



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs): BIOPROSPECÇÃO DE
MICRO-ORGANISMOS E PRODUÇÃO A PARTIR DE GLICEROL**

FABRÍCIO COUTINHO DE PAULA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de concentração: Microbiologia Aplicada).

Fevereiro - 2012

FABRÍCIO COUTINHO DE PAULA

**POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs): BIOPROSPECÇÃO DE
MICRO-ORGANISMOS E PRODUÇÃO A PARTIR DE GLICEROL**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de concentração: Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof.Dr. Jonas Contiero

Rio Claro
2012

FABRÍCIO COUTINHO DE PAULA

**POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs): BIOPROSPECÇÃO DE
MICRO-ORGANISMOS E PRODUÇÃO A PARTIR DE GLICEROL**

Tese apresentada ao Instituto de
Bociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Biológicas (Área de concentração:
Microbiologia Aplicada).

Comissão Examinadora:

Prof.Dr. André Henrique Rosa (UNESP/Sorocaba-SP)
Profa.Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto (FCFAR-UNESP/Araraquara-SP)
Prof.Dr. Eloizio Júlio Ribeiro (UFU/Uberlândia-SP)
Prof.Dr. Jonas Contiero (IB-UNESP/Rio Claro-SP)
Prof.Dr. José Gregório Cabrera Gomez (ICB-USP/São Paulo-SP)

Rio Claro, 10 de Fevereiro de 2012.

*Às mulheres da minha vida:
Sebastiana, minha mãe, e
Carolina, minha esposa.
Hoje e sempre!*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelo presente da ciência em minha vida. Especialmente, por mostrar que a fé é necessária para dar os primeiros passos e perseverar na concretização dos objetivos propostos em uma hipótese científica.

Aos meus pais, Elias e Sebastiana, pois sem o seu apoio incondicional seria difícil viver o sonho da ciência.

À Carolina, minha esposa, pela ajuda e compreensão. Você esteve ao meu lado em madrugadas no laboratório. Estava comigo em plena floresta atlântica, quando isolei os micro-organismos deste trabalho. Viveu ao meu lado os duros períodos sem financiamento. E nunca perdeu a fé em mim, nenhum momento.

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero, meu orientador. Agradeço pela confiança depositada, pela chance de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Pelos conselhos profissionais e pessoais, na busca de sempre obter o melhor de mim. Esta aí, um homem, cujo tempo só faz crescer a chama da ciência em seu coração, a qual contagia a todos em sua volta na busca pelo conhecimento.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, pois sem a sua ajuda este trabalho dificilmente se concretizaria. Pela oportunidade em participar do CBAB, em 2008. Foram duas semanas muito importantes no direcionamento de minhas pesquisas. Acima de tudo, por abrir as portas de seu laboratório e de seu conhecimento na produção destes polímeros. Muito obrigado!

À FAPESP, pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gervásio Paulo Silva, o homem do glicerol. Nossas conversas resultaram no projeto de pesquisa, que levaram a obtenção desta tese científica.

Ao amigo e Dr. Cristian Jacques, um grande professor para mim na área de estatística, cuja ajuda foi indispensável.

Ao técnico Roberto José Pedro, um anjo da guarda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo e Dr. Siddhartha pelas linhagens e conselhos referentes à *P. aeruginosa*.

À Dra. Cinara pela ajuda com a identificação das linhagens bacterianas isoladas neste estudo.

À Profa. Sandra Franchetti e ao amigo Adriano Uemura pela ajuda com as análises de FTIR.

À todos os alunos do Laboratório de Microbiologia Industrial: Rodrigo, Kate, Mary, Paulo, Roberta, Túlio, Mariana, Guilherme, Lorenzo, Natália, Franciele, Paula, Marcela,

Paola, Vinicius, Heloísa. Entre eles, um agradecimento especial a Luciana Fontes Coelho. Obrigado a todos vocês, pela ajuda profissional e pela oportunidade de aprendizado.

Agradeço a todo o corpo docente, técnicos e alunos do Depto. Bioquímica e Microbiologia, que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Entre eles, um obrigado ao amigo Alex, por sua ajuda e conselhos, pelas conversas de jovens cientistas.

Ao amigo André Sunao, cujo apoio foi importante para a minha volta a Rio Claro, ao universo de pesquisas.

Aos meus irmãos, Vinicius e Lara, pela compreensão com o meu trabalho e por disponibilizar a privacidade de suas férias escolares, propiciando-me um ambiente equilibrado para a produção desta tese.

A Ronaldo e Magaly pelos conselhos, fé e dedicação em meu amadurecimento pessoal e profissional.

A Carlos Rodrigues e Ronaldo Filho pelo apoio em meus dias de pesquisa na grande São Paulo.

Aos amigos Antonio Carlos e Denilson, com quem estou dividindo minhas experiências pessoais e profissionais a quase 30 anos.

A Simão e Flávia, cujos destinos têm sempre proporcionado suas participações em momentos decisivos da minha vida.

Aos amigos de Rio Claro, Cis, Rodrigo Gomes, Paixão, Amarílis, Miagy e tantos outros que me alimentaram com uma boa convivência, renovando o meu espírito para o ambiente de pesquisa.

À todos os amigos, familiares e companheiros de trabalho, que ajudaram de alguma forma o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigado!

*“Nossas dádivas são traidoras e nos impedem de alcançar
todo o bem que poderíamos conquistar,
senão fosse o medo de tentar”.*
(William Shakespeare).

RESUMO

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis, sintetizados como grânulos intracelulares em células bacterianas, na presença de excesso de fonte de carbono e limitação de nutrientes necessários ao crescimento. Estes biopolímeros são atraentes substitutos para os polímeros derivados do petróleo, devido às suas propriedades similares com vários termoplásticos e elastômeros. Atualmente, a produção de biocombustíveis é outra grande alternativa para a substituição do petróleo, especialmente o biodiesel produzido a partir da transesterificação de gorduras e óleos vegetais e animais. O glicerol bruto é o principal subproduto da produção deste biocombustível, o qual tem baixo custo devido à presença de impurezas. O desafio na produção de PHAs é a competitividade com os preços dos polímeros derivados do petróleo. Uma solução para este problema tem sido propor a implementação de biorefinarias que obtêm outros produtos, agregando valores à cadeia de produção do biodiesel, tal como, a produção de biopolímeros bacterianos, utilizando glicerol bruto como fonte de carbono. Portanto, torna-se necessária a descoberta de novas linhagens bacterianas promissoras, na produção de PHAs a partir deste insumo. Neste trabalho, realizou-se a busca por micro-organismos capazes de produzir polihidroxicanoatos (PHAs) utilizando glicerol em meios de cultivo. Para verificar o potencial de produção destes polímeros a partir desta fonte de carbono, foram avaliadas 107 linhagens de micro-organismos através da reação com o corante Sudan Black B. Entre os quais, estavam 76 isolados obtidos de solo de Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica) e 31 de solo de Mangue. Além disso, foram também avaliadas 7 linhagens de *P. aeruginosa* provenientes de solos contaminados com hidrocarbonetos e manipueira. Nestes experimentos, foram determinados pH, consumo da fonte de carbono e massa seca celular. As células liofilizadas provenientes dos cultivos foram submetidas à reação de propanólise para a determinação de PHAs. Os propil-ésteres obtidos foram analisados por cromatografia gasosa. A maior produção de PHA-mcl a partir de glicerol bruto foi obtida nos cultivos de *P. aeruginosa* LDM 03 (1,38 g/L). A análise cromatográfica revelou um polímero constituído principalmente de monômeros 3-hidroxicanoato (HD) e 3-hidroxicanoato (HDd), com uma baixa incidência de monômeros 3-hidroxi-hexanoato (HHx) e 3-hidroxi-octanoato (HO). As linhagens provenientes de Mata Atlântica MA 03 (3,72 g/L), MA 09 (2,36 g/L), MA 13 (2,23 g/L) e MA 18 (2,23 g/L) apresentaram as melhores produções de PHB a partir deste insumo. Estas foram identificadas como *Pandoraea sputorum*, *Cupriavidus metallidurans*, *Burkholderia cepacia* e *Burkholderia mimosarum*, respectivamente. Neste trabalho, a linhagem MA 03 apresentou-se como a mais promissora para a produção de um copolímero PHB-HV a partir de glicerol bruto e ácido propiônico, com um rendimento de $Y_{HV/AP} = 0,32$ g/g.

Palavras chave: PHA. Biopolímero. Glicerol. Biodiesel. Bioprospecção

ABSTRACT

The polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable polyesters that are synthesized intracellularly and deposited as granules in bacterial cultures in the presence of excess carbon source and a growth limiting nutrient. These biopolymers are attractive substitute for petrochemical-based plastics due to their similar material properties to various thermoplastics and elastomers. Actually, the biofuels production is another great alternative to replace the petroleum, specially the biodiesel generated from the transesterification of vegetable or animal fats and oils. The crude glycerol is the main byproduct of biodiesel production, which has a relative low value due to the presence of impurities. The challenge in the PHAs production is the competitive prices of petroleum polymers. A solution for this problem has been proposed with the implementation of biorefineries that co-produce additional value-added products along with biodiesel, such as bacterial biopolymers production utilizing crude glycerol as a carbon source. Therefore, it is necessary to discover a new promising PHAs-producing bacterial strains. In this work, was carried out the search for PHA-producer microorganisms utilizing glycerol as a sole carbon source. For this, 107 bacterial strains were evaluated by Sudan Black B staining reaction. Among which were 76 strains isolated from a tropical moist forest soil (Atlantic forest) and 31 from Mangrove ecosystem. Furthermore, 7 *P. aeruginosa* strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil and cassava wastewater were also evaluated for PHAs production. In this experiments were determined the pH, carbon source consumption e cell dry weight. The freeze-dried cells were subjected to propanolysis for PHAs determination. The propyl esters were assayed by gas chromatography. The highest mcl-PHA production from biodiesel glycerol was obtained from *P.aeruginosa* LDM 03 (1.38 g.L⁻¹). The composition analysis of the mcl-PHA showed a polymer composed primarily of monomers 3-hydroxydecanoate and 3-hydroxydodecanoate with low incidence of monomers 3-hydroxyhexanoate and 3-hydroxyoctanoate. The Atlantic forest isolated bacteria MA 03 (3.72 g.L⁻¹), MA 09 (2.36 g.L⁻¹), MA 13 (2.23 g.L⁻¹) and MA18 (2.62 g.L⁻¹) were the best PHB-producing microorganisms. These bacterial strains were identified by 16S rDNA sequencing analysis as *Pandoraea sputorum*, *Cupriavidus metallidurans*, *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia mimosarum*, respectively. In this work, the MA 03 was the most promising bacterial strain for PHB-HV production utilizing biodiesel glycerol and propionic acid with a 3HV yield of 0.32 g.g⁻¹.

Keywords: PHA. Biopolymer. Glycerol. Biodiesel. Bioprospection.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Polihidroxicanoatos (PHAs)	18
2.2. A síntese de PHAs em micro-organismos	21
2.3. Histórico da produção de PHAs e perspectivas de mercado	23
2.4. Glicerol	24
2.5. A produção de biodiesel e a obtenção de glicerol	25
2.6. Produtos obtidos através da bioconversão do glicerol	26
2.7. Planejamento experimental	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. PRODUÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE GLICEROL DE BIODIESEL POR LINHAGENS BACTERIANAS ISOLADAS DE SOLO DE MATA ATLÂNTICA	30
4.1. Introdução	30
4.2. Materiais e Métodos	31
4.2.1. Meios de cultivo	31
4.2.1.1. Caldo e ágar nutriente	31
4.2.1.2. Meio mineral	31
4.2.1.3. Esterilização	32
4.2.2. Micro-organismos	32
4.2.3. Isolamento de micro-organismos de Mata Atlântica	32
4.2.3.1. Amostragem	32
4.2.3.2. Isolamento de micro-organismos a partir do solo de Mangue e Floresta Ombrófila	32
4.2.4. Seleção de micro-organismos produtores de PHAs	34
4.2.5. Cultivo de micro-organismos	35
4.2.5.1. Cultivo dos micro-organismos isolados de ecossistemas de Mata Atlântica	35
4.2.5.2. Cultivo das linhagens LMI MA 03, MA 09, MA 13 e MA 18 utilizando glicerol bruto proveniente de usina de biodiesel	35
4.2.6. Determinação de biomassa	36

4.2.7. Determinação de glicerol	36
4.2.8. Determinação de PHAs	36
4.2.9. Caracterização de micro-organismos	37
4.2.9.1. Coloração de Gram.....	37
4.2.9.2. Morfologia celular.....	38
4.2.9.3. Teste de Catalase.....	38
4.2.9.4. Teste de Oxidase	38
4.2.9.5. Caracterização das linhagens MA 03, MA 09, MA 13, MA 18 a partir de testes bioquímicos	38
4.2.10. Identificação das linhagens mais promissoras na produção de PHAs empregando técnicas moleculares	39
4.2.10.1. Extração do DNA das linhagens bacterianas LMI MA 03, MA 09, MA 13, MA18.....	39
4.2.10.2. Eletroforese em gel de agarose 1% com GelRed ou Brometo de Etídio.....	40
4.2.10.3. Quantificação de DNA por espectrofotometria (Nanodrop®)	41
4.2.10.4. Amplificação do gene 16S rDNA utilizando PCR.....	41
4.2.10.5. Purificação dos produtos da PCR.....	41
4.2.10.6. Reação de sequenciamento de DNA	42
4.2.10.7. Análise das sequencias obtidas.....	43
4.3. Resultados e Discussão	43
4.3.1. Isolamento de micro-organismos	43
4.3.2. Seleção de micro-organismos isolados produtores de PHAs	44
4.3.3. Cultivo e caracterização dos micro-organismos isolados produtores de PHAs	44
4.3.4. Cultivo das linhagens LMI MA03, MA09, MA13 e MA18 utilizando glicerol bruto proveniente de usina de biodiesel.....	46
4.3.5. Identificação das linhagens mais promissoras na produção de PHAs empregando técnicas moleculares	49
4.3.6. Caracterização das linhagens MA 03, MA 09, MA 13 e MA 18 por testes bioquímicos ...	52
5. PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE GLICEROL POR LINHAGENS DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL COMPLETO	57
5.1. Introdução	57
5.2. Materiais e Métodos.....	58
5.2.1. Meios de cultivo.....	58
5.2.1.1. Luria-Bertani	58
5.2.1.2. Meio Mineral.....	58
5.2.1.3. Esterilização	59

5.2.2. Micro-organismos	59
5.2.3. Cultivo de linhagens de <i>P. aeruginosa</i> utilizando planejamento experimental	60
5.2.3.1. Planejamento Fatorial Completo	60
5.2.3.2. Condições de cultivo das linhagens de <i>P.aeruginosa</i>	65
5.2.4. Determinação de Biomassa	66
5.2.5. Determinação de glicerol	66
5.2.6. Determinação de PHAs	66
5.2.7. Análise do PHA produzido por <i>P. aeruginosa</i> LMI 6c.....	67
5.2.7.1. Extração do polímero e fracionamento com acetona	67
5.2.7.2 Análise dos PHAs de <i>P.aeruginosa</i> LMI 6c através de cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	68
5.3. Resultados e Discussão	68
5.3.1. Cultivo de linhagens de <i>P. aeruginosa</i> utilizando planejamento experimental	68
5.3.1.1. Resultados do planejamento fatorial completo utilizando <i>P. aeruginosa</i> LMI 6c	69
5.3.1.2. Resultados do planejamento fatorial completo utilizando <i>P. aeruginosa</i> LMI 7a.....	75
5.3.1.3. Resultados do planejamento fatorial completo utilizando <i>P. aeruginosa</i> LMI L2-1	80
5.3.1.4. Resultados do planejamento fatorial completo utilizando <i>P. aeruginosa</i> LMI B1-3.....	84
5.3.1.5. Resultados do planejamento fatorial completo utilizando <i>P. aeruginosa</i> LBI.....	89
5.3.1.6. Discussão e considerações finais sobre os cultivos das linhagens de <i>P. aeruginosa</i> utilizando planejamento experimental.....	95
5.3.2. Análise dos PHAs de <i>P.aeruginosa</i> LMI 6c através de cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	98
6. PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR LINHAGENS DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> UTILIZANDO GLICEROL DE BIODIESEL E ÓLEO DE SOJA	100
6.1. Introdução	100
6.2. Materiais e Métodos.....	101
6.2.1. Meios de Cultivo	101
6.2.1.1. Luria-Bertani	101
6.2.1.2. Meio Mineral.....	101
6.2.1.3. Esterilização	102
6.2.2. Micro-organismos	102
6.2.3. Isolamento e seleção da linhagem LDM 03	102
6.2.4. Cultivo de linhagens de <i>P. aeruginosa</i> LMI 6c e LDM 03	103
6.2.5. Determinação de Biomassa	104
6.2.6. Determinação de glicerol e óleo de soja.....	104

6.2.7. Determinação de PHAs	105
6.2.8. Caracterização da linhagem isolada LDM 03	106
6.2.9. Identificação da linhagem LDM 03 empregando técnicas moleculares.....	106
6.2.9.1. Extração do DNA da linhagem LDM 03.....	106
6.2.9.2. Eletroforese em gel de agarose 1% com GelRed ou Brometo de Etídio.....	107
6.2.9.3. Quantificação de DNA por espectrofotometria (Nanodrop®)	108
6.2.9.4. Amplificação do gene 16S rDNA utilizando PCR.....	108
6.2.9.5. Purificação do produto da PCR.....	108
6.2.9.6. Reação de sequenciamento de DNA	109
6.2.9.7. Análise das sequencias obtidas.....	110
6.3. Resultados e Discussão	110
6.3.1. Isolamento e seleção da linhagem LDM 03	110
6.3.2. Caracterização e identificação da linhagem LDM 03	111
6.3.3. Cultivo da linhagem <i>P. aeruginosa</i> LMI 6c em meios contendo glicerol bruto e óleo de soja	112
6.3.4. Cultivos da linhagem LDM 03 em meios contendo glicerol bruto e óleo de soja.....	124
7. PRODUÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE GLICEROL DE BIODIESEL POR <i>CUPRIAVIDUS METALLIDURANS</i> E <i>BURKHOLDERIA MIMOSARUM</i> UTILIZANDO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL.....	132
7.1. Introdução	132
7.2. Materiais e Métodos	133
7.2.1. Meios de cultivo	133
7.2.1.1. Caldo e Ágar Nutriente	133
7.2.1.2. Meio Mineral.....	133
7.2.1.3. Esterilização	134
7.2.2. Micro-organismos	134
7.2.3. Cultivo de micro-organismos	134
7.2.3.1. Delineamento Composto Central Rotacional	134
7.2.3.2. Cultivo das linhagens <i>C. metallidurans</i> MA 09 e <i>B. mimosarum</i> MA 18.....	140
7.2.4. Determinação de Biomassa	141
7.2.5. Determinação de glicerol	141
7.2.6. Determinação de PHAs	142
7.2.7. Análise dos polímeros de <i>C. metallidurans</i> MA 09 e <i>B. mimosarum</i> MA 18 por cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho	143
7.3. Resultados e Discussão	144

7.3.1. Cultivo para verificar a cinética de produção de PHB pelas linhagens <i>C. metallidurans</i> MA 09 e <i>B. mimosarum</i> MA 18	144
7.3.2 Cultivo das linhagens <i>C. metallidurans</i> MA 09 e <i>B. mimosarum</i> MA 18 utilizando planejamento experimental	147
7.3.3. Análise dos polímeros de <i>C. metallidurans</i> MA 09 e <i>B. mimosarum</i> MA 18 por cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho	163
8. PRODUÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO E POLI-3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIHEXANOATO A PARTIR DE GLICEROL DE BIODIESEL COM ÁCIDOS PROPIONICO E HEXANÓICO POR <i>PANDORAEA SPUTORUM</i> E <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i>	164
8.1. Introdução	164
8.2. Materiais e Métodos	165
8.2.1. Meios de cultivo	165
8.2.1.1. Caldo e Ágar Nutriente	165
8.2.1.2. Meio Mineral.....	165
8.2.1.3. Esterilização	166
8.2.2. Micro-organismos	166
8.2.3. Cultivo de micro-organismos	166
8.2.3.1. Cultivos das linhagens <i>P. sputorum</i> MA 03 e <i>B. cepacia</i> MA 13 em glicerol bruto com ácidos propiônico e hexanóico	166
8.2.3.2. Cultivos de <i>P. sputorum</i> MA 03 e <i>B. cepacia</i> MA 13 em glicerol bruto e ácido propiônico utilizando planejamento experimental.....	167
8.2.4. Determinação de Biomassa	172
8.2.5. Determinação de glicerol e ácidos propiônico e hexanóico	173
8.2.6. Determinação de PHAs	173
8.2.7. Análise dos polímeros de <i>P. sputorum</i> MA 03 e <i>B. cepacia</i> MA 13 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa	175
8.3. Resultados e Discussão	175
8.3.1. Cultivos das linhagens <i>P. sputorum</i> MA 03 e <i>B. cepacia</i> MA 13 em glicerol bruto com ácidos propiônico e hexanóico	175
8.3.2. Cultivos de <i>P. sputorum</i> MA 03 e <i>B. cepacia</i> MA 13 em glicerol bruto e ácido propiônico utilizando planejamento experimental.....	180
8.3.3. Análise dos polímeros de <i>P. sputorum</i> MA 03 e <i>B. cepacia</i> MA 13 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa	198
9. CONCLUSÕES	205
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	208
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	209

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Ágar nutriente
AP	Ácido propiônico
CN	Caldo nutriente
GLY	Glicerol
HB	3-hidroxi butirato
HD	3-hidroxi decanoato
HDd	3-hidroxi dodecanoato
HHx	3-hidroxi hexanoato
HO	3-hidroxi octanoato
HV	3-hidroxi valerato
LB	Luria-Bertani
ld	Limite de detecção
<ld	valor menor que o limite de detecção
LMI	Laboratório de Microbiologia Industrial
MM	Meio mineral
MSC	Massa seca celular
nd	Não determinado
PHA	Polihidroxi alcanoato
PHA-lcl	Polihidroxi alcanoato de cadeia longa
PHA-mcl	Polihidroxi alcanoato de cadeia média
PHA-scl	Polihidroxi alcanoato de cadeia curta
PHB	Poli-3-hidroxi butirato
PHB-HHx	Poli-3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato
PHB-HV	Poli-3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato
PP	Polipropileno
TBE	Tris, Ácido bórico, EDTA
TE	Tris-HCl, EDTA
TNES	Tris, NaCl, EDTA e SDS
X_R	Biomassa residual
Y_{HHx/AH}	rendimento teórico de HHx a partir de ácido hexanóico (g/g)
Y_{HV/AP}	rendimento teórico de HV a partir de ácido propiônico (g/g)
Y^O_{HB/GLY}	rendimento global de PHB a partir de glicerol (g/g)
Y^T_{HB/GLY}	rendimento teórico de PHB a partir de glicerol (g/g)

1. INTRODUÇÃO

O tema principal deste trabalho, fundamentado na busca sistemática por micro-organismos com potencial biotecnológico para a produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de glicerol, insere-se no contexto dos combustíveis e plásticos, tradicionalmente utilizados, direcionando a atenção para sua origem comum: o petróleo.

A história do petróleo tem origem em 4.000 a.C., entre os povos da Mesopotâmia, Egito, Pérsia e Judéia; onde já era utilizado no aquecimento e iluminação de casas, além da pavimentação de estradas e calafetagem de grandes construções (SHAH, 2007). Porém, somente a partir da década de 50, com a disseminação dos motores a óleo diesel, o petróleo passou a assumir um papel de destaque na economia mundial e os estilos de vida, presentes nas diversas sociedades, tornaram-se cada vez mais dependentes da utilização desta fonte mineral para a geração de combustíveis e matéria-prima para produtos industrializados (HANSEN, ZHANG & LYNE, 2005).

Ao lado do desenvolvimento econômico apresentado pela indústria petroquímica, novas tecnologias surgiram em ciências de materiais, possibilitando a criação de polímeros derivados do petróleo com propriedades físico-químicas diferenciadas, além de maior integridade mecânica e durabilidade. O notável aumento da versatilidade dos polímeros obtidos despertou o interesse de diversos setores de mercado, especialmente a indústria médica e alimentícia, resultando em um aumento na produção mundial de plásticos de 1,5 milhões de toneladas, em 1950, para 245 milhões de toneladas no ano de 2008 (CHANPRATEEP, 2010).

Atualmente, o estabelecimento de uma sociedade caracterizada pelo alto consumo de plásticos passou a ser um sério problema para a administração pública, frente à alta incidência de descarte inapropriado destes produtos, pois os mesmos não são biodegradáveis e acabam por ser extremamente persistentes no ambiente, acumulando-se nos ecossistemas (CHANPRATEEP, 2010). Além do impacto ambiental gerado pela utilização destes produtos, tem-se verificado um aumento gradativo sobre o preço do petróleo e seus derivados. Estimativas apontam um declínio significativo na produção deste combustível fóssil a partir de 2010 até sua total escassez em 2050, tornando-se necessário o estabelecimento de fontes de energia alternativas e ecologicamente viáveis, em substituição aos produtos derivados do petróleo (SILVA, MACK & CONTIERO, 2009). Dessa forma, a produção de polímeros biodegradáveis a partir de fontes renováveis tornou-se atrativo industrialmente.

Entre os biopolímeros provenientes do cultivo microbiano, os polihidroxialcanoatos (PHAs) têm recebido considerável atenção devido ao seu alto potencial de biodegradação

(MARANGONI, 2000). As aplicações dos PHAs estão diretamente relacionadas às propriedades destes polímeros, sendo termoplásticos e/ou elastômeros, insolúveis em água, não apresentam toxicidade e são biocompatíveis; características que os tornam atraentes para a indústria, sendo utilizados na elaboração de produtos de higiene e embalagens, além de aplicações no setor médico e farmacêutico, particularmente na produção de cápsulas de medicamentos e drogas agrícolas, também sendo utilizados na obtenção de próteses e enxertos de tecidos humanos e na medicina veterinária. O poli-3-hidroxi-butirato (PHB) possui características similares ao polipropileno (PP), de origem petroquímica, com ambos apresentando um alto grau de cristalinidade e temperaturas de fusão muito próximas. Essas características podem ser alteradas com a adição de outros PHAs, como o 3-hidroxi-valerato (HV), formando um copolímero com propriedades termomecânicas diferenciadas. No entanto, mesmo diante de várias características interessantes para a indústria, a ampla introdução destes biopolímeros no mercado ainda torna-se inviável, devido aos elevados custos envolvidos no seu processo de produção (ASHBY, SOLAIMAN & FOGLIA, 2005). Até 2006, as médias de preços observadas na comercialização de PHB e alguns copolímeros, como o PHB-HV, ainda eram muito superiores a outros biopolímeros, devido aos custos referentes à matéria-prima para os cultivos, além da extração e processamento destes polímeros. A partir de 2010, através do desenvolvimento de novas tecnologias e recentes investimentos na produção de PHAs, preços menores foram observados no mercado, como por exemplo, o PHB produzido pela empresa norte-americana Telles, com a marca MirelTM, obtido a partir de xarope de açúcares provenientes do milho, com cotações próximas de US\$ 2 / kg. No entanto, estes avanços ainda se distanciam dos preços de mercado dos polímeros de origem petroquímica, como o polipropileno, cujas cotações atingem no máximo US\$ 0,7 /Kg. Os custos destinados à compra de matéria-prima para os cultivos de produção de PHB podem chegar a 40% da demanda total (CHANPRATEEP, 2010). Portanto, a utilização de fontes de carbono e outros nutrientes de baixos valores de mercado, assim como o emprego de subprodutos industriais como insumos de cultivo, tornam-se uma boa alternativa na minimização dos custos de produção de PHAs. Outra solução viável seria vincular o processo de obtenção destes biopolímeros à cadeia de produção de outros produtos provenientes de fontes renováveis, principalmente os biocombustíveis, podendo através da utilização de seus subprodutos gerar uma linha de produção de combustíveis e polímeros biodegradáveis, independentes daqueles derivados do petróleo, e ao mesmo tempo, agregar valores a ambos os produtos, viabilizando seus processos de produção.

Atualmente, as tecnologias mais difundidas e comumente aplicadas na obtenção de combustíveis a partir de fontes renováveis são a produção de etanol, através da fermentação de açúcares provenientes da cana-de-açúcar, milho e beterraba; e a produção de biodiesel, obtida através da transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com álcool para a produção de ésteres (YAZDANI & GONZALEZ, 2007). Entre os biocombustíveis, o biodiesel tornou-se uma boa alternativa devido às suas propriedades similares ao óleo diesel (YUSTE & DORADO, 2006), podendo ser utilizado em misturas com este combustível ou substituindo-o totalmente sem a necessidade de ajustes nos motores, aumentando a vida útil destes por ser um bom lubrificante. O biodiesel ainda apresenta menores riscos de explosão e dessa forma, pode ser mais facilmente armazenado e transportado. Além disso, sua queima produz menos poluente e sua utilização contribui para a diminuição dos impactos ambientais (GAZZONI, 2007).

O estabelecimento do segmento de mercado do biodiesel e a crescente adoção deste combustível em programas de matrizes energéticas de diversos países resultaram na superprodução de seu subproduto: o glicerol, provocando um aumento do número de pesquisas em biotecnologia voltadas para o desenvolvimento de novas técnicas de conversão deste subproduto e aprimoramento daquelas já existentes. A produção de glicerol é equivalente a cerca de 10% do volume total de biodiesel produzido e a utilização deste subproduto tornou-se um desafio, pois o seu emprego na indústria de alimentos e cosméticos é inviável sem um pré-tratamento e posteriores processos de purificação. Dessa forma, torna-se necessário a descoberta de novos micro-organismos capazes de utilizar o glicerol na obtenção de produtos de interesse econômico, além da elaboração e otimização de técnicas de cultivo empregadas na utilização deste composto. Entre os produtos obtidos a partir do glicerol bruto, pode-se destacar o 1,3-propanodiol, 1,2-propanodiol, dihidroxiacetonas, poliglicerois, ácido succínico e, recentemente, biopolímeros (PACHAURI & HE, 2006).

Com a finalidade de agregar valores à cadeia de produção do biodiesel, direcionado às técnicas de conversão do subproduto glicerol, este projeto tem o objetivo de isolar micro-organismos do ambiente que possuam a capacidade de utilizar esta fonte de carbono na obtenção de PHAs, assim como, observar o desempenho de micro-organismos com potencial de produção destes biopolímeros, utilizando o glicerol em meios de cultivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) representam uma classe de poliésteres produzidos através de cultivo bacteriano, sendo sintetizados e acumulados como reserva de carbono por estes micro-organismos. Os PHAs são tipicamente obtidos como um polímero de 10^3 a 10^4 monômeros, podendo ser acumulados por bactérias gram-positivas e negativas na forma de inclusões citoplasmáticas com 0,2-0,5 μ m de diâmetro (ANDERSON & DAWES, 1990; STEINBÜCHEL, 1991; STEINBÜCHEL & FÜCHTENBUSCH, 1998). Entre os polímeros de origem microbiana, os PHAs e seus derivados têm sido amplamente difundidos e produzidos para uma diversidade de aplicações (MADISON & HUISMAN, 1999; WITHOLT & KESSLER, 2002; KIM & LENZ, 2001, SURIYAMONGKOL et al., 2007), chamando a atenção por sua biocompatibilidade e seu alto potencial de biodegradação, podendo sofrer ação enzimática de uma grande variedade de bactérias, fungos e algas. O tempo de degradação depende da composição do material e do tipo de ambiente, podendo variar em semanas e até ultrapassar um ano (HAMMOND & LIGGAT, 1995).

A estrutura, propriedades físico-químicas, composição monomérica, o número e tamanho dos grânulos de PHAs são variáveis e dependem do micro-organismo produtor (ANDERSON & DAWES, 1990; HÁ & CHO, 2002). Estes polímeros são semicristalinos e dependendo de sua composição podem apresentar temperaturas de fusão variando entre 120 e 180 °C. Os PHAs são compostos de monômeros de ácidos hidroxialcanóicos e/ou hidroxialcenóicos, formando poliésteres de cadeia alifática (Figuras 1.1), apresentando uma grande variedade estrutural. Através do tipo de micro-organismo ou substrato utilizado durante o crescimento, o radical "R" pode variar de um simples metil a estruturas funcionais contendo ligações insaturadas, duplas ou triplas, halogênios ou grupos benzil, cianida e epóxi. A estrutura e a composição dos monômeros influenciam diretamente nas propriedades físicas destes polímeros. Os PHAs podem ser quebradiços, tais como o polihidroxibutirato (PHB) produzido por várias espécies de bactérias; flexíveis como o PHB-HV, o qual consiste de 3-hidroxibutirato (HB) e 3-hidroxivalerato (HV) e PHB-HHx, copoliésteres compostos por HB e 3-hidroxihexanoato (HHx). Também podem apresentar propriedades elásticas, quando constituídos dos monômeros 3-hidroxiocetanoato e 3-hidroxidecanoato (CHEN, 2003).

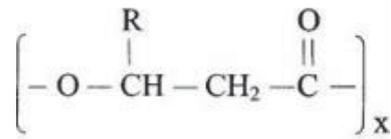


Figura 1.1- Fórmula química básica de uma molécula de PHA (CHEN, 2003).

Entre todos os PHAs caracterizados, os grupos alquil, os quais ocupam a configuração R no carbono C-3 da molécula de éster, variam de um carbono (C1) até mais que quatorze carbonos (C-14) por monômero (Figura 1.2). Os PHAs podem ser classificados em três maiores classes, através do número de átomos de carbono presentes em sua estrutura monomérica: PHAs de cadeia curta (scl-PHA), com seus monômeros constituídos por até 5 átomos de carbonos; PHAs de cadeia média (mcl-PHA), apresentando monômeros com 6 a 14 carbonos; e PHAs de cadeia longa (lcl-PHA), cujos monômeros contém mais de 14 átomos de carbono (SURIYAMONGKOL et al., 2007).

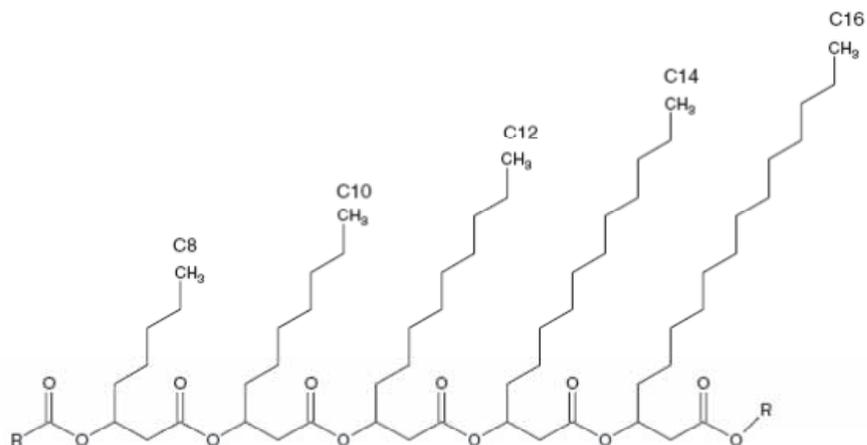


Figura 1.2- Representação geral de monômeros de uma molécula de PHA (COSTA et al., 2009).

Os micro-organismos capazes de acumular PHAs são geralmente bactérias gram-positivas e negativas, existindo mais de 75 gêneros diferentes (REDDY, GHAI & KALIA, 2003). De um modo geral, as bactérias produtoras de PHAs podem ser divididas em dois grupos de acordo com as características de acúmulo deste polímero. O primeiro grupo começa a produzir o PHA quando há um excesso de fonte de carbono e o crescimento celular é interrompido pela ausência de um nutriente essencial, como o N, P, Mg, K ou S. O segundo grupo produz quantidades de PHA associado ao crescimento celular. A bactéria *Cupriavidus necator* (classificada anteriormente como *Alcaligenes eutrophus*, após *Ralstonia eutropha*, e por último como *Wautersia eutropha*) (VANDAMME & COENYE, 2004), uma conhecida produtora de PHAs, pertence ao primeiro grupo, enquanto *Alcaligenes latus*, *Azotobacter beijerinckii* e *E. coli* recombinante pertencem ao segundo. Portanto, o desenvolvimento de estratégias de cultivo para cada tipo de micro-organismo torna-se fundamental. As bactérias produtoras de PHA em condições limitantes de nutrientes apresentam melhores produções em sistemas de batelada dividida em duas etapas, enquanto os micro-organismos produtores associados ao crescimento demonstram melhores resultados em sistemas de alimentação contínua (LEE, 1996).

Entre uma grande variedade de bactérias produtoras de PHAs, o PHB é o mais comumente encontrado entre diversas espécies. Embora outros tipos de PHAs sejam encontrados, o PHB, PHB-HV e o PHB-HHx são os mais produzidos industrialmente e explorados em escala comercial. A produção industrial de PHAs exige linhagens de micro-organismos com o máximo de características associadas à otimização da produção, tais como, rápido crescimento em fontes de carbono de baixo custo, alta porcentagem de acúmulo de PHA, uma alta eficiência de transformação do substrato em produto, produção de um polímero facilmente extraído das células bacterianas e bem adaptado às técnicas de separação, além de apresentar-se inofensivo a seres humanos, animais e ao ambiente. Ainda, uma linhagem bacteriana ideal para a produção de PHAs deve apresentar baixa demanda de oxigênio, observando-se um crescimento com alta densidade de células e baixa limitação por oxigênio, produzindo polímeros de alto peso molecular. Devido à grande dificuldade de isolamento de uma linhagem bacteriana adaptada às condições ideais, a produção industrial deste biopolímero se concentra na obtenção de PHAs a partir de *Alcaligenes latus* e *Cupriavidus necator* (CHEN, 2003).

Vários pesquisadores vêm realizando estudos na produção de PHAs por bactérias do gênero *Pseudomonas*, os quais se têm intensificado ao longo dos anos. Haywood et al. (1988) (*apud* ANDERSON e DAWES, 1990) examinaram várias espécies de *Pseudomonas*. O

acúmulo de polímero foi demonstrado em *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. testosteroni* em uma extensa variedade de substratos. Lageveen et al. (1988) observaram a presença de grânulos intracelulares em *P. oleovorans*. Subseqüentemente, descobriu-se que, ao alimentar *P. oleovorans* com n-octano, havia a produção de um polímero contendo 3-hidroxiocetanoato e 3-hidroxihexanoato em maior e menor quantidade, respectivamente. Recentemente, um pequeno grupo de bactérias, principalmente espécies de *Pseudomonas*, tem despertado interesse na produção de PHA-mcl a partir de ácidos graxos e outras fontes de carbono pouco convencionais (KROUMOVA, WAGNER & DAVIES, 2002). Guo-Qiang et al. (2001) avaliaram a síntese de uma variedade de PHAs-mcl obtidas por *P. stutzeri* 1317, utilizando glicose e/ou ácidos graxos como fonte de carbono. A partir do desenvolvimento dos estudos genéticos referentes à síntese de PHA-mcl, tem-se isolado genes de *P. aeruginosa* e *P. oleovorans*, na tentativa de compreender a dinâmica do metabolismo de ácidos graxos nestas bactérias, visando estabelecer uma relação com a produção de PHAs (TIMM & STEINBÜCHEL, 1992).

2.2. A síntese de PHAs em micro-organismos

Várias espécies de bactérias são capazes de sintetizar PHAs e atualmente há mais de 300 espécies produtoras (ANDERSON & DAWES, 1990; STEINBÜCHEL & VALENTIN, 1995; BRAUNNEG et al., 1998; MADISON & HUISMAN, 1999; ZINN et al., 2001; CIESIELSKI et al., 2006; BERLANGA et al., 2006; SURIYAMONGKOL et al., 2007). Há uma grande diversidade de PHAs, sendo a síntese de PHB mais conhecida e comum entre os micro-organismos produtores. A síntese de PHB pode ser dividida em 3 etapas, envolvendo a ação de 3 tipos de enzimas com seus respectivos genes codificadores. Na primeira etapa, o gene *phaA* codifica a β -cetotiolase, a primeira enzima responsável pela condensação de 2 moléculas de acetil-CoA para formar uma molécula de acetoacetil-CoA. A próxima etapa baseia-se na redução de acetoacetil-CoA para (R)-3-hidroxiacetil-CoA, a qual é catalisada pela enzima Acetoacetil-CoA redutase, codificada pelo gene *phaB*, a qual é NADPH dependente. A terceira e última reação, consiste na polimerização de (R)-3-hidroxiacetil-CoA realizada pela PHA sintase, codificada pelo gene *phaC* (REDDY et al., 2003; REHM, 2003). A PHA sintase de *Cupriavidus necator*, anteriormente conhecida como *Ralstonia eutropha*, é capaz de reagir com uma variedade limitada de substratos, com cadeias contendo 3 (C3) a 5 (C5) carbonos. Porém, substratos com 4 carbonos são preferidos, obtendo-se através desta via metabólica monômeros de HB (STEINBÜCHEL & SCHLEGEL, 1991).

Outros tipos de PHAs têm sido obtidos, com monômeros diferentes de C3-C5, por uma variedade de bactérias, incluindo *Cupriavidus necator*, através da alteração das fontes de carbono no meio de cultivo. A adição de ácido propiônico ou valérico em meios com glicose, leva à produção de um copolímero composto de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV) (PHB-HV). Nesta via metabólica, a condensação de propionil-CoA com acetil-CoA é mediado por uma 3-cetotiolase. A redução de 3-cetovaleril-CoA para (R)-3-hidroxivaleril-CoA e sua subsequente polimerização a PHB-HV é catalisado pelas mesmas enzimas envolvidas na síntese de PHB, acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase, respectivamente. No entanto, outras vias metabólicas podem estar envolvidas na produção de PHAs. Podem ser obtidos monômeros de cadeia média através da conversão de intermediários do metabolismo de ácidos graxos a (R)-3-hidroxiacil-CoA. Nos casos, onde a fonte de carbono é oxidada a acetil-Coa, excluindo a β -oxidação de ácidos graxos, intermediários da síntese “*de novo*” são dirigidos a biosíntese de PHAs, catalisada pela *PhaG* transacilase. Se a fonte de carbono é oxidada através da β -oxidação de ácidos graxos, então uma enoil-CoA hidratase (*PhaJ*) específica catalisa a reação de oxidação de enoil-CoA a (R)-3-hidroxiacil-CoA, e deste, para PHA, através da ação da PHA sintase (REHM, 2006).

PHA sintases isoladas de diferentes bactérias são capazes de polimerizar uma grande variedade de hidroxiacil-CoA tio-ésteres como substrato, sendo classificadas dentro de 4 grupos de acordo com o número de subunidades e especificidade pelo substrato. Na classe I são encontradas PHA sintases, cuja estrutura consiste em um único polipeptídeo, com especificidade por substratos de cadeia curta, formando PHA-scls, sendo encontrada em *Cupriavidus necator*. As PHA sintases de classe II também apresentam uma unidade, formada por um polipeptídeo. Porém, apresentam especificidade para a polimerização de monômeros de cadeia média, formando PHA mcls. O gênero *Pseudomonas* apresenta este tipo de PHA sintase. Já aquelas pertencentes à classe III, são formadas por duas subunidades (com aproximadamente 40 KDa cada), incorporando monômeros de cadeia curta, como em *Allochromatium vinosum*. Por último, as PHA sintases de classe IV, presentes em *Bacillus megaterium*, a qual é formada por duas subunidades. Porém, ambas se divergem, sendo uma delas menor (*PhaR*) e apresentando especificidade para a formação de PHA-scls (REHM & STEINBÜCHEL, 2002).

2.3. Histórico da produção de PHAs e perspectivas de mercado

Há relatos sobre a observação de grânulos brilhantes de PHAs em células bacterianas por Beijerinck, desde 1888 (*apud* CHOWDHURY, 1963). Porém a composição destes biopolímeros foi obtida pela primeira vez em 1923, por Maurice Lemoigne, através de *Bacillus megaterium*, sendo o primeiro composto determinado o ácido 3-hidroxi-3-butírico (P3HB). Em 1958, Macre e Wilkinson verificaram o armazenamento de um homopolímero de *B. megaterium*, principalmente quando se elevavam as proporções de glicose e nitrogênio do meio de cultivo, concluindo ser uma fonte de reserva de carbono e energia.

A partir da década de 60, com a descoberta das propriedades termoplásticas do PHB, aumentou o interesse por este polímero biodegradável, levando a empresa W.R. Grace Co. produzi-lo comercialmente. No entanto, esta companhia encerrou sua linha de produção devido à baixa eficiência no processo de obtenção deste polímero, o qual apresentava baixa produtividade e uma série de etapas de purificação até o produto final. Posteriormente, outros tipos de PHAs foram descobertos e em 1976, a empresa inglesa Imperial Chemical Industrie começou a desenvolver pesquisas sobre a produção e aplicação do PHB, produzindo um polímero com o nome comercial Biopol® (SURIYAMONGKOL et al., 2007). Após 20 anos, a Monsanto adquiriu o processo de produção deste copolímero, sendo vendido novamente, em 2001, à empresa Metabolix Inc., a qual reiniciou a produção de poli-3-hidroxi-3-butirato-co-hidroxi-3-valerato (P3HB-co-HV). Em 2008, a Metabolix Inc. passou a produzir PHAs a partir de gramíneas, reaproveitando a biomassa residual para a produção de energia e por fim, unindo-se em 2010 à empresa Daniels Midland Company, gerando a Telles Company., a maior produtora de PHAs da atualidade. Ainda, outras empresas estão envolvidas na produção destes biopolímeros, como a associação entre Procter & Gamble, Kaneka Corporation, Universidade de Tsingta na China e o Instituto Riken do Japão, desenvolvendo polímeros de PHB e PHB-HHx criando a marca NodaxTM, a qual foi vendida em 1993. Recentemente, a Kaneka Corporation retomou a produção de polímeros sob a marca Kaneka PHB-HHx em 2010, com uma capacidade instalada de 1.000 ton/ano na cidade de Takasago. Também no Japão, a Mitsubishi Gas Chemical tem alcançado progressos na produção de PHB a partir de metanol (BioGreenTM). A Biomer Inc., uma companhia Alemã, tem produzido PHB em escala comercial desde 1995. No Canadá, a Biomatera Inc. especializou-se na produção de PHAs a partir de resíduos agroindustriais, com aplicações destes polímeros na fabricação de cápsulas de medicamentos e cosméticos de liberação lenta, além de ser utilizados em matrizes de regeneração de tecidos (CHANPRATEEP, 2010).

No Brasil em 1991, foram iniciadas as pesquisas para produção de PHB, sendo estabelecido em 1992 um projeto de cooperação técnica a fim de desenvolver pesquisas para produção de PHB entre a Cooperativa de produtores de cana-de-açúcar e álcool do estado de São Paulo e o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), juntamente com o Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Em 2000, a indústria brasileira PHB Industrial S.A. começou a produzir PHB em escala piloto, sob o nome de Biocycle®.

Atualmente, os biopolímeros mais promissores são os polímeros de ácido láctico (PLA) e os PHAs. O PLA tem sido considerado a alternativa economicamente mais viável na produção de polímeros de origem bacteriana, enquanto os PHAs ainda têm como desafio a redução de seus preços de mercado para serem competitivos ao lado de polímeros derivados do petróleo. À medida que novos processos de produção são desenvolvidos ou aperfeiçoados, nota-se uma redução significativa nos preços de biopolímeros, enquanto estimativas esperam um aumento das cotações dos plásticos provenientes de petróleo de 50% a 80% para o ano de 2012. Isto torna-se um incentivo para futuros investimentos na produção destes biopolímeros em larga escala. A maioria das empresas produtoras de polímeros biodegradáveis não ultrapassa a faixa de 1.000 a 20.000 toneladas por ano, enquanto os produtores de plásticos de origem petroquímica atingem uma média anual de 300.000 toneladas apenas na produção de polietileno. Em 2003, o PLA começou a ser produzido em larga escala pela Nature Works LLC (Blair, Nebraska) nos Estados Unidos, com a fabricação da resina de polilactato Ingeo™, atingindo produções de 140.000 toneladas ao ano. Entre os produtores de PHAs, a empresa Telles destaca-se pela utilização de xaropes de açúcares do milho na obtenção de resinas de PHA, comercializada sob a marca Mirel™, atingindo produções de 50.000 ton/ano (CHANPRATEEP, 2010).

2.4. Glicerol

O glicerol, ou 1,2,3-propanotriol, também comercialmente chamado de glicerina, é um álcool incolor, inodoro e com sabor adocicado. Apresenta pontos de fusão e ebulição de 17,8 e 290 °C, respectivamente. O glicerol está presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal em sua forma combinada, ou seja, ligado a ácidos graxos tais como o ácido estereático, oleico, palmítico e láurico para formar a molécula de triacilglicerol.

2.5. A produção de biodiesel e a obtenção de glicerol

Os maiores componentes dos óleos vegetais e gordura animal são os triacilgliceróis (TAG), sendo quimicamente ésteres de ácidos graxos (AG), os quais são variáveis em sua estrutura, ligados à cadeia do glicerol (1,2,3-propanotriol). Os diferentes AG contidos no TAG acabam por revelar a composição dos óleos vegetais e gorduras animais.

Na produção do biodiesel os óleos vegetais e gorduras animais são submetidos a uma reação de transesterificação, a qual na presença de um catalisador (normalmente uma base) com um álcool (usualmente metanol) produz alquil ésteres. No caso do metanol, seriam metil-ésteres. O biodiesel pode ser obtido de uma variedade de matérias-primas, as quais, na maioria das vezes, são óleos vegetais, como óleos de soja, algodão, palma, amendoim, canola, girassol, açafrão ou coco. Também sendo produzido a partir de gordura animal, geralmente sebo bovino, ou até mesmo, proveniente de óleos de descarte, como óleos de fritura (KNOTHE, 2006).

A produção de biodiesel iniciou-se nos anos 90 na Europa, onde se encontra o maior mercado produtor e consumidor deste produto. A União Européia produz anualmente mais de 1,35 milhões de toneladas de biodiesel, correspondendo a 90% da produção mundial. A Alemanha é responsável por 42% de toda a produção do biodiesel europeu, o qual tem sido utilizado como combustível de veículos de passeio, transportes públicos e para a geração de energia elétrica. No Brasil, a lei 11.097 de 13 de Janeiro de 2005, introduz o biodiesel na matriz energética brasileira e torna obrigatório, a partir de 2008, a utilização de um percentual intermediário de 2% (B2) adicionado ao óleo diesel comercializado, sendo a partir de 2013, fixado um percentual mínimo obrigatório de 5% (B5) em todo o território nacional. Tal medida do governo federal provocou um elevado investimento voltado para o aumento da capacidade instalada de refinarias no objetivo de suprir a demanda do biocombustível esperada na adoção do B2 e B5 (GAZZONI, 2007). O resultado do elevado potencial de produção instalado levou o governo federal, juntamente ao Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), antecipar para Janeiro de 2010 a adoção do B5. Atualmente, segundo dados da ANP, o Brasil possui 64 refinarias em operação, sendo várias em processos de ampliação e instalação. Para a produção do B5 são produzidos 2,4 bilhões de litros de biodiesel, porém, a capacidade total instalada é de 4,6 bilhões litros/ano, o suficiente para a adoção do B10 (FERRES, 2010).

O maior desafio na introdução do biodiesel em larga escala é a sua viabilidade econômica. O processo de transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal para a obtenção do biodiesel torna sua produção mais onerosa, comparada ao óleo diesel

comercializado. Dessa forma, é importante selecionar fontes de baixo custo para a obtenção deste produto (YUSTE & DORADO, 2006). O modelo de uma biorrefinaria economicamente viável para a produção de biodiesel também deve considerar a utilização dos subprodutos e rejeitos gerados durante o processo de obtenção deste combustível (KAMM & KAMM, 2007).

Entre os subprodutos obtidos durante a produção de biocombustíveis, o glicerol é produzido em altas quantidades, tanto no processo de obtenção do biodiesel (THOMPSON & HE, 2006) como na produção de etanol (ALDIGUIER et al., 2004). Durante o processo de transesterificação, para cada 100 kg de biodiesel produzido são obtidos 10 kg de glicerol. O crescimento acelerado das indústrias do biodiesel, com o conseqüente aumento gerado na produção de glicerol, resultou em uma queda vertiginosa nos preços deste produto, provocando a falência de importantes indústrias especializadas em sua produção e refino (YASDANI & GONZALEZ, 2007). Contudo, o aumento exponencial da oferta do glicerol, além do impacto comercial negativo gerado, ainda remete à preocupação com o descarte de seu excedente de mercado no ambiente. Portanto, para um aumento da viabilidade econômica na produção do biodiesel pelas refinarias, torna-se essencial o desenvolvimento de estratégias de conversões químicas e biológicas do glicerol em produtos de interesse de mercado, agregando maiores valores à produção do biodiesel e amenizando os custos no tratamento de efluentes (McCOY, 2006). Entre as possíveis transformações do glicerol em produtos de interesse econômico, a conversão biológica oferece vantagens em relação à catálise química, apresentando maior especificidade de ação na obtenção de produtos e condições mais amenas de pressão e temperatura durante os processos de bioconversão.

2.6. Produtos obtidos através da bioconversão do glicerol

Uma variedade de compostos químicos pode ser obtida através de cultivos microbianos utilizando o glicerol, entre eles pode-se encontrar o desenvolvimento de tecnologias para a produção de 1,3 propanodiol (DU et al., 2006), ácido propiônico (HIMMI et al., 2000; BARBIRATO, CHEDAILLE & BORIES, 1997), ácido succínico (LEE et al., 2001), ácido cítrico (PAPANIKOLAOU et al., 2002), etanol (ITO et al., 2005), pigmentos como a violaceína (PITLOVANCIV et al., 2006), biossurfactantes (OLIVEIRA et al., 2003; COSTA et al., 2009), diidroxiacetona (BAUER et al., 2005) e polihidroxialcanoatos (PHAs) (ASHBY, SOLAIMAN & FOGLIA, 2005; COSTA et al., 2009).

Koller et al. (2005) obtiveram polihidroxialcanoatos em biorreatores a partir de soro hidrolisado de leite e glicerol líquido utilizando um micro-organismo altamente osmofílico. Na ausência de precursores, observou-se a produção do copolímero PHB-HV em ambas as fontes de carbono. Nestes processos fermentativos, também foi substituída a fonte de nitrogênio por extrato de carne e farinha de osso, juntamente com a adição de glicerol como fonte de carbono, resultando na produção de PHAs. Ashby, Solaiman & Foglia (2005) também relataram produção de polihidroxialcanoatos utilizando *P. oleovorans* e *P. corrugata*, a partir do glicerol associado a outras fontes de carbono.

2.7. Planejamento experimental

Ao investigar o efeito provocado nas respostas dos experimentos por dois ou mais fatores de controle, sendo cada um deles com dois ou mais níveis de regulação, recomenda-se o uso de técnicas clássicas de planejamento, como técnicas de planejamento fatorial completo, fatorial fracionado ou experimentos com pontos centrais (JURAN et al., 1951).

Os processos experimentais, na maioria das vezes, apresentam vários fatores e níveis de controle, os quais influenciam as características do produto obtido, sendo comum a necessidade de estudar seus efeitos simultaneamente. Portanto, o número de testes requeridos para a experimentação tende a crescer à medida que a quantidade de fatores aumenta. Dessa forma, a maioria dos experimentos industriais acaba tornando-se inviável, devido aos custos e tempo de execução elevados. Antony et al. (1998) sugerem que a solução desses problemas pode ser alcançada com mais facilidade quando os experimentos são planejados e as respostas analisadas com métodos ou técnicas estatísticas.

O experimento planejado é um teste ou uma série de testes, nos quais se induzem mudanças deliberadas ou estímulos nas variáveis de entrada (inputs) do processo ou sistema, sendo possível observar e identificar os efeitos nas respostas ou nas variáveis de saída (outputs) (MONTGOMERY, 1991).

O planejamento fatorial é indicado na fase inicial do procedimento experimental, quando há necessidade de se definir os fatores mais importantes e estudar os efeitos sobre a variável resposta escolhida. Portanto, sendo um modelo de efeitos fixos, ou seja, com a análise dos efeitos provocados pelos fatores nos níveis analisados no planejamento (BUTTON, 2001).

O planejamento fatorial 2^k é definido por apresentar k fatores, cada qual com 2 níveis, sendo o processo experimental baseado na realização de testes com cada uma das

combinações da matriz experimental. Em seguida, determina e interpretam-se os efeitos principais e de interação dos fatores investigados, identificando as melhores condições experimentais do produto ou processo avaliado (JURAN et al., 1951). As principais vantagens desta técnica, através da análise dos experimentos, é poder indicar as principais tendências e determinar uma direção promissora para as subseqüentes experimentações, além de quantificar os erros experimentais (MONTGOMERY, 1991).

Ao realizar experimentos é comum verificar a necessidade de avaliar o efeito de um ou mais fatores de controle ao mesmo tempo, assim como, reduzir custos e o tempo requerido para realização dos ensaios. A aplicação de técnicas de planejamento fatorial fracionado mostra-se como uma solução para esse problema. No planejamento fatorial fracionado 2^{k-p} é possível analisar os efeitos sobre uma resposta, envolvendo k fatores com dois níveis cada, em 2^{k-p} combinações de testes, realizando apenas uma parte dos experimentos (metade quando $p=1$ e um quarto quando $p=2$), sem comprometer significativamente a precisão das conclusões na análise dos resultados. Além disso, pode-se obter a dispersão dos efeitos e uma maior projeção experimental, através de matrizes maiores construídas a partir de um subconjunto de fatores significativos. Outra vantagem é a possibilidade de efetuar-se uma corrida experimental seqüencial, com dois ou mais experimentos realizados em combinação (MONTGOMERY, 1991).

Em um procedimento de otimização experimental, o primeiro passo é identificar uma função matemática que modele a variação das respostas em função da variação dos fatores investigados. O conjunto de técnicas de planejamento e análise de experimentos usados na modelagem matemática de respostas é conhecido como metodologia de superfície de resposta. Geralmente, a primeira função utilizada para se aproximar de um conjunto de resultados são os polinômios de primeira ordem. Nesse caso, procura-se verificar se a variação da resposta em função dos fatores é bem modelada por uma superfície plana. A classe de planejamento utilizada para aproximação rápida da superfície de resposta é o experimento fatorial 2^k com pontos centrais, adicionados entre os níveis dos fatores de controle. Ao realizar a análise de variância pode ser verificado se o modelo de primeira ordem pode ser utilizado para ajustar a superfície de resposta. Porém, se o modelo não se ajustar, deve-se partir para a construção de um modelo de segunda ordem. Neste caso, a série de experimentos utilizados são os planejamentos rotáveis, sendo a variância da resposta estimada para um ponto calculado em função da distância do ponto ao centro e não em função da direção. A classe de planejamento rotável mais utilizada para ajustar o modelo de segunda ordem é o planejamento composto central. Este planejamento consiste de um planejamento 2^k fatorial ou fatorial fracionado 2^{k-p}

mais 2k pontos axiais e pontos centrais. O ponto axial no planejamento é utilizado para garantir que o experimento seja rotável, sendo possível estimar os coeficientes da superfície em todas as direções possíveis (MONTGOMERY, 1991).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar a produção de polihidroxicanoatos (PHAs) por micro-organismos utilizando glicerol como fonte de carbono.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar micro-organismos produtores de PHAs, provenientes do meio natural e de efluente da produção de biodiesel, que possuam a capacidade de utilizar o glicerol como única fonte de carbono.
- Caracterizar e identificar as linhagens bacterianas mais promissoras na produção de PHAs a partir de glicerol.
- Avaliar o potencial de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* na produção de PHAs utilizando o glicerol como fonte de carbono.
- Avaliar as linhagens bacterianas com maior potencial na produção de PHAs em cultivos contendo glicerol bruto de usina de biodiesel
- Otimizar as condições de cultivo de produção de PHAs a partir de glicerol bruto, nas linhagens mais promissoras.
- Análisar a composição dos PHAs obtidos nas linhagens com maior potencial de produção destes polímeros.

4. PRODUÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE GLICEROL DE BIODIESEL POR LINHAGENS BACTERIANAS ISOLADAS DE SOLO DE MATA ATLÂNTICA

4.1. Introdução

Atualmente, os biopolímeros vêm ganhando considerável atenção devido às vantagens oferecidas por suas propriedades físico-químicas em relação aos polímeros derivados do petróleo, como ausência de efeitos tóxicos em organismos, tornando-os bons candidatos para aplicações médicas e farmacêuticas, além de alta biodegradabilidade em diferentes ambientes (STEINBÜCHEL, 2005). Entre os polímeros de origem bacteriana, os polihidroxicanoatos (PHAs) têm sido amplamente estudados por apresentarem características similares aos plásticos convencionalmente comercializados (OJUMO, YU & SOLOMON, 2004). Embora, os PHAs sejam considerados bons substitutos destes polímeros, sua ampla aplicação ainda encontra limitações, devido ao seu alto custo de produção (CAVALHEIRO et al., 2009).

Uma faixa de 40-48% do custo total de produção de PHAs destinam-se à matéria-prima necessária para obtenção destes polímeros, das quais os custos com a fonte de carbono pode chegar a 80%. Dessa forma, é desejável o desenvolvimento de processos baseados na utilização de subprodutos industriais, ao invés de insumos de cultivos mais elaborados (CAVALHEIRO et al., 2009). Recentemente, o glicerol bruto, um subproduto obtido na produção de biodiesel, tem sido empregado em cultivos para obtenção de metabólitos de origem microbiana, entre eles a produção de PHAs (CHANPRATEEP, 2010).

Embora, mais de 300 espécies de micro-organismos sejam capazes de sintetizar PHAs, somente poucos, como *Cupriavidus necator*, produzem estes polímeros em larga escala (HAZER & STEINBÜCHEL, 2007). Portanto, é necessária a descoberta de novas linhagens bacterianas com potencial de produção destes biopolímeros. Este presente estudo teve o objetivo de isolar micro-organismos do solo de ecossistemas de Mata Atlântica (Floresta ombrófila densa e Mangue) capazes de produzir PHAs a partir de glicerol bruto, proveniente da indústria de biodiesel.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Meios de cultivo

Foram utilizados os meios de cultivo Caldo Nutriente (CN), Ágar Nutriente (AN) e Meio Mineral (MM).

4.2.1.1. Caldo e ágar nutriente

Extrato de carne.....	3,0 g/L
Peptona.....	5,0 g/L

Ágar Nutriente foi obtido com a adição de ágar 15-20 g/L.

4.2.1.2. Meio mineral

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

Na_2HPO_4	3,5 g/L
KH_2PO_4	1,5 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/L
Citrato férrico amoniacal.....	0,06 g/L
Solução de elementos traços.....	1 mL

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

Solução de elementos traços:

H_3BO_3	0,30 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,20 g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10 g/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03 g/L
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03 g/L
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/L

Ao Meio Mineral foram adicionadas diferentes concentrações de glicerol, como fonte de carbono, e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como fonte de nitrogênio, para a obtenção das melhores condições na produção de PHAs.

4.2.1.3. Esterilização

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

4.2.2. Micro-organismos

Foram utilizados micro-organismos isolados de ecossistemas de Mata Atlântica. Ainda foram utilizadas linhagens provenientes do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI) (IB-UNESP/Campus de Rio Claro-SP), uma cepa de *Escherichia coli* W3100 e linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, como controles negativo e positivo, respectivamente, nos testes de produção de PHAs. Todas as linhagens acima citadas foram mantidas em placas de Petri, ágar inclinado e preservadas em tubos criogênicos contendo glicerol a 20%, sob congelamento a -20°C e -80°C , sendo realizada a manutenção de viabilidade das culturas microbianas periodicamente. Além disso, as linhagens bacterianas mais promissoras foram preservadas através de liofilização, sendo estocadas em ampolas seladas a vácuo e mantidas em refrigerador ($5-10^\circ\text{C}$).

4.2.3. Isolamento de micro-organismos de Mata Atlântica

4.2.3.1. Amostragem

O isolamento de micro-organismos provenientes de ecossistemas de Mata Atlântica foi realizado a partir de amostras compostas provenientes de solos de Mangue ($23^\circ29'27.57''\text{S}$, $45^\circ09'55.99''\text{O}$) e Floresta Ombrófila Densa ($23^\circ34'58.53''\text{S}$, $45^\circ16'12.91''\text{O}$), coletadas no município de Ubatuba (SP).

4.2.3.2. Isolamento de micro-organismos a partir do solo de Mangue e Floresta Ombrófila

Realizou-se isolamento direto de micro-organismos a partir das amostras de solos coletadas. Para tal, transferiu-se assepticamente 10 g de solo para 100 mL de solução salina (NaCl 0,85%) em erlenmeyers de 250 mL, a qual foi submetida a 3 ciclos de banho de

ultrassom por 10 minutos e agitação a 150 rpm, durante 1 hora, a 30°C. Após, a solução mencionada permaneceu em repouso durante 30 minutos para a sedimentação do material particulado. A partir da solução obtida, foram realizadas diluições decimais em solução salina até o fator 10^{-6} . Alíquotas de 100 μL da solução e de suas diluições foram submetidas ao espalhamento em superfície em meio mineral sólido, contendo 20 g/L de glicerol e 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As placas foram incubadas a 30°C por até 10 dias. Os isolados foram transferidos para ágar nutriente, incubados por até 72 h a 30°C, sendo estriados até a obtenção de culturas puras (Figura 4.1).

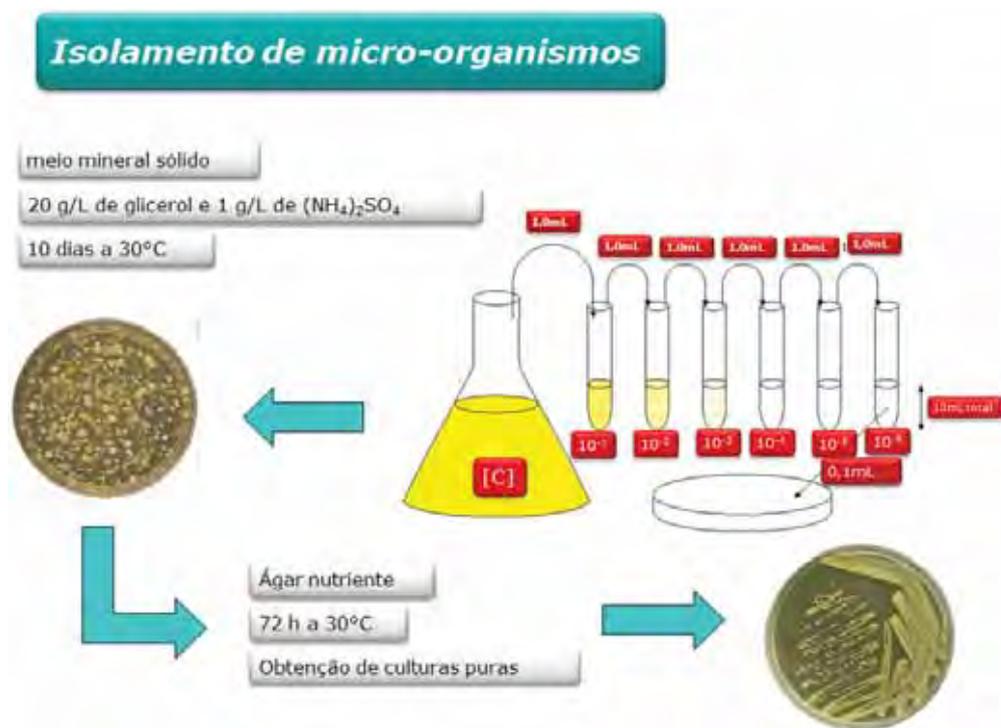


Figura 4.1-Técnica utilizada no isolamento de micro-organismos de solo de Mata Atlântica em meio mineral contendo glicerol.

4.2.4. Seleção de micro-organismos produtores de PHAs

A seleção de potenciais produtores de PHAs foi realizada transferindo os micro-organismos a serem avaliados para meio mineral, contendo 10 g/L de glicerol e 0,06 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sendo incubados durante 5 dias a 30°C. Após o período de incubação, as linhagens analisadas foram coradas com uma solução de Sudan Black B 0,02% em etanol 96%, durante 20 minutos, sendo descorados com etanol por 1 minuto. As colônias bacterianas com coloração azul escura foram consideradas produtoras de PHA (PHA+), enquanto as colônias levemente azuladas ou não coradas foram consideradas não produtoras deste polímero (PHA-) (SCHLEGEL, LAFFERTY & KRAUSS, 1970). Neste ensaio, foram utilizadas linhagens de *P. aeruginosa* como controle positivo e *E. coli* W3100 como controle negativo (Figura 4.2).

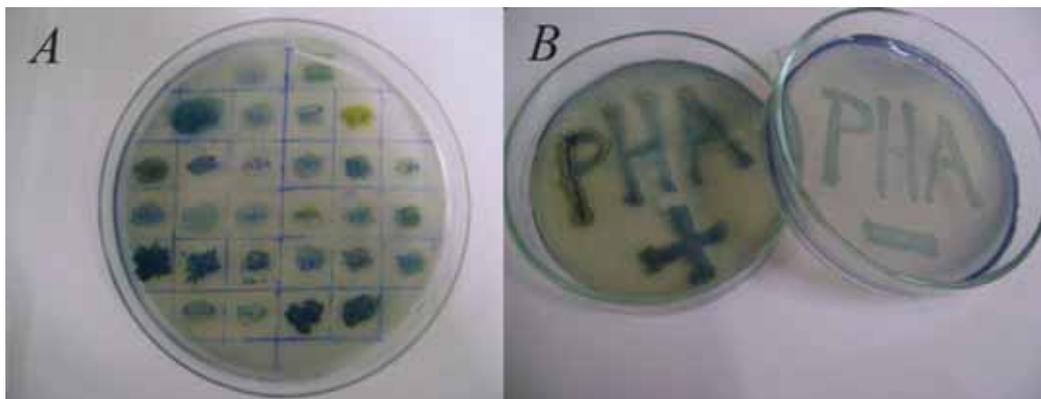


Figura 4.2-Colônias de micro-organismos em meio mineral, contendo glicerol, após a reação com o corante Sudan Black B. **(A)** Colônias de micro-organismos isolados a partir de solo de Mangue. **(B)** Micro-organismos utilizados como controles positivo (*P. aeruginosa*) e negativo (*E. coli* W3100).

4.2.5. Cultivo de micro-organismos

4.2.5.1. Cultivo dos micro-organismos isolados de ecossistemas de Mata Atlântica

Avaliou-se em cultivo 11 linhagens bacterianas isoladas do ambiente, consideradas produtoras de PHAs, sendo 6 isolados de solo de Mangue, 5 isolados de solo de Floresta Ombrófila Densa. Os isolados selecionados foram submetidos a cultivos em meio mineral em erlenmeyers de 250 mL para verificar o potencial de produção de PHAs. Cada uma das linhagens foi estriada em ágar nutriente e incubadas por 72 h. As colônias isoladas foram utilizadas para inocular 100 mL de caldo nutriente, sendo incubadas por 24 h a 150 rpm e 30°C. Transferiu-se 3 mL do cultivo em caldo nutriente para inocular 100 mL de meio mineral, contendo 20 g/L de glicerol e 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, conduzindo-se este experimento por 72 h, com 150 rpm de agitação, a 30°C. O meio caldo nutriente também foi empregado na manutenção e estoque das culturas. Utilizou-se HCl 2M / NaOH 2M para ajustar o pH inicial dos meios de cultivos para 7,0. Após os cultivos, duas amostras de 10 mL e 90 mL provenientes de cada erlenmeyer, foram centrifugadas a 9410 x g e 10600 x g por 10 minutos, respectivamente. A primeira amostra (10 mL) foi utilizada para a determinação de pH, consumo de glicerol e biomassa. As células da segunda amostra (90 mL) foram congeladas e liofilizadas para a determinação da quantidade e composição de PHAs.

4.2.5.2. Cultivo das linhagens bacterianas isoladas utilizando glicerol bruto proveniente de usina de biodiesel

As linhagens bacterianas isoladas do ambiente, com maiores produções de PHAs a partir de glicerol puro (glicerina bidestilada), foram avaliadas em cultivo contendo glicerol bruto, proveniente do processo de produção de biodiesel a partir de óleo de soja, fornecido pela Usina Candeias da Petrobrás (Candeias/BA). Para tal, as linhagens LMI MA 03, MA 09, MA 13 e MA 18 foram avaliadas em meio mineral contendo glicerol bruto, nas concentrações 10, 20, 30, 40 e 50 g/L e 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sendo os cultivos conduzidos e as amostras processadas segundo descrições do item 4.2.5.1 para a determinação de pH, biomassa, consumo de glicerol e produção de PHAs.

4.2.6. 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, provenientes dos cultivos, foram ressuspensos em água destilada e submetidos à secagem em estufa a 105°C durante 24 h. A biomassa residual (X_R) foi obtida através da diferença entre os valores de massa seca celular e polímero (g/L) obtidos nos cultivos realizados.

4.2.7. Determinação de glicerol

A determinação das concentrações de glicerol foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se o cromatógrafo Prominence UFLC (Shimadzu[®]), acoplado aos detectores ultravioleta (SPD-20A UV/Vis[®]) e índice de refração (RID-10A[®]), equipado com a coluna Rezex ROA (300 x 7,8 mm) (Phenomenex[®]). As condições empregadas na análise foram: volume de injeção: 20µL; temperatura da coluna (forno): 65°C; e eluente: H₂SO₄ 0,0025M a uma vazão de 0,6 mL/min. Além da análise por HPLC, o glicerol bruto proveniente de usina de biodiesel, ainda foi submetido a análise de hexano solúveis, para verificar a existência de substâncias apolares provenientes do processo de transesterificação, como óleo de soja residual, sendo estas determinadas gravimetricamente. Para tal, uma amostra de 10 mL foi acidificada com HCl 2M até pH 1,0; sendo conduzido a um processo de extração múltipla com 10 mL de hexano em funil de separação. As fases superiores, contendo hexano solúveis foram transferidas para frascos pré-tarados, sendo o hexano evaporado em banho termostaticado a 60°C, em capela. Após, os frascos foram transferidos para estufa a 100°C por 4 horas até peso constante. A quantidade de hexano solúveis foi calculada através da diferença de peso dos frascos verificada após o processo de extração. Da mesma forma, o consumo dos substratos utilizados nos meio de cultivo foi calculado através da diferença entre as concentrações iniciais e finais de glicerol, observadas nos meios de cultivos, para seus respectivos experimentos fermentativos.

4.2.8. Determinação de PHAs

A quantidade e composição de PHAs foram determinadas através de cromatografia gasosa de propil-ésteres (RIIS & MAI, 1988). Entre 10 e 15 mg de células liofilizadas foram submetidas a reação de propanólise em tubos, aos quais se adicionaram 2 mL de uma solução de HCl em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2 dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido

benzóico em propanol (40 g/L), como padrão interno. Os tubos foram fechados fortemente, sendo vedados com fita de PTFE, agitados e submetidos a 4 h de reação a 80°C, com agitação após os primeiros 40 minutos de propanólise. Ao final da reação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se 4 mL de água ultrapura aos mesmos, sendo agitados vigorosamente por 30 segundos. Após a separação das fases aquosa (superior) e orgânica (inferior), a primeira foi descartada, utilizando então a fase orgânica para a análise de propil-ésteres. Todas as amostras foram estocadas em vials com septo de PTFE, sendo conduzidas para serem analisadas no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, localizado no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP/ São Paulo-SP). 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 Agilent 7890A GC System®, equipado com a coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As temperaturas do injetor e detector (sistema de detecção por ionização de chama-FID) foram 250 e 300°C, respectivamente, utilizando-se hélio como gás de arraste a 0,8 mL/min. As análises foram conduzidas empregando-se um programa de temperaturas do forno com 100°C por 1 minuto, elevando-se a temperatura até 185°C a uma razão de 8°C/min e mantendo-se a 185°C por 15 minutos. Além dos padrões 3HB e 3HB-HV, polímeros produzidos por *Pseudomonas oleovorans* ou *Pseudomonas putida* a partir de diferentes fontes de carbono foram utilizados como padrões para a geração de curvas de calibração (3HHx, 3HHp, 3HO, 3HN, 3HD e 3HDd). O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes verificados nas amostras analisadas, sendo expresso em porcentagem da massa seca celular (PHA%) e em gramas de polímero por litro de cultivo (g/L).

4.2.9. Caracterização de micro-organismos

As linhagens isoladas com a capacidade de produção de PHAs foram caracterizadas através da coloração de Gram, morfologia celular e testes de catalase e oxidase. Tal caracterização teve a finalidade de identificar a biodiversidade entre os micro-organismos isolados, assim como, auxiliar uma posterior identificação dos isolados de interesse.

4.2.9.1. Coloração de Gram

A partir de esfregaços de células fixados pelo calor, adicionou-se uma solução de cristal violeta sobre a lâmina durante 1 minuto, cobrindo-a com uma solução de lugol por mais 1 minuto. Depois, lavou-se a lâmina com água destilada e em seguida com uma solução

álcool-acetona. Após lavar-se com água corrente, adicionou-se uma solução de safranina por 30 segundos. Por fim, retirou-se o excesso de corante com água, secou-se a lâmina com papel filtro e a mesma foi analisada ao microscópio óptico em óleo de imersão. Micro-organismos com coloração azulada foram considerados gram-positivos, enquanto aqueles com coloração avermelhada gram-negativos (PELCZAR, 1996).

4.2.9.2. Morfologia celular

As bactérias foram analisadas segundo a morfologia celular, quanto à forma e arranjo de colônias, além da presença de esporos, seguindo a nona edição do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994).

4.2.9.3. Teste de Catalase

Para a realização do teste de catalase, foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio sobre colônias isoladas após 24 h de incubação. As linhagens bacterianas que liberam bolhas são consideradas catalase positivas e as outras, cuja liberação não é evidenciada, catalase negativa (FADIN, 1976).

4.2.9.4. Teste de Oxidase

Realizou-se o teste de oxidase, o qual verifica a presença da enzima citocromo-oxidase, através da transferência de células em um palito estéril para uma tira de papel imersa no reagente tetrametil-p-fenilenodiamina. As linhagens oxidase positiva apresentam cor púrpura-azulada, enquanto linhagens oxidase negativa não se coram ou apresentam cor amarelada (FADIN, 1976).

4.2.9.5. Caracterização das linhagens MA 03, MA 09, MA 13, MA 18 a partir de testes bioquímicos

As linhagens isoladas de solo de Mata Atlântica MA 03, MA 09, MA 13 e MA18 foram submetidas a testes bioquímicos, visando uma melhor caracterização destes micro-organismos, considerados os mais promissores quanto à produção de PHAs. Para isto, utilizaram-se os kits API 20 NE e API 50 CH (Biomérieux®). O kit API 20 NE, geralmente utilizado para identificação de bacilos gram-negativos, era composto de 20 testes

bioquímicos, entre ensaios enzimáticos e de assimilação de carboidratos. O kit API 50 CH é composto por 50 testes de assimilação de carboidratos, sendo utilizado para obter uma caracterização mais completa das linhagens isoladas. As linhagens bacterianas foram cultivadas em ágar nutriente durante 18-24 h. Para o primeiro teste, transferiu-se colônias isoladas para 2 mL de uma solução salina (0,85%), até atingir uma turbidez equivalente a 0,5 na escala McFarland; enquanto para o segundo teste, obteve-se uma suspensão em 1mL de solução salina com uma turbidez de 0,2 McFarland. As suspensões bacterianas obtidas foram utilizadas para inoculação de tubos com meios seletivos e cúpulas presentes nas galerias dos respectivos testes, efetuando-se este procedimento para cada isolado.

4.2.10. Identificação das linhagens mais promissoras na produção de PHAs empregando técnicas moleculares

As linhagens bacterianas isoladas de Mata Atlântica LMI MA03, MA09, MA13 e MA18, as quais apresentaram as maiores produções de PHAs, foram identificadas por técnicas moleculares envolvendo a amplificação do gene 16S rDNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior análise de suas sequências (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

4.2.10.1. Extração do DNA das linhagens bacterianas LMI MA 03, MA 09, MA 13, MA18

As linhagens bacterianas foram estriadas de cultura estoque em ágar nutriente durante 72h, a 30°C. As colônias isoladas foram utilizadas para inocular 50 mL de caldo nutriente, sendo cada linhagem cultivada a 150rpm por 24h, a 30°C. Um volume de 2 mL de cada cultivo foi transferido para microtubos estéreis e centrifugados a 10000 x g durante 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e as células obtidas mantidas em gelo para o início do processo de extração do DNA.

Foram adicionados 50µL de TNES ao conteúdo celular bacteriano, macerando o mesmo. Após, adicionou-se mais 500µL da solução de TNES aos microtubos, agitando-os em vortex por 10 segundos. Para a remoção de proteínas associadas ao DNA, foram adicionados 5µL de proteinase K (20 mg/mL), incubando-se a reação em banho termostatizado a 55°C, durante 3h. Depois, um volume de 3µL de solução de RNase A (4 mg/mL) foi transferido ao conteúdo dos microtubos, sendo os mesmos agitados por inversão 25 vezes e conduzidos em banho a 37°C, por 30 minutos. Terminada a reação, adicionou-se 200µL de NaCl 5M para a

precipitação de proteínas, agitando-se novamente em vortex por 20 segundos e centrifugando o conteúdo a 15000 x g durante 6 minutos. Os sobrenadantes dos processos, nos quais se encontra o DNA, foram transferidos para novos microtubos, adicionando a estes 600 μ L de isopropanol, agitando-se por inversão e centrifugando a 15000 x g por 5 minutos, para a precipitação do DNA das amostras. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi conduzido em centrifuga a vácuo, por 10 minutos, para secagem, sendo o DNA reidratado com 30 μ L de TE e ressuspensionado em refrigerador durante 12h. Verificou-se a qualidade da extração em gel de agarose 1%, assim como foi efetuada a quantificação de DNA na extração, através de espectrofotometria (Nanodrop®) (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

4.2.10.2. Eletroforese em gel de agarose 1% com GelRed ou Brometo de Etídio

O gel de agarose foi preparado adicionando-se 100 mL de TBE 1X a 1g de agarose, sendo fundido em forno microondas e resfriado entre 55°C e 60°C, com inversão do conteúdo ao molde do gel a temperatura ambiente, por 30 a 45 minutos até a total gelificação. Transferiu-se o gel para a cuba de corrida, acrescentando tampão TBE 1X até cobertura do mesmo. Aplicou-se 2 μ L de marcador molecular 1 Kb DNA ladder (New England BioLabs®), previamente misturado ao tampão de amostra (0,75 μ L) e ao corante de ácidos nucleicos GelRed (0,75 μ L). Após, foram aplicadas as amostras de 2 μ L de DNA misturadas ao tampão de amostra (0,75 μ L) e ao GelRed (0,75 μ L). Foi aplicado ao gel uma tensão de 100V acompanhando-se a corrida, utilizando como referência os corantes presentes no tampão de amostra. O padrão de migração foi analisado por exposição do gel à luz ultravioleta. Nos géis com brometo de etídio, este foi adicionado à agarose fundida em TBE 1X abaixo de 50°C (0,5 μ g/mL). Neste caso, não se utilizou GelRed misturado ao marcador molecular e às amostras. Outro procedimento foi a imersão do gel após a corrida em uma solução de brometo de etídio (0,5 μ L/L) durante 15 minutos, descorando o gel em água destilada por 5 minutos para remoção do excesso de brometo de etídio, para após ser visualizado o padrão de migração em luz ultravioleta (Transiluminador) (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

4.2.10.3. Quantificação de DNA por espectrofotometria (Nanodrop®)

A pureza das amostras de DNA foi avaliada por espectrofotometria na região dos comprimentos de onda ultravioleta. Primeiramente, foram realizadas leituras das amostras a 280 nm (A_{280}) para verificar a presença de proteínas residuais nos processos de extração e purificação de DNA. As leituras realizadas a 260 nm (A_{260}) são específicas para ácidos nucleicos, assim pode-se estabelecer o cálculo da relação A_{260}/A_{280} para observar o grau de pureza do DNA analisado, esperando-se valores de 1,8-1,9. Estas análises foram efetuadas em Nanodrop 2000C (Thermo Scientific®). Dessa forma, 1 μ L de TE foi utilizado no pedestal para zerar o aparelho, sendo aplicadas 1 μ L das amostras sucessivamente, permitindo a realização das análises espectrofométricas e observação da relação A_{260}/A_{280} , para obter os valores de quantificação e pureza do DNA presente nas amostras avaliadas (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

4.2.10.4. Amplificação do gene 16S rDNA utilizando PCR

O gene 16S rDNA presente nas amostras de DNA, provenientes das linhagens bacterianas isoladas de solo de Mata Atlântica, foi amplificado por reação de PCR utilizando o kit Pure Taq Ready-To Go PCR Beads (GE Healthcare®).

Foram utilizados os “primers” 27FA/FC 5’ AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG e 1492RT/RC 5’ TACGGT/CTACCTTGTTACGACTT. Esses conjuntos de iniciadores permitem a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1500 pares de bases (bp) do gene 16S rDNA (numeração relativa a sequência do gene de *E. coli*). Para a reação de PCR, foram adicionados aos microtubos 2 μ L do kit, contendo a enzima Taq-polimerase (1 Bead); 1 μ L de cada “primer” (10pmol/ μ L); 0,2 μ L das amostras de DNA e 18,8 μ L de água ultrapura, totalizando 25 μ L de volume reacional.

A reação de PCR foi conduzida em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient®) nas seguintes condições de tempo e temperatura: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos, com desnaturação a 95°C por 1 minuto, pareamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos. Os produtos da PCR foram posteriormente analisados em gel de agarose 1% (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

4.2.10.5. Purificação dos produtos da PCR

Após a amplificação do gene 16S rDNA das linhagens bacterianas MA03, MA09, MA13 e MA18; os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA e Gel

Band Purification Kit (GE Healthcare®). Tal procedimento foi iniciado com a adição de 500µL de tampão de captura 3 aos produtos da PCR, agitando-se em vortex, e então, transferindo os conteúdos dos microtubos da PCR para colunas GFX MicroSpin, mantidas em tubos coletores, sendo estes centrifugados a 16000 x g por 30 segundos. Descartou-se o filtrado, esvaziando os tubos coletores, permanecendo apenas as colunas de purificação, as quais contêm sílica carregada positivamente, onde estaria retido o DNA da amostra. Transferiu-se novamente as colunas para os tubos coletores, adicionando 500µL de tampão de lavagem tipo 1, centrifugando estes a 16000 x g durante 30 segundos. Descartou-se novamente o filtrado, transferindo as colunas para microtubos de 1,5mL e adicionou-se a estas um volume de 30µL de tampão de eluição tipo 4, incubando-se por 1 minuto, sendo após centrifugadas a 16000 x g por 1 minuto para recuperar o DNA purificado. Os produtos da purificação da PCR foram armazenados em congelador a -20°C, sendo analisados posteriormente em gel de agarose 1% e quantificados em Nanodrop® (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

4.2.10.6. Reação de sequenciamento de DNA

Para a realização do seqüenciamento de DNA utilizou-se o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®).

O sistema de reação de sequenciamento foi constituído de 10 a 40 ng de DNA (1µL das amostras); 3,2 pmol dos “primers” 27FA/FC 5’ AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG e 1492RT/RC 5’ TACGGT/CTACCTTGTTACGACTT; 2,5µL de BigDye 3.1; 2,5µL de Save Money e água ultrapura, suficiente para completar 10µL de volume de reação.

A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient®) nas seguintes condições de tempo e temperatura: 1 ciclo a 96°C por 1 minuto; 25 ciclos, sendo 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A seguir, ao produto da reação foi adicionado 1µL de EDTA 125mM, para a redução da quantidade de terminadores não incorporados, os quais precipitam junto ao DNA e distorcem os dados do sequenciamento. Também, adicionou-se 1µL de acetato de sódio 3M e 60µL de etanol 100%, mantendo-se a temperatura ambiente por 15 minutos na ausência de luz. Após, os produtos foram centrifugados a 15000 x g por 25 minutos, com descarte do sobrenadante e adição de 170µL de etanol 70% para a lavagem do “pellet” obtido. Centrifugou-se novamente as amostras a 15000 x g durante 10 minutos, descartando-se novamente o sobrenadante. Os “pellets” obtidos, após secagem, foram ressuspensos em 10µL de formamida, sendo as

amostras aplicadas em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems®) (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

4.2.10.7. Análise das sequencias obtidas

O alinhamento das sequencias obtidas e a geração de sequencias consenso foram efetuadas através do software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.5.3. As sequencias consenso obtidas para cada linhagem foram comparadas com o banco de dados GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando a ferramenta BLASTn para a identificação das linhagens bacterianas. As sequencias de 16S rDNA que apresentaram similaridade igual ou superior a 95% foram agrupadas dentro da referida espécie. Os valores de similaridade para 16S rDNA utilizados em diferentes trabalhos variam de 80% a 98%, dependendo do objetivo, sendo o valor mínimo de similaridade de 95% para o gene 16S rDNA está de acordo com o valor mínimo de similaridade de 70% para comparação entre genomas completos (LUDWIG et al., 1998; LA SCOLA et al., 2003; SNELL-CASTRO et al., 2005)

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Isolamento de micro-organismos

O principal objetivo na técnica realizada para o isolamento de micro-organismos foi obter linhagens produtoras de PHAs capazes de utilizar o glicerol como única fonte de carbono. Inicialmente, incubou-se as amostras provenientes dos ambientes de isolamento em meio mineral com 20 g/L de glicerol e 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A escolha do meio mineral para o crescimento dos micro-organismos a serem isolados, justifica-se na tentativa de obter micro-organismos adaptados ao meio de produção de PHAs, pois em experimentos iniciais com alguns isolados pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI), verificou-se que uma parcela significativa destes micro-organismos não apresentava crescimento ou atingia valores de biomassa muito inferiores ao serem cultivados neste meio com glicerol. Além disso, o crescimento de micro-organismos com a capacidade de utilizar o glicerol como única fonte de carbono seria favorecido em meio mineral, pelo fato deste ser caracterizado pelo excesso de fonte de carbono e limitação em outros nutrientes, algo que não aconteceria em meios enriquecidos.

Os domínios morfoclimáticos de Mata Atlântica, Floresta Ombrófila Densa e Mangue, foram escolhidos com a finalidade de verificar seu potencial biotecnológico e diversidade

microbiana no isolamento de linhagens produtoras de PHAs utilizando o glicerol como fonte de carbono, pois são regiões ainda pouco estudadas nestes aspectos.

A partir da técnica utilizada para as amostras mencionadas, foram obtidos 107 micro-organismos, dos quais 76 isolados a partir de solo de Floresta Ombrófila Densa e 31 de solo de Mangue.

4.3.2. Seleção de micro-organismos isolados produtores de PHAs

Entre os 107 micro-organismos isolados de ecossistemas de Mata Atlântica, 11 isolados apresentaram reação positiva ao corante Sudan Black B, sendo considerados potenciais produtores de PHAs. A partir das 76 linhagens isoladas de solo de Floresta Ombrófila Densa (MA), foram obtidas 5 linhagens PHA+. Entre os 31 micro-organismos de solo de Mangue (MG), 6 isolados apresentaram potencial de produção de PHAs.

Bonatto et al. (2004) ao isolar 398 linhagens a partir de solo de Floresta Subtropical Úmida (Sul do Brasil), utilizando 9 tipos de meio de cultivo, obtiveram 38 linhagens produtoras de PHAs, ou seja, aproximadamente 9,55% das linhagens avaliadas apresentaram reação positiva. Lima et al. (1999) obtiveram 11 linhagens PHA+ (13,41%) de 82 isolados de solo de canavial em meio ágar nutriente (Nordeste do Brasil). Como pôde ser verificado a partir dos resultados obtidos neste trabalho, mesmo diante de condições específicas de isolamento, onde apenas um meio de cultivo e uma fonte de carbono foram utilizados, as médias de linhagens PHA+ de 6,58% para Floresta Ombrófila Densa e 19,35% para Mangue podem ser consideradas significativas diante dos valores apresentados.

4.3.3. Cultivo e caracterização dos micro-organismos isolados produtores de PHAs

Entre os micro-organismos isolados de solo de Floresta Ómbrófila Densa e Mangue, aqueles selecionados como potenciais produtores de PHAs, através da reação positiva ao corante Sudan Black B, foram cultivados em meio mineral durante 72 h a 30°C, segundo metodologia mencionada no item 4.2.5.1. Os valores observados no consumo de glicerol, massa seca celular, pH, acúmulo do polímero em percentual da MSC, assim como as produções de PHAs (g/L) encontram-se na Tabela 4.1. Foram avaliadas 11 linhagens de micro-organismos isolados, cujos perfis de cultivo apresentaram-se bastante diversificados. Os maiores valores de MSC foram observados para a linhagem MA 13 com 4,72 g/L; sendo verificados os menores valores para as linhagens MA 24 e MG 11 com 0,25 e 0,24 g/L, respectivamente. No caso do isolado MA 24, tal resultado pode ser atribuído a baixa viabilidade apresentada por esta linhagem bacteriana. Quanto ao isolado MG11, o qual

apresentou formas filamentosas em análises microscópicas de sua morfologia, foram observados uma baixa solubilidade deste micro-organismo e lento crescimento nos meios de cultivo utilizados. Devido a estes resultados, estas linhagens não foram avaliadas quanto à produção de polímero. O isolado MA 13 apresentou os maiores valores de acúmulo de polímero (41,86% da MSC) e a maior produção de PHAs com 1,97 g/L. Também foram verificadas produções de polímero significativas nas linhagens MA 03 (16,2% da MSC; 0,29 g/L), MA 09 (15,64% da MSC; 0,34 g/L) e MA 18 (9,32% da MSC; 0,17 g/L). Todos isolados apresentaram um polímero totalmente constituído do monômero HB, ou seja, produzindo polihidroxibutirato.

Com base nos resultados obtidos, os isolados de solo de Mata Atlântica MA 03, MA 09, MA 13 e MA 18 foram consideradas as linhagens mais promissoras na produção de PHAs (PHB), sendo selecionados para a realização de experimentos posteriores.

Tabela 4.1-Resultados de cultivos de micro-organismos isolados produtores de PHAs em meio mineral a 30°C, após 72 h.

Micro-organismo	Consumo de Glicerol (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (% MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
MA 03	4,63	6,37	1,8	16,2	0,291	1,51
MA 09	3,93	6,39	2,20	15,64	0,344	1,856
MA 13	5,97	6,44	4,72	41,86	1,975	2,75
MA 18	3,64	6,42	1,86	9,32	0,173	1,69
MA 24	1,22	6,92	0,25	nd	nd	nd
MG 06	3,18	6,67	1,28	0,53	0,007	1,27
MG 08	6,05	6,27	1,85	0,87	0,016	1,83
MG 11	0,92	6,95	0,24	nd	nd	nd
MG 12	2,46	6,74	0,88	< 1d	< 1d	0,88
MG 18	7,50	4,61	0,91	< 1d	< 1d	0,91
MG 20	6,24	6,37	1,65	< 1d	< 1d	1,65

Os micro-organismos isolados com a capacidade de produção de PHAs foram caracterizados através da coloração de Gram, morfologia celular e testes de catalase e oxidase. Tal caracterização teve o intuito de identificar a biodiversidade entre as linhagens selecionadas e dividi-las em grupos iniciais para auxiliar uma posterior identificação de isolados de interesse. Como pode ser observado na Tabela 4.2, a maioria das linhagens bacterianas caracterizadas são bastonetes gram-negativos, com exceção de MG 11 e MG 12, as quais apresentavam-se na forma de filamentos, com coloração gram-positiva.

Tabela 4.2-Caracterização de micro-organismos isolados produtores de PHAs a partir de glicerol.

Micro-organismo Isolado (Código LMI)	Coloração de Gram	Morfologia	Teste Bioquímico		Grupo
			Catalase	Oxidase	
MA 03	-	bastonete curto	+	+	III
MA 09	-	bastonete	+	+	III
MA 13	-	bastonete	+	-	IV
MA 18	-	bastonete curto	+	-	IV
MA 24	-	bastonete	+	-	IV
MG 06	-	bastonete	-	+	II
MG 08	-	bastonete curto	+	+	III
MG 11	+	filamentos (actinobacteria)	+	-	V
MG 12	+	filamentos (actinobacteria)	+	-	V
MG 18	-	bastonete curto	+	-	IV
MG 20	-	bastonete curto	-	-	I

4.3.4. Cultivo das linhagens LMI MA03, MA09, MA13 e MA18 utilizando glicerol bruto proveniente de usina de biodiesel

As linhagens bacterianas isoladas do ambiente, com maiores produções de PHAs a partir de glicerol puro (glicerina bidestilada), foram avaliadas em cultivo contendo glicerol bruto, proveniente do processo de transesterificação de óleo de soja para a produção de biodiesel, fornecido pela Usina Candeias da Petrobrás (Candeias/BA). Este subproduto foi analisado quanto a sua composição de glicerol, através de cromatografia líquida de alta

eficiência (HPLC), sendo também efetuada análise gravimétrica de substâncias hidrofóbicas que poderiam estar presentes neste insumo, após um processo de extração com hexano. Não foi observado valor significativo de hexano solúveis, sendo verificado neste insumo de cultivo uma concentração de 934 g/L de glicerol (74,05% v/v). As linhagens LMI MA03, MA09, MA13 e MA18 foram avaliadas quanto a produção de PHB em meio mineral contendo glicerol bruto, nas concentrações 10, 20, 30, 40 e 50 g/L, sendo os cultivos conduzidos nas condições especificadas no item 4.2.5.2. Os valores de consumo das fontes de carbono utilizadas, massa seca celular, pH, acúmulo do polímero em percentual da MSC e produção de PHB (g/L) podem ser observados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3-Resultados de cultivos de micro-organismos isolados produtores de PHAs em meio mineral contendo glicerol bruto a 30°C, após 72 h.

Micro-organismo	[] Glicerol Bruto inicial (g/L)	Consumo de Glicerol (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (% MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
MA03	10	6,52	6,02	2,12	9,09	0,192	1,93
MA03	20	7,30	6,07	2,13	10,65	0,227	1,90
MA03	30	8,86	5,88	2,25	12,43	0,280	1,97
MA03	40	6,12	6,06	2,15	8,78	0,189	1,96
MA03	50	4,32	6,04	1,97	8,21	0,162	1,81
MA09	10	7,77	6,25	2,50	37,05	0,926	1,57
MA09	20	8,06	6,45	3,20	42,83	1,370	1,83
MA09	30	9,30	6,39	3,80	44,41	1,688	2,11
MA09	40	11,14	6,29	4,00	41,40	1,656	2,34
MA09	50	8,48	6,35	3,50	37,86	1,325	2,18
MA13	10	9,50	6,31	3,90	43,39	1,692	2,21
MA13	20	11,72	6,46	4,60	48,57	2,234	2,37
MA13	30	13,48	6,41	4,20	40,17	1,687	2,51
MA13	40	15,68	6,29	4,20	37,90	1,592	2,61
MA13	50	18,06	6,34	3,90	34,57	1,348	2,55
MA18	10	8,11	6,09	3,79	31,37	1,189	2,60
MA18	20	12,10	6,10	4,01	32,87	1,318	2,69
MA18	30	12,94	5,91	4,83	38,40	1,855	2,98
MA18	40	11,06	6,05	4,51	39,40	1,777	2,73
MA18	50	9,48	6,06	3,73	34,54	1,288	2,44

Comparando-se os resultados obtidos pelas linhagens isoladas de Mata Atlântica na utilização de glicerol bruto nos meios de cultivo com a mesma concentração de glicerol puro (20 g/L) empregada nos experimentos anteriores, nota-se uma melhora expressiva de desempenho na produção de polímeros pelas linhagens MA 09, MA 13 e MA 18. Através do consumo de glicerol e aumento de biomassa (MSC) apresentados por todas as linhagens avaliadas, também pôde ser verificada uma maior afinidade por esta fonte de carbono. Uma exceção foi o isolado MA 03, pois apesar de obtido um discreto aumento na produção de MSC, foi observado um menor acúmulo do polímero, o quê resultou em valores de produção de PHB próximos daquele apresentado em cultivo com glicerol puro (0,29 g/L), com acúmulo máximo de 12,43% da MSC e uma produção de polímero de 0,28 g/L, atingidos em uma concentração de 30 g/L de glicerol bruto. Ao contrário, um brusco aumento na obtenção de PHB foi verificado para as linhagens MA 09 e MA 18, as quais anteriormente apresentaram acúmulos intracelulares de 15,64 e 9,32% da MSC e produções de 0,34 e 0,17 g/L de PHB, respectivamente. Nos cultivos com glicerol bruto estas mesmas cepas, atingiram valores de acúmulo do polímero de 44,41 e 39,40% da MSC e produções de PHB, com 1,69 g/L pelo isolado MA 09 e 1,86 g/L por MA 18. Os maiores valores foram atingidos pela linhagem MA 13, com um acúmulo intracelular de 48,27% da MSC e uma produção de 2,23 g/L de PHB.

Mothes et al. (2007) avaliaram a produção de PHB utilizando glicerol puro e glicerol bruto proveniente de diferentes usinas de biodiesel. Em seus experimentos observaram o acúmulo intracelular do polímero em duas espécies bacterianas, *Paracoccus denitrificans* e *Cupriavidus necator* (anteriormente classificada como *Ralstonia eutropha*), sendo esta última largamente conhecida por sua capacidade em produzir altas concentrações celulares de PHB. Os maiores acúmulos de polímeros foram obtidos nos cultivos com *C. necator* a partir de glicerol puro (70% da MSC). Ao utilizar glicerol bruto, foi relatado um efeito negativo sobre o crescimento celular e o acúmulo de polímero, devido a presença de íons de sódio encontrados neste insumo, geralmente provenientes do catalisador NaOH utilizado no processo de transesterificação para a produção de biodiesel. Nos ensaios com este substrato, foi observado um máximo acúmulo de 48% da MSC. Estes efeitos também foram relatados por Cavalheiro et al. (2009), apresentando um acúmulo máximo de polímero a partir de glicerol bruto de 38% da MSC utilizando uma linhagem de *C. necator*. Os dados observados por estes autores podem ser comparados com àqueles obtidos neste estudo, onde se observou um acúmulo de 48,27% da MSC. No entanto, ao utilizar glicerol bruto nos meios de cultivo foi verificado um efeito positivo na produção de biomassa e acúmulo do polímero, implicando na vantagem dos isolados de Mata Atlântica, obtidos neste presente trabalho, estar mais

adaptados e possuir maior afinidade por este substrato, ou seja, apresentar melhor desempenho em uma fonte de carbono obtida como subproduto sem qualquer tratamento.

4.3.5. Identificação das linhagens mais promissoras na produção de PHAs empregando técnicas moleculares

As linhagens bacterianas isoladas de Mata Atlântica LMI MA03, MA09, MA13 e MA18, as quais apresentaram as maiores produções de PHAs em meios de cultivo contendo glicerol bruto, foram identificadas por técnicas moleculares envolvendo a amplificação do gene 16S rDNA, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior análise de suas sequências. Para tal, estas linhagens bacterianas foram cultivadas em caldo nutriente e seus respectivos conteúdos celulares submetidos a um processo de extração de DNA, segundo especificações do item 4.2.10.1. Na Tabela 4.4, podem ser observados os resultados da quantificação de DNA extraído através de análise espectrofotométrica. As leituras a 260 nm (A_{260}) são específicas para ácidos nucleicos, enquanto as leituras das amostras a 280 nm (A_{280}) são realizadas para verificar a presença de proteínas residuais nos processos de extração. A partir do cálculo da relação A_{260}/A_{280} , observa-se o grau de pureza do DNA extraído, apresentando valores próximos da faixa desejada (1,8-1,9).

Tabela 4.4-Quantificação por espectrofotometria (Nanodrop®) do produto da extração de DNA das linhagens bacterianas MA03, MA09, MA13 e MA18.

Micro-organismo	[] DNA (ng/ μ L)	A_{260} (nm)	A_{280} (nm)	A_{260}/A_{280}
MA03	828,7	16,575	8,531	1,94
MA09	3033,2	60,663	31,232	1,94
MA13	890,5	17,809	9,239	1,93
MA18	1304,5	26,089	13,578	1,92

O gene 16S rDNA das amostras de DNA extraído de cada linhagem bacteriana foi amplificado por reação de PCR utilizando, assim como foi especificado no item 4.2.10.4., utilizando os “primers” 27FA/FC 5’ AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG e 1492RT/RC 5’ TACGGT/CTACCTTGTTACGACTT. Esses conjuntos de iniciadores permitem a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1500 pares de bases (bp) do gene 16S rDNA, o qual pode ser verificado na análise eletroforética dos produtos da amplificação (Figura 4.3).

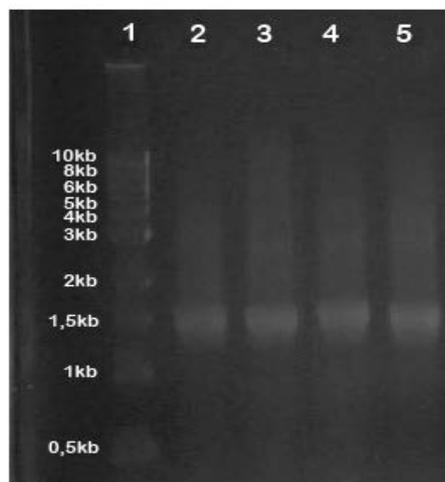


Figura 4.3- Avaliação dos produtos da PCR das linhagens bacterianas isoladas de Mata Atlântica, através de eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando corante de ácidos nucléicos GelRed: (1) Marcador molecular 1Kb DNA ladder; (2) MA03; (3) MA09; (4) MA13; e (5) MA18.

Após, os produtos da amplificação do gene 16S rDNA das linhagens bacterianas MA03, MA09, MA13 e MA18 foram purificados para a realização do seqüenciamento de DNA. Para uma melhor visualização dos produtos da purificação foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, desta vez contendo brometo de etídio (Figura 4.4).

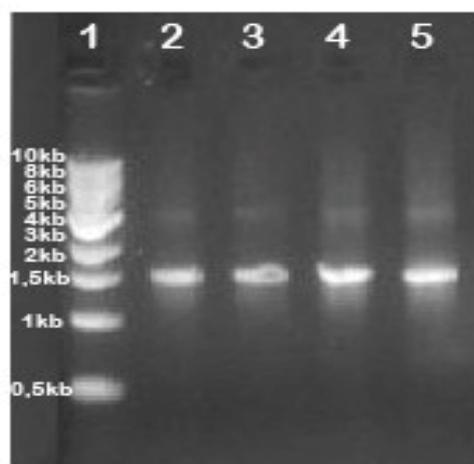


Figura 4.4- Avaliação dos produtos de purificação da PCR das linhagens bacterianas isoladas de Mata Atlântica, através de eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando brometo de etídio: (1) Marcador molecular 1Kb DNA ladder; (2) MA03; (3) MA09; (4) MA13; e (5) MA18.

Foram efetuadas leituras a 260 nm (A_{260}) para a quantificação de DNA dos produtos da purificação da reação de PCR, assim como, leituras a 280 nm (A_{280}) para verificar a presença de proteínas residuais, através de análise por espectrofotometria. Pode-se notar na Tabela 4.5 os valores da relação A_{260}/A_{280} , observando-se um grau de pureza dos produtos purificados próximo dos valores desejáveis.

Tabela 4.5- Quantificação por espectrofotometria (Nanodrop®) dos produtos de purificação da PCR das linhagens bacterianas MA03, MA09, MA13 e MA18.

Micro-organismo	[] DNA (ng/ μ L)	A_{260} (nm)	A_{280} (nm)	A_{260}/A_{280}
MA03	62,2	1,244	0,637	1,95
MA09	63,2	1,265	0,652	1,94
MA13	57,7	1,154	0,586	1,97
MA18	53,6	1,072	0,545	1,97

Assim, os produtos da purificação da PCR foram submetidos à reação de sequenciamento em termociclador. A seguir, aos produtos da reação foi adicionado 1µL de EDTA 125mM, reduzindo a quantidade de terminadores não incorporados, os quais podem distorcer os dados do sequenciamento. Por fim, as amostras obtidas para cada isolado foram aplicadas em sequenciador automático ABI 3500.

Após o alinhamento das sequências obtidas e geração de sequências consenso, estas foram comparadas com o banco de dados do NCBI através da ferramenta BLASTn. A sequência obtida para a linhagem MA 03 obteve uma similaridade de 99% com *Pandoraea sputorum*, MA 09 apresentou 99% de similaridade com *Cupriavidus metallidurans*, em MA 13 foi observada uma similaridade de 98% com *Burkholderia cepacia* e a linhagem MA 18 com 98% de similaridade com *Burkholderia mimosarum*.

Todas as espécies bacterianas identificadas possuem capacidade reconhecida pela literatura de acúmulo de PHAs e estão classificadas na família Burkholderiaceae, pertencente ao filo Proteobacteria, o qual apresenta o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas. Entre os papéis desempenhados pelos integrantes deste grupo está a participação ativa no ciclo de nitrogênio, justificando a presença desses indivíduos em solos de floresta de Mata Atlântica. A dominância das Proteobactérias já foi descrita, ocorrendo geralmente em solos de cultivo e contaminados com metais pesados (BRENNER et al., 2005).

4.3.6. Caracterização das linhagens MA 03, MA 09, MA 13 e MA 18 por testes bioquímicos

Utilizaram-se os kits API 20 NE e API 50 CH (Biomérieux®) para a realização de testes bioquímicos enzimáticos e de assimilação de carboidratos pelas linhagens MA 03, MA 09, MA 13 e MA18 (isoladas de solo de Mata Atlântica), as quais foram consideradas promissoras para a produção de PHAs a partir de glicerol bruto, proveniente da produção de biodiesel. Como pôde ser observado no item 4.3.5 as linhagens MA 03, MA 09, MA 13 e MA 18 foram identificadas através de técnicas moleculares como *Pandoraea sputorum*, *Cupriavidus metallidurans*, *Burkholderia cepacia* e *Burkholderia mimosarum*, respectivamente. Todas estas espécies citadas são bacilos gram-negativos, não enterobacteriaceas (BRENNER et al., 2005), podendo ser caracterizadas pelo kit API 20 NE (Biomérieux®) e até identificadas utilizando a base de dados apiweb™. Com isso, a comparação dos resultados obtidos através deste teste bioquímico, com aqueles observados a partir de técnicas moleculares, poderia proporcionar um auxílio adicional à identificação destas linhagens bacterianas. No entanto, a análise de similaridade entre os testes realizados

encontra limitações na própria base de dados fornecida pelo fabricante, a qual não consta os gêneros *Pandoraea* e *Cupriavidus*, além da espécie *B. mimosarum*. Isto, provavelmente, ocorre devido as linhagens MA 03, MA 09 e MA 18, pertencerem a “taxos” recentes, ainda não incorporados a base de dados apiwebTM. Mesmo assim, é possível estabelecer uma relação entre os resultados deste teste com a identificação molecular destes micro-organismos. Através da base apiwebTM as linhagens MA 03, MA 13 e MA 18 foram identificadas como *Burkholderia cepacia*. No caso do isolado MA 13, o resultado indica a mesma espécie relatada pelos testes moleculares. Como a espécie *B. mimosarum* (MA 18), indicada pela análise genética, é recente e não consta na base de dados do teste API 20 NE, o máximo de similaridade que pode-se alcançar é uma espécie de mesmo gênero, com uma alta variedade genômica, neste caso *B. cepacia* (CHEN et al., 2006). Quanto à linhagem MA 03, onde as análises das sequências do 16S rDNA indicaram a espécie *Pandoraea sputorum*, cujo gênero também não consta na base de dados apiwebTM, poderá somente ser relacionada a um gênero próximo filogeneticamente. O gênero *Pandoraea* foi incorporado atualmente às bases literárias de taxonomia bacteriana, sendo anteriormente classificadas entre *Ralstonia* e *Burkholderia* (COENYE et al., 2000; BRENNER et al., 2005). No teste bioquímico realizado, obteve-se para o isolado MA 03 a espécie *B. cepacia*, próxima do gênero *Pandoraea*. A linhagem MA 09 foi identificada a partir de técnicas de genética molecular como *Cupriavidus metallidurans*. Até 2004, a espécie *C. metallidurans* era classificada como *Wautersia metallidurans* (VANDAMME & COENYE, 2004) e primariamente, foram descobertas como *Ralstonia metallidurans* (GORIS et al., 2001). Porém, nenhuma destas espécies estão na base de dados apiwebTM, sendo obtido para o isolado MA 09, a espécie *Ralstonia pickettii*. Dessa forma, os testes API 20 NE, com uma complementaridade do teste API 50 CH, foram realizados com o objetivo principal de obter uma maior caracterização destes micro-organismos isolados. Nas Tabelas 4.6 e 4.7 podem ser observados os resultados obtidos com o kit API 20 NE e API 50 CH, respectivamente.

Tabela 4.6-Caracterização das linhagens isoladas MA 03, MA 09, MA 13, MA 18 através do kit API 20 NE

Característica	Micro-organismo			
	MA 03	MA 09	MA 13	MA18
Coloração de Gram	-	-	-	-
Morfologia celular	bastonete curto	bastonete	bastonete	bastonete curto
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	+	-	-
Redução de nitrato	-	+	+	+
Formação de indol (Tryptofano)	-	-	-	-
Fermentação de glicose	-	-	-	-
Hidrólise de arginina	-	-	-	-
urease	-	+	+	+
β -glicosidase	+	+	+	+
Hidrólise de gelatina	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-
D-glicose	+	+	+	+
L-arabinose	-	+	+	+
D-manose	+	-	+	+
D-manitol	+	-	+	+
N-acetil-glicosamina	+	-	+	+
D-maltose	+	-	+	+
Gluconato de potássio	+	+	+	+
Caprato	+	+	+	+
Adipato	-	+	+	+
Malato	+	+	+	+
Citrato	-	-	-	-
Fenil-acetato	+	+	+	+

Tabela 4.7 (Parte 01)- Caracterização das linhagens isoladas MA 03, MA 09, MA 13, MA 18 através do kit API 50 CH

Micro-organismo					
Teste	Fonte de Carbono	MA 03	MA 09	MA 13	MA 18
0	Controle	-	-	-	-
1	Glicerol	+	+	+	+
2	Eritritol	-	-	-	-
3	D-arabinose	+	+	+	+
4	L-arabinose	+	+	+	+
5	D-ribose	+	-	+	+
6	D-xilose	-	+	+	+
7	L-xilose	-	-	-	-
8	D-adonitol	-	-	-	-
9	Metil- β -D-xilopiranosídeo	-	-	-	-
10	D-galactose	+	-	+	+
11	D-glicose	+	+	+	+
12	D-frutose	+	-	+	+
13	D-manose	+	-	+	+
14	L-sorbose	-	+	-	-
15	L-ramnose	-	-	-	-
16	Dulcitol	+	-	+	+
17	Inositol	+	-	+	+
18	D-manitol	+	-	+	+
19	D-sorbitol	+	-	+	+
20	Metil- α -D-manopiranosídeo	-	-	-	-
21	Metil- α -D-glicopiranosídeo	+	+	+	+
22	N-acetil glucosamina	+	-	+	+
23	Amigdalina	-	-	-	-
24	Arbutina	-	+	-	-

Tabela 4.7 (Parte 02)- Caracterização das linhagens isoladas MA 03, MA 09, MA 13, MA 18 através do kit API 50 CH

Micro-organismo					
Teste	Fonte de Carbono	MA 03	MA 09	MA 13	MA 18
25	Citrato	-	-	-	-
26	Salicina	-	-	-	-
27	D-celobiose	+	-	-	-
28	D-maltose	+	-	+	+
29	D-lactose	+	-	-	-
30	D-melibiose	-	-	-	-
31	D-sacarose	+	-	+	+
32	D-trealose	+	-	+	+
33	Inulina	-	-	-	-
34	D-melezitose	+	-	-	-
35	D-rafinose	-	-	-	-
36	Amido	-	-	-	-
37	Glicogênio	-	-	-	-
38	Xilitol	-	-	-	-
39	Gentiobiose	-	-	-	-
40	D-turanose	+	-	+	+
41	D-lixose	+	-	+	+
42	D-tagatose	+	+	+	+
43	D-fucose	+	+	+	+
44	L-fucose	+	-	+	+
45	D-arabitol	+	-	+	+
46	L-arabitol	-	-	-	-
47	Gluconato de potássio	+	+	+	+
48	2-cetogluconato de potássio	+	-	+	+
49	5-cetogluconato de potássio	+	+	+	+

5. PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE GLICEROL POR LINHAGENS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL COMPLETO

5.1. Introdução

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres bacterianos produzidos geralmente sob condições desbalanceadas, como limitação de nitrogênio e excesso de fonte de carbono, sendo acumulados como grânulos intracelulares de reserva energética (SILVA-QUEIROZ et al., 2009). Embora, existam cerca de 150 tipos de monômeros na constituição destes polímeros, os PHAs comumente obtidos podem ser divididos entre aqueles de cadeia curta (scI-PHAs), como o polihidroxibutirato (PHB) e polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHB-HV), e os PHAs de cadeia média (PHA-mcl), compostos de monômeros com 6 a 14 átomos de carbono, conferindo a estes polímeros uma estrutura mais amorfa, os quais exibem propriedades elastoméricas (ASHBY, SOLAIMAN & FOGLIA, 2005).

Várias espécies de *Pseudomonas* são capazes de sintetizar PHA-mcl a partir de diferentes substratos, como fontes de carbono hidrofílicas até ácidos graxos. Estas características tornam as bactérias deste gênero atrativas, diante da necessidade de obter novos polímeros com propriedades diferenciadas, utilizando resíduos ou subprodutos agroindustriais (HABA et al., 2007). Atualmente, um dos maiores problemas enfrentados no estabelecimento da indústria do biodiesel tem sido as altas quantidades de glicerol resultantes de seu processo de produção (DOBROTH et al., 2011). Dessa forma, seria interessante a utilização deste subproduto em meios de cultivos para obtenção de PHAs, uma vez que estes polímeros, junto ao biodiesel, oferecem uma alternativa ecologicamente viável para substituição de produtos provenientes do petróleo.

Embora seja conhecida a capacidade de linhagens de *Pseudomonas* produzirem PHAs a partir de glicerol (ASHBY, SOLAIMAN & STRAHAN 2011), é necessário um conhecimento da interação entre os fatores determinantes para a produção destes polímeros, tais como, fonte de carbono e nitrogênio. O planejamento experimental do tipo fatorial permite a combinação de variáveis determinantes do processo de produção, na busca de respostas otimizadas, as quais podem ser identificadas por modelos obtidos ou visualizados a partir de metodologias de superfícies de resposta (GROTHER, MOO-YOUNG & CHISTI, 1999). Portanto, o objetivo deste trabalho fundamentou-se na realização de um experimento fatorial completo com linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, provenientes de coleção laboratorial, com conhecida capacidade de produção de PHAs-mcl, para avaliar a interação da

fonte de nitrogênio utilizada com a fonte de carbono glicerol, assim como verificar sua viabilidade para futuros experimentos.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Meios de cultivo

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

5.2.1.1. Luria-Bertani

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

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

Triptona..... 10 g/L

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

.

5.2.1.2. Meio Mineral

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

Na_2HPO_4 3,5 g/L

KH_2PO_4 1,5 g/L

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

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

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

Solução de elementos traços..... 1 mL

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

Solução de elementos traços:

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

Ao Meio Mineral foram adicionadas diferentes concentrações de glicerol, como fonte de carbono, e (NH₄)₂SO₄, como fonte de nitrogênio, para a obtenção das melhores condições na produção de PHAs.

5.2.1.3. Esterilização

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

5.2.2. Micro-organismos

Foram utilizadas as linhagens *Pseudomonas aeruginosa* LMI 6c e 7a (COSTA et al., 2008); *P. aeruginosa* LMI L2-1 e B1-3 (COSTA et al., 2009); e *P. aeruginosa* LBI (BENINCASA et al., 2002); todas obtidas de solos contaminados por hidrocarbonetos. Os micro-organismos deste estudo são provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI), localizado no Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)-Campus de Rio Claro (SP). As linhagens bacterianas acima citadas foram mantidas em placas de Petri, ágar inclinado e preservadas em tubos criogênicos contendo glicerol a 20%, sob congelamento a -20 °C e -80 °C; sendo realizada a manutenção de viabilidade das culturas microbianas periodicamente. Realizou-se também a preservação destas linhagens bacterianas através de liofilização, sendo estocadas em ampolas seladas a vácuo e mantidas em refrigerador (5-10 °C).

5.2.3. Cultivo de linhagens de *P. aeruginosa* utilizando planejamento experimental

5.2.3.1. Planejamento Fatorial Completo

Foram realizados cultivos com 5 linhagens de *P. aeruginosa* (LMI 6c, 7a, L2-1, B1-3 e LBI) com o objetivo de verificar a influência da variação da concentração de glicerol e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na produção de PHAs por estas bactérias. Dessa forma, realizou-se o planejamento fatorial completo com variação em três níveis na concentração de glicerol (10, 20 e 30 g/L) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5; 1,0 e 1,5 g/L), somando-se 3 repetições do ponto central, totalizando 12 experimentos para cada linhagem bacteriana, sendo avaliadas como variável resposta a produção de PHAs (g/L) (Tabela 5.1).

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

$$\text{Equação geral: } X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (5.1)$$

Onde:

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

X_0 é o valor real da variável no ponto central;

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

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

Portanto, nos 5 planejamentos do tipo fatorial completo realizados temos 2 variáveis: concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_1) e concentração de glicerol (X_2). Ao estabelecer um planejamento com 3 níveis, definiu-se como nível inferior (-1), central (0) e superior (+1) para a variável X_1 as concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 g/L, respectivamente. Para a variável X_2 os 3 níveis foram da mesma forma definidos para as concentrações de 10, 20 e 30 g/L. Dessa forma, as equações codificadas nos experimentos são demonstradas pelas equações 5.2 e 5.3:

$$X_1 = X - 1/0,5 \quad (5.2)$$

$$X_2 = X - 20/10 \quad (5.3)$$

Tabela 5.1-Planejamento fatorial completo com variáveis independentes codificadas. X_1 = concentração de $(NH_4)_2SO_4$ e X_2 = concentração de glicerol.

Tratamentos	Variáveis codificadas		
	X_1	X_2	
1	-1	-1	
2	-1	0	
3	-1	+1	
4	0	-1	
5	0	0	
6	0	+1	
7	+1	-1	
8	+1	0	
9	+1	+1	
10	0	0	
11	0	0	
12	0	0	

Variáveis independentes	níveis reais		
	-1	0	+1
$X_1 = (NH_4)_2SO_4$ (g/L)	0,5	1,0	1,5
$X_2 =$ Glicerol (g/L)	10	20	30

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

$$Y = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + cX_1^2 + dX_1X_2 + eX_2^2 \quad (5.4)$$

Onde:

Y é a resposta estudada;

β_0 é o valor médio da resposta;

a, b, c, d, e são constantes ou parâmetros da equação;

X_1 é a concentração $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L);

X_2 é a concentração de glicerol (g/L).

A partir da equação original (5.4) foi realizada uma aplicação estatística da estimativa dos parâmetros através dos valores de t de Student, sendo eliminados aqueles com nível de significância superior a 5%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes. O valor da distribuição t de Student foi definido como a relação entre o valor do parâmetro estimado e o seu desvio padrão. Eliminando os parâmetros não significativos, definiu-se para cada uma das respostas estudadas uma equação representativa dos efeitos das variáveis do processo que mais afetam a resposta avaliada.

O valor de F (Fisher) foi determinado pela razão entre o quadrado médio da equação ajustada (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR), como mostra a Equação (5.5). O valor obtido para F pode ser usado para a realização de um teste de hipótese para a verificação da adequação aos dados experimentais. Assim, se o valor de F calculado é maior que o valor de F tabelado, rejeita-se a hipótese de nulidade do modelo obtido, sendo este considerado significativo. Quanto maior o valor de F, melhor será o ajuste do modelo em questão.

$$F = \frac{QME}{QMR} \quad (5.5)$$

O quadrado médio da equação (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR) são dados pelas Equações (5.6) e (5.7), respectivamente.

$$QME = \frac{\text{Soma dos quadrados dos valores preditos}}{\text{Numero de graus de liberdade da equação}} \quad (5.6)$$

$$QMR = \frac{\text{Soma dos quadrados do residuo}}{\text{Numero de graus de liberdade do residuo}} \quad (5.7)$$

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

Para verificar se a resposta estudada apresentava um ponto de máximo, de mínimo ou não apresentava nenhum de ambos (ponto de sela) descobriu-se o ponto estacionário.

Os pontos estacionários são obtidos através da derivada da equação da resposta Y pela variável X_k , isto é:

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = \frac{\partial Y}{\partial X_2} = \dots = \frac{\partial Y}{\partial X_k} = 0 \quad (5.8)$$

sendo, $Y = b_0 + x'b + x'Bx$

$$\frac{\partial y}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x} [b_0 + x'b + x'Bx] = b + 2Bx = 0 \quad (5.9)$$

onde, b_0 é o termo independente;

$x'b$ são os termos de 1ª. ordem na função de resposta;

$x'Bx$ é a contribuição quadrática.

Então, o ponto estacionário será dado por: $x_0 = - (1/2) B^{-1}b$, onde B é a matriz (k x k) na qual a diagonal é composta pelos coeficientes dos termos quadráticos da equação e os

termos fora da diagonal são correspondentes aos coeficientes das interações divididos por 2 (ex: a_{12} e a_{21} correspondem ao coeficiente da interação X_1X_2). A matriz b é uma matriz coluna composta pelos coeficientes associados às variáveis isoladas (variáveis lineares).

O ponto estacionário (x_0) pode ser:

- Um ponto onde a superfície atinge um **máximo**;
- Um ponto onde a superfície atinge um **mínimo**, ou
- Um ponto nem de máximo, nem de mínimo \Rightarrow **Ponto de sela** (“saddle point”).

Ainda podem existir problemas relacionados aos pontos estacionários obtidos, tais como:

- A existência de uma região de máximo e não um ponto de máximo;
- O ponto estacionário pode estar fora da região experimental.

Para determinar a natureza desse ponto estacionário foi necessário fazer uma análise canônica, que considera uma translação da superfície de resposta da origem ($X_1, X_2, \dots, X_k = (0, 0, \dots, 0)$) para o ponto estacionário x_0 (Figura – 5.1) . Daí a função de resposta é formulada em termos de novas variáveis, w_1, w_2, \dots, w_k .

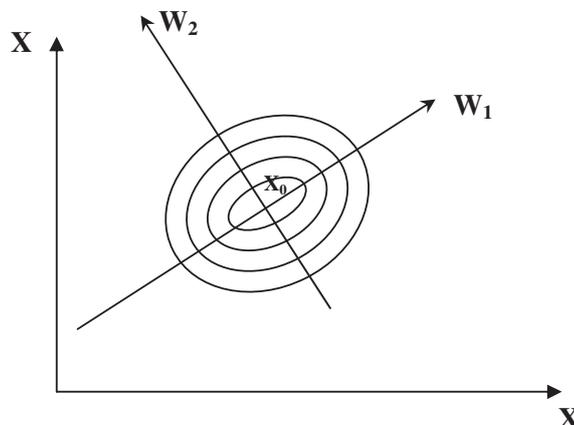


Figura 5.1 – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.

Então, obtêm-se a função de resposta em termos das novas variáveis:

$$Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (5.10)$$

onde:

y_0 : é a resposta estimada no ponto estacionário e,

$\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ são constantes.

Os sinais dos λ 's e a grandeza dos λ 's ajudam a determinar a natureza do ponto estacionário e, a relação entre os w 's e os x 's também são importantes pois indicam ao pesquisador regiões úteis para exploração.

Se $\lambda_i < 0$, sendo $i = 1, 2, \dots, k$, quando movimentamos em qualquer direção a partir do ponto estacionário, teremos um decréscimo de Y , isto é, o ponto estacionário x_0 é um ponto de resposta máxima da superfície ajustada. Se $\lambda_i > 0$, o ponto estacionário x_0 é um ponto de mínimo para a superfície ajustada e, se os λ 's têm sinais diferentes, o ponto estacionário x_0 não é nem ponto de máximo, nem de mínimo.

A obtenção dos pontos estacionários e a análise canônica dos dados para cálculo dos pontos de maximização da resposta, quando existentes, foram realizados utilizando um algoritmo implementado no *software Maple V Release 4*®.

5.2.3.2. Condições de cultivo das linhagens de *P.aeruginosa*

As linhagens bacterianas foram estriadas a partir de cultura estoque em meio Luria-Bertani ágar (LB), sendo incubados durante 72 h a 30°C. Colônias isoladas foram transferidas para 100 mL de meio LB, incubando-se durante 24 h a 30°C e 150 rpm de agitação. Um volume de 3 mL do cultivo em meio LB foi utilizado para inocular 100 mL de meio mineral, contendo concentrações de glicerol e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ especificadas no item 5.2.3.1., sendo incubado por 72 h a 150 rpm e 30°C. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 250 mL e o pH inicial dos meios de cultivos foi ajustado para 7,0 utilizando HCl 2M / NaOH 2M. O meio LB também foi utilizado para a preservação e manutenção de culturas estoque.

Após os cultivos, duas amostras de 10 mL e 90 mL provenientes de cada erlenmeyer, foram centrifugadas a 9410 x g e 10600 x g por 10 minutos, respectivamente; sendo a primeira amostra (10 mL) utilizada para a determinação de pH, consumo de glicerol e biomassa. As células da segunda amostra (90 mL) foram congeladas e liofilizadas para a determinação da quantidade e composição de PHAs.

5.2.4. 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, provenientes dos cultivos, foram ressuspensos em água destilada e submetidos à secagem em estufa a 105°C durante 24 h. A biomassa residual (X_R) foi obtida através da diferença entre os valores de massa seca celular e polímero (g/L) obtidos nos cultivos realizados.

5.2.5. Determinação de glicerol

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

5.2.6. Determinação de PHAs

A quantidade e composição de PHAs foram determinadas através de cromatografia gasosa de propil-ésteres (RIIS & MAI, 1988). Entre 10 e 15 mg de células liofilizadas foram submetidas a reação de propanólise em tubos, aos quais se adicionaram 2 mL de uma solução de HCl em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2 dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido benzóico em propanol (40 g/L), como padrão interno. Os tubos foram fechados fortemente, sendo vedados com fita de PTFE, agitados e submetidos a 4 h de reação a 80°C, com agitação após os primeiros 40 minutos de propanólise. Ao final da reação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se 4 mL de água ultrapura aos mesmos, sendo agitados vigorosamente por 30 segundos. Após a separação das fases aquosa (superior)

e orgânica (inferior), a primeira foi descartada, utilizando então a fase orgânica para a análise de propil-ésteres. Todas as amostras foram estocadas em vials com septo de PTFE, sendo conduzidas para serem analisadas no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, localizado no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP/ São Paulo-SP). 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 Agilent 7890A GC System®, equipado com a coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As temperaturas do injetor e detector (sistema de detecção por ionização de chama-FID) foram 250 e 300°C, respectivamente, utilizando-se hélio como gás de arraste a 0,8 mL/min. As análises foram conduzidas empregando-se um programa de temperaturas do forno com 100°C por 1 minuto, elevando-se a temperatura até 185°C a uma razão de 8°C/min e mantendo-se a 185°C por 15 minutos. Além dos padrões 3HB e 3HB-HV, polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida* a partir de diferentes fontes de carbono foram utilizados como padrões para a geração de curvas de calibração (3HHx, 3HHp, 3HO, 3HN, 3HD e 3HDD). O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes verificados nas amostras analisadas, sendo expresso em porcentagem da massa seca celular (PHA%) e em gramas de polímero por litro de cultivo (g/L).

5.2.7. Análise do PHA produzido por *P. aeruginosa* LMI 6c

5.2.7.1. Extração do polímero e fracionamento com acetona

O polímero intracelular foi extraído adicionando-se clorofórmio às células liofilizadas, sendo estas submetidas à agitação de 200 rpm a 35°C, durante 48 h. O conteúdo celular foi separado por filtro de papel Whatman #1, evaporando-se o clorofórmio resultante deste processo para obtenção dos PHAs. O polímero obtido foi dissolvido em um pequeno volume de clorofórmio e reprecipitado 5 vezes através de adição de metanol gelado. Transferiu-se o precipitado para recipiente previamente pesado, sendo o mesmo secado durante 24 h. O PHA-mcl produzido por *P. aeruginosa* LMI 6c foi submetido a um novo processo de separação, para obtenção da fração de PHB produzida por este micro-organismo. Após a extração com clorofórmio, adicionou-se acetona ao polímero obtido. A reação foi conduzida sob agitação durante 24 h, a temperatura ambiente, sendo novamente filtrada para obtenção das frações solúvel (PHA-mcl) e insolúvel em acetona (PHB) (ASHBY, SOLAIMAN & FOGLIA, 2005).

5.2.7.2 Análise dos PHAs de *P.aeruginosa* LMI 6c através de cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As frações de PHA-mcl e PHB do polímero extraído de *P. aeruginosa* LMI 6c foram analisadas por cromatografia gasosa de propil-ésteres segundo especificações presentes no item 5.2.6. A fração de PHB produzida também foi avaliada através de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), utilizando o equipamento IR Prestige (Shimadzu®). As amostras foram analisadas por transmitância (%) com uma resolução de 4 cm⁻¹, em uma faixa de comprimento de ondas de 4000-400 cm⁻¹. Os espectros obtidos foram comparados qualitativamente com o padrão PHB (Sigma®).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Cultivo de linhagens de *P. aeruginosa* utilizando planejamento experimental

Foram avaliadas as linhagens *P. aeruginosa* LMI 6c, 7a, L2-1, B1-3 e LBI; através de planejamento experimental, com a finalidade principal de observar a influência da variação das concentrações de glicerol e (NH₄)₂SO₄ na produção de PHAs por estes micro-organismos. Além disso, os ensaios realizados permitiriam selecionar uma destas linhagens, cuja capacidade de produção destes polímeros já é conhecida (COSTA et al., 2009), para futuros experimentos utilizando o glicerol como fonte de carbono.

A metodologia de planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, foi escolhida para realização destes experimentos, pois se trata de uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre processos, minimizando o empirismo baseado em técnicas de tentativas e erros (BOX et al., 1978).

Segundo Rodrigues & Iemma (2005) a escolha do planejamento adequado é uma função direta do número de variáveis independentes envolvidas no estudo. No caso de 2 variáveis ou fatores não deve-se realizar um planejamento fatorial fracionado, recomendando-se a realização de delineamento composto central ou um fatorial completo com 3 ou mais repetições do ponto central. Assim, para cada linhagem, foi realizado um planejamento fatorial completo, onde todas as combinações poderiam ser investigadas, explorando todo o espaço experimental. Os planejamentos realizados foram compostos de 12 experimentos, variando-se 3 níveis na concentração de glicerol (10, 20 e 30 g/L) e (NH₄)₂SO₄ (0,5; 1,0 e 1,5 g/L), com 3 repetições do ponto central. As análises estatísticas foram efetuadas utilizando o *Software Statistica 7.0.*, sendo realizada para cada resposta uma análise de regressão múltipla, através do método dos mínimos quadrados.

Nos itens seguintes podem ser observados os resultados obtidos nos cultivos das 5 linhagens de *P. aeruginosa*, juntamente com suas respectivas análises estatísticas. Posteriormente, no item 5.3.1.6 encontra-se uma discussão e considerações finais a respeito dos planejamentos experimentais realizados.

5.3.1.1. Resultados do planejamento fatorial completo utilizando *P. aeruginosa* LMI 6c

A partir da Tabela 5.2, podem ser observados os valores das respostas obtidas através do planejamento experimental na produção de PHAs (g/L). Ainda, podem ser verificados os valores de consumo de glicerol, pH, massa seca celular (MSC) e produção de PHAs em percentual da MSC para cada experimento, envolvendo as variáveis estudadas.

Tabela 5.2-Resultados dos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Experimento	[] (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	[] Glicerol inicial (g/L)	Consumo de Glicerol (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
1	0,5	10	6,47	6,65	1,42	9,27	0,132	1,29
2	0,5	20	7,85	6,62	1,37	7,59	0,104	1,27
3	0,5	30	8,83	6,60	1,46	7,27	0,106	1,35
4	1,0	10	7,63	6,24	1,66	8,47	0,140	1,52
5	1,0	20	8,56	6,28	1,78	6,47	0,115	1,67
6	1,0	30	9,00	6,39	2,15	5,47	0,117	2,03
7	1,5	10	7,71	5,40	2,26	4,15	0,094	2,17
8	1,5	20	9,43	5,72	2,31	4,24	0,098	2,21
9	1,5	30	9,13	5,61	2,43	4,84	0,118	2,31
10	1,0	20	10,82	6,06	1,72	7,29	0,125	1,60
11	1,0	20	10,72	6,12	1,78	6,65	0,118	1,66
12	1,0	20	10,45	6,31	1,67	7,56	0,126	1,54

No planejamento fatorial completo realizado o maior valor para a produção de PHAs foi obtido no experimento 4 (0,14 g/L), com concentração de 1 g/L de (NH₄)₂SO₄ e 10 g/L de

glicerol. Embora, possa ser percebida uma tendência de maior acúmulo intracelular do polímero (%MSC) no sentido das menores concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, um aumento no valor da biomassa obtida (MSC) também está associado a maiores produções do polímero. A maioria das linhagens produtoras de PHAs começa a produzi-lo em maiores quantidades quando há um excesso de fonte de carbono e o crescimento celular é interrompido pela ausência de um nutriente essencial, como o N, P, Mg, K ou S (LEE, 1996). Por isso, torna-se um desafio associar a produção do polímero e crescimento celular, pois normalmente as concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, onde se observa a maior produção celular do polímero, são limitantes para o crescimento bacteriano, com menores valores de MSC. Dessa forma, torna-se o maior objetivo obter as concentrações de fonte de carbono e limitação de nutrientes ideais para obter a maior produção de PHAs (g/L).

Na Tabela 5.3, pode-se observar a proporção (mol%) e os tipos de monômero na composição dos polímeros obtidos nos cultivos de *P. aeruginosa* 6c, no planejamento experimental realizado.

Tabela 5.3- Resultados da composição dos PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Experimento	[] $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	[] Glicerol inicial (g/L)	HB (mol%)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)
1	0,5	10	68,99	0,65	6,15	18,97	5,23
2	0,5	20	62,71	< 1d	7,13	23,66	6,50
3	0,5	30	69,36	< 1d	6,47	18,32	5,84
4	1,0	10	76,88	< 1d	2,94	13,37	6,80
5	1,0	20	76,78	< 1d	2,69	14,51	6,02
6	1,0	30	72,32	0,89	4,77	16,36	5,65
7	1,5	10	66,65	< 1d	< 1d	21,25	12,10
8	1,5	20	73,27	< 1d	< 1d	16,10	10,62
9	1,5	30	< 1d	2,41	34,28	49,66	13,65
10	1,0	20	78,93	< 1d	2,23	12,19	6,65
11	1,0	20	76,45	< 1d	3,03	13,90	6,62
12	1,0	20	78,87	< 1d	2,69	12,29	6,15

HB = 3-hidroxi-butirato **HHx** = 3-hidroxi-hexanoato **HO** = 3-hidroxi-octanoato

HD = 3-hidroxi-decanoato **HDd** = 3-hidroxi-dodecanoato

Os resultados apresentados na Tabela 5.3 evidenciam uma proporção e uma composição atípica entre os tipos de monômeros obtidos. A síntese de PHAs a partir de

glicerol utilizando linhagens de *P. aeruginosa* é conhecida como uma síntese a partir de um substrato não relacionado, onde geralmente ocorre a redução da molécula de glicerol a acetil-CoA, produzindo PHAs-mcl com uma composição de monômeros, essencialmente, formado de HD (~70%), HO (~20-25%), HHx (~5%) e HDd (~5%) (HUIJBERTS et al., 1992). Tal diferença na proporção entre estes monômeros poderia ser atribuída a uma deficiência na assimilação da fonte de carbono (glicerol) na formação de um polímero típico. Nos 12 experimentos, também nota-se uma quantidade expressiva de HB (PHA-scl), dificilmente produzidos nesta proporção por linhagens selvagens de *Pseudomonas aeruginosa*. A produção simultânea de HB e PHAs-mcl na composição do polímero obtido, provavelmente, envolve a síntese de dois tipos diferentes de PHA sintases, o que sugere a expressão de dois genes diferentes responsáveis pela produção dessas enzimas (REHM et al., 2002). Porém, ainda não se pode afirmar a presença de duas PHA sintases envolvidas na formação do polímero obtido, pois a metodologia de análise deste, através de cromatografia gasosa, utiliza células liofilizadas na reação de propanólise, sendo o produto da extração analisado diretamente. Neste caso, outros componentes celulares poderiam apresentar o mesmo tempo de retenção do monômero HB. Portanto, uma análise mais precisa da composição do polímero, exigiria um procedimento de extração e purificação do mesmo, para depois ser submetido à reação de propanólise e, então, ser analisado em cromatógrafo gasoso. Outra alternativa, seria realizar o fracionamento do polímero obtido com acetona para posterior análise das frações solúvel (PHA-mcl) e insolúvel (PHB) por cromatografia gasosa, podendo ainda ser caracterizadas por outras técnicas, como a espectroscopia de infravermelho.

Através dos valores obtidos, realizou-se a regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, resultando na seguinte equação geral para a síntese de PHAs:

$$Y = 0,120757 - 0,005393X_1 - 0,004097X_2 - 0,018548X_1^2 + 0,012380X_1X_2 + 0,009502X_2^2 \quad (5.11)$$

Através da análise de variância (ANOVA) pode-se confirmar a validade do modelo obtido utilizando as variáveis estudadas. Como pode ser verificado na Tabela 5.4, o valor de F calculado (F_C) = 7,94 é maior que o valor de F tabelado ($F_{5,6,0,05}$) = 4,39 para um nível de

significância de 5%. Tal comparação pode ser interpretada através de um teste de hipótese. A hipótese de nulidade (H_0) diz que o modelo não é significativo, ou seja, todos os parâmetros são iguais a zero. A hipótese alternativa (H_1) afirma que o modelo é significativo. O resultado do teste F mostrou que se pode rejeitar H_0 no nível de significância de 5%, ou seja, tem-se uma confiança de 95% de significância do modelo obtido. Esta análise foi extrapolada para as demais respostas obtidas nos planejamentos experimentais realizados. O coeficiente de determinação R^2 indica um bom ajuste dos dados experimentais, pois mostra que 86,88% da variabilidade dos resultados foi explicada pela equação geral obtida.

Tabela 5.4- Análise de variância para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_C	p-valor
Regressão	0,001839	5	0,000368	7,944342	0,012700
Resíduos	0,000278	6	0,000046		
Total	0,002117				

$R^2=86,88\%$; $F_{5,6;0,05}=4,39$

A Figura 5.2 apresenta uma comparação entre os valores observados nos experimentos e aqueles preditos pela equação geral, podendo-se verificar uma proximidade entre as respostas e os valores fornecidos pela equação empírica.

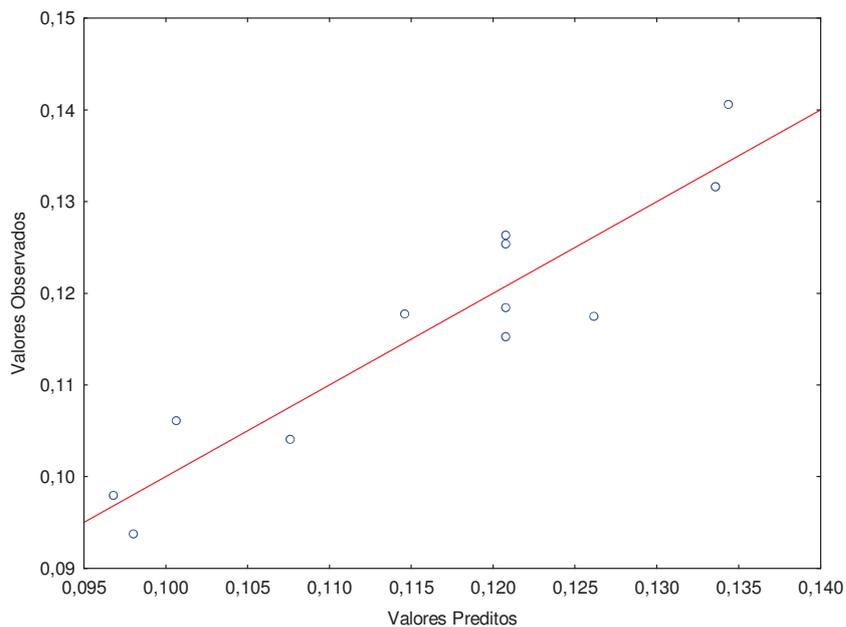


Figura 5.2-Valores observados em função dos valores preditos para a produção de PHAs, obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

A partir da equação geral foram eliminados os parâmetros com nível de significância do teste t de Student superiores a 5%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes. Na Tabela 5.5 encontram-se as variáveis mais significativas para a produção de PHAs.

Tabela 5.5- Resultados da regressão múltipla para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Fator	Parâmetro	t de student	p-valor
Constante β_0	0,123924	32,32309	0,000000
X_1^2	-0,015381	-2,83681	0,019505
X_1X_2	0,012380	2,63657	0,027066
$R^2= 0,62$	$F_C = 7,50$		$F_T(0,05) = 4,26$

Como pôde ser visualizado na Tabela 5.5, o valor de F calculado (F_c) é maior que F tabelado (F_T), indicando uma confiança de 95% do modelo obtido. O coeficiente de correlação (R^2) de 0,62 indica um ajuste satisfatório dos dados experimentais na resposta de produção de PHAs, mostrando que 62% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

Assim, após a eliminação dos parâmetros não significativos, conforme apresentado na Tabela 5.5, obteve-se a seguinte equação ajustada:

$$Y = 0,123924 - 0,015381X_1^2 + 0,012380X_1X_2 \quad (5.12)$$

Os efeitos das variáveis na produção de PHAs para a equação empírica ajustada podem ser melhor visualizados a partir da superfície de resposta obtida (Figura 5.3):

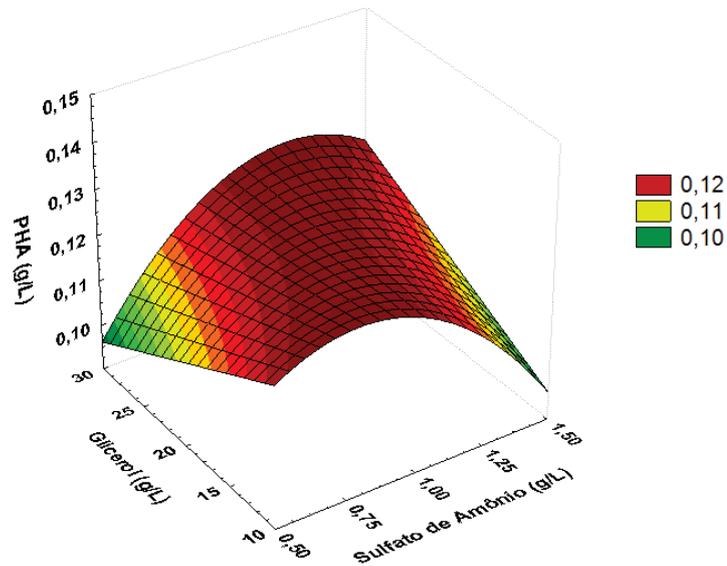


Figura 5.3-Superfície de resposta para a produção de PHAs em função das concentrações de $(NH_4)_2SO_4$ e glicerol nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Na Figura 5.3, observa-se na superfície de resposta uma tendência ao aumento na produção de PHAs na menor concentração de glicerol (10 g/L) para valores de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,5 a 1,0 g/L. Nos experimentos realizados em concentrações de sulfato de amônio de 1,0 g/L foram encontradas as maiores proporções de HB no polímero, associado ao maior valor apresentado para a produção de PHAs. Ainda, pode ser verificado um discreto aumento na produção de PHAs a medida que se aumenta a concentração de glicerol em 1,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5.3.1.2. Resultados do planejamento fatorial completo utilizando *P. aeruginosa* LMI 7a

Na Tabela 5.6, encontram-se os valores das respostas obtidas nos 12 experimentos do planejamento fatorial completo para a produção de PHAs.

Tabela 5.6-Resultados dos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 7a em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Experimento	[] $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	[] Glicerol inicial (g/L)	Consumo de Glicerol (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X_R (g/L)
1	0,5	10	7,18	6,45	1,33	10,02	0,133	1,20
2	0,5	20	7,58	6,44	1,24	9,99	0,124	1,12
3	0,5	30	8,13	6,43	1,29	9,51	0,123	1,17
4	1,0	10	8,72	5,16	2,47	3,38	0,083	2,39
5	1,0	20	9,66	5,24	3,21	2,51	0,080	3,13
6	1,0	30	8,21	5,09	1,64	2,56	0,042	1,60
7	1,5	10	8,46	5,03	2,05	3,81	0,078	1,97
8	1,5	20	8,67	5,00	2,17	3,50	0,076	2,09
9	1,5	30	10,39	4,95	2,17	3,06	0,066	2,10
10	1,0	20	11,01	5,04	2,72	3,09	0,084	2,64
11	1,0	20	11,17	5,26	2,96	2,99	0,088	2,87
12	1,0	20	11,21	5,03	3,02	2,87	0,086	2,93

O maior valor obtido de produção de PHAs foi 0,13 g/L (Experimento 1), nas concentrações de 0,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 10 g/L de glicerol. Nos pontos centrais podem ser

verificados os maiores valores de MSC. Contudo, os maiores acúmulos de polímero (%MSC) foram obtidos em condições limitantes da fonte de nitrogênio, na menor concentração de sulfato de amônio.

Nos experimentos 1, 2 e 3 nota-se uma proporção (mol%) dos monômeros constituintes de um polímero típico de *P. aeruginosa* (Tabela 5.7), apresentando PHAs-mcl formado de HD (~70%), HO (~20-25%), HHx (~5%) e HDd (~5%) (HUIJBERTS et al., 1992). Porém, ao aumentar a concentração da fonte de nitrogênio, observa-se a formação apenas de HD e HDd, nos experimentos 4, 5, 6, 11 e 12, com um reduzido valor de HO no ensaio 10. Além disso, mais uma vez proporções significativas de HB aparecem nos experimentos 7, 8 e 9.

Tabela 5.7- Resultados da composição dos PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 7a em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Experimento	[] (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	[] Glicerol inicial (g/L)	HB (mol%)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)
1	0,5	10	< ld	2,18	20,14	65,63	12,05
2	0,5	20	5,624	1,91	20,34	63,70	8,42
3	0,5	30	5,16	2,17	20,51	63,72	8,43
4	1,0	10	< ld	< ld	< ld	67,42	32,58
5	1,0	20	< ld	< ld	< ld	73,68	26,31
6	1,0	30	< ld	< ld	< ld	68,23	31,76
7	1,5	10	47,36	< ld	< ld	35,25	17,39
8	1,5	20	46,93	< ld	< ld	35,74	17,33
9	1,5	30	47,78	< ld	< ld	34,38	17,84
10	1,0	20	< ld	< ld	5,03	66,95	28,02
11	1,0	20	< ld	< ld	< ld	67,59	32,41
12	1,0	20	< ld	< ld	< ld	67,61	32,39

HB = 3-hidroxi butirato **HHx** = 3-hidroxi hexanoato **HO** = 3-hidroxi octanoato
HD = 3-hidroxi decanoato **HDd** = 3-hidroxi dodecanoato

Através dos valores obtidos na regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, obteve-se a seguinte equação geral para a síntese de PHAs:

$$Y = 0,081180 - 0,026497X_1 - 0,010653X_2 + 0,026213X_1^2 - 0,000338X_1X_2 - 0,010965X_2^2$$

(5.13)

A partir da resposta obtida pôde-se confirmar a validade do modelo em função das variáveis estudadas através da análise de variância. Observa-se na Tabela 5.8 que o valor de F_C é maior que F_T , rejeitando-se H_0 e mostrando uma confiança de 95% da equação obtida. O valor do coeficiente de determinação (R^2) denota um bom ajuste dos dados experimentais, demonstrando que 90,66% dos resultados podem ser explicados pelo modelo obtido.

Tabela 5.8-Análise de variância para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 7a em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_C	p-valor
Regressão	0,006741	5	0,001348	11,64504	0,004799
Resíduos	0,000695	6	0,000116		
Total	0,007436				

$R^2=90,66\%$; $F_{5,6;0,05}=4,39$

A Figura 5.4 apresenta uma comparação entre os valores observados e preditos pela equação geral. Pode-se verificar uma proximidade entre as respostas na produção de PHAs e os valores fornecidos pela equação empírica.

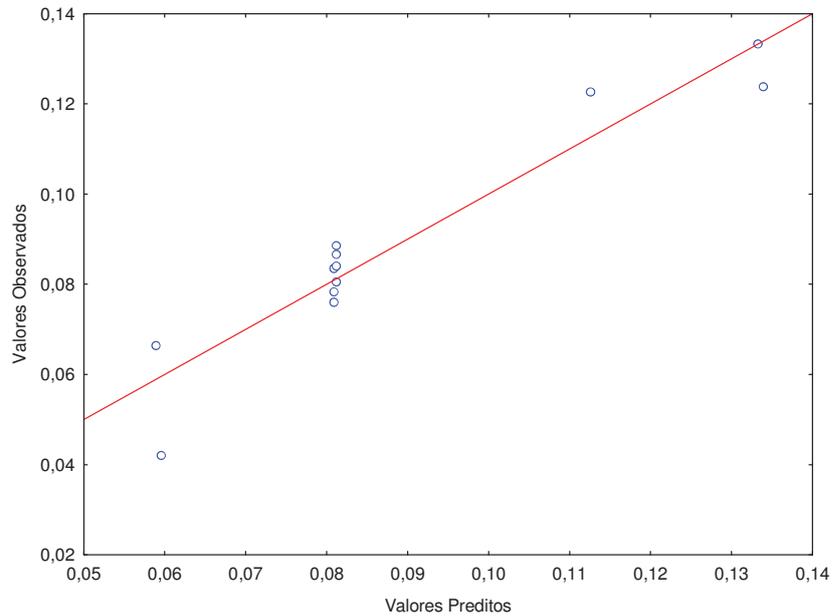


Figura 5.4-Valores observados em função dos valores preditos para a produção de PHAs, obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 7a em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Foram consideradas apenas as variáveis mais significativas, com parâmetros com nível de significância do teste t de Student inferiores a 5% (Tabela 5.9).

Tabela 5.9- Resultados da regressão múltipla para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 7a em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Fator	Parâmetro	t de student	p-valor
Constante β_0	0,077525	16,85312	0,000000
X_1	-0,026497	-5,76012	0,000424
X_2	-0,010653	-2,31589	0,049234
X_1^2	0,022558	3,46755	0,008473
$R^2= 0,86$	$F_C = 16,85$		$F_T(0,05) = 4,07$

O coeficiente de correlação apresentado (0,86) indica um ajuste adequado dos dados experimentais. O resultado de F calculado (16,85) foi superior ao F tabelado (4,07), portanto, o modelo pode ser considerado significativo.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos (Tabela 5.9), obteve-se a seguinte equação ajustada:

$$Y = 0,077525 - 0,026497X_1 - 0,010653X_2 + 0,022558X_1^2 \quad (5.14)$$

Na superfície de resposta obtida a partir da equação ajustada (Figura 5.5), nota-se um aumento gradativo na produção do polímero diminuindo-se as concentrações de glicerol e sulfato de amônio, com a maior produção no menor valor de ambos.

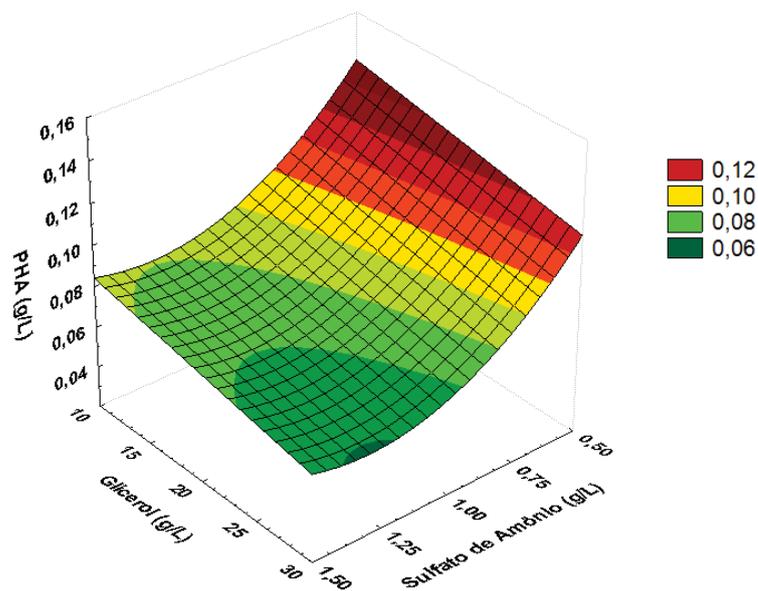


Figura 5.5-Superfície de resposta para a produção de PHAs em função das concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e glicerol nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 7a em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

5.3.1.3. Resultados do planejamento fatorial completo utilizando *P. aeruginosa* LMI L2-1

Os valores das respostas obtidas através do planejamento experimental na produção de PHAs (g/L) podem ser observados na Tabela 5.10:

Tabela 5.10-Resultados dos cultivos de *P.aeruginosa* LMI L2-1 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Experimento	[] (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	[] Glicerol inicial (g/L)	Consumo de Glicerol (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
1	0,5	10	7,33	6,45	1,24	7,34	0,091	1,15
2	0,5	20	7,82	6,50	1,25	5,34	0,067	1,18
3	0,5	30	9,75	6,50	1,26	4,50	0,057	1,20
4	1,0	10	8,79	5,14	2,23	3,00	0,067	2,16
5	1,0	20	10,29	5,16	3,12	2,88	0,090	3,03
6	1,0	30	10,19	5,84	2,17	4,00	0,087	2,08
7	1,5	10	7,16	5,14	1,8	2,66	0,048	1,75
8	1,5	20	9,15	5,12	1,94	2,76	0,053	1,89
9	1,5	30	9,18	4,96	2,26	3,20	0,072	2,19
10	1,0	20	9,11	5,14	3,15	2,63	0,083	3,07
11	1,0	20	9,08	5,01	3,14	2,74	0,086	3,05
12	1,0	20	9,13	5,09	3,08	2,87	0,088	2,99

No planejamento experimental desenvolvido o maior valor para a produção de PHAs foi de 0,09 g/L (Experimento 1). Mesmo diante dos maiores valores de MSC apresentados pelos experimentos no ponto central, ainda uma maior limitação na fonte de nitrogênio, com menor concentração de (NH₄)₂SO₄, foi determinante no acúmulo de polímero pela linhagem *P. aeruginosa* LMI L2-1.

Assim como foi observado nos planejamentos anteriores, nota-se na Tabela 5.11 uma proporção atípica dos monômeros obtidos na composição dos polímeros. Aparecendo ainda HB nos experimentos 1, 2, 6 e 9.

Tabela 5.11- Resultados da composição dos PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI L2-1 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Experimento	[] (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	[] Glicerol inicial (g/L)	HB (mol%)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)
1	0,5	10	9,34	2,43	29,42	47,74	11,07
2	0,5	20	71,06	< ld	5,43	13,47	10,03
3	0,5	30	< ld	3,02	20,84	61,03	15,11
4	1,0	10	< ld	< ld	< ld	64,80	35,20
5	1,0	20	< ld	< ld	2,40	63,30	34,30
6	1,0	30	13,61	< ld	17,59	50,93	17,87
7	1,5	10	< ld	< ld	< ld	62,45	37,55
8	1,5	20	< ld	< ld	< ld	67,58	32,42
9	1,5	30	34,18	< ld	< ld	44,79	21,03
10	1,0	20	< ld	< ld	< ld	62,76	37,24
11	1,0	20	< ld	< ld	< ld	63,65	36,35
12	1,0	20	< ld	< ld	< ld	63,10	36,90

HB = 3-hidroxi butirato **HHx** = 3-hidroxi hexanoato **HO** = 3-hidroxi octanoato

HD = 3-hidroxi decanoato **HDd** = 3-hidroxi dodecanoato

Através dos valores obtidos, realizou-se a regressão múltipla no programa *Statistica* 7.0, resultando na seguinte equação geral para a síntese de PHAs:

$$Y = 0,084059 - 0,006840X_1 + 0,001592X_2 - 0,018269X_1^2 + 0,014717X_1X_2 - 0,001520X_2^2$$

(5.15)

Os valores da ANOVA podem ser verificados na Tabela 5.12, demonstrando a validade do modelo obtido em função das variáveis estudadas, através dos valores de F calculado e R^2 .

Tabela 5.12-Análise de variância para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI L2-1 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _C	p-valor
Regressão	0,002226	5	0,000445	6,239538	0,022708
Resíduos	0,000428	6	0,000071		
Total	0,002654				

$R^2=83,87\%$; $F_{5,6;0,05}=4,39$

Na Figura 5.6, percebe-se uma proximidade entre os valores observados e preditos pela equação geral:

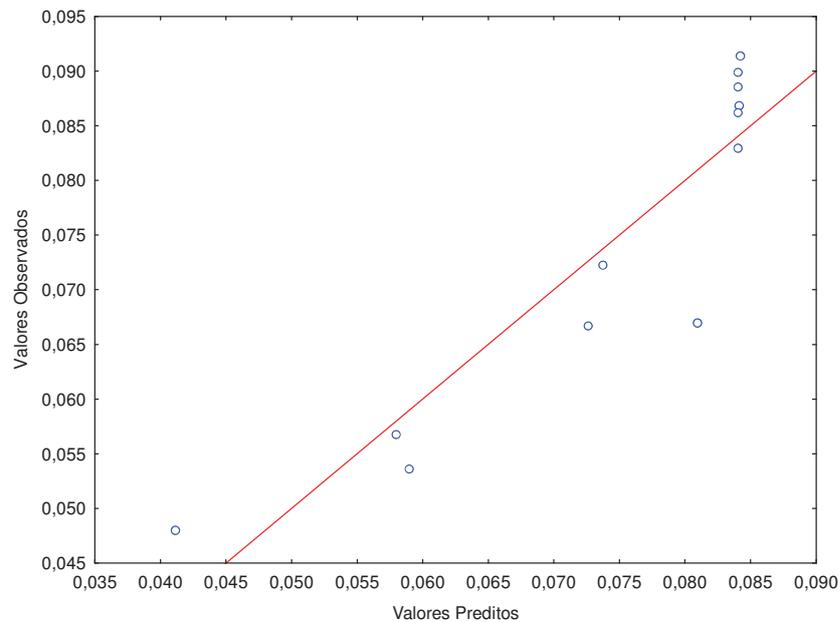


Figura 5.6-Valores observados em função dos valores preditos para a produção de PHAs, obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI L2-1 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo

A partir desta equação foram eliminados os parâmetros com nível de significância do teste t de Student superiores a 5%, sendo encontradas na Tabela 5.13 apenas as variáveis mais significativas para o planejamento experimental realizado.

Tabela 5.13- Resultados da regressão múltipla para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI L2-1 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Fator	Parâmetro	t de student	p-valor
Constante β_0	0,083553	22,72201	0,000000
X_1^2	-0,018776	-3,61054	0,005655
X_1X_2	0,014717	3,26789	0,009715
$R^2= 0,72$	$F_C = 11,86$		$F_T(0,05) = 4,26$

Para os 12 experimentos, considerando as variáveis significativas, foi obtido coeficiente de correlação 0,72, indicando um ajuste satisfatório dos dados experimentais. O resultado de F calculado (F_c) foi superior ao F tabelado (F_T) para um nível de significância de 5%, ou seja, tem-se uma confiança de 95% de significância do modelo obtido.

Assim, após a eliminação dos parâmetros não significativos, obteve-se a seguinte equação ajustada:

$$Y = 0,083553 - 0,018776X_1^2 + 0,014717X_1X_2 \quad (5.16)$$

Conforme a equação ajustada, construiu-se uma superfície de resposta para melhor visualização dos efeitos das variáveis sulfato de amônio e glicerol na produção de PHAs por *P. aeruginosa* LMI L2-1 (Figura 5.7).

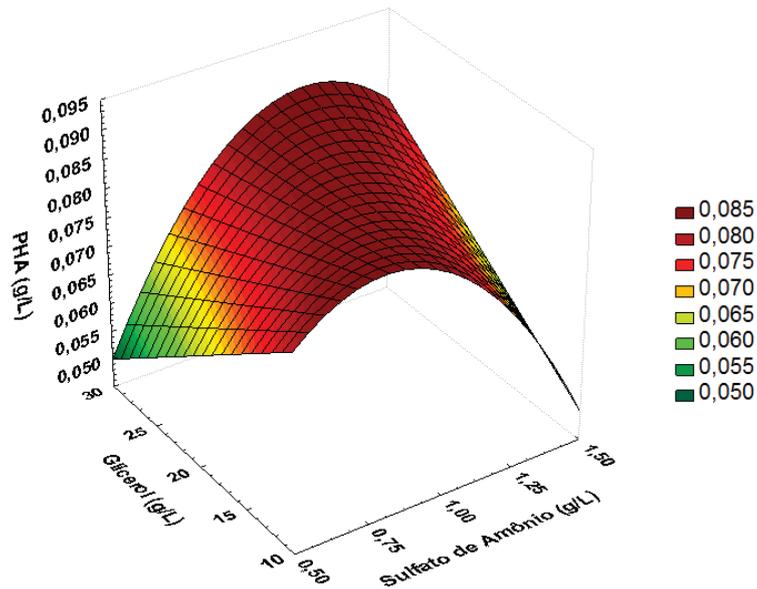


Figura 5.7-Superfície de resposta para a produção de PHAs em função das concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e glicerol nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI L2-1 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Na superfície de resposta, embora o maior valor na produção de PHAs tenha sido observado na menor concentração de sulfato de amônio e glicerol, há uma tendência no aumento na produção de polímero em torno do ponto central, com 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e valores na concentração de glicerol entre 20 e 30 g/L.

5.3.1.4. Resultados do planejamento fatorial completo utilizando *P. aeruginosa* LMI B1-3

A Tabela 5.14 contém os valores das respostas obtidas através do planejamento experimental na produção de PHAs (g/L). Ainda, podem ser verificados os valores de consumo de glicerol, pH, massa seca celular (MSC) e produção de PHAs em percentual da MSC para cada experimento, envolvendo as variáveis estudadas.

Tabela 5.14-Resultados dos cultivos de *P.aeruginosa* LMI B1-3 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Experimento	[] (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	[] Glicerol inicial (g/L)	Consumo de Glicerol (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
1	0,5	10	8,12	6,51	1,50	5,22	0,078	1,42
2	0,5	20	7,41	6,49	1,32	4,66	0,061	1,26
3	0,5	30	9,43	6,49	1,38	3,88	0,053	1,33
4	1,0	10	9,22	5,16	3,21	2,37	0,076	3,13
5	1,0	20	10,70	5,15	3,98	2,46	0,098	3,88
6	1,0	30	11,89	5,90	2,12	3,81	0,081	2,04
7	1,5	10	7,80	5,21	1,82	2,49	0,045	1,78
8	1,5	20	9,81	5,14	2,05	2,42	0,050	2,00
9	1,5	30	10,18	4,96	2,51	2,20	0,055	2,46
10	1,0	20	8,97	5,22	3,64	2,61	0,095	3,55
11	1,0	20	8,30	5,17	3,81	2,62	0,100	3,71
12	1,0	20	9,14	4,98	3,90	2,46	0,096	3,80

Neste planejamento fatorial completo, o maior valor para a produção de PHAs foi obtido no ponto central (0,10 g/L), em concentrações de 1 g/L de (NH₄)₂SO₄ e 20 g/L de glicerol. Nestes experimentos (5, 10, 11 E 12), embora não tenham sido observados os maiores acúmulos intracelulares de polímero, encontraram-se os maiores valores de MSC. Dessa forma, um valor intermediário de sulfato de amônio proporcionou um maior crescimento celular, sendo obtidos valores de produção de PHAs próximos dos valores obtidos nos demais planejamentos experimentais.

Na Tabela 5.15, pode-se observar a proporção (mol%) e os tipos de monômero na composição dos polímeros obtidos no planejamento fatorial completo realizado. Verifica-se neste caso, a incidência de uma maior proporção de monômeros HD e HDd, mais uma vez apresentando uma composição atípica para polímeros produzidos por *P. aeruginosa*.

Tabela 5.15- Resultados da composição do PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI B1-3 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Experimento	[] (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	[] Glicerol inicial (g/L)	HB (mol%)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)
1	0,5	10	7,43	< ld	19,97	55,59	17,00
2	0,5	20	< ld	< ld	23,18	57,65	19,17
3	0,5	30	< ld	< ld	17,70	63,56	18,73
4	1,0	10	< ld	< ld	< ld	55,43	44,57
5	1,0	20	< ld	< ld	< ld	59,58	40,42
6	1,0	30	< ld	< ld	16,45	61,66	21,88
7	1,5	10	< ld	< ld	< ld	59,22	40,78
8	1,5	20	< ld	< ld	< ld	59,47	40,52
9	1,5	30	< ld	< ld	< ld	56,87	43,13
10	1,0	20	< ld	< ld	< ld	59,61	40,38
11	1,0	20	< ld	< ld	< ld	59,30	40,70
12	1,0	20	< ld	< ld	< ld	56,57	43,43

HB = 3-hidroxibutirato **HHx** = 3-hidroxihexanoato **HO** = 3-hidroxiocetanoato

HD = 3-hidroxidecanoato **HDd** = 3-hidroxidodecanoato

Realizou-se a regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, a partir dos valores obtidos nos experimentos de *P. aeruginosa* B1-3, resultando na seguinte equação geral para a síntese de PHAs:

$$Y = 0,093661 - 0,007220X_1 - 0,001712X_2 - 0,030949X_1^2 + 0,008647X_1X_2 - 0,008174X_2^2 \quad (5.17)$$

Na tabela 5.16, na análise de variância realizada o valor de F calculado ($F_C = 13,73$) maior que F tabelado ($F_{5,6;0,05} = 4,39$) confirma a validade do modelo obtido, o qual se ajusta a 91,96% da variabilidade dos resultados observados, segundo coeficiente de determinação (R^2)

Tabela 5.16-Análise de variância para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI B1-3 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _C	p-valor
Regressão	0,004209	5	0,000842	13,73453	0,003102
Resíduos	0,000368	6	0,000061		
Total	0,004577				

$R^2=91,96\%$; $F_{5,6;0,05}=4,39$

A Figura 5.8 apresenta uma comparação entre os valores observados nos experimentos e aqueles preditos pela equação geral, notando-se uma proximidade entre as respostas e os valores fornecidos pela equação geral.

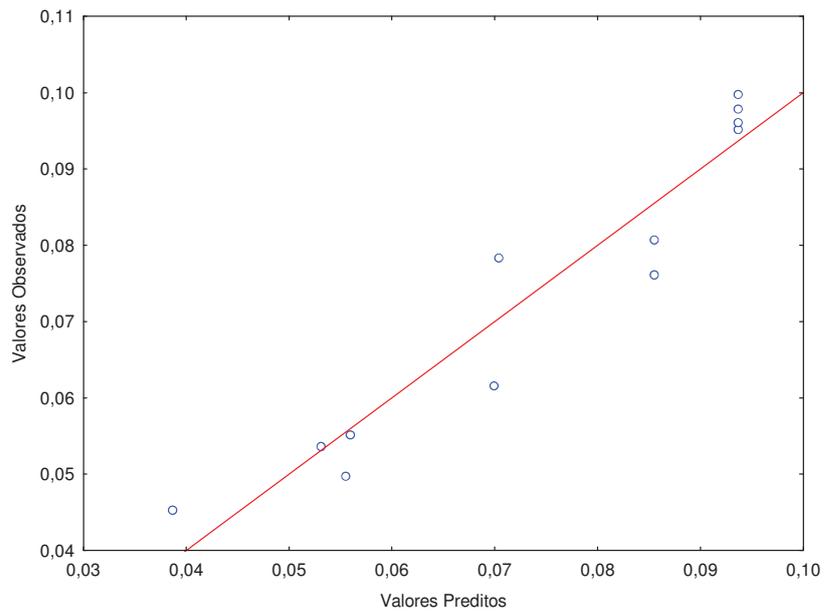


Figura 5.8-Valores observados em função dos valores preditos para a produção de PHAs, obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI B1-3 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Nesta equação foram desconsiderados os parâmetros com nível de significância do teste t de Student superiores a 5%, sendo eliminadas as variáveis relacionadas aos mesmos (Tabela 5.17).

Tabela 5.17- Resultados da regressão múltipla para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI B1-3 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Fator	Parâmetro	t de student	p-valor
Constante β_0	0,090936	20,54576	0,000000
X_1^2	-0,033674	-5,37981	0,000310
$R^2=0,74$	$F_C = 28,94$		$F_T(0,05) = 4,96$

O coeficiente de correlação (R^2) de 0,74 indica um ajuste satisfatório dos dados experimentais para a resposta avaliada. Os resultados de F calculado (F_C) e F tabelado (F_T) demonstraram uma confiança de 95% de significância do modelo obtido.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, conforme apresentado na Tabela 5.17, obteve-se a seguinte equação ajustada:

$$Y = 0,090936 - 0,033674X_1^2 \quad (5.18)$$

Na Figura 5.9, observa-se na superfície de resposta, obtida através da equação ajustada, que a variável concentração de glicerol (X_2) não exerce efeito significativo sobre a produção de PHAs por *P. aeruginosa* LMI B1-3, sendo a interação quadrática da variável concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_1^2) determinante na produção de polímero.

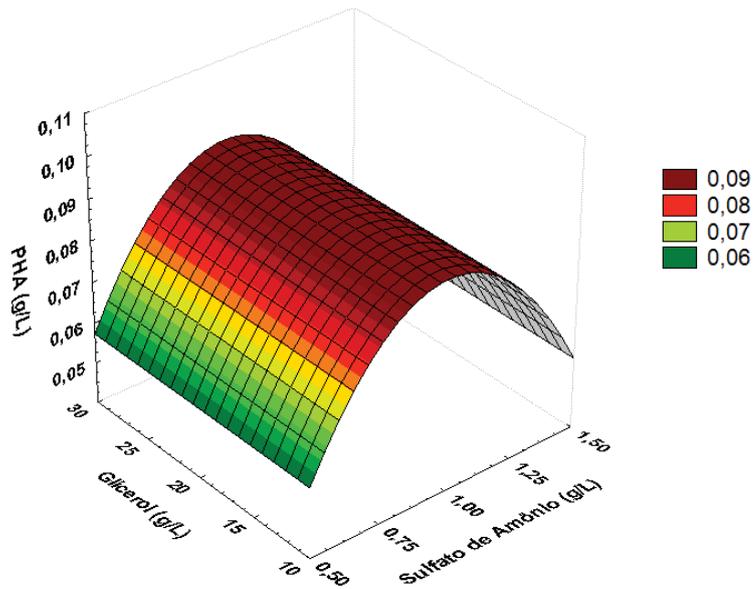


Figura 5.9-Superfície de resposta para a produção de PHAs em função das concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e glicerol nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI B1-3 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

5.3.1.5. Resultados do planejamento fatorial completo utilizando *P. aeruginosa* LBI

Na Tabela 5.18, encontram-se os valores das respostas obtidas na produção de PHAs pela linhagem *P.aeruginosa* LBI.

Tabela 5.18-Resultados dos cultivos de *P.aeruginosa* LBI em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Experimento	[] (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	[] Glicerol inicial (g/L)	Consumo de Glicerol (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
1	0,5	10	6,71	6,57	1,21	5,43	0,066	1,14
2	0,5	20	7,49	6,52	1,18	4,95	0,058	1,12
3	0,5	30	8,26	6,51	1,22	3,89	0,047	1,17
4	1,0	10	8,53	5,14	1,78	3,56	0,063	1,72
5	1,0	20	10,16	5,15	3,80	2,81	0,107	3,70
6	1,0	30	15,13	5,65	2,17	3,26	0,071	2,10
7	1,5	10	8,56	5,14	1,71	4,06	0,069	1,64
8	1,5	20	9,75	5,13	2,20	3,48	0,077	2,12
9	1,5	30	9,27	4,88	2,42	2,84	0,069	2,35
10	1,0	20	10,10	4,92	4,27	2,48	0,106	4,16
11	1,0	20	10,07	5,02	3,75	2,88	0,108	3,64
12	1,0	20	9,93	5,28	3,32	2,89	0,096	3,22

Neste planejamento foram encontrados os maiores valores para a produção de PHAs no ponto central (1,0 g/L de (NH₄)₂SO₄ e 20 g/L de glicerol), com produções de polímero próximas de 0,11 g/L. A proporção de monômeros obtida nos experimentos realizados pode ser observada na Tabela 5.19, estando concentrada nos monômeros HD e HDd, com apenas aparecimento de HO na concentração de 0,5 g/L de (NH₄)₂SO₄.

Tabela 5.19- Resultados da composição do PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LBI em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Experimento	[] (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	[] Glicerol inicial (g/L)	HB (mol%)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)
1	0,5	10	< ld	< ld	22,44	62,01	15,56
2	0,5	20	< ld	< ld	27,31	57,00	15,69
3	0,5	30	< ld	< ld	19,52	63,41	17,07
4	1,0	10	< ld	< ld	< ld	70,27	29,73
5	1,0	20	< ld	< ld	< ld	64,34	35,65
6	1,0	30	< ld	< ld	< ld	68,04	31,96
7	1,5	10	< ld	< ld	< ld	75,09	24,90
8	1,5	20	< ld	< ld	< ld	73,72	26,27
9	1,5	30	< ld	< ld	< ld	64,17	35,83
10	1,0	20	< ld	< ld	< ld	68,78	31,22
11	1,0	20	< ld	< ld	< ld	64,52	35,48
12	1,0	20	< ld	< ld	< ld	64,70	35,29

HB = 3-hidroxi butirato

HHx = 3-hidroxi hexanoato

HO = 3-hidroxi octanoato

HD = 3-hidroxi decanoato

HDd = 3-hidroxi dodecanoato

Através da regressão múltipla no programa *Statistica 7.0* obteve-se a seguinte equação geral para a síntese de PHAs:

$$Y = 0,098697 + 0,007226X_1 - 0,0019350X_2 - 0,020400X_1^2 + 0,004440X_1X_2 - 0,020825X_2^2$$

(5.19)

Através dos valores da ANOVA (Tabela 5.20) pode-se observar a validade do modelo obtido, com F calculado maior que F tabelado, além do ajuste satisfatório demonstrado por R^2 , apresentando valor de 80,96%.

Tabela 5.20-Análise de variância para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LBI em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _C	p-valor
Regressão	0,003814	5	0,000763	5,101774	0,035986
Resíduos	0,000897	6	0,000150		
Total	0,004711				

$R^2=80,96\%$; $F_{5,6;0,05}=4,39$

Uma comparação entre os valores observados e preditos pela equação geral empírica permite observar uma proximidade entre os valores das respostas experimentais (Figura 5.10):

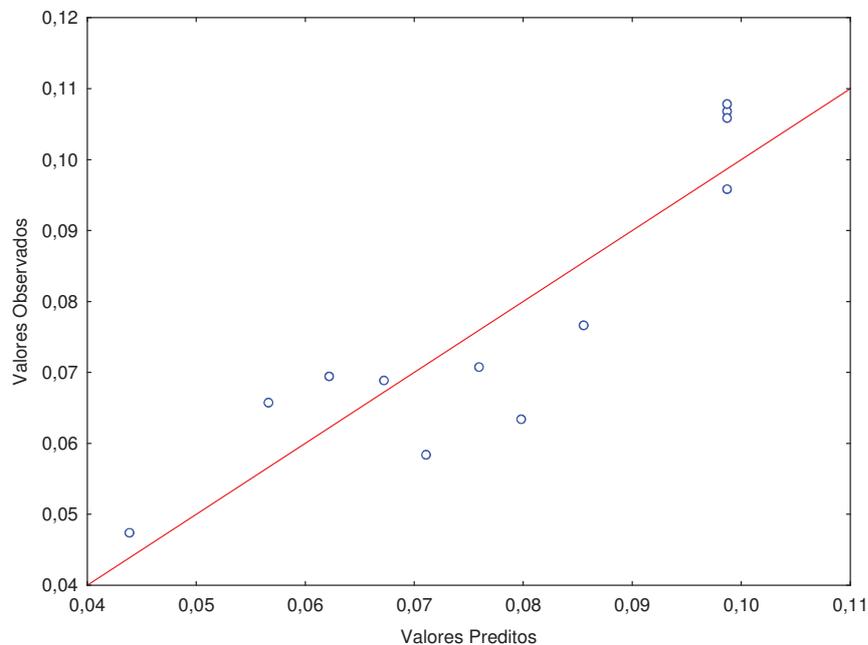


Figura 5.10-Valores observados em função dos valores preditos para a produção de PHAs, obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LBI em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Foram eliminados da equação os parâmetros com nível de significância do teste t de Student superiores a 5%, sendo consideradas apenas as variáveis significativas (Tabela 5.21).

Tabela 5.21- Resultados da regressão múltipla para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LBI em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

Fator	Parâmetro	t de student	p-valor
Constante β_0	0,098697	17,91148	0,000000
X_1^2	-0,020400	-2,75949	0,022131
X_2^2	-0,020825	-2,81697	0,020146
$R^2= 0,72$	$F_C = 11,67$		$F_T(0,05) = 4,26$

Ao eliminar as variáveis não significativas, foi obtido um coeficiente de correlação de 0,72, indicando um ajuste satisfatório dos dados experimentais. O resultado de F calculado (F_C) foi superior ao F tabelado (F_T), demonstrando uma significância de 95% para o modelo obtido.

Portanto, após a eliminação dos parâmetros não significativos, conforme apresentado na Tabela 5.21, obteve-se a seguinte equação ajustada:

$$Y = 0,098697 - 0,020400X_1^2 - 0,020825X_2^2 \quad (5.20)$$

A partir da equação geral (5.19) foi possível a utilização de um algoritmo feito no programa *Maple V Release 4*® para calcular o ponto estacionário para a síntese de PHAs. Os valores de λ 's referentes à síntese de polímero indicaram que esta resposta possui um ponto de máximo, pois $\lambda_1 = -0,02284$ e $\lambda_2 = -0,01838$ apresentaram sinais iguais (negativos).

As coordenadas $X_1 = 0,1741$ e $X_2 = -0,02790$ representam os valores codificados que maximizam a resposta. Assim, utilizando as equações de codificação (5.2) e (5.3), obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização para a síntese de PHA:

$X_1 = 1,087$ g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;

$X_2 = 19,721$ g/L de glicerol.

A partir dos valores codificados das variáveis X_1 e X_2 no ponto de otimização, determinou-se a concentração da produção de PHAs neste ponto, obtendo-se um valor de 0,10 g/L. Como era esperado, a condição de otimização esta próxima dos resultados obtidos nos experimentos 5, 10, 11 e 12; localizados no ponto central deste planejamento.

No objetivo de visualizar com maior facilidade o efeito das variáveis independentes sobre a produção de PHAs, foi construída uma superfície de resposta em função das concentrações de sulfato de amônio e glicerol (Figura 5.11).

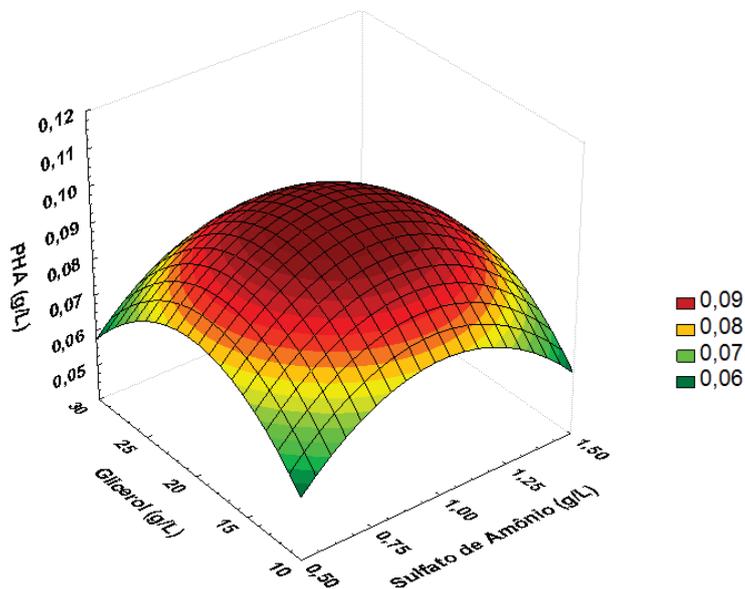


Figura 5.11-Superfície de resposta para a produção de PHAs em função das concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e glicerol nos cultivos de *P.aeruginosa* LBI em meio mineral após 72h, utilizando planejamento fatorial completo.

5.3.1.6. Discussão e considerações finais sobre os cultivos das linhagens de *P. aeruginosa* utilizando planejamento experimental

Como pode ser observado nos experimentos realizados a resposta produção de PHA (g/L) está diretamente relacionada ao valores de biomassa e acúmulo de polímero (% MSC) obtidos nos cultivos. Na maioria das linhagens produtoras de PHAs são observadas maiores quantidades de acúmulo de polímero quando há um excesso de fonte de carbono e o crescimento celular é interrompido pela ausência de um nutriente essencial, como a fonte de nitrogênio (LEE, 1996). Contudo, um aumento nos valores de biomassa é obtido quando há uma maior oferta da fonte de nitrogênio. Assim, torna-se um desafio associar o acúmulo de polímero ao crescimento celular, na busca de uma melhor resposta, pois as concentrações de fonte de nitrogênio com o maior acúmulo de polímero são limitantes para o crescimento bacteriano, com menores valores de MSC. Com isso, pode-se inferir que há efeitos antagônicos entre os níveis da variável sulfato de amônio, sendo necessário a obtenção de um valor de concentração desta fonte de nitrogênio, onde estes efeitos sejam minimizados para a produção de biomassa e acúmulo de polímero. Ao mesmo tempo, através do planejamento fatorial realizado, pode-se descobrir a influência do glicerol na obtenção de PHAs, verificando em qual concentração desta fonte de carbono ocorrerá uma maior produção de polímero, além dos efeitos simultâneos exercidos pelas variáveis glicerol e sulfato de amônio.

Os maiores acúmulos do polímero (%MSC) foram alcançados nas menores concentrações de sulfato de amônio (0,5 g/L) e glicerol (10 g/L), com o valor máximo de 10,01 % da MSC, obtido nos cultivos da linhagem LMI 7a. Em contrapartida, nos tratamentos realizados com as 5 linhagens de *P. aeruginosa*, utilizando-se 0,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, observou-se que os valores de acúmulo de polímero, assim como a MSC, pouco variaram em relação ao aumento das concentrações de glicerol empregadas nos cultivos. Uma maior influência desta variável só pôde ser verificada nos experimentos com concentrações de 1,0 e 1,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com aumentos nos valores de biomassa. Uma hipótese para tal resultado, seria um maior direcionamento da fonte de carbono para o crescimento celular, assim que maiores quantidades de fonte de nitrogênio são disponibilizadas. Os maiores valores de MSC foram obtidos nos pontos centrais, utilizando-se 20 g/L de glicerol e 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com exceção da linhagem LMI 6c, a qual apresentou um discreto e constante aumento da MSC, atingindo o máximo valor nas concentrações de 30 g/L de glicerol e 1,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Portanto, embora o maior acúmulo de polímero tenha sido observado nas menores concentrações da fonte de nitrogênio, devido aos maiores valores de MSC

encontrados em concentrações de sulfato de amônio de 1,0 a 1,5 g/L, verificou-se que as maiores produções de PHA (g/L) dividiram-se entre os tratamentos realizados, com valores máximos para LMI 6c, B1-3 e LBI na concentração de 1,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, enquanto LMI 7a e L2-1 apresentaram maior produção em 0,5 g/L desta fonte de nitrogênio, sendo o maior valor alcançado por *P. aeruginosa* LMI 6c (0,14 g/L).

Na maioria dos experimentos realizados observou-se uma proporção e uma composição atípica entre os tipos de monômeros obtidos. Como foi mencionado no item 5.3.1.1, a síntese de PHAs-mcl é dividida em dois grandes tipos, com base no substrato fornecido. O primeiro é conhecido como síntese a partir de substratos relacionados, com a composição do polímero estruturalmente relacionado ao substrato utilizado. O outro tipo é conhecido como síntese a partir de substratos não relacionados, onde os substratos são metabolizados a acetil-CoA para a produção do polímero. O glicerol está entre os substratos não relacionados, sendo utilizado como fonte de carbono para a síntese de PHAs-mcl com uma composição de monômeros, geralmente, formado de HD (~70%), HO (~20-25%), HHx (~5%) e HDd (~5%) (HUIJBERTS et al., 1992). Na maioria dos planejamentos experimentais realizados, há uma tendência no acúmulo de HD, porém com maiores proporções de HDd. Esses resultados também foram observados por Strelec (2006) através do emprego de carboidratos como fonte de carbono em seus cultivos. Tal diferença na proporção entre estes monômeros poderia ser atribuída a uma deficiência na assimilação da fonte de carbono na formação de um polímero típico, pois se observa frações residuais de HHx e HO, principalmente, em concentrações menores de sulfato de amônio, quando um maior acúmulo de polímero seria favorecido.

Nos experimentos, também nota-se uma quantidade expressiva de HB (PHA-scl), dificilmente produzido por linhagens selvagens de *Pseudomonas aeruginosa*. A produção simultânea de HB e PHAs-mcl na composição do polímero obtido envolve a síntese de dois tipos diferentes de PHA sintases, o que sugere a expressão de dois genes diferentes responsáveis pela produção dessas enzimas (REHM et al., 2002). Porém, ainda não se pode afirmar a presença de duas PHA sintases envolvidas na formação do polímero obtido, pois a metodologia de análise deste, através de cromatografia gasosa, utiliza células liofilizadas na reação de propanólise, sendo o produto da extração analisado diretamente. Neste caso, diante do baixo acúmulo de polímero observado, outros componentes celulares poderiam apresentar o mesmo tempo de retenção do monômero HB. Portanto, uma análise mais precisa da composição do polímero, exigiria um procedimento de purificação do mesmo, para depois ser submetido à reação de propanólise e, então, ser analisado em cromatógrafo gasoso.

Costa et al. (2009) ao realizar cultivos com *P. aeruginosa* LMI 6c, 7a, L2-1 e B1-3 (quatro das linhagens avaliadas neste estudo) em meio salino a 30°C, utilizando 20 g/L de glicerol e 4 g/L de NaNO₃, obtiveram valores de massa seca celular de 3,7; 3,8; 3,1 e 3,4 g/L; respectivamente, após 120 h de cultivo. Para a linhagem L2-1, o consumo total de glicerol foi verificado após 72 h de cultivo. Neste trabalho, foram obtidos para a mesma concentração de glicerol (20 g/L), porém, utilizando 1 g/L de (NH₄)₂SO₄, valores de MSC de 1,78; 3,21; 3,15; 3,98 e 4,27 g/L para as linhagens 6c, 7a, L2-1, B1-3 e LBI, respectivamente, após 72 h de cultivo, quando foi verificado um perfil de consumo de glicerol em torno de 50% para as 5 linhagens avaliadas. Portanto, neste estudo desenvolvido, valores de MSC próximos daqueles obtidos por Costa et al. (2009) foram alcançados, utilizando uma concentração menor de fonte de nitrogênio e com a metade do consumo de fonte de carbono. As linhagens LMI B1-3 e L2-1 também apresentaram valores na produção de PHAs (g/L) próximos daqueles observados por Costa et al. (2009). Porém, as linhagens *P. aeruginosa* LMI 6c e 7a, apresentaram valores mais baixos para a produção do polímero; pois mesmo diante de valores de MSC aproximados, nos experimentos de Costa et al. (2009), foram obtidos valores superiores no acúmulo de PHAs, com LMI 6c e 7a apresentando valores de 22,2 e 16,8% da MSC, respectivamente.

Além de uma deficiência na assimilação da fonte de carbono utilizada, uma hipótese para explicar os valores reduzidos de acúmulo de polímero obtidos nos cultivos das linhagens de *P. aeruginosa*, também poderia ser a concorrência por intermediários da síntese de PHAs comuns à produção de outros metabólitos, tais como ramnolipídios, também obtidos em cultivos de espécies de *P. aeruginosa*. Em seus cultivos, Strelec (2006) observou que as linhagens de *P. aeruginosa* com produção de ramnose acima de 150 mg/L apresentavam teores de PHA sempre inferiores a 15% da MSC, sugerindo uma incorporação de 3-hidróxialcanoatos para a síntese de ramnolipídios. Hori et al. (2002) observaram em seus experimentos uma síntese de PHAs apenas durante a fase de crescimento bacteriano. Após, a produção do polímero era cessada, mesmo diante da oferta de fonte de carbono. Este fato foi justificado pela transferência de 3-hidróxialcanoatos exclusivamente para a síntese de ramnolipídios, resultando em valores de acúmulo do polímero abaixo de 10% da MSC. Neste trabalho, os resultados poderiam seguir esta tendência, cujo teor máximo de polímero atinge cerca de 10%, fundamentando-se no fato de que as linhagens avaliadas são consideradas boas produtoras de ramnolipídios (BENINCASA et al., 2002; COSTA et al, 2008; COSTA et al., 2009). Quando carboidratos, ou outros substratos como o glicerol, metabolizados a acetil-CoA são utilizados, os produtos dos genes *phaG* e *rhlA* têm sido associados à transferência de

intermediários da biossíntese de ácidos graxos para síntese de PHAs (REHM et al., 2002) e ramnolipídios (ZHU & ROCK, 2008), respectivamente. Portanto, as sínteses de PHAs e ramnolipídios devem sofrer interferência mútua, com o metabolismo destes produtos envolvendo genes comuns.

5.3.2. Análise dos PHAs de *P.aeruginosa* LMI 6c através de cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Nos cultivos realizados anteriormente com a linhagem *P. aeruginosa* LMI 6c foram verificadas frações do monômero HB. Como já fora mencionado, bactérias da espécie *P. aeruginosa* geralmente produzem PHAs-mcl, dificilmente sendo observadas quantidades significativas do monômero HB. A produção simultânea de HB e PHAs-mcl na composição do polímero obtido envolve a síntese de dois tipos diferentes de PHA sintases, o que sugere a expressão de dois genes diferentes responsáveis pela produção dessas enzimas (REHM et al., 2002). No entanto, não se pode afirmar com certeza a presença de monômeros HB, envolvidos na formação do polímero obtido, pois a metodologia de análise deste, através de cromatografia gasosa, utiliza células liofilizadas na reação de propanólise, sendo o produto da extração analisado diretamente. Neste caso, havia a possibilidade de outros componentes celulares poderem apresentar o mesmo tempo de retenção do monômero HB. Portanto, uma análise mais precisa da composição do polímero, exigiria um procedimento de purificação do mesmo, para depois ser submetido à reação de propanólise, e então, ser analisado através de cromatografia gasosa ou outras técnicas, como a análise por espectroscopia no infravermelho, ressonância nuclear magnética e espectrometria de massas. Dessa forma, realizou-se a extração do polímero produzido por *P. aeruginosa* LMI 6c segundo especificações do item 5.2.7.1, sendo o mesmo submetido a um processo de separação com acetona das frações de PHB e PHA-mcl presentes no polímero extraído. Posteriormente, analisou-se as frações obtidas por cromatografia gasosa de propil ésteres. A fração insolúvel em acetona (PHB) também foi analisada por FTIR, comparando-se o espectro desta com aquele obtido para um padrão de PHB.

Na tabela 5.22 estão presentes os dados da composição das frações insolúvel (PHB) e solúvel (PHA-mcl) em acetona obtidos através da cromatografia gasosa de propil ésteres. Na fração insolúvel observou-se uma composição de 100% de PHB, enquanto na fração solúvel foram obtidas os monômeros HO (34,10 mol%) e HD (65,90 mol%) típicas de PHA-mcl.

Tabela 5.22-Análise da composição das frações solúvel e insolúvel em acetona do PHA obtido nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c.

PHA	HB mol%	HHx mol%	HO mol%	HD mol%	HDd mol%
Polímero insolúvel em acetona	100	0	0	0	0
Polímero solúvel em acetona	0	0	34,10	65,90	0

Como pode ser verificado na Figura 5.12, a semelhança entre os espectros obtidos (“fingerprint”) pode ser considerado como mais um fator contribuinte para evidenciar a produção de PHB pela linhagem em estudo. No espectro obtido, é possível ainda verificar bandas de absorção no comprimento de onda 1720 cm^{-1} , as quais se referem aos grupos carbonilas (C=O), típica de ésteres, neste caso o PHB.

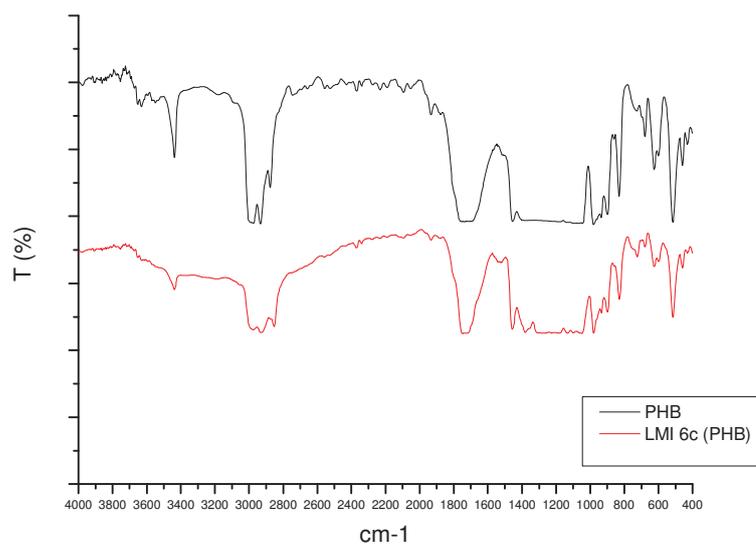


Figura 5.12-Espectro de FTIR da fração insolúvel em acetona (PHB) do processo de extração do PHA-mcl produzido por *P.aeruginosa* LMI 6c em cultivos contendo glicerol, comparado ao padrão PHB.

6. PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR LINHAGENS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* UTILIZANDO GLICEROL DE BIODIESEL E ÓLEO DE SOJA

6.1. Introdução

Atualmente, o continente americano é responsável por aproximadamente dois terços da produção mundial de óleos vegetais, sendo necessária a descoberta de novas aplicações destes produtos, além daquelas relacionadas à indústria de alimentos. Uma alternativa que tem ganhado cada vez mais perspectivas de mercado, é a produção de biodiesel, composto tipicamente de metil ou etil-ésteres obtidos a partir da transesterificação de ácidos graxos (ASHBY, SOLAIMAN & FOGLIA, 2004).

A crescente adoção do biodiesel pelas matrizes energéticas de diversos países tem gerado um aumento na produção de glicerol, despertando o interesse pela criação de técnicas de conversão deste subproduto em produtos com maior valor agregado (SILVA, MACK & CONTIERO, 2009), como a produção de 1,2 e 1,3-propanodiol, ácido succínico, poligliceróis, dihidroxiacetonas e, recentemente, os biopolímeros (PACHAURI & HE, 2006). Entre os biopolímeros provenientes de cultivos bacterianos, os polihidroxicanoatos (PHAs) têm se destacado, devido ao seu potencial na obtenção de termoplásticos biodegradáveis (KAHAR et al., 2004).

Na produção de biodiesel são gerados cerca de 10% de glicerol bruto, cuja composição pode variar de acordo com o tipo de óleo vegetal, do processo de transesterificação e da eficiência de recuperação dos alquil ésteres produzidos. Dessa forma, além de glicerol, este subproduto pode apresentar diferentes teores de água e sais, assim como, ácidos graxos e ésteres residuais (YASDANI & GONZALEZ, 2007). Portanto, a utilização de linhagens bacterianas versáteis é imprescindível para utilizar este subproduto como fonte de carbono na produção de PHAs.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam a capacidade de produzir PHAs de cadeia média (PHAs-mcl) a partir de diferentes substratos, utilizando fontes de carbono hidrofílicas, como o glicerol, assim como ácidos graxos (ASHBY, SOLAIMAN & FOGLIA, 2004). Diante da conhecida versatilidade metabólica destes micro-organismos, este trabalho teve o objetivo de avaliar a produção de PHAs por 2 linhagens de *P. aeruginosa*, utilizando glicerol bruto e óleo de soja nos meios de cultivo para verificar a influência destas fontes de carbono no acúmulo destes polímeros.

6.2. Materiais e Métodos

6.2.1. Meios de Cultivo

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

6.2.1.1. Luria-Bertani

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

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

Triptona..... 10 g/L

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

6.2.1.2. Meio Mineral

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

Na_2HPO_4 3,5 g/L

KH_2PO_4 1,5 g/L

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

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

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

Solução de elementos traços..... 1 mL

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

Solução de elementos traços:

H_3BO_3 0,30 g/L

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,20 g/L

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,10 g/L

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g/L

$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g/L

$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L

Ao Meio Mineral foram adicionadas diferentes concentrações de glicerol, como fonte de carbono, e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como fonte de nitrogênio, para a obtenção das melhores condições na produção de PHAs.

6.2.1.3. Esterilização

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

6.2.2. Micro-organismos

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*. A cepa LMI 6c, proveniente do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI), localizado no Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)-Campus de Rio Claro (SP); e *P. aeruginosa* LDM 03, isolada a partir de lagoa de decantação de manipueira (água residual do processamento de farinha de mandioca), sendo identificada através do sequenciamento do gene 16S rDNA. Estas linhagens bacterianas foram mantidas em placas de Petri, ágar inclinado e preservadas em tubos criogênicos contendo glicerol a 20%, sob congelamento a -20 °C e -80 °C, sendo realizada a manutenção de viabilidade das culturas microbianas periodicamente. Também preservou-se os micro-organismos deste estudo através de liofilização, sendo estocados em ampolas seladas a vácuo e mantidas em refrigerador (5-10 °C).

6.2.3. Isolamento e seleção da linhagem LDM 03

Foram realizados isolamentos a partir de efluentes da produção de biodiesel, sendo utilizadas amostras de glicerol bruto, obtido a partir da transesterificação etanólica de óleo de soja, girassol, canola, algodão, amendoim, óleo de fritura e sebo bovino, fornecidos pela Profa. Dra. Thais Ferreira de Souza Vieira do Laboratório de Óleos e Gorduras, localizado no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição; da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq-USP)-Piracicaba (SP). Além disso, realizou-se o isolamento de micro-organismos a partir de lagoa de decantação de manipueira coletada na fecularia Plaza, situada em Santa Maria da Serra-SP.

Foi realizado isolamento direto de micro-organismos a partir das amostras obtidas. Para tal, transferiu-se 5 g dos subprodutos avaliados para 50 mL de solução salina (NaCl 0,85%) em erlenmeyers de 125 mL, com posterior agitação a 150 rpm durante 2 h, a 30°C. A

partir das soluções obtidas, realizou-se diluições decimais em solução salina até o fator 10^{-6} , sendo alíquotas de 100 μ L transferidas e submetidas ao espalhamento em superfície, em meio mineral sólido, contendo 20 g/L de glicerol e 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As placas foram incubadas a 30°C por até 10 dias, sendo os isolados transferidos para ágar nutriente, incubados a 30°C por até 72 h e estriados até a obtenção de culturas puras.

A seleção de linhagens produtoras de PHAs foi realizada transferindo os microorganismos a ser avaliados para meio mineral, contendo 10 g/L de glicerol e 0,06 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sendo incubados durante 5 dias a 30°C. Após o período de incubação, as linhagens analisadas foram coradas com uma solução de Sudan Black B 0,02% em etanol 96% durante 20 minutos, sendo descorados com etanol por 1 minuto. As colônias bacterianas com coloração azul escura foram consideradas produtoras de PHA (PHA+), enquanto as colônias levemente azuladas ou não coradas foram consideradas não produtoras deste polímero (PHA-) (SCHLEGEL, LAFFERTY & KRAUSS, 1970).

Além disso, o isolado selecionado foi submetido a cultivos em meio mineral em erlenmeyers de 250 mL para verificar o potencial de produção de PHAs. A linhagem avaliada foi estriada em ágar nutriente e incubada por 72 h. As colônias isoladas foram utilizadas para inocular 100 mL de caldo nutriente, sendo incubado por 24 h a 150 rpm e 30°C. Transferiu-se 3 mL do cultivo em caldo nutriente para inocular 100 mL de meio mineral, contendo 20 g/L de glicerol e 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, conduzindo-se este experimento por 72 h, com 150 rpm de agitação, a 30°C. Após o encerramento das fermentações, amostras de cada cultivo foram processadas para a determinação de pH, biomassa, consumo de glicerol e produção de PHAs.

6.2.4. Cultivo de linhagens de *P. aeruginosa* LMI 6c e LDM 03

Após a realização dos cultivos das linhagens de *P. aeruginosa* (Capítulo 05) utilizando planejamento experimental, a cepa LMI 6c foi selecionada para avaliação de sua produção e composição de PHAs em meios de cultivo contendo glicerol bruto, óleo de soja e uma combinação com concentrações equivalentes (g/L) destes dois insumos. Entre os microorganismos isolados neste estudo, a linhagem *P. aeruginosa* LDM 03 foi submetida às mesmas condições de cultivo para verificar seu potencial de produção de PHAs nos substratos avaliados. Para isto, ambas as linhagens foram estriadas, a partir de cultura estoque, em Luria-Bertani (LB) ágar e incubadas por 72 h, utilizando-se colônias isoladas para inocular 100 mL de meio LB em erlenmeyers de 250 mL, sendo incubados por 24 h a 150 rpm e 30°C. Transferiu-se 3 mL do cultivo em meio LB para inocular 100 mL de meio mineral, contendo 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 g/L de glicerol bruto, óleo de soja e

uma combinação equivalente de ambos (5/5, 10/10, 15/15, 20/20 e 25/25 g/L), conduzindo-se as fermentações por 72 h, com 150 rpm de agitação, a 30°C. Utilizou-se HCl 2M / NaOH 2M para ajustar o pH inicial dos meios de cultivos para 7,0. Ainda, foram realizados cultivos para verificar a cinética de produção de PHAs pelas linhagens avaliadas, sendo analisadas amostras nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 h. Após o encerramento das fermentações, duas amostras de 10 mL e 90 mL provenientes de cada erlenmeyer, foram centrifugadas a 9410 x g e 10600 x g por 10 minutos, respectivamente. A primeira amostra (10 mL) foi utilizada para a determinação de pH, consumo de glicerol e biomassa. As células da segunda amostra (90 mL) foram congeladas e liofilizadas para a determinação da quantidade e composição de PHAs.

6.2.5. 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, provenientes dos cultivos, foram ressuspensos em água destilada e submetidos à secagem em estufa a 105°C durante 24 h. A biomassa residual (X_R) foi obtida através da diferença entre os valores de massa seca celular e polímero (g/L) obtidos nos cultivos realizados.

6.2.6. Determinação de glicerol e óleo de soja

A determinação das concentrações (g/L) de glicerol foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se o cromatógrafo Prominence UFLC (Shimadzu®), acoplado aos detectores ultravioleta (SPD-20A UV/Vis®) e índice de refração (RID-10A®), equipado com a coluna Rezex ROA (300 x 7,8 mm) (Phenomenex®). As condições empregadas na análise foram: volume de injeção: 20µL; temperatura da coluna (forno): 65°C; e eluente: H₂SO₄ 0,0025M a uma vazão de 0,6 mL/min. A análise das concentrações de óleo de soja residual dos procedimentos fermentativos foi determinada gravimetricamente. Para tal, uma amostra de 10 mL do caldo de cultivo foi centrifugada a 9410 x g durante 10 minutos. O sobrenadante da amostra contendo óleo de soja foi acidificado com HCl 2M até pH 1,0; sendo conduzido a um processo de extração com 5 mL de hexano. A fase superior, contendo hexano solúveis foi transferida para frascos pré-tarados, sendo o hexano evaporado em banho termostaticado a 60°C, em capela. Após, os frascos foram transferidos para estufa a 100°C por 4 horas até peso constante. A quantidade de óleo de soja residual foi calculada através da diferença de peso dos frascos verificada após o processo de extração. Da mesma forma, o consumo dos substratos utilizados nos meio de

cultivo foi calculado através da diferença entre as concentrações iniciais e finais de glicerol e óleo de soja, observadas nos meios de cultivos, para seus respectivos experimentos fermentativos.

6.2.7. Determinação de PHAs

A quantidade e composição de PHAs foram determinadas através de cromatografia gasosa de propil-ésteres (RIIS & MAI, 1988). Entre 10 e 15 mg de células liofilizadas foram submetidas a reação de propanólise em tubos, aos quais se adicionaram 2 mL de uma solução de HCl em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2 dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido benzóico em propanol (40 g/L), como padrão interno. Os tubos foram fechados fortemente, sendo vedados com fita de PTFE, agitados e submetidos a 4 h de reação a 80°C, com agitação após os primeiros 30 minutos de propanólise. Ao final da reação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se 4 mL de água ultrapura aos mesmos, sendo agitados vigorosamente por 30 segundos. Após a separação das fases aquosa (superior) e orgânica (inferior), a primeira foi descartada, utilizando então a fase orgânica para a análise de propil-ésteres. Todas as amostras foram estocadas em vials com septo de PTFE, sendo conduzidas para serem analisadas no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, localizado no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP/ São Paulo-SP), sob supervisão do Prof. Dr José Gregório Cabrera Gomez. 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 Agilent 7890A GC System®, equipado com a coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As temperaturas do injetor e detector (sistema de detecção por ionização de chama-FID) foram 250 e 300°C, respectivamente, utilizando-se hélio como gás de arraste a 0,8 mL/min. As análises foram conduzidas empregando-se um programa de temperaturas do forno com 100°C por 1 minuto, elevando-se a temperatura até 185°C a uma razão de 8°C/min e mantendo-se a 185°C por 15 minutos. Além dos padrões 3HB e 3HB-HV, polímeros produzidos por *Pseudomonas oleovorans* ou *Pseudomonas putida* a partir de diferentes fontes de carbono foram utilizados como padrões para a geração de curvas de calibração (3HHx, 3HHp, 3HO, 3HN, 3HD e 3HDd). O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes verificados nas amostras analisadas, sendo expresso em porcentagem da massa seca celular (PHA%) e em gramas de polímero por litro de cultivo (g/L).

6.2.8. Caracterização da linhagem isolada LDM 03

A linhagem LDM 03, isolada a partir de lagoa de decantação de manipueira foi caracterizada através da coloração de Gram, morfologia celular e testes de catalase e oxidase. Além disso, visando uma melhor caracterização, esta linhagem foi submetida a testes bioquímicos, utilizando-se o kit API 20 NE (Biomérieux®). O kit API 20 NE, geralmente utilizado para identificação de bacilos gram-negativos, é composto de 20 testes bioquímicos, entre ensaios enzimáticos e de assimilação de carboidratos. Para a caracterização através do kit mencionado, o isolado LDM 03 foi cultivado em Luria-Bertani ágar durante 18-24 h. Para o primeiro teste, transferiu-se colônias isoladas para 2 mL de uma solução salina (0,85%), até atingir uma turbidez equivalente a 0,5 na escala McFarland. A suspensão bacteriana obtida foi utilizada para inoculação de tubos com meios seletivos e cúpulas presentes nas galerias dos respectivos testes.

6.2.9. Identificação da linhagem LDM 03 empregando técnicas moleculares

A linhagem bacteriana isolada foi identificada por técnicas moleculares envolvendo a amplificação do gene 16S rDNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior análise de suas sequências (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

6.2.9.1. Extração do DNA da linhagem LDM 03

O isolado LDM 03 foi estriado de cultura estoque em Luria-Bertani ágar durante 72h, a 30°C. As colônias isoladas foram utilizadas para inocular 50 mL de caldo nutriente, sendo cada linhagem cultivada a 150rpm por 24h, a 30°C. Um volume de 2 mL foi transferido para microtubo estéril e centrifugado a 10000 x g durante 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e as células obtidas mantidas em gelo para o início do processo de extração do DNA.

Foram adicionados 50µL de TNES ao conteúdo celular bacteriano, macerando o mesmo. Após, adicionou-se mais 500µL da solução de TNES ao microtubo, agitando-o em vortex por 10 segundos. Para a remoção de proteínas associadas ao DNA, foram adicionados 5µL de proteinase K (20 mg/mL), incubando-se a reação em banho termostático a 55°C, durante 3h. Depois, um volume de 3µL de solução de RNase A (4 mg/mL) foi transferido ao conteúdo dos microtubo, sendo o mesmo agitado por inversão 25 vezes e conduzido em banho a 37°C, por 30 minutos. Terminada a reação, adicionou-se 200µL de NaCl 5M para a

precipitação de proteínas, agitando-se novamente em vortex por 20 segundos e centrifugando o conteúdo a 15000 x g durante 6 minutos. O sobrenadante do processo, no qual se encontra o DNA, foi transferido para novo microtubo, adicionando a este 600µL de isopropanol, agitando-se por inversão e centrifugando a 15000 x g por 5 minutos, para a precipitação do DNA da amostra. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi conduzido em centrífuga a vácuo, por 10 minutos, para secagem, sendo o DNA reidratado com 30µL de TE e ressuspenso em refrigerador durante 12h. Verificou-se a qualidade da extração em gel de agarose 1%, assim como foi efetuada a quantificação de DNA na extração, através de espectrofotometria (Nanodrop®) (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003)

6.2.9.2. Eletroforese em gel de agarose 1% com GelRed ou Brometo de Etídio

O gel de agarose foi preparado adicionando-se 100 mL de TBE 1X a 1g de agarose, sendo fundido em forno microondas e resfriado entre 55°C e 60°C, com inversão do conteúdo ao molde do gel a temperatura ambiente, por 30 a 45 minutos até a total gelificação. Transferiu-se o gel para a cuba de corrida, acrescentando tampão TBE 1X até cobertura do mesmo. Aplicou-se 2µL de marcador molecular 1 Kb DNA ladder (New England BioLabs®), previamente misturado ao tampão de amostra (0,75µL) e ao corante de ácidos nucleicos GelRed (0,75µL). Após, foi aplicada a amostras de DNA misturada ao tampão de amostra (0,75µL) e ao GelRed (0,75µL). Foi aplicado ao gel uma tensão de 100V acompanhando-se a corrida, utilizando como referência os corantes presentes no tampão de amostra. O padrão de migração foi analisado por exposição do gel à luz ultravioleta. Nos géis com brometo de etídio, este foi adicionado à agarose fundida em TBE 1X abaixo de 50°C (0,5µg/mL). Neste caso, não se utilizou GelRed misturado ao marcador molecular e às amostras. Outro procedimento foi a imersão do gel após a corrida em uma solução de brometo de etídio (0,5µL/L) durante 15 minutos, descorando o gel em água destilada por 5 minutos para remoção do excesso de brometo de etídio, para após ser visualizado o padrão de migração em luz ultravioleta (Transiluminador) (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

6.2.9.3. Quantificação de DNA por espectrofotometria (Nanodrop®)

A pureza da amostra de DNA foi avaliada por espectrofotometria na região dos comprimentos de onda ultravioleta. Primeiramente, foram realizadas leituras da amostra a 280 nm (A_{280}) para verificar a presença de proteínas residuais nos processos de extração e purificação de DNA. As leituras realizadas a 260 nm (A_{260}) são específicas para ácidos nucleicos, assim pode-se estabelecer o cálculo da relação A_{260}/A_{280} para observar o grau de pureza do DNA analisado, esperando-se valores de 1,8-1,9. Estas análises foram efetuadas em Nanodrop 2000C (Thermo Scientific®). Dessa forma, 1 μ L de TE foi utilizado no pedestal para zerar o aparelho, sendo aplicado 1 μ L da amostra sucessivamente, permitindo a realização das análises espectrofométricas e observação da relação A_{260}/A_{280} , para obter os valores de quantificação e pureza do DNA presente na amostra avaliada (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

6.2.9.4. Amplificação do gene 16S rDNA utilizando PCR

O gene 16S rDNA presente na amostra de DNA, proveniente da linhagem LDM 03, foi amplificado por reação de PCR utilizando o kit Pure Taq Ready-To Go PCR Beads (GE Healthcare®).

Foram utilizados os “primers” 27FA/FC 5’ AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG e 1492RT/RC 5’ TACGGT/CTACCTTGTTACGACTT. Esses conjuntos de iniciadores permitem a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 1500 pares de bases (bp) do gene 16S rDNA (numeração relativa a sequência do gene de *E. coli*). Para a reação de PCR, foi adicionado ao microtubo 2 μ L do kit, contendo a enzima Taq-polimerase (1 Bead); 1 μ L de cada “primer” (10pmol/ μ L); 0,2 μ L das amostras de DNA e 18,8 μ L de água ultrapura, totalizando 25 μ L de volume reacional.

A reação de PCR foi conduzida em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient®) nas seguintes condições de tempo e temperatura: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos, com desnaturação a 95°C por 1 minuto, pareamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos. O produto da PCR foi posteriormente analisado em gel de agarose 1% (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

6.2.9.5. Purificação do produto da PCR

Após a amplificação do gene 16S rDNA da linhagem LDM 03; o produto da PCR foi purificado utilizando o kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®).

Tal procedimento foi iniciado com a adição de 500µL de tampão de captura 3 ao produto da PCR, agitando-se em vortex, e então, transferindo o conteúdo do microtubo da PCR para uma coluna GFX MicroSpin, mantida em tubo coletor, sendo este centrifugado a 16000 x g por 30 segundos. Descartou-se o filtrado, esvaziando o tubo coletor, permanecendo apenas a coluna de purificação, a qual contém sílica carregada positivamente, onde estaria retido o DNA da amostra. Transferiu-se novamente a coluna para o tubo coletor, adicionando 500µL de tampão de lavagem tipo 1, centrifugando estes a 16000 x g durante 30 segundos. Descartou-se novamente o filtrado, transferindo a coluna para um microtubo de 1,5mL e adicionou-se a esta um volume de 30µL de tampão de eluição tipo 4, incubando-se por 1 minuto, sendo após centrifugada a 16000 x g por 1 minuto para recuperar o DNA purificado. O produto da purificação da PCR foi armazenado em congelador a -20°C, sendo analisado posteriormente em gel de agarose 1% e quantificado em Nanodrop® (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

6.2.9.6. Reação de sequenciamento de DNA

Para a realização do seqüenciamento de DNA utilizou-se o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®).

O sistema de reação de sequenciamento foi constituído de 10 a 40 ng de DNA (1µL das amostras); 3,2 pmol dos “primers” 27FA/FC 5’ AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG e 1492RT/RC 5’ TACGGT/CTACCTTGTTACGACTT; 2,5µL de BigDye 3.1; 2,5µL de Save Money e água ultrapura, suficiente para completar 10µL de volume de reação.

A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient®) nas seguintes condições de tempo e temperatura: 1 ciclo a 96°C por 1 minuto; 25 ciclos, sendo 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A seguir, ao produto da reação foi adicionado 1µL de EDTA 125mM, para a redução da quantidade de terminadores não incorporados, os quais precipitam junto ao DNA e distorcem os dados do sequenciamento. Também, adicionou-se 1µL de acetato de sódio 3M e 60µL de etanol 100%, mantendo-se a temperatura ambiente por 15 minutos na ausência de luz. Após, o produto foi centrifugado a 15000 x g por 25 minutos, com descarte do sobrenadante e adição de 170µL de etanol 70% para a lavagem do “pellet” obtido. Centrifugou-se novamente a amostra a 15000 x g durante 10 minutos, descartando-se novamente o sobrenadante. Os “pellet” obtido, após secagem, foi ressuspenso em 10µL de formamida, sendo a amostra aplicada em

sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems®) (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989; AZEVEDO et al., 2003).

6.2.9.7. Análise das sequencias obtidas

O alinhamento da sequencia obtida e a geração de sequencia consenso foram efetuados através do software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.5.3. A sequencia consenso obtida para o isolado LDM 03 foi comparada com o banco de dados GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando a ferramenta BLASTn para a identificação desta linhagem bacteriana. A sequencia de 16S rDNA com similaridade igual ou superior a 95% foi agrupada dentro da referida espécie. Os valores de similaridade para 16S rDNA utilizados em diferentes trabalhos variam de 80% a 98%, dependendo do objetivo, sendo o valor mínimo de similaridade de 95% para o gene 16S rDNA está de acordo com o valor mínimo de similaridade de 70% para comparação entre genomas completos (LUDWIG et al., 1998; LA SCOLA et al., 2003; SNELL-CASTRO et al., 2005).

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Isolamento e seleção da linhagem LDM 03

Realizou-se o isolamento de micro-organismos a partir de efluentes da transesterificação etanólica de óleos e gorduras, na obtenção de biodiesel. As amostras foram obtidas de glicerol bruto resultante da produção de biodiesel a partir de óleo de soja, girassol, canola, algodão, amendoim, óleo de fritura e sebo bovino. Escolheu-se este efluente, devido à alta concentração de glicerol encontrada, além de outros compostos, como ácidos graxos, sais e ésteres, os quais poderiam estar sendo utilizados como fonte de nutrientes por micro-organismos (ASHBY, SOLAIMAN & FOGLIA, 2004). Porém, o principal objetivo seria a obtenção de isolados produtores de PHAs adaptados ao crescimento em glicerol bruto, sem qualquer tratamento, o que seria algo interessante do ponto de vista econômico e biotecnológico. Também foi realizado o isolamento de micro-organismos a partir de lagoa de decantação de manipueira. A manipueira é um resíduo líquido gerado em grandes quantidades no processamento de farinha de mandioca. Ao lado do trigo, arroz, milho, batata e aveia; a mandioca é uma das seis “commodities” agrícolas mais produzidas em todo mundo, com 160 milhões de toneladas por ano (COSTA et al., 2009). Ainda não são observados muitos estudos utilizando esta fonte de carbono na produção de PHAs, assim como, trabalhos realizados com

micro-organismos produtores isolados a partir deste efluente. Assim, torna-se interessante a investigação de seu potencial biotecnológico.

A partir da técnica utilizada para as amostras mencionadas, foram obtidos 26 micro-organismos, dos quais 4 provenientes de glicerol bruto obtido da produção de biodiesel a partir de óleo de soja, 7 de sebo bovino e 15 isolados proveniente de lagoa de decantação de manipueira. As amostras incubadas obtidas dos outros efluentes avaliados não apresentaram qualquer crescimento microbiano. Tal fato, pode ser atribuído ao pH alcalino apresentado por estes efluentes (8,5-9,2), associado a condições específicas de cultivo, como a utilização de glicerol como única fonte de carbono em meio mineral. O glicerol bruto obtido a partir de óleo de soja e sebo bovino, apresentavam valores de pH igual a 5,0 e 5,5; respectivamente, mais brandos e toleráveis para o crescimento de micro-organismos.

Entre os micro-organismos isolados apenas LDM 03 apresentou reação positiva para o acúmulo de PHAs. Nos cultivos realizados em meio mineral com 20 g/L de glicerol, foi observada uma produção de 0,14 g/L de PHAs, com um acúmulo de 6,53% da MSC. O polímero obtido apresentava em sua composição os monômeros HD (68,67 mol%), HDd (20,66 mol%) e HO (10,67 mol%).

6.3.2. Caracterização e identificação da linhagem LDM 03

Realizou-se a caracterização da linhagem LDM 03, isolada a partir de lagoa de decantação de manipueira através da coloração de Gram, morfologia celular e testes de catalase e oxidase. Além disso, esta linhagem foi submetida a testes bioquímicos, utilizando-se o kit API 20 NE (Biomérieux®). Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 6.1. Através dos dados obtidos neste teste pôde-se também realizar a identificação deste micro-organismo utilizando a base de dados apiweb™, disponibilizado pelo fabricante, obtendo-se para o isolado LDM 03 a espécie *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 6.1- Caracterização da linhagem LDM 03, isolada de lagoa de decantação de manipueira, através do kit API 20 NE.

Teste	Característica	LDM 03	Teste	Característica	LDM 03
1	Coloração de Gram	-	13	D-glicose	+
2	Morfologia celular	bastonete curto	14	L-arabinose	-
3	Catalase	+	15	D-manose	-
4	Oxidase	+	16	D-manitol	+
5	Redução de nitrato	+	17	N-acetil-glicosamina	+
6	Formação de indol (Triptofano)	-	18	D-maltose	-
7	Fermentação de glicose	-	19	Gluconato de potássio	+
8	Hidrólise de arginina	+	20	Caprato	+
9	urease	+	21	Adipato	+
10	β -glicosidase	+	22	Malato	+
11	Hidrólise de gelatina	+	23	Citrato	+
12	β -galactosidase	-	24	Fenil-acetato	-

A identificação da linhagem isolada LDM 03 foi efetuada por técnicas moleculares, envolvendo a amplificação do gene 16S rDNA, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), para posterior análise de sua sequência genética.

Após os processo de extração do DNA bacteriano, amplificação gênica e purificação do produto da PCR, realizou-se a reação de sequenciamento em termociclador. A seguir, ao produto da reação foi adicionado 1 μ L de EDTA 125mM, reduzindo a quantidade de terminadores não incorporados, os quais podem distorcer os dados do sequenciamento. Por fim, a amostra obtida foi aplicada em sequenciador automático ABI 3500. Após o alinhamento das sequências obtidas e geração da sequência consenso, esta foi comparada com o banco de dados do NCBI através da ferramenta BLASTn. A sequência obtida para a linhagem LDM 03 obteve uma similaridade de 99% com *Pseudomonas aeruginosa*.

6.3.3. Cultivo da linhagem *P. aeruginosa* LMI 6c em meios contendo glicerol bruto e óleo de soja

Após a realização dos cultivos das linhagens de *P. aeruginosa* utilizando planejamento experimental, a cepa LMI 6c foi selecionada para avaliação de sua produção e composição de PHAs em meios de cultivo contendo glicerol bruto, óleo de soja e uma combinação destes dois insumos em concentrações variando de 10 a 50 g/L, assim como foi especificado no item 6.2.4. Além de ter apresentado a maior produção do polímero (g/L), em cultivos realizados anteriormente com *P. aeruginosa* LMI 6c foram observadas concentrações expressivas

(mol%) do monômero HB em sua constituição. Estes resultados despertaram o interesse de avaliar esta linhagem em cultivos com glicerol bruto, obtido através do processo de produção de biodiesel a partir de óleo de soja. Também foram utilizadas como fonte de carbono o óleo de soja e uma mistura equivalente deste insumo com glicerol bruto, devido a conhecida capacidade das linhagens de *P. aeruginosa* na assimilação de óleos e gorduras através da β -oxidação de ácidos graxos, obtendo produções significativas de PHAs (SOLAIMAN, 2006). Ainda, pode ser considerado o fato da produção de biodiesel ser proveniente do processo de transesterificação de óleos e gorduras, sendo o óleo de soja a matéria-prima mais comum na obtenção de biodiesel. Dessa forma, é possível a existência de óleo de soja residual, presente nas águas de lavagem da produção de biodiesel e no próprio glicerol bruto, em processos de escala piloto ou menos elaborados.

Na Tabela 6.2 encontram-se os valores de consumo das fontes de carbono utilizadas, massa seca celular, pH, acúmulo do polímero em percentual da MSC, assim como as produções de PHAs (g/L) observadas nos cultivos.

Tabela 6.2-Resultados dos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral contendo glicerol bruto e óleo de soja a 30°C, após 72h.

[] Glicerol Bruto inicial (g/L)	Consumo de Glicerol (g/L)	[] Óleo de Soja inicial (g/L)	Consumo de Óleo de Soja (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
10	9,50	0	-	6,05	2,11	4,10	0,086	2,02
20	13,80	0	-	6,00	1,91	4,31	0,082	1,83
30	14,12	0	-	5,13	1,83	4,93	0,090	1,74
40	14,50	0	-	5,74	1,78	2,58	0,045	1,74
50	12,40	0	-	5,76	1,57	2,32	0,036	1,53
5	< 1d0	5	3,10	5,82	2,70	9,49	0,256	2,44
10	< 1d0	10	8,00	5,66	2,74	18,21	0,499	2,24
15	1,85	15	4,79	5,38	1,75	12,39	0,217	1,53
20	5,80	20	11,61	5,55	2,38	12,13	0,289	2,09
25	5,97	25	18,52	5,52	2,54	10,42	0,265	2,28
0	-	10	8,64	6,31	1,53	5,37	0,082	1,45
0	-	20	16,02	5,40	3,64	19,09	0,695	2,95
0	-	30	26,32	5,43	3,15	54,39	1,713	1,44
0	-	40	30,45	5,59	2,97	45,18	1,342	1,63
0	-	50	34,30	5,73	2,92	21,93	0,640	2,28

A partir dos dados obtidos nos cultivos de LMI 6c pode ser observada uma maior afinidade na assimilação de óleo de soja como fonte de carbono. Em concentrações equivalentes de glicerol bruto e óleo de soja, a linhagem avaliada consome apenas este último insumo em concentrações de 10 e 20 g/L desta mistura, passando a consumir glicerol apenas nos cultivos com concentrações de 30 a 50 g/L em quantidades significativamente menores que o consumo de óleo de soja, quando pôde ser verificado uma diminuição nos valores de biomassa e acúmulo de polímero. Em cultivos contendo somente óleo de soja nota-se o maior acúmulo intracelular do polímero (54,39% da MSC) e produção de 1,71 g/L. O percentual máximo da MSC obtido neste estudo é superior àqueles apresentados por Costa et al. (2009), utilizando óleo residual de fritura para esta linhagem (48,4% da MSC), além das cepas *P. aeruginosa* 7a (50,4%), L2-1 (43%) e B1-3 (44,2%). Tais resultados, também podem ser comparados com os teores de PHAs observados nos experimentos de Silva & Queiroz (2003) com *Pseudomonas putida* a partir de óleos vegetais, atingindo valores de até 50% da MSC.

Ashby, Solaiman & Foglia (2004) realizaram cultivos com linhagens de *P. corrugata* e *P. oleovorans* em meio E*, com 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, utilizando glicerol bruto (subproduto de usina de biodiesel com 40% de glicerol e 36% de ácidos graxos e ésteres) para a produção de PHAs. Os experimentos foram conduzidos a 30°C por 72 h, variando-se concentrações de glicerol bruto de 1 a 5%, assim como nos cultivos com *P. aeruginosa* LMI 6c realizados neste trabalho. A linhagem *P. oleovorans* apresentou valores de MSC próximos de 1,3 g/L para todas as concentrações utilizadas. Porém, valores próximos daqueles apresentados neste estudo foram observados nos cultivos com *P. corrugata*, com o máximo valor de MSC (2,1 g/L) obtido em uma concentração de 1% de glicerol bruto, decaindo constantemente em concentrações mais elevadas, até atingir 1,7 g/L. Também pôde ser observado que o consumo de glicerol, presente no subproduto utilizado em cultivo, apresentava valores próximos até concentrações de 2% para *P. corrugata* e 3% para *P. oleovorans*, diminuindo para maiores concentrações de glicerol bruto. A maior produção de polímero foi verificada em 5% de glicerol bruto para *P. oleovorans* (0,4 g/L) e em 2% deste insumo para *P. corrugata* (0,7 g/L). Nos experimentos realizados com a linhagem LMI 6c obteve-se produções de PHAs inferiores ao utilizar apenas glicerol bruto como fonte de carbono nos meios de cultivo. Este resultado pode ser atribuído a diferença de composição dos insumos empregados nos cultivos. Enquanto o glicerol bruto utilizado nos experimentos deste presente trabalho é constituído de 74,05% de glicerol, não sendo observada a existência de compostos solúveis em hexano, como ácidos graxos (óleos) ou ésteres (biodiesel); o glicerol bruto empregado nos ensaios de Ashby, Solaiman & Foglia (2004) era praticamente constituído de uma mistura equivalente de

glicerol (40%) e ácidos graxos/ésteres (36%). Comparando-se os resultados apresentados por *P. aeruginosa* 6c no experimento contendo uma mistura glicerol bruto/óleo de soja em uma concentração de 2% (20 g/L) obtém-se uma quantidade de polímero (0,5 g/L) intermediária àquelas observadas em *P. oleovorans* (0,4 g/L) e *P. corrugata* (0,7 g/L) nos ensaios realizados por estes autores.

A síntese de PHAs-mcl é dividida em dois grandes tipos com base no substrato fornecido. A produção do polímero a partir de óleo de soja configura o primeiro tipo, definido como síntese a partir de substratos relacionados, com a composição do polímero estruturalmente relacionado ao substrato utilizado. O outro tipo, conhecido como síntese a partir de substratos não relacionados, onde a fonte de carbono é metabolizada a acetil-CoA, para a obtenção do polímero (HUIBERTS et al., 1992). É o caso da produção de PHAs empregando glicerol nos meios de cultivo. Nos experimentos com *P. aeruginosa* 6c, assim como nos planejamentos fatoriais realizados neste trabalho (Capítulo 05), observa-se uma composição de PHAs-mcl essencialmente constituída de HD e HDd, quando se utiliza apenas glicerol como fonte de carbono na obtenção destes polímeros, com uma maior quantidade deste primeiro monômero. Ao empregar uma mistura de glicerol bruto e óleo de soja nos cultivos mencionados, a linhagem avaliada passa a assimilar preferencialmente o óleo de soja e percebe-se um polímero de composição típica, constituído principalmente de HD, porém, com a presença de monômeros secundários como HHx, HO e HDd em proporções próximas àquelas propostas por Hujberts et al. (1992). Nos ensaios realizados por Silva & Queiroz (2003) e Strelec (2006) com linhagens de *Pseudomonas*, foram observados uma preferência na incorporação de monômeros HHx e HO, além de aumentos nas frações de HO e redução na fração de HD, quando óleo de soja era utilizado como fonte de carbono em comparação a carboidratos. Neste trabalho, também foi observada a presença de monômeros de HO na formação de PHAs-mcl, a partir da introdução de óleo de soja nos meios de cultivo. Quando este insumo foi utilizado como única fonte de carbono, verificou-se também uma redução na fração de HD. No entanto, ao invés de ocorrer um aumento de HO, foram observados maiores teores do monômero HDd. Todos estes resultados apresentados podem ser verificados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3- Resultados da composição do PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral contendo glicerol bruto e óleo de soja, após 72h.

[] Glicerol inicial (g/L)	[] Óleo de Soja inicial (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)
10	0	4,10	0,086	9,45	< ld	69,15	21,40
20	0	4,31	0,082	< ld	< ld	56,5	43,5
30	0	4,93	0,090	< ld	< ld	48,66	51,34
40	0	2,58	0,046	< ld	< ld	100	< ld
50	0	2,32	0,036	< ld	< ld	100	< ld
5	5	9,49	0,256	2,60	21,31	59,20	16,89
10	10	18,21	0,499	2,56	21,77	64,99	10,68
15	15	12,39	0,217	2,01	16,63	69,7	11,66
20	20	12,13	0,289	2,85	24,79	52,58	19,78
25	25	10,42	0,265	2,66	20,91	52,19	24,24
0	10	5,37	0,0822	< ld	< ld	48,07	51,93
0	20	19,09	0,695	1,44	15,62	47,18	35,76
0	30	54,39	1,713	0,73	6,39	16,95	75,93
0	40	45,18	1,342	0,82	6,97	22,94	69,27
0	50	21,93	0,640	1,08	8,54	35,88	54,50

HHx = 3-hidroxi-hexanoato **HO** = 3-hidroxi-octanoato

HD = 3-hidroxi-decanoato **HDd** = 3-hidroxi-dodecanoato

A partir dos melhores resultados observados em experimentos anteriores com a linhagem LMI 6c foram realizados cultivos para verificar a cinética de produção e composição de PHAs nas concentrações de 10 g/L de glicerol bruto e 30 g/L de óleo de soja. Ainda foi avaliada uma combinação equivalente de ambos na concentração de 20/20 g/L, quando em experimentos anteriores passou-se a observar um consumo de glicerol, para tentar analisar o consumo de ambas as fontes de carbono na produção de polímeros, em função dos tempos de cultivo. Avaliaram-se as amostras provenientes dos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 h. Os valores de consumo das fontes de carbono utilizadas, pH, MSC, acúmulo de polímero e produção de PHAs (g/L) podem ser observados nas Tabelas 6.4, 6.6 e 6.8; assim como nas Figuras 6.1, 6.2 e 6.3 é possível verificar os perfis de cultivo da linhagem avaliada até 120 h de cultivo. Nas Tabelas 6.5, 6.7 e 6.9 também se pode observar a composição de monômeros presentes nos polímeros obtidos com os diferentes insumos.

Em comparação á cultivos realizados anteriormente, foi observada uma melhora na produção de PHAs pela linhagem LMI 6c em todas as fontes de carbono avaliadas. Em glicerol bruto foram obtidos os valores mais baixos no acúmulo de polímero, MSC e, consecutivamente, as menores produções de PHAs. Observou-se o maior acúmulo de polímero após 72 h de cultivo (10,44%), verificando-se uma queda nas produções até 120 h. Através da figura 6.1 nota-se uma estabilização do crescimento celular após 48 h, sendo os maiores acúmulos celulares de polímero obtidos a partir de 72 h, onde também foi observado um consumo total do glicerol disponível em meio de cultivo. Assim, sugere-se que o micro-organismo avaliado utiliza esta fonte de carbono nas primeiras 48 h priorizando o crescimento celular, para após este período favorecer o acúmulo de polímero. Nos experimentos de Costa et al. (2009) com a linhagem de *P. aeruginosa* L2-1, também foi observada uma estabilização do crescimento celular após 48 h. Porém, os maiores valores de produção de polímero também foram observados neste período, apresentando um queda nos valores obtidos após 48 h de cultivo.

Quanto à composição do polímero obtido, assim como fora observado nos planejamentos experimentais realizados anteriormente, mais uma vez aparecem frações de HB, desta vez em menores proporções, até 72 h de cultivo. Também são produzidos os monômeros HD e HO a partir de 48 h até 120 h. Os monômeros HHx e HDd são observados apenas após 72 h de cultivo e os valores de suas frações aumentam até 120 h, enquanto diminui a quantidade do monômero HD. Nos experimentos analisados aparecem maiores proporções dos monômeros HHx e HDd após o consumo total da fonte de carbono. Também verifica-se frações de HB, principalmente nos primeiros períodos de cultivo. Como fora mencionado antes, a produção simultânea de HB e PHAs-mcl na composição do polímero obtido envolve a síntese de dois tipos diferentes de PHA sintases, o quê sugere a expressão de dois genes diferentes responsáveis pela produção dessas enzimas (REHM et al., 2002). Nestes cultivos a produção de HB parece estar associada ao crescimento, enquanto o aumento das frações de HHx e HDd são observados na fase de acúmulo.

Tabela 6.4-Resultados dos cultivos da linhagem *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral com 10 g/L de glicerol bruto durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	Glicerol Bruto (g/L)	Consumo de Glicerol Bruto (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
0	10,00	0	6,98	0	0	0	0
24	4,80	5,20	6,40	1,44	0,25	0,004	1,44
48	2,41	7,59	6,16	2,28	3,47	0,079	2,20
72	< ld	10,00	6,06	2,18	10,44	0,228	1,95
96	< ld	10,00	6,12	2,52	7,03	0,177	2,34
120	< ld	10,00	4,66	2,02	7,10	0,143	1,88

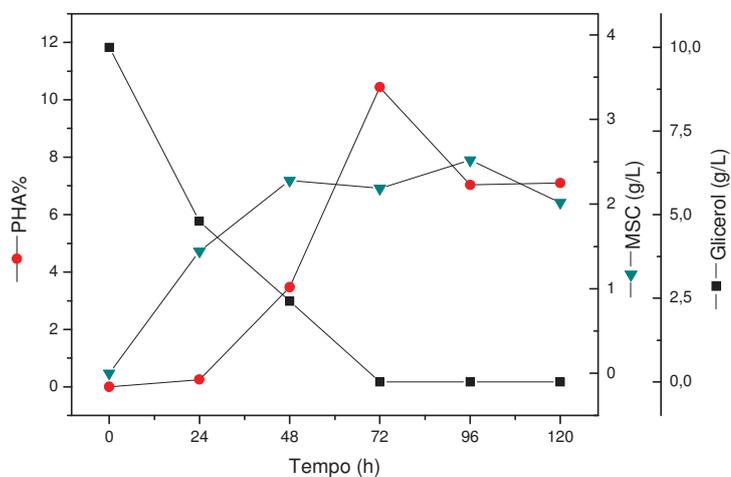


Figura 6.1-Cultivos da linhagem *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral com 20 g/L de glicerol bruto durante 120 h, a 30°C.

Tabela 6.5- Resultados da composição do PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral contendo 10 g/L de glicerol bruto durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	PHA (%MSC)	HB (mol%)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)	PHA (g/L)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	0,25	100	< 1d	< 1d	< 1d	< 1d	0,004
48	3,47	2,77	< 1d	10,55	86,68	< 1d	0,079
72	10,44	10,06	8,22	16,88	50,60	14,24	0,228
96	7,03	0	6,95	16,14	53,63	23,29	0,177
120	7,10	0	23,61	16,64	34,12	25,62	0,143

Tabela 6.6- Resultados dos cultivos da linhagem *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral com 20 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	Glicero l Bruto (g/L)	Consumo de Glicerol Bruto (g/L)	Óleo de Soja (g/L)	Consumo de Óleo de Soja (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
0	20,00	0	20,00	0	6,98	0	0	0	0
24	12,91	7,09	18,02	1,98	6,03	1,61	0,07	0,001	1,61
48	12,13	7,87	11,40	8,60	6,06	3,38	36,17	1,224	2,16
72	12,06	7,94	10,72	9,28	5,30	3,72	12,85	0,478	3,24
96	12,00	8,00	9,74	10,26	5,14	3,53	13,82	0,488	3,04
120	12,64	7,36	8,82	11,18	6,13	3,55	14,63	0,520	3,03

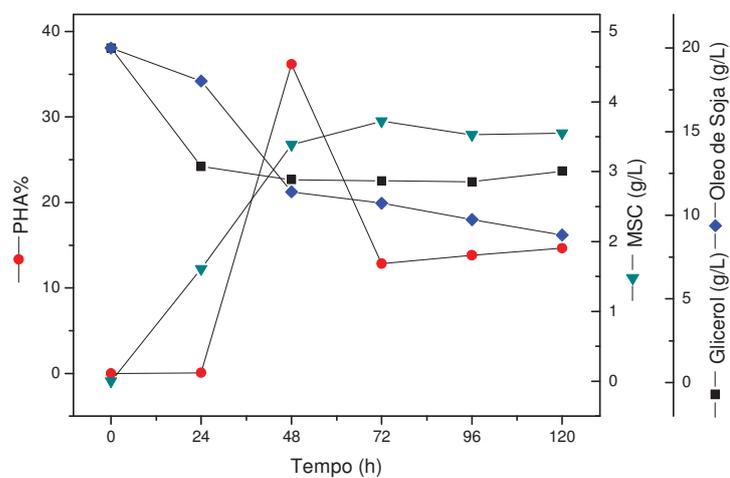


Figura 6.2-Cultivos da linhagem *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral com 20 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°.

Tabela 6.7- Resultados da composição do PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral contendo 20 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	PHA (%MSC)	HB (mol%)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)	PHA (g/L)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	0,07	100	< 1d	< 1d	< 1d	< 1d	0,001
48	36,17	< 1d	< 1d	0,44	32,73	66,82	1,224
72	12,85	< 1d	1,27	9,08	27,53	62,11	0,478
96	13,82	< 1d	< 1d	6,28	42,26	51,46	0,488
120	14,63	< 1d	5,49	3,24	31,36	59,91	0,520

Como se esperava, as maiores produções de PHAs foram observadas nos cultivos com óleo de soja, assim como, havia ocorrido em experimentos anteriores. As linhagens de *P. aeruginosa* apresentam conhecida capacidade de produzir quantidades significativas destes polímeros assimilando óleos e gorduras através da β -oxidação de ácidos graxos (SOLAIMAN et al., 2006). Observa-se a maior produção após 96 h, com 3,58 g/L de polímero, o valor mais alto alcançado nos estudos realizados. Também se verificou neste tempo um valor de MSC (7,58 g/L) associado a um acúmulo de polímero de 47,25%. Estes resultados estão um pouco acima daqueles obtidos por Costa et al. (2009) em cultivos com esta mesma linhagem (3,25 g/L) e *P. aeruginosa* L2-1, 7a e B1-3, utilizando óleo de fritura.

Enquanto nos cultivos realizados com glicerol bruto foram obtidos PHAs-mcl constituídos em sua maior parte pelo monômero HD, nos experimentos com óleo de soja foram observadas quantidade muito reduzidas dos monômeros HHx, HO e HD, apresentando um polímero constituído praticamente de HDd. Esses resultados contrariam àqueles obtidos por outros autores com linhagens de *Pseudomonas*, quando óleo de soja era utilizado como fonte de carbono em comparação a carboidratos, onde foi observada uma preferência na incorporação de monômeros HHx e HO, além de aumentos nas frações de HO e reduções de HD (SILVA & QUEIROZ, 2003; STRELEC, 2006).

Após terem sido analisadas produções de PHAs em glicerol bruto e óleo de soja, foram realizados experimentos em meios de cultivo contendo uma mistura equivalente de ambas as fontes de carbono em concentrações de 20/20 g/L. Os estudos realizados visaram observar a prioridade de consumo dos insumos utilizados em função do tempo de cultivo, assim como os valores de crescimento celular e acúmulo de polímero, na tentativa de melhor entender as produções de PHAs obtidas na combinação destes insumos, a qual aproxima-se da realidade de alguns subprodutos provenientes do processo de transesterificação na obtenção de biodiesel; pois em processo de escala piloto, ou menos elaborados, e até mesmo nas águas de lavagem, é possível a existência de óleo de soja residual, utilizado como matéria-prima para produção deste biocombustível. Nos cultivos realizados com ambas as fontes de carbono foi observada a maior produção de PHAs após 48 h, quando pôde-se notar o maior acúmulo de polímero (36,17%). A partir dos dados visualizados na Tabela 6.6 e através do perfil de cultivo presente na Figura 6.2, é possível perceber uma prioridade desta linhagem em consumir o glicerol na fase de crescimento celular, sendo pouco consumido após 24 h; enquanto o óleo de soja passa a ser consumido preferencialmente na fase de acúmulo do polímero. Quanto à composição do polímero obtido, nota-se um predomínio de monômeros HDd, porém, em menor proporção daquelas observadas nos cultivos com apenas óleo de soja.

Também são verificados em valores decrescentes os monômeros HD, HO, HHx e, interessantemente, HB. Uma pequena fração do monômero HB foi observada nas primeiras 24 h de cultivo, quando se havia consumido principalmente glicerol. Nos experimentos com glicerol bruto, produções de HB foram obtidas até 72 h, posteriormente sendo evidenciada a presença de quantidades crescentes do monômero HHx. Ao utilizar óleo de soja nos cultivos anteriores, não foram verificadas produções de HB, sendo acompanhadas de proporções reduzidas do monômero HHx. Tal resultado sugere a produção deste monômero principalmente pela conversão de glicerol.

Nos experimentos realizados por Ashby, Solaiman & Foglia (2004), com linhagens de *P. corrugata* e *P. oleovorans*, onde foi utilizado como fonte de carbono um glicerol bruto, proveniente de usina de biodiesel, com uma alta concentração de ácidos graxos e ésteres, próxima de uma mistura equivalente de glicerol é óleo de soja, foram obtidas as maiores produções de polímero em 5% deste glicerol bruto para *P. oleovorans* (0,4 g/L) e em 2% deste insumo para *P. corrugata* (0,7 g/L) após 96 h de cultivo. Comparando-se estes dados com o presente estudo realizado, utilizando uma fonte de carbono com proporções semelhantes, foi atingida uma produção superior de polímero (1,22 g/L) após 48 h.

Tabela 6.8-Resultados dos cultivos da linhagem *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral com 30 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	Óleo de Soja (g/L)	Consumo de Óleo de Soja (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
0	30,00	0	6,98	0	0	0	0
24	4,00	26,00	6,18	3,89	17,22	0,669	3,22
48	5,06	24,94	5,52	3,02	31,32	0,947	2,07
72	2,22	27,78	4,68	8,40	29,31	2,462	5,94
96	5,26	24,74	4,67	7,58	47,25	3,584	4,00
120	1,82	28,18	4,90	4,82	49,64	2,392	2,43

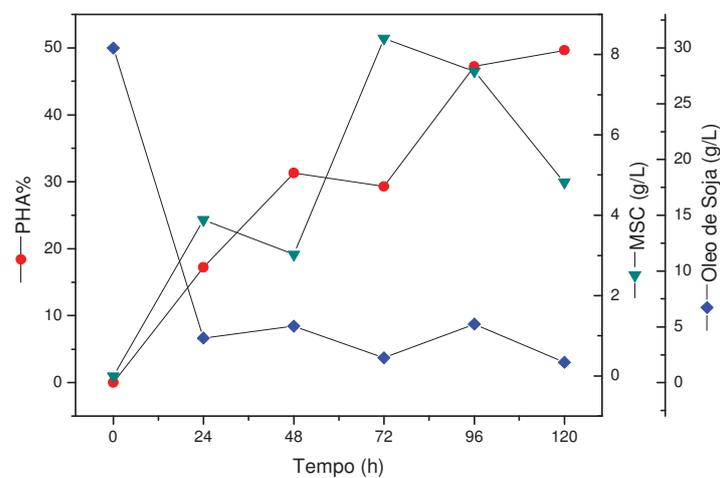


Figura 6.3-Cultivos da linhagem *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral com 30 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°.

Tabela 6.9- Resultados da composição do PHAs obtidos nos cultivos de *P.aeruginosa* LMI 6c em meio mineral contendo 30 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	PHA (% MSC)	HB (mol%)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)	PHA (g/L)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	17,22	< ld	< ld	1,75	5,38	92,87	0,70
48	31,32	< ld	1,55	5,27	8,57	84,61	0,95
72	29,31	< ld	0,54	10,33	10,80	78,32	2,46
96	47,25	< ld	0,79	3,63	6,17	89,41	3,58
120	49,64	< ld	1,39	4,55	7,68	86,38	2,39

6.3.4. Cultivos da linhagem LDM 03 em meios contendo glicerol bruto e óleo de soja

Nos cultivos realizados anteriormente utilizando glicerol puro para a avaliação de linhagens isoladas de diferentes efluentes, a linhagem LDM 03 despertou interesse, por apresentar um polímero típico de PHAs-mcl, constituído principalmente do monômero HD (68,67 mol%) e proporções menores de HDd (20,66 mol%) e HO (10,67 mol%), com valores de produção de PHAs superiores àqueles obtidos nos planejamentos experimentais com linhagens de *P. aeruginosa*. Além disso, todas as características morfológicas, produção de ramnose observados nos cultivos, e produção de pigmentos verde-azulados, apontaram semelhanças deste micro-organismo com bactérias do gênero *Pseudomonas*. Estas suspeitas foram posteriormente confirmadas após sua identificação a partir de técnicas moleculares, cujo resultado apresentou 99% de similaridade com *P. aeruginosa*. Assim, este isolado foi avaliado em meios de cultivo, sendo conduzidas as fermentações até 72 h em meio mineral, contendo 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 g/L de glicerol bruto, óleo de soja e uma combinação equivalente de ambos (5/5, 10/10, 15/15, 20/20 e 25/25 g/L). Segundo especificações do item 6.2.4., ainda foram realizados cultivos para verificar a cinética de produção da linhagem LDM 03 em meio mineral contendo 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ adicionado de 20 g/L de glicerol bruto, 20 g/L de óleo de soja e uma mistura equivalente de ambos, com 10 g/L de glicerol bruto e 10 g/L de óleo de soja; analisando-se amostras nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 h.

Nos experimentos realizados em diferentes concentrações das fontes de carbono avaliadas, as maiores produções de polímero foram obtidas em 50 g/L de glicerol bruto (1,38 g/L), em 25/25 g/L da mistura óleo de soja/glicerol bruto (0,58 g/L) e 20 g/L de óleo de soja (1,42 g/L). Os demais valores obtidos de consumo de glicerol e/ou óleo de soja, pH, MSC e produção de PHAs podem ser observados na Tabela 6.10; assim como, a composição dos polímeros obtidos na Tabela 6.11, para todas as concentrações das fontes de carbono utilizadas em cultivo.

Tabela 6.10- Resultados dos cultivos da linhagem isolada LDM 03 em meio mineral contendo glicerol bruto e/ou óleo de soja após 72 h, a 30°C.

Glicerol Bruto Inicial (g/L)	Consumo de Glicerol Bruto (g/L)	Óleo de Soja Inicial (g/L)	Consumo de Óleo de Soja (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
10	6,03	-	-	6,06	3,14	5,23	0,164	2,98
20	5,13	-	-	6,04	3,70	3,67	0,136	3,56
30	12,32	-	-	5,03	5,18	4,17	0,216	4,96
40	12,43	-	-	5,05	6,22	4,76	0,296	5,92
50	12,43	-	-	4,04	8,81	15,67	1,380	7,43
5	< 1d	5	5,00	5,93	3,14	11,07	0,348	2,79
10	2,23	10	7,90	5,98	4,61	11,66	0,537	4,07
15	9,17	15	7,80	5,04	4,27	9,25	0,395	3,88
20	10,58	20	7,14	6,04	4,68	12,41	0,581	4,10
25	13,47	25	4,78	5,98	5,78	10,18	0,589	5,19
-	-	10	8,20	5,37	4,30	25,00	1,074	3,23
-	-	20	10,82	5,31	4,06	34,99	1,419	2,64
-	-	30	11,46	5,98	3,86	18,82	0,727	3,13
-	-	40	18,08	4,89	3,67	11,97	0,440	3,23
-	-	50	1,44	5,22	3,43	21,24	0,729	2,70

Comparando-se os valores obtidos nos experimentos com glicerol bruto, foram observados maiores valores de MSC, acúmulo e produção de polímero daqueles verificados nos ensaios realizados com a linhagem selvagem LMI 6c, demonstrando que o isolado LDM 03 está mais adaptado ao glicerol bruto. Embora não tenha sido notado um maior consumo significativo de glicerol a partir dos cultivos com 30 g/L deste insumo, notam-se maiores valores de MSC e acúmulo de polímero a medida que se aumenta a concentração de glicerol até 50 g/L.

Tabela 6.11- Resultados da composição do PHAs obtidos nos cultivos da linhagem isolada LDM 03 em meio mineral contendo glicerol bruto e/ou óleo de soja após 72 h, a 30°C.

Glicerol Bruto	Óleo de Soja	PHA	HB	HHx	HO	HD	HDd	PHA
Inicial (g/L)	Inicial (g/L)	(%MSC)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(g/L)
10	-	5,23	< ld	24,20	7,00	44,44	24,36	0,164
20	-	3,67	< ld	< ld	13,42	59,08	27,49	0,136
30	-	4,17	< ld	< ld	6,81	61,54	31,65	0,216
40	-	4,76	< ld	< ld	3,88	52,67	43,45	0,296
50	-	15,67	< ld	6,75	3,66	22,56	67,04	1,380
5	5	11,07	< ld	4,08	2,52	27,45	65,96	0,348
10	10	11,66	< ld	5,05	11,09	66,16	17,70	0,537
15	15	9,25	< ld	4,89	2,75	41,52	50,84	0,395
20	20	12,41	< ld	3,55	12,06	32,41	51,98	0,581
25	25	10,18	< ld	2,57	1,35	57,15	38,94	0,589
-	10	25,00	< ld	1,78	5,11	20,52	72,59	1,074
-	20	34,99	< ld	< ld	4,12	23,83	72,05	1,419
-	30	18,82	< ld	2,47	5,75	41,61	50,18	0,727
-	40	11,97	< ld	7,56	11,02	35,33	46,10	0,440
-	50	21,24	< ld	2,58	6,71	59,74	30,97	0,729

Nos cultivos onde foi analisada a cinética de produção de PHAs para esta linhagem isolada, nas concentrações de 20 g/L das fontes de carbono avaliadas, pôde-se entender melhor o mecanismo de produção destes polímeros. Nos experimentos onde foram adicionados glicerol bruto e óleo de soja em quantidades equivalentes observa-se um consumo reduzido de glicerol a partir de 72 h; por outro lado, todo óleo disponível em cultivo foi consumido após 120 h (Tabela 6.14). No entanto, quando há somente glicerol bruto nos meios de cultivo, praticamente os mesmos valores de MSC foram alcançados (Tabela 6.12). Tal fato sugere que a linhagem avaliada está mais adaptada ao óleo de soja. Porém, quando se dispõe apenas de glicerol no meio de cultivo, esta linhagem assimila esta fonte de carbono preferencialmente para o crescimento celular. Esta hipótese confirma-se mais uma vez ao avaliar os acúmulos, produções e composição de polímeros obtidos em função do tempo. Como pode ser verificado na Tabela 6.16, há um maior acúmulo e produção de PHAs nos

experimentos onde somente óleo de soja está disponível. Contudo, nos cultivos onde glicerol bruto está presente, menores acúmulos de polímero são obtidos. Quanto a composição dos polímeros obtidos (Tabelas 6.13, 6.15 e 6.17), há a presença de monômeros HHx, HO, HD e HDd nos ensaios com óleo de soja, seja este utilizado junto ao glicerol ou separadamente. Nos ensaios com glicerol bruto a presença de HHx só é verificada na menor e maior concentração deste insumo, além disso, foram obtidas maiores proporções do monômero HD (Tabela 6.11). Segundo Huijberts et al. (1992), a síntese de PHAs pode ser dividida em dois tipos, sendo a primeira a partir de substratos relacionados, como hidrocarbonetos e ácidos carboxílicos, obtendo-se um polímero com características estruturais relacionadas à fonte de carbono utilizada. O segundo tipo é conhecida como síntese de PHAs a partir de substratos não relacionados, como glicose, frutose, e no caso deste estudo, o glicerol. Nesta síntese a fonte de carbono utilizada é metabolizada a acetil-CoA e produz um polímero composto principalmente do monômero HD, com outros constituintes secundários como HHx, HO e HDd, além de outros em quantidades reduzidas. Isto pode explicar os resultados obtidos nos experimentos com a linhagem LDM 03 em cultivos com glicerol bruto. Nos ensaios com diferentes concentrações deste insumo adicionado de óleo de soja, nota-se um aumento de HD e diminuição de HDd, a medida que se aumenta a concentração e o consumo de glicerol bruto.

Tabela 6.12- Resultados dos cultivos da linhagem isolada LDM 03 em meio mineral contendo 20 g/L de glicerol bruto durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	Glicerol Bruto (g/L)	Consumo de Glicerol Bruto (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
0	20,00	0	6,98	0	0	0	0
24	19,72	0,28	6,42	1,61	1,74	0,028	1,58
48	17,12	2,88	6,04	3,84	4,13	0,159	3,68
72	14,87	5,13	6,04	3,70	3,67	0,136	3,56
96	13,93	6,07	5,75	4,03	6,06	0,244	3,77
120	13,63	6,37	5,72	4,25	14,65	0,622	3,63

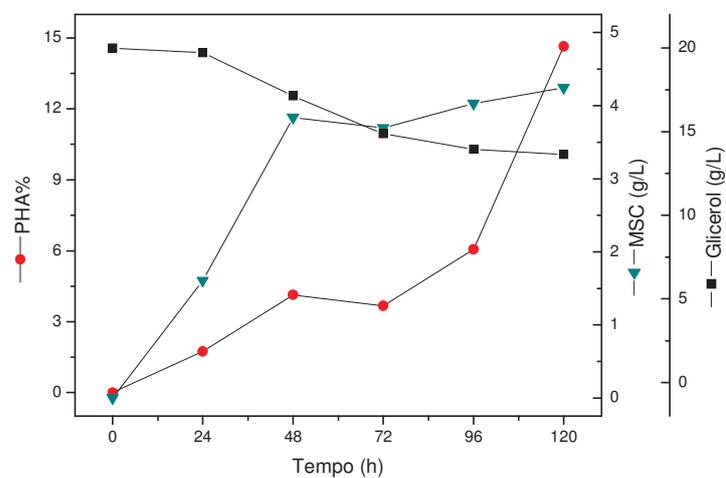


Figura 6.4-Cultivos da linhagem isolada LDM 03 em meio mineral contendo 20 g/L de glicerol bruto durante 120 h, a 30°C.

Tabela 6.13- Resultados da composição do PHAs obtidos nos cultivos da linhagem isolada LDM 03 em meio mineral contendo 20 g/L de glicerol bruto durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	PHA (% MSC)	HB (mol%)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)	PHA (g/L)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	1,74	< 1d	< 1d	< 1d	32,78	67,22	0,028
48	4,13	< 1d	< 1d	7,56	60,38	32,06	0,159
72	3,67	< 1d	< 1d	13,42	59,08	27,49	0,136
96	6,06	< 1d	< 1d	7,76	55,68	36,56	0,244
120	14,65	< 1d	< 1d	8,43	61,55	30,01	0,622

Tabela 6.14- Resultados dos cultivos da linhagem isolada LDM 03 em meio mineral contendo 10 g/L de glicerol bruto e 10 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	Glicerol Bruto (g/L)	Consumo de Glicerol Bruto (g/L)	Óleo de Soja (g/L)	Consumo de Óleo de Soja (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
0	10	0	10,00	0	6,98	0	0	0	0
24	10	< 1d	4,98	5,02	5,97	1,80	2,43	0,044	1,76
48	8,50	1,50	3,60	6,40	6,06	3,72	8,89	0,331	3,39
72	7,77	2,23	2,10	7,90	5,98	4,61	11,66	0,537	4,07
96	7,20	2,80	0,82	9,18	4,89	4,13	12,83	0,530	3,60
120	6,80	3,20	< 1d	10,00	5,43	4,10	8,89	0,365	3,74

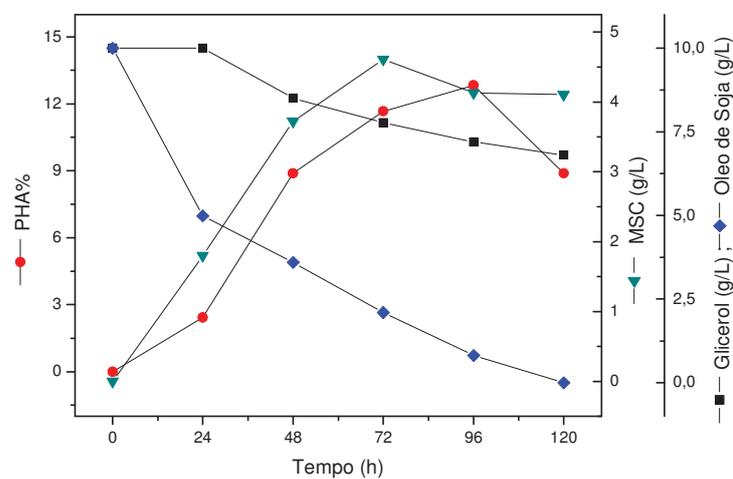


Figura 6.5- Cultivos da linhagem isolada LDM 03 em meio mineral contendo 10 g/L de glicerol bruto e 10 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°C.

Tabela 6.15- Resultados da composição do PHAs obtidos nos cultivos da linhagem isolada LDM 03 em meio mineral contendo 10 g/L de glicerol bruto e 10 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	PHA (%MSC)	HB (mol%)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)	PHA (g/L)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	2,43	< ld	13,05	7,95	54,74	24,26	0,044
48	8,89	< ld	6,92	6,92	66,37	19,79	0,331
72	11,66	< ld	5,046	11,09	66,16	17,70	0,537
96	12,83	< ld	1,91	2,54	37,80	57,75	0,530
120	8,89	< ld	6,92	6,92	66,37	19,79	0,365

Tabela 6.16- Resultados dos cultivos da linhagem isolada LDM 03 em meio mineral contendo 20 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	Óleo de Soja (g/L)	Consumo de Óleo de Soja (g/L)	pH	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	PHA (g/L)	X _R (g/L)
0	20,00	0	6,98	0	0	0	0
24	11,90	8,10	5,93	2,04	17,37	0,354	1,69
48	10,78	9,22	5,62	3,55	21,72	0,771	2,78
72	9,18	10,82	5,31	4,06	34,99	1,419	2,64
96	7,66	12,34	4,90	5,42	16,34	0,886	4,53
120	0,20	19,80	4,89	3,67	9,87	0,363	3,31

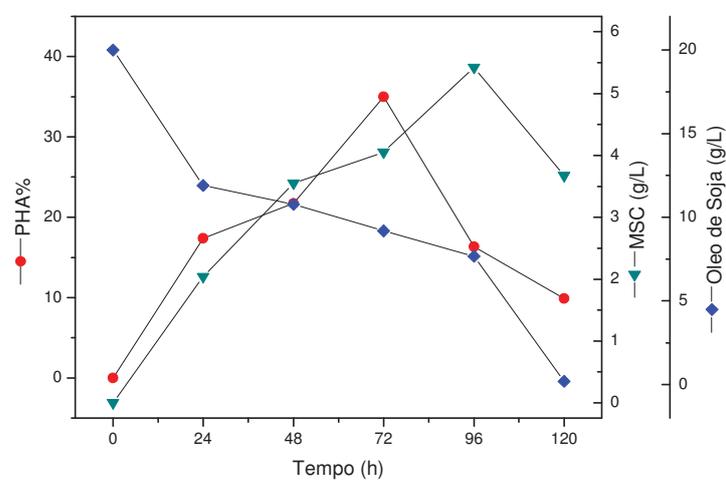


Figura 6.6- Cultivos da linhagem isolada LDM 03 em meio mineral contendo 20 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°C.

Tabela 6.17- Resultados da composição do PHAs obtidos nos cultivos da linhagem isolada LDM 03 em meio mineral contendo 20 g/L de óleo de soja durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	PHA (%MSC)	HB (mol%)	HHx (mol%)	HO (mol%)	HD (mol%)	HDd (mol%)	PHA (g/L)
0	0	0	0	0			0
24	17,37	< ld	3,18	1,96	6,63	88,23	0,354
48	21,72	< ld	< ld	4,87	30,37	64,77	0,771
72	34,99	< ld	< ld	4,12	23,83	72,05	1,419
96	16,34	< ld	1,34	4,78	50,13	43,75	0,886
120	9,87	< ld	8,22	6,26	34,65	50,87	0,363

7. PRODUÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE GLICEROL DE BIODIESEL POR *CUPRIAVIDUS METALLIDURANS* E *BURKHOLDERIA MIMOSARUM* UTILIZANDO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

7.1. Introdução

Nas últimas décadas, o acúmulo de resíduos plásticos de origem petroquímica tornou-se um crescente problema ambiental, provocando um aumento no número de pesquisas voltadas à produção de polímeros biodegradáveis. Os polihidroxialcanoatos (PHAs), extraídos de células bacterianas, despertaram o interesse de setores industriais devido às suas características similares aos polímeros derivados do petróleo, acompanhado de seu alto potencial de biodegradação e ainda por ser obtido a partir de fontes renováveis (VERLINDEN, 2007).

Entre os diversos tipos de PHAs, o polihidroxibutirato (PHB) é o mais produzido pela maioria das linhagens isoladas do ambiente, sendo o mais estudado (SANGKHARAK & PRASERTSAN, 2007). As propriedades físico-químicas do PHB, tais como, peso molecular, cristalinidade, rigidez, ponto de fusão e temperatura de transição vítrea; são comparáveis ao polipropileno (PP) (BARHAM, 1990). Assim, o PHB apresenta características que permitem a substituição deste polímero de origem petroquímica.

Embora a ocorrência do PHB em bactérias seja conhecida desde 1926, a partir dos estudos de Lemoigne, o alto custo de produção deste biopolímero fez com que o mesmo fosse ignorado durante um longo período, diante da disponibilidade de produtos derivados do petróleo (VERLINDEN, 2007). Atualmente, têm sido relatados vários trabalhos sobre a produção de PHAs utilizando subprodutos e efluentes industriais como insumos de cultivo, estando entre estes a obtenção de PHB a partir de glicerol bruto, um subproduto originado na produção de biodiesel (CHANPRATEEP, 2010). A utilização do glicerol bruto fornece uma alternativa viável para a obtenção destes polímeros, pois a fonte de carbono chega a atingir 40% dos custos totais de produção (CAVALHEIRO et al., 2009). Além disso, apresenta a vantagem adicional de agregar valores à cadeia de produção do biodiesel. Portanto, a descoberta de novos micro-organismos produtores e a melhora de processos fermentativos a partir do glicerol tornam-se atraentes para a produção de PHAs.

A biossíntese de PHB em linhagens bacterianas envolve vários fatores, como limitação da fonte de nitrogênio e o excesso da fonte de carbono, sendo necessária a otimização de processos para alcançar as maiores taxas de produção de polímero. Para isso, o planejamento

experimental e a análise estatística fornecem informações mais precisas sobre os fatores determinantes do processo fermentativo, permitindo a interação entre os mesmos. Neste estudo, o principal objetivo foi obter as condições ótimas na produção de PHB por novas linhagens isoladas, *Cupriavidus metallidurans* MA 09 e *Burkholderia mimosarum* MA 18, utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono.

7.2. Materiais e Métodos

7.2.1. Meios de cultivo

Foram utilizados os meios de cultivo Caldo Nutriente (CN), Ágar Nutriente (AN) e Meio Mineral (MM).

7.2.1.1. Caldo e Ágar Nutriente

Extrato de carne..... 3,0 g/L
Peptona..... 5,0 g/L

Ágar Nutriente foi obtido com a adição de ágar 15-20 g/L.

7.2.1.2. Meio Mineral

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

Na₂HPO₄..... 3,5 g/L
KH₂PO₄..... 1,5 g/L
MgSO₄.7H₂O..... 0,2 g/L
CaCl₂.2H₂O..... 0,01 g/L
Citrato férrico amoniacal..... 0,06 g/L
Solução de elementos traços..... 1 mL

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

Solução de elementos traços:

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

Ao Meio Mineral foram adicionadas diferentes concentrações de glicerol, como fonte de carbono, e (NH₄)₂SO₄, como fonte de nitrogênio, para a obtenção das melhores condições na produção de PHAs.

7.2.1.3. Esterilização

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

7.2.2. Micro-organismos

Utilizou-se as linhagens isoladas a partir de solo de Mata Atlântica, *Cupriavidus metallidurans* MA 09 e *Burkholderia mimosarum* MA 18. As linhagens bacterianas acima citadas foram mantidas em placas de Petri, agar inclinado e preservadas em tubos criogênicos contendo glicerol a 20%, sob congelamento a -20 °C e -80 °C; sendo realizada a manutenção de viabilidade das culturas microbianas periodicamente. Realizou-se também a preservação destas linhagens bacterianas através de liofilização, sendo estocadas em ampolas seladas a vácuo e mantidas em refrigerador (5-10 °C).

7.2.3. Cultivo de micro-organismos

7.2.3.1. Delineamento Composto Central Rotacional

As linhagens *C. metallidurans* MA 09 e *B. mimosarum* MA 18 foram avaliadas em meios de cultivo através de um delineamento composto central do tipo rotacional. Cada planejamento foi constituído de 18 experimentos; com 8 ensaios nos níveis propostos, 4 réplicas do ponto central e mais 6 referentes aos pontos axiais. As variáveis estudadas foram

temperatura (X_1), concentrações de sulfato de amônio (X_2) e glicerol bruto (X_3); obtendo-se como resposta a produção de PHB (g/L).

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

$$\text{Equação geral:} \quad X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (7.1)$$

Onde:

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

X_0 é o valor real da variável no ponto central;

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

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

Assim, nos planejamentos realizados temos a variável temperatura (X_1) nos níveis 30°C (-1), 33,5°C (0) e 37°C (+1). Da mesma forma, os valores de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_2) estão divididos nos níveis 0,5; 1,0 e 1,5 g/L; e por fim o glicerol bruto nos valores 15, 20 e 25 g/L. As equações codificadas nos experimentos são demonstradas pelas equações 7.2, 7.3 e 7.4:

$$X_1 = X - 33,5/3,5 \quad (7.2)$$

$$X_2 = X - 1/0,5 \quad (7.3)$$

$$X_3 = X - 20/5 \quad (7.4)$$

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

$$\alpha = \pm(2^k)^{1/4} \quad (7.5)$$

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

$$X_{\alpha} = X_0 \pm \alpha[(X_{+1} - X_{-1})/2] \quad (7.6)$$

Na tabela 7.1, pode ser observada a matriz obtida no planejamento experimental realizado, com as variáveis em seus respectivos níveis reais e codificados.

Tabela 7.1-Delineamento composto central rotacional com variáveis independentes codificadas. X_1 = temperatura; X_2 = concentração de sulfato de amônio e X_3 = concentração de glicerol.

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

Variáveis independentes	Níveis reais				
	-1,68	-1	0	1	1,68
X_1 =Temperatura (°C)	27,6	30	33,5	37	39,4
X_2 =Sulfato de amônio (g/L)	0,16	0,5	1	1,5	1,84
X_3 =Glicerol bruto (g/L)	11,6	15	20	25	28,4

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

$$Y = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + cX_3 + dX_1^2 + eX_1X_2 + fX_1X_3 + gX_2^2 + hX_2X_3 + iX_3^2 \quad (7.7)$$

Onde:

Y é a resposta estudada;

β_0 é o valor médio da resposta;

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

X_1 é a temperatura (°C);

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

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

A partir da equação original (7.7) foi realizada uma aplicação estatística da estimativa dos parâmetros através dos valores de t de Student, sendo eliminados aqueles com nível de significância superior a 5%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes. O valor da distribuição t de Student foi definido como a relação entre o valor do parâmetro estimado e o seu desvio padrão. Eliminando os parâmetros não significativos, definiu-se para cada uma das respostas estudadas uma equação representativa dos efeitos das variáveis do processo que mais afetam a resposta avaliada.

O valor de F (Fisher) foi determinado pela razão entre o quadrado médio da equação ajustada (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR), como mostra a Equação 7.8. O valor obtido para F pode ser usado para a realização de um teste de hipótese para a verificação da adequação aos dados experimentais. Assim, se o valor de F calculado é maior que o valor de F tabelado, rejeita-se a hipótese de nulidade do modelo obtido, sendo este considerado significativo. Quanto maior o valor de F, melhor será o ajuste do modelo em questão.

$$F = \frac{QME}{QMR} \quad (7.8)$$

O quadrado médio da equação (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR) são dados pelas Equações 7.9 e 7.10, respectivamente.

$$QME = \frac{\text{Soma dos quadrados dos valores preditos}}{\text{Numero de graus de liberdade da equação}} \quad (7.9)$$

$$QMR = \frac{\text{Soma dos quadrados do residuo}}{\text{Numero de graus de liberdade do residuo}} \quad (7.10)$$

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

Para verificar se a resposta estudada apresentava um ponto de máximo, de mínimo ou não apresentava nenhum de ambos (ponto de sela) descobriu-se o ponto estacionário.

Os pontos estacionários são obtidos através da derivada da equação da resposta Y pela variável X_k , isto é:

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = \frac{\partial Y}{\partial X_2} = \dots = \frac{\partial Y}{\partial X_k} = 0 \quad (7.11)$$

sendo, $Y = b_0 + x'b + x'Bx$

$$\frac{\partial y}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x} [b_0 + x'b + x'Bx] = b + 2Bx = 0 \quad (7.12)$$

onde, b_0 é o termo independente;

$x'b$ são os termos de 1ª. ordem na função de resposta;

$x'Bx$ é a contribuição quadrática.

Então, o ponto estacionário será dado por: $x_0 = - (1/2) B^{-1}b$, onde B é a matriz (k x k) na qual a diagonal é composta pelos coeficientes dos termos quadráticos da equação e os termos fora da diagonal são correspondentes aos coeficientes das interações divididos por 2 (ex: a_{12} e a_{21} correspondem ao coeficiente da interação X_1X_2). A matriz b é uma matriz coluna composta pelos coeficientes associados às variáveis isoladas (variáveis lineares).

O ponto estacionário (x_0) pode ser:

- Um ponto onde a superfície atinge um **máximo**;
- Um ponto onde a superfície atinge um **mínimo**, ou
- Um ponto nem de máximo, nem de mínimo \Rightarrow **Ponto de sela** (“saddle point”).

Ainda podem existir problemas relacionados aos pontos estacionários obtidos, tais como:

- A existência de uma região de máximo e não um ponto de máximo;
- O ponto estacionário pode estar fora da região experimental.

Para determinar a natureza desse ponto estacionário foi necessário fazer uma análise canônica, que considera uma translação da superfície de resposta da origem (X_1, X_2, \dots, X_k) = (0, 0, ..., 0) para o ponto estacionário x_0 (Figura – 7.1) . Daí a função de resposta é formulada em termos de novas variáveis, w_1, w_2, \dots, w_k .

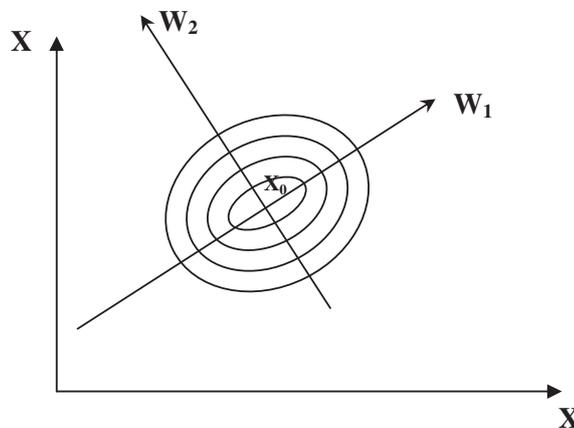


Figura 7.1 – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.

Então, obtêm-se a função de resposta em termos das novas variáveis:

$$Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (7.12)$$

onde:

y_0 : é a resposta estimada no ponto estacionário e,

$\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ são constantes.

Os sinais dos λ 's e a grandeza dos λ 's ajudam a determinar a natureza do ponto estacionário e, a relação entre os w 's e os x 's também são importantes pois indicam ao pesquisador regiões úteis para exploração.

Se $\lambda_i < 0$, sendo $i = 1, 2, \dots, k$, quando movimentamos em qualquer direção a partir do ponto estacionário, teremos um decréscimo de Y , isto é, o ponto estacionário x_0 é um ponto de resposta máxima da superfície ajustada. Se $\lambda_i > 0$, o ponto estacionário x_0 é um ponto de mínimo para a superfície ajustada e, se os λ 's têm sinais diferentes, o ponto estacionário x_0 não é nem ponto de máximo, nem de mínimo.

A obtenção dos pontos estacionários e a análise canônica dos dados para cálculo dos pontos de maximização da resposta, quando existentes, foram realizados utilizando um algoritmo implementado no *software Maple V Release 4*®.

7.2.3.2. Cultivo das linhagens *C. metallidurans* MA 09 e *B. mimosarum* MA 18

As linhagens avaliadas em cultivo, foram estriadas a partir de cultura estoque em meio agar nutriente, sendo incubados durante 72 h a 30°C. Colônias isoladas foram transferidas para tubos estéreis contendo um volume de 5 mL de solução salina (NaCl 0,85), sendo realizadas diluições para ajuste da densidade óptica ($\lambda=610$ nm) da suspensão bacteriana para $0,65 \pm 0,02$ de absorvância, visando a padronização do pré-inóculo (10^7 UFC). Após, foram transferidos 1,5 mL desta suspensão para 50 mL de caldo nutriente, incubando-se durante 24 h a 30°C e 150 rpm de agitação. Utilizou-se 1,5 mL do cultivo em caldo nutriente para

inocular 50 mL de meio mineral, contendo 20 g/L de glicerol bruto e 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o qual foi incubado por até 120 h a 150 rpm e 30°C. Foram analisadas amostras dos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 h de cultivo, para verificar a cinética de produção de PHB. Após, os planejamentos experimentais foram realizados sob as mesmas condições de pré-inóculo e meios de cultivo, nas concentrações de glicerol, sulfato de amônio e temperaturas especificados no item 7.2.3.1., visando a otimização destes processos fermentativos. Todas as fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 125 mL e o pH inicial dos meios de cultivos foi ajustado para 7,0 utilizando HCl 2M / NaOH 2M. O meio caldo nutriente também foi utilizado para a preservação e manutenção de culturas estoque. Após o término das fermentações, duas amostras de 5 mL e 45 mL de cada cultivo, foram centrifugadas a 10500 x g e 11800 x g por 10 minutos, respectivamente. A primeira amostra foi utilizada para a determinação de consumo de glicerol e biomassa. As células da segunda amostra foram congeladas e liofilizadas para a determinação da quantidade de PHB.

7.2.4. 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, provenientes dos cultivos, foram ressuspensos em água destilada e submetidos à secagem em estufa a 105°C durante 24 h. A biomassa residual (X_R) foi obtida através da diferença entre os valores de massa seca celular e polímero (g/L) obtidos nos cultivos realizados.

7.2.5. Determinação de glicerol

A determinação das concentrações de glicerol foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se o cromatógrafo Prominence UFLC (Shimadzu[®]), acoplado aos detectores ultravioleta (SPD-20A UV/Vis[®]) e índice de refração (RID-10A[®]), equipado com a coluna Rezex ROA (300 x 7,8 mm) (Phenomenex[®]). As condições empregadas na análise foram: volume de injeção: 20µL; temperatura da coluna (forno): 65°C; e eluente: H_2SO_4 0,0025M a uma vazão de 0,6 mL/min. O consumo do substrato utilizado foi calculado através da diferença entre as concentrações iniciais e finais de glicerol, observadas nos meios de cultivos, para seus respectivos experimentos fermentativos.

7.2.6. Determinação de PHAs

A quantidade e composição de PHAs foram determinadas através de cromatografia gasosa de propil-ésteres (RIIS & MAI, 1988). Entre 10 e 15 mg de células liofilizadas foram submetidas a reação de propanólise em tubos, aos quais se adicionaram 2 mL de uma solução de HCl em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2 dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido benzóico em propanol (40 g/L), como padrão interno. Os tubos foram fechados fortemente, sendo vedados com fita de PTFE, agitados e submetidos a 4 h de reação a 80°C, com agitação após os primeiros 40 minutos de propanólise. Ao final da reação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se 4 mL de água ultrapura aos mesmos, sendo agitados vigorosamente por 30 segundos. Após a separação das fases aquosa (superior) e orgânica (inferior), a primeira foi descartada, utilizando então a fase orgânica para a análise de propil-ésteres. Todas as amostras foram estocadas em vials com septo de PTFE, sendo conduzidas para serem analisadas no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, localizado no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP/ São Paulo-SP). 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 Agilent 7890A GC System®, equipado com a coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As temperaturas do injetor e detector (sistema de detecção por ionização de chama-FID) foram 250 e 300°C, respectivamente, utilizando-se hélio como gás de arraste a 0,8 mL/min. As análises foram conduzidas empregando-se um programa de temperaturas do forno com 100°C por 1 minuto, elevando-se a temperatura até 185°C a uma razão de 8°C/min e mantendo-se a 185°C por 15 minutos. Além dos padrões 3HB e 3HB-HV, polímeros produzidos por *Pseudomonas oleovorans* ou *Pseudomonas putida* a partir de diferentes fontes de carbono foram utilizados como padrões para a geração de curvas de calibração (3HHx, 3HHp, 3HO, 3HN, 3HD e 3HDd). O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes verificados nas amostras analisadas, sendo expresso em porcentagem da massa seca celular (PHA%) e em gramas de polímero por litro de cultivo (g/L).

Além disso, foi realizado o cálculo de rendimento global ($Y_{HB/GLY}^O$), para verificar a conversão de substrato consumido em produto (g/g), sendo os valores de rendimento global máximo utilizados de forma comparativa para obter a eficiência (%) das linhagens avaliadas em cultivo. O rendimento global é obtido através da razão entre a quantidade de PHB (g/L) produzida e o glicerol consumido em cultivo (g/L), levando em consideração tanto a fonte de carbono utilizada para a produção de polímero, como aquela direcionada ao crescimento celular (X_R). O cálculo do rendimento global máximo foi obtido a partir da equação 7.13,

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

$$Y_{HB/GLY}^O = \frac{PHB}{PHB \left(\frac{1}{Y_{HB/GLY}^T} - \frac{1}{Y_{X/GLY}} \right) + \frac{100}{Y_{X/GLY}}} \quad (7.13)$$

Onde:

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

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

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

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

7.2.7. Análise dos polímeros de *C. metallidurans* MA 09 e *B. mimosarum* MA 18 por cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho

Os polímeros produzidos pelas linhagens em estudo foram extraídos adicionando-se clorofórmio às células liofilizadas, sendo estas submetidas à agitação de 200 rpm a 35°C, durante 48 h. O conteúdo celular foi separado por filtro de papel Whatman #1, evaporando-se o clorofórmio resultante deste processo para obtenção dos PHAs. O polímero obtido foi dissolvido em um pequeno volume de clorofórmio e reprecipitado 5 vezes através de adição de metanol gelado. Transferiu-se o precipitado para recipiente previamente pesado, sendo o mesmo secado durante 24 h (ASHBY, SOLAIMAN & FOGLIA, 2004). O polímero extraído das linhagens MA 09 e MA 18 foram analisados por cromatografia gasosa de propil-ésteres,

segundo especificações presentes no item 7.2.6. Ainda, foi realizada uma análise comparativa dos polímeros obtidos com o padrão PHB (Sigma-Aldrich[®]), através de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), utilizando o equipamento IR Prestige (Shimadzu[®]). As amostras foram analisadas por transmitância (%) com uma resolução de 4 cm⁻¹, em uma faixa de comprimento de ondas de 4000-400 cm⁻¹.

7.3. Resultados e Discussão

7.3.1. Cultivo para verificar a cinética de produção de PHB pelas linhagens *C. metallidurans* MA 09 e *B. mimosarum* MA 18

As linhagens isoladas de solo de Mata Atlântica MA 09 e MA 18 foram submetidas a ensaios fermentativos para verificar a cinética de produção de PHB, utilizando o glicerol de biodiesel como insumo de cultivo. Os cultivos foram realizados em meio mineral contendo 20 g/L de glicerol bruto e 1 g/L de (NH₄)₂SO₄, segundo especificações relatadas no item 7.2.3.2, sendo analisadas amostras nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 h. A concentração de 20 g/L de glicerol bruto foi escolhida para avaliar a produção de polímero pelos micro-organismos em estudo, em função do tempo, devido a resultados obtidos em experimentos anteriores (Capítulo 04), estando entre os maiores valores de produção e acúmulo de PHB (30 g/L de glicerol bruto) e rendimento do processo fermentativo (10 g/L de glicerol bruto). Além disso, havia a necessidade de estabelecer-se um valor de concentração fixo para a fonte de carbono, para padronização dos experimentos, onde as duas linhagens pudessem ser comparadas a partir dos resultados obtidos, para posteriormente serem submetidas a um planejamento experimental.

Os valores de consumo da fonte de carbono utilizada, massa seca celular, acúmulo do polímero em percentual da MSC, produção de PHB (g/L) e rendimento podem ser observados nas Tabelas 7.2 e 7.3. Nos experimentos realizados, as linhagens avaliadas atingem os maiores valores de produção de PHB após 120 h de cultivo. Neste período, a linhagem MA09 apresentou um valor de 5,40 g/L de MSC e um acúmulo de polímero de 43,24%, resultando em uma produção de 2,34 g/L de PHB. Em MA 18, foram verificados um acúmulo de polímero de 34,47% da MSC e biomassa de 3,82 g/L, a qual apresentou uma produção de polímero de 1,32 g/L. Embora a produção de PHB obtida nos cultivos com MA 18 apresente menores valores, houve um maior consumo da fonte de carbono utilizada neste ensaio (18,02

g/L), resultando em um rendimento de $Y_{HB/GLY}^O = 0,07$ g/g. Para a linhagem MA 09, observou-se um consumo menor de glicerol (14,58 g/L) e um rendimento de 0,16 g/g.

Entre as espécies bacterianas utilizadas para a produção de PHB, as linhagens de *Cupriavidus necator* são bastante conhecidas por sua habilidade em produzir altas concentrações celulares deste polímero (CHANPRATEEP, 2010). A linhagem MA 09, previamente identificada como *Cupriavidus metallidurans*, apresenta valores de acúmulo de polímero próximos daqueles obtidos por *C. necator* nos experimentos de Cavalheiro et al. (2009), com um acúmulo máximo de polímero de 38%, e Mothes et al. (2007) com resultados próximos a 48% da MSC.

Algumas espécies do gênero *Burkholderia* têm sido recentemente avaliadas quanto à produção de PHAs utilizando diversas fontes de carbono, tais como, sacarose, glicose, frutose, xilose, lactose, maltose, melibiose, rafinose, adonitol, arabinose, diversos tipos de óleos, etc (BRÄMER et al., 2001); porém, produções significativas a partir de glicerol são dificilmente relatadas. Neste estudo, os valores de concentração celular de polímero obtidos com a linhagem MA 18 (*B. mimosarum*), com 34,47% da MSC, são similares àqueles relatados por Silva et al. (2007), a partir de uma linhagem de *B. cepacia* em cultivos com triglicérides, onde foi observado um acúmulo de 34%.

Ao analisar o perfil de cultivo destes micro-organismos (Figuras 7.2 e 7.3), nota-se uma produção de polímero associada ao crescimento celular. Em MA 09, após 48 h de cultivo, o aumento nos valores de MSC é acompanhado pela produção de PHB, com ambos estabilizando-se a partir de 96 h, quando a velocidade de consumo de substrato diminui. Em *B. mimosarum* MA 18, após 24 h de cultivo, os valores de PHB g/L e MSC aumentam até 120 h, com uma velocidade de acúmulo de polímero (PHB%) diminuindo após 96 h.

Tabela 7.2-Resultados dos cultivos da linhagem MA 09 (*C.metallidurans*) em meio mineral com 20 g/L de glicerol bruto durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	Glicerol Bruto (g/L)	Consumo de Glicerol Bruto (g/L)	MSC (g/L)	PHB (%MSC)	PHB (g/L)	X _R (g/L)	Y ^O _{HB/GLY} (g/g)
0	20,00	0	0	0	0	0	0
24	15,39	4,61	0,72	1,01	0,007	0,71	0,002
48	13,29	6,71	2,09	3,02	0,063	2,03	0,009
72	9,75	10,25	3,24	24,24	0,785	2,46	0,077
96	6,23	13,77	5,28	37,81	1,996	3,28	0,145
120	5,42	14,58	5,40	43,24	2,335	3,07	0,160

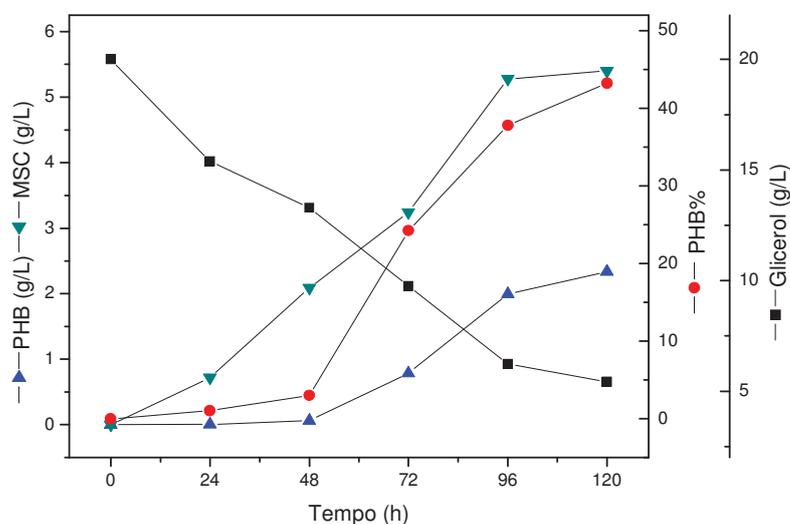


Figura 7.2-Cultivos da linhagem MA 09 (*C.metallidurans*) em meio mineral com 20 g/L de glicerol bruto durante 120 h, a 30°C.

Tabela 7.3-Resultados dos cultivos da linhagem MA 18 (*B.mimosarum*) em meio mineral com 20 g/L de glicerol bruto durante 120 h, a 30°C.

Tempo (h)	Glicerol Bruto (g/L)	Consumo de Glicerol Bruto (g/L)	MSC (g/L)	PHB (%MSC)	PHB (g/L)	X_R (g/L)	$Y_{HB/GLY}^0$ (g/g)
0	20,00	0	0	0	0	0	0
24	14,70	5,30	1,24	3,53	0,044	1,20	0,008
48	11,62	8,38	2,06	14,00	0,288	1,77	0,034
72	8,20	11,8	2,47	23,12	0,571	1,90	0,048
96	5,44	14,56	3,34	32,55	1,087	2,25	0,075
120	1,98	18,02	3,82	34,47	1,317	2,50	0,073

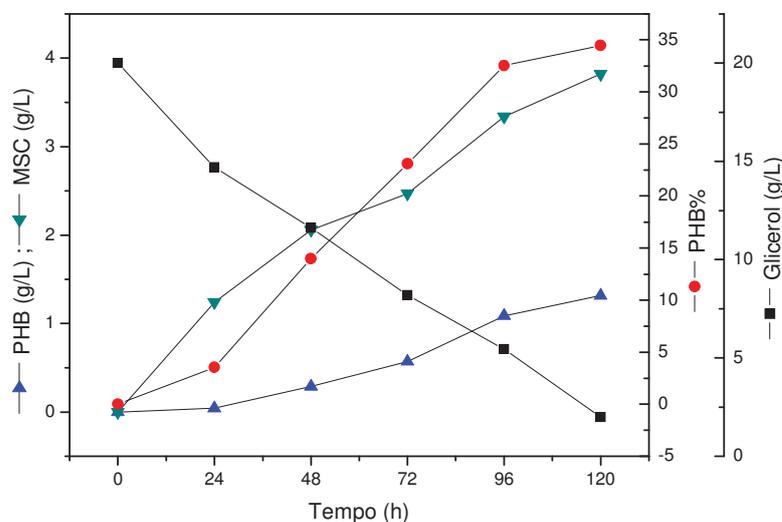


Figura 7.3-Cultivos da linhagem MA 18 (*B.mimosarum*) em meio mineral com 20 g/L de glicerol bruto durante 120 h, a 30°C.

7.3.2 Cultivo das linhagens *C. metallidurans* MA 09 e *B. mimosarum* MA 18 utilizando planejamento experimental

Os resultados obtidos em cultivos anteriores com as linhagens MA 09 e MA 18 (item 7.3.1), onde foram observados acúmulos de polímero próximos a 40% da MSC, demonstraram que estes micro-organismos apresentam um bom potencial na obtenção de PHB a partir de glicerol bruto. Dessa forma, foram realizados experimentos visando à otimização destes processos fermentativos. Para tal, as linhagens *C. metallidurans* MA 09 e *B. mimosarum* MA 18 foram avaliadas através de planejamento experimental.

Atualmente, há uma necessidade crescente do melhoramento de processos, na tentativa de minimizar custos e tempo, maximizando produção, rendimento e qualidade do produto obtido. Isto tem levado profissionais de diversas áreas do conhecimento a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

A otimização de experimentos têm sido conduzidas essencialmente de duas maneiras, sendo uma delas a metodologia convencionalmente utilizada, onde varia-se um fator por vez, em técnicas de tentativas e erros. Outra possibilidade envolve a variação dos fatores ao mesmo, analisando seus efeitos e interações a partir de análises estatísticas. Neste caso, o

planejamento experimental acaba fornecendo informações mais confiáveis, minimizando o empirismo (NIKEL et al., 2005). Além disso, através da análise de superfícies de resposta, podem ser visualizadas áreas de tendência a partir da interação entre as variáveis propostas, dificilmente verificadas a partir de técnicas convencionais. Dessa forma, a metodologia de planejamento fatorial, torna-se uma boa alternativa para a otimização dos parâmetros fermentativos, na produção de PHB, pelas linhagens avaliadas neste estudo.

Os programas computacionais de estatística são capazes de gerar várias classes de superfícies de resposta para experimentos fermentativos. Entre elas, o delineamento composto central é o mais popular e eficiente método, do qual se pode obter o maior número de informações por um menor número de experimentos; apresentando ainda, a flexibilidade de corridas sequenciais (MONTGOMERY, 1997). Portanto, na tentativa de otimizar o processo de produção de PHB pelas linhagens MA 09 e MA 18, foi realizado um delineamento composto central do tipo rotacional para cada micro-organismo. Este planejamento foi constituído de 18 experimentos; com 8 ensaios nos níveis propostos, 4 réplicas do ponto central e mais 6 referentes aos pontos axiais. As variáveis estudadas foram temperatura (X_1), concentrações de sulfato de amônio (X_2) e glicerol bruto (X_3); obtendo-se como resposta a produção de PHB (g/L). Para cada variável, além dos pontos axiais, foram analisados 3 níveis. Assim, nos planejamentos realizados a variável temperatura (X_1) foi avaliada em 30°C (-1), 33,5°C (0) e 37°C (+1). Da mesma forma, os valores de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_2) estão divididos nos níveis 0,5; 1,0 e 1,5 g/L; e por fim o glicerol bruto nos valores 15, 20 e 25 g/L. Os ensaios fermentativos foram realizados segundo especificações do item 7.2.3.2, sendo conduzidos até 96 h. Este tempo de cultivo foi escolhido a partir de experimentos anteriores, onde foi observado uma estabilização dos valores máximos de rendimento e acúmulo de polímero (item 7.3.1).

A tabela 7.4 apresenta os resultados obtidos nos cultivos com a linhagem *C. metallidurans* MA 09, utilizando delineamento composto central. Como pode ser verificado, o maior valor de produção de polímero foi obtido em uma das réplicas do ponto central deste planejamento (experimento 17), com 20 g/L de glicerol bruto e 1 g/L de sulfato de amônio, a 33,5 °C. Neste ensaio foi observada uma produção de 1,72 g/L de PHB, quando pôde ser observado também o maior rendimento (0,14 g/g). No experimento 11, onde foi utilizada a menor concentração de sulfato de amônio, nota-se a influência desta variável no acúmulo de polímero, observando-se neste ensaio uma concentração celular de 76,67%. Este valor pode ser comparado aos maiores acúmulos de polímero observado para esta fonte de carbono, os quais se situam numa faixa de 70-80% MSC. Shrivastav et al. (2010) obtiveram em seus

estudos duas linhagens bacterianas promissoras na produção de PHB a partir de um subproduto de biodiesel, proveniente de óleo de mamona, o qual continha glicerol. A linhagem SM-P-3M, identificada como *Halomonas hydrothermalis*, apresentou um acúmulo de polímero de até 75% da MSC, enquanto SM-P-1S (*Bacillus sonorensis*) uma produção de 72%. Ibrahim & Steinbüchel (2010) também obtiveram um alto percentual intracelular de polímero com uma linhagem de *Zobellella denitrificans*, com um acúmulo de 80,4% da MSC, a partir de glicerol puro. Zhu et al. (2010) ao utilizar glicerol de biodiesel atingiram um acúmulo de polímero de 81,9% após 96 h, a partir de uma linhagem de *B. cepacia*. Mothes et al. (2007) também relataram um alto acúmulo de PHB em cultivos contendo glicerol purificado, com um valor de 70% da concentração de polímero, obtidos a partir de uma linhagem de *C. necator*. Porém, ao utilizar glicerol de biodiesel apresentaram uma queda na concentração celular de PHB, com um valor de 48% da MSC.

Tabela 7.4-Resultados dos cultivos de *C. metallidurans* MA 09 em meio mineral após 96 h, através de delineamento composto central rotacional.

Experimento	Temperatura (°C)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Glicerol (g/L)	Consumo de glicerol (g/L)	MSC (g/l)	PHB (%MSC)	PHB (g/l)	X _R (g/L)	Y ⁰ _{HB/GLY} (g/g)
1	30,0	0,5	15,0	9,32	1,42	46,47	0,660	0,76	0,071
2	30,0	0,5	25,0	13,50	1,64	50,00	0,820	0,82	0,061
3	30,0	1,5	15,0	12,25	3,30	30,40	1,003	2,30	0,082
4	30,0	1,5	25,0	16,93	3,72	29,35	1,092	2,63	0,064
5	37,0	0,5	15,0	10,46	1,88	48,36	0,909	0,97	0,087
6	37,0	0,5	25,0	12,17	2,48	46,90	1,163	1,32	0,096
7	37,0	1,5	15,0	10,37	4,40	32,21	1,417	2,98	0,137
8	37,0	1,5	25,0	15,43	4,72	26,83	1,267	3,45	0,082
9	27,60	1,0	20,0	14,32	2,46	26,25	0,646	1,81	0,045
10	39,40	1,0	20,0	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld
11	33,50	0,16	20,0	6,80	1,16	76,67	0,889	0,27	0,131
12	33,50	1,84	20,0	18,02	4,48	35,56	1,593	2,89	0,088
13	33,50	1,0	11,6	10,21	3,58	37,56	1,345	2,24	0,132
14	33,50	1,0	28,4	17,72	2,88	33,97	0,978	1,90	0,055
15	33,50	1,0	20,0	13,43	4,00	37,95	1,518	2,48	0,113
16	33,50	1,0	20,0	11,70	4,04	38,67	1,562	2,48	0,134
17	33,50	1,0	20,0	12,58	4,56	37,72	1,720	2,84	0,137
18	33,50	1,0	20,0	12,78	3,78	40,20	1,519	2,26	0,119

A partir dos resultados de produção de polímero obtidos neste delineamento, realizou-se uma regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, criando a seguinte equação geral para a síntese de PHB em *C. metallidurans* MA 09:

$$Y = 1,571 + 0,007X_1 + 0,176X_2 - 0,019X_3 - 0,407X_1^2 - 0,001X_1X_2 - 0,018X_1X_3 - 0,082X_2^2 - 0,060X_2X_3 - 0,110X_3^2 \quad (7.14)$$

Para verificar a confiabilidade deste modelo, foi realizado um teste de hipótese de nulidade (H_0). Os valores de p (nível de significância) abaixo de 5% (p-valor < 0,05) rejeitam H_0 , criando uma hipótese alternativa (H_1), a qual afirma que o modelo obtido é significativo. Isto pode ser confirmado a partir de um teste de Hartley, cuja estatística tem distribuição F (Fisher-Snedecor) obtida do quociente entre a maior e menor variância. Assim, o valor de F calculado (F_C) obtido para o experimento é comparado a F tabelado (F_T), este último determinado através dos graus de liberdade associados ao numerador e denominador da estatística do teste. Se $F_C > F_T$, rejeita-se H_0 . Na tabela 7.5, pode ser verificado que F calculado é maior que F tabelado, assim o modelo obtido acima é validado. O coeficiente de determinação (R^2) mede o ajuste da reta de regressão à nuvem de pontos e, neste caso, indica que 80,85% da variação total das respostas pode ser explicada pela equação obtida.

Tabela 7.5-Análise de variância para a produção de PHB nos cultivos de *C. metallidurans* MA 09 em meio mineral após 96 h, utilizando planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_C	p-valor
Regressão	2,564731	9	0,284970	3,752400	0,038020
Resíduos	0,607547	8	0,075943		
Total	3,172279				

$R^2=80,85\%$; $F_{9,8,0,05}=3,39$

Na figura 7.4 pode ser visualizado os valores observados neste experimento em função daqueles preditos pela equação geral.

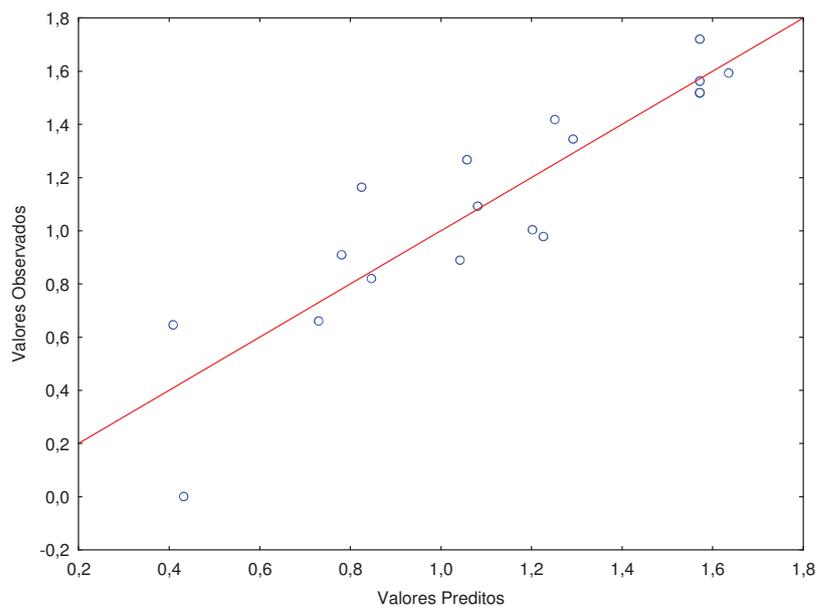


Figura 7.4-Valores observados em função dos valores preditos para a produção de PHB, obtidos nos cultivos de *C. metallidurans* MA 09 em meio mineral após 96 h, utilizando planejamento experimental.

Neste modelo, foram eliminados os parâmetros da equação com nível de significância acima de 5% para o teste t de student, desconsiderando as variáveis relacionadas aos mesmos. Na tabela 7.6 observam-se apenas os parâmetros e variáveis mais significativos para o delineamento realizado.

Tabela 7.6- Resultados da regressão múltipla para a produção de PHB obtidos nos cultivos de *C. metallidurans* MA 09 em meio mineral após 96 h, utilizando planejamento experimental.

Fator	Parâmetro	t de student	p-valor
Constante β_0	1,400131	18,87270	0,000000
X_2	0,176463	2,74842	0,014934
X_1^2	-0,373497	-5,81329	0,000034
$R^2 = 0,73$	$F_C = 20,67$		$F_T(2,15) = 3,68$

Na eliminação dos parâmetros não significativos, nota-se um aumento no valor de F calculato ($F_C = 20,67$) em relação a F tabelado, afirmando a significância do modelo ajustado, para o qual obteve-se a seguinte equação:

$$Y = 1,400 + 0,176X_2 - 0,373X_1^2 \quad (7.15)$$

Nos cultivos realizados, embora possa ser verificada uma pequena influência da variável glicerol bruto (X_3), com um discreto aumento nos valores de biomassa (MSC) a partir do ajuste de sua concentração de 15 a 25 g/L; as variáveis estatisticamente mais significativas para este processo, nos níveis propostos para este planejamento, foram a temperatura (X_1) e sulfato de amônio (X_2). Nestes experimentos, a partir dos dados obtidos, notou-se um efeito positivo sobre o acúmulo de polímero no sentido das menores concentrações de sulfato de amônio. Em contrapartida, o aumento nos níveis desta variável, assim como, o aumento da temperatura, entre 30 e 37 °C, favorecem o crescimento resultando em maiores biomassas, como podem ser verificados nos experimentos 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8. Nos mesmos ensaios, observa-se que a temperatura exerce influência menos significativa sobre o acúmulo de

polímero (%MSC). O PHB, por ser um produto intracelular, tem sua produção associada à capacidade do micro-organismo em acumular este polímero, mas também depende de seu potencial de crescimento, obtendo bons valores de biomassa. Assim, é necessário estabelecer as melhores concentrações da fonte de nitrogênio que favoreçam a produção de biomassa e ao mesmo tempo a limitação em nutrientes necessária ao acúmulo do polímero (LEE, 1996).

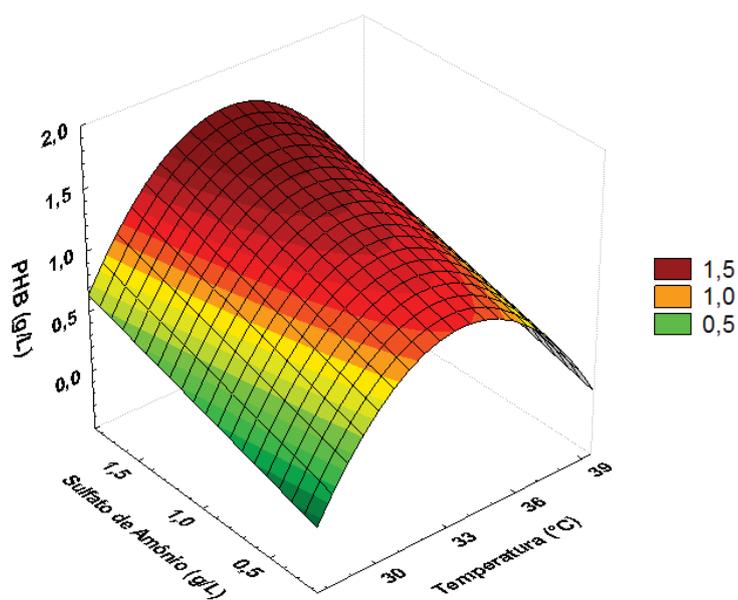


Figura 7.5-Superfície de resposta para a produção de PHB em função da temperatura e concentrações de sulfato de amônio nos cultivos de *C. metallidurans* MA 09 em meio mineral após 96 h, utilizando planejamento experimental.

Como pode ser observado na superfície de resposta obtida para a produção de PHB g/L (Figura 7.5); nos experimentos realizados, os aumentos nos níveis propostos para as concentrações de sulfato de amônio são mais significativos para o aumento da biomassa, do que a diminuição de seus níveis voltados ao acúmulo de polímero. Assim, as maiores produções de polímero apresentam uma região ótima de produção entre temperaturas de 30 a 37 °C, na concentração de 1,5 g/L. Isto pode ser verificado a partir dos experimentos 7, 12, 15, 16, 17 e 18; nos quais são observados os maiores valores de produção, cujos níveis destas variáveis mais se aproximam do modelo proposto. Comparando os valores obtidos neste planejamento com os ensaios realizados anteriormente com esta linhagem (item 7.3.1), verificou-se valores de acúmulos de polímero muito próximos para as mesmas concentrações de sulfato de amônio (1,0 g/L) e glicerol bruto (20 g/L), com uma média de 38,63 %MSC para os pontos centrais deste delineamento e 37,81% em experimento anterior após 96 h de cultivo. Além disso, também foram observados valores próximos de rendimento, variando de 0,11 a 0,14 g/g. Porém, verificaram-se diferentes valores de biomassa, que resultaram em produções de 2 g/L e 1,72 g/L de PHB, respectivamente.

No planejamento experimental realizado com a linhagem *B. mimosarum* MA 18, visando à otimização de suas condições de cultivo, foi obtido uma melhora de aproximadamente 140% na produção de polímero, comparado a experimentos anteriores. Em uma das réplicas do ponto central deste delineamento (Experimento 18), foi verificado o maior valor de rendimento (0,22 g/g) e produção de PHB (2,62 g/L). A partir destes ensaios, pode ser observada a influência da variável glicerol bruto (X_3) nos valores de biomassa, obtendo-se maiores valores de MSC a medida que as concentrações deste insumo era aumentada. Nos resultados da Tabela 7.7, analisando-se as diferenças nos valores de acúmulo intracelular de polímero nos experimentos 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8; pôde ser verificado, mais claramente, o efeito das concentrações de sulfato de amônio nas produções de polímero e valores de biomassa. O aumento dos valores de concentração deste insumo de cultivo provocou aumentos nos valores de MSC, enquanto, nos menores níveis desta variável, a limitação desta fonte de nitrogênio, passa a favorecer o acúmulo de polímero. Isto se evidencia a partir dos resultados obtidos nos experimentos 2 e 11, onde as menores concentrações de sulfato de amônio provocaram as maiores concentrações celulares de PHB, com valores de 63,5 e 56,5% da MSC. Neste estudo, o aumento da temperatura exerce efeito significativo sobre os valores de biomassa, em concentrações de sulfato de amônio de 0,16 até 1,0 g/L. Ao comparar os resultados de biomassa dos experimentos 3 e 7, e 4 e 8; notou-se que em concentrações desta fonte de nitrogênio de 1,5 g/L, o aumento da temperatura de 30 a 37

°C, passa a não influenciar positivamente a produção de biomassa, sendo observados menores valores.

Tabela 7.7-Resultados dos cultivos de *B. mimosarum* MA 18 em meio mineral após 96 h, através de delineamento composto central rotacional.

Experimento	Temperatura (°C)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Glicerol (g/L)	Consumo de glicerol (g/L)	MSC (g/l)	PHB (%MSC)	PHB (g/l)	X _R (g/L)	Y ^o _{HB/GLY} (g/g)
1	30,0	0,5	15,0	9,98	1,80	49,60	0,893	0,91	0,089
2	30,0	0,5	25,0	15,17	2,18	63,50	1,384	0,80	0,091
3	30,0	1,5	15,0	13,32	5,22	31,81	1,660	3,56	0,125
4	30,0	1,5	25,0	17,71	5,98	32,91	1,968	4,01	0,111
5	37,0	0,5	15,0	8,89	2,78	47,60	1,323	1,46	0,149
6	37,0	0,5	25,0	14,67	3,54	34,35	1,216	2,32	0,083
7	37,0	1,5	15,0	10,89	4,34	27,78	1,206	3,13	0,111
8	37,0	1,5	25,0	16,85	5,28	29,17	1,540	3,74	0,091
9	27,6	1,0	20,0	14,86	2,00	38,75	0,775	1,23	0,052
10	39,4	1,0	20,0	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld	<ld
11	33,5	0,16	20,0	8,30	1,62	56,52	0,916	0,70	0,110
12	33,5	1,84	20,0	12,29	4,96	36,25	1,798	3,16	0,146
13	33,5	1,0	11,60	10,33	4,20	39,74	1,669	2,53	0,162
14	33,5	1,0	28,40	19,86	5,56	44,64	2,482	3,08	0,125
15	33,5	1,0	20,0	10,80	4,96	43,62	2,163	2,80	0,200
16	33,5	1,0	20,0	12,70	5,60	42,32	2,370	3,23	0,187
17	33,5	1,0	20,0	12,26	5,12	39,00	1,997	3,12	0,163
18	33,5	1,0	20,0	12,00	6,10	42,95	2,620	3,48	0,218

Com o objetivo de criar um modelo para a produção de PHB a partir da linhagem *B. mimosarum* MA 18, realizou-se uma regressão múltipla dos resultados obtidos neste delineamento, em função dos níveis propostos para as variáveis temperatura, sulfato de amônio e glicerol bruto. Para tal, utilizou-se o “software” *Statistica 7.0*, resultando na equação geral:

$$Y = 2,278 - 0,141X_1 + 0,223X_2 + 0,175X_3 - 0,631X_1^2 - 0,143X_1X_2 - 0,071X_1X_3 - 0,289X_2^2 + 0,032X_2X_3 - 0,034X_3^2 \quad (7.16)$$

Assim como foi realizado com a linhagem MA 09, verificou-se a validade deste modelo através da análise de variância. Observa-se na Tabela 7.8 que o valor de F calculado ($F_C = 12,41$) é maior que F tabelado ($F_T = 3,39$). Isto significa que pode-se rejeitar a hipótese de nulidade e modelo pode ser considerado significativo, para um nível de 5%. (p-valor < 0,05). O coeficiente de determinação de 93,31% indica um bom ajuste desta equação para explicar a variabilidade dos resultados obtidos.

Tabela 7.8-Análise de variância para a produção de PHB nos cultivos de *B. mimosarum* MA 18 em meio mineral após 96 h, utilizando planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_C	p-valor
Regressão	7,157680	9	0,795298	12,40650	0,000829
Resíduos	0,512826	8	0,064103		
Total	7,670506				

$R^2=93,31\%$; $F_{9,8;0,05}=3,39$

O gráfico de valores observados nos experimentos em função dos valores preditos pela equação geral pode ser observado na figura 7.6, demonstrando o ajuste do modelo aos dados obtidos.

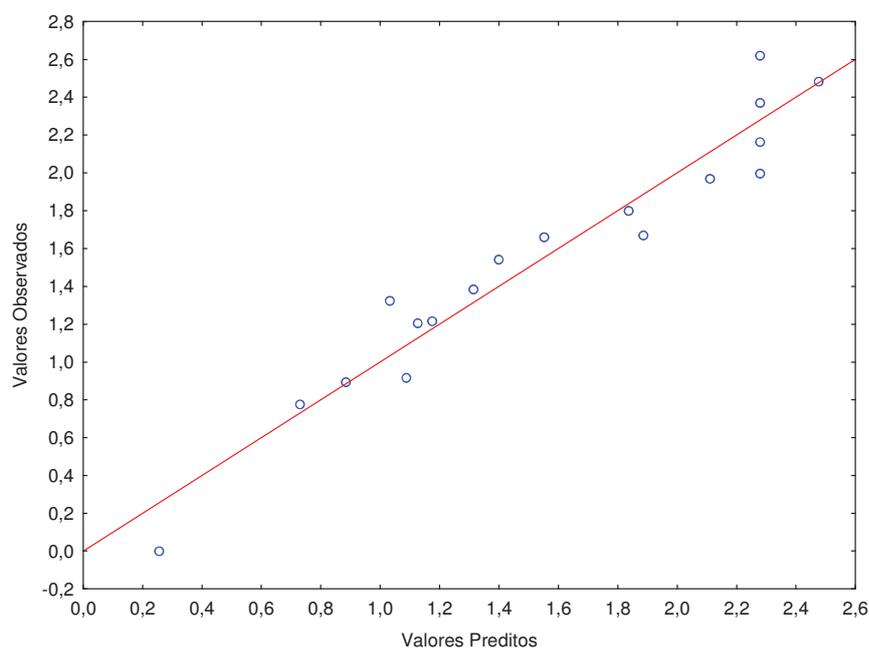


Figura 7.6- Valores observados em função dos valores preditos para a produção de PHB, obtidos nos cultivos de *B. mimosarum* MA 18 em meio mineral após 96 h, utilizando planejamento experimental.

Nesta regressão múltipla, os parâmetros da equação com nível de significância acima de 5% para o teste de t de student foram eliminados, para a construção de um modelo ajustado que apresente apenas as interações mais significativas das variáveis deste estudo. Na tabela 7.9 pode ser verificado os parâmetros mais significativos para o modelo obtido.

Tabela 7.9- Resultados da regressão múltipla para a produção de PHB obtidos nos cultivos de *B. mimosarum* MA 18 em meio mineral após 96 h, utilizando planejamento experimental.

Fator	Parâmetro	t de student	p-valor
Constante β_0	2,241362	20,23270	0,000000
X_2	0,222764	2,95060	0,011259
X_3	0,175336	2,32240	0,037083
X_1^2	-0,624028	-8,13511	0,000002
X_2^2	-0,281298	-3,66713	0,002843
$R^2 = 0,87$	$F_C = 21,38$		$F_T(4,13) = 3,18$

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, verificou-se um aumento no valor de F calculado para 21,38. A partir destas interações obteve-se a seguinte equação ajustada:

$$Y = 2,241 + 0,223X_2 + 0,175X_3 - 0,624X_1^2 - 0,281X_2^2 \quad (7.17)$$

A partir do modelo ajustado, foi possível obter 3 superfícies de resposta para a produção de PHB pela linhagem *B. mimosarum* MA 18, sendo possível verifica as interações das variáveis deste estudo (Figuras 7.7, 7.8 e 7.9).

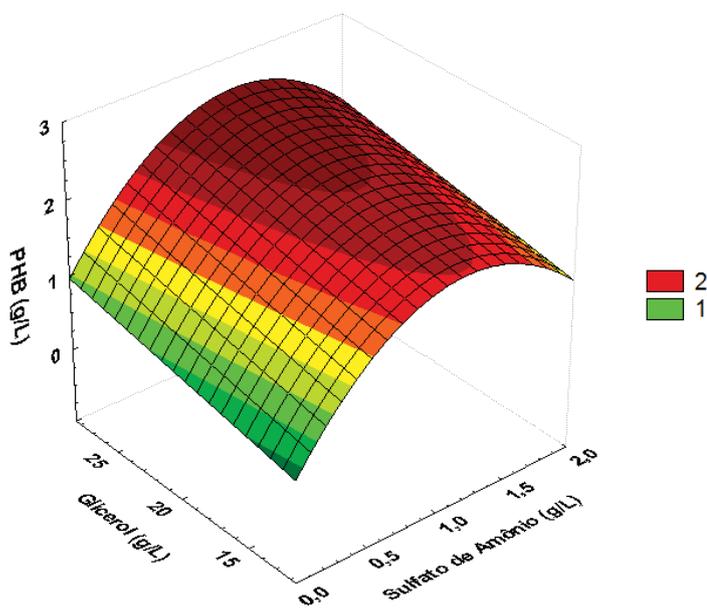


Figura 7.6-Superfície de resposta para a produção de PHB, em função das concentrações de sulfato de amônio e glicerol bruto nos cultivos de *B. mimosarum* MA 18 em meio mineral após 96 h, utilizando planejamento experimental.

Como pode ser verificado na figura 7.6, a variável glicerol bruto exerce uma influência menos significativa na produção de PHB do que a variação nas concentrações de sulfato de amônio. Nos experimentos realizados, foi observado um aumento nos valores de biomassa no sentido das maiores concentrações da fonte de carbono utilizada. Porém, o ajuste nos efeitos antagonísticos do nível inferior e superior da fonte de nitrogênio é determinante para a produção do polímero. Nas menores concentrações de sulfato de amônio (0,16 e 0,5 g/L) são observados os maiores acúmulos de polímero, em contrapartida, os maiores valores de biomassa são verificados nos níveis central e superior 1,0 (0) a 1,5 (+1) g/L. Dessa forma, a região ótima de produção de PHB situa-se na maior concentração da fonte de carbono e próxima ao nível central da fonte de nitrogênio.

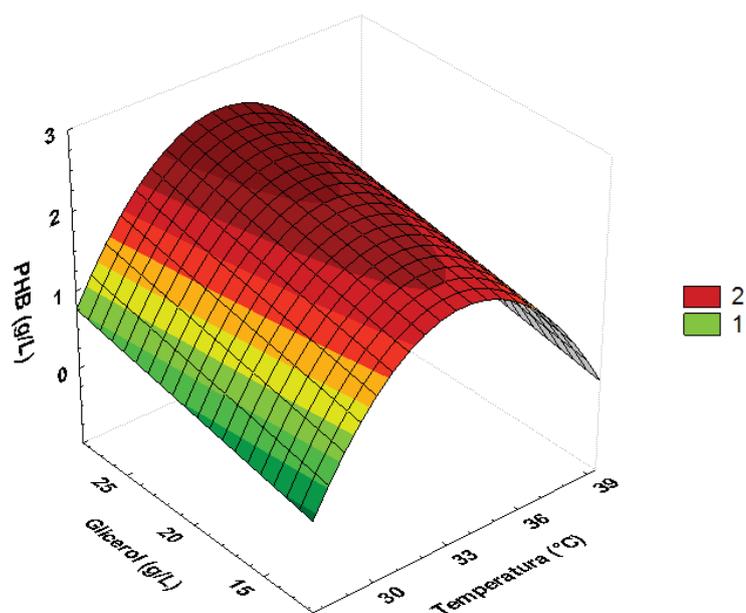


Figura 7.7-Superfície de resposta para a produção de PHB, em função da temperatura e concentrações de glicerol bruto nos cultivos de *B. mimosarum* MA 18 em meio mineral após 96 h, utilizando planejamento experimental.

Através da análise da superfície de resposta obtida para a produção de polímero, em função da temperatura e das concentrações de glicerol bruto (Figura 7.7), pode ser notado um maior efeito desta primeira variável sobre a produção de PHB. Como foi mencionado anteriormente, o aumento da temperatura em concentrações mais baixas de sulfato amônio (0,5 a 1,0) provocou um aumento nos valores de biomassa, algo favorável à produção de polímero, uma vez que a temperatura parece não exercer efeitos bastante significativos sobre o acúmulo de polímero. No entanto, quando esta variável encontra-se no nível superior, obtém-se uma menor produção de PHB. Isto pode ser explicado através da análise da superfície de resposta obtida em função dos níveis de temperatura e da fonte de nitrogênio utilizada (Figura 7.8). Nos experimentos 3 e 7, 4 e 8; foram observados menores valores de biomassa, quando aumentava-se a temperatura de 30 °C para 37 °C, em uma concentração de sulfato de amônio de 1,5 g/L. Dessa forma, o nível superior da fonte de nitrogênio é determinante sobre o efeito da temperatura. Portanto, os maiores valores de produção de PHB devem ser encontrados próximos aos pontos centrais de ambas as variáveis. A partir da equação geral deste delineamento (7.15), foi possível calcular o ponto estacionário para a produção de PHB, através de um algoritmo feito no programa *Maple V Release 4*®. Os valores de λ 's referentes à produção do polímero indicaram que esta resposta possui um ponto de máximo, pois os coeficientes apresentam os mesmos sinais (negativos); com $\lambda_1 = -0,6472$; $\lambda_2 = -0,2762$ e $\lambda_3 = -0,0306$.

As coordenadas $X_1 = -0,3699$; $X_2 = 0,6593$ e $X_3 = 3,242$ representam os valores codificados que maximizam a resposta. Assim, utilizando as equações de codificação (7.2), (7.3) e (7.4) obtêm-se os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização para a produção de PHB:

$$X_1 = 32,20 \text{ °C};$$

$$X_2 = 1,33 \text{ g/L de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4;$$

$$X_3 = 36,21 \text{ g/L de glicerol.}$$

A partir dos valores codificados das variáveis X_1 , X_2 e X_3 no ponto de otimização, determinou-se a produção de PHB neste ponto, apresentando um valor de 2,67 g/L. Como pode ser verificado, o ponto obtido para a variável X_3 está fora do espaço definido pelos níveis experimentais. Ao observar os resultados deste planejamento, verificou-se um aumento constante da produção de polímero em função do aumento da concentração de glicerol bruto,

devido principalmente a sua influência nos valores de biomassa. Assim, neste delineamento o ponto de máximo a ser inserido na equação para o cálculo do ponto ótimo seria 30 g/L (+2). Inserindo este valor na equação geral, teríamos uma produção de 2,61 g/L, próxima aos maiores valores obtidos nestes experimentos.

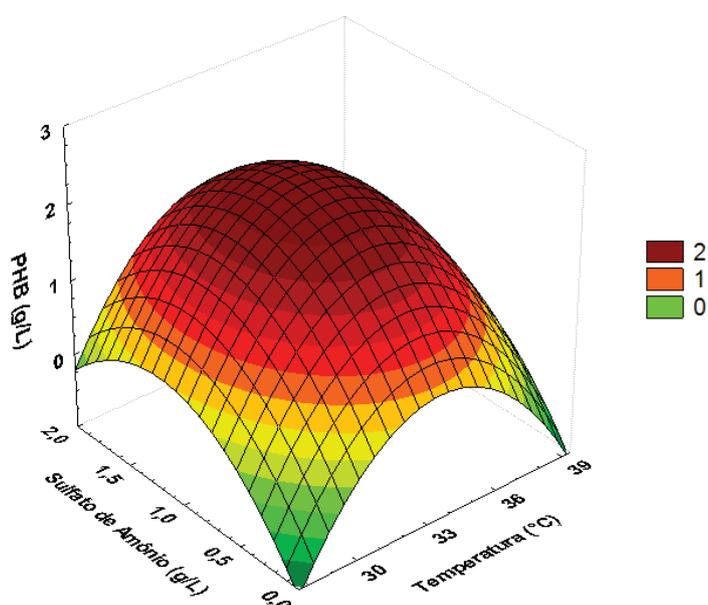


Figura 7.8-Superfície de resposta para a produção de PHB, em função da temperatura e concentrações de sulfato de amônio nos cultivos de *B. mimosarum* MA 18 em meio mineral após 96 h, utilizando planejamento experimental.

Mothes et al. (2007), ao utilizar glicerol bruto em seus cultivos com *C. necator* e *Paracoccus denitrificans*, relatou um efeito negativo sobre o crescimento celular e o acúmulo de PHB. Tal fato, foi atribuído a presença de íons de sódio encontrados neste insumo, geralmente provenientes do catalisador NaOH utilizado no processo de transesterificação para a produção de biodiesel. Nos ensaios com este substrato, foi observado um máximo acúmulo de 48%, enquanto ao utilizar glicerol puro obteve-se 70% da MSC. Estes efeitos também foram relatados por Cavalheiro et al. (2009), apresentando um acúmulo máximo de polímero

a partir de glicerol bruto de 38%, também utilizando um linhagem de *C. necator*. Neste estudo aconteceu o contrário, sendo observado um efeito positivo na produção de biomassa e acúmulo de polímero, implicando na vantagem destas linhagens estarem mais adaptadas e possuir maior afinidade pelo glicerol bruto.

Entre os trabalhos realizados para a produção de PHB a partir de glicerol, seja este purificado ou obtido como um subproduto industrial, desde experimentos conduzidos em “shaker” até àqueles realizados em sistemas de batelada, os rendimentos teóricos de produção de polímero em relação ao consumo de glicerol, geralmente, situam-se entre 0,08 e 0,40 g/g (MORALEJO-GÁRATE et al., 2011). Para verificar o rendimento teórico máximo a ser alcançado na produção de PHB a partir do glicerol, deve-se levar em conta as vias metabólicas envolvidas na conversão desta fonte de carbono em polímero. A biossíntese de PHB requer a condensação de 2 moléculas de acetil-CoA, catalisada pela enzima β -cetotiolase (PhaA), levando a formação de acetoacetil-CoA, o qual é reduzido para 3-hidroxiacetil-CoA pela acetoacetil-CoA redutase (PhaB). Este último é o precursor direto para a síntese do polímero, realizada pela PHA sintase (PhaC) (REHM, 2006). Dessa forma, a conversão de glicerol necessita fornecer duas moléculas de acetil-CoA para a formação de HB. A molécula de glicerol, através da ação da enzima glicerol quinase, será transformado em glicerol-3-fosfato, este por sua vez, ao sofrer a ação da glicerol-3-fosfato desidrogenase, será convertido em dihidroxiacetona fosfato. Nesta etapa da reação, uma triose fosfato isomerase transformará este último substrato em gliceraldeído-3-fosfato, um intermediário das vias glicolíticas. Nesta via, o gliceraldeído-3-fosfato renderá uma molécula de acetil-CoA (KIRK-OTHMER, 2007). Assim, são necessários 2 mols de glicerol ($M = 92 \text{ g/mol}$) para a formação de 1 mol de HB ($M = 86 \text{ g/mol}$), resultando em um rendimento teórico máximo de 0,47 g/g. Segundo Gomez et al. (1996), há duas diferentes maneiras de obter o rendimento da produção de PHB por linhagens bacterianas a partir de uma determinada fonte de carbono. Uma delas é o rendimento teórico, onde assume-se que a fonte de carbono utilizada é convertida apenas em PHB. Outra forma, é o rendimento global, o qual é mais adaptado a realidade de cultivo, pois considera que parte da fonte de carbono é utilizada para a manutenção e crescimento celular, além da produção de polímero. Dessa forma, diante de diferentes acúmulos de polímero (PHB%) são obtidos diferentes rendimentos globais. Assim, mesmo diante de um valor de eficiência máxima de conversão da fonte de carbono em polímero, os valores de rendimento global serão menores que o rendimento teórico, pois o primeiro considera a fonte de carbono voltada a produção de biomassa residual. No estudo desenvolvido com as linhagens *C. metallidurans* MA 09 e *B. mimosarum* MA 18 foram obtidos rendimentos globais de 0,16 e

0,22 g/g. Comparando estes valores com o rendimento global máximo para estes cultivos, verificou-se que as linhagens MA 09 e MA 18 realizaram a produção de PHB com eficiências de 76 e 100%, respectivamente; com máximo aproveitamento da fonte de carbono utilizada.

7.3.3. Análise dos polímeros de *C. metallidurans* MA 09 e *B. mimosarum* MA 18 por cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho

O polímero produzido pelas linhagens MA 09 e MA 18 foram analisados por cromatografia gasosa de propil-ésteres, segundo especificações presentes no item 7.2.6. Ainda, foi realizada uma análise comparativa dos polímeros obtidos com o padrão PHB (Sigma-Aldrich®), através de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Estas técnicas foram utilizadas para a uma caracterização adicional dos polímeros obtidos por estas linhagens. A análise por cromatografia gasosa confirmou a composição de um polímero formado por 100% de HB. Na figura 7.9, encontra-se os espectros obtidos para os polímeros de *C. metallidurans* MA 09 e *B. mimosarum* MA 18. No espectro obtido, é possível verificar bandas de absorção no comprimento de onda 1720 cm^{-1} , as quais se referem aos grupos carbonilas (C=O), típica de poliésteres.

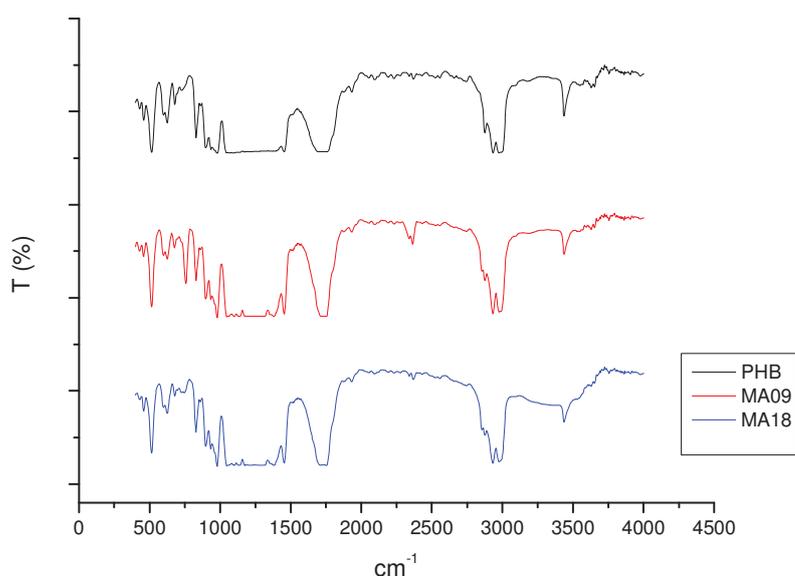


Figura 7.9-Espectro de FTIR dos polímeros produzidos por *C. metallidurans* MA 09 e *B. mimosarum* MA 18 em cultivos contendo glicerol bruto, comparado ao padrão PHB.

8. PRODUÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIVALERATO E POLI-3-HIDROXIBUTIRATO-CO-3-HIDROXIHEXANOATO A PARTIR DE GLICEROL DE BIODIESEL COM ÁCIDOS PROPIONICO E HEXANÓICO POR *PANDORAEA SPUTORUM* E *BURKHOLDERIA CEPACIA*

8.1. Introdução

Desde a década de 1940, os polímeros sintéticos passaram a conquistar o mercado mundial, substituindo produtos de vidro, madeira e até metais, em aplicações domésticas e industriais. Devido às vantagens oferecidas por suas propriedades físico-químicas, as quais garantiam estabilidade, alta durabilidade e praticidade de uso; os polímeros de origem petroquímica acumularam-se nos ecossistemas, configurando entre os maiores problemas ambientais da atualidade. Consequentemente, nas últimas duas décadas, aumentou o interesse público pela criação de produtos biodegradáveis, ecologicamente viáveis, e com potenciais características para a substituição dos plásticos derivados do petróleo, provocando um aumento no número de pesquisas científicas para a produção de biopolímeros (OJUMO, YU & SOLOMON, 2004).

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres de origem microbiana, sendo o polihidroxitirato (PHB) o mais conhecido entres estes biopolímeros (PANDIAN et al., 2010). Embora o PHB seja um potencial substituto para os polímeros de origem petroquímica, como o polipropileno (PP), seu número de aplicações é ainda limitada, devido sua alta cristalinidade, dureza e baixa flexibilidade; características que o tornam quebradiço (LAU et al., 2010). As propriedades térmicas e mecânicas do PHB têm sido modificadas através da adição de outros monômeros para a produção de copolímeros, tais como o poli-3-hidroxitirato-co-3-hidroxicanoato (PHB-HV) (LOO & SUDESH, 2007) e o poli-3-hidroxitirato-3-hidroxihexanoato (PHB-HHx) (QIU et al., 2006), resultando em menor cristalinidade e maior flexibilidade.

Várias técnicas de cultivo bacteriano têm sido empregadas na obtenção destes copolímeros, sendo bastante comum a obtenção de PHB-HV através da adição de ácido propiônico nos meios de cultivo, juntamente com glicose (CHOI & LEE, 1999), e PHB-HHx pela suplementação com ácido hexanóico (DENNIS, 1994). Porém, a utilização destes ácidos acaba gerando um aumento nos custos de produção destes copolímeros. Assim, uma alternativa para compensar estes gastos, tem sido a utilização de efluentes industriais ou fontes de carbono de baixo valor na obtenção da fração de HB do copolímero produzido (LEE et al., 2008).

Entre os subprodutos de processos industriais, o glicerol bruto, proveniente da produção de biodiesel, tem chamado a atenção por ser obtido em larga escala (10% do volume produzido) e apresentar preços cada vez mais reduzidos de mercado (YASDANI & GONZALES, 2007). Dessa forma, torna-se interessante o desenvolvimento de técnicas de cultivo de PHAs através da utilização deste subproduto como fonte de carbono. No trabalho apresentado, o principal objetivo a ser alcançado foi verificar a produção de PHB-HV e PHB-HHx em novas linhagens isoladas de mata atlântica, *Pandoraea sputorum* MA 03 e *Burkholderia cepacia* MA 13, a partir de glicerol bruto, adicionando-se ácidos propiônico e hexanóico aos meios de cultivo.

8.2. Materiais e Métodos

8.2.1. Meios de cultivo

Foram utilizados os meios de cultivo Caldo Nutriente (CN), Ágar Nutriente (AN) e Meio Mineral (MM).

8.2.1.1. Caldo e Ágar Nutriente

Extrato de carne.....	3,0 g/L
Peptona.....	5,0 g/L

Ágar Nutriente foi obtido com a adição de ágar 15-20 g/L.

8.2.1.2. Meio Mineral

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

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

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

Solução de elementos traços:

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

Ao Meio Mineral foram adicionadas diferentes concentrações de glicerol, como fonte de carbono, e (NH₄)₂SO₄, como fonte de nitrogênio, além de ácidos propiônico ou hexanóico, para a produção de PHAs.

8.2.1.3. Esterilização

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

8.2.2. Micro-organismos

Foram utilizadas as linhagens *Pandoraea sputorum* MA 03 e *Burkholderia cepacia* MA 13, isoladas a partir de solo de Mata Atlântica. As linhagens bacterianas acima citadas foram mantidas em placas de Petri, ágar inclinado e preservadas em tubos criogênicos contendo glicerol a 20%, sob congelamento a -20 °C e -80 °C; sendo realizada a manutenção de viabilidade das culturas microbianas periodicamente. Realizou-se também a preservação destas linhagens bacterianas através de liofilização, sendo estocadas em ampolas seladas a vácuo e mantidas em refrigerador (5-10 °C).

8.2.3. Cultivo de micro-organismos

8.2.3.1. Cultivos das linhagens *P. sputorum* MA 03 e *B. cepacia* MA 13 em glicerol bruto com ácidos propiônico e hexanóico

Foram realizados cultivos com os isolados de Mata Atlântica MA 03 e MA 13 em meios contendo 10 g/L de glicerol bruto e 1,0 g/L de ácido propiônico ou hexanóico, para verificar o potencial destas linhagens bacterianas na obtenção dos copolímeros PHB-HV e

PHB-HHx, respectivamente. Para tal, as linhagens em estudo foram estriadas a partir de cultura estoque em meio ágar nutriente, sendo incubados durante 72 h a 30°C. Transferiu-se colônias isoladas para tubos estéreis contendo um volume de 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%), realizando-se diluições para ajuste da densidade óptica ($\lambda=610$ nm) da suspensão bacteriana para $0,65\pm 0,02$ de absorvância (10^8 UFC), visando a padronização do pré-inóculo. Após, foram transferidos 1,5 mL desta suspensão para 50 mL de caldo nutriente, incubando-se durante 24 h a 30°C e 150 rpm de agitação. Utilizou-se 1,5 mL do cultivo em caldo nutriente para inocular 50 mL de meio mineral, contendo 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, além de glicerol bruto. Utilizou-se HCl 2M / NaOH 2M para ajustar o pH inicial dos meios de cultivos para 7,0. Os ácidos propiônico ou hexanóico foram adicionados aos meios de cultivo após 24 h, nas concentrações especificadas. Os experimentos foram conduzidos até 120 h, a 150 rpm e 30°C, sendo analisadas as amostras referentes aos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 h. O volume destas foi dividido em alíquotas de 5 mL e 45 mL, sendo centrifugadas a $10500 \times g$ e $11800 \times g$ por 10 minutos, respectivamente. A primeira foi utilizada para a determinação de consumo de glicerol, ácidos propiônico e hexanóico, além da biomassa. As células da segunda amostra foram congeladas e liofilizadas para a determinação da composição e quantidade de PHAs.

8.2.3.2. Cultivos de *P. sputorum* MA 03 e *B. cepacia* MA 13 em glicerol bruto e ácido propiônico utilizando planejamento experimental

As linhagens bacterianas MA 03 e MA 13 foram avaliadas em meios com diferentes temperaturas e concentrações de glicerol bruto, ácido propiônico e sulfato de amônio; utilizando um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional, com o objetivo de verificar a influência destas variáveis na quantidade total de polímero obtida e na formação do copolímero PHB-HV. Os cultivos foram conduzidos por 72 h a 150 rpm, sendo os parâmetros fermentativos e amostras processadas segundo o item 8.2.3.1. Cada planejamento foi composto de 28 experimentos, sendo 16 realizados nos níveis propostos, 4 réplicas dos pontos centrais e 8 ensaios nos pontos axiais. A variável glicerol bruto (X_1) foi distribuída nos níveis 15 (-1), 20 (0) e 25 g/L (+1); ácido propiônico (X_2) em 0,5 (-1), 1,0 (0) e 1,5 g/L (1,5); sulfato de amônio em 0,6 (-1), 1,0 (0) e 1,4 g/L (+1); e por fim, a temperatura controlada nos níveis 30 (-1), 33,5 (0) e 37 °C (+1). Os níveis das variáveis estudadas apresentaram-se na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a seguinte equação de codificação:

Equação geral:

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (8.1)$$

Onde:

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

X_0 é o valor real da variável no ponto central;

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

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

As equações codificadas nos experimentos são demonstradas pelas equações 8.2, 8.3, 8.4 e 8.5:

$$X_1 = X - 20/5 \quad (8.2)$$

$$X_2 = X - 1/0,5 \quad (8.3)$$

$$X_3 = X - 1/0,4 \quad (8.4)$$

$$X_4 = X - 33,5/3,5 \quad (8.5)$$

Os valores dos pontos axiais ($\pm\alpha$), para a geração de um planejamento rotacional, foram definidos pela equação abaixo:

$$\alpha = \pm(2^k)^{1/4} \quad (8.6)$$

Onde k é igual ao número de fatores (variáveis) do planejamento experimental. Como os planejamentos realizados apresentaram 4 variáveis ($k = 4$), $\alpha = \pm 2,0000$. Para os valores reais tem-se:

$$X_\alpha = X_0 \pm \alpha[(X_{+1} - X_{-1})/2] \quad (8.7)$$

Na tabela 8.1, pode ser observada a matriz obtida no planejamento experimental realizado, com as variáveis em seus respectivos níveis reais e codificados.

Tabela 8.1- Delineamento composto central rotacional com variáveis independentes codificadas. X_1 = concentração de glicerol bruto; X_2 = concentração de ácido propiônico; X_3 = concentração sulfato de amônio e X_4 =temperatura.

Tratamentos	Variáveis codificadas				
	X_1	X_2	X_3	X_4	
1	-1	-1	-1	-1	
2	-1	-1	-1	1	
3	-1	-1	1	-1	
4	-1	-1	1	1	
5	-1	1	-1	-1	
6	-1	1	-1	1	
7	-1	1	1	-1	
8	-1	1	1	1	
9	1	-1	-1	-1	
10	1	-1	-1	1	
11	1	-1	1	-1	
12	1	-1	1	1	
13	1	1	-1	-1	
14	1	1	-1	1	
15	1	1	1	-1	
16	1	1	1	1	
17	-2	0	0	0	
18	2	0	0	0	
19	0	-2	0	0	
20	0	2	0	0	
21	0	0	-2	0	
22	0	0	2	0	
23	0	0	0	-2	
24	0	0	0	2	
25	0	0	0	0	
26	0	0	0	0	
27	0	0	0	0	
28	0	0	0	0	
Variáveis independentes	Níveis reais				
	-2	-1	0	1	2
X_1 =Glicerol bruto (g/L)	10	15	20	25	30
X_2 =Ácido propiônico (g/L)	0	0,5	1	1,5	2
X_3 =Sulfato de amônio (g/L)	0,2	0,6	1	1,4	1,8
X_4 =Temperatura (°C)	26,5	30	33,5	37	40,5

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

$$Y = \beta_0 + aX_1 + bX_2 + cX_3 + dX_4 + eX_1^2 + fX_1X_2 + gX_1X_3 + hX_1X_4 + iX_2^2 + jX_2X_3 + kX_2X_4 + lX_3^2 + mX_3X_4 + nX_4^2 \quad (8.8)$$

Onde:

Y é a resposta estudada;

β_0 é o valor médio da resposta;

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n são constantes ou parâmetros da equação;

X_1 é a concentração de glicerol (g/L);

X_2 é a concentração de ácido propiônico (g/L);

X_3 é a concentração de sulfato de amônio (g/L);

X_4 é a temperatura (°C).

A partir da equação original (8.8) foi realizada uma aplicação estatística da estimativa dos parâmetros através dos valores de t de Student, sendo eliminados aqueles com nível de significância superior a 5%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes. O valor da distribuição t de Student foi definido como a relação entre o valor do parâmetro estimado e o seu desvio padrão. Eliminando os parâmetros não significativos, definiu-se para cada uma das respostas estudadas uma equação representativa dos efeitos das variáveis do processo que mais afetam a resposta avaliada.

O valor de F (Fisher) foi determinado pela razão entre o quadrado médio da equação ajustada (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR), como mostra a Equação (8.9). O valor obtido para F pode ser usado para a realização de um teste de hipótese para a verificação da adequação aos dados experimentais. Assim, se o valor de F calculado é maior que o valor

de F tabelado, rejeita-se a hipótese de nulidade do modelo obtido, sendo este considerado significativo. Quanto maior o valor de F, melhor será o ajuste do modelo em questão.

$$F = \frac{QME}{QMR} \quad (8.9)$$

O quadrado médio da equação (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR) são dados pelas Equações (8.10) e (8.11), respectivamente.

$$QME = \frac{\text{Soma dos quadrados dos valores preditos}}{\text{Numero de graus de liberdade da equação}} \quad (8.10)$$

$$QMR = \frac{\text{Soma dos quadrados do residuo}}{\text{Numero de graus de liberdade do residuo}} \quad (8.11)$$

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

8.2.4. 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, provenientes dos cultivos, foram ressuspenso em água destilada e submetidos à secagem em estufa a 105°C durante 24 h. A biomassa residual (X_R) foi obtida através da

diferença entre os valores de massa seca celular e polímero (g/L) obtidos nos cultivos realizados.

8.2.5. Determinação de glicerol e ácidos propiônico e hexanóico

A determinação das concentrações de glicerol e ácido propiônico foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se o cromatógrafo Prominence UFLC (Shimadzu[®]), acoplado aos detectores ultravioleta (SPD-20A UV/Vis[®]) e índice de refração (RID-10A[®]), equipado com a coluna Rezex ROA (300 x 7,8 mm) (Phenomenex[®]). As condições empregadas na análise foram: volume de injeção: 20µL; temperatura da coluna (forno): 65°C; e eluente: H₂SO₄ 0,0025M a uma vazão de 0,6 mL/min. Realizou-se a determinação das concentrações de ácido hexanóico através de cromatografia gasosa (Agilent 7890A GC System[®]), utilizando a coluna FFAP (30m x 0,53mm x 1,33µm). As temperaturas do injetor e detector (FID) foram, respectivamente, 250°C e 300°C. Injetou-se 0,2 µL das amostras avaliadas sob uma vazão de 3 mL/min. de gás de arraste, empregado um programa de temperatura do forno, com temperatura inicial de 130°C por 5 minutos, elevando-se a uma razão de 10°C/min. até 185°C. O consumo do substrato utilizado foi calculado através da diferença entre as concentrações iniciais e finais, observadas nos meios de cultivos, para seus respectivos experimentos fermentativos.

8.2.6. Determinação de PHAs

A quantidade e composição de PHAs foram determinadas através de cromatografia gasosa de propil-ésteres (RIIS & MAI, 1988). Entre 10 e 15 mg de células liofilizadas foram submetidas a reação de propanólise em tubos, aos quais se adicionaram 2 mL de uma solução de HCl em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2 dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido benzóico em propanol (40 g/L), como padrão interno. Os tubos foram fechados fortemente, sendo vedados com fita de PTFE, agitados e submetidos a 4 h de reação a 80°C, com agitação após os primeiros 40 minutos de propanólise. Ao final da reação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e posteriormente adicionou-se 4 mL de água ultrapura aos mesmos, sendo agitados vigorosamente por 30 segundos. Após a separação das fases aquosa (superior) e orgânica (inferior), a primeira foi descartada, utilizando então a fase orgânica para a análise de propil-ésteres. Todas as amostras foram estocadas em vials com septo de PTFE, sendo conduzidas para serem analisadas no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, localizado no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP/ São Paulo-SP). 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 Agilent 7890A GC System®, equipado com a coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). As temperaturas do injetor e detector (sistema de detecção por ionização de chama-FID) foram 250 e 300°C, respectivamente, utilizando-se hélio como gás de arraste a 0,8 mL/min. As análises foram conduzidas empregando-se um programa de temperaturas do forno com 100°C por 1 minuto, elevando-se a temperatura até 185°C a uma razão de 8°C/min e mantendo-se a 185°C por 15 minutos. Além dos padrões 3HB e 3HB-HV, polímeros produzidos por *Pseudomonas oleovorans* ou *Pseudomonas putida* a partir de diferentes fontes de carbono foram utilizados como padrões para a geração de curvas de calibração (3HHx, 3HHp, 3HO, 3HN, 3HD e 3HDd). O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes verificados nas amostras analisadas, sendo expresso em porcentagem da massa seca celular (PHA%) e em gramas de polímero por litro de cultivo (g/L).

Além disso, para verificar o rendimento na produção de PHB foi realizado o cálculo de rendimento global ($Y_{\text{HB/GLY}}^{\text{O}}$), para verificar a conversão de substrato consumido em produto (g/g), sendo os valores de rendimento global máximo utilizados de forma comparativa para obter a eficiência (%) das linhagens avaliadas em cultivo. O rendimento global é obtido através da razão entre a quantidade de PHB (g/L) produzida e o glicerol consumido em cultivo (g/L), levando em consideração tanto a fonte de carbono utilizada para a produção de polímero, como aquela direcionada ao crescimento celular (X_{R}). O cálculo do rendimento global máximo foi obtido a partir da equação 8.12, utilizando os valores de rendimento teórico e de biomassa residual máximos. O rendimento teórico máximo considera que a fonte de carbono é totalmente direcionada à produção de polímero, sendo obtido a partir da razão entre a quantidade de PHB (g/L) produzida e a fonte de carbono utilizada somente para a produção de polímero. Para o cálculo de rendimento teórico máximo, têm-se 2 mols de glicerol ($M = 92 \text{ g/mol}$) envolvidos na produção de 1 mol de PHB ($M = 86 \text{ g/mol}$), obtendo-se o valor de $Y_{\text{HB/GLY}}^{\text{T}} = 0,47$. O valor máximo de produção de biomassa residual a partir de glicerol foi considerado $Y_{\text{X/GLY}} = 0,50$ (YAMANE, 1993; GOMEZ et al., 1996).

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

(8.12)

Onde:

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

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

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

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

Nos cultivos com ácidos propiônico e hexanóico, foram calculados os rendimentos teóricos de produção dos monômeros HV e HHx, respectivamente, sendo consideradas as conversões diretas destes ácidos para a produção destes copolímeros (GOMEZ et al., 1996; SILVA et al., 2000; MENDONÇA, 2009).

8.2.7. Análise dos polímeros de *P. sputorum* MA 03 e *B. cepacia* MA 13 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A partir dos produtos da reação de propanólise das células liofilizadas de *P. sputorum* MA 03 e *B. cepacia* MA 13 (item 8.2.6) foi realizada a análise dos propil-ésteres obtidos, através de cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa. Foi utilizado o equipamento GC-MS Shimadzu 14B/QP5050A, com analisador tipo quadrupolo, sendo injetados 0,4 μ L de amostra em uma coluna BPX-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), com uma vazão de 2 mL/min. de gás de arraste Hélio e temperaturas do injetor e detector (FID), 280 e 320 °C, respectivamente. Conduziu-se a análise utilizando-se um programa de temperatura do forno, com início a 100°C e elevando-se a uma razão de 8°C/min até 210 °C, mantendo-a por 15 minutos. Os fragmentos dos propil-ésteres foram obtidos através de ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV.

8.3. Resultados e Discussão

8.3.1. Cultivos das linhagens *P. sputorum* MA 03 e *B. cepacia* MA 13 em glicerol bruto com ácidos propiônico e hexanóico

A maioria dos micro-organismos produtores de PHAs encontrados apresenta a capacidade de sintetizar exclusivamente o PHB (SURIYAMONGKOL et al., 2007). Embora este homopolímero apresente alto potencial de biodegradação, suas aplicações industriais têm sido limitadas devido ao seu elevado grau de cristalinidade, tornando-o quebradiço. Uma

alternativa tem sido a busca por linhagens bacterianas capazes de sintetizar o copolímero PHB-HV, pois a inserção de unidades de 3-hidroxicaprolato (HV), compostas por cinco átomos de carbono, resulta em um polímero mais flexível. A utilização de linhagens de *C. necator* e *Burkholderias* tem sido relatada na produção de PHB-HV a partir de carboidratos, porém uma produção significativa deste copolímero geralmente é obtida através da adição de precursores como ácido propiônico, juntamente com a fonte de carbono avaliada (SILVA et al., 2007).

O PHB-HHx é outro copolímero que vem ganhando destaque, pois a adição de unidades de HHx confere ao polímero maior flexibilidade (LIANQG, 2006). Doi et al. (1995) verificaram um aumento nos valores de alongamento de ruptura de 400 para 850%, quando a composição do copolímero obtido por *Aeromonas caviae* apresentava um aumento de 10 a 17 mol% do monômero HHx. Além de *A. caviae*, podemos destacar *Aeromonas hydrophila* (CHEN et al., 2001); *Bacillus megaterium* (DENNIS, 1994) e *Bacillus cereus* (CABALLERO, 1995), entre as bactérias capazes de produzir este copolímero. Recentemente, os trabalhos desenvolvidos com a linhagem *Burkholderia sacchari* têm demonstrando a habilidade de bactérias do gênero *Burkholderia* para a produção de PHB-HHx (BUFFONI, 2006; MENDONÇA, 2009). Diante destes fatos, torna-se interessante a realização de experimentos com a linhagem isolada de Mata Atlântica MA 13 para verificar seu potencial de produção dos copolímeros PHB-HV e PHB-HHx, uma vez que esta foi identificada anteriormente através de técnicas moleculares como *Burkholderia cepacia*.

A linhagem bacteriana MA 03, identificada como *Pandoraea sputorum*, também foi avaliada quanto à sua capacidade de obtenção destes copolímeros. O gênero *Pandoraea* é recente, sendo *P. sputorum* uma de suas cinco espécies identificadas. Anteriormente, as bactérias deste gênero eram classificadas entre *Ralstonias* e *Burkholderias* (COENYE et al., 2000). Apesar ter sido relatada sua capacidade de produzir PHB (BRENNER et al., 2005), geralmente são relatados trabalhos na área clínica com bactérias deste gênero. Dessa forma, pouco se conhece a respeito do mecanismo de produção de PHAs a partir da espécie *P. sputorum*, sendo interessante o desenvolvimento de estudos na obtenção destes polímeros por estas bactérias. Assim, as linhagens *P. sputorum* MA 03 e *B. cepacia* MA 13 foram submetidas a cultivos em meio mineral contendo glicerol bruto, além de ácidos propiônico ou hexanóico (item 8.2.3.1), para verificar seus potenciais na obtenção dos copolímeros PHB-HV e PHB-HHx, respectivamente.

Na tabela 8.2 e 8.3, pode ser verificado os resultados dos cultivos realizados com as linhagens MA 03 e MA 13, em meio mineral contendo 10 g/L de glicerol bruto e 1g/L de ácido hexanóico. Nos experimentos com a linhagem MA 03 não foi observada a produção do

monômero HHx. No entanto, pode ser verificado um total consumo do ácido hexanóico fornecido após 72 h, onde os maiores valores de acúmulos (%MSC) e produção de PHB passaram a ser obtidos.

Tabela 8.2-Resultados dos cultivos da linhagem MA 03 (*P.sputorum*) em meio mineral com 10 g/L de glicerol bruto e 1 g/L de ácido hexanóico, durante 120 h a 30°C.

Tempo (h)	Consumo de Glicerol (g/L)	Consumo de ácido hexanóico (g/L)	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	HB (mol%)	HHx (mol%)	PHA (g/L)	X _R (g/L)	Y ⁰ _{HB/GLY} (g/g)	Y _{HHx/AH} (g/g)
24	7,58	-	1,44	14,90	100	-	0,214	1,23	0,028	-
48	8,86	0,57	1,82	11,04	100	<ld	0,201	1,62	0,023	0
72	10,00	1,00	3,22	45,27	100	<ld	1,458	1,76	0,146	0
96	10,00	1,00	2,84	48,60	100	<ld	1,380	1,46	0,138	0
120	10,00	1,00	3,02	46,05	100	<ld	1,391	1,63	0,139	0

Tabela 8.3- Resultados dos cultivos da linhagem MA 13 (*B. cepacia*) em meio mineral com 10 g/L de glicerol bruto e 1 g/L de ácido hexanóico, durante 120 h a 30°C.

Tempo (h)	Consumo de Glicerol (g/L)	Consumo de ácido hexanóico (g/L)	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	HB (mol%)	HHx (mol%)	PHA (g/L)	X _R (g/L)	Y ⁰ _{HB/GLY} (g/g)	Y _{HHx/AH} (g/g)
24	7,49	-	1,64	20,71	100	-	0,340	1,30	0,045	-
48	8,98	0,48	2,44	5,96	100	<ld	0,146	2,29	0,016	0
72	10,00	0,46	3,16	34,02	99,76	0,24	1,075	2,09	0,107	0,007
96	10,00	0,48	3,26	42,63	99,68	0,32	1,390	1,87	0,138	0,012
120	10,00	0,50	2,58	51,08	99,80	0,20	1,318	1,26	0,131	0,007

Nos cultivos realizados com *B. cepacia* MA 13, pode ser notado pequenas frações de HHx após 72 h de cultivo, as quais não ultrapassaram 0,32 mol%, apresentando um rendimento de $Y_{HHx/AH} = 0,012$ g/g em relação ao ácido hexanóico consumido. Este valor pode ser considerado muito baixo se o compararmos com o rendimento teórico de 0,98 g/g para esta reação; onde 1 mol de HHx ($M = 114$ g/mol) seria produzido a partir de 1 mol de

ácido hexanóico ($M = 116 \text{ g/mol}$), com total aproveitamento da fonte de carbono na obtenção deste monômero. Porém, geralmente são observadas produções reduzidas do monômero HHx por linhagens selvagens. Mendonça (2009) ao realizar experimentos com a linhagem *B. sacchari* LFM 101, utilizando 10 g/L de glicose e 1 g/L de ácido hexanóico, obteve um copolímero com 1,02 mol% de HHx (0,016 g/L), após 72 h de cultivo. Em outras linhagens, cuja PHA sintase é similar a *Burkholderia* sp., como *Cupriavidus necator*, são verificadas produções máximas de 2,2 mol % de HHx (GROSS et al., 1989; ULMER et al., 1989).

As linhagens MA 03 e MA 13 também foram avaliadas quanto à produção de PHB-HV em meios de cultivo com ácido propiônico. Nos ensaios com MA 03 foram observadas as maiores frações de HV a partir de 72 h de cultivo, apresentando valores de 25,86 mol% após 120 h de cultivo (Tabela 8.4). Embora seja observada uma maior proporção do monômero HV, o maior acúmulo de polímero é obtido após 72 h (18,55%), com valores decrescentes até 120 h. Como pode ser verificado na tabela 8.5, a linhagem MA 13 apresentou as maiores produções de polímero nestes experimentos. Ao contrário da linhagem MA 03, a maior fração de HV foi obtida após 48 h (24,84 mol%), sendo observados valores decrescentes após este período. Ainda, a produção de HB aumenta nos períodos avaliados, atingindo o máximo após 120 h (28,99 %MSC).

Enquanto, os valores de biomassa tendem a estabilizar-se após 72 h nos ensaios com a linhagem MA 03, onde se verificou um menor consumo das fontes de carbono utilizadas; nos cultivos realizados com MA 13 observa-se valores crescentes de biomassa até 120 h de cultivo, com um consumo de 90% do glicerol bruto, após 96h, e consumo total do ácido propiônico utilizado, após 48 h. Este fato sugere que esta última linhagem apresenta uma maior afinidade pelas fontes de carbono utilizadas.

Tabela 8.4- Resultados dos cultivos da linhagem MA 03 (*P.sputorum*) em meio mineral com 10 g/L de glicerol bruto e 1 g/L de ácido propiônico, durante 120 h a 30°C.

Tempo (h)	Consumo de Glicerol Bruto (g/L)	Consumo de Ácido Propiônico (g/L)	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	HB (mol%)	HV (mol%)	PHA (g/L)	X_R (g/L)	$Y_{HB/GLY}^0$ (g/g)	$Y_{HV/AP}$ (g/g)
24	3,01	-	0,53	3,01	100	-	0,016	0,51	0,005	-
48	3,66	0,19	0,62	16,93	91,12	8,88	0,106	0,51	0,026	0,057
72	4,05	0,24	1,13	18,55	80,76	19,24	0,209	0,92	0,040	0,189
96	4,27	0,23	1,13	9,00	78,50	21,50	0,101	1,03	0,023	0,107
120	5,69	0,43	1,34	9,77	74,14	25,86	0,131	1,21	0,016	0,088

Tabela 8.5- Resultados dos cultivos da linhagem MA 13 (*B cepacia*) em meio mineral com 10 g/L de glicerol bruto e 1 g/L de ácido propiônico, durante 120 h a 30°C.

Tempo (h)	Consumo de Glicerol Bruto (g/L)	Consumo de Ácido Propiônico (g/L)	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	HB (mol%)	HV (mol%)	PHA (g/L)	X _R (g/L)	Y ⁰ _{HB/GLY} (g/g)	Y _{HV/AP} (g/g)
24	2,46	-	1,37	5,84	100	-	0,080	1,29	0,032	-
48	6,1	1,00	1,97	19,07	75,16	24,84	0,375	1,60	0,044	0,104
72	7,76	1,00	2,18	22,91	78,49	21,51	0,500	1,68	0,049	0,121
96	9,00	1,00	3,02	22,05	98,93	1,07	0,667	2,35	0,073	0,008
120	9,3	1,00	3,41	28,99	86,10	13,90	0,988	2,42	0,089	0,156

Atualmente, têm sido estudadas diferentes estratégias para a obtenção de PHB-HV, através de linhagens geneticamente modificadas e diferentes regimes de operação. Várias linhagens selvagens produtoras deste copolímero têm apresentado taxas reduzidas do monômero HV, sendo observados baixos rendimentos a partir da adição de ácido propiônico nos meios de cultivo. Provavelmente, o acúmulo do monômero HB e a predominância das vias oxidativas para a geração de energia, a partir dos precursores de HV, resultem nos baixos valores de conversão de ácido propiônico em unidades deste monômero (GOMEZ et al., 1996).

Para solucionar este problema, alguns pesquisadores têm desenvolvido espécies mutantes na tentativa de obter maiores proporções do monômero HV. Silva et al. (2000) obtiveram melhoras significativas no acúmulo de 3-hidroxicvalerato por mutantes de *B. sacchari* IPT 101 em meios contendo glicose e ácido propiônico, sendo observado um acúmulo de até 68,3 mol% do monômero HV, enquanto a linhagem selvagem apresentava 6,2 mol%. Neste presente trabalho, as proporções de HV obtidas nos cultivos com as linhagens selvagens MA 03 e MA 13, utilizando glicerol bruto e ácido propiônico, assemelham-se aos valores observados em alguns dos mutantes de *B. sacchari*.

Silva et al. (2000) obtiveram para a linhagem selvagem um rendimento de 0,10 g/g em meio mineral com glicose e ácido propiônico. Os resultados de rendimento observados nos experimentos com as linhagens bacterianas MA 03 e MA 13 podem ser comparados com este estudo, apresentando valores de $Y_{HV/AP} = 0,19$ g/g (MA 03) e $Y_{HV/AP} = 0,16$ g/g (MA 13).

Tais rendimentos podem ser considerados significativos para linhagens selvagens, principalmente pela utilização de glicerol bruto, uma fonte de carbono de baixo valor agregado. Porém, estes resultados ainda distanciam-se do rendimento máximo de 1,35 g/g (GOMEZ et al, 1996), no qual seria obtido 1 mol de HV ($M = 100$ g/mol) a partir de 1 mol de ácido propiônico ($M = 74$ g/mol).

8.3.2. Cultivos de *P. sputorum* MA 03 e *B. cepacia* MA 13 em glicerol bruto e ácido propiônico utilizando planejamento experimental

Os resultados obtidos nos cultivos preliminares com as linhagens MA 03 e MA 13, utilizando glicerol bruto e ácido propiônico (item 8.3.1), demonstraram que estes micro-organismos apresentam potencial para a produção de PHB-HV. Dessa forma, na tentativa de otimizar o processo de obtenção deste copolímero, foi realizado um planejamento experimental com cada linhagem isolada, avaliando a influência de 4 variáveis. Assim, escolheu-se a concentração de glicerol bruto (X_1), a fonte de carbono principal avaliada neste estudo, sendo distribuída nos níveis 15 (-1), 20 (0) e 25 g/L (+1); a concentração de ácido propiônico (X_2), necessária a obtenção do monômero HV, em 0,5 (-1), 1,0 (0) e 1,5 g/L (1,5); a concentração de sulfato de amônio, necessário ao crescimento bacteriano e acúmulo de polímero, nos níveis 0,6 (-1), 1,0 (0) e 1,4 g/L (+1); e por fim, a temperatura controlada em 30 (-1), 33,5 (0) e 37 °C (+1).

Neste trabalho, optou-se pela otimização do processo de produção de PHB-HV utilizando planejamento experimental pelas vantagens oferecidas por esta metodologia. A maioria dos experimentos científicos em microbiologia busca alcançar melhores rendimentos de seus processos pelas variações dos parâmetros fermentativos, utilizando técnicas de tentativas e erros. Ao adotar a metodologia de planejamento experimental pode-se reduzir o número de experimentos e obter uma maior qualidade da informação através da interação entre as variáveis envolvidas no estudo realizado. Além disso, permite calcular e avaliar o nível de confiança estatística com o qual se pode estimar a reprodutibilidade dos resultados desejados (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Certamente, há diversos tipos de planejamentos experimentais que podem ser realizados para se atingir um objetivo, partindo-se de uma condição distante da otimizada. O tipo de planejamento fatorial necessário depende do número de variáveis independentes a serem estudadas inicialmente.

Segundo Rodrigues & Iemma (2005), para 4 variáveis pode-se fazer a opção pelo delineamento composto central rotacional, ou um planejamento fatorial fracionado. Porém,

este último, geralmente é utilizado para uma investigação inicial em relação aos efeitos das variáveis estudadas, e na maioria das vezes necessita-se de outro planejamento experimental para atingir as condições ótimas do processo avaliado.

Neste estudo, foram realizados 2 planejamentos do tipo delineamento composto central rotacional para as linhagens MA 03 e MA 13. Cada planejamento foi composto de 28 experimentos, sendo 16 realizados nos níveis propostos, 4 réplicas dos pontos centrais e 8 ensaios nos pontos axiais. Os níveis escolhidos para cada variável foram fundamentados em experimentos anteriores realizados com estas linhagens bacterianas. Os cultivos seguiram os parâmetros fermentativos especificados no item 8.2.3.2, sendo realizados até 72 h. Este tempo de cultivo foi escolhido, pois neste período foram verificados os maiores valores de rendimento na produção de HV, nos ensaios com glicerol bruto e ácido propiônico (item 8.3.1). Entre os níveis destes delineamentos, um diferencial é o valor do ponto axial negativo ($-\alpha$) da variável ácido propiônico (X_2), a qual apresenta valor 0 g/L; ou seja, um dos níveis é a ausência deste substrato. Em cultivos anteriores, notou-se uma diminuição do crescimento celular e diferenças nos valores de acúmulo de polímeros, obtidos pelas linhagens avaliadas, na presença deste insumo. A produção do copolímero PHB-HV tem sido geralmente obtida a partir de cultivos com o ácido propiônico. Embora esta fonte de carbono seja um precursor na obtenção de monômeros de HV, este ácido também é comumente empregado na conservação de alimentos, como agente microbicida, especialmente contra alguns fungos. Mesmo, apresentando uma toxicidade menor para bactérias, aumentos em sua concentração dificultam o crescimento destes micro-organismos (PAULUS, 1993). Como os PHAs são produtos intracelulares, sua produção total está também ligada ao aumento de biomassa. Portanto, além das concentrações ideais de ácido propiônico para a obtenção de maiores frações do monômero HV, também é necessário verificar o efeito deste insumo na produção total de polímero, envolvendo as frações de HV e HB. Assim, entre os pontos do delineamento realizado, analisou-se a ausência deste insumo e avaliou-se a produção total de PHA (g/L), como uma das respostas destes experimentos.

Nas tabelas 8.6 e 8.8 podem ser verificados os resultados dos planejamentos experimentais realizados com as linhagens MA 03 e MA 13, para as respostas PHA g/L e produção de HV g/L. Além disso, ainda pode ser visualizado nas tabelas 8.7 e 8.9 o consumo de glicerol e ácido propiônico, a MSC (g/L), as frações dos monômeros HB e HV (mol%), o acúmulo de polímero (%MSC) e os rendimentos na obtenção dos monômeros HB ($Y_{HB/GLY}^O$) e HV ($Y_{HV/AP}$), obtidos nestes cultivos.

Tabela 8.6-Resultados dos cultivos de *P. sutorum* MA 03 em meio mineral após 72h, através de delineamento composto central rotacional.

Experimento	Glicerol (g/L)	Ácido propiônico (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Temperatura (°C)	PHA(g/l)	HV(g/l)
1	15	0,5	0,6	30,0	0,997	0,083
2	15	0,5	0,6	37,0	1,263	0,022
3	15	0,5	1,4	30,0	1,064	< ld
4	15	0,5	1,4	37,0	1,178	< ld
5	15	1,5	0,6	30,0	0,033	< ld
6	15	1,5	0,6	37,0	0,192	< ld
7	15	1,5	1,4	30,0	0,025	< ld
8	15	1,5	1,4	37,0	0,824	< ld
9	25	0,5	0,6	30,0	1,363	0,158
10	25	0,5	0,6	37,0	1,440	0,039
11	25	0,5	1,4	30,0	0,948	< ld
12	25	0,5	1,4	37,0	1,006	< ld
13	25	1,5	0,6	30,0	0,025	< ld
14	25	1,5	0,6	37,0	0,257	< ld
15	25	1,5	1,4	30,0	0,059	< ld
16	25	1,5	1,4	37,0	0,982	< ld
17	10	1,0	1,0	33,5	0,561	< ld
18	30	1,0	1,0	33,5	0,873	< ld
19	20	0	1,0	33,5	3,722	< ld
20	20	2,0	1,0	33,5	0,022	0,003
21	20	1,0	0,2	33,5	0,123	0,004
22	20	1,0	1,8	33,5	0,632	< ld
23	20	1,0	1,0	26,5	0,435	< ld
24	20	1,0	1,0	40,5	< ld	< ld
25	20	1,0	1,0	33,5	0,763	< ld
26	20	1,0	1,0	33,5	0,931	< ld
27	20	1,0	1,0	33,5	0,790	< ld
28	20	1,0	1,0	33,5	0,821	< ld

Tabela 8.7-Resultados do consumo de glicerol e ácido propiônico, biomassa, composição do polímero e rendimento nos cultivos de *P. sputorum* MA 03 em meio mineral após 72 h, através de delineamento composto central rotacional.

Experimento	Consumo de glicerol (g/L)	Consumo de Ácido propiônico (g/L)	MSC (g/L)	%PHA	HB mol%	HV mol%	X _R (g/L)	Y ^o _{HB/GLY} (g/g)	Y _{HV/AP} (g/g)
1	8,89	0,50	2,10	47,49	92,80	7,20	1,10	0,103	0,165
2	9,96	0,50	2,48	50,91	98,53	1,47	1,22	0,125	0,043
3	9,57	0,05	2,52	42,24	100	< ld	1,46	0,111	0
4	10,37	0,50	3,22	36,59	100	< ld	2,04	0,114	0
5	7,44	0,04	0,92	3,63	100	< ld	0,89	0,004	0
6	8,50	0,80	1,14	16,83	100	< ld	0,95	0,023	0
7	9,39	0,02	1,34	1,85	100	< ld	1,32	0,003	0
8	10,23	0,88	2,60	31,68	100	< ld	1,78	0,080	0
9	14,87	0,50	2,74	49,74	89,87	10,13	1,38	0,081	0,316
10	14,92	0,50	3,10	46,44	97,69	2,31	1,66	0,094	0,077
11	14,94	0,14	2,32	40,87	100	< ld	1,37	0,063	0
12	16,90	0,50	2,94	34,22	100	< ld	1,93	0,060	0
13	14,58	0,12	1,32	1,93	100	< ld	1,30	0,002	0
14	15,52	0,87	1,54	16,70	100	< ld	1,28	0,017	0
15	14,39	0,29	2,00	2,95	100	< ld	1,94	0,004	0
16	16,85	0,88	2,50	39,27	100	< ld	1,52	0,058	0
17	7,94	0,48	1,84	30,47	100	< ld	1,28	0,071	0
18	16,33	0,60	2,66	32,82	100	< ld	1,79	0,053	0
19	14,26	0	6,30	59,08	100	< ld	2,58	0,261	0
20	12,14	1,04	0,92	2,39	88,61	11,39	0,90	0,002	0,003
21	11,67	0,55	0,82	15,71	97,43	2,57	0,70	0,011	0,007
22	11,58	0,54	3,10	20,39	100	< ld	2,47	0,055	0
23	13,27	0,69	1,38	31,55	100	< ld	0,95	0,033	0
24	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	0	0
25	12,62	0,55	2,04	37,42	100	< ld	1,28	0,060	0
26	12,17	0,49	2,00	46,57	100	< ld	1,07	0,077	0
27	11,34	0,58	2,08	37,97	100	< ld	1,29	0,070	0
28	11,72	0,40	2,92	28,13	100	< ld	2,10	0,070	0

Tabela 8.8-Resultados dos cultivos de *B. cepacia* MA 13 em meio mineral após 72h, através de delineamento composto central rotacional.

Experimento	Glicerol (g/L)	Ácido propiônico (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Temperatura (°C)	PHA (g/L)	HV (g/L)
1	15	0,5	0,6	30,0	0,899	0,090
2	15	0,5	0,6	37,0	1,170	0,022
3	15	0,5	1,4	30,0	1,074	< ld
4	15	0,5	1,4	37,0	1,131	< ld
5	15	1,5	0,6	30,0	0,018	< ld
6	15	1,5	0,6	37,0	0,285	< ld
7	15	1,5	1,4	30,0	0,088	< ld
8	15	1,5	1,4	37,0	1,049	< ld
9	25	0,5	0,6	30,0	1,039	0,107
10	25	0,5	0,6	37,0	1,332	0,023
11	25	0,5	1,4	30,0	1,387	< ld
12	25	0,5	1,4	37,0	1,393	< ld
13	25	1,5	0,6	30,0	0,016	< ld
14	25	1,5	0,6	37,0	0,521	< ld
15	25	1,5	1,4	30,0	0,070	< ld
16	25	1,5	1,4	37,0	0,657	< ld
17	10	1,0	1,0	33,5	0,600	< ld
18	30	1,0	1,0	33,5	0,621	< ld
19	20	0	1,0	33,5	2,014	< ld
20	20	2,0	1,0	33,5	0,037	0,006
21	20	1,0	0,2	33,5	0,850	< ld
22	20	1,0	1,8	33,5	1,572	0,029
23	20	1,0	1,0	26,5	0,787	< ld
24	20	1,0	1,0	40,5	< ld	< ld
25	20	1,0	1,0	33,5	0,786	< ld
26	20	1,0	1,0	33,5	0,650	< ld
27	20	1,0	1,0	33,5	0,701	< ld
28	20	1,0	1,0	33,5	0,622	< ld

Tabela 8.9-Resultados do consumo de glicerol e ácido propiônico, biomassa, composição do polímero e rendimento nos cultivos de *B. cepacia* MA 13 em meio mineral após 72 h, através de delineamento composto central rotacional.

Experimento	Consumo de glicerol (g/L)	Consumo de ácido propiônico (g/L)	MSC (g/L)	% PHA	HB mol%	HV mol%	X _R (g/L)	Y ^O _{HB/GLY} (g/g)	Y _{HV/AP} (g/g)
1	9,88	0,50	1,86	48,34	91,26	8,74	0,96	0,081	0,180
2	8,99	0,50	2,16	54,15	98,38	1,62	0,99	0,128	0,044
3	9,7	0,05	2,26	47,53	100	< ld	1,19	0,111	0
4	10,39	0,50	3,40	33,25	100	< ld	2,27	0,109	0
5	9,52	0,43	1,20	1,47	100	< ld	1,18	0,002	0
6	10,74	0,74	1,74	16,40	100	< ld	1,46	0,027	0
7	9,79	0,06	1,42	6,21	100	< ld	1,33	0,009	0
8	9,89	0,85	2,56	40,96	100	< ld	1,51	0,106	0
9	15,50	0,50	2,28	45,59	91,00	9,00	1,24	0,060	0,214
10	15,10	0,50	2,40	55,49	98,54	1,46	1,07	0,087	0,045
11	15,98	0,17	2,88	48,17	100	< ld	1,49	0,087	0
12	16,39	0,50	3,78	36,86	100	< ld	2,39	0,085	0
13	14,91	0	1,54	1,05	100	< ld	1,52	0,001	0
14	15,11	0,90	1,82	28,62	100	< ld	1,30	0,034	0
15	14,86	0,29	2,00	3,48	100	< ld	1,93	0,005	0
16	16,84	0,87	2,28	28,82	100	< ld	1,62	0,039	0
17	7,11	0,47	2,32	25,86	100	< ld	1,72	0,084	0
18	14,97	1,0	2,24	27,74	100	< ld	1,62	0,042	0
19	15,29	0	6,56	30,70	100	< ld	4,55	0,132	0
20	10,92	1,02	1,12	3,29	85,14	14,86	1,08	0,003	0,006
21	9,14	0,62	1,34	63,46	100	< ld	0,49	0,093	0
22	12,20	0,61	2,80	56,14	98,40	1,60	1,23	0,126	0,048
23	13,32	1,0	1,64	48,01	100	< ld	0,85	0,059	0
24	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	< ld	0	0
25	12,09	0,58	2,46	31,95	100	< ld	1,67	0,065	0
26	11,05	0,58	2,16	30,11	100	< ld	1,51	0,059	0
27	12,48	0,58	2,50	28,06	100	< ld	1,80	0,056	0
28	11,98	0,6	2,14	29,05	100	< ld	1,52	0,052	0

Como pode ser verificado, a partir dos valores observados nos cultivos com as linhagens MA 03 e MA 13, há uma tendência na produção de HV nas menores concentrações de ácido propiônico (0,5 g/L) e sulfato de amônio (0,6 g/L). Porém, o número de resultados nulos obtidos para esta variável resposta inviabiliza a análise estatística nos níveis propostos para este delineamento. Isto pode ser confirmado a partir dos valores da análise de variância (ANOVA), realizada para avaliar a regressão múltipla dos resultados obtidos para a produção de HV em cada linhagem bacteriana (Tabelas 8.10 e 8.11). Neste estudo, a validação dos experimentos realizados foi interpretada através de um teste de hipótese. A hipótese de nulidade (H_0) diz que o modelo não é significativo, ou seja, todos os parâmetros são iguais a zero. A hipótese alternativa (H_1) afirma que o modelo é significativo, dentro de um nível de significância de 5% (p-valor). Nas ANOVAs dos resultados obtidos para cada linhagem foram observados valores de F calculado (F_C) menores que F tabelado ($F_{14,13;0,05} = 2,55$). Os valores de p (nível de significância) ultrapassam 5%. Assim, não é possível obter um modelo confiável a partir dos dados obtidos. Tal fato, provavelmente pode ser justificado pelos valores dos níveis da variável ácido propiônico, escolhidos para este experimento. Embora, tenha-se notado produções de HV nas menores concentrações de ácido propiônico e sulfato de amônio, ainda é possível verificar produções deste monômero em pequenas quantidades nos experimentos 20 e 21 em MA 03, em 20 e 22 em MA 13. Estes resultados contrariam a tendência de produção observada nestes cultivos e podem sugerir a produção de pequenas frações de HV nos níveis propostos que não foram detectadas pela análise de propil-ésteres. Dessa forma, para a obtenção de um modelo significativo seria necessária a realização de outro planejamento composto, com valores dos níveis para esta variável mais sensíveis à produção do monômero HV e menos agressivos ao crescimento celular; provavelmente em concentrações menores de ácido propiônico. Portanto, os resultados de produção de HV obtidos neste estudo são discutidos quantitativo e qualitativamente, sendo as análises estatísticas efetuadas apenas para a produção total de polímero (PHA g/L).

Tabela 8.10- Análise de variância para a produção do monômero HV nos cultivos de *P. sputorum* MA 03 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _C	p-valor
Regressão	0,020842	14	0,001489	2,037557	0,104256
Resíduos	0,009498	13	0,000731		
Total	0,030340				

$R^2=82,88\%$; $F_{14,13;0,05}=2,55$

Tabela 8.11- Análise de variância para a produção do monômero HV nos cultivos de *B. cepacia* MA 13 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _C	p-valor
Regressão	0,011953	14	0,000854	1,635511	0,191367
Resíduos	0,006787	13	0,000522		
Total	0,018740				

$R^2=79,87\%$; $F_{14,13;0,05}=2,55$

Nos planejamentos realizados para ambas as linhagens, os maiores valores de produção e rendimento foram observados no experimento 9, com 25 g/L de glicerol bruto a 30 °C, com a linhagem MA 03 apresentando 0,16 g/L do monômero HV e 0,32 g/g de rendimento na produção do mesmo. Para a linhagem *B. cepacia* MA 13 foi observada uma produção de 0,11 g/L e rendimento de 0,21 g/g. Ao compararmos esse valores com aqueles obtidos em cultivos anteriores, sendo 0,19 g/g para MA 03 e 0,16 g/g para MA 13, onde foram utilizados 10 g/L de glicerol bruto e 1 g/L de ácido propiônico; nota-se um efeito positivo sobre a produção do monômero HV a partir da diminuição da concentração de ácido propiônico para 0,5 g/L, acompanhado do aumento da concentração de glicerol bruto para 25 g/L. Por outro lado, o ajuste da temperatura de 30 para 37°C exerce um efeito negativo no

acúmulo de HV, favorecendo um aumento nos valores de biomassa e na proporção do monômero HB (mol%).

Embora não seja possível realizar uma análise estatística confiável a partir dos dados obtidos na produção de HV, a razão principal da existência deste capítulo, no presente trabalho, é relatar a importância dos resultados verificados na obtenção deste monômero por estas linhagens, ressaltando o seu potencial para pesquisas futuras. A produção de PHAs utilizando o glicerol como fonte de carbono é recente e passou a tornar-se mais importante com a adoção do biodiesel por matrizes energéticas de diversos países. Portanto, ainda há poucos trabalhos publicados (BORMAN & ROTH, 1999; ASHBY, SOLAIMAN & FOGLIA, 2004; ASHBY, SOLAIMAN & FOGLIA, 2005; KOLLER et al., 2005; THOMPSON & HE, 2006; DE ALMEIDA et al., 2007; MOTHEs et al., 2007; NIKEL et al., 2008; CAVALHEIRO et al., 2009; IBRAHIM & STEINBÜCHEL, 2009; KAWATA & AIBA, 2010; SHRISVASTAV et al., 2010; ZHU et al., 2010; ASHBY, SOLAIMAN & STRAHAN, 2011; DOBROTH et al., 2011; MORALEJO-GÁRATE et al., 2011). Entre 16 referências aqui apresentadas, apenas uma é voltada a produção de PHB-HV a partir de glicerol puro, com um máximo acúmulo de 10 mol% (KOLLER et al., 2005). Assim, torna-se necessário a descoberta de novos micro-organismos com potencial de produção deste copolímero, utilizando o glicerol como fonte de carbono. Portanto, o rendimento de 0,32 g/g alcançado nos cultivos com *P. sputorum* MA 03 pode ser considerado significativo para uma linhagem selvagem, sendo equivalente a 23,7 % do valor teórico máximo de 1,35 g/g (GOMEZ et al., 1996). Tal valor pode ser comparado a alguns mutantes de *B. sacchari* afetados em seu metabolismo de propionato, com melhoras em seu rendimento na produção de HV, como IPT 182, 184, 185, 186, 187, 188 e 198. Porém, ainda distancia-se dos altos valores obtidos com a linhagem mutante IPT 189, cujos cultivos apresentava rendimentos de 0,81 nos trabalhos de Silva et al. (2000) e 1,25 nos experimentos em fermentador desenvolvidos por Rocha et al. (2007). Estas comparações servem para denotar o potencial desta linhagem para a realização de estudos futuros na produção destes copolímeros.

Quanto à produção total de polímero, a partir dos resultados obtidos pode ser verificada a forte influência das variáveis ácido propiônico e sulfato de amônio no acúmulo (%MSC) e produção de polímero (PHA g/L) nas linhagens MA 03 e MA 13, avaliadas neste trabalho.

Através dos valores obtidos nos cultivos de *P. sputorum* MA 03 para a resposta produção total de polímero (PHA g/L), realizou-se uma regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*, resultando na seguinte equação geral para a síntese de PHAs:

$$Y = 0,826 + 0,047X_1 - 0,594X_2 + 0,063X_3 + 0,073X_4 - 0,039X_1^2 - 0,001X_1X_2 - 0,043X_1X_3 - 0,003X_1X_4 + 0,250X_2^2 + 0,140X_2X_3 + 0,100X_2X_4 - 0,123X_3^2 + 0,073X_3X_4 - 0,164X_4^2 \quad (8.13)$$

A análise de variância pôde confirmar a significância do modelo obtido, com o valor de F calculado (5,83) maior que F tabelado (2,55), negando a hipótese de nulidade da equação obtida. O coeficiente de determinação apresentou um valor de 86,25%, demonstrando um bom ajuste dos dados da variável resposta para os níveis propostos neste planejamento.

Tabela 8.12-Análise de variância para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P. sputorum* MA 03 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _C	p-valor
Regressão	12,70528	14	0,907520	5,829018	0,001488
Resíduos	2,02397	13	0,155690		
Total	14,72925				

R²=86,25%; F_{14,13;0,05}=2,55

Abaixo, pode ser visualizado na Figura 8.1 os valores preditos pela equação em função dos valores observados, verificando-se a proximidade destes em relação à reta de tendência.

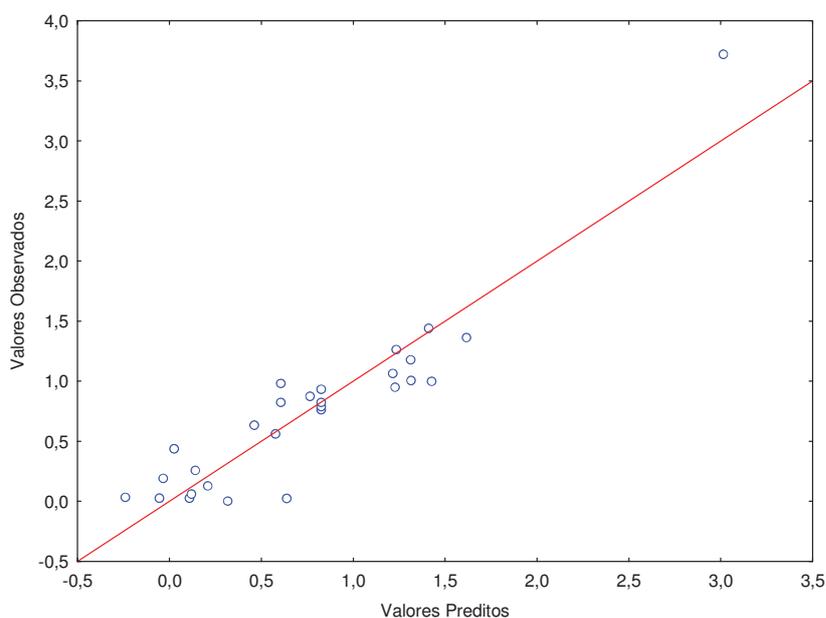


Figura 8.1-Valores observados em função dos valores preditos para a produção de PHAs, obtidos nos cultivos de *P. sputorum* MA 03 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento experimental.

A partir da equação geral 8.13 foram eliminados os parâmetros não significativos, ou seja, aqueles que apresentaram nível de significância acima de 5% para o teste t de student. Assim, as variáveis relacionadas a estes parâmetros foram desconsideradas, utilizando apenas aquelas estatisticamente viáveis para o modelo obtido. Na tabela 8.13 podem ser observados os parâmetros mais significativos para o modelo ajustado.

Tabela 8.13- Resultados da regressão múltipla para a produção de PHAs obtidos nos cultivos *P. sputorum* MA 03 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento experimental.

Fator	Parâmetro	t de student	p-valor
Constante β_0	0,501242	5,20097	0,000022
X_2	-0,594258	-7,55191	0,000000
X_2^2	0,304225	4,13307	0,000352
$R^2 = 0,75$	$F_C = 37,06$		$F_T(2,25) = 4,26$

Nota-se que ao eliminar as variáveis não significativas há um aumento no valor de F_C (37,06) em relação ao seu valor tabelado de 3,39; garantindo a validade do modelo ajustado. O coeficiente de determinação ($R^2=0,75$) apresentado indica um ajuste satisfatório deste novo modelo. Considerando apenas as variáveis significativas obteve-se a seguinte equação ajustada:

$$Y = 0,501 - 0,594X_2 + 0,304 X_2^2 \quad (8.14)$$

Na nova equação, verifica-se que o ácido propiônico é a única variável significativa para o planejamento realizado. Ao avaliar as respostas obtidas nos cultivos da linhagem MA 03, pode ser observada a influência das variáveis glicerol, sulfato de amônio e temperatura sobre a produção de PHAs. Porém, o efeito deletério do aumento das concentrações de ácido propiônico sobre a produção de polímero é tão significativo, que em um modelo ajustado torna-se estatisticamente irrelevante o efeito provocado pela variação dos outros fatores, nos níveis propostos. Comparando o valor de MSC obtido no experimento 19 (6,3 g/L) na ausência de ácido propiônico, com o restante dos valores obtidos nos outros experimentos, nota-se o efeito negativo sobre a produção de biomassa em maiores concentrações deste insumo. Além disso, nos níveis de 1,5 e 2,0 g/L de ácido propiônico verificaram-se menores

valores de acúmulo de polímero (%MSC). A produção de PHAs depende essencialmente da capacidade de acúmulo do micro-organismo e da biomassa obtida. Assim, nesta linhagem estudada os níveis superiores da variável ácido propiônico apresentam uma dupla influência contra a produção de polímero. No experimento 19, obteve-se uma produção de 3,72 g/L de polímero na ausência de ácido propiônico. O maior valor obtido para a produção de PHB-HV, com um rendimento de 0,32 g/g e 0,16 g do monômero HV, apresentou uma produção total de polímero de 1,36 g/L. Considerando estes valores, ao utilizar o ácido propiônico, para a obtenção deste copolímero, há uma diminuição de ao menos 63,4% da produção de polímero observada, quando esta linhagem é utilizada apenas para a produção de PHB.

Na figura 8.2 pode ser observada a superfície de resposta obtida a partir do modelo ajustado. Através da interação entre as concentrações de ácido propiônico e sulfato de amônio, nota-se que esta última variável não exerce efeito estatístico significativo sobre a resposta avaliada. A região em vermelho escuro demonstra onde os maiores valores de produção de polímero podem ser obtidos neste modelo.

Uma das vantagens da realização de um planejamento de experimentos é a interação entre as variáveis utilizadas para a resposta em estudo (RODRIGUES & IEMMA, 2005). Na produção de PHAs, geralmente, a limitação da fonte de nitrogênio, associada ao excesso de fonte de carbono, favorece o acúmulo de polímero (LEE, 1996). Nos experimentos realizados com a linhagem MA 03, embora os níveis de concentração da fonte de carbono não sejam determinantes, os menores valores de sulfato de amônio favorecem o acúmulo de polímero. No entanto, o efeito positivo desta variável sobre a produção de PHAs torna-se nulo na interação com a variável ácido propiônico, nas concentrações de 1,5 e 2,0 g/L. Neste caso, o aumento da temperatura de 30 para 37°C parece amenizar as reduções no percentual celular de polímero. Interessantemente, nas menores concentrações de ácido propiônico o aumento da temperatura favorece a produção de biomassa, ao invés do acúmulo de polímero.

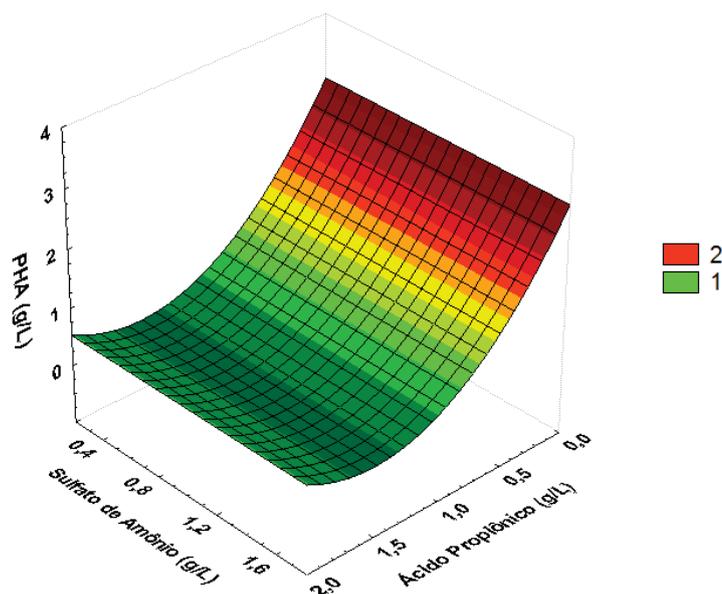


Figura 8.2-Superfície de resposta para a produção de PHAs em função das concentrações de ácido propiônico e sulfato de amônio nos cultivos de *P. sputorum* MA 03 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento experimental.

Os experimentos com a linhagem *B. cepacia* MA 13 parecem seguir as mesmas tendências verificadas nos resultados com a linhagem MA 03. No entanto, foram verificadas menores produções de polímero, com 2,01 g/L no experimento 19, onde não foi adicionado ácido propiônico. Neste ensaio, o valor de biomassa de 6,56 g/L, comparado aos valores de MSC obtidos nos outros experimentos, evidenciam mais uma vez o efeito negativo da variável ácido propiônico sobre a produção de biomassa. Contudo, para esta linhagem, nas menores concentrações desta variável, notou-se um aumento nos valores de acúmulo de polímero. No experimento 19, apesar da biomassa verificada para a linhagem MA 13 apresentar um valor superior àquele obtido nas mesmas condições de cultivo de *P. sputorum* MA 03, a menor produção de polímero deve-se a um menor acúmulo intracelular, observado neste cultivo (30,70 %MSC). Em experimentos realizados anteriormente com as linhagens deste estudo, verificou-se uma inibição no acúmulo de polímero nos cultivos de MA 03, a

partir de 72 h. Ao contrário, a linhagem MA 13 apresentou maiores valores de produção de PHAs até 120 h de cultivo.

Para esta linhagem, também foi realizada uma regressão linear a partir dos resultados obtidos na produção de polímero (PHA g/L), utilizando o programa *Statistica 7.0*, resultando na seguinte equação geral:

$$Y = 0,690 + 0,031X_1 - 0,445X_2 + 0,126X_3 + 0,057X_4 - 0,029X_1^2 - 0,066X_1X_2 - 0,023X_1X_3 - 0,010X_1X_4 + 0,075X_2^2 + 0,030X_2X_3 + 0,106X_2X_4 + 0,122X_3^2 + 0,017X_3X_4 - 0,082X_4^2 \quad (8.15)$$

A validade do modelo obtido foi confirmada através dos resultados da análise de variância (Tabela 8.14), na qual pode ser observado um valor de $F_C = 5,48$ maior que $F_T = 2,55$, rejeitando através deste teste a hipótese de nulidade. O coeficiente de determinação demonstra que 85,51% da variabilidade dos resultados pode ser explicada pela equação empírica.

Tabela 8.14-Análise de variância para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *B. cepacia* MA 13 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_C	p-valor
Regressão	6,372011	14	0,455144	5,479275	0,002012
Resíduos	1,079863	13	0,083066		
Total	7,451874				

$R^2=85,51\%$; $F_{14,13;0,05}=2,55$

Os valores preditos em função dos valores observados (Figura 8.3) demonstram graficamente a proximidade entre as respostas obtidas nos experimentos em relação às fornecidas pela equação 8.15.

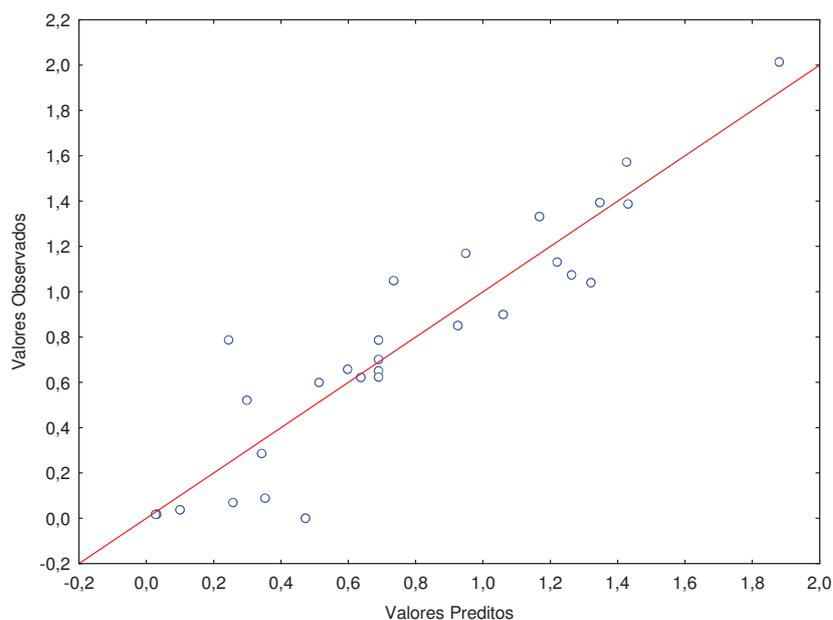


Figura 8.3-Valores observados em função dos valores preditos para a produção de PHAs, obtidos nos cultivos de *B. cepacia* MA 13em meio mineral após 72h, utilizando planejamento experimental.

Eliminando-se os parâmetros da equação geral com nível de significância acima de 5% para o teste t de student, obtiveram-se apenas as variáveis com maior relevância estatística para o modelo obtido (Tabela 8.15).

Tabela 8.15- Resultados da regressão múltipla para a produção de PHAs obtidos nos cultivos de *P. sputorum* MA 03 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento experimental.

Fator	Parâmetro	t de student	p-valor
Constante β_0	0,653799	9,34774	0,000000
X_2	-0,444805	-7,78893	0,000000
X_3	0,125504	2,19769	0,037861
X_3^2	0,127649	2,38957	0,025076
$R^2= 0,75$	$F_C= 23,74$		$F_T(3,24) = 3,01$

A partir do modelo ajustado obtido através da eliminação das variáveis não significativas, verifica-se um aumento no valor de F calculado ($F_C = 23,74$) em relação a F tabelado. O valor de R^2 indica um ajuste satisfatório das respostas ao novo modelo. Assim, utilizando apenas as variáveis com nível de significância abaixo de 5%, foi obtida a seguinte equação:

$$Y = 0,654 - 0,445X_2 + 0,126X_3 + 0,128X_3^2 \quad (8.16)$$

Ao contrário do modelo ajustado obtido a partir da regressão linear dos resultados nos cultivos da linhagem MA 03, nos experimentos com *B. cepacia* MA 13 pode ser verificada na equação 8.16 a interação das variáveis ácido propiônico e sulfato de amônio. Embora o nível de significância (p-valor) para a variável X_2 (ácido propiônico) seja menor, os valores da variável X_3 e sua interação quadrática podem ser estatisticamente considerados para o modelo observado. Nos cultivos com *B. cepacia* MA 13 pode ser verificado um efeito positivo sobre o acúmulo de polímero (%MSC) no sentido dos menores valores de concentração de sulfato de amônio. Assim como, nos experimentos com MA 03, o aumento nas concentrações de ácido propiônico para 1,5 e 2,0 g/L tem efeito predominante sobre a fonte de nitrogênio,

exercendo um efeito negativo na produção de polímero. Diferentemente, nestes experimentos o aumento da temperatura de 30 a 37 °C favorece o acúmulo de biomassa nas maiores concentrações de sulfato de amônio (1,6 g/L). Porém, quando esta fonte de nitrogênio apresenta valores reduzidos de 0,6 g/L ou diante dos maiores valores de concentração de ácido propiônico, a temperatura exerce um efeito contrário, no sentido da produção intracelular de polímero.

Abaixo na figura 8.4 pode ser verificada a influência das variáveis ácido propiônico e sulfato de amônio sobre a produção de polímero no modelo ajustado obtido nos experimentos com *B. cepacia* MA 13. Enquanto, há um aumento da resposta no sentido das menores concentrações de ácido propiônico, pode ser observado o efeito antagônico exercido pela variável sulfato de amônio, criando duas regiões de maior produção. Uma delas pode ser verificada na maior concentração deste insumo (1,8 g/L), onde são obtidas os maiores valores de biomassa; outra na concentração de 0,2 g/L, a qual favorece um maior acúmulo intracelular de polímero.

Outro resultado interessante são os valores de rendimento global obtidos para a produção de PHB. Nos experimentos 19, cujos cultivos foram realizados sem a adição de ácido propiônico, verificaram-se rendimentos na produção de PHB a partir de glicerol bruto de 0,26 g/g para MA 03 e 0,13 g/g em MA 13. Ao compararmos com o rendimento global máximo para estes experimentos (GOMEZ et al., 1996), foram alcançados valores de eficiência de 91,6 e 87,8%, respectivamente, to total possível. Comparando-se estes valores com aqueles obtidos no experimento 9, onde foi observada a maior produção de HV, verificou-se uma diminuição no rendimento de HB e aumento para HV. Neste cultivo, a linhagem MA 03 apresentou um rendimento de 0,08 g/g para a produção de HB e 0,32 g/g para HV. Da mesma forma, para MA 13 obteve-se 0,06 e 0,13 g/g para os monômeros HB e HV, respectivamente. Em cultivos realizados anteriormente, com a linhagem *P. sputorum* MA 03 (item 8.3.1), notou-se uma estabilização nos valores de biomassa e uma queda no acúmulo de PHB (%MSC), após adição de ácido propiônico, seguido de um aumento de HV, após 72 h. Estes fatos podem sugerir um direcionamento da fonte de carbono glicerol, para o fornecimento de acetil-CoA para ser condensado com propionil-CoA, na formação de 3-cetovaleril-CoA, para a produção do monômero HV (MATSUMOTO et al., 2010).

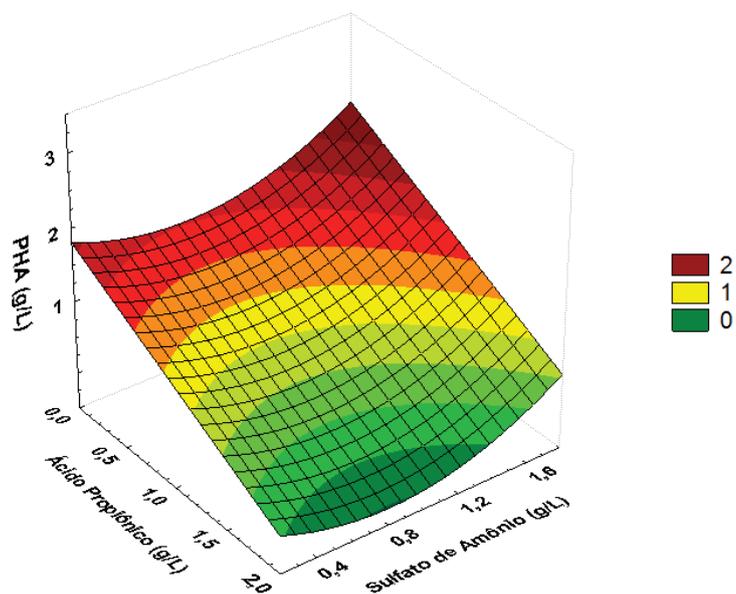


Figura 8.4-Superfície de resposta para a produção de PHAs em função das concentrações de ácido propiônico e sulfato de amônio nos cultivos de *B. cepacia* MA 13 em meio mineral após 72h, utilizando planejamento experimental.

8.3.3. Análise dos polímeros de *P. sputorum* MA 03 e *B. cepacia* MA 13 por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A partir dos produtos da reação de propanólise das células liofilizadas de *P. sputorum* MA 03 e *B. cepacia* MA 13 foi realizada a análise dos propil-ésteres obtidos, através de cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa, com a finalidade de melhor auxiliar a caracterização dos polímeros obtidos por estas linhagens, evitando a possibilidade de que as produções do monômero HV correspondessem a outros compostos, com o mesmo tempo de retenção na cromatografia gasosa realizada anteriormente. Assim, as amostras com os melhores resultados de rendimento na produção de HV foram submetidas a esta análise, seguindo as especificações do item 8.2.7 (Materiais e Métodos).

Abaixo pode ser visualizados os cromatogramas e espectros de massa obtidos para o polímero produzido pelas linhagens MA 03 (Figuras 8.5, 8.6 e 8.7) e MA13 (Figuras 8.8, 8.9

e 8.10). Em todos os espectros pode ser detectado o fragmento com m/e 131, característico de propil-ésteres de 3-hidroxicanoatos, o qual é formado pela clivagem α do grupo funcional hidroxila (LEE & CHOI, 1995; SILVA-QUEIROZ et al., 2009). Além disso, os diferentes constituintes de PHAs podem ser identificados pela análise dos fragmentos de m/e [M-59]. Na análise realizada o fragmento m/e 87 corresponde ao propil-éster de 3-hidroxiбутirato e m/e 101 ao 3-hidroxi valerato.

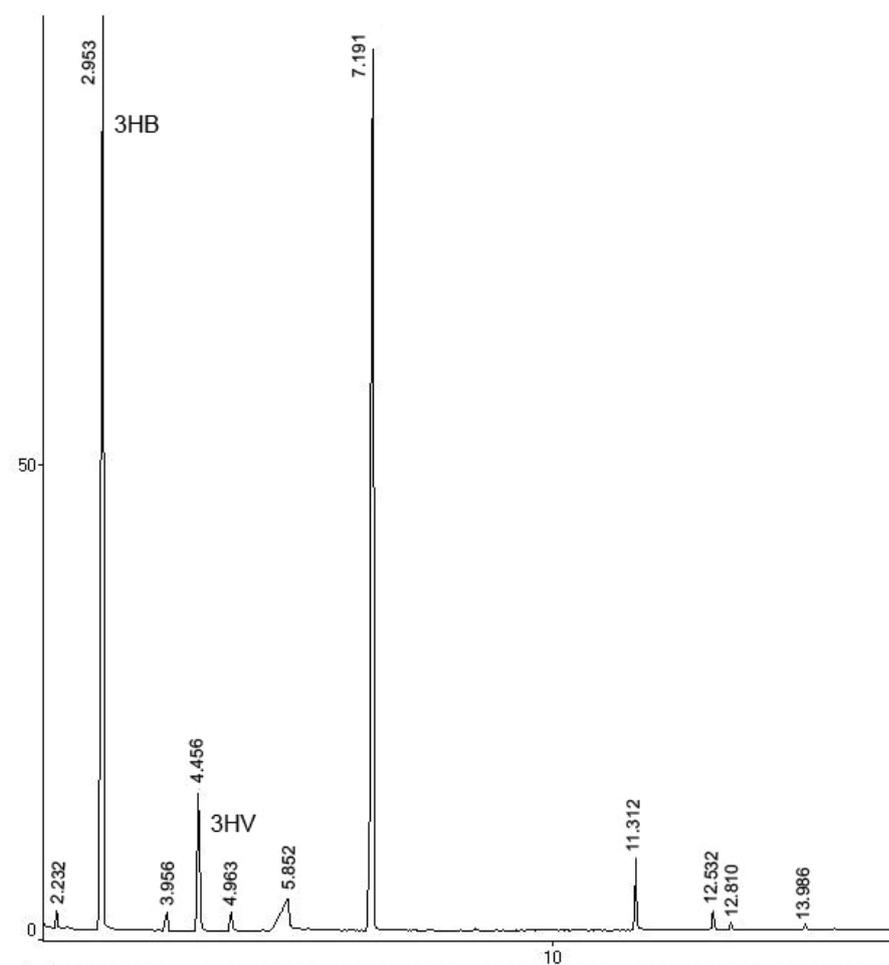


Figura 8.5-Espectro de cromatografia gasosa de propil-ésteres de 3-hidroxicanoatos, indicando o tempo de retenção relativo aos picos de 3HB e 3HV obtido nos cultivos com *P. sutorum* MA 03.

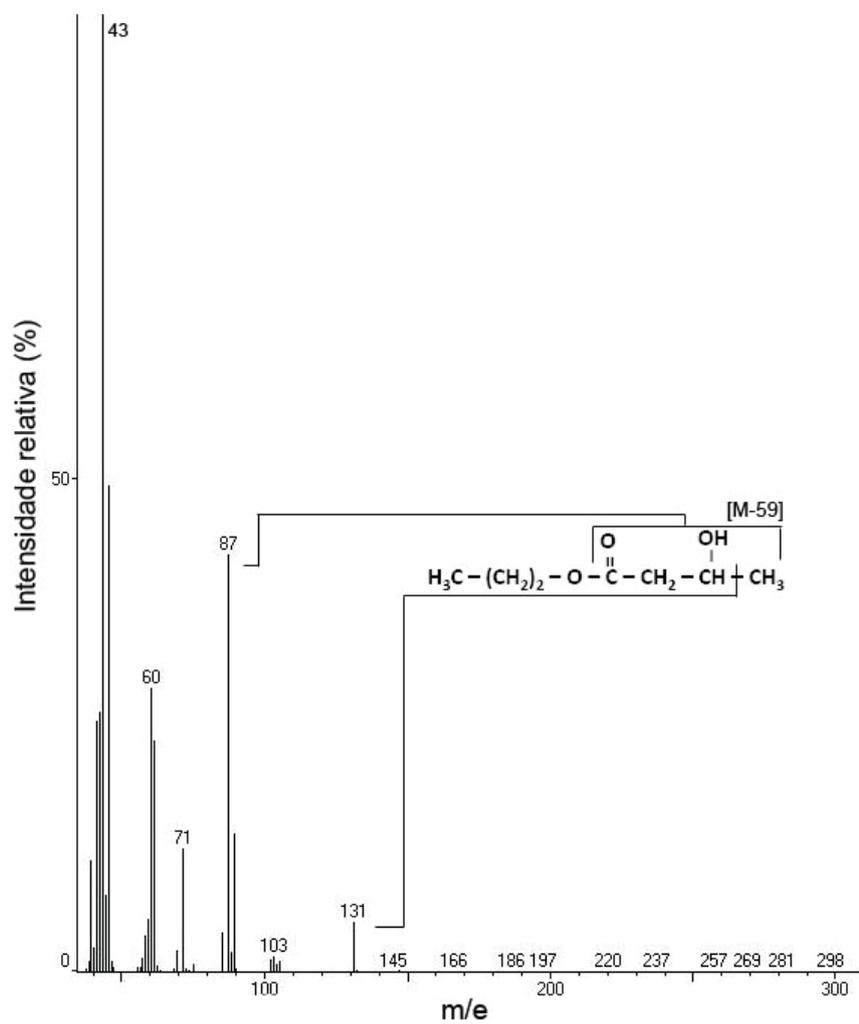


Figura 8.6-Espectro de massa de propil-ésteres de 3-hidroxiacanoatos (3-hidroxi butiril-propil-éster), relativo ao polímero obtido nos cultivos com *P. sputorum* MA 03.

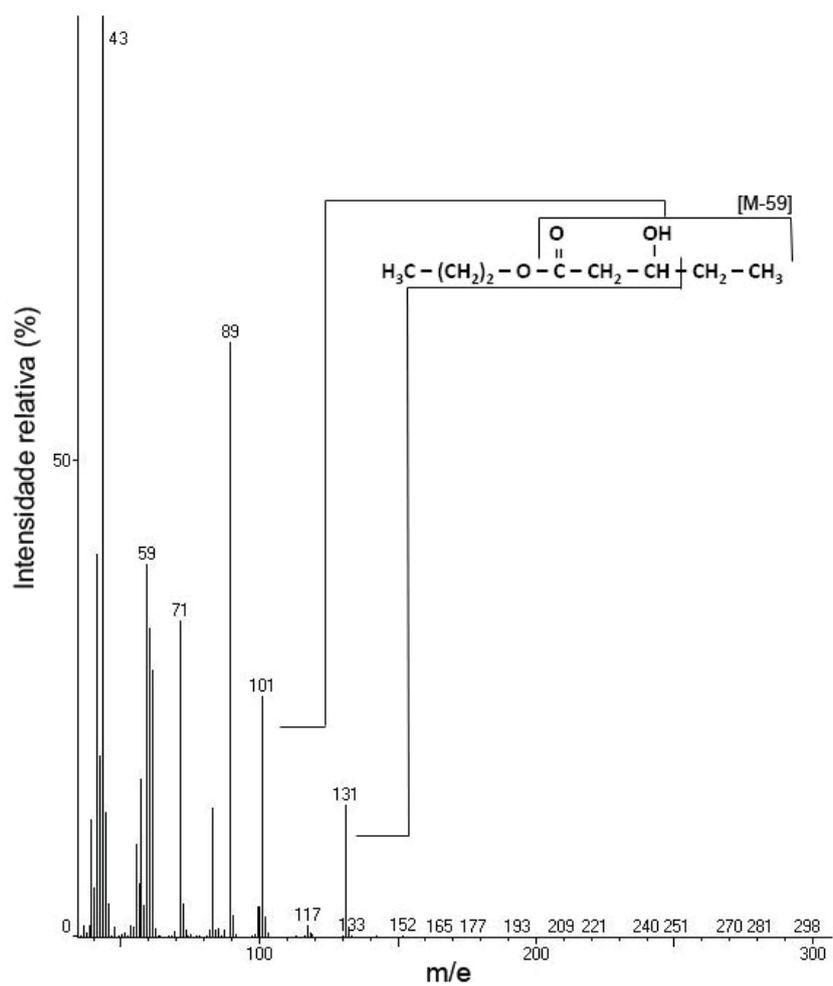


Figura 8.7-Espectro de massa de propil-ésteres de 3-hidroxiálcanoatos (3-hidroxiálaleril-propil-éster), relativo ao polímero obtido nos cultivos com *P. sputorum* MA 03.

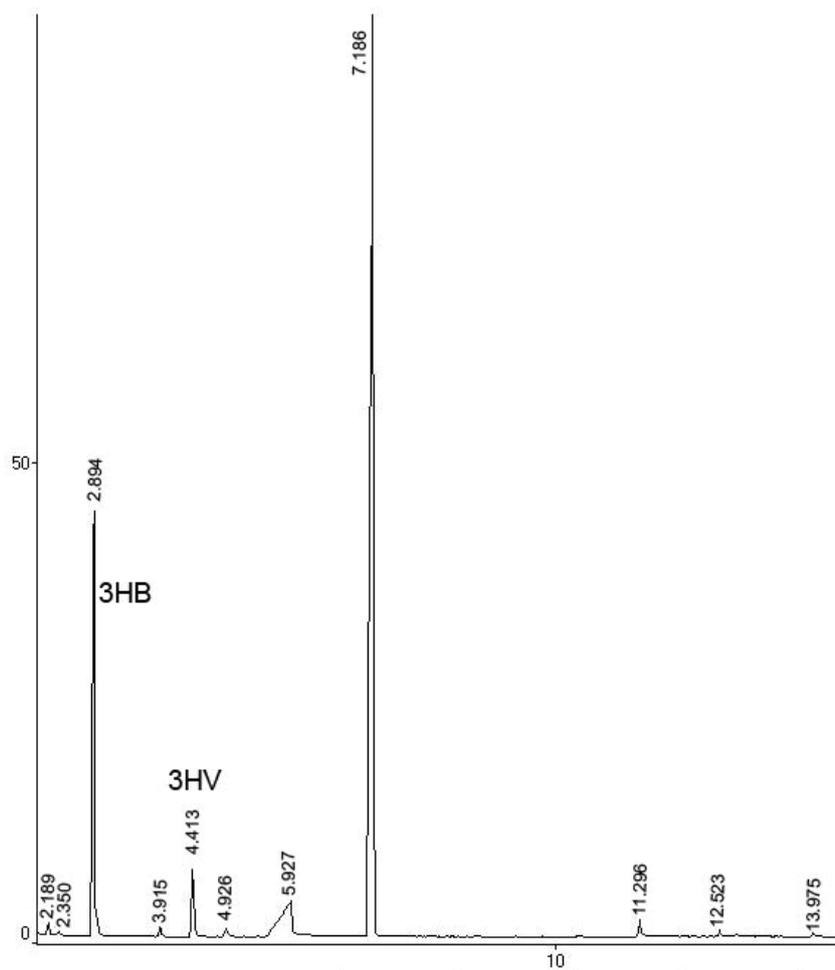


Figura 8.8-Espectro de cromatografia gasosa de propil-ésteres de 3-hidroxicanoatos, indicando o tempo de retenção relativo aos picos de 3HB e 3HV obtido nos cultivos com *B. cepacia* MA 13.

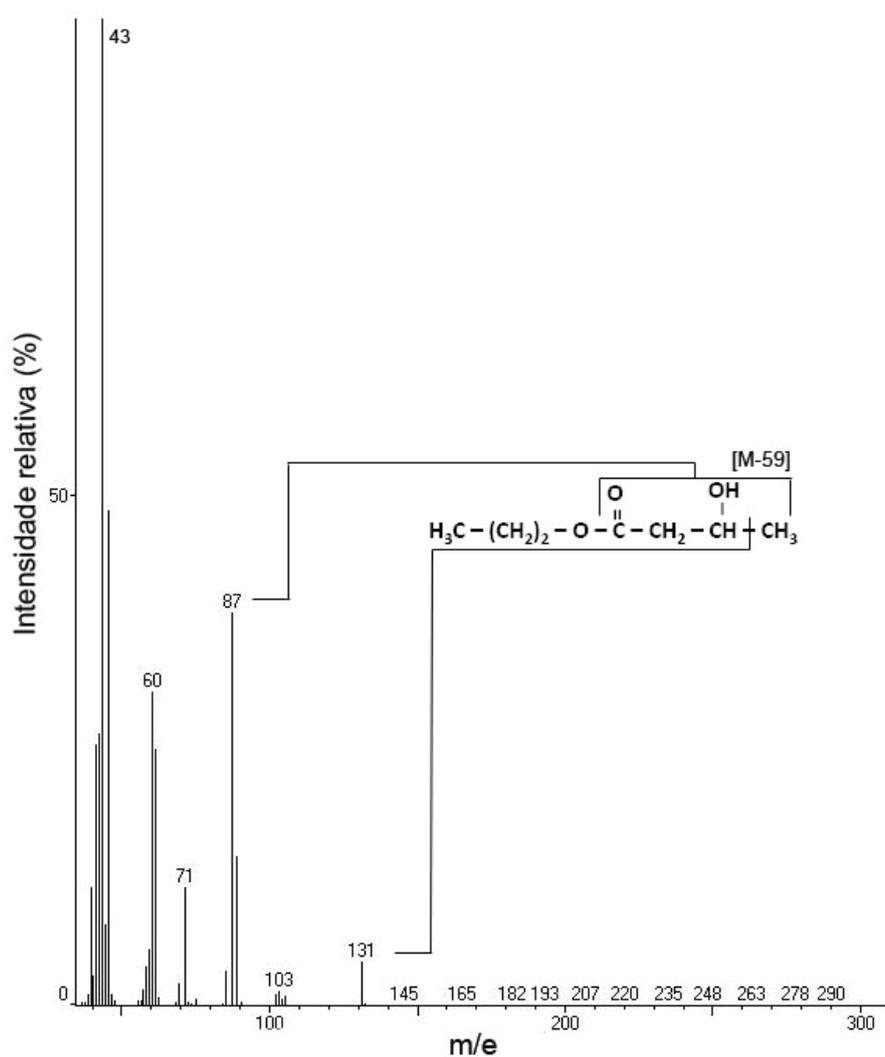


Figura 8.9-Espectro de massa de propil-ésteres de 3-hidroxiálcanoatos (3-hidroxi-butiril-propil-éster), relativo ao polímero obtido nos cultivos com *B. cepacia* MA 13.

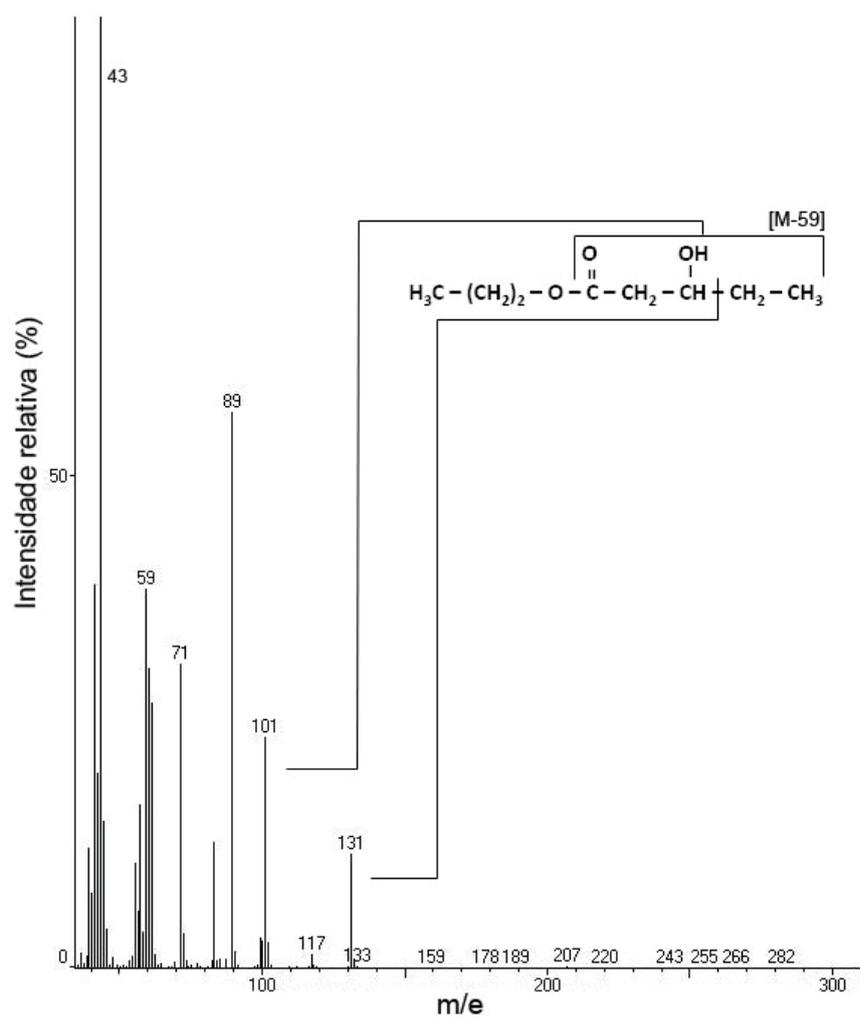


Figura 8.10-Espectro de massa de propil-ésteres de 3-hidroxiacanoatos (3-hidrovaleril-propil-éster), relativo ao polímero obtido nos cultivos com *B. cepacia* MA 13.

9. CONCLUSÕES

- Entre 107 micro-organismos isolados de solo de Mata Atlântica, as linhagens *Pandoraea sputorum* MA 03, *Cupriavidus metallidurans* MA 09, *Burkholderia cepacia* MA 13 e *Burkholderia mimosarum* MA 18 apresentaram-se como as mais promissoras para a produção de PHB a partir de glicerol.
- As linhagens bacterianas deste estudo apresentaram maiores produções e acúmulos intracelular de polímero em glicerol bruto, proveniente de usina de biodiesel, demonstrando que este subproduto é um melhor substrato para a produção de PHAs nestas linhagens, em comparação ao glicerol puro.
- Entre as linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas a partir de planejamento experimental, LMI 6c apresentou-se como a mais promissora para a produção de PHAs em glicerol puro.
- Nos planejamentos experimentais realizados com linhagens de *P. aeruginosa*, há uma tendência no acúmulo do monômero HD, porém com maiores proporções de HDd. Tal diferença na proporção entre estes monômeros poderia ser atribuída a uma deficiência na assimilação da fonte de carbono na formação de um polímero típico, pois se observa frações residuais de HHx e HO, principalmente, em concentrações menores de sulfato de amônio, quando um maior acúmulo de polímero seria favorecido.
- Nos experimentos realizados com *P. aeruginosa* 6c, nota-se uma quantidade expressiva de HB, variando em uma faixa de 62,7-78,9 mol% (PHA-scl), dificilmente produzido por linhagens selvagens de *P. aeruginosa*. A produção simultânea de HB e PHAs-mcl, na composição do polímero obtido, sugere a síntese de dois tipos diferentes de PHA sintases presentes nesta linhagem, com a expressão de dois genes responsáveis pela produção dessas enzimas.
- Nos cultivos realizados com as linhagens de *P. aeruginosa* LMI 6c e LDM 03 o óleo de soja demonstrou ser um melhor substrato do que o glicerol bruto para a produção de PHAs.
- Entre as linhagens de *P. aeruginosa* avaliadas em glicerol bruto, LDM 03 apresentou os melhores resultados de produção de PHAs-mcl (1,38 g/L). Estes resultados são próximos àqueles obtidos em óleo de soja (1,42 g/L), demonstrando que esta linhagem está mais adaptada a produção em glicerol bruto, em comparação com as outras linhagens avaliadas neste estudo.

- Através dos cultivos de cinética de *P. aeruginosa* LMI 6c e LDM 03, conclui-se que o glicerol bruto é consumido preferencialmente para o crescimento celular, enquanto o óleo de soja é um melhor substrato para o acúmulo intracelular de polímero.
- Nos cultivos com glicerol bruto, foram observadas menores proporções do monômero HB (mol%) produzido pela linhagem LMI 6c, em comparação aos experimentos com glicerol puro. Através dos resultados obtidos, verificou-se uma produção de HB associada ao consumo de glicerol, na fase exponencial de crescimento microbiano.
- As linhagens LMI 6c e LDM 03 em cultivos com glicerol bruto produzem um polímero constituído principalmente do monômero HD. A adição de óleo de soja, aos meios de cultivo, favorecem a produção de HHx e HO, mas apresentam um polímero com maiores frações de HDd.
- Nos planejamentos experimentais realizados com *C. metallidurans* MA 09 e *B. mimosarum* MA 18, as variáveis sulfato de amônio e temperatura foram consideradas as mais significativas nos níveis propostos para estes delineamentos.
- A partir da análise da superfície de resposta obtida nos cultivos de *C. metallidurans* MA 09, pode-se concluir que os aumentos nos níveis propostos para as concentrações de sulfato de amônio são mais significativos para o aumento da biomassa, do que a diminuição de seus níveis voltados ao acúmulo de polímero. Assim, as maiores produções de polímero apresentam uma região ótima de produção entre temperaturas de 30 a 37 °C, na concentração de 1,5 g/L.
- Neste trabalho, nos cultivos com a linhagem *C. metallidurans* MA 09, foi atingido o maior valor de acúmulo de polímero com 76,7% da MSC.
- No delineamento composto central realizado para *B. mimosarum* MA 18, o aumento nos níveis da variável glicerol é mais significativo para o aumento da biomassa, ao invés de acúmulo de polímero.
- Em *B. mimosarum* MA 18 o ajuste nos efeitos antagônicos das concentrações da fonte de nitrogênio é determinante para a produção do polímero. Nas menores concentrações de sulfato de amônio (0,16 e 0,5 g/L) foram observados os maiores acúmulos de polímero. Em contrapartida, os maiores valores de biomassa são verificados nos níveis central e superior, 1,0 (0) a 1,5 (+1) g/L, respectivamente. Assim, em valores próximos a 1,0 g/L podem ser obtidos os melhores resultados para esta variável.

- Nos experimentos com *B. mimosarum* MA 18, o aumento da temperatura de 30 a 37 °C, provocou um aumento nos valores de biomassa, para concentrações de sulfato de amônio de 0,5 a 1,0 g/L. Porém, foram observados menores valores de biomassa, em uma concentração de sulfato de amônio de 1,5 g/L. Dessa forma, o nível superior da fonte de nitrogênio foi determinante sobre o efeito da temperatura.
- A linhagem *B. cepacia* MA 13 demonstrou uma capacidade de produção de copolímeros de PHB-HV e PHB-HHx, em cultivos com glicerol de biodiesel e ácidos propiônico e hexanóico, respectivamente.
- Neste trabalho, a linhagem *P. sputorum* MA 03 apresentou as maiores produções de PHB (3,72 g/L) e PHB-HV(0,16 g/L) em cultivos com glicerol bruto, também sendo verificados os maiores rendimentos com $Y_{HB/GLY}^O = 0,26$ g/g e $Y_{HV/AP} = 0,32$ g/g. Estes valores levam a concluir que esta linhagem demonstrou um bom potencial para a produção destes polímeros a partir da fonte de carbono avaliada.
- Nos delineamentos realizados com *P. sputorum* MA 03 e *B. cepacia* MA 13, o aumento da temperatura e das concentrações de sulfato de amônio, nos níveis propostos, exerceram um efeito negativo sobre o acúmulo do monômero HV. Ao contrário, o aumento da concentração de glicerol favoreceu a produção do copolímero PHB-HV.
- Por fim, pôde-se concluir que o objetivo principal deste trabalho foi alcançado, obtendo-se linhagens bacterianas com bom potencial na produção de PHAs, a partir de glicerol.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O Laboratório de Microbiologia Industrial (IB-UNESP/Rio Claro-SP) vem desenvolvendo pesquisas há 10 anos, estando em constante crescimento na obtenção de novas linhagens de micro-organismos e aprimoramento de processos fermentativos, voltados à produção de metabólitos microbianos de interesse econômico, a partir de subprodutos ou efluentes industriais. Dessa forma, além de estudos direcionados à produção de enzimas, biossurfactantes, 1,3 propanodiol e ácido láctico; novas linhas de pesquisa têm sido incorporadas por este ambiente de pesquisa. Neste trabalho, foram realizados nas dependências do LMI os primeiros experimentos visando à produção de PHAs. Assim, a partir do ambiente e de resíduos industriais, foi realizada a bioprospecção de micro-organismos, na tentativa de encontrar linhagens bacterianas promissoras para a produção de PHAs utilizando o glicerol de biodiesel como fonte de carbono. Cultivos com micro-organismos isolados e linhagens de *P. aeruginosa*, provenientes da coleção deste laboratório, foram realizados para verificar o potencial destes na produção de PHAs, assim como, analisar a composição do polímero obtido, a partir deste insumo.

Entre as linhagens bacterianas avaliadas neste estudo, destacaram-se *P. sputorum* MA 03 pelos maiores valores de produção de PHB, além do potencial para a produção do copolímero PHB-HV. Dessa forma, trabalhos futuros poderão ser realizados com esta linhagem, visando otimizar o processo de produção de PHB-HV, através de um novo planejamento experimental, com níveis diferentes na variável ácido propiônico. Ainda, tem-se o objetivo de expandir a escala de produção deste copolímero, em experimentos desenvolvidos em bioreatores, testando sistemas de batelada e de alta densidade celular.

Os resultados obtidos nos cultivos de *P. aeruginosa* LMI 6c chamaram a atenção pelas frações do monômero HB, em cultivos com glicerol. Com isso, poderão ser desenvolvidas pesquisas voltadas a obtenção deste monômero, além de uma caracterização das PHA sintases envolvidas na produção de PHA-mcl e PHB por esta linhagem bacteriana.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, New York, v. 54, p. 450-472, 1990.

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

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

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

ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y., STRAHAN, G.D. Efficient utilization of crude glycerol as fermentation substrate in the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) biopolymers. **Am. Oil Chem. Soc.**, v. 88, p. 949-959, 2011.

AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. 212 p.

BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. **Appl. Microbiology and Biotechnol.**, Berlin, v. 47, p. 441-446, 1997.

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

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

BENINCASA, M. **Obtenção de biotensoativos a partir de resíduos da indústria de óleos vegetais**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.283-288, 2002.

BERLANGA, M.; MONTERO, M.T.; FERNANDEZ-BORRELL, J.; GUERRERO, R. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. **Int. Microbiol.** v. 9, p. 95-102, 2006.

Biocycle®. História. Disponível em: < <http://www.biocycle.com.br/site.htm>>. Acessado em: 15/08/2009.

BONATTO, D.; MATIAS, F.; LISBÔA, M.P.; BOGDAWA, H.M.; HENRIQUES, J.A.P. Production of short side chain-poly[hydroxyalkanoate] by a newly isolated *Ralstonia picketti* strain. **W. J. Microbiol. Biotechnol.** v. 20, p. 395-403, 2004.

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

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: an introduction to designs, data analysis and model building.** New York: Wiley, 1978.

BRÄMER, C.O.; VANDAMME, P.; SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; STEINBÜCHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. Nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.51, p.1709-1713, 2001.

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.

BRASIL. Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. DOU de 14 de janeiro de 2005.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **J. Biotechnol.** v. 65, p. 127-161, 1998.

BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Vol. II: The Proteobacteria. 2ª Ed. New York: Springer Science, 2005. 1414p.

BUFFONI, E. **Avaliação da composição de polímeros biodegradáveis produzidos por *Burkholderia sacchari* a partir de diferentes substratos.** 80f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BUTTON, S.T. Metodologia para planejamento experimental e análise de resultado (Apostila). Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2001.

CAMPOS-GARCIA, J.; CARO, A.C.; NÁJERA, R.; MILLER-MAIER, R.M.; ALTAHHAN, R.A.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene encodes a NADPH-dependent *i*-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. **J. Bacteriology**, v. 180, p. 4442-4451, 1998.

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

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

CHEN, G.Q. Production and Application of Microbial Polyhydroxyalkanoates. In: CHIELLINI, E.; SOLARO, R. **Biodegradable Polymers and Plastics**. London: Springer, 2003. p. 155-166.

CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; COENYE, T.; CHOU, J.H.; BARRIOS, E.; FARIA, S.M.; ELLIOTT, G.N.; SHEU, S.Y.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **Int. J. System. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 1847-1851, 2006.

CHOI, J.I.; LEE, S.Y. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4363-4368, 1999.

CHOWDHURY, A.A. Poly- β -hydroxybuttersäure abbauende bakterien und exoenzyme. **Arch. Mikrobiol.** v. 47, p. 167-200, 1963.

CIESIELSKI, S.; CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; POKOJ, T.; KLIMIUK, E. Molecular detection and diversity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates-producing bacteria enriched from activated sludge. **J. Appl. Microbiol.** v. 101, p. 190-199, 2006.

COENYE, T.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; OHLÉN, M.; GORIS, J.; GOVAN, J.R.W.; GILLIS, M.; VANDAMME, P. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenus* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.50, p.887-899, 2000.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotenssoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, p. 34-38, 2008.

COSTA, S.G.V.A.O.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, Heidelberg, v.36, p. 1063-1072, 2009.

DE ALMEIDA, A.; NIKEL, P.I.; GIORDANO, A.M.; PETTINARI, M.J. Effects of granule-associated protein PhaP on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 7912-7916, 2007.

DENNIS, D.E. Expression of polyhydroxyalkanoates in recombinant bacteria. In: **International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates**. Montreal, Canada, 1994.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. *rhIA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology**, v. 149, p. 2005-2013, 2003.

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

DOI, Y.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v. 28, p. 4822, 1995.

CHEN, G.Q.; ZHANG, G.; PARK, S.J.; LEE, S.Y. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 57, p. 50-55, 2001.

DU, C.; YAN, H.; ZHANG, Y.; LI, Y. Use of oxidoreduction potential as an indicator to regulate 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Appl. Microbiology and Biotechnol.**, Berlin, v. 69, p. 554-563, 2006.

FADIN, J.F.M. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 2^a Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1976. 260p.

FERRES, J.D. Disponível em: <<http://www.cdes.gov.br/noticia/14129/pag-2/biodiesel-a-necessidade-de-um-novo-marco-regulatorio.html>>. Acessado em: 12/08/2010.

FORMOLO, M.C.; DUARTE, M.A.T.; SCHNEIDER, A.L.; FURLAN, S.A.; PEZZIN, A.P.T. Poliídrolalcanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, Joinville, v. 4, p. 14-21, 2003.

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

GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, R.C.P.; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L.; SILVA, L.F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.45, p.785-791, 1996.

GORIS, J.; DE VOS, P.; COENYE, T.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; BRIM, H.; DIELS, L.; MERGEAY, M.; KERSTERS, K. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. **Int. J. System. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 1773-1782, 2001.

GROSS, R.A.; BRANDL, H.; ULMER, H.W.; POSADA, M.A.; FULLER, R.C.; LENZ, R.W. The biosynthesis and characterization of new poly(p-hydroxyalkanoates). **Polymer Prep.**, v. 30, p. 492-493, 1989.

GROTHER, E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 25, p. 132-141, 1999.

GUO-QIANG, C.; JUN, X.; QIONG, W.; ZENGMING, Z.; KWOK-PING, H. Synthesis of copolyesters consisting of medium-chain-length β -hydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317. **React.Funct. Polym.**, v. 48, p. 107-112, 2001.

HÁ, C.S.; CHO, W.J. Miscibility, properties and biodegradability of microbial polyester containing blends. **Prog. Polym. Sci.** v. 27, p. 759-809, 2002.

HABA, E.; VIDAL-MAS, J.; BASSAS, M.; ESPUNY, M.J.; LLORENS, J.; MANRESA, A. Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. **Biochem. Eng. Journal**, v. 35, p. 99-106, 2007.

HAMMOND, T.; LIGGAT, J.J. Properties and applications of bacterially derived polyhydroxyalkanoates. In: SCOTT, G.; GILEAD, D. **Degradable Polymers: Principles and Applications**. London: Springer, 1995. p. 88-111.

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

HAZER, B.; STEINBÜCHEL, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 74, p. 1-12, 2007.

HIMMI, E.H., BORIES, A.; BOUSSAID, A.; HASSANI, L. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. **Appl. Microbiology and Biotechnol.**, Berlin, v. 53, p. 435-440, 2000.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9^a Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HORI, K.; MARSUDI, S.; UNNO, H. Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 78, p.699-707, 2002.

HUIJBERTS, G.N.M.; EGGINK, G.; DE WAARD, P.; HUISMAN, G.W.; WITHOLT, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly (3-hydroxyalkanoates) consisting of saturate and unsaturated monomers. **Appl. Environ. Microbiology**, v. 58, p. 536-544, 1992.

IBRAHIM, M.H.A.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans*, MW1 via high-cell-density fed batch fermentation and simplified solvent extraction. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 6222-6231, 2009.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **J. Bioscience Bioeng.**, Osaka, v. 100, n. 13, p. 260-265, 2005.

JENDROSSECK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H.G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. Mini-review. **Appl. Microbial Biotechnol.**, Berlin, v. 46, p. 436-451, 1996.

JURAN, J.M.; GRZYNA, J.R.; BINGHAM, J.R. **Quality control handbook**. New York: McGraw-Hill. p.1-49.

KARR, D. B.; WATERS, J.K.; EMERICH, D.W. Analysis of poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. **Appl. Environ. Microbiology**, Washington, v. 46, p. 1339-1344, 1983.

KAHAR, P.; TSUGE, T.; TAGUSHI, K.; DOI, Y. High yield of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Pol. Deg. Stab.**, v. 83, p. 79-86, 2004.

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

KAWATA, Y.; AIBA, S. Poly(3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp. KM-1 using waste glycerol. **Bioscience Biotechnol. Biochem.**, v. 74, p. 175-177, 2010.

KIM, Y.B.; LENZ, R.W. Polyesters from microorganisms. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** v. 71, p. 51-79, 2001.

KNOTHE, G. Introdução. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. p. 1-18

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

KROMOUVA, A.B.; WAGNER, G.J.; DAVIES, H.M. Biochemical observations on medium-chain-length polyhydroxyalkanoate biosynthesis and accumulation in *Pseudomonas mendocina*. **Arch. Biochem. Biophysics**, v. 405, p. 95-103, 2002.

LAGEVEEN, R.G.; HUISMAN, G.W.; PRESTING, H.; KETELAAR, P.; EGGINK, G.; WITHOLT, B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrate on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 54, p. 2924-2932, 1988.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl. Microbiol. Biotechnology**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LAU, N.; CHEE, J.; TSUGE, T.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of a novel polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer produced by *Burkholderia* sp. USM (JCM15050). **Bioresource Technol.**, v. 101, p. 7916-7923, 2010.

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

LEE, P.C.; LEE, W.G.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 72, n. 1, p. 41-48, 2000.

LEE, W.; LOO, C.; NOMURA, C.T.; SUDESH, K. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 6844-6851, 2008.

LIANQG, Z.; JINGFAN, X.; TAO, F.; HAIBIN, W. Synthesis of poly (hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) by *Sinorhizobium fredii* strain. *Letters in Appl. Microbiol.*, v. 42, p. 344-349, 2006.

LIMA, T.C.; GRISI, B.M.; BONATO, M.C.M. Bacteria isolated from a sugarcane agroecosystem: their potential production of polyhydroxyalkanoates and resistance to antibiotics. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 214-224, 1999.

LIU, W.; MINO, T.; MATSUO, T.; NAKAMURA, K. Isolation, Characterization and Identification of Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria from Activated Sludge. **J. Biosc. Bioeng.** v. 90, p. 494-500, 2000.

LOO, C.Y.; LEE, W.H.; TSUGE, T.; DOI, Y.; SUDESH, K. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-hexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. **Biotechnol. Letters**, v. 27, p. 1405-1410, 2005.

LOO, C.Y.; SUDESH, K. Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 40, p. 466-471, 2007.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; KLUGBAUER, S.; KLUGBAUER, N.; WEIZENEGGER, M.; NEUMAIER, J.; BACHLEITNER, M.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. **Electrophoresis**, v. 19, n. 4, p. 554-568, 1998.

MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 63, p. 21-53, 1999.

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

MATSUMOTO, K.I.; KITAGAWA, K.; JO, S.J.; SONG, Y.Y.; TAGUCHI, S. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* using propionate as precursor. **Journal of Biotechnology**, v. 152, p. 144-146, 2010.

McCOY, M. Glycerin surplus. **Chem. Eng. News**, Washington, v. 84, p. 7, 2006.

MENDONÇA, T.T. **Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)[P(3-HB-co-3-**

HHx]. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

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

MORALEJO-GÁRATE, H.; MAR'ATUSALIHAT, E.; KLEEREBEZEM, R.; LOOSDRECHT, M.C.M. Microbial community engineering for biopolymer production from glycerol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 92, p. 631-639, 2011.

MOTHES, G.; SCHNORPFEIL, C.; ACKERMANN, J.U. Production of PHB from crude glycerol. **Eng. Life Sci.** v. 7, n. 5, p. 475-479, 2007

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 3016-3019, 1989.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L.A.G.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnol. Prog.** v. 21, p. 1562-1566, 2005.

ODLING-SMEE, L. Biofuels bandwagon hits a rut. **Nature**, London, v. 446, p. 483, 2007.

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

OLIVEIRA, A.H.S.; GUIMARÃES, J.A.; HILUY FILHO, J.J.; LOPES, A.A.S. Produção de biossurfactantes para a remediação de ambientes contaminados com petróleo e derivados. In: **II Congresso em P&D em petróleo e gás natural**, Rio de Janeiro, 2003.

OSTLE, A.G.; HOLT, J.G. Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 44, p. 238-241, 1982.

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

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

PAPANIKOLAOU, S., MUNIGLIA, L., CHEVALOT, I, AGGELIS, G., MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.92, p.737-744, 2002.

PAULUS, W. **Microbicides for the protection of materials-A handbook**. 1^a Ed. London: Chapman & Hall, 1993. 505p.

ULMER, H.W.; GROSS, R.A.; WEISBACH, P.; FULLER, R.C.; LENZ, R.W. The bacterial synthesis of functional poly(b-hydroxyalkanoate). **Polymer Prep.**, v. 30, n. 2, p. 402-407, 1989.

PELCZAR, M.; REID, R. D. & CHAN, E. C. S. **Microbiologia: Conceitos e aplicações** Vol. I. 2^a Ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524p.

PITLOVANCIV, A.K.; CARIS, M.E.; PORTO, L.M.; PEDROSA, R.C.; ANTÔNIO, R.V. Condições de cultivo e produção de pigmento por *Chromobacterium violaceum*. **Biotemas**, Florianópolis, v. 19, p. 13-18, 2006.

QIU, Y.Z.; HAN, J.; CHEN, G.Q. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 69, p. 537-542, 2006.

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.

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

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

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

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

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

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

ROCHA, R.C.S.; PEREIRA, F.S.; TACIRO, M.K.; RODRIGUES, M.F.A.; PRADELLA, J.G.C. Controle da biossíntese de polihidroxialcanoatos bacterianos através de fluxos de substratos. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.53-55, 2007.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1ª Ed. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ª Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGKHARAK, K.; PRASERTSAN, P. Utilization of biodiesel waste as a feedstock for the production of polyhydroxybutyrate by *Cupriavidus necator*. **African. J. Biotechnol.** v. 10, p. 17812-17824, 2011.

SCHLEGEL, H.G.; LAFFERTY, R.; KRAUSS, I. The isolation of mutants not accumulating poly- β -hydroxybutyric acid. **Arch. Mikrobiol.** v. 71. p. 283-294, 1970.

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

SIEGMUND, I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnology techniques**, v.5, n.4, p.265-268, 1991.

SHAH, Sônia. **A História do Petróleo**. 1ª Ed. Porto Alegre: L&PM Editores, 2007. 240p.

SHRISVASTAV, A.; MISHRA, S.K.; SHETHIA, B.; PANCHA, I.; JAIN, D.; MISHRA, S. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 47, p. 283-287, 2010.

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.; GOMEZ, J.G.C.; ROCHA, R.C.S.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v.30, p1732-1743, 2007.

SILVA, S.N.R.L.; FARIAS, C.B.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 174-183, 2010.

SILVA-QUEIROZ, S.R.; SILVA, L.F.; PRADELLA, J.G.C.; PEREIRA, E.M.; GOMEZ, J.G.C. PHA_{MCL} biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. **J. Biotechnol.**, v. 143, p. 111-118, 2009.

SNELL-CASTRO, R.; GODON, J.J.; DELGENÈS, J.P.; DABERT, P. Characterization of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, n. 2, p. 229-242, 2005.

SOBERÓN-CHÁVES, G.; AGUIRRE-RAMÍREZ, M. Is *Pseudomonas aeruginosa* Only “Sensing Quorum”? **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, p. 171-182, 2005.

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W.N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 71, p. 783-789, 2006.

SPIEKERMANN, P.; REHM, B.H.A.; KALSCHEUER, R.; BAUMEISTER, D.; STEINBÜCHEL, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Arch. Microbiol.** v. 171, p. 73-80, 1999.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: BYRON, D. **Biomaterials: novel materials from biological sources**. New York: Stockton Press, 1991. P. 123-213.

STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.G. Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. **Mol. Microbiol.** v. 5, p. 535-542, 1991.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 128, p. 128-219, 1995.

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

STEINBÜCHEL, A. Consideration on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusion. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 94-105, 2005.

STRELEC, T. **Isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes ramnolipídios e polihidroxicanoatos e avaliação da relação metabólica no processo de síntese**. 120f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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, p. 148-175, 2007.

TAJIMA, K.; IGARI, T.; NISHIMURA, D.; NAKAMURA, M.; SATOH, Y.; MUNEKATA, M. Isolation and Characterization of *Bacillus* sp. INT005 Accumulating Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Gas Field Soil. **J. Biosc. Bioeng.** v. 95, p. 77-81, 2003.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Appl. Eng. Agric.**, St. Joseph, v. 22, p. 261-265, 2006.

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.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **Int. J. System. Evol. Microbiol.** v. 54, p. 2285-2289, 2004.

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

WITHOLT, B.; KESSLER, B. Perspectives of medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 10, p. 279-285, 2002.

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

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

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

ZAJIC, J.E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v.1, n.2, p. 87-107, 1984.

ZHU, C.; NOMURA, C.T.; PERROTTA, J.A.; STIPANOVIC, A.J.; NAKAS, J.P. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. **Biotechnol. Progr.**, v. 26, p. 424-430, 2010.

ZHU, K.; ROCK, C.O. RhlA converts β -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis of the β -hydroxydecanoil- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 3147-3154, 2008.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Adv. Drug Rev.** v. 53, p. 5-21, 2001.