 g/L propiciou maiores valores de biomassa, embora o aumento da concentração de glicerol bruto para 30 g/L nos meios de cultivo resultou em uma certa inibição do crescimento no início de cultivo, provocando, consecutivamente, uma extensão da fase *lag*, devido a um maior tempo de adaptação ao meio de cultivo e início da fase *log* ou exponencial após 24 h de

cultivo. Devido aos maiores valores de biomassa obtidos, na fase de acúmulo foram obtidos valores de produção de P3HB de 5,1 e 5,7 g/L para *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13, respectivamente.

4.4 Considerações finais a respeito dos planejamentos experimentais realizados com as linhagens *Pandorea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13.

Atualmente, há uma necessidade crescente no melhoramento de processos, na tentativa de minimizar custos e tempo, maximizando produção, rendimento e qualidade do produto obtido. Isto tem levado profissionais de diversas áreas do conhecimento a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento experimental (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

A otimização de experimentos tem sido conduzida essencialmente de duas maneiras, sendo uma delas a metodologia convencionalmente utilizada, onde varia-se um fator por vez, em técnicas de tentativas e erros. Outra possibilidade envolve a variação dos fatores ao mesmo tempo, analisando seus efeitos e interações a partir de análises estatísticas. Neste caso, o planejamento experimental acaba fornecendo informações mais confiáveis, minimizando o empirismo (NIKEL et al., 2005). Além disso, através da análise de superfícies de resposta, podem ser visualizadas áreas de tendência a partir da interação entre as variáveis propostas, dificilmente verificadas a partir de técnicas convencionais. Portanto, a metodologia de planejamento fatorial, torna-se uma boa alternativa para a avaliação e otimização de parâmetros fermentativos, na produção de P3HB, pelas linhagens avaliadas neste estudo.

Os programas computacionais de estatística são capazes de gerar várias classes de superfícies de resposta para experimentos fermentativos. Entre elas, o delineamento composto central é o mais popular e eficiente método, do qual se pode obter o maior número de informações por um menor número de experimentos; apresentando ainda, a flexibilidade de corridas sequenciais (MONTGOMERY, 1997). Em ambos os planejamentos realizados as linhagens *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13 apresentaram maiores valores de produção de P3HB no

experimento 14, a uma temperatura de 33,5 °C, 2 g/L de sulfato de amônio e 28,4 g/L de glicerol de biodiesel; onde foram obtidos 1,34 g/L e 3,23 g/L, respectivamente. Nota-se que os valores de produção máxima são obtidos nos níveis próximos aos pontos centrais destes planejamentos. Uma observação importante a respeito dos planejamentos realizados é sobre a variável concentração de sulfato de amônio, a qual influencia a produção de polímero de maneira diferente para as linhagens deste estudo. Nos cultivos com *Pandoraea* sp. MA03, valores de sulfato de amônio até 2 g/L parecem exercer efeito positivo sobre a produção de polímero, sendo em valores maiores observados menores produções de polímero. Por outro lado, nos ensaios com *Burkholderia cepacia* MA13, valores crescentes de concentração de sulfato de amônio, dentro dos níveis propostos para este planejamento, exercem efeito positivo sobre a produção de P3HB. Outros resultados que merecem atenção, são aqueles obtidos nos ensaios de número 11, de ambos os planejamentos, onde são avaliados cultivos com baixa concentração de sulfato de amônio (0,3 g/L), a qual pode ser considerada limitante ao crescimento. Nestes experimentos foram observados os maiores acúmulos de polímero por *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13, com valores de 58,85% e 82,70% da MSC, respectivamente. Estes dados, demonstram que um maior acúmulo celular nestas linhagens está associado à limitação de fonte de nitrogênio. Porém, em *Burkholderia cepacia* MA13, maiores valores de concentração de sulfato de amônio parecem exercer influência positiva no acúmulo de polímero.

Devido a estes resultados, decidiu-se realizar experimentos de cinética para avaliar a produção de P3HB a cada 24 h, durante 120 h de cultivo. Estes experimentos confirmaram a importância da limitação da fonte de nitrogênio para que se obtenha maiores valores de acúmulo intracelular de polímero. No planejamento experimental realizado anteriormente, provavelmente a linhagem *B. cepacia* MA13 apresentou maiores valores de biomassa e acúmulo de polímero em concentrações maiores da fonte de nitrogênio utilizada, provavelmente, por estar mais adapta às condições de cultivo e também à fonte de carbono utilizada. Dessa forma, dentro do intervalo de tempo deste planejamento (72 h) esta última linhagem pôde alcançar maiores valores de biomassa e ao mesmo tempo atingir valores limitantes de fonte de nitrogênio, os quais favoreceram o acúmulo de

polímero. Outro fator importante são os valores de NH_3^+ observados para ambas as linhagens durante a fase de acúmulo. Somente foi observado valores significativos de acúmulo de polímero em *Pandoraea* sp. MA03 quando valores de NH_3^+ próximos a 0,20 g/L foram atingidos, enquanto para *B. cepacia* MA13 valores inferiores a 0,40 g/L já foram suficientes para acúmulo de P3HB.

O P3HB, por ser um produto intracelular, tem sua produção associada à capacidade do micro-organismo em acumular este polímero, mas também depende de seu potencial de crescimento. Portanto, também devem ser alcançados bons valores de biomassa. Assim, é necessário estabelecer as melhores concentrações da fonte de nitrogênio que favoreçam a produção de biomassa e ao mesmo tempo a limitação em nutrientes necessária ao acúmulo do polímero (LEE, 1996). Pode-se sugerir a partir dos resultados obtidos a partir das linhagens deste estudo, a realização de cultivos bacterianos em duas etapas. Em uma delas, sem limitação da fonte de nitrogênio, onde poderia ser alcançado maiores valores de biomassa. E uma segunda etapa, com limitação da fonte de nitrogênio para o acúmulo de polímero intracelular.

Os valores de acúmulos da MSC celular obtidos nestes experimentos a partir das linhagens deste estudo, com 58,58% e 82,70%, estão próximos aos maiores valores obtidos na literatura, demonstrando o seu potencial para futuros estudos. Shrivastav et al. (2010) obtiveram em seus estudos duas linhagens bacterianas promissoras na produção de P3HB a partir de um subproduto de biodiesel, proveniente de óleo de mamona, o qual continha glicerol. A linhagem SM-P-3M, identificada como *Halomonas hydrothermalis*, apresentou um acúmulo de polímero de até 75% da MSC, enquanto SM-P-1S (*Bacillus sonorensis*) uma produção de 72%. Ibrahim & Steinbüchel (2010) também obtiveram um alto percentual intracelular de polímero com uma linhagem de *Zobellella denitrificans*, com um acúmulo de 80,4% da MSC, a partir de glicerol puro. Zhu et al. (2010) ao utilizar glicerol de biodiesel atingiram um acúmulo de polímero de 81,9% após 96 h, a partir de uma linhagem de *Burkholderia cepacia*. Mothes et al. (2007) também relataram um alto acúmulo de P3HB em cultivos contendo glicerol purificado, com um valor de 70% da concentração de polímero, obtidos a partir de uma linhagem de *C. necator*. Porém, ao utilizar

glicerol de biodiesel apresentaram uma queda na concentração celular de P3HB, com um valor de 48% da MSC.

Para verificar o rendimento teórico máximo a ser alcançado na produção de P3HB a partir do glicerol, deve-se levar em conta as vias metabólicas envolvidas na conversão desta fonte de carbono em polímero. A biossíntese de P3HB requer a condensação de 2 moléculas de acetil-CoA, catalisada pela enzima β -cetotiolase (PhaA), levando a formação de acetoacetil-CoA, o qual é reduzido para 3-hidroxiacetil-CoA pela acetoacetil-CoA redutase (PhaB). Este último é o precursor direto para a síntese do polímero, realizada pela PHA sintase (PhaC) (REHM, 2006). Dessa forma, a conversão de glicerol necessita fornecer duas moléculas de acetil-CoA para a formação de 3HB. A molécula de glicerol, através da ação da enzima glicerol quinase, será transformado em glicerol-3-fosfato, este por sua vez, ao sofrer a ação da glicerol-3-fosfato desidrogenase, será convertido em dihidroxiacetona fosfato. Nesta etapa da reação, uma triose fosfato isomerase transformará este último substrato em gliceraldeído-3-fosfato, um intermediário das vias glicolíticas. Nesta via, o gliceraldeído-3-fosfato renderá uma molécula de acetil-CoA (KIRK-OTHMER, 2007). Assim, são necessários 2 mols de glicerol ($M = 92 \text{ g/mol}$) para a formação de 1 mol de 3HB ($M = 86 \text{ g/mol}$), resultando em um rendimento teórico máximo de 0,47 g/g. Segundo Gomez et al. (1996), há duas diferentes maneiras de obter o rendimento da produção de P3HB por linhagens bacterianas a partir de uma determinada fonte de carbono. Uma delas é o rendimento teórico, onde assume-se que a fonte de carbono utilizada é convertida apenas em P3HB. Outra forma, é o rendimento global, o qual é mais adaptado a realidade de cultivo, pois considera que parte da fonte de carbono é utilizada para a manutenção e crescimento celular, além da produção de polímero. Dessa forma, diante de diferentes acúmulos de polímero (P3HB%) são obtidos diferentes rendimentos globais. Assim, mesmo diante de um valor de eficiência máxima de conversão da fonte de carbono em polímero, os valores de rendimento global serão menores que o rendimento teórico, pois o primeiro considera a fonte de carbono voltada a produção de biomassa residual. No planejamento realizado, a linhagem *Pandoraea* sp. MA03 alcançou um rendimento global de 0,09 g/g, com uma

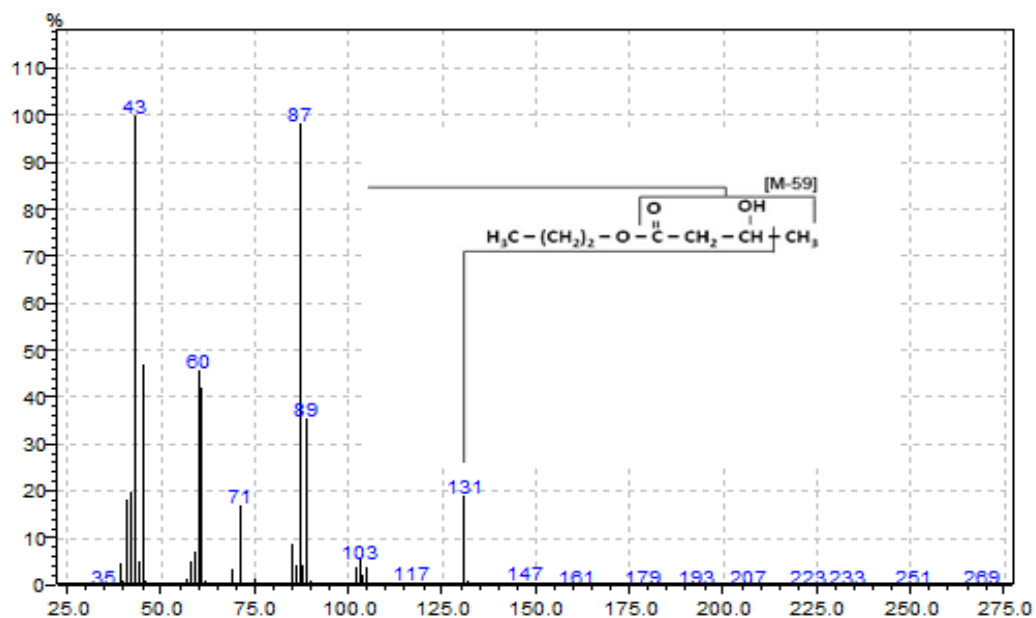
eficiência de 31,73 % de conversão de glicerol em P3HB. Já a linhagem *Burkholderia cepacia* MA13 alcançou um rendimento global de 0,17 g/g e uma eficiência de 53,38%.

4.5 Análise dos polímeros de *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13

A partir do produto da reação de propanólise das células liofilizadas de *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13 foram realizadas as análises dos propil-ésteres obtidos, através de cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa, com a finalidade de melhor auxiliar a caracterização dos polímeros obtidos por esta linhagem.

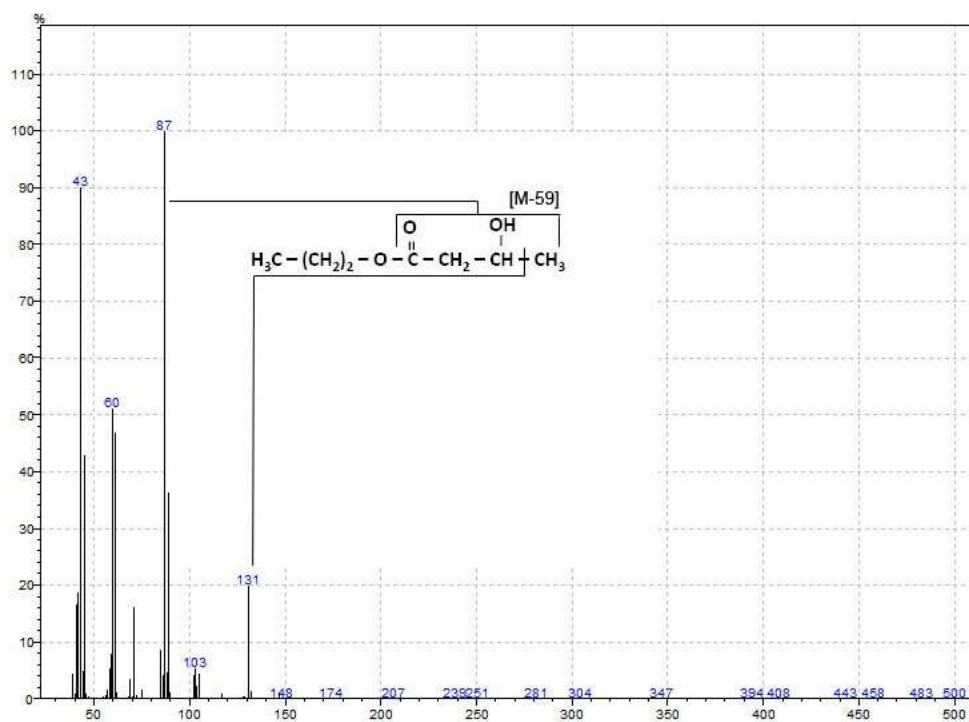
Abaixo pode ser visualizado o espectro de massa obtido para o polímero produzido pelas linhagens MA 03 e MA13 (Figuras 13 e 14). Nos espectros obtidos pode ser verificado o fragmento com m/e 131, característico de propil-ésteres de 3-hidroxicanoatos, o qual é formado pela clivagem α do grupo funcional hidroxila (LEE & CHOI, 1995; SILVA- QUEIROZ et al., 2009). Além disso, os diferentes constituintes de PHAs podem ser identificados pela análise dos fragmentos de m/e [M-59]. Na análise realizada o fragmento m/e 87 corresponde ao propil-éster de 3-hidroxibutirato.

Figura 13 - Espectro de massa de propil-ésteres de 3-hidroxialcanoatos (3-hidroxibutiril-propil-éster), relativo ao polímero obtido nos cultivos com *Pandoraea* sp. MA 03.



Fonte: Dados do trabalho

Figura 12 - Espectro de massa de propil-ésteres de 3-hidroxicanoatos (3-hidroxi-3-butiril-propil-éster), relativo ao polímero obtido nos cultivos com *Burkholderia cepacia* MA 13.



Fonte: Dados do trabalho

5. Conclusão

Em ambos os planejamentos realizados, as linhagens *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13 apresentaram maiores valores de produção de P3HB no experimento 14, a uma temperatura de 33,5 °C, 2 g/L de sulfato de amônio e 28,4 g/L de glicerol de biodiesel; onde foram obtidos 1,34 g/L e 3,23 g/L, respectivamente. O acúmulo de polímero da linhagem *Pandorea* sp. Ainda, em o acúmulo de polímero por *Pandoraea* sp. MA03 e *Burkholderia cepacia* MA13, com valores de 58,85% e 82,70% da MSC, respectivamente. Com relação ao rendimento global, a linhagem *Pandoraea* sp. MA03 alcançou um valor de 0,09 g/g, com uma eficiência de 31,73 % de conversão de glicerol em P3HB. Já a linhagem *Burkholderia cepacia* MA13 alcançou um rendimento global de 0,17 g/g e uma eficiência de 53,38%.

Os experimentos de cinética de produção de P3HB demonstraram a importância da limitação da fonte de nitrogênio, sendo observados valores significativos de acúmulo de polímero em *Pandoraea* sp. MA03 quando valores de NH_3^+ próximos a 0,20 g/L foram atingidos, enquanto para *B. cepacia* MA13 valores inferiores a 0,40 g/L já foram suficientes para acúmulo de P3HB.

REFERÊNCIAS

ABIPLAST. **Perfil 2015**. In: Estatísticas. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br>>. Acessado em 22 mar 2017.

ALDIGUIER, A.S.; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J.L.; GUILLOUET, S.E.; MOLINA-JOUVE, C. Synergistic temperatures and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess Biosystems Engineering**, New York, v. 26, p. 217-222, 2004.

ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and a industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**. v. 54, p. 450-472. 1990.

ANTONY, J.; KATE, M.; FRANGOU, A. A strategic methodology to the use of advanced statistical quality improvement techniques. **The TQM Magazine**, v. 10, p. 169-176.

ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. Bacterial poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream. **J. Pol. Environ.**, v. 12, p. 105-112, 2004.

ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. **Biomacromolecules**, Washington, v. 6, p. 2106-2112, 2005.

BARHAM, P.J. Physical properties of poly(hydroxybutyrate) and poly(hydroxybutyrate-co- hydroxyvalerate). In: Novel biodegradable microbial polymers. Dordrecht: Dawes EA, 1990. p. 81-96.

BAUER, R.; KATSIKIS, N.; VARGA, S.; HEKMAT, D. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, New York, v. 5, p. 37-43, 2005.

BORMANN, E.J.; ROTH, M. The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolyses. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v. 21, p. 1059-1063, 1999.

BRASIL, Biodiesel. In: Biocombustíveis. Disponível em <<http://www.anp.gov.br>>. Acessado em: 20 mar 2017.

BRASIL. Boletim mensal do biodiesel (Jan/2017). In: Boletins ANP. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acessado em: 22 mar 2017.

BRASIL. Boletim mensal de produção de petróleo e gás natural (Mar/2013). In: Boletins ANP. Disponível em <<http://www.anp.gov.br>>. Acessado em 23 jun. 2014

CAVALHEIRO, J.M.B.T.; ALMEIDA, M.C.M.D.; GRANDFELS, C.; FONSECA, M.M.R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 509-515, 2009.

CESAR, M. A. A.; SILVA, F. C.; SILVA C. A B. Pequenas Indústrias rurais de cana-de-açúcar: melado, rapadura e açúcar mascavo. Ed. 1. Embrapa Informação Tecnológica. 2003.

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

CHEN, G.Q. Production and Application of Microbial Polyhydroxyalkanoates. In: CHIELLINI, E.; SOLARO, R. **Biodegradable Polymers and Plastics**. London: Springer, 2003. p. 155-166. FERRES, J.D. Disponível em: <<http://www.cdes.gov.br/noticia/14129/pag-2/biodiesel-a-necessidade-de-um-novo-marco-regulatorio.html>>. Acessado em: 12/08/2010.

CHOUWDHURY, A. A. Poly- β -hydroxybuttersäure abbauende Bakterien und Exoenzyme. **Arch. Mikrobiol.** v. 47, p. 167-200. 1963.

EGGERS, J.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-Hydroxybutyrate) Degradation in *Ralstonia eutropha* H16 is mediated stereoselectively to (S)- 3 – Hydroxybutyryl Coenzyme A (CoA) via Crotonyl-CoA. **Journal of Bacteriology**, v. 195(14), p. 3213-3223. 2013.

European Biodiesel Board. In: Statistics, The EU biodiesel Industry. Disponível em: <<http://www.ebb-eu.org>>. Acessado em: 22 de mar 2017.

FRANGUI, M.; MILFORD, H. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

GAZZONI, D.L. **O biodiesel no mundo**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/colunistas/gazzoni.htm>>. Acesso em: 25 out. 2007.

GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, R.C.P.; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L.; SILVA, L.F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.45, p785-791, 1996.

GOUDA, M. K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, v.156, p. 201-207. 2001.

HANSEN, A.C.; ZHANG, Q.; LYNE, P.W.L. Ethanol-diesel fuel blends – a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 277-285, 2005.

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. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineering**, v. 42, p. 883-888, 2011.

KAMM, B.; KAMM, M. Biorefineries – multi-product processes. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, San Diego, v. 105, p. 175-204, 2007.

KABILAN, S.; AYYASAMY, M.; JAYAVEL, S.; PARAMASAMY, G. *Pseudomonas* sp. as a source of medium chain length polyhydroxyalkanoates for controlled drug delivery: perspective. **Int. J. Microbiol.** India. 2012.

KHOSRAVI-DARANI, K.; MOKHTARI, Z.; AMAI T.; TANAKA, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C₁ carbon sources. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 1407-1424, 2013.

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. Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 310-320, 2011.

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.

LEE, Y. Plastic bacteria: progress and prospecta for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends in Biotechnol.**, Amsterdam, v. 14, p. 431-438, 1996.

MADISON, LL; HUISMAN, GW. Metabolic engineering of poly(3- hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 63, p. 21-53. 1999.

MARANGONI, C. Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substrato de baixo custo e ácido propiônico. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2000.

McCOY, M. Glycerin surplus. **Chemical & Engineering News**, Washington, v. 84, p. 7, 2006.

MONTEIRO, M. R.; AMBROZIN, A. R. P.; KURI, S. E. Corrosão metálica associada ao uso de combustíveis minerais e biocombustíveis. **Quim. Nova**, v. 32, p.1910-1916, 2009.

MONTGOMERY, D.C. Diseño y análisis de experimentos. Trad. por Jaime Delgado Saldivar. México: Iberoamérica, 1991.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 4^a Ed. New York: Wiley & Sons, 1997.

NIKEL, P.I.; PETTINARI, M.J.; GALVAGNO, M.A.; MENDEZ, B.S. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* arcA mutant in fed-batch microaerobic cultures. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 77, p. 1337-1343, 2008.

OJUMU, T. V.; YU, J.; SOLOMON, B. O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **African Journal of Biotechnology**. v. 3 (1), p. 18-24. 2004.

PACHAURI, N.; HE, B. Value-added utilization of crude glycerol biodiesel production: a survey of current research activities. In: **ASABE Annual International Meeting**, Portland, 2006.

QUINTELLA, C. M., TEIXEIRA, L. S. G., KORN, M. G. A., NETO, P. R. C., TORRES, E. A., CASTRO, M. P., & JESUS, C. A. C. Cadeia do Biodiesel da Bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Quim. Nova**, 32, p.793– 808, 2009.

RAMSAY, B. A. et al. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. **Appl. Envir. Microbiol.** 56(7), p. 2093-2098, 1990.

REDDY, C.S.K.; GHAI, R.; KALIA, V.C. Polyhydroxyalkanoate: an overview. Review paper. **Elsevier**, v. 87, p. 137-146, 2003.

REE, Y.H.; KIM, G.J.; YUN, K.Y.; BAE, K.S. Accumulation of copolyesters consisting of 3- hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes* sp. SH-69 in batch culture. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v. 14, p. 27-32, 1992.

REHM, B.H.A.; STEINBÜCHEL, A. PHA synthases: the key enzymes of PHA biosynthesis. In: DOI, Y.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers-polyesters I**. Vol. 3a. Weinheim: Wiley- VCH, 2002. P. 173-215.

REHM, B.H.A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochem. J.** v. 376, p. 15- 33, 2003.

REHM, B.H.A. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. **Biotechnol. Letters**. v. 28, p. 207-213, 2006.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **J. Chromatogr.** v. 445, p. 285-289, 1988.

SANGKHARAK, K. & PRASERTSAN, P. Optimization of polyhydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. **Journal of biotechnology**, 132(3), 331–40, 2007

SERVICE, R. Cellulosic ethanol. Biofuel researchers prepare to reap a new harvest. **Science**, Washington, v. 315, p. 1488-1491, 2007.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30-39, 2009.

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyesters production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 419-427, 1998.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants – a review. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 148-175, 2007.

VALENTIN, H. E.; STEINBÜCHEL, A. Diversity of microbial polyhydroxy-alkanoic acids. **FEMS Microbiology. Letters**. v. 127, p. 219-228. 1995.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, St. Joseph, v. 22, p. 261-265, 2006.

TORRES, R. C. O.; PORTO, A. C. S.; SANT'ANNA, E.S.; FELTRIN, V. P. Produção de *Lactobacillus plantarum* em Melaço de Cana-de-açúcar. **Braz. arch. biol. technol.** vol.43. 2000.

TÜRESİN, F. et al. Biosynthesis of Polyhydroxybutyrate and its Copolymers and their use in the Controlled Drug Release. **Turkish J. of Medical Sciences**. v. 30(6), p. 535-541. 2000.

VERLINDEN, R.A.J.; HILL, D.J.; KENWARD, M.A.; WILLIAMS, C.D.; RADECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 102, p. 1437-1449, 2007.

YAMANE, T. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 41, p. 165-170, 1993.

YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 213-219, 2007.

YUSTE, A.J.; DORADO, M.P. A neural network approach to simulate biodiesel production from waste olive oil. **Energy and Fuels**, Washington, v. 20, p. 399-402, 2006.

Prof. Dr. Jonas Contiero

Dr. Fabrício Coutinho de Paula

Vítor Rodrigues Marin