

MARCELA NOGUEIRA RODRIGUES

**PRODUÇÃO DE POLI-(3-HIDROXIBUTIRATO)
[P(3HB)] A PARTIR DE MELAÇO POR
Burkholderia mimosarum MA18**

MARCELA NOGUEIRA RODRIGUES

PRODUÇÃO DE POLI-(3-HIDROXIBUTIRATO) [P(3HB)] A
PARTIR DE MELAÇO POR *Burkholderia mimosarum* MA18

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 Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2019

R696p

Rodrigues, Marcela Nogueira

Produção de poli-(3-hidroxi-butirato) [P(3HB)] a partir de melaço por
Burkholderia mimosarum MA18 / Marcela Nogueira Rodrigues. -- ,
2019

Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara,

Orientador: Jonas Contiero

Coorientador: Fabrício Coutinho de Paula

1. Biopolímeros. 2. PHAs. 3. Microbiologia industrial. 4.
Subprodutos

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Dedico este trabalho a meus ancestrais, meu pai, minha mãe e meu irmão e todos os amigos e parentes que contribuíram para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela oportunidade de estar vivendo no seio de uma família tão maravilhosa como a minha. Sou abençoada de ter seu Luiz e dona Maria como pais e de ter Pedro como meu irmão. Agradeço aos meus avós, tios, tias e primos que sempre foram exemplos para mim.

Agradeço ao professor Jonas Contiero pela oportunidade de fazer pesquisa nesta área de Microbiologia Industrial. Professor, sem a oportunidade que me proporcionou eu não teria me encontrado na biologia. Agradeço imensamente, também, aos meus companheiros de bancada de laboratório e escrita, meu co-orientador Dr. Fabrício Coutinho de Paula e Carolina. Sem a parceria e amizade de vocês eu não teria chegado tão longe. Contem sempre comigo! Aos meus colegas do LMI, o meu muito obrigada por sempre me ajudarem no dia a dia quando precisava e me ensinarem coisas novas.

Agradeço à agência FAPESP (Processo 2017/26552-0) pelo financiamento desta pesquisa.

Não posso deixar de agradecer o apoio dos amigos que cultivo desde o Ensino Fundamental: Laura, Fernanda, Letícia, Bia, Juan, João Guilherme, Bruno, Leonardo e tantos mais que passaram pela minha vida. E, mais recentemente, nesses 6 anos de graduação não posso deixar de demonstrar minha gratidão aos integrantes do “Quero Pipetar”: a Jéssica, Bea (Chuchu), Lucas, João, Yuri e aos integrantes da “Gangue do Marrocos”: Mayara, Isa, Carol, Jaque, Bea, Jéssica, Felipe, João, Raquel, Fran. Sem vocês, amigos, a complicada jornada da faculdade teria sido bem mais penosa. Esta família que criei aqui na UNESP levarei pro resto da vida! Continuemos unidos, maratonando séries, fazendo comidas e karaokês! Tenho orgulho de todos os meus amigos, de Itu e da UNESP. Vocês são pessoas sensacionais!

Obrigada à CBI 14 e agregados por tudo que me ensinaram. Obrigada à UNESP por me proporcionar uma transformação única: em 2014 entrei uma menina de 17 e saio em 2019 uma Mulher de 23 anos com muita consciência social e que está estabelecendo uma identidade pessoal e política. Todas as experiências que tive, principalmente em aulas da licenciatura com as professoras Maria Rosa, Dalva e Áurea me mostraram a importância de pensar o outro. Aqui também vai um agradecimento especial à professora Rosa Maria que me orientou no trabalho de PCC. Professora, você me proporcionou melhorar minha escrita acadêmica e aumentar minha visão para a questão ambiental no Brasil e no mundo, além de questões étnico-raciais. Agradeço também a 48ª Semana de Estudos Geográficos de 2018 que me impulsionou a assumir a minha identidade de mulher negra! Obrigada!

RESUMO

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres bacterianos, geralmente sintetizados a partir de excesso de fonte de carbono e limitação de nutrientes na forma de grânulos intracelulares para reserva de energia. Os PHAs possuem propriedades físico-químicas similares a polímeros sintéticos de origem petroquímica, além de apresentarem viabilidade ecológica devido a sua elevada biodegradabilidade. Dentre os PHAs, o poli-(3-hidroxi-butirato) [P(3HB)] é o mais amplamente estudado. As propriedades do P(3HB) são similares às do polipropileno (PP), o qual é utilizado na produção de plásticos convencionais, tornando-o um potencial substituto para alguns polímeros derivados do petróleo. Entretanto, apesar de apresentar vantagens ambientais, o custo destinado às fontes de carbono para os cultivos microbianos ainda é um dos fatores limitantes na obtenção de PHAs. Desse modo, subprodutos agroindustriais, devido ao seu baixo custo, vem se tornando uma alternativa atraente para uma produção economicamente viável desses biopolímeros. Neste trabalho, *Burkholderia mimosarum* MA18 foi avaliada quanto à produção de P(3HB) a partir de melão de cana-de-açúcar, através de diferentes parâmetros de cultivo, com o intuito de estabelecer uma linhagem adaptada à síntese de PHAs a partir de um subproduto da indústria sucroalcooleira, favorecendo um modelo de biorrefinaria voltado à produção de bioplásticos e biocombustíveis. A linhagem *B. mimosarum* MA18 alcançou valores máximos de acúmulo intracelular de P(3HB) em relação à biomassa de $63,03 \pm 6,75$ % da Massa Seca Celular e rendimento de conversão de açúcares totais provenientes de melão de cana-de-açúcar em polímero P(3HB) com valor de $Y_{P(3HB)/ATC} = 0,20 \pm 0,02$ g/g. Além disso, a linhagem exibiu melhores resultados de produção de P(3HB) quando em meios com concentrações limitantes da fonte de nitrogênio de modo a induzir o metabolismo da síntese de P(3HB), apresentando maior rendimento de polímero.

Palavras-chave: Melão. PHA. Poli-(3-hidroxi-butirato). *Burkholderia mimosarum*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1. Revisão Bibliográfica	12
1.1.1. Polihidroxialcanoatos (PHAs)	12
1.1.2. Produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV)	13
1.1.3. Histórico da produção de PHAs	15
2 OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Meios de cultivo	19
3.1.1. Caldo Lisogênico (CL)	19
3.1.2. Meio Mineral (MM)	19
3.2. Esterilização	20
3.3. Micro-organismo	20
3.4. Cultivos de micro-organismos	20
3.5. Determinação de Biomassa	21
3.6. Determinação de fonte de carbono	22
3.7. Determinação de PHAs	22
3.8. Análises estatísticas	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4.1. Etapas de otimização: Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, de fontes de nitrogênio, sais e temperaturas, por <i>Burkholderia mimosarum</i> MA18	24
4.1.1. Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, melão de cana-de-açúcar, por <i>Burkholderia mimosarum</i> MA18	24
4.1.2. Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄ , por <i>Burkholderia mimosarum</i> MA18	28
4.1.3. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de extrato de levedura, por <i>Burkholderia mimosarum</i> MA18	31
4.1.4. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de nitrato de sódio (NaNO ₃), por <i>Burkholderia mimosarum</i> MA18	35
4.1.5. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de cloreto de amônio (NH ₄ Cl) por <i>Burkholderia mimosarum</i> MA18	38

4.1.6. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações do sal sulfato de potássio (K_2SO_4), por <i>Burkholderia mimosarum</i> MA18.....	41
4.1.7. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações do sal cloreto de sódio (NaCl) por <i>Burkholderia mimosarum</i> MA18.....	44
4.1.8. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de melação de cana-de-açúcar por <i>Burkholderia mimosarum</i> MA18 em diferentes temperaturas.....	47
4.1.9. Considerações acerca dos experimentos das etapas de otimização de produção de P(3HB).....	49
4.2. Cinética de produção de P(3HB) por <i>B. mimosarum</i> MA18.....	51
4.2.1. Experimento 1: Cinética de produção a partir de melação de cana-de-açúcar e sulfato de amônio.....	51
4.2.2. Experimento 2: Cinética de produção de P(3HB) a partir de melação de cana-de-açúcar e sulfato de amônio, adicionando-se o sal sulfato de potássio.....	56
4.2.3. Considerações acerca dos experimentos de cinética de produção.....	60
4.3. Caracterização do P(3HB) de <i>Burkholderia mimosarum</i> MA18.....	61
5 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A partir da disseminação do petróleo como fonte de combustível em motores a óleo diesel para transporte na década de 1950 e com sua subsequente utilização como matéria-prima para a produção de produtos comercializáveis, tais como embalagens e utensílios das indústrias médica e alimentícia, os plásticos desenvolvidos pela indústria petroquímica tornaram-se componentes essenciais da vida contemporânea (HANSEN, ZHANG e LYNE, 2005; CHANPRATEEP, 2010). O Brasil é responsável pela produção de 6,2 milhões de toneladas de plásticos, principalmente nos setores de construção civil, alimentos, artigos de comércio em atacado e varejo e automóveis (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO, 2018). Entretanto, devido a sua reduzida biodegradabilidade, e consequente prolongada permanência no ambiente, esses materiais geram impactos ambientais e problemas de gerenciamento de resíduos sólidos em ambientes urbanos. Tem sido observados aumentos nos preços internacionais do barril de petróleo, devido à redução gradativa das reservas petrolíferas, além do impacto ambiental ocasionado pela emissão de gases do efeito estufa através da queima de combustíveis fósseis (SILVA, MACK e CONTIERO, 2009). Portanto, tornou-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias direcionadas à produção de combustíveis derivados de fontes renováveis de energia, os biocombustíveis, visando sua utilização em meios de transporte em substituição aos combustíveis derivados do petróleo (REE et al, 2011).

Atualmente, entre as tecnologias mais difundidas e comumente aplicadas na obtenção de biocombustíveis está a produção de etanol, através da fermentação de açúcares oriundos da cana-de-açúcar, milho e beterraba, também podendo ser proveniente de "commodities" agrícolas como a mandioca ou subprodutos de processos agroindustriais, como melaço de cana-de-açúcar e de beterraba, além de resíduos do processamento do milho (YAZDANI e GONZALEZ, 2007). Outra tecnologia bastante conhecida e aplicada na obtenção de biocombustível é a produção de biodiesel, obtido através da transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com álcool, para a produção de ésteres (YAZDANI e GONZALEZ, 2007; REE et al, 2011). Neste processo ocorre a geração de glicerol, o qual também pode ser utilizado para a produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) [DE PAULA, 2017(a e b)].

No Brasil, a criação do Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool), em 1975, surgiu em resposta à primeira crise do petróleo ocorrida em 1973, com o objetivo de apoiar a

indústria açucareira, devido à flutuação dos preços do açúcar no mercado internacional, bem como diminuir a dependência de importações de petróleo, uma vez que os preços de barris quadruplicaram na época (HOGARTH, 2016; KOHLHEPP, 2010). Em decorrência disso, houve a incorporação do etanol à gasolina comum como aditivo, o qual é mantido atualmente a 27% (ANP, 2018). Nos anos 1980, o país já produzia veículos com motores à combustão movidos a etanol de cana-de-açúcar. No início dos anos 2000, em um esforço conjunto entre o governo e indústrias consolidadas no setor automotivo, foi desenvolvida a tecnologia de veículos bicombustíveis, os quais representam 88,9% das vendas de automóveis (BRASIL, 2017). As inovações de usinas sucroalcooleiras e consequentes aplicações na indústria de transportes criaram a oportunidade de inserção do etanol na matriz energética do Brasil e do mundo (HOGARTH, 2016).

Em 2018, os Estados Unidos da América (EUA) e o Brasil foram responsáveis por 84% da produção mundial de biocombustíveis (RFA, 2019). Este alto índice deve-se, principalmente, à produção de bioetanol, sendo produzidos 60,56 bi L/ano nos EUA, essencialmente a partir de milho, enquanto no Brasil são obtidos 33,14 bi/L, provenientes dos cultivos de cana-de-açúcar (CONAB, 2019; EIA, 2019). O Brasil apresenta 382 unidades autorizadas de produção de bioetanol, com capacidade de produção de 9,56 bi/L de etanol anidro e 23,58 bi/L de etanol hidratado (CONAB, 2019).

Um dos principais subprodutos gerados pela indústria sucroalcooleira é o melaço. No processo de fabricação do açúcar são obtidos cerca de 60 kg de melaço por tonelada de cana moída, podendo ser obtido por concentração do caldo de cana utilizado na fermentação para produção de bioetanol (ALCARDE, 2009). O melaço é um dos subprodutos mais utilizados como matéria-prima para fermentação alcoólica e produção comercial de etanol devido à sua grande disponibilidade e baixo custo (MURUAGA et al, 2016). Assim, em um modelo ideal de biorrefinaria sucroalcooleira, para a obtenção de um processo produtivo economicamente viável, torna-se necessária a integração entre o aproveitamento da biomassa, incluindo os subprodutos obtidos a partir da cana-de-açúcar, e a produção de biocombustíveis, energia e compostos químicos de interesse econômico, possibilitando a geração de produtos de maior valor agregado de mercado, que potencialmente tornem competitivos os custos de produção de biocombustíveis (PRIELER e FISCHER, 2009; REE et al, 2011).

Tendo em vista a abundância desses recursos e a possibilidade de geração de produtos com maior valor econômico, tem-se investido na produção de biopolímeros através da

utilização de subprodutos obtidos a partir de fontes de energia renováveis. O melaço de cana-de-açúcar, além de carboidratos simples como sacarose, glicose e frutose, contém vitaminas e outros micronutrientes, sendo assim, adequado para aplicação como fonte de carbono e fatores de crescimento de células bacterianas (RAZA, 2018; KULPREECHA et al, 2009). Dessa forma, tem-se estudado o aproveitamento deste subproduto como substrato potencial para a produção de biopolímeros por meio de processos fermentativos microbianos, com destaque para a produção de PHAs (NAHEED e JAMIL, 2014).

Os PHAs são poliésteres sintetizados como reservas bacterianas de carbono e energia, apresentando as propriedades de termoplásticos ou elastômeros, insolúveis em água e não tóxicos, sendo biodegradáveis e biocompatíveis (TANIGUCHI, 2003). Assim, esses biopolímeros tornaram-se atraentes para as indústrias médica e farmacêutica na produção de cápsulas de medicamentos e drogas agrícolas; na obtenção de próteses e enxertos de tecidos humanos e na medicina veterinária; na produção de malhas e fibras para suturas em cirurgias; na terapia contra o câncer, sendo utilizados como carreadores de substâncias antitumorais; na produção de arcabouços para engenharia de tecidos; além de seu emprego na elaboração de produtos de higiene e embalagens (KILIÇAI et al., 2011; HSIEH et al., 2011, BRIGHAM, 2012). Dentre os PHAs, o poli(-3-hidroxi-butarato) [P(3HB)] é o mais estudado e produzido comercialmente. O P(3HB) apresenta propriedades físico-químicas similares às do polipropileno (PP), o que o torna um potencial substituto a este polímero de origem petroquímica (BARHAM, 1990; PANDIAN et al., 2010). No entanto, os custos de produção ainda consistem o principal desafio no estabelecimento desses biopolímeros como substitutos aos plásticos convencionais derivados do petróleo (VERLINDEN et al., 2007).

Diferentes fontes de carbono provenientes da indústria sucroalcooleira vem sendo utilizadas para a produção de PHAs desde a década de 1990. No Brasil, já foi proposta a produção de PHAs integrada à produção de açúcar e etanol, porém, considerando o uso de sacarose como fonte de carbono. Em 2000, a indústria brasileira PHB Industrial S.A. começou a produzir PHB em escala piloto, sob o nome da marca Biocycle®, a qual continua em operação com produções em menor escala comercial (SILVA et al., 2014). No processo de síntese de PHAs, os gastos com a obtenção de substratos para os meios de cultivo podem chegar a 40-50% dos custos totais de produção (CAVALHEIRO et al, 2009; POSADA et al, 2011). Portanto, o uso de matérias-primas baratas e abundantes, provenientes de subprodutos agroindustriais, como o melaço de cana-de-açúcar, é interessante para que se possa obter uma produção menos dispendiosa desses poliésteres microbianos

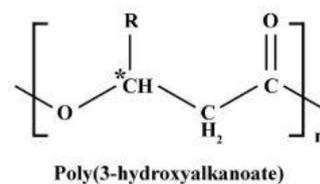
(SANTIMANO, 2009).

Diversos trabalhos tem sido reportados sobre a produção de PHAs utilizando subprodutos da indústria sucroalcooleira, com alguns envolvendo a obtenção de P(3HB) a partir de melaço de cana-de-açúcar (ALBUQUERQUE, 2010; KANJANACHUMPOL et al, 2013; NAHEED & JAMIL, 2014). Além disso, torna-se interessante a descoberta de novos micro-organismos produtores. Diversas linhagens bacterianas extensivamente estudadas tem demonstrado altos rendimentos na conversão de subprodutos industriais, como as do gênero *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp e *Cupriavidus necator* (KULPREECHA et al, 2009; RAPOSO et al, 2017; NASCIMENTO et al, 2016; VERLINDER et al, 2011). As linhagens do gênero *Burkholderia* tem demonstrado alto potencial para a conversão de fontes de carbono oriundas da cana-de-açúcar em PHAs, sendo isoladas do meio ambiente (GOMEZ et al., 1996) e geneticamente modificadas (SILVA et al., 2000), para a produção destes polímeros a partir de sacarose, xilose e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2004).

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. Polihidroxicanoatos (PHAs)

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados na forma de grânulos bacterianos intracelulares de reserva de energia a partir de excesso de fonte de carbono e limitação de nutrientes (DE PAULA, 2012). Os PHAs são polímeros constituídos de 10^3 a 10^4 monômeros, podendo ser compostos por 150 diferentes monômeros de ácidos hidroxicanoicos e/ou hidroxicenóicos formando poliésteres de cadeia alifática. A nomenclatura e o número de carbonos para os monômeros de PHA é determinado pelo grupo funcional “R” (Figura 1) (DE PAULA, 2012; TAN et al, 2014). Os PHAs podem ser produzidos por 90 gêneros de bactérias gram-negativas e gram-positivas na forma de grânulos citoplasmáticos com 0,2 – 0,5 μm de diâmetro (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUCH, 1998), podendo chegar a atingir 90% (m/m) em biomassa celular (LAYCOCK et al., 2014). As variações estruturais ocorrem de acordo com o do tipo de micro-organismo utilizado e das condições durante a fase de crescimento tais como tipo e concentração do substrato, pH, condições de fermentação e tipos de fermentação (batelada, batelada alimentada ou contínua) (KHANNA et al, 2005).



R group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C ₄	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C ₅	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C ₆	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C ₇	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C ₈	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C ₉	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C ₁₀	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C ₁₁	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C ₁₂	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C ₁₃	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C ₁₄	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C ₁₅	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C ₁₆	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

Figura 1. Estrutura geral de um polihidroxicanoato (PHA). O asterisco denota o centro quiral do polímero (TAN et al, 2014).

Esses polímeros apresentam as propriedades de termoplásticos ou elastômeros, insolúveis em água e não tóxicos, sendo biocompatíveis, ou seja, não produzindo metabólitos tóxicos durante seu processo de degradação, e apresentando um alto potencial de biodegradação (TANIGUCHI, 2003). Além disso, podem ser produzidos através de fontes renováveis. Assim sendo, esses biopolímeros tornaram-se atraentes para as indústrias médica e farmacêutica (KILIÇAI et al., 2011; HSIEH et al., 2011, BRIGHAM, 2012).

Os PHAs são classificados em três classes de acordo com o número de carbonos das cadeias laterais de seus monômeros: 1) PHAs de cadeia curta “short-chain length” (scl-PHA), os quais possuem até 5 átomos de carbonos; 2) PHAs de cadeia média “medium-chain length” (mcl-PHA), os quais apresentam de 6 a 14 carbonos; e 3) PHAs de cadeia longa “long-chain length” (lcl-PHA), os quais contém mais de 14 átomos de carbono, entretanto são menos comuns e menos estudados (KUNASUNDARI e SUDESH, 2011).

As propriedades físicas dos PHAs variam de acordo com sua estrutura e composição monomérica, podendo ser observadas as diferentes características termoplásticas, termofixas, mecânicas ou elastoméricas entre os diferentes tipos desses biopolímeros. O poli(-3-hidroxi-butirato) [P(3HB)] é o PHA mais estudado e produzido comercialmente, sendo, no entanto, mais quebradiço e cristalino se comparado a outros PHAs de cadeias médias e longas. Também são produzidos comercialmente os copolímeros P(3HB-co-3HV), o qual consiste de 3- hidroxi-butirato (3HB) e 3-hidroxi-valerato (3HV) e, ainda, PHB-HHx, formado por copoliésteres compostos por HB e 3-hidroxi-hexanoato (HHx), os quais são mais flexíveis (CHEN, 2003 *apud* DE PAULA, 2012, p.18). Tal versatilidade evidencia o potencial desses biopolímeros para substituição aos polímeros de origem fóssil (CARDOSO, 2017).

1.1.2. Produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV)

O poli-3-hidroxi-butirato P(3HB), é um polihidroxi-álcanoato de cadeia curta (scl-PHA), composto apenas por monômeros do ácido 3-hidroxi-butírico o qual apresenta no grupo radical, o grupo metil. Esse homopolímero possui características similares ao polipropileno (PP), de origem petroquímica, ambos apresentando um alto grau de cristalinidade e temperaturas de fusão similares (DE PAULA, 2012). Além disso, o P(3HB) é inerte, biodegradável, possui resistência aos raios ultravioleta (UV) e embora sua característica de

cristalização secundária o torne quebradiço (VIZCAINO-CASTON et al., 2016), suas ótimas propriedades termoplásticas o tornam industrialmente interessante.

Atualmente, há mais de 300 espécies produtoras desse biopolímero (DE PAULA, 2012), o que torna interessante saber as vias metabólicas que levam à síntese de PHAs visando um processo produtivo otimizado. As vias biossintéticas para produção de P(3HB) mais estudadas são da espécie *Cupriavidus necator*, na qual o P3HB é sintetizado a partir de acetil-CoA por uma ação de três enzimas em três etapas (Figura 2). Na primeira etapa, a primeira enzima, 3-cetotiolase, promove a condensação de dois grupos acetil-CoA, reação que é reversível, formando acetoacetil-CoA. Na segunda etapa, a segunda enzima, a acetoacetil-CoA redutase é responsável pela redução deste em (R)-3-hidroxiacetil-CoA. Por fim, a terceira enzima catalisa a reação de polimerização de (R)-3-hidroxiacetil-CoA em P(3HB) (OJUMU, 2004).

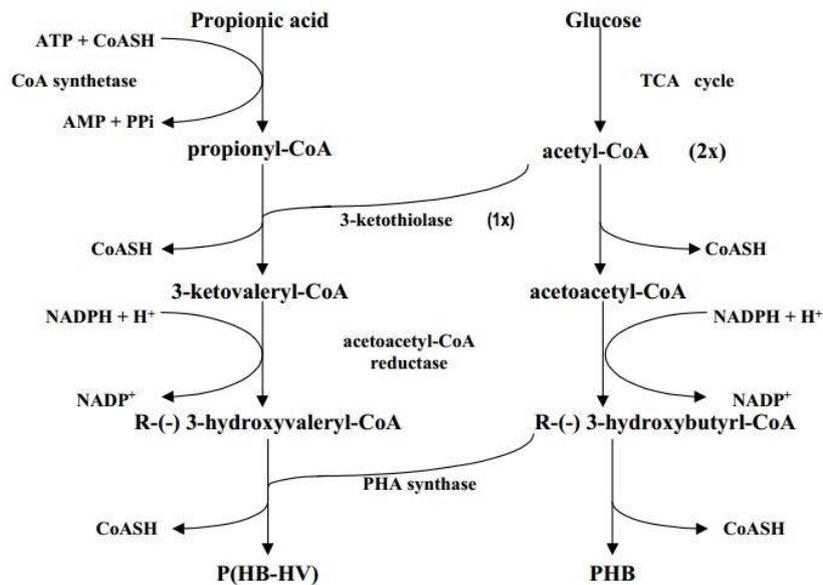


Figura 2: Rotas metabólicas de P3HB e P3HB-co-3HV em *Cupriavidus necator* (OJUMU, 2004).

É possível, ainda, obter outros PHAs de acordo com a fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Tem sido relatado que a adição de ácido propiônico ou ácido valérico em meios contendo glicose leva à produção de copolímero composto de 3-hidroxiacetilato a

(3HB) e 3-hidroxivalerato(3HV), formando P(3HB-*co*-3HV) (DE PAULA, 2012) (Figura 2). Nessa via biossintética, três enzimas são atuantes, sendo que a primeira, a 3-cetotiolase, catalisa a condensação de propionil-CoA com acetil-CoA; a segunda enzima, acetoacetil-CoA redutase promove a redução de 3-cetovaleril-CoA para (R)-3-hidroxivaleril-CoA e, finalmente, a PHA sintase atua na polimerização deste último composto a P(3HB-*co*-3HV).

1.1.3. Histórico da produção de PHAs

De acordo com a literatura, há relatos de observação, em 1888, de grânulos brilhantes em células bacterianas por Beijerinck (CARDOSO, 2017). No entanto, o primeiro polihidroxialcanoato foi determinado em 1926 por Lemoigne, que definiu as inclusões produzidas por *Bacillus megaterium* como sendo formadas pelo homopolímero ácido 3-hidroxibutírico [P(3HB)] (DE PAULA, 2012). Com maiores estudos sobre esses biopolímeros, Macre e Wilkinson (1958 *apud* DE PAULA, 2012) constataram que *B. megaterium* realizava o armazenamento do homopolímero como fonte de reserva de carbono e energia. A partir da década de 60, com a descoberta das propriedades termoplásticas do P(3HB), aumentou-se o interesse por este polímero biodegradável, levando a empresa W.R. Grace Co. a produzi-lo comercialmente. Nesta época, somente o homopolímero P(3HB) era conhecido. Entretanto, Wallen e Rohwedder (1974 *apud* CHODAK, 2008) identificaram os monômeros de 3-hidroxivalerato e 3-hidroxihexanoato em extrações feitas em clorofórmio a partir de lodo de esgoto ativado, o que incentivou pesquisadores a descobrirem novos monômeros.

Em 1976, a empresa inglesa Imperial Chemical Industries foi pioneira e começou a desenvolver pesquisas com o PHB utilizando a bactéria *Cupriavidus necator*, o que levou à produção de um copolímero, isto é, uma junção de mais de um monômero no mesmo polímero, com propriedades termoplásticas, constituído de monômeros de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxivalerato, o qual foi comercializado com o nome de Biopol® (SURIYAMONGKOL et al., 2007; CHODAK, 2008). A bactéria foi capaz de produzir 90% de copolímero em massa seca em um processo de fermentação de larga escala. A partir dos anos 2000, o foco passou a ser na engenharia metabólica visando a melhoria das condições para a produção destes biopolímeros. Em 2008, a Metabolix Inc. passou a produzir PHAs utilizando gramíneas de

modo a reaproveitar a biomassa residual para produção de energia. Esta empresa uniu-se em 2010 à empresa Daniels Midland Company, gerando a Telles Company, uma das maiores produtoras de PHAs no mundo. Outras empresas são grandes comercializadoras de polihidroxialcanoatos como a associação entre Procter & Gamble, Kaneka Corporation, Universidade de Tsingua na China e o Instituto Riken do Japão, criando a marca Nodax™, que desenvolve polímeros de PHB e PHB-HHx. No Japão, a Kaneka Corporation retomou a produção de polímeros sob a marca Kaneka PHB-HHx em 2010 e a Mitsubishi Gas Chemical efetua a produção de PHB a partir de metanol (BioGreen™) (DE PAULA, 2012; CHODAK, 2008).

No Brasil, a PHB Industrial S.A., criada em 1995, a qual é responsável pela marca “Biocycle”, produz em escala industrial o homopolímero polihidroxibutirato (PHB) bem como seu copolímero P(3HB)-co-3HV para aplicações na área de injeção, extrusão e poliuretanas (CARDOSO, 2017). Nesta empresa, o P(3HB) é produzido com sacarose como fonte de carbono utilizando a bactéria *Cupriavidus necator*. A PHB Industrial S.A. está alocada na cidade de Serrana, em uma planta piloto, no interior do Estado de São Paulo. No entanto, há ainda de ser superado o desafio da redução de preços de mercado de PHAs para serem competitivos com polímeros de origem petroquímica.

A maioria das empresas produtoras de polímeros biodegradáveis não ultrapassa a produção entre 1.000 e 20.000 ton/ano, enquanto os produtores de plásticos de origem petroquímica atingem uma média de 300.000 ton/ano apenas na produção de polietileno. Entre os produtores de PHAs, a empresa Telles destacam-se pela utilização de xaropes de açúcares do milho na obtenção de resinas de PHA, comercializada sob a marca Mirel™ e a indústria brasileira PHB Industrial S.A., ambas atingindo produções de 50.000 ton/ano (DE PAULA, 2012; BIOCYCLE, 2016).

Uma alternativa é o uso de matérias-primas baratas e abundantes, as quais vem sendo extensivamente estudadas. Estas são provenientes de subprodutos agroindustriais, como o melaço de cana-de-açúcar e de beterraba, bagaço de cana-de-açúcar, vinhaça; subprodutos industriais; gorduras e óleos vegetais ou residuais; matérias-primas lignocelulósicas; materiais agrícolas e domésticos; glicerol; metanol açúcares e águas residuais (ANJUM et al, 2016). O melaço de cana-de-açúcar da indústria da biorrefinaria açucareira tem se mostrado um substrato interessante, uma vez que apresenta alto teor de açúcar e carboidratos simples, principalmente a sacarose, além de glicose e frutose, vitaminas e outros micronutrientes

adequados para aplicação como fontes de carbono e crescimento celular bacteriano (RAZA, 2018). Desse modo, tornam-se relevantes mais estudos com esta fonte de carbono para a otimização da produção de biopolímeros.

A linhagem *B. mimosarum* MA18 foi isolada para a produção de P(3HB) a partir de glicerol de biodiesel (DE PAULA, 2012), mostrando resultados promissores, sendo também avaliado, em testes preliminares, seu potencial na síntese deste biopolímero a partir de outros subprodutos, entre eles, sendo verificada a produção de P(3HB) a partir de melão. Esta fonte de carbono foi diretamente convertida em biopolímero, sem qualquer pré-tratamento, como o clareamento para a diminuição do teor de impurezas, ou hidrólise ácida para conversão da sacarose em glicose e frutose, sendo estes últimos mais facilmente assimilados pela maioria dos micro-organismos produtores de PHAs (DE PAULA, 2012). Dessa forma, uma vez que experimentos de otimização não foram realizados com esta espécie bacteriana, utilizando esta fonte de carbono, este trabalho tem o objetivo de avaliar diferentes parâmetros de cultivos na busca das condições ótimas de produção de P(3HB) por *B. mimosarum*, utilizando melão de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliação da produção de P(3HB) a partir de melaço de cana-de-açúcar por *Burkholderia mimosarum* MA18.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliação da produção de P(3HB) por *B. mimosarum* a partir de melaço de cana-de-açúcar, em diferentes temperaturas, concentrações de fonte de carbono, fontes de nitrogênio e sais.
- Realização de experimentos de cinética da produção de P(3HB) para os melhores parâmetros de cultivo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Meios de cultivo

Na preparação de pré-inóculos e manutenção de culturas estoque foi utilizado o meio Caldo Lisogênico (CL). Para a produção de P(3HB) foi utilizado o Meio Mineral (MM) (RAMSAY et al., 1990).

3.1.1. Caldo lisogênico (CL)

Extrato de levedura.....	5,0 g/L
Triptona.....	10,0 g/L
NaCl.....	5,0 g/L

Para obtenção de meio de cultivo sólido foi acrescentado 15-20 g/L de ágar.

3.1.2. Meio Mineral (MM)

Na ₂ HPO ₄	3,5 g/L
KH ₂ PO ₄	1,5 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2 g/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 da fonte de carbono, melão de cana-de-açúcar; diferentes concentrações das fontes de nitrogênio, (NH₄)₂SO₄, extrato de levedura, NaNO₃ e NH₄Cl; e diferentes concentrações dos sais K₂SO₄ e NaCl, a fim de se obterem as melhores condições de cultivo.

3.2. Esterilização

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

3.3. Micro-organismo

Utilizou-se a linhagem *Burkholderia mimosarum* MA18, isolada de solo de Mata Atlântica (DE PAULA, 2012). Preservou-se a linhagem bacteriana 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).

3.4. Cultivos de micro-organismos

Os cultivos bacterianos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de MM, para avaliar a produção de P(3HB) a partir de melaço de cana-de-açúcar em diferentes parâmetros de cultivo. O melaço de cana-de-açúcar foi obtido junto à Usina São Domingos S.A. (Catanduva-SP). A linhagem *B. mimosarum* MA18 foi estriada a partir de cultura estoque, em meio CL sólido, durante 48 h a 34 °C. Colônias isoladas foram transferidas para 50 mL de CL, sendo incubado em shaker durante 24 h, a 34 °C e 150 rpm. Padronizando-se o inóculo, um volume de 5 mL deste cultivo foi transferido para inocular 50 mL de Meio Mineral. Em um primeiro momento, nas etapas de otimização da produção de P(3HB), analisou-se a produção de polímero em diferentes concentrações de fonte de carbono (10, 20, 30, 40 e 50 g/L); diferentes concentrações de fontes de nitrogênio (NH₄)₂SO₄, extrato de levedura, NaNO₃ e NH₄Cl (1, 2 e 3 g/L); diferentes concentrações de sais, K₂SO₄ e NaCl (5, 10, 15, 20 e 25 g/L) e diferentes temperaturas (27, 30, 34, 37 e 40 °C). Todos os experimentos foram realizados em replicatas em frascos agitados com meio de cultivo a pH 7,0. Os experimentos visando avaliar a produção de P(3HB) com diferentes concentrações da fonte de carbono, o melaço de cana-de-açúcar, foram realizados em Meio Mineral contendo 2g/L de (NH₄)₂SO₄, a 34 °C e 150 rpm. Os experimentos com diferentes concentrações dos sais, K₂SO₄ e NaCl foram realizados em Meio Mineral contendo 20 g/L de melaço, 2g/L de (NH₄)₂SO₄, a 34 °C e 150 rpm. Os experimentos com variação de concentrações das fontes de nitrogênio (NH₄)₂SO₄, extrato de levedura, NaNO₃ e NH₄Cl foram realizados contendo 20 g/L

de melaço, a 34 °C e 150 rpm. Finalmente, os experimentos visando avaliar a produção de P(3HB) sob diferentes temperaturas foram realizados contendo 20 g/L de melaço e 2g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 150 rpm. As amostras dos cultivos foram processadas após 72 h para análise de Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de polímero em valores de P(3HB) (g/L) e valores de polímero expressos em porcentagem de biomassa [P(3HB)%]. Além disso, foi analisado o consumo de açúcares totais (g/L) provenientes da fonte de carbono.

Em um segundo momento, foram realizados dois experimentos de cinética de produção de P(3HB) a partir de melaço de cana-de-açúcar utilizando-se a linhagem *B. mimosarum* MA18 com os melhores parâmetros analisados na etapa anterior. Para ambos os experimentos mantiveram-se os procedimentos de preparação de 5 mL de inóculo a serem adicionados a 50 mL Meio Mineral em Erlenmeyers de 250 mL descritos neste item (3.4). No primeiro experimento foi avaliada a cinética de produção de P(3HB) utilizando-se 20 g/L de melaço e 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 50 mL de Meio Mineral, a 34 °C e 150 rpm, durante 144h. No segundo experimento, a cinética de produção do biopolímero foi analisada a partir de 20 g/L de melaço como fonte de carbono, 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio e 10 g/L de K_2SO_4 como sal, a 34 °C e 150 rpm, durante 144h. Ambos os cultivos foram realizados em replicatas, a pH 7,0, sendo retiradas amostras de 40 mL nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h para centrifugação e posterior análise de MSC e biomassa residual (X_R), além de consumo de açúcares totais provenientes do melaço de cana-de-açúcar e produção de P(3HB) em cada cultivo.

3.5.Determinação de Biomassa

A determinação da concentração de biomassa foi realizada por gravimetria, através de pesagem da massa seca celular obtida (MSC). Os precipitados (“pellets”) obtidos de amostras centrifugadas foram submetidos à pesagem após processo de liofilização. A biomassa residual (X_R) (g/L) foi obtida através da diferença entre os valores de MSC (g/L) e produção de polímero P(3HB) (g/L) obtidos nos cultivos realizados.

3.6. Determinação de fonte de carbono

A fonte de carbono foi determinada pelas concentrações de açúcares totais que possui, as quais foram obtidas através da soma das concentrações de sacarose, glicose e frutose, os principais açúcares que compõe o melaço de cana-de-açúcar. Embora a sacarose seja o principal açúcar presente nesta fonte de carbono, glicose e frutose também foram considerados entre os açúcares totais, uma vez que estão presentes em menores frações neste insumo. Além disso, há a possibilidade de glicose e frutose serem produtos da hidrólise microbiana durante os cultivos, através da ação de invertases sobre a sacarose, sendo assimilados como produtos desta reação. As determinações de glicose, frutose e sacarose foram realizadas a partir de cromatografia líquida de alta eficiência, em inglês, “High Performance Liquid Chromatography” (HPLC), utilizando-se o cromatógrafo Prominence UFLC (Shimadzu®, Japão), acoplado aos detectores ultravioleta (SPD- 20A UV/Vis®) e índice de refração (RID-10A®), equipado com a coluna Rezex RCM – Monossacarídeo Ca²⁺ (8%) (300 x 7,8 mm) (Phenomenex®, EUA). As condições de análise foram: volume de injeção: 20µL; temperatura da coluna (forno): 65°C; e eluente: água ultrapura a uma vazão de 0,6 mL/min. Para cada experimento foi analisado o índice de refração. Para cada experimento, o Consumo de Açúcares Totais (g/L) foi calculado pela diferença entre a quantidade inicial de açúcares totais e a quantidade final desses açúcares após o final dos cultivos.

3.7. Determinação de PHAs

A quantificação e composição do polímero P(3HB) foi determinada, a partir de cromatografia gasosa de metil-ésteres (BRANDL et al., 1988; TIMM & STEINBÜCHEL, 1992; HUIJBERTS et al., 1994). Entre 5 - 10 mg de células liofilizadas foram submetidas à reação de metanólise em tubos Pyrex® com sistema de vedação de Teflon® (Pyrex, EUA), através da adição de 2 mL clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado com H₂SO₄ 15% (85:15 v/v). A reação foi conduzida a 85 °C durante 4 h. Após a reação de metanólise, os tubos foram resfriados a 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. 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[®], Japão), 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 o seguinte programa de temperaturas do forno: 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 P(3HB-co-3HV) (Sigma-Aldrich[®]) para a geração de curvas de calibração. Além disso, foi calculado o rendimento, $Y_{P(3HB)/ATC}$ (g/g), de cada experimento, a fim de se verificar a conversão de substrato consumido (açúcares totais provenientes do melaço) em produto [P(3HB)], através da razão entre a quantidade de P(3HB) (g/L) produzido e a quantidade de açúcares totais consumidos (ATC) (g/L) em cada experimento.

3.8. Análises Estatísticas

Foram calculados as médias e desvios padrão dos resultados obtidos. Os valores obtidos de P(3HB) (g/L) e rendimento de produção $Y_{P(3HB)/ATC}$ (g/g) tanto dos experimentos de otimização de produção como dos de cinética de produção foram analisados estatisticamente por meio de Análise de Variância (ANOVA) de fator único a fim de identificar a significância estatística de cada parâmetro estudado. Foi admitido o nível de significância (α) igual a 5 % ou 0,05. Para a análise dos dados dos cultivos foram formuladas duas hipóteses. A Hipótese de nulidade (H_0) admite que os dados não apresentam diferença significativa entre si, de acordo com o parâmetro analisado e, portanto, há, estatisticamente, uma igualdade entre os dados. Esta hipótese é válida se valor de $p \geq \alpha$, isto é, se $p \geq 0,05$. A Hipótese Alternativa (H_1) admite que há pelo menos uma diferença significativa entre o grupos de dados de acordo com o parâmetro analisado. Esta hipótese é válida se valor de $p < \alpha$, isto é, se $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Etapas de otimização: Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, de fontes de nitrogênio, sais e temperaturas, por *Burkholderia mimosarum* MA18

4.1.1. Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de fonte de carbono, melão de cana-de-açúcar, por *Burkholderia mimosarum* MA18

Os experimentos foram conduzidos utilizando melão de cana-de-açúcar, proveniente da Usina São Domingos S.A. (Catanduva-SP), como fonte de carbono nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 g/L, a 34 °C e 150 rpm, durante 72 h. Os meios de cultivo seguiram as especificações do item 3.4. deste trabalho, contendo, ainda, 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio. Os resultados obtidos a partir dos experimentos podem ser observados na Tabela 1. O cultivo conduzido na concentração de 30 g/L de melão apresentou maior produção de P(3HB) (g/L), sendo obtidos $2,00 \pm 0,12$ g/L de P(3HB). No entanto, observou-se um maior consumo de açúcares nessa concentração, obtendo-se rendimento de $0,10 \pm 0,00$ (g/g). Os maiores valores de acúmulo intracelular de polímero em porcentagem de biomassa de $36,91 \pm 8,55$ % e melhor rendimento de produto em relação ao substrato $Y_{\text{P(3HB)}/\text{ATC}} = 0,15 \pm 0,05$ (g/g), foram obtidos na concentração de 10 g/L de melão.

Nos cultivos realizados utilizando a variação de concentração de fonte de carbono pode ser observado o aumento da biomassa de *B. mimosarum* MA18 com valores de MSC que variam de $3,09 \pm 0,23$ g/L em 10 g/L de melão a $6,48 \pm 0,11$ g/L em 50 g/L de melão, à medida que a disponibilidade de fonte de carbono aumenta. Entretanto, o consumo dos açúcares totais presentes na fonte de carbono parece ser direcionado ao crescimento da linhagem (X_R) em concentrações de melão acima de 30 g/L em detrimento do acúmulo de polímero (Figuras 1, 2, 3 e 4).

De acordo com a Análise de Variância (ANOVA), o modo como os valores de produção de P(3HB) se comportam de acordo com cada concentração de fonte de carbono pode ser demonstrado. Na tabela 2 pode ser verificado que os valores de produção de polímero diferiram significativamente entre si, de acordo com a concentração de fonte de carbono utilizada em cada cultivo, sendo obtidos resultados de p-valor $> 0,05$. No entanto,

não houve diferença significativa entre os valores obtidos de rendimento de produção ($p>0,05$) (Tabela 3).

Tabela 1 - Produção de P(3HB) a partir de melão de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes concentrações de melão de cana-de-açúcar (10, 20, 30, 40 e 50 g/L), contendo 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h.

Melão (g/L)	Açúcares Totais (g/L)	Açúcares Totais Residuais (g/L)	MSC (g/L)	P(3HB) %	P(3HB) (g/L)	X _R (g/L)	Y _{P(3HB)/ATC} (g/g)
10,00	7,45±0,00	0,00±0,00	3,09±0,23	36,91±8,55	1,15±0,35	1,94±0,12	0,15±0,05
20,00	14,90±0,00	0,00±0,00	4,94±0,19	32,08±0,19	1,58±0,05	3,35±0,14	0,11±0,00
30,00	22,35±0,00	1,87±0,29	6,01±0,23	33,23±0,75	2,00±0,12	4,01±0,11	0,10±0,00
40,00	29,80±0,00	5,64±1,02	6,25±0,00	29,77±1,92	1,86±0,12	4,39±0,12	0,08±0,00
50,00	37,25±0,00	10,36±3,79	6,48±0,11	28,93±0,70	1,87±0,01	4,60±0,12	0,07±0,01

Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de P(3HB) (g/L) a partir de melão de cana-de-açúcar em diferentes concentrações dessa fonte de carbono por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	0,922813	4	0,230703	7,504989	5,192167	0,024209
Resíduos	0,153700	5	0,030739			
Total	1,076513	9				

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento de produção (g/g) de P(3HB) a partir de melão de cana-de-açúcar em diferentes concentrações dessa fonte de carbono por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	0,008787	4	0,002196	4,700489	5,192167	0,060166
Resíduos	0,002336	5	0,000467			
Total	0,011123	9				

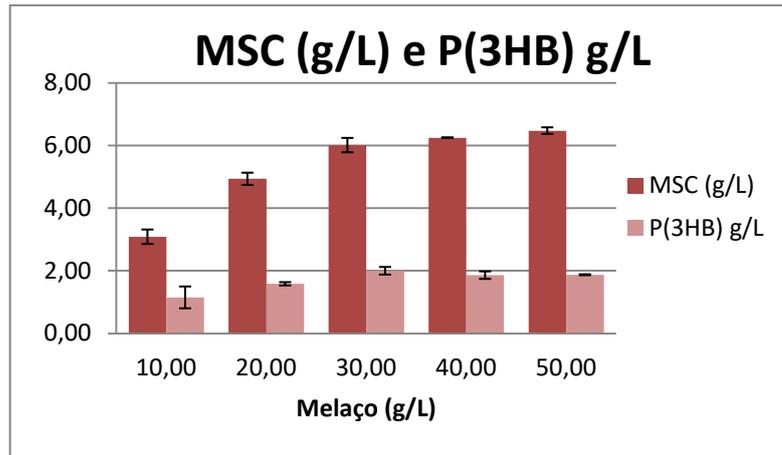


Figura 1 - Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de melaço de cana-de-açúcar (10, 20, 30, 40 e 50 g/L) em Meio Mineral, contendo 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h de cultivo.

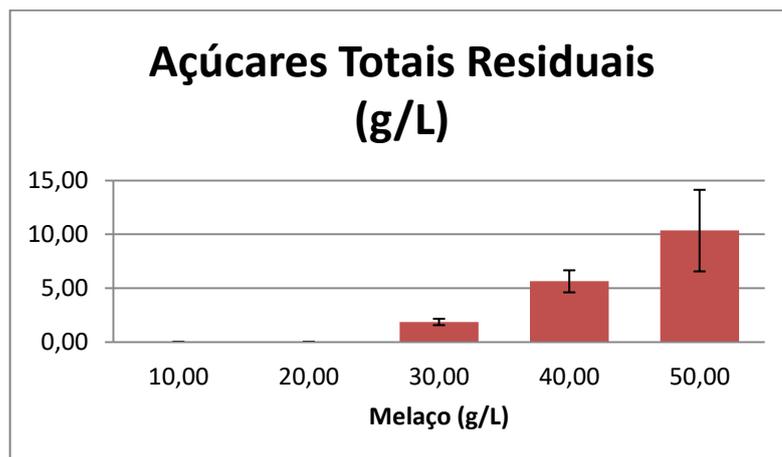


Figura 2 - Açúcares Totais Residuais (ATR) (g/L,) provenientes de melaço de cana-de-açúcar, os quais incluem glicose, frutose e sacarose. Cultivos realizados em diferentes concentrações de melaço de (10, 20, 30, 40 e 50 g/L) em Meio Mineral, contendo 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

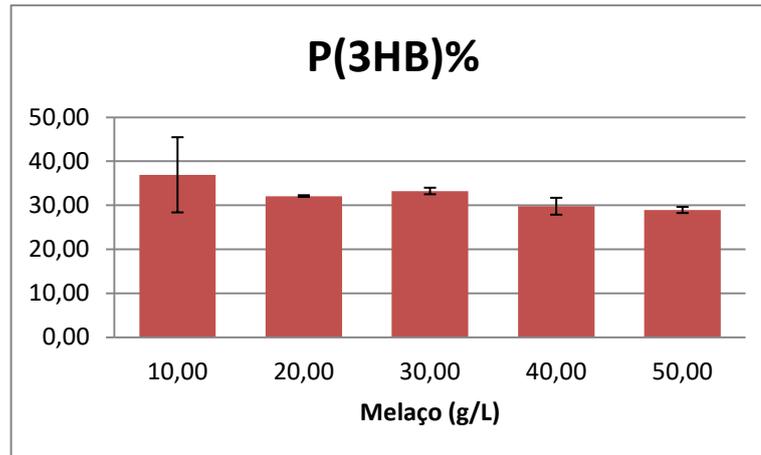


Figura 3 - Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [P(3HB)%] a partir de melaço de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes concentrações de melaço de cana-de-açúcar (10, 20, 30, 40 e 50 g/L), contendo 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h de cultivo.

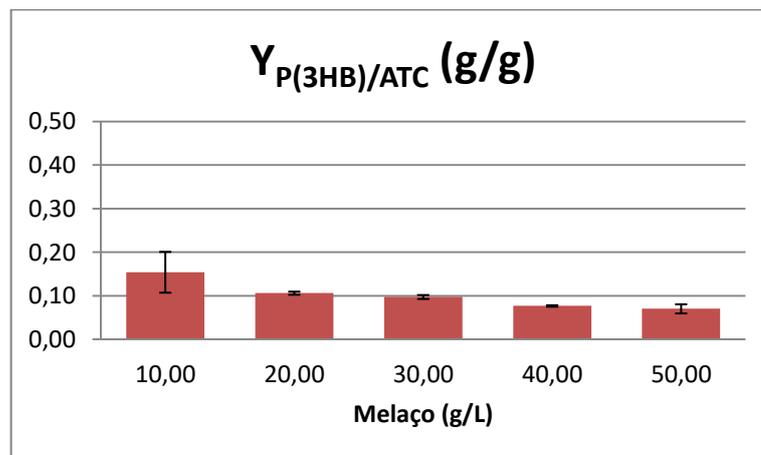


Figura 4 – Rendimento de produção de P(3HB) em razão dos açúcares totais consumidos (ATC), $Y_{\text{P(3HB)/ATC}}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de melaço de (10, 20, 30, 40 e 50 g/L) em Meio Mineral, contendo 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

4.1.2. Avaliação da produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, por *Burkholderia mimosarum* MA18

Os cultivos de *B. mimosarum* MA18 em meio mineral com diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1, 2, 3 g/L), a 34 °C e 150 rpm, foram realizados para a análise da influência desta fonte de nitrogênio na produção do polímero. Nestes experimentos foram adicionados 20 g/L de melão de cana-de-açúcar, como fonte de carbono, nas condições descritas no item 3.4. deste trabalho. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4. Todos os cultivos deste parâmetro apresentaram resultados satisfatórios quanto à quantidade de MSC e o consumo de açúcares provenientes do melão, sendo apresentados valores com pouca variação (Figuras 5 e 6).

O melhor resultado de acúmulo intracelular de polímero é observado no cultivo com concentração de 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, apresentando o valor de $34,20 \pm 0,91$ % da MSC. Tal resultado possivelmente está relacionado a uma maior limitação da fonte de nitrogênio, necessária a várias linhagens bacterianas produtoras de PHAs. Portanto, enquanto algumas espécies bacterianas apresentam produção associada ao crescimento, *B. mimosarum* MA18 parece necessitar de concentrações limitantes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Neste cultivo nota-se um menor crescimento celular (X_R). A partir da concentração de 2 g/L nota-se uma diminuição em valores de acúmulo de polímero e um aumento dos valores de biomassa residual (X_R), levando a um direcionamento de uma maior quantidade da fonte de carbono para o crescimento celular.

A partir do cálculo das ANOVAs é possível verificar que estatisticamente há igualdade entre os valores de produção de P(3HB) e rendimento de produção nos cultivos realizados, estando expostos valores de $p > 0,05$ (Tabelas 5 e 6). Isso pode ser observado nas análises dos cultivos de 1 e 2 g/L de sulfato de amônio. O cultivo com concentração de 2 g/L de sulfato de amônio, o qual possui o maior valor de produção de polímero em g/L, apresenta $1,58 \pm 0,05$ g/L de P(3HB). Isso permite com que ambos os cultivos com 1 e 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentem o mesmo valor de rendimento produto/substrato de produção de polímero, sendo este de $0,11 \pm 0,00$ g/g (Figuras 7 e 8).

Tabela 4 - Produção de P(3HB) a partir de melão de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1, 2, 3 g/L), contendo 20 g/L de melão de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Açúcares Totais (g/L)	Açúcares Totais Residuais (g/L)	MSC (g/L)	P(3HB) %	P(3HB) (g/L)	X_R (g/L)	$Y_{\text{P(3HB)/ATC}}$ (g/g)
1,00	14,9±0,00	0,35±0,07	4,58±0,14	34,20±0,91	1,56±0,01	3,01±0,13	0,11±0,00
2,00	14,9±0,00	0,00±0,00	4,94±0,19	32,08±0,19	1,58±0,05	3,35±0,14	0,11±0,00
3,00	14,9±0,00	0,11±0,15	5,10±0,07	25,75±3,10	1,31±0,18	3,79±0,11	0,09±0,01

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de P(3HB) (g/L) a partir de melão de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de sulfato de amônio por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F_c	p-valor
Regressão	0,090186	2	0,230703	3,997019	9,552094	0,142543
Resíduos	0,033845	3	0,030739			
Total	0,124032	5				

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento de produção (g/g) de P(3HB) a partir de melão de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de sulfato de amônio por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F_c	p-valor
Regressão	0,000437	2	0,002196	4,920107	9,552094	0,112933
Resíduos	0,000133	3	0,000467			
Total	0,000571	5				

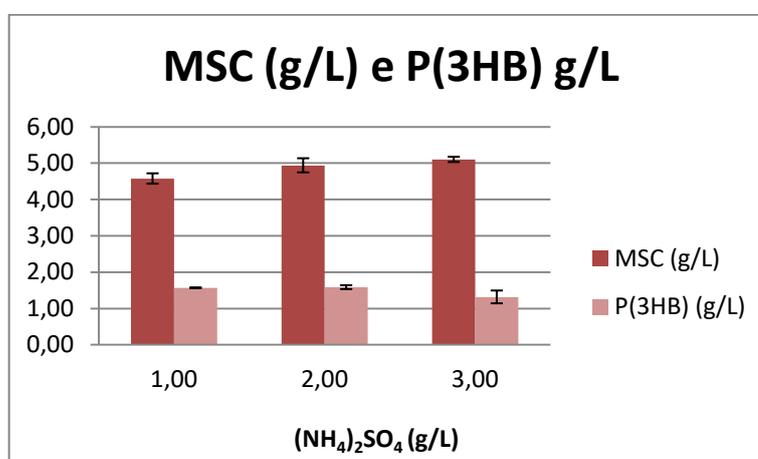


Figura 5 - Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melão de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h de cultivo.

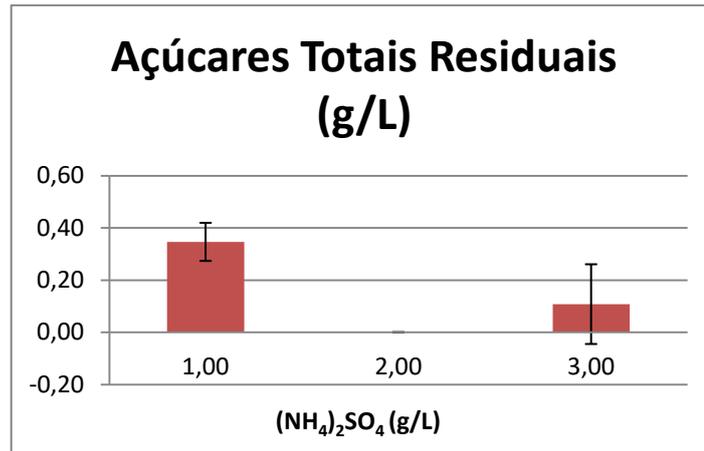


Figura 6 - Açúcares Totais Residuais (ATR) (g/L,) provenientes de melaço de cana-de-açúcar, os quais incluem glicose, frutose e sacarose. Cultivos realizados em diferentes concentrações de (NH₄)₂SO₄ (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

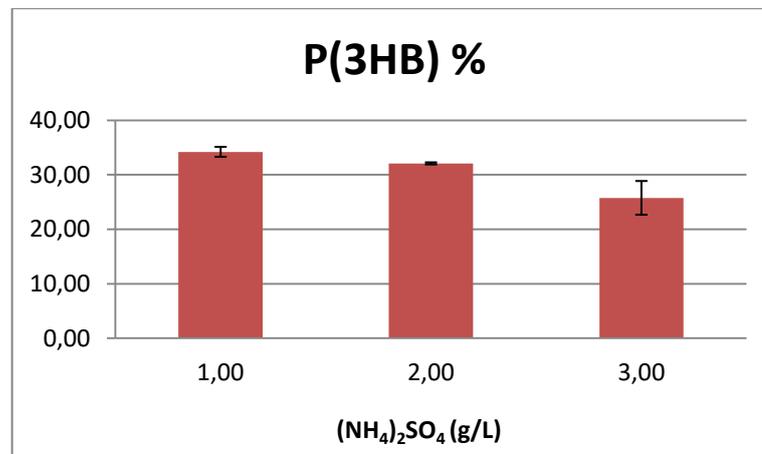


Figura 7 - Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [P(3HB)%] a partir de melaço de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes concentrações de (NH₄)₂SO₄ (1, 2, 3 g/L), contendo 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h de cultivo.

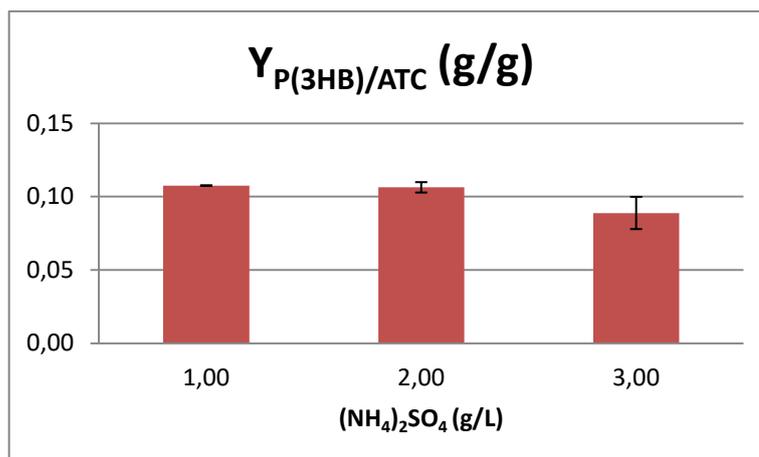


Figura 8 - Rendimento de produção de P(3HB) em razão dos açúcares totais consumidos (ATC), $Y_{P(3HB)/ATC}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de $(NH_4)_2SO_4$ (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melão de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

4.1.3. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de extrato de levedura, por *Burkholderia mimosarum* MA18

A avaliação do extrato de levedura como fonte de nitrogênio para *B. mimosarum* MA18 nas concentrações de 1, 2 e 3 g/L ocorreu de acordo com as especificações do item 3.4. deste estudo, em cultivos contendo 20 g/L de melão de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm. A Tabela 7 expõe os resultados obtidos durante os experimentos.

A MSC e o consumo de açúcares totais do melão aumentam à medida em que há aumento das concentrações de extrato de levedura nos experimentos (Figuras 9 e 10). A maior disponibilidade de fonte de carbono leva a um maior acúmulo intracelular de P(3HB) e maior produção de P(3HB), atingindo-se os valores de $32,44 \pm 0,00$ % da MSC e $1,31 \pm 0,00$ g/L, respectivamente, na concentração de 3 g/L de extrato de levedura. As concentrações de 2 e 3 g/L de extrato de levedura apresentam valores aproximados de rendimento dentre os cultivos realizados, obtendo-se rendimento de $0,09 \pm 0,01$ g/g (Figuras 11 e 12). Como mostrado nas tabelas 8 e 9, os resultados de produção de polímero e rendimento diferiram significativamente ($p < 0,05$) para cada concentração de extrato de levedura utilizada.

Tabela 7 - Produção de P(3HB) a partir de melaço de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes concentrações de Extrato de levedura (1, 2, 3 g/L), adicionando 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h.

Extrato de levedura (g/L)	Açúcares Totais (g/L)	Açúcares Totais Residuais (g/L)	MSC (g/L)	P(3HB) %	P(3HB) (g/L)	X _R (g/L)	Y _{P(3HB)/ATR} (g/g)
1,00	14,9±0,00	2,29±0,79	2,76±0,19	19,87±0,00	0,55±0,04	2,21±0,16	0,04±0,00
2,00	14,9±0,00	3,06±1,81	3,61±0,19	27,71±0,17	1,00±0,06	2,61±0,13	0,09±0,01
3,00	14,9±0,00	0,70±0,99	4,05±0,00	32,44±0,00	1,31±0,00	2,74±0,00	0,09±0,01

Tabela 8 - Análise de Variância (ANOVA) para a produção de P(3HB) (g/L) a partir de melaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de extrato de levedura por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	0,591355	2	0,295677	174,06685	9,552094	0,0007897
Resíduos	0,005096	3	0,001699			
Total	0,596451	5				

Tabela 9 - Análise de Variância (ANOVA) para o rendimento de produção (g/g) de P(3HB) a partir de melaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de extrato de levedura por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	0,002811	2	0,00140567	40,230204	9,552094	0,006814
Resíduos	0,000105	3	3,49407E05			
Total	0,002916	5				

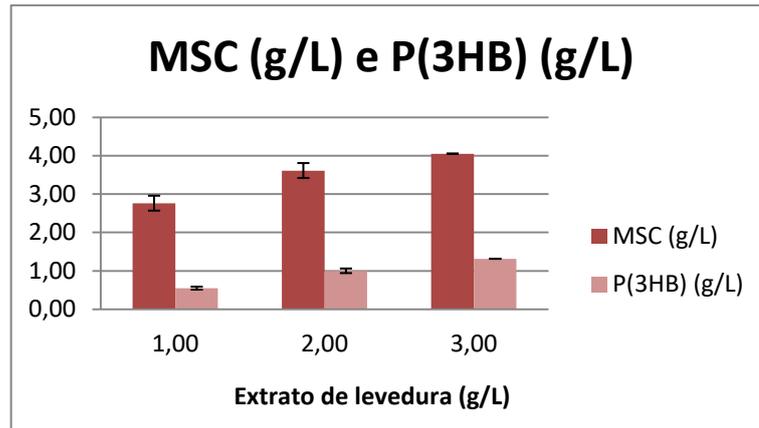


Figura 9 - Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P3HB (g/L) em diferentes concentrações de Extrato de levedura (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, adicionando 20 g/L de melão de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h de cultivo.

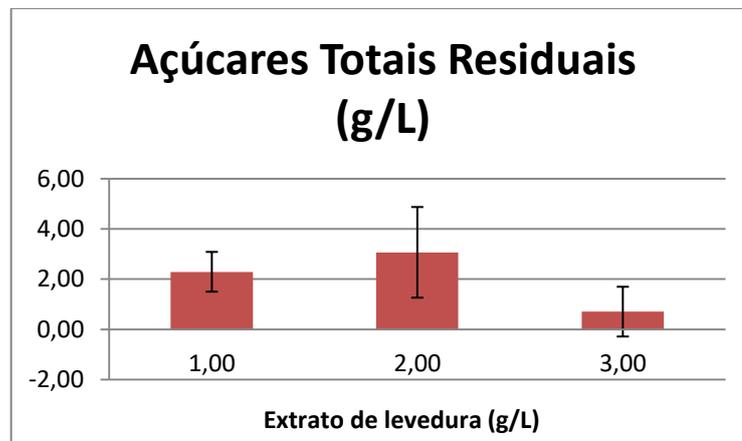


Figura 10 - Açúcares Totais Residuais (ATR) (g/L,) provenientes de melão de cana-de-açúcar , os quais incluem glicose, frutose e sacarose. Cultivos realizados em diferentes concentrações de Extrato de levedura (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, adicionando 20 g/L de melão de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

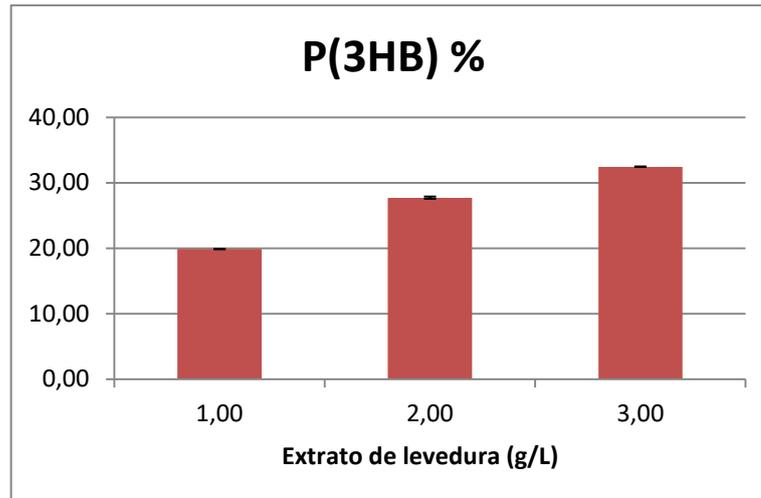


Figura 11 - Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [P(3HB)%] a partir de melaço de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes concentrações de Extrato de levedura (1, 2, 3 g/L), adicionando 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h de cultivo.

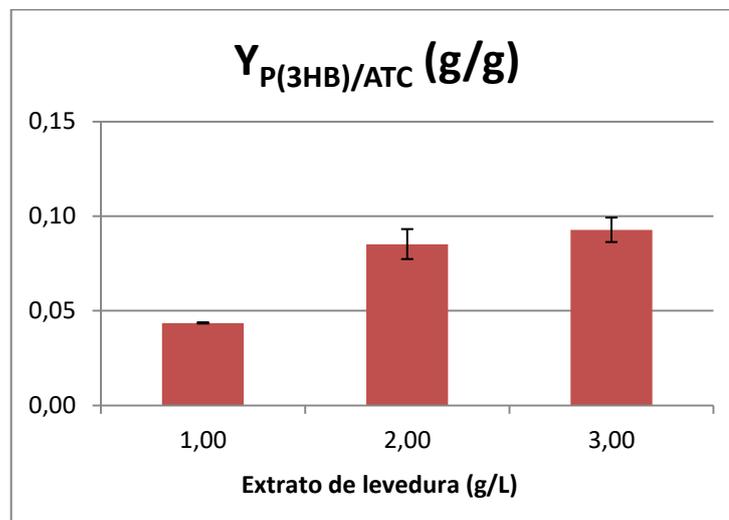


Figura 12 - Rendimento de produção de P(3HB) em razão dos açúcares totais consumidos (ATC), $Y_{P(3HB)/ATC}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de Extrato de levedura (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, adicionando 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h.

4.1.4. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de nitrato de sódio (NaNO_3), por *Burkholderia mimosarum* MA18

A avaliação de nitrato de sódio nas concentrações de 1, 2 e 3 g/L como fonte de nitrogênio para a linhagem *B. mimosarum* MA18 ocorreu em meios de cultivo contendo 20 g/L de meloço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, segundo as especificações do item 3.4. deste estudo. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos durante os experimentos. Nota-se que os valores de MSC destes cultivos estão entre os mais baixos dentre os diferentes parâmetros testados nesse estudo, sendo o maior valor de MSC o de $3,33 \pm 0,07$ g/L na concentração de 2 g/L de NaNO_3 . Todavia, menores concentrações de nitrato de sódio aliadas ao alto consumo de açúcares totais provenientes do meloço levaram a um maior acúmulo de polímero e crescimento celular, com valores aproximados de produção e rendimento nas concentrações de 1 e 2 g/L de NaNO_3 . O melhor acúmulo de P(3HB) é de $30,78 \pm 2,71$ % de MSC e o melhor rendimento é de $0,07 \pm 0,01$ g/g, ambos provenientes de cultivos com a menor concentração do parâmetro, isto é, 1 g/L de NaNO_3 (Figuras 13, 14, 15 e 16). Estatisticamente, por meio de ANOVA, demonstrou-se que os resultados de produção de polímero e rendimento não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$) (Tabelas 11 e 12).

Tabela 10 - Produção de P(3HB) a partir de meloço de cana-de-açúcar em Meio Mineral contendo diferentes concentrações de NaNO_3 (1, 2, 3 g/L), adicionando 20 g/L de meloço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h.

NaNO_3 (g/L)	Açúcares Totais (g/L)	Açúcares Totais Residuais (g/L)	MSC (g/L)	P(3HB) %	P(3HB) (g/L)	X_R (g/L)	$Y_{P(3HB)/ATC}$ (g/g)
1,00	$14,9 \pm 0,00$	$1,41 \pm 0,54$	$2,96 \pm 0,05$	$30,78 \pm 2,71$	$0,91 \pm 0,10$	$2,05 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,01$
2,00	$14,9 \pm 0,00$	$0,23 \pm 0,33$	$3,33 \pm 0,07$	$27,44 \pm 5,56$	$0,91 \pm 0,20$	$2,41 \pm 0,13$	$0,06 \pm 0,02$
3,00	$14,9 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$2,68 \pm 0,04$	$16,43 \pm 2,05$	$0,44 \pm 0,05$	$2,24 \pm 0,08$	$0,03 \pm 0,00$

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de P(3HB) (g/L) a partir de meloço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de nitrato de sódio por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F_c	p-valor
Regressão	0,299934	2	0,149967	8,407249	9,552094	0,058912
Resíduos	0,053513	3	0,017838			
Total	0,353448	5				

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento de produção (g/g) de P(3HB) a partir de melaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de nitrato de sódio por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	0,001727	2	0,000863	7,535646	9,552094	0,067639
Resíduos	0,000344	3	0,000115			
Total	0,002070	5				

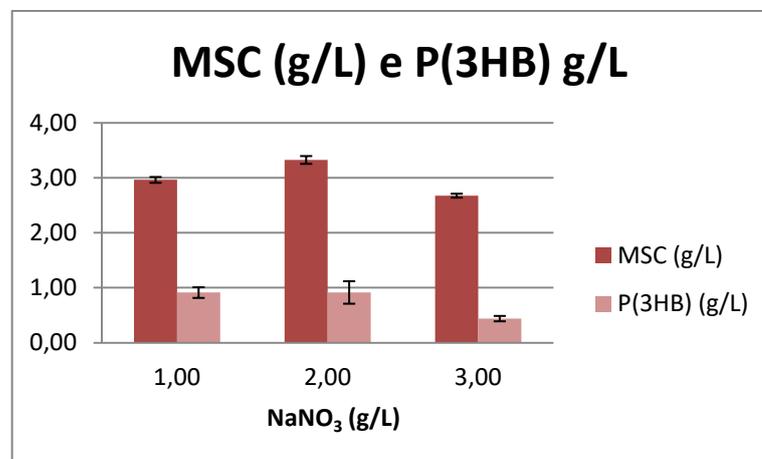


Figura 13 - Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações NaNO₃ (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h de cultivo.

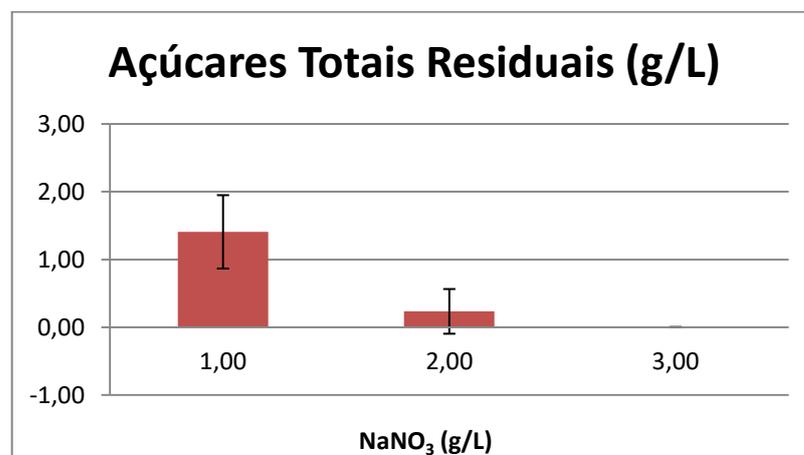


Figura 14 - Açúcares Totais Residuais (ATR) (g/L) provenientes de melaço de cana-de-açúcar, os quais incluem glicose, frutose e sacarose. Cultivos em diferentes concentrações de NaNO₃ (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

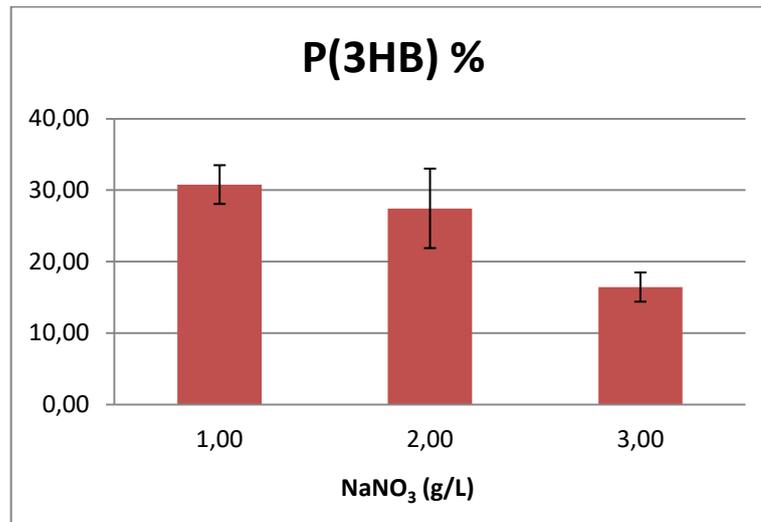


Figura 15 - Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [P(3HB)%] a partir de melaço de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes concentrações de NaNO₃ (1, 2, 3 g/L), 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h de cultivo.

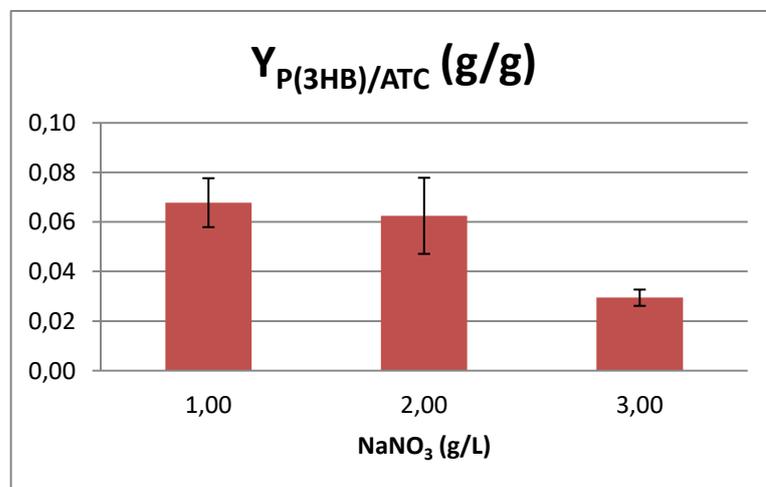


Figura 16 - Rendimento de produção de P(3HB) em razão dos açúcares totais consumidos (ATC), $Y_{P(3HB)/ATR}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de NaNO₃ (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h.

4.1.5. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações de cloreto de amônio (NH₄Cl) por *Burkholderia mimosarum* MA18

Os experimentos de cultivo de *B. mimosarum* MA18 com diferentes concentrações de cloreto de amônio (1, 2 e 3 g/L) foram conduzidos como descrito no item 3.4. desse trabalho, adicionando 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm. Os resultados podem ser observados na Tabela 13. O cultivo com concentração de 2 g/L de NH₄Cl apresenta maior Massa Seca Celular com 4,95±0,07 g/L. São observados, ainda, consumos iguais dos açúcares totais. Porém, a média de acúmulo intracelular de polímero é pouco afetada pelas diferentes concentrações da fonte de nitrogênio avaliada. Pela análise estatística dos resultados de produção de P(3HB) e rendimento não houve diferença significativa entre os dados (p>0,05) (Tabelas 14 e 15). A maior produção de polímero e maior rendimento foram verificados no cultivo com concentração de 2 g/L de NH₄Cl, obtendo-se valores de 1,21±0,07 g/L e 0,08±0,00 g/g, respectivamente (Figuras 17, 18, 19 e 20).

Tabela 13 - Produção de P(3HB) a partir de melaço de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes concentrações de NH₄Cl (1, 2, 3 g/L), adicionando 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h.

NH ₄ Cl (g/L)	Açúcares Totais (g/L)	Açúcares Totais Residuais (g/L)	MSC (g/L)	P(3HB) %	P(3HB) (g/L)	X _R (g/L)	Y _{P(3HB)/ATR} (g/g)
1,00	14,9±0,00	0,00±0,00	3,55±0,11	28,22±1,75	1,00±0,03	2,55±0,14	0,07±0,00
2,00	14,9±0,00	0,00±0,00	4,95±0,07	24,52±1,80	1,21±0,07	3,74±0,14	0,08±0,00
3,00	14,9±0,00	0,00±0,00	3,26±0,12	30,02±2,96	0,98±0,13	2,28±0,01	0,07±0,01

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de P(3HB) (g/L) a partir de melaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de cloreto de amônio por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	0,066040	2	0,033020	4,115524	9,552094	0,138055
Resíduos	0,024070	3	0,008023			
Total	0,090110	5				

Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento de produção (g/g) de P(3HB) a partir de melaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de cloreto de amônio por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	0,000297	2	0,000149	4,115524	9,552094	0,138054
Resíduos	0,000108	3	0,000036			
Total	0,000406	5				

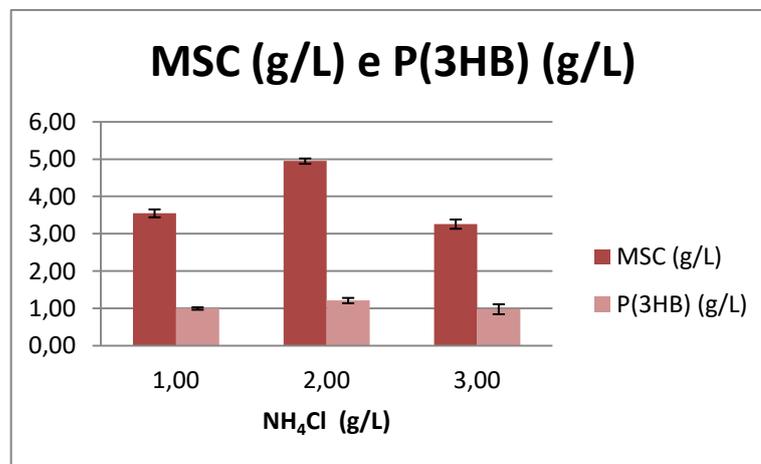


Figura 17 - Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de NH₄Cl (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, adicionando 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

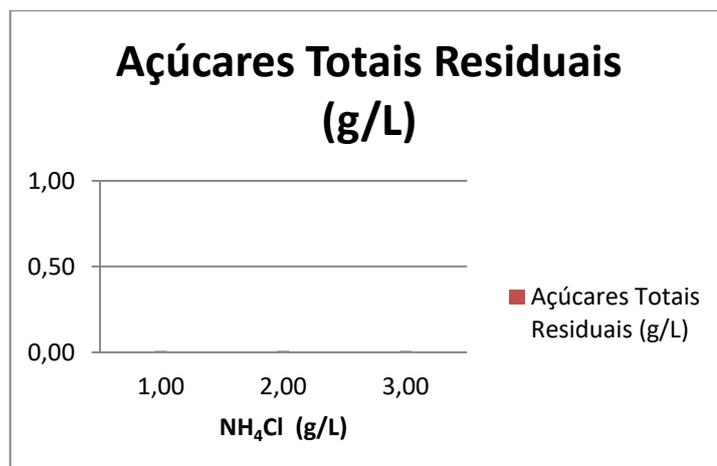


Figura 18 - Açúcares Totais Residuais (ATR) (g/L), provenientes de melaço de cana-de-açúcar, os quais incluem glicose, frutose e sacarose. Cultivos em diferentes concentrações de NH₄Cl (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, adicionando 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

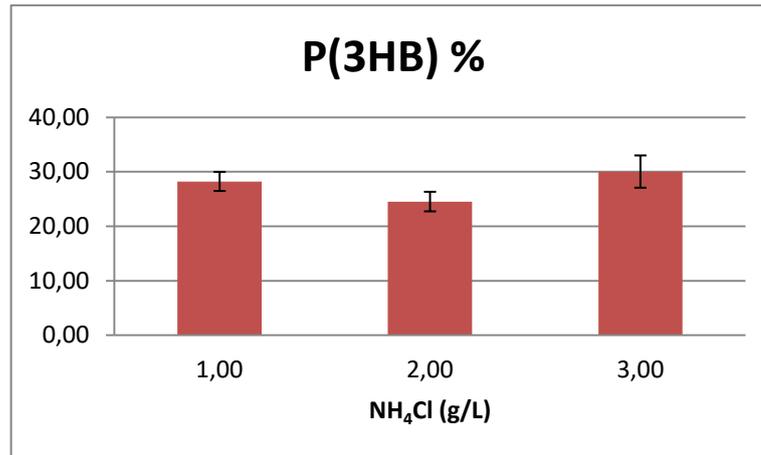


Figura 19 - Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [P(3HB)%] a partir de melaço de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes concentrações de NH₄Cl (1, 2, 3 g/L), adicionando 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h de cultivo.

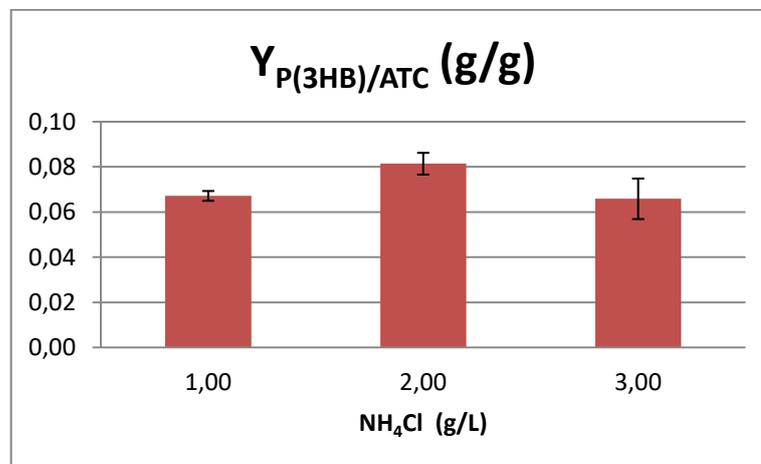


Figura 20 - Rendimento de produção de P(3HB) em razão dos açúcares totais consumidos (ATC), $Y_{P(3HB)/ATC}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações NH₄Cl (1, 2, 3 g/L) em Meio Mineral, adicionando 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h.

4.1.6. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações do sal sulfato de potássio (K_2SO_4), por *Burkholderia mimosarum* MA18

Cultivos com concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 g/L de K_2SO_4 foram realizados conforme descrito no item 3.4. deste estudo, adicionando-se 20 g/L de fonte de carbono e 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ como fonte de nitrogênio, a 34 °C e 150 rpm. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 16. Observa-se que os cultivos de *B. mimosarum* MA18 nas concentrações de 15 g/L e 10 g/L de K_2SO_4 revelaram os melhores resultados de acúmulo intracelular de polímero e rendimento de produção. Em cultivo com 15 g/L de K_2SO_4 foram alcançados valores de $40,56 \pm 7,89$ % da MSC e $0,13 \pm 0,02$ g/g, respectivamente. Em cultivo com 10 g/L de K_2SO_4 foi obtido acúmulo de polímero de $35,68 \pm 1,26$ % da MSC e rendimento de $0,12 \pm 0,01$ g/g. Os experimentos de produção de P(3HB) contendo diferentes concentrações de sulfato de potássio apresentam uma diminuição da MSC, com valores de $5,29 \pm 0,12$ g/L na concentração de 5 g/L de K_2SO_4 variando a $3,85 \pm 0,07$ g/L de MSC na concentração de 25 g/L, havendo, desse modo, uma inibição do crescimento celular em concentrações acima de 20 g/L de K_2SO_4 (Figuras 21 e 22). A redução de biomassa pode ser associada a um aumento de estresse osmótico em concentrações maiores de sulfato de potássio. Maiores concentrações deste sal também influenciaram a diminuição de acúmulo intracelular de polímero em cultivos com concentrações acima de 15 g/L de K_2SO_4 (Figuras 23 e 24). Tal fato pode dever-se à Bomba de Sódio e Potássio presente na membrana plasmática da célula, cuja atuação pode reduzir o acúmulo do polímero e outros metabólitos na tentativa de retirar sais da célula. O melhor valor de produção de polímero, de $1,97 \pm 0,33$ g/L, obtido na concentração de 15 g/L de K_2SO_4 pode estar associado a um possível aumento de aporte da fonte de carbono, devido a um aumento de permeabilidade da membrana plasmática da célula bacteriana.

Tabela 16 - Produção de P(3HB) a partir de melão de cana-de-açúcar em Meio Mineral contendo diferentes concentrações de K_2SO_4 (5, 10, 15, 20 e 25 g/L), adicionando 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 20 g/L de melão de cana-de-açúcar a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h.

K_2SO_4 (g/L)	Açúcar Total Inicial (g/L)	Açúcares Totais Residuais (g/L)	MSC (g/L)	P(3HB) %	P(3HB) (g/L)	X_R (g/L)	$Y_{P(3HB)/ATC}$ (g/g)
5,00	14,9±0,00	0,00±0,00	5,29±0,12	31,25±1,75	1,65±0,05	3,64±0,18	0,11±0,00
10,00	14,9±0,00	0,00±0,00	5,08±0,18	35,68±1,26	1,81±0,13	3,26±0,05	0,12±0,01
15,00	14,9±0,00	0,00±0,00	4,88±0,14	40,56±7,89	1,97±0,33	2,90±0,47	0,13±0,02
20,00	14,9±0,00	0,00±0,00	4,96±0,23	31,17±1,67	1,54±0,01	3,42±0,24	0,10±0,00
25,00	14,9±0,00	0,26±0,37	3,85±0,07	26,02±2,15	1,00±0,06	2,85±0,14	0,07±0,00

Através dos dados da ANOVA (Tabelas 17 e 18) pode-se observar que os valores de produção de P(3HB) e rendimento de produção diferem significativamente de acordo com as concentrações do sal sulfato de potássio utilizadas, apresentando valores de $p < 0,05$.

Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de P(3HB) (g/L) a partir de melão de cana-de-açúcar em diferentes concentrações do sal sulfato de potássio por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	1,095178	4	0,273795	10,493152	5,192167	0,011954
Resíduos	0,130463	5	0,026093			
Total	1,225642	9				

Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento de produção (g/g) de P(3HB) a partir de melão de cana-de-açúcar em diferentes concentrações do sal sulfato de potássio por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	0,004751	4	0,001188	10,305873	9,552094	0,012428
Resíduos	0,000576	5	0,000115			
Total	0,005327	9				

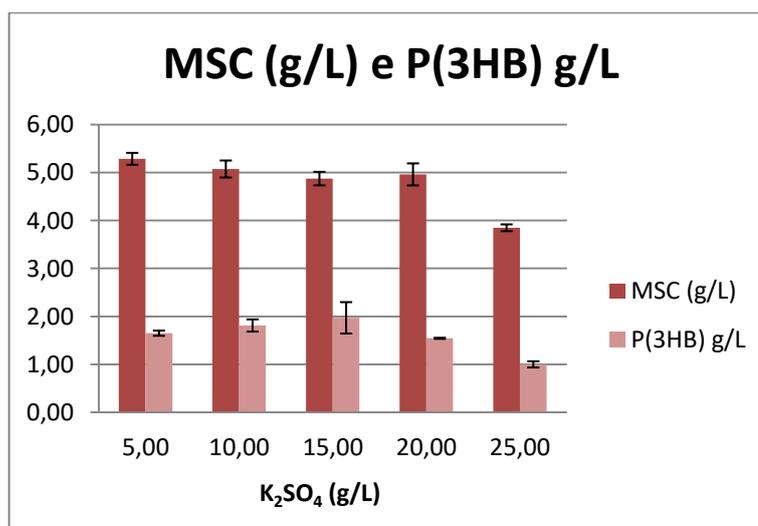


Figura 21 - Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de K₂SO₄ (5, 10, 15, 20 e 25 g/L) em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melão, 2 g/L de (NH₄)₂SO₄, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

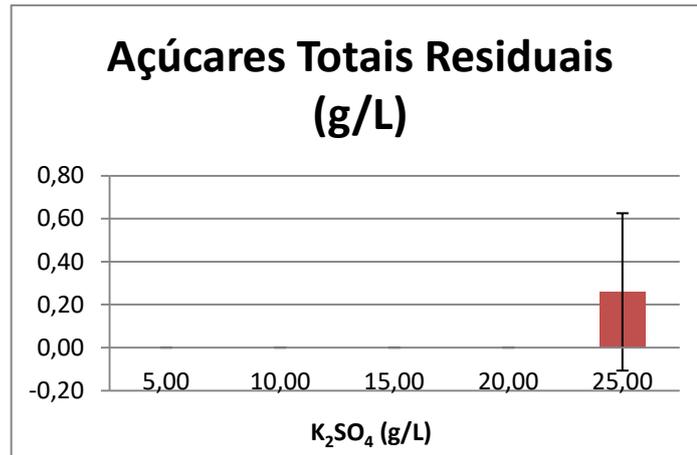


Figura 22 - Açúcares Totais Residuais (g/L,) provenientes de melão de cana-de-açúcar, os quais incluem glicose, frutose e sacarose. Cultivos em diferentes concentrações de K₂SO₄ (5, 10, 15, 20 e 25 g/L) em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melão, 2 g/L de (NH₄)₂SO₄, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

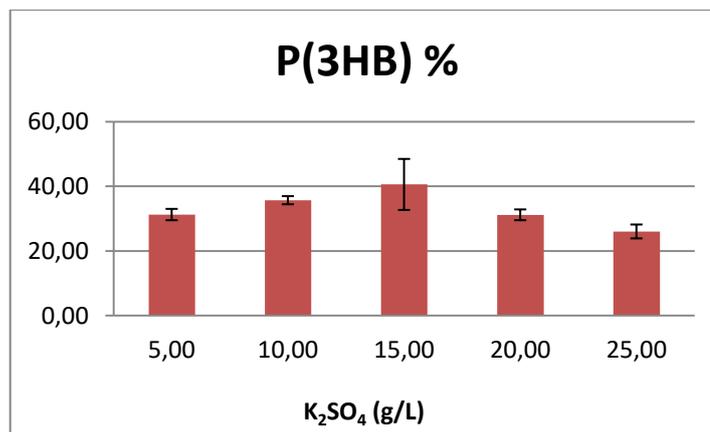


Figura 23 - Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [P(3HB)%] a partir de melão de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes concentrações de K₂SO₄ (5, 10, 15, 20 e 25 g/L), contendo 20 g/L de melão, 2 g/L de (NH₄)₂SO₄, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h de cultivo.

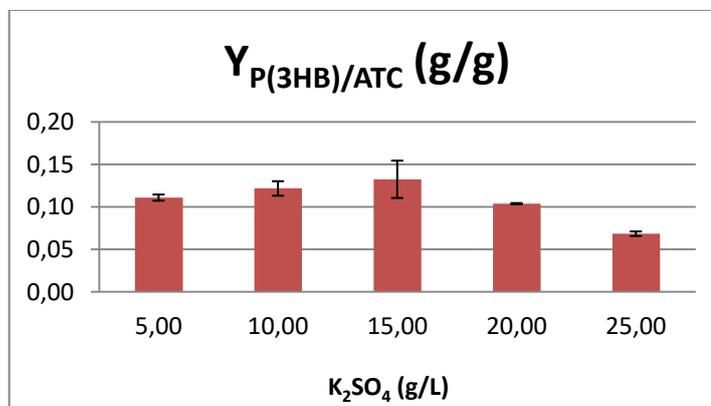


Figura 24 - Rendimento de produção de P(3HB) em razão dos açúcares totais consumidos (ATC), Y_{P(3HB)/ATC} (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de K₂SO₄ (5, 10, 15, 20 e 25 g/L) em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melão, 2 g/L de (NH₄)₂SO₄, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

4.1.7. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de cultivos com diferentes concentrações do sal cloreto de sódio (NaCl) por *Burkholderia mimosarum* MA18

Cultivos de *B. mimosarum* MA18 em meio mineral contendo concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 g/L de NaCl foram realizados durante 72 h, a 34 °C e 150 rpm, de acordo com o item 3.4. deste estudo, contendo 20 g/L de melação e 2 g/L de (NH₄)₂SO₄. Após a finalização dos cultivos, na etapa de quantificação de biomassa descrita no item 7.5., nos valores de concentrações de 20 e 25 g/L de NaCl não foram observados crescimento microbiano. Desse modo, as mais altas concentrações de NaCl testadas foram deletérias ao crescimento celular da linhagem. Assim sendo, apenas foram obtidos resultados dos cultivos com as concentrações de 5, 10 e 15 g/L de NaCl (Tabela 19 e Figuras 25, 26, 27, 28).

O cultivo de menor concentração do sal, 5 g/L de NaCl, obteve o maior valor de produção de P(3HB), alcançando 31,07±0,74 % da MSC, além de apresentar o melhor rendimento, de 0,11±0,00 g/g. Nota-se que a partir da concentração de 10 g/L de cloreto de sódio houve uma inibição do acúmulo intracelular de polímero, sendo apresentados os menores valores de porcentagem de polímero em biomassa dentre todos os parâmetros avaliados neste estudo. Em cultivos com concentração acima de 15 g/L de NaCl, nota-se a inibição do crescimento celular, com uma acentuada redução da quantidade de MSC, possivelmente derivada de estresse osmótico.

Tabela 19 - Produção de P(3HB) a partir de melação de cana-de-açúcar em Meio Mineral contendo diferentes concentrações de NaCl (5, 10, 15, 20 e 25 g/L), adicionando 2 g/L de (NH₄)₂SO₄, 20 g/L de melação de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h. Não houve crescimento nas replicatas de NaCl em concentrações de 20 e 25 g/L.

NaCl (g/L)	Açúcares Totais (g/L)	Açúcares Totais Residuais (g/L)	MSC (g/L)	P(3HB) %	P(3HB) (g/L)	X _R (g/L)	Y _{P(3HB)/ATC} (g/g)
5,00	14,9±0,00	0,000±0,00	5,08±0,11	31,07±0,74	1,58±0,07	3,50±0,04	0,11±0,00
10,00	14,9±0,00	0,19±0,27	4,38±0,18	17,75±0,96	0,78±0,01	3,60±0,19	0,05±0,00
15,00	14,9±0,00	5,27±2,37	2,78±0,21	18,09±1,27	0,50±0,00	2,27±0,21	0,05±0,01

De acordo com a Análise de Variância (ANOVA) de produção de polímero e rendimento apresentadas nas tabelas 20 e 21 as diferentes concentrações desse sal influenciaram na síntese de P(3HB), gerando valores de produção e rendimento de polímero significativamente diferentes entre si (p<0,05).

Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de P(3HB) (g/L) a partir de melaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações do sal cloreto de sódio por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	1,251114	2	0,625557	366,558464	9,552094	0,000260
Resíduos	0,005120	3	0,001707			
Total	1,256234	5				

Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento de produção (g/g) de P(3HB) a partir de melaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações do sal cloreto de sódio por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	0,003703	2	0,001852	29,251355	9,552094	0,010773
Resíduos	0,000190	3	0,000063			
Total	0,003893	5				

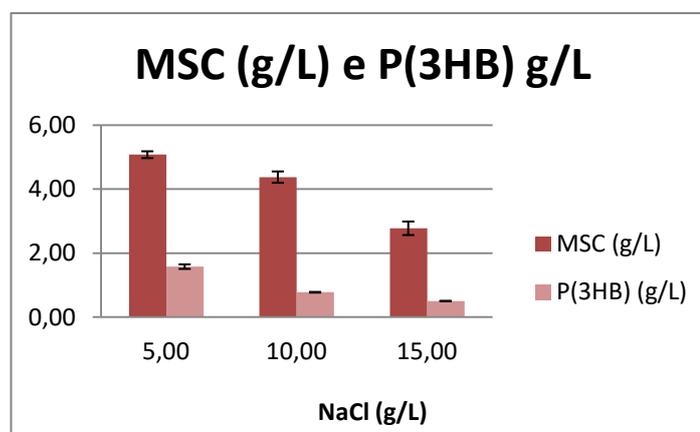


Figura 25 - Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de NaCl (5, 10, 15 g/L) em Meio Mineral, adicionando 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

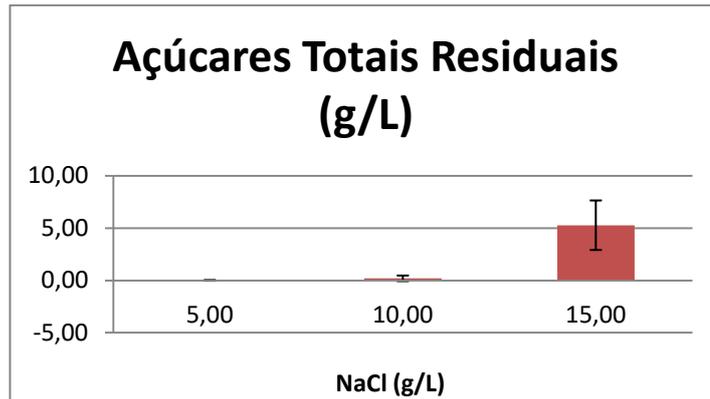


Figura 26 - Açúcares Totais Residuais (ATR) (g/L), provenientes de melão de cana-de-açúcar, os quais incluem glicose, frutose e sacarose. Cultivos em diferentes concentrações de NaCl (5, 10, 15 g/L) em Meio Mineral, adicionando 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 g/L de melão de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h.

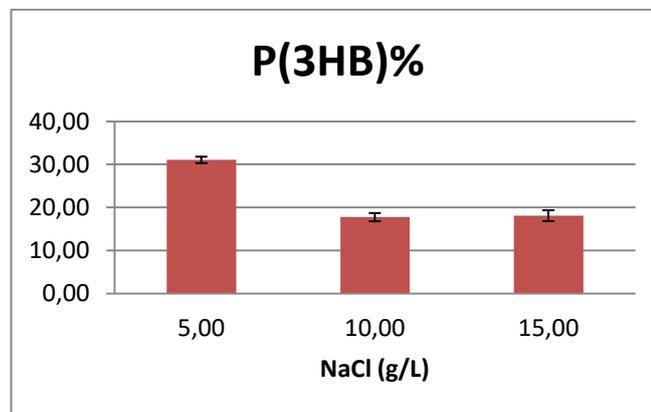


Figura 11 - Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [P(3HB)%] a partir de melão de cana-de-açúcar em Meio Mineral com diferentes concentrações de NaCl (5, 10, 15 g/L), adicionando 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 g/L de melão de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h de cultivo.

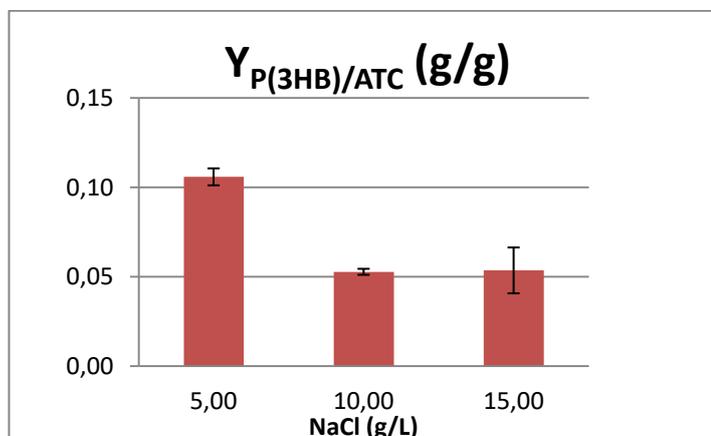


Figura 12 - Rendimento de produção de P(3HB) em razão dos açúcares totais consumidos, $Y_{\text{P(3HB)/ATC}}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de NaCl (5, 10, 15 g/L) em Meio Mineral, adicionando 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 g/L de melão de cana-de-açúcar, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

4.1.8. Avaliação de produção de P(3HB) a partir de melão de cana-de-açúcar por *Burkholderia mimosarum* MA18 em diferentes temperaturas

Os cultivos realizados com variação de temperatura (27, 30, 34, 37 e 40 °C) foram conduzidos de acordo com as especificações do item 3.4., contendo 20 g/L de melão de cana-de-açúcar e 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 34 °C e 150 rpm. Os resultados expostos na Tabela 22 mostram um consumo similar de açúcares totais nas diferentes temperaturas avaliadas e a influência que estas apresentam na produção de P(3HB) e quantidade de MSC. O cultivo realizado na temperatura de 34°C apresentou os melhores resultados de MSC, sendo de $4,94 \pm 0,19$ g/L, além de serem observados o maior acúmulo intracelular de polímero e maior rendimento, com valores de $32,08 \pm 0,19$ % de MSC e $0,11 \pm 0,00$ g/g, respectivamente. Tais resultados corroboram a utilização desta temperatura para os cultivos realizados nos demais parâmetros testados neste trabalho a fim de que houvesse uma melhor produção do polímero P(3HB). As ANOVAs (Tabelas 23 e 24) atestam, ainda, a significância que diferentes temperaturas possuem sobre produção de P(3HB) e seu rendimento ($p < 0,05$).

Tabela 22 - Produção de P(3HB) a partir de melão de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes temperaturas (27, 30, 34, 37 e 40 °C), adicionando 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 g/L de melão de cana-de-açúcar a 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h.

Temperatura (°C)	Açúcares Totais (g/L)	Açúcares Totais Residuais (g/L)	MSC (g/L)	P(3HB) %	P(3HB) (g/L)	X _R (g/L)	Y _{P(3HB)/ATC} (g/g)
27	14,9±0,00	0,00±0,00	1,33±0,18	26,93±0,65	0,36±0,04	0,97±0,14	0,02±0,00
30	14,9±0,00	0,00±0,00	2,54±0,19	28,95±0,55	0,74±0,07	1,80±0,12	0,05±0,00
34	14,9±0,00	0,00±0,00	4,94±0,19	32,08±0,19	1,58±0,05	3,35±0,14	0,11±0,00
37	14,9±0,00	0,00±0,00	3,83±1,17	24,55±0,55	0,94±0,31	2,88±0,86	0,06±0,02
40	14,9±0,00	4,86±0,21	0,88±0,04	25,45±0,82	0,22±0,00	0,65±0,03	0,02±0,00

Tabela 23 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de P(3HB) (g/L) a partir de melão de cana-de-açúcar em diferentes temperaturas por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	2,327262	4	0,581815	28,042682	5,192167	0,001276
Resíduos	0,103737	5	0,020747			
Total	2,430999	9				

Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento de produção (g/g) de P(3HB) a partir de melão de cana-de-açúcar em temperaturas por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	0,009507	4	0,002377	25,430186	5,192167	0,001607
Resíduos	0,000467	5	0,000093			
Total	0,009975	9				

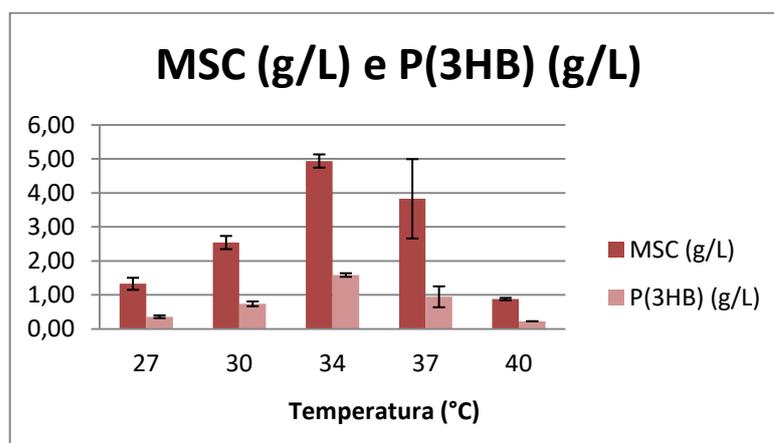


Figura 29 - Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção intracelular de P(3HB) (g/L) em diferentes concentrações de temperaturas (27, 30, 34, 37 e 40 °C) em Meio Mineral, adicionando 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 g/L de melão de cana-de-açúcar a 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72.

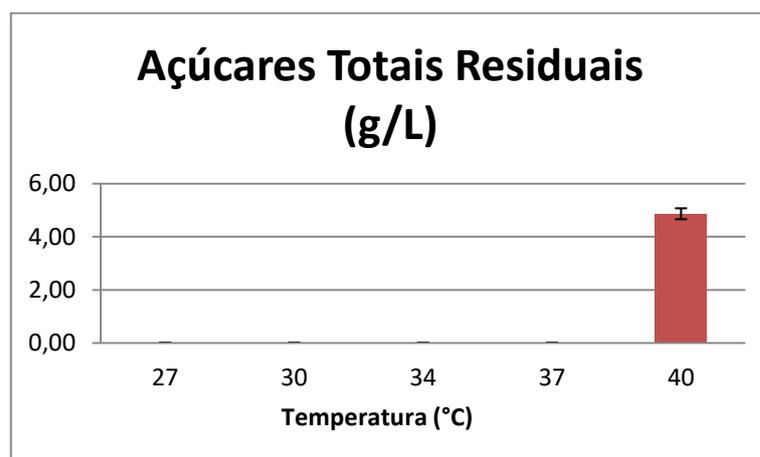


Figura 30 - Açúcares Totais Residuais (g/L,) provenientes de melão de cana-de-açúcar, os quais incluem glicose, frutose e sacarose. Cultivos em diferentes concentrações de temperaturas (27, 30, 34, 37 e 40 °C) em Meio Mineral, adicionando 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 g/L de melão de cana-de-açúcar a 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 72 h.

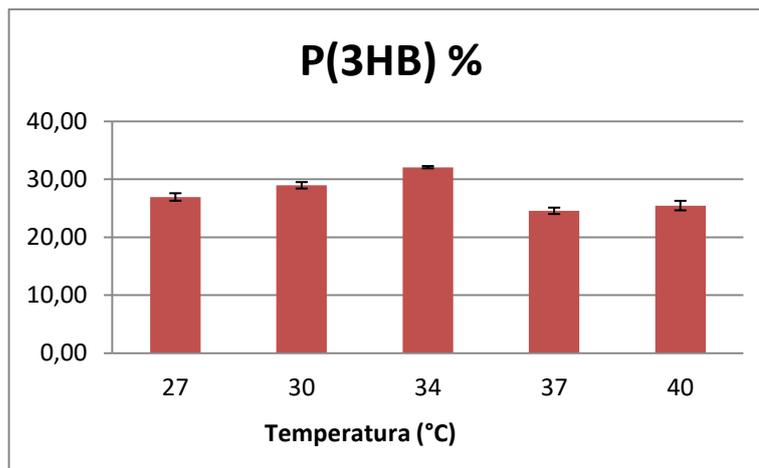


Figura 31 - Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [P(3HB)%] a partir de melaço de cana-de-açúcar em Meio Mineral em diferentes concentrações de temperaturas (27, 30, 34, 37 e 40 °C), adicionando 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar a 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 após 72 h de cultivo.

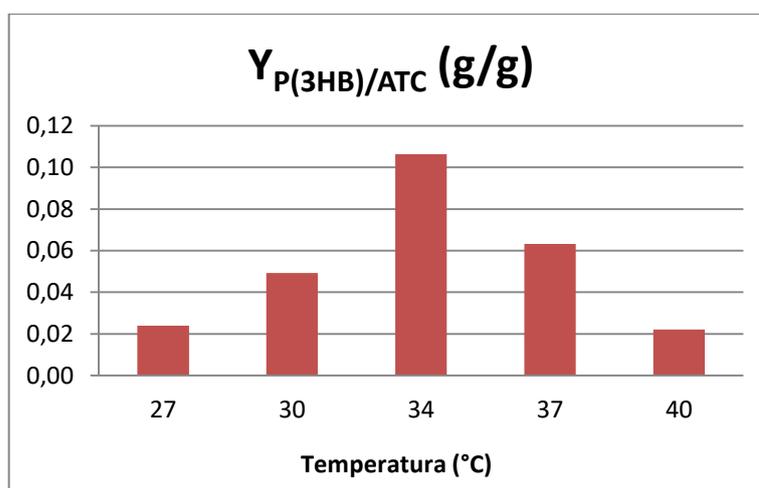


Figura 32 - Rendimento de produção de P(3HB) em razão dos açúcares totais consumidos (ATC), $Y_{\text{P(3HB)/ATC}}$ (g/g), obtido em cultivos com diferentes concentrações de temperaturas (27, 30, 34, 37 e 40 °C) em Meio Mineral, adicionando 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar a 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 72 h.

4.1.9. Considerações acerca dos experimentos das etapas de otimização de produção de P(3HB)

Nos experimentos realizados em diferentes concentrações de melaço de cana-de-açúcar (10, 20, 30, 40 e 50 g/L), a linhagem *Burkholderia mimosarum* MA18 apresentou os melhores resultados na concentração de 10 g/L da fonte de carbono, sendo obtidos maior acúmulo de polímero e melhor rendimento, com valores de $36,91 \pm 8,55$ % da MSC e $0,15 \pm 0,05$ (g/g), respectivamente. No entanto, para utilização na fase subsequente de cinética de produção de P(3HB), os resultados obtidos em cultivo com 20 g/L de melaço de cana-de-

açúcar seriam mais indicados por apresentarem valores de acúmulo de polímero de $32,08 \pm 0,19$ % da MSC e rendimento de $0,11 \pm 0,00$ g/g.

Nos experimentos com variação de concentrações de fontes de nitrogênio (1, 2, 3 g/L), o cultivo com 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obteve o melhor valor de acúmulo intracelular de polímero, com $34,20 \pm 0,91$ % da MSC. O cultivo com 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentou maior valor de produção de polímero em g/L, com $1,58 \pm 0,05$ g/L de P(3HB), permitindo que ambos os cultivos com 1 e 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentassem o mesmo valor de rendimento de produção de polímero, de $0,11 \pm 0,00$ g/g. Desse modo, o sulfato de amônio demonstrou ser a melhor fonte de nitrogênio para cultivos com *B. mimosarum* MA18. O nitrato de sódio demonstrou ter efeito negativo sobre quantidade de MSC e produção de polímero em maiores concentrações.

A linhagem *B. mimosarum* MA18 também foi avaliada em diferentes concentrações de sais (5, 10, 15, 20 e 25 g/L). O cultivo com 15 g/L de K_2SO_4 revelou os melhores resultados dentre as etapas de otimização, apresentando acúmulo intracelular de polímero e rendimento de produção com valores de $40,56 \pm 7,89$ % da MSC e $0,13 \pm 0,02$ g/g, respectivamente. No entanto, houve, também, bons resultados na concentração de 10 g/L deste sal, com $35,68 \pm 1,26$ %MSC para acúmulo intracelular de polímero e $0,12 \pm 0,01$ g/g para rendimento, os quais seriam melhores para o cultivo de cinética de produção. Cultivos com concentração acima de 15 g/L de NaCl provocaram inibição do crescimento celular.

Em cultivos com variação de temperatura (27, 30, 34, 37 e 40 °C), o experimento realizado na temperatura de 34°C apresentou o maior acúmulo intracelular de polímero e maior rendimento, com valores de $32,08 \pm 0,19$ % da MSC e $0,11 \pm 0,00$ g/g, respectivamente, sendo esta a temperatura adequada para realização de cultivos com *B. mimosarum* MA18.

Nestas etapas de otimização da produção de P(3HB) com testes de diferentes parâmetros de cultivo realizadas nesse estudo foram obtidos valores de produção de polímero entre $0,91 \pm 0,10$ g/L e $2,00 \pm 0,12$ g/L; valores de acúmulo intracelular de P(3HB) em porcentagem de biomassa entre $24,52 \pm 1,80$ % e $40,56 \pm 7,89$ % da MSC e valores de rendimento entre $0,07 \pm 0,01$ g/g e $0,15 \pm 0,05$ g/g. Sen et al (2019) avaliaram a produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator* a partir de melaço de cana-de-açúcar com diferentes tratamentos e sem pré tratamento. Em cultivo com duração de 72 h, essa espécie produziu 27,30 % de MSC utilizando melaço sem pré tratamento.

Santimano (2009) avaliaram a bactéria heterotrófica *Bacillus* sp. COL1 / A6 isolada de húmus quanto a seu potencial de produzir PHA a partir de resíduos agroindustriais como amido, resíduo de bolacha, polpa de citrus e melaço de cana-de-açúcar. O melaço de cana-de-

açúcar demonstrou ser uma ótima fonte de carbono, sendo obtido acúmulo de PHA de $54,68 \pm 1,36$ % de MSC, segundo o autor, devido a uma grande disponibilidade de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e vitaminas presentes no melão.

Os experimentos do presente trabalho realizados com diferentes parâmetros de análise da produção de P(3HB) por *B. mimosarum* MA18 demonstraram que a linhagem possui potencial de realizar uma produção satisfatória deste biopolímero, sendo necessária a realização de uma nova etapa de cultivos para a aquisição de melhores resultados.

4.2. Cinética de produção de P(3HB) por *B. mimosarum* MA18

Os cultivos de cinética de produção de P(3HB) com *B. mimosarum* MA18 foram realizados após análise e escolha dos melhores parâmetros de cultivo verificados nas etapas de otimização da produção de P(3HB) (itens de 4.1.1 a 4.1.8. deste estudo).

4.2.1. Experimento 1: Cinética de produção a partir de melão de cana-de-açúcar e sulfato de amônio

Com intuito de atingir uma maior produção de P(3HB) por *B. mimosarum* MA18, foram utilizados, neste primeiro experimento, 20 g/L de melão como fonte de carbono e 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio em 50 mL de Meio Mineral, a 34 °C e 150 rpm, durante 144 h, sendo retiradas amostras no tempo 0 h e a cada 24 h conforme descrito no item 3.4 deste estudo.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 25, nota-se que há um consumo maior dos açúcares totais provenientes da fonte de carbono a partir de 24h de cultivo (Figura 36), demonstrando uma extensão da fase “lag” até 24 h e consequente adaptação ao meio de cultivo. A fase “log” ou exponencial teve início após 24h, havendo um aumento dos valores de MSC de $1,65 \pm 0,07$ g/L em 24 h a $4,90 \pm 0,14$ g/L em 72h de cultivo (Figuras 35).

Com relação à biomassa residual (X_R), nota-se um direcionamento do metabolismo bacteriano ao crescimento celular no período de 24h a 72h e de 120h a 144h, demonstrando que a linhagem *B. mimosarum* MA18 possui o auge de sua fase de acúmulo intracelular de polímero no tempo de 96h. Em 96h de cultivo nota-se o início da fase estacionária do micro-organismo, na qual este apresenta o valor de biomassa residual de $1,75 \pm 0,30$ g/L (Tabela 25).

Com relação à fonte de nitrogênio foi verificado que uma menor quantidade de NH_4^+ disponível nos meios de cultivo, ou seja, limitação de fonte de nitrogênio é favorável ao acúmulo de polímero intracelularmente, sendo observado o maior acúmulo intracelular de P(3HB) de $63,03 \pm 6,75$ % da MSC quando alcançado o valor de $0,22 \pm 0,02$ g/L de NH_4^+ (Figura 37 e Tabela 25).

Com 96h de cultivo, dentre todos os resultados deste trabalho, *B. mimosarum* MA18 obteve os valores máximos de acúmulo intracelular de P(3HB) em relação à biomassa com valor de $63,03 \pm 6,75$ % da MSC; produção de P(3HB) com valor de $2,99 \pm 0,35$ g/L e rendimento de $0,20 \pm 0,02$ g/g (Tabela 25 e Figuras 35, 38 e 39).

A síntese de PHAs pode ocorrer diferentemente em dois grupos de bactérias: o primeiro grupo requer limitação de nutrientes, como oxigênio, nitrogênio, fósforo, magnésio ou enxofre, sob a condição de excesso de fonte de carbono. Por outro lado, o segundo grupo apresenta síntese de PHAs juntamente com crescimento bacteriano (Anjum et al, 2016). Os resultados obtidos nesta cinética de produção demonstram que as condições de 20 g/L de melação como fonte de carbono e 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio deste experimento favoreceram a via biossintética de síntese de P(3HB) da linhagem *B. mimosarum* MA18, sendo obtido o maior valor de acúmulo de P(3HB) de todo estudo. Assim sendo, comprova-se que esta linhagem pertence ao grupo de bactérias que produz PHAs em meios contendo excesso de fonte de carbono e limitação de fonte de nitrogênio.

Tabela 25 – Cinética de produção de P(3HB) a partir de melação de cana-de-açúcar em MM contendo 20 g/L de melação e 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

Tempo (h)	Açúcares Totais (g/L)	Açúcares Totais Residuais (g/L)	NH_4^+ (g/L)	MSC (g/L)	P(3HB) %	P(3HB) (g/L)	X_R (g/L)	$Y_{P(3HB)/ATC}$ (g/g)
0	14,9±0,00	14,90±0,00	0,54±0,00	0,56±0,19	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
24	14,9±0,00	6,15±0,14	0,37±0,08	1,65±0,07	2,86±0,02	0,05±0,00	1,60±0,07	0,01±0,00
48	14,9±0,00	1,96±0,36	0,22±0,06	3,38±0,04	17,12±4,01	0,58±0,13	2,80±0,16	0,04±0,01
72	14,9±0,00	0,00±0,00	0,20±0,00	4,90±0,14	19,90±1,37	0,98±0,10	3,92±0,05	0,07±0,01
96	14,9±0,00	0,00±0,00	0,22±0,02	4,74±0,05	63,03±6,75	2,99±0,35	1,75±0,30	0,20±0,02
120	14,9±0,00	0,00±0,00	0,24±0,01	5,43±0,14	14,76±0,40	0,80±0,04	4,62±0,10	0,05±0,00
144	14,9±0,00	0,00±0,00	0,23±0,01	5,53±0,04	29,94±0,01	1,65±0,01	3,87±0,03	0,11±0,00

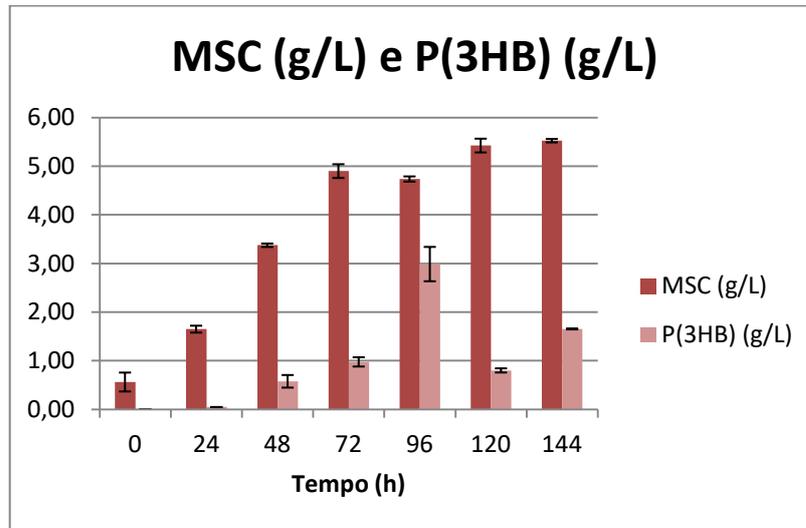


Figura 35 - Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção intracelular de P(3HB) (g/L). Cultivos em Meio Mineral, adicionando 20 g/L de melão de cana-de-açúcar e 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

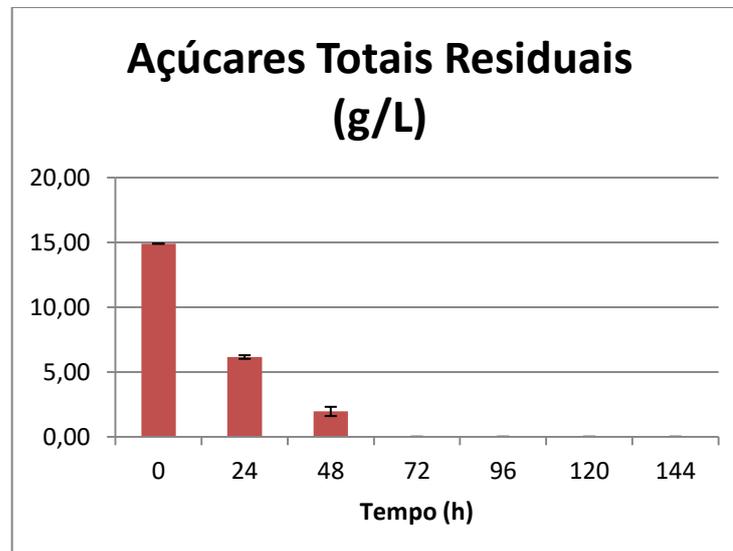


Figura 36 - Açúcares Totais Residuais (g/L,) provenientes de melão de cana-de-açúcar , os quais incluem glicose, frutose e sacarose. Cultivos em Meio Mineral, adicionando 20 g/L de melão de cana-de-açúcar e 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

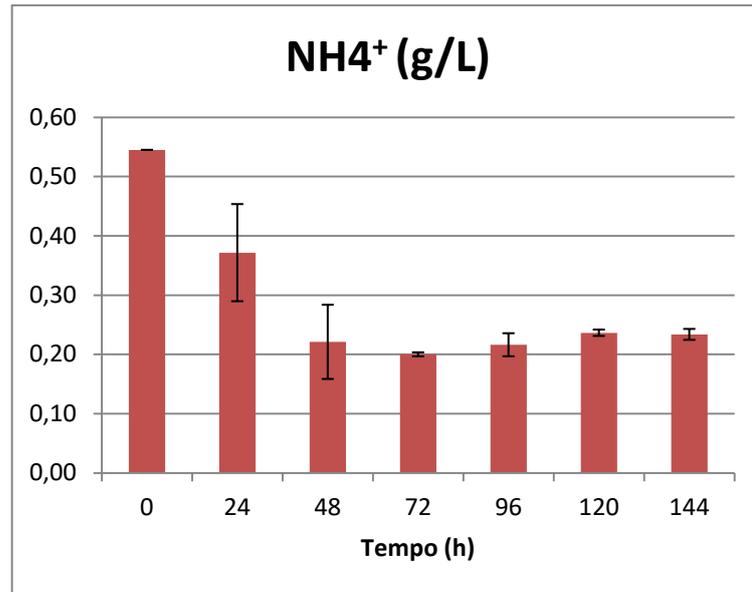


Figura 37 – NH₄⁺ (g/L) presente em cultivos de cinética de produção realizados em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melão de cana-de-açúcar e 2 g/L de (NH₄)₂SO₄, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

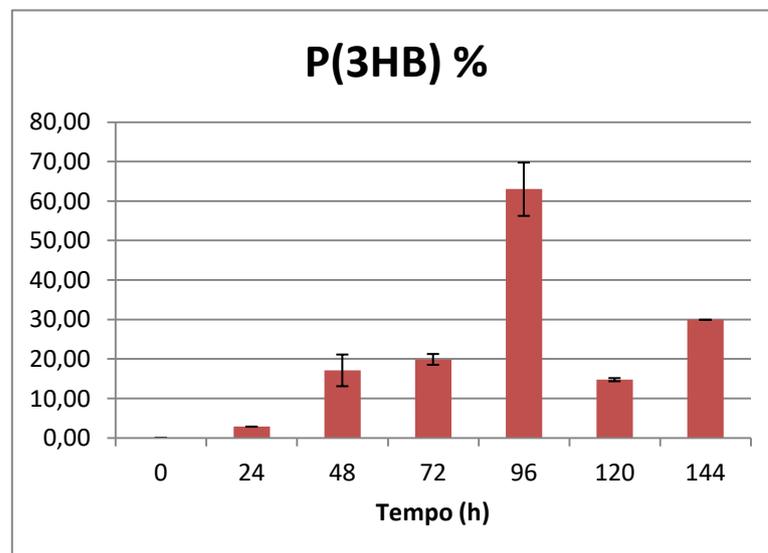


Figura 38 - Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [P(3HB) %] a partir de melão de cana-de-açúcar. Cultivos realizados em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melão de cana-de-açúcar e 2 g/L de (NH₄)₂SO₄, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

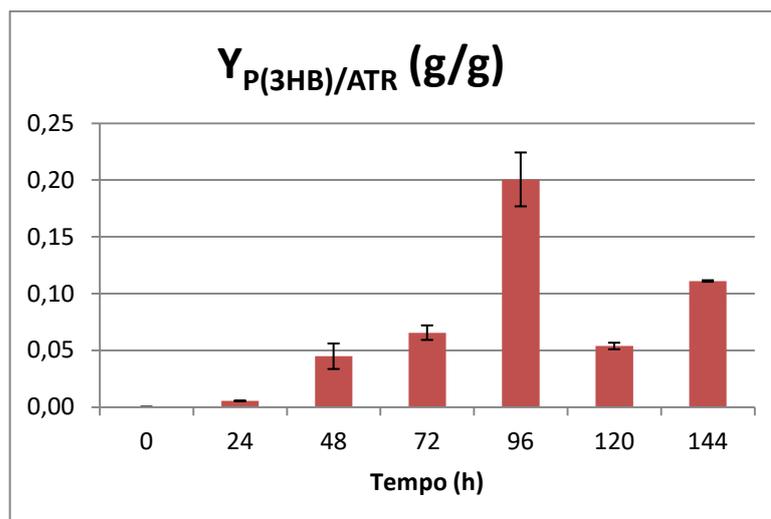


Figura 39 Rendimento de produção de P(3HB) em razão dos açúcares totais consumidos (ATC), $Y_{P(3HB)/ATC}$ (g/g), obtidos em cultivos em Meio Mineral, contendo 20 g/L de melão de cana-de-açúcar e 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

Através da Análise de Variância, pode-se observar que os parâmetros utilizados nesse experimento proporcionam a diferenciação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos valores de produção de P(3HB) (g/L) e rendimento de produção (g/g) (Tabelas 26 e 27).

Tabela 26 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de P(3HB) (g/L) em cinética de produção a partir de melão de cana-de-açúcar em MM contendo 20 g/L de melão e 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F_c	p-valor
Regressão	13,010649	6	2,168442	99,487209	3,865968	0,000002
Resíduos	0,152573	7	0,021796			
Total	13,163222	13				

Tabela 27 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento de produção (g/g) de P(3HB) em cinética de produção a partir de melão de cana-de-açúcar em MM contendo 20 g/L de melão e 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F_c	p-valor
Regressão	0,057402	6	0,009567	90,754304	3,865968	0,000003
Resíduos	0,000738	7	0,000105			
Total	0,058140	13				

4.2.2. Experimento 2: Cinética de produção de P(3HB) a partir de melaço de cana-de-açúcar e sulfato de amônio, adicionando-se o sal sulfato de potássio

O segundo experimento de cinética de produção envolveu a condução de cultivos em 50 mL de Meio Mineral contendo 20 g/L de melaço, 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 10 g/L de K_2SO_4 , a 34 °C e 150 rpm, durante 144h, de acordo com o item 3.4 deste estudo. Decidiu-se adicionar o sal K_2SO_4 nestes cultivos visto que no experimento que analisou diferentes concentrações do sal K_2SO_4 (item 4.1.6 deste estudo), a concentração de 15 g/L de K_2SO_4 apresentou o maior acúmulo intracelular de P(3HB) em porcentagem de biomassa e rendimento dentre os resultados das etapas de otimização, com valores de $40,56 \pm 7,89$ % da MSC e $0,13 \pm 0,02$ g/g, respectivamente. No entanto, houve, também, bons resultados e com desvios padrões menores na concentração de 10 g/L deste sal, com $35,68 \pm 1,26$ % da MSC para acúmulo intracelular de polímero e $0,12 \pm 0,01$ g/g para rendimento, os quais seriam melhores para o estudo de cinética de produção.

A tabela 28 apresenta os resultados do estudo de cinética de produção com 10 g/L de K_2SO_4 . Com relação à MSC, pode-se notar um aumento de seus valores de 24 h até o tempo de 72h, referentes à fase “log” ou exponencial da linhagem *B. mimosarum* MA18 (Tabela 28 e Figura 40). Após 72h há um direcionamento do metabolismo de *B. mimosarum* MA18 para o crescimento celular, com valores de biomassa residual (X_R) maiores do que os encontrados no Experimento 1 de cinética de produção (item 8.2.1), apresentando $2,05 \pm 0,44$ g/L em 72 h e chegando a $4,80 \pm 0,03$ g/L de biomassa residual em 144 h (Tabela 28). O direcionamento para o crescimento celular também pode ser verificado nos resultados de P(3HB) % após 72 h (Figura 43), nos quais, nesse período de tempo, são identificados os menores valores de acúmulo intracelular de PHA, variando de $19,17 \pm 0,52$ % da MSC no tempo de 96 h a $11,07 \pm 0,00$ %MSC em 144h (Tabela 28).

Com relação à fonte de nitrogênio, em comparação ao cultivo de cinética do Experimento 1 (item 8.2.1), foi verificado que *B. mimosarum* MA18 também atingiu maiores acúmulos de polímero com menores quantidade de NH_4^+ disponíveis nos meios de cultivo. Nesta cinética, foi observado o maior acúmulo intracelular de polímero de $55,37 \pm 10,01$ % da MSC quando alcançado o valor de $0,23 \pm 0,04$ g/L de NH_4^+ (Figura 42 e Tabela 10).

Portanto, os melhores valores de acúmulo intracelular de P(3HB), produção de P(3HB) e rendimento para este experimento são dados no tempo de 72h, com valores de $55,37 \pm 10,01$ % da MSC; $2,55 \pm 0,48$ g/L e $0,17 \pm 0,03$ g/g, respectivamente (Figuras 40, 43 e

44). Mesmo tendo sido atingidos os segundos melhores valores para produção do polímero em todo o estudo, a limitação de fonte de nitrogênio também parece ter sido importante para obtenção de tais resultados.

Tabela 28 – Produção de P(3HB) a partir de melão de cana-de-açúcar em Meio Mineral adicionando 10 g/L de K_2SO_4 , 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ e 20 g/L de melão de cana-de-açúcar a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 144 h.

Tempo (h)	K_2SO_4 (g/L)	Açúcares Totais (g/L)	Açúcares Totais Residuais (g/L)	NH_4^+ (g/L)	MSC (g/L)	P(3HB) %	P(3HB) (g/L)	X_R (g/L)	$Y_{P(3HB)/ATC}$ (g/g)
0	10,0	14,9±0,00	14,90±0,00	0,54±0,00	0,61±0,30	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
24	10,0	14,9±0,00	10,17±2,70	0,44±0,12	1,68±0,07	21,37±0,04	0,36±0,01	1,32±0,06	0,09±0,05
48	10,0	14,9±0,00	6,84±0,46	0,33±0,04	3,01±0,05	53,40±13,53	1,61±0,37	1,41±0,43	0,20±0,04
72	10,0	14,9±0,00	0,00±0,00	0,23±0,04	4,60±0,04	55,37±10,01	2,55±0,48	2,05±0,44	0,17±0,03
96	10,0	14,9±0,00	0,00±0,00	0,25±0,02	4,96±0,19	19,17±0,52	0,95±0,06	4,01±0,13	0,06±0,00
120	10,0	14,9±0,00	0,00±0,00	0,30±0,01	5,24±0,05	15,76±4,29	0,82±0,22	4,41±0,27	0,06±0,01
144	10,0	14,9±0,00	0,00±0,00	0,29±0,03	5,40±0,04	11,07±0,00	0,60±0,00	4,80±0,03	0,04±0,00

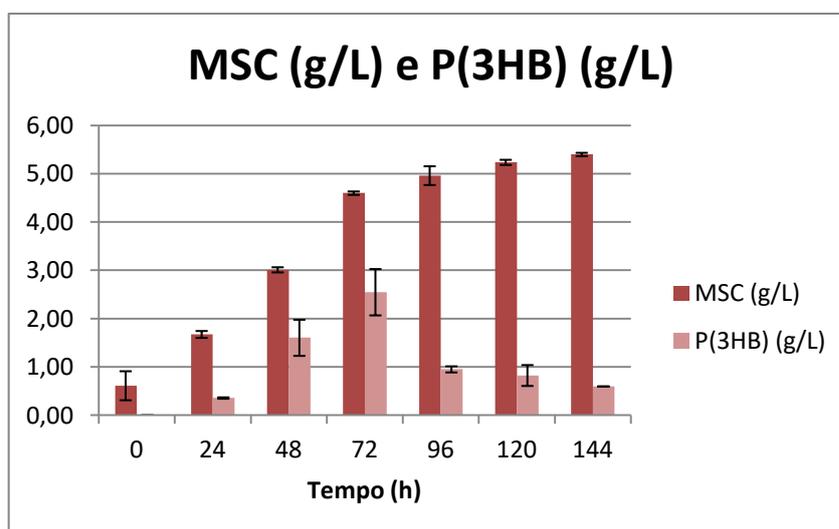


Figura 40 - Massa Seca Celular (MSC) (g/L) e produção intracelular de P(3HB) (g/L). Cultivos em Meio Mineral, adicionando 10 g/L de K_2SO_4 , 20 g/L de melão de cana-de-açúcar e 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

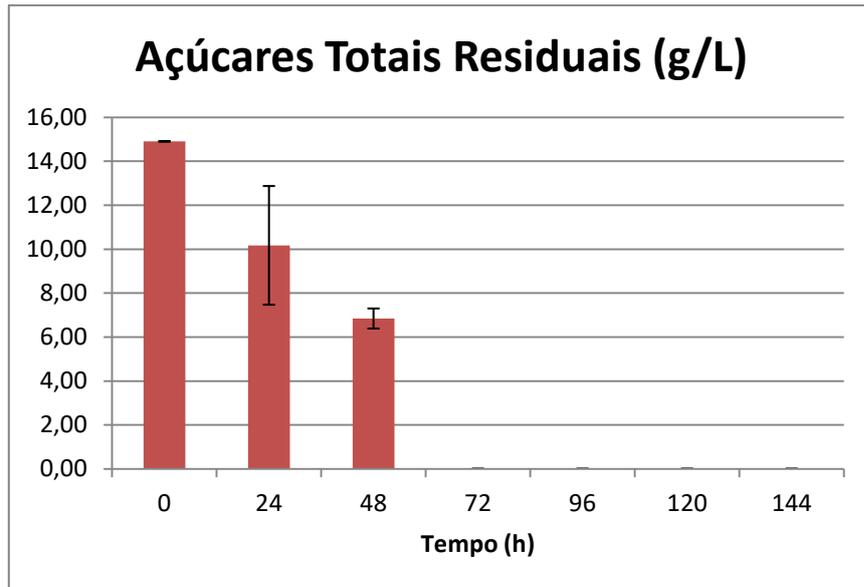


Figura 41 - Açúcares Totais Residuais (g/L,) provenientes de melaço de cana-de-açúcar , os quais incluem glicose, frutose e sacarose. Cultivos em Meio Mineral, adicionando 10 g/L de K_2SO_4 , 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar e 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

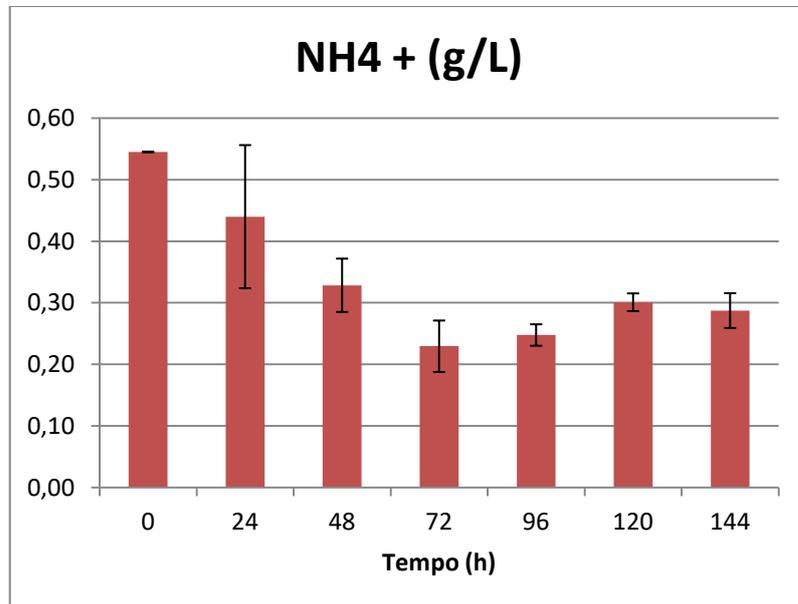


Figura 42 – NH_4^+ (g/L) presente em cultivos de cinética de produção realizados em Meio Mineral, contendo 10 g/L de K_2SO_4 , 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar e 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

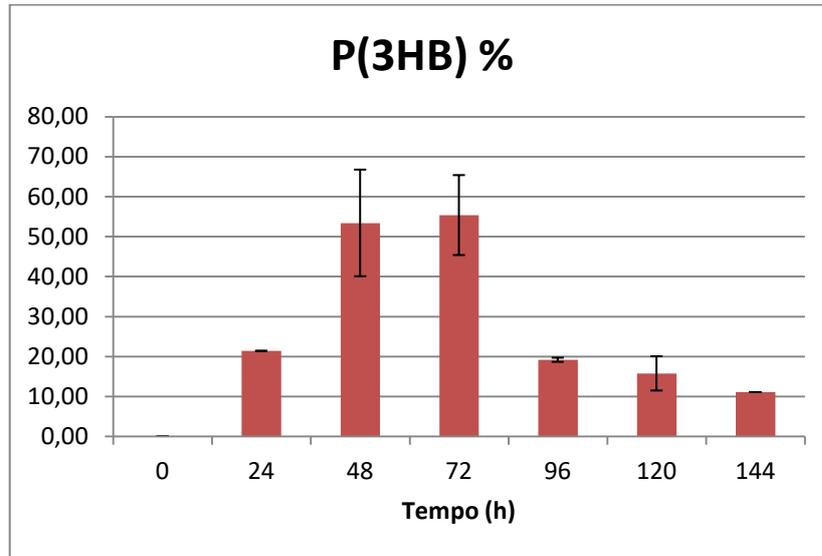


Figura 43 - Acúmulo intracelular de polímero expresso em porcentagem de biomassa [P(3HB)%] a partir de melaço de cana-de-açúcar. Cultivos realizados em Meio Mineral, contendo 10 g/L de K_2SO_4 , 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar e 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

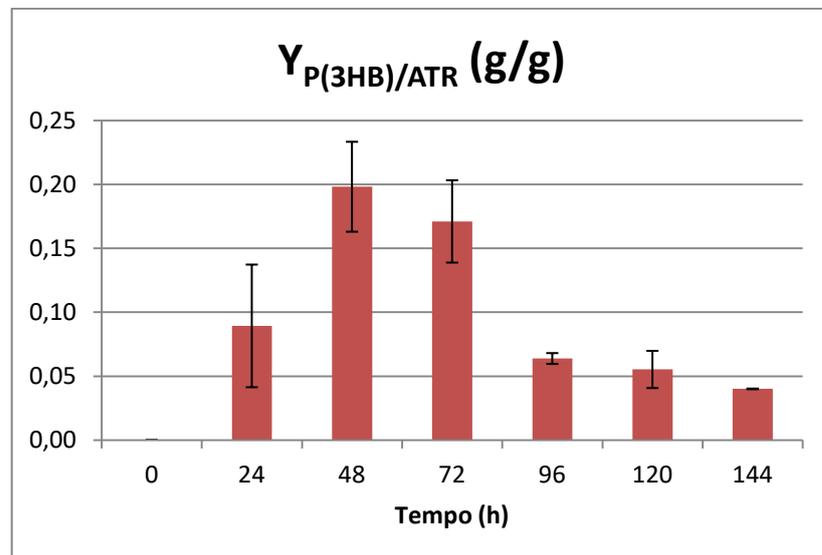


Figura 44 - Rendimento de produção de P(3HB) em razão dos açúcares totais consumidos (ATC), $Y_{P(3HB)/ATR}$ (g/g) obtido em cultivos em Meio Mineral, contendo 10 g/L de K_2SO_4 , 20 g/L de melaço de cana-de-açúcar e 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18, durante 144 h.

As Análises de Variância realizadas demonstram que os parâmetros utilizados nesta cinética de produção com uso de 10 g/L de K_2SO_4 influenciaram significativamente nos resultados de produção de P(3HB) e rendimento ($p > 0,05$) (Tabelas 29 e 30).

Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de P(3HB) (g/L) em cinética de produção a partir de melão de cana-de-açúcar adicionando 10 g/L de K_2SO_4 , 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ e 20 g/L de melão de cana-de-açúcar a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 144 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	8,740550	6	1,456758	24,222952	3,865968	0,000239
Resíduos	0,420977	7	0,060140			
Total	9,161527	13				

Tabela 30 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento de produção (g/g) de P(3HB) em cinética de produção a partir de melão de cana-de-açúcar adicionando 10 g/L de K_2SO_4 , 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ e 20 g/L de melão de cana-de-açúcar a 34 °C e 150 rpm, por *Burkholderia mimosarum* MA18 durante 144 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	F _c	p-valor
Regressão	0,061457	6	0,010243	14,929667	3,865968	0,001129
Resíduos	0,004803	7	0,000686			
Total	0,066260	13				

4.2.3. Considerações acerca dos experimentos de cinética de produção

As melhores concentrações dos parâmetros de cultivo avaliados foram utilizadas na etapa de cinética de produção de P(3HB). No primeiro experimento de cinética foram testados 20 g/L de melão de cana-de-açúcar; 2 g/L de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e a temperatura de 34°C. No segundo experimento de cinética foram avaliados os parâmetros de 20 g/L de melão de cana-de-açúcar; 2 g/L de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio; 10 g/L de K_2SO_4 como sal e a temperatura de 34°C.

Ambos os experimentos de cinética de produção de P(3HB) apresentaram os mais altos valores de acúmulo de P(3HB), produção de P(3HB) e rendimento de produção deste estudo. Além disso, com esses experimentos, pode-se compreender a importância de limitação de fonte de nitrogênio para a linhagem *B. mimosarum* MA18, sendo obtidos resultados satisfatórios de acúmulo de polímero quando valores de NH_4^+ entre 0,20 e 0,30 g/L foram observados.

O primeiro experimento de cinética, no qual foi utilizado sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, foram obtidos os melhores resultados de acúmulo intracelular de P(3HB) em

relação à biomassa com $63,03 \pm 6,75$ % da MSC; melhor produção de P(3HB) com $2,99 \pm 0,35$ g/L e melhor rendimento de produção de $0,20 \pm 0,02$ g/g deste estudo. O segundo experimento de cinética, no qual utilizou-se sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e o sal sulfato de potássio, demonstrou valores satisfatórios de acúmulo intracelular de polímero com $55,37 \pm 10,01$ % da MSC; produção de P(3HB) com $2,55 \pm 0,48$ g/L e rendimento com $0,17 \pm 0,03$ g/g. Estes resultados superam os valores descritos por De Paula ET AL (2019), em seu estudo de cinética de produção de polihidroxicanoatos com a linhagem *Burkholderia glumae* MA13. Os autores obtiveram acúmulo intracelular de Poli-(3-hidroxi-butirato) com valor de 49% da MSC, utilizando melação de cana-de-açúcar sem pré-tratamento.

Além disso, com os resultados do presente trabalho é possível compreender que a limitação de fonte de nitrogênio e excesso de fonte de carbono, sendo, neste estudo, utilizados sulfato de amônio a 2 g/L e melação a 20 g/L, apresentam influência positiva sobre a produção de P(3HB) pela linhagem *B. mimosarum* MA18. Desse modo, a linhagem *B. mimosarum* MA18 está adaptada à produção deste biopolímero a partir de melação de cana-de-açúcar sem pré-tratamento, o que pode favorecer o modelo de biorrefinaria sucroalcooleira.

4.3. Caracterização do P(3HB) de *Burkholderia mimosarum* MA18

A quantificação e composição do polímero P(3HB) foram realizados através da análise de metil-ésteres, obtidos a partir da reação de Metanólise descrita no item 3.7. deste trabalho. As análises foram realizadas através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Obteve-se, desse modo, um cromatograma (Figura 45) e um espectro de massa (Figura 46) referentes à produção de P(3HB) nos cultivos de *B. Mimosarum* MA18 na concentração de 10 g/L de melação de cana-de-açúcar.

Nos espectro de massa é possível identificar o fragmento de m/z 103, o qual é um fragmento característico de metil-ésteres de ácidos 3-hidroxicanoicos, derivados de clivagem α do grupo funcional hidroxila (LEE & CHOI, 1995). Ainda, a partir do fragmento m/z [M-31], os diferentes componentes de PHAs podem ser verificados, sendo no fragmento m/z 87 característico de 3-hidroxi-butirato.

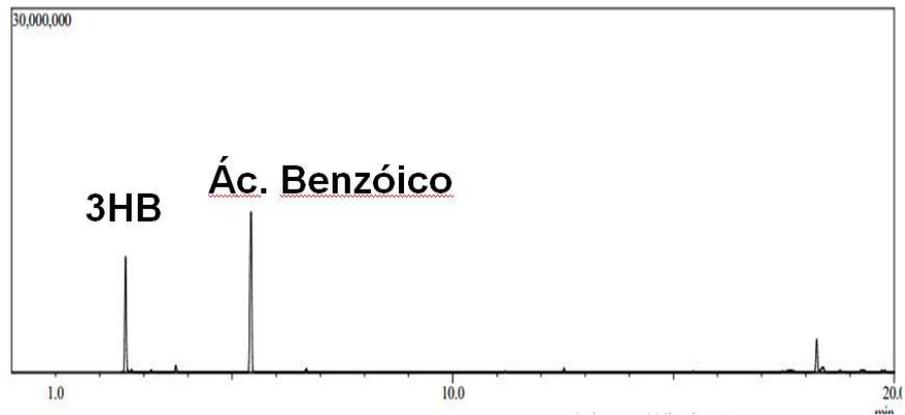


Figura 45 - Cromatograma obtido a partir de análise por GC-MS dos metil-ésteres de ácido 3-hidroxicanoico, produzidos por *Burkholderia cepacia* MA18, utilizando melão de cana-de-açúcar.

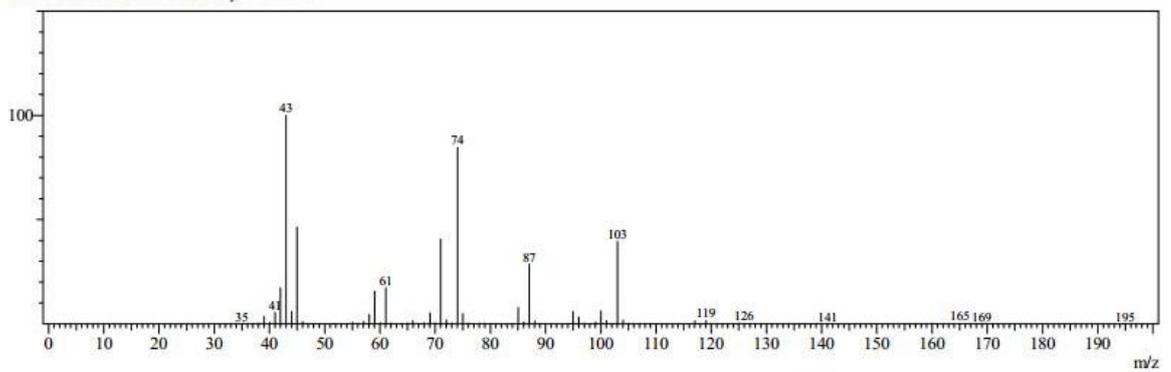


Figura 46 - Espectro de massa de metil-ésteres de 3-hidroxicanoatos produzidos por *Burkholderia cepacia* MA18: 3-hidroxiacetato.

5 CONCLUSÕES

Nos experimentos de análise de parâmetros ótimos para produção de P(3HB), a linhagem *Burkholderia mimosarum* MA18 alcançou valores satisfatórios de acúmulo de polímero sendo observados valores entre $24,52 \pm 1,80\%$ da MSC em cultivo com 2 g/L NH_4Cl e $40,56 \pm 7,89\%$ da Massa Seca Celular em cultivo com 15 g/L do sal sulfato de potássio. Foi obtido, também, o valor de produção de $2,00 \pm 0,12$ g/L de P(3HB) em cultivo com 30 g/L de melação de cana-de-açúcar. Além disso, foi avaliado o rendimento de conversão da fonte de carbono, melação de cana-de-açúcar, em polímero P(3HB), chegando ao valor satisfatório de $0,15 \pm 0,05$ g/g em cultivo com 10 g/L de melação.

No entanto, os melhores resultados foram obtidos nos experimentos de cinética de produção. Esses cultivos foram realizados no intuito de ativar a via metabólica de síntese do polímero e aumentar o acúmulo intracelular de P(3HB) pela bactéria. A linhagem *Burkholderia mimosarum* MA18 obteve os melhores resultados de todo o estudo no primeiro experimento de cinética de produção, sob as condições de 20 g/L de melação e 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a 34 °C e 150 rpm, alcançando valores máximos de acúmulo intracelular de P(3HB) em relação à biomassa de $63,03 \pm 6,75\%$ da MSC e melhor produção de P(3HB) com $2,99 \pm 0,35$ g/L. Além disso, nesse experimento foi obtido o melhor rendimento de conversão de açúcares totais provenientes de melação de cana-de-açúcar em polímero P(3HB) com valor de $0,20 \pm 0,02$ g/g. Ficou evidenciado, ainda, que esta linhagem bacteriana tem melhores resultados de produção de P(3HB) quando em meios com limitação de fonte de nitrogênio com valores de NH_4^+ entre 0,20 e 0,30 g/L.

Assim, pode-se concluir que o melação de cana-de-açúcar é uma boa fonte de carbono barata para ser usada como substrato para *Burkholderia mimosarum* MA18, havendo, assim, o potencial de reduzir os custos de produção deste polímero de plástico biodegradável e de favorecer o modelo de biorrefinaria sucroalcooleira para produção desses biopolímeros.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. G.E.; TORRES, C. A.V.; REIS, M. A.M. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. **Water Res**, v. 44, n. 11, p. 3419-3433, 2010.
- ALCARDE, A. R. **Processamento da cana-de-açúcar: outros produtos**. Agência de informação EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 26 out. 2017.
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETROLEO GAS NATURAL E BIOCMBUSTIVEL. 2018. Disponível em:< <http://www.anp.gov.br/noticias/4983-nota-esclarecimento-consumidor-14dez2018>>. Acesso em: 24. jul. 2019
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO (ABISPLAST), 2018. Disponível em: < <http://www.abiplast.org.br/publicacoes/perfil2018/>>. Acesso em: 24 de julho de 2019.
- BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of new poly(3-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Appl. Environ. Microbiology**, Washington, v. 54, p. 1977-1982, 1988.
- BARHAM, P.J. Physical properties of poly(hydroxyalkanoates) and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate). In: **Novel biodegradable microbial polymers**. Dordrecht: Dawes EA, 1990. P 81-96.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**. Edição n.109. Brasília: 2017. 24p.
- BRIGHAM, J. C.; SINSKEY, A.J. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry. **Int. J. Biotech. Well. Indus.**, v.1, n.1, p. 53-60, 2012.
- CARDOSO, L. O. B.; **Produção de Polihidroxibutirato (PHB) por Bactérias Metilotróficas**. 2017. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- 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 Biochem**, v.44, n.5, p.509–515, 2009.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019. Disponível em:<<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2859-producao-de-etanol-no-brasil-mantem-recorde-e-alcanca-33-58-bilhoes-de-litros>>. Acesso em: 24 jul. 2019.
- CHANPRATEEP, S. Current trends biodegradable polyhydroxyalkanoates. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 110, p.621-632, 2010.
- CHODAK, I. Polyhydroxyalkanoates: Origin, properties and applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, p. 451–477, 2008.

DE PAULA, F. C. **Polihidroxicanoatos (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, F. C. et al., Polyhydroxyalkanoates production from crude glycerol by newly isolated *Pandoraea* sp. **JKSUS**, v.29, n.2, p.166-173, 2017(a).

DE PAULA, F. C. et al., Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from biodiesel by-product and propionic acid by mutant strains of *Pandoraea* sp. **Biotechnol. Prog.**, v.33, n. 4, p.1077-1084, 2017(b).

DE PAULA, F. C., KAKAZU, S., DE PAULA, C. B. C., DE ALMEIDA, A. F., CABRERA GOMEZ, J. G.; CONTIERO, J. *Burkholderia glumae* MA13: A newly isolated bacterial strain suitable for polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 20, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101268>>. Acesso em: 16 nov 2019.

DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Frying process: selection of fats and quality control. In: **International Meeting on Fats & Oils Technology Symposium and Exhibition**, 1991, Campinas, SP. p. 58-66.

EIA - U.S. Energy Information Administration. **Monthly Energy Review**, jun 2019, 274 p. Disponível em: <<https://www.eia.gov/totalenergy/data/monthly/pdf/mer.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2019.

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.

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

HOGARTH, J. R. Evolutionary models of sustainable economic change in Brazil: No-till agriculture, reduced deforestation and ethanol biofuels. **Environ. Innov. Soc. Transit.**, v. 24, sep. 2017, p. 130-141, 2017.

HUIJBERTS, G. N. M.; VAN DER WAL, H.; WILKINSON, C.; EGGINK, G. Gas-chromatographic analysis of poly(3-hydroxyalkanoates) in bacteria. **Biotechnol. Tech.**, v. 8, p. 187-192, (1994).

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 Inst. Chem. Eng.**, v. 42, [s.n.], p. 883-888, 2011.

KANJANACHUMPOL. P.; KULPREECHA, S.; TOLIENG, V.; THONGCHUL, N. Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. **Bioproc. Biosyst. Eng.**, v.36, p. 1463-1474, 2013.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochem**, v. 40, [s.n.], 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, [s.n.], p. 310-320, 2011.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estud. Av.**, v. 24, n.68, p. 223-253, 2010.

KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 107, n. 3, p. 240–245, 2009.

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

LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 2, p. 397–442, 2014.

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.

MURUAGA, M. L.; CARVALHO, K. G.; DOMÍNGUEZ, J.M.; de SOUZA OLIVEIRA, R. P.; PEROTTI, N. Isolation and characterization of *Saccharomyces* species for bioethanol production from sugarcane molasses: Studies of scale up in bioreactor. **Renew. Energy**, v. 85, [s.n.], p.649-656, 2016.

NAHEED, N.; JAMIL, N. Optimization of biodegradable plastic production on sugar cane molasses in *Enterobacter* sp. SEL2. **Braz. J. Microbiol.**, v.45, n. 2, p. 417-426, 2014.

NASCIMENTO V.M., SILVA L.F., GOMEZ J.G.C., FONSECA G.G. Growth of *Burkholderia sacchari* LFM 101 cultivated in glucose, sucrose and glycerol at different temperatures. **Sci. Agric**, v. 73, [s.n.], p. 429–433, 2016.

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

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

POSADA, J.A.; NARANJO, J.M.; LÓPEZ, J.A.; HIGUITA, J.C.; CARDONA, C.A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochem.**, v. 46, n.1, p. 310–317, 2011.

PRIELER, S.; FISCHER, G. **Agricultural by-products associated with biofuel production chains.** Elobio, 2009. 14p. Disponível em: <http://www.elobio.eu/fileadmin/elobio/user/docs/DeliverableE_5.1.pdf>. Acesso em: 25 out. 2017.

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.

RAPOSO, R.S., DE ALMEIDA, M.C.M., DE OLIVEIRA M.D.C.M., DA FONSECA M.M., CESÁRIO M.T. A *Burkholderiasacchari* cell factory: Production of poly-3-hydroxybutyrate, xylitol and xylonic acid from xylose-rich sugar mixtures. **New Biotechnol**, v. 34, p. 12–22. 2017.

RAZA, Z.A.; ABID, S.; BANAT, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **Int. Biodeterior. Biodegradation**, v.126, jan. 2018, p. 45-56, 2017. Disponível online em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>>. Acesso em: 25 out. 2017.

REE, R. V.; SANDERS, J; BAKKER, R.; BLAAUW, R.; ZWART, R.; DRIFT, B.V.D. Biofuel-driven biorefineries for the co-production of transportation fuels and added-value products. In: **Handbook of biofuels production**. 1st edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2011. p 559-580.

RFA – RENEABLE FUELS ASSOCIATION. **2019 ETHANOL INDUSTRY OUTLOOK**. Disponível em: < <https://ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2019/02/RFA2019Outlook.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2019.

SANTIMANO, M.C.; PRABHU, N. N.; GARG, S. PHA Production using low-cost agroindustrial wastes by *Bacillus* sp. strain COL1/A6. **Res. J. Microbiol.**, v. 4, p. 89-96, 2009.

SEN, K.Y.; HUSSIN, M.H.; BAIDURAH, S. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.17, p. 51–59, 2019. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.006>>. Acesso em: 24 dez 2018.

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

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; TORRES, B.B. Propionic acid metabolism and Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHB-co-HV) production by *Burkholderia* sp. **J. Biotechnol.**, v.76, p.165-174, 2000.

SILVA, L.F.; TACIRO, M.K.; MICHELIN RAMOS, M.E.; CARTER, J.M.; PRADELLA, J.G.C.; GOMEZ, J.G.C. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31(6), p. 245–254, 2004.

SILVA, L.F.; TACIRO, M.K.; RAICHER, G.; PICCOLI, R.A.M.; MENDONÇA, T.T.; LOPES, M.S.G.; GOMEZ, J.G.C. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 71, [s.n.], p. 2-7, 2014.

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyesters production. **Trends Biotechnol.**, 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. **Biotechnol. Advances**, San Diego, v. 25, [s.n.], p. 148-175, 2007.

TAN, G.Y.A.; CHEN, C.L.; LI, L.; GE, L.; WANG, L. RAZAAD, I.M.N.; LI, Y.; ZHAO, L., MO, Y.; WANG, J. Y. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. **Polymers**, v.6, n.3, p. 706-754, 2014.

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

TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Eur. J. Biochem**, v. 209, p. 15-30, 1992.

VERLINDEN, R.A.J.; HILL, D.J.; KENWAR, M.A.; WILLIAMS, C.D.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; RADECKA, I.K. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. **AMB Express**. v. 1, 11 p., 2011.

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

VIZCAINO-CASTON, I.; KELLY, C. A.; FITZGERALD, A. V. L.; LEEKE, G. A.; JENKINS, M.; OVERTON, T. W. Development of a rapid method to isolate polyhydroxyalkanoates from bacteria for screening studies. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 1, p. 101–104, 2016.

YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Curr. Opin. Biotechnol.**, London, v. 18, p. 213- 219, 2007.