



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

**PRODUÇÃO DE POLI-HIDROXIBUTIRATO POR BACTÉRIA *Cupriavidus necator*  
UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**DÉBORA JAMILA NÓBREGA DE MELO**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucineide Balbino da Silva**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2025**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

**PRODUÇÃO DE POLI-HIDROXIBUTIRATO POR BACTÉRIA *Cupriavidus necator*  
UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**DÉBORA JAMILA NÓBREGA DE MELO**

Tese apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal da Paraíba, como exigência para obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucineide Balbino da Silva**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2025**

**Catalogação na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação**

M528p Melo, Débora Jamila Nóbrega de.  
Produção de poli-hidroxibutirato por bactéria  
Cupriavidus necator utilizando melão de cana-de-açúcar  
/ Débora Jamila Nóbrega de Melo. - João Pessoa, 2025.  
119 f. : il.

Orientação: Lucineide Balbino da Silva.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Produção de biopolímero. 2. Polihidroxibutirato bacteriano - PHB-B. 3. Biodegradação. 4. Cinética de degradação térmica. 5. Cupriavidus necator - bactéria.  
6. Sustentabilidade. I. Silva, Lucineide Balbino da.  
II. Título.

UFPB/BC

CDU 678.7(043)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Ata da Defesa de Tese de Doutorado apresentada pela aluna DEBORA JAMILA NOBREGA DE MELO, no dia 26 de março de 2025.

Às 10h00 do dia 26 de março de 2025, Sala de Sala multimidia PPGCTA/UFPB, reuniram-se os membros da banca examinadora composta pelos Professores: Prof<sup>a</sup> Dra. LUCINEIDE BALBINO DA SILVA, Presidente/orientadora (UFPB); Prof<sup>a</sup> Dra. AMELIA SEVERINO FERREIRA E SANTOS, Examinadora Interna (UFPB); Prof<sup>a</sup> Dra. ANDREA FARIA DE ALMEIDA, Examinadora Externa ao Programa (UFPB); Prof. Dr. MARCIO JOSE BATISTA CARDOSO, Examinador Interno ao Programa (UFPB); Prof<sup>a</sup> Dra. SHARLINE FLORENTINO DE MELO SANTOS, Examinadora Externa ao Programa (UFPB);, a fim de avaliarem a defesa da tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, com título "PRODUÇÃO DE POLI-HIDROXIBUTIRATO POR BACTÉRIA *Cupriavidus Necator* UTILIZANDO MELAÇÔ DE CANA-DE-AÇUCAR" de autoria da aluna DEBORA JAMILA NOBREGA DE MELO, matrícula 20201008637. A reunião foi aberta pelo Presidente da banca, que deu início aos trabalhos autorizando a candidata a iniciar sua apresentação. Concluídos os trabalhos de apresentação e de arguição, a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer:

A banca apreciou o trabalho de defesa de tese e sugeriu correções a serem feitas que tornarão os resultados da Tese ainda melhores apresentados e discutidos. A banca deu um prazo de trinta dias para a correção da tese.

A aluna é obrigada a realizar as sugestões da banca. Para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora além do referido discente que apresentou a defesa da tese de seu Doutorado.

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** LUCINEIDE BALBINO DA SILVA  
Data: 27/03/2025 10:29:22-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup> Dra. LUCINEIDE BALBINO DA SILVA  
(Presidente/orientadora)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** AMELIA SEVERINO FERREIRA E SANTOS  
Data: 28/03/2025 07:18:56-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup> Dra. AMELIA SEVERINO FERREIRA E SANTOS  
(Examinadora Interna)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ANDREA FARIA DE ALMEIDA  
Data: 28/03/2025 17:24:11-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup> Dra. ANDREA FARIA DE ALMEIDA  
(Examinadora Externa ao Programa)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** MARCIO JOSE BATISTA CARDOSO  
Data: 28/03/2025 18:23:11-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

Prof. Dr. MARCIO JOSE BATISTA CARDOSO  
(Examinador Interno ao Programa)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** SHARLINE FLORENTINO DE MELO SANTOS  
Data: 31/03/2025 15:08:57-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

Prof<sup>a</sup> Dra. SHARLINE FLORENTINO DE MELO SANTOS  
(Examinadora Externa ao Programa)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** DEBORA JAMILA NOBREGA DE MELO  
Data: 31/03/2025 18:12:21-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

DEBORA JAMILA NOBREGA DE MELO  
Discente

Com amor, dedico aos meus pais, ao meu marido  
e às minhas sobrinhas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, fonte de amor e misericórdia, pelo dom da vida e por guiar e iluminar meus passos, sempre nos caminhos do bem e da felicidade.

Aos meus pais, Anita e France, por todo amor, carinho e dedicação que me ofertam nessa longa caminhada da vida.

Ao meu marido, Cadu, por todo amor, incentivo, companheirismo e cuidado que sempre teve comigo.

Às minhas avós, Maria Elvira e Nevinha (*in memoriam*), por todas as orações nos momentos de angústia e felicidade.

À minha orientadora, professora Lucineide, por acreditar em mim e conceder esta oportunidade, por todos os ensinamentos e orientações.

Ao professor Márcio Cardoso por sua contribuição com este trabalho.

Agradeço aos meus chefes, Sharline e Flávio, por todos os ensinamentos.

Agradeço aos amigos, Fabiana, Clediana, Vanessa, Andréa, Chico, Rafael, Sófacles, Evandro, Fábio, Lucas, Riva e Jhonathas, por me incentivarem e sempre estarem dispostos a ajudar.

À Universidade Federal da Paraíba, por toda infraestrutura que possibilitou a execução deste trabalho.

A todos, que de forma direta ou indireta, contribuíram com a execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Nós não herdamos o mundo dos nossos antepassados, nós o pegamos emprestado dos nossos filhos.”

(Autor desconhecido)

## RESUMO

O crescimento populacional, associado ao consumo desenfreado, acarreta o aumento do uso de plásticos de origem petrolífera e o seu descarte inadequado têm causado impactos negativos significativos nos ecossistemas terrestres e aquáticos, além de repercussões preocupantes para a saúde humana. O plástico representa uma grave ameaça à vida selvagem, animais frequentemente confundem fragmentos de plástico com alimento, ingerindo materiais que causam obstruções no trato digestivo, desntrição e morte. Além disso, redes de pesca descartadas e outros resíduos plásticos podem aprisionar e ferir animais marinhos. Como forma de minimizar os problemas ambientais oriundos da sua fragmentação e longevidade, cada vez mais se busca produzir polímeros de fácil biodegradação e de baixos custos de produção. O objetivo dessa pesquisa foi obter um polímero de origem microbiana, a partir de uma fonte renovável. O polihidroxibutirato bacteriano (PHB-B) foi produzido por *Cupriavidus necator*, utilizando melaço de cana comercial (MCC) como fonte de carbono no substrato. Foi avaliada a influência da temperatura de cultivo (30, 34 e 38 °C) e da concentração inicial de CCM, como fonte de carbono (5, 10, 15 g.L<sup>-1</sup> de açúcares redutores AR) na produção de PHB-B em 72 h de cultivo. Para isto, foi realizado um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com três repetições no ponto central. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers com capacidade de 300 mL, contendo 200 mL de meio de cultura composto por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7 g.L<sup>-1</sup>), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2 g.L<sup>-1</sup>) e MCC nas concentrações indicadas pelo planejamento fatorial juntamente com o microrganismo. O melaço de cana se mostrou eficaz como fonte de carbono, com rendimento máximo de 35,70% de PHB-B ocorrendo a 30 °C com 15 g.L<sup>-1</sup> de açúcares redutores, sob agitação de 180 rpm. O PHB-B apresentou os mesmos grupos funcionais do polihidroxibutirato comercial (PHB-C), como também a mesma estrutura cristalina para ambos. O grau de cristalinidade do PHB-B e PHB-C foi de 51,71 e 62,01 %, respectivamente. O PHB-B apresentou pico duplo de fusão a 160,79 e 170,05 °C, enquanto o PHB-C apresentou temperatura de cristalização no segundo aquecimento de 39,93 °C e apenas um pico de fusão a 166,09 °C. As temperaturas iniciais e máximas de degradação térmica foram de 233 e 262 °C e de 258 e 279 °C para o PHB-B e PHB-C, respectivamente, e o processo de degradação térmica se deu em uma única etapa. A energia de ativação revelou que o PHB-B é mais resistente a degradação térmica do que o PHB-C. Os parâmetros termodinâmicos indicam que o perfil de degradação térmica é do tipo endotérmico e que os processos de degradação térmica ocorrem espontaneamente para ambos biopolímeros estudados. Nesse estudo se comprova que o melaço de cana-de-açúcar comercial pode produzir PHB bacteriano biodegradável e resistente a degradação térmica, propriedade de interesse para o processamento e a estocagem desse biopolímero valorizando as suas aplicações.

**Palavras-chave:** PHB; bactéria; produção de biopolímero; biodegradação; cinética de degradação térmica; sustentabilidade.

## ABSTRACT

Population growth, combined with unbridled consumption, has led to an increase in the use of petroleum-based plastics, and their improper disposal has caused significant negative impacts on terrestrial and aquatic ecosystems, in addition to worrying repercussions for human health. Plastic poses a serious threat to wildlife; animals often mistake plastic fragments for food, ingesting materials that cause obstructions in the digestive tract, malnutrition, and death. In addition, discarded fishing nets and other plastic waste can trap and harm marine animals. In order to minimize the environmental problems arising from their fragmentation and longevity, there is an increasing search for polymers that are easily biodegradable and have low production costs. The objective of this research was to obtain a polymer of microbial origin from a renewable source. Bacterial polyhydroxybutyrate (PHB-B) was produced by *Cupriavidus necator*, using commercial sugarcane molasses (MCC) as a carbon source in the substrate. The influence of cultivation temperature (30, 34, and 38 °C) and initial concentration of CCM as a carbon source (5, 10, 15 g.L<sup>-1</sup> of reducing sugars AR) on the production of PHB-B in 72 h of cultivation was evaluated. For this purpose, a complete factorial design 2<sup>2</sup> with three replicates at the central point was performed. The cultivations were carried out in Erlenmeyer flasks with a capacity of 300 mL, containing 200 mL of culture medium composed of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7 g.L<sup>-1</sup>), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.2 g.L<sup>-1</sup>) and MCC at the concentrations indicated by the factorial design together with the microorganism. Sugarcane molasses proved to be effective as a carbon source, with a maximum yield of 35.70% of PHB-B occurring at 30 °C with 15 g.L<sup>-1</sup> of reducing sugars, obtained at 180 rpm. PHB-B presented the same functional groups as commercial polyhydroxybutyrate (PHB-C), as well as the same crystalline structure for both. The degree of crystallinity of PHB-B and PHB-C was 51.71 and 62.01%, respectively. PHB-B presented a double melting peak at 160.79 and 170.05 °C, while PHB-C presented a crystallization temperature in the second heating of 39.93 °C and only one melting peak at 166.09 °C. The initial and maximum temperatures of thermal manipulation were 233 and 262 °C and 258 and 279 °C for PHB-B and PHB-C, respectively, and the thermal purification process occurred in a single step. The activation energy revealed that PHB-B is more resistant to thermal manipulation than PHB-C. The thermodynamic configurations indicate that the thermal manipulation profile is endothermic and that the thermal manipulation processes occur spontaneously for both trained biopolymers. This study proves that commercial sugarcane molasses can produce biodegradable bacterial PHB that is resistant to thermal manipulation, a property of interest for the processing and storage of this biopolymer, enhancing its applications.

**Keywords:** PHB; bacteria; biopolymer production; biodegradation; thermal degradation kinetics; sustainability.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de biodegradação de polímeros .....	21
Figura 2 - Classificação dos polímeros biodegradáveis. ....	22
Figura 3 - Modelo das proteínas gliadina, glutenina e do glúten. ....	24
Figura 4 - Representação da albumina sérica humana (HSA). ....	26
Figura 5- Estruturas químicas da amilose e amilopectina. ....	27
Figura 6 - Estrutura molecular da celulose. ....	27
Figura 7 - Principais tipos de carrageninas.....	28
Figura 8 - Estrutura molecular do ácido hialurônico. ....	29
Figura 9 - Estruturas moleculares da quitina e quitosana. ....	30
Figura 10 - Estrutura molecular do sulfato de condroitina. ....	30
Figura 11 - Estrutura molecular do ácido algínico. ....	31
Figura 12 - Fluxograma geral de produção de polihidroxialcanoato.....	33
Figura 13 - Estrutura molecular do poliácido láctico. ....	34
Figura 14 - Estrutura molecular da policaprolactona. ....	35
Figura 15 - Estrutura molecular do PGA.....	35
Figura 16 - Estrutura molecular do poli(butileno succinato co-adipato).....	36
Figura 17 - Micrografia eletrônica de transmissão da bactéria <i>Cupriavidus necator</i> DSM 545 contendo PHA. Ampliação: 70.000x. ....	37
Figura 18 - Estrutura molecular geral dos polihidroxialcanoatos e nomenclaturas. ....	38
Figura 19 - Vias metabólicas da síntese dos polihidroxialcanoatos. ....	41
Figura 20 - Estrutura molecular do polihidroxibutirato.....	46
Figura 21 - Fluxograma do processo de extração e tratamento do caldo de cana. ....	50
Figura 22 - Fluxograma de processo de produção de açúcar cristal a partir do caldo clarificado. ....	51
Figura 23 - Fluxograma com a sequência de procedimentos experimentais. ....	54
Figura 24 - Repique para manutenção de linhagem. ....	58
Figura 25 - Preparação do pré-inóculo. ....	60
Figura 26 - Cultivo da <i>Cupriavidus necator</i> . ....	61
Figura 27 - a) <i>Cupriavidus necator</i> , b) biomassa e c) polihidroxibutirato bacteriano produzido	62

Figura 28 - Curvas de crescimento da <i>C. necator</i> e do consumo de substrato nos cultivos de acordo com o planejamento fatorial. (C/C <sub>0</sub> ) representa a razão entre o valor final do substrato e o valor inicial.....	72
Figura 29 - Superfície de resposta do percentual de produção de polihidroxibutirato bacteriano.....	77
Figura 30 - Espectros no infravermelho por transformada de Fourier de polihidroxibutirato bacteriano e polihidroxibutirato comercial.....	80
Figura 31 – Espectros no infravermelho por transformada de Fourier de polihidroxibutirato bacteriano e polihidroxibutirato comercial em regiões selecionadas: a) 3050–2900 cm <sup>-1</sup> , b) 1000–800 cm <sup>-1</sup> , c) 1500–1000 cm <sup>-1</sup> e d) 1800–1600 cm <sup>-1</sup> .....	81
Figura 32 – Espectro de ressonância magnética nuclear <sup>1</sup> H do polihidroxibutirato comercial.....	83
Figura 33 - Espectro de ressonância magnética nuclear <sup>1</sup> H do polihidroxibutirato bacteriano.....	83
Figura 34 - Espectro de ressonância magnética nuclear <sup>13</sup> C do polihidroxibutirato comercial.....	84
Figura 35 - Espectro de ressonância magnética nuclear <sup>13</sup> C do polihidroxibutirato bacteriano.....	84
Figura 36 - Difratogramas de polihidroxibutirato bacteriano e polihidroxibutirato comercial	85
Figura 37 - Termogramas de calorimetria de varredura diferencial do polihidroxibutirato bacteriano e polihidroxibutirato comercial: a) primeira varredura de aquecimento; b) resfriamento; c) segunda varredura de aquecimento.....	87
Figura 38 - Análise termogravimétrica do polihidroxibutirato bacteriano e polihidroxibutirato comercial: a) análise termogravimétrica e b) análise termogravimétrica diferencial.....	89
Figura 39 - Gráficos dos modelos cinéticos: a) polihidroxibutirato comercial e b) polihidroxibutirato bacteriano.....	92
Figura 40 – Fotografias dos filmes de polihidroxibutirato bacteriano e comercial durante o teste de biodegradação.....	99
Figura 41 - Curvas de biodegradação do polihidroxibutirato bacteriano e comercial.....	99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos produtores de polihidroxibutirato e co-polímeros.....	43
Tabela 2 - Propriedades mecânicas e térmicas do polihidroxibutirato e polímeros de origem petroquímica.....	47
Tabela 3 - Composição química do melaço de cana-de-açúcar.....	53
Tabela 4 - Informação nutricional do melaço de cana-de-açúcar.....	54
Tabela 5 - Composição do meio ágar nutritivo.....	58
Tabela 6 - Variáveis de entrada com os níveis reais e codificados utilizados no planejamento experimental .....	59
Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo $2^2$ com três repetições no ponto central .....	59
Tabela 8 - Composição do meio caldo nutritivo .....	60
Tabela 9 - Composição do meio de cultivo .....	60
Tabela 10 - Composição do meio de cultura.....	69
Tabela 11 - Caracterização do melaço de cana.....	70
Tabela 12 - Parâmetros cinéticos dos cultivos. ....	73
Tabela 13 - Coeficientes de rendimento dos cultivos.....	75
Tabela 14 - Percentual de polihidroxibutirato produzido nos meios de cultura.....	76
Tabela 15 - Parâmetros da análise térmica por calorimetria de varredura diferencial. ....	89
Tabela 16 - Parâmetros da análise termogravimétrica.....	91
Tabela 17 - Valores calculados a partir dos métodos Horowitz-Metzger, Coats-Redfern e Broido .....	94
Tabela 18 - Parâmetros termodinâmicos do polihidroxibutirato comercial e do polihidroxibutirato bacteriano. ....	97

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- 3HV - 3-hidroxivalerato  
AR - Açúcares redutores  
ART - Açúcares redutores totais  
BSA - Albumina sérica bovina  
CCM - Melaço de cana comercial  
DRX - Difração de raios X  
FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier  
HA - Hidroxialcanoato  
HSA - Albumina sérica humana  
NPK - Nitrogênio, fósforo e potássio  
OVA - Ovoalbumina  
PBSA - Poli(butileno succinato co-adipato)  
PCL - Policaprolactona  
PE - Polietileno  
PEG - Polietilenoglicol  
PET - Polietileno tereftalato  
PGA - Poli(ácido glicólico) ou ácido poliglicólico  
PHA - Polihidroxialcanoato  
PHB - Polihidroxibutirato  
PHB-B - Polihidroxibutirato bacteriano  
PHB-C - Polihidroxibutirato comercial  
PHBV - Poli-3-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)  
PLA - Poliácido láctico  
PP - Polipropileno  
PVC - Policloreto de vinila  
RMN - Ressonância magnética nuclear  
RSA - Albumina sérica de rato  
TG - Análise termogravimétrica  
UV - Ultravioleta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS .....	20
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
3.1 POLÍMEROSS BIODEGRADÁVEIS .....	21
3.1.1 Polímeros obtidos de proteínas .....	22
3.1.2 Polímeros obtidos de polissacarídeos.....	26
3.1.3 Polímeros obtidos de microrganismos .....	32
3.1.4 Polímeros obtidos por processo biotecnológico.....	33
3.1.5 Polímeros de fonte petroquímica.....	34
3.2 POLIHIDROXIALCANOATOS.....	36
3.2.1 Estrutura química e classificação dos PHAs .....	37
3.2.2 Características dos PHAs .....	39
3.2.3 Biossíntese dos PHAs.....	39
3.3 POLIHIDROXIBUTIRATO .....	41
3.3.1 Histórico .....	41
3.3.2 Microrganismos produtores.....	43
3.3.2.1 <i>Cupriavidus necator</i> .....	44
3.3.3 Estrutura química e caraterísticas do PHB .....	45
3.3.4 Aplicações do PHB .....	47
3.4 PRODUÇÃO DE AÇÚCAR .....	49
3.4.1 Produção de cana-de-açúcar.....	49
3.4.2 Processo produtivo do açúcar.....	50
3.4.3 Melaço de cana-de-açúcar .....	52

<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO DE CANA.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1.1 pH .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1.2 Umidade .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1.3 Cinzas .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1.4 Teor de sólidos solúveis (°Brix) .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1.5 Teor de Açúcares Redutores (AR) .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1.6 Teor de Açúcares Redutores Totais (ART).....</b>	<b>57</b>
<b>4.2 MICRORGANISMO <i>Cupriavidus necator</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>4.3 PROCESSO PRODUTIVO .....</b>	<b>58</b>
<b>4.3.1 Estudo das condições de cultivo na síntese do PHB .....</b>	<b>58</b>
<b>4.3.2 Determinação dos parâmetros cinéticos e dos coeficientes de rendimento .....</b>	<b>62</b>
<b>4.4 CARACTERIZAÇÃO DO PHB .....</b>	<b>64</b>
<b>4.4.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR .....</b>	<b>64</b>
<b>4.4.2 Ressonância magnética nuclear – RMN.....</b>	<b>65</b>
<b>4.4.3 Difração de raios X – DRX .....</b>	<b>65</b>
<b>4.4.4 Caracterizações térmicas .....</b>	<b>65</b>
<b>4.4.5 Estudo de biodegradação.....</b>	<b>68</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO DE CANA COMERCIAL .....</b>	<b>70</b>
<b>5.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DO CONSUMO DE SUBSTRATO .....</b>	<b>71</b>
<b>5.3 DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE RENDIMENTO.....</b>	<b>74</b>
<b>5.4 PRODUÇÃO DE PHB .....</b>	<b>76</b>
<b>5.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR.....</b>	<b>79</b>
<b>5.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR-RMN .....</b>	<b>82</b>
<b>5.8 DIFRAÇÃO DE RAIOS X - DRX .....</b>	<b>85</b>

5.9 ANÁLISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL-DSC.....	86
5.10 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA - TG .....	89
5.11 ANÁLISE CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA .....	91
5.12 ANÁLISE DE BIODEGRADAÇÃO .....	98
6 CONCLUSÕES .....	101
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	102

## **1 INTRODUÇÃO**

Materiais poliméricos apresentam menor custo, moldados facilmente quando comparados a outros materiais, ainda sendo duradouros, por isso possuem uma infinidade de usos. Estão diretamente ligados à correria da vida moderna e são os materiais mais amplamente utilizados em muitas aplicações e em quase todas as áreas da indústria (Ramadas *et al.*, 2009; Lenfeld *et al.*, 2020).

O consumo de plástico no mundo está em torno de 450 milhões de toneladas por ano, equivalente a aproximadamente 57 quilos por pessoa. Anualmente, mais de 350 milhões de toneladas de plástico acabam como resíduos, dos quais cerca de 80 milhões de toneladas são gerenciados de forma inadequada, resultando em poluição. (Purcel *et al.*, 2023). As principais fontes de resíduos plásticos são: garrafas, embalagens, tampas, sacolas de supermercado ou varejo e embalagens alimentícias (Pilapitiya & Ratnayake, 2024).

Os resíduos plásticos podem se degradar em tamanhos micro a nanométrico, e essas pequenas partículas são espalháveis no ar, na água e no solo. Portanto tanto os animais terrestres, quanto aquáticos estão sujeitos a vários impactos negativos, como a ingestão, emaranhamento, formação de úlceras, redução de reprodutividade e estresse. Os microplásticos também podem prejudicar a saúde humana devido a doenças cardiovasculares, doença renal crônica, defeitos congênitos, câncer e infertilidade (Pilapitiya & Ratnayake, 2024).

O gerenciamento de resíduos plásticos pode ser feito por meio da reciclagem, mas existem barreiras que dificultam a execução. A reciclagem mecânica resulta em materiais de qualidade inferior, enquanto a reciclagem química, embora mais eficaz, tem custos altos, tornando-a menos competitiva frente às resinas virgens (Vogt *et al.*, 2021). Além disso, a reciclagem é prejudicada pela falta de coleta seletiva, tanto em áreas urbanas quanto rurais, e pela falta de conhecimento dos consumidores sobre a classificação e separação correta dos materiais recicláveis (Oliveira *et al.*, 2019).

Como forma de tentar reduzir os problemas ambientais causados pelos plásticos produzidos por derivados de petróleo e contornar os desafios para aumentar os índices de reciclagem, surgem cada vez mais pesquisas que utilizam como matéria-prima fontes renováveis e que produzem polímeros biodegradáveis (Anjun *et al.*, 2016; Mahato *et al.*, 2023). Os biopolímeros de interesse são os polilactídeos, os polissacarídeos, os poliésteres alifáticos e os polihidroxialcanoatos (PHA) (Anjum *et al.*, 2016). Esses à base de PHA são poliésteres de hidroxialcanoatos sintetizados por inúmeras bactérias. A biossíntese do PHA depende de vários

fatores como, por exemplo, o tipo de fonte de carbono que é oferecida como substrato, das vias metabólicas disponíveis a esse organismo para converter essa fonte de carbono em monômeros de PHA, e da especificidade das enzimas envolvidas na síntese do PHA (Lu *et al.*, 2009).

O primeiro PHA a ser descoberto foi o polihidroxibutirato (PHB), em 1926 (Lemoigne, 1926), e é o mais pesquisado e o mais bem caracterizado. O biopolímero é sintetizado dentro do citoplasma do microrganismo na forma de grânulos e ali se acumulam como fonte de energia, devido ao consumo de açúcar pela bactéria em meio de cultura. Acredita-se que seja uma estratégia da bactéria para garantir-se por maior tempo sobrevivendo em um meio com fonte de carbono abundante, mas com limitação de outros nutrientes, como nitrogênio e fósforo (Gouda *et al.*, 2001; Mostafa *et al.*, 2020).

O custo de produção de polímeros biodegradáveis baseados nos polihidroxialcanoatos (PHAs) foi estimado ser de três a quatro vezes mais alto do que o valor para os polímeros baseados em petróleo como o polipropileno (Yadav *et al.*, 2021). No caso do PHB, os custos são reduzidos em torno de 40-50% ao se usar subprodutos agroindustriais de baixo custo como substratos (Choi J. & Lee S. Y., 1999; Kim B. S. & Chang H. N, 2000). Portanto, diversos tipos de substratos baratos oriundos de subprodutos celulósicos têm sido utilizados a fim de colaborar com o aumento da produção do PHB (Kovalcic *et al.*, 2020; Andler *et al.*, 2021; Tu *et al.*, 2022). A produção de PHB em escala industrial, em condições econômicas viáveis requer o uso de substratos mais baratos (Liu *et al.*, 2021).

A perspectiva de crescimento da produção do PHB em 2022 foi de aproximadamente 2,44 milhões de toneladas, indicando a necessidade de instalações para atender a demanda de produção futura e comercialização desse biopolímero (Abbas *et al.*, 2024).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo (Karp *et al.*, 2022), com um rendimento médio de 85.580,00 Kg/ha e produção de 713,2 milhões de toneladas na safra de 2023/2024. A maior parte desta cana-de-açúcar é destinada à fabricação de etanol hidratado, anidro e açúcar. Nesta mesma safra, a produção de açúcar foi de 45,68 milhões de toneladas. (CONAB, 2024). Sendo o melaço um subproduto da fabricação do açúcar, o seu uso como substrato para a produção do PHB se justifica pelo seu custo baixo, com oferta abundante em várias partes do mundo que garante larga escala de fermentação para a produção de polímeros biodegradáveis baseados no PHA (Sunita *et al.*, 2024). A alta concentração de carbono fermentável do melaço inerente à cristalização do açúcar, o torna um substrato rico em carbono para a produção do PHB a partir de processos biotecnológicos (Oliveira *et al.*, 2009; Sahu O, 2018).

Na literatura, vários artigos foram publicados usando melaço para produzir polímeros biodegradáveis baseados em PHAs, mas nessas pesquisas foram realizados pré-tratamentos no melaço baseados em hidrólises ácida, alcalina e enzimática para aumentar a concentração de carbono fermentável no meio (Sen *et al.*, 2019; Dalsasso *et al.*, 2019) e etapas de purificação para retirada de impurezas. Os pré-tratamentos no melaço produzem substâncias que inibem o crescimento microbiano (como o hidroximetilfurfural e o furfural) (Bishop *et al.*, 2024) e como consequência podem afetar a produção de PHB. A poluição ambiental relacionada a subprodutos tóxicos de tratamentos químicos precisa ser levada em consideração na produção de um biopolímero.

O melaço de cana retirado diretamente da usina não é padronizado quanto ao seu teor de açúcares e é obtido com resíduos e impurezas. Assim, a motivação desta pesquisa foi utilizar melaço de cana-de-açúcar comercial para evitar a etapa de pré-tratamento que geralmente é realizada quando se faz uso. Na literatura, não se tem visto a publicação do PHB sendo obtido a partir do melaço de cana-de-açúcar comercial. Além disso, o presente trabalho valoriza esse subproduto, dando mais uma aplicação industrial, servindo como substrato para a produção de PHB.

Esse trabalho teve como objetivo analisar a produção do PHB utilizando melaço de cana-de-açúcar comercial e a bactéria *Cupriavidus necator*, para isso foram avaliadas as influências da temperatura de cultivo e a concentração inicial de melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono no meio. Investigar as propriedades térmicas, a cinética de degradação térmica, os parâmetros termodinâmicos e caracterizar o polímero por meio de análises de espectroscopia no infravermelho (FTIR), ressonância magnética (RMN), difração de raios X (DRX) e estudo de biodegradação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Producir polihidroxibutirato (PHB) utilizando *Cupriavidus necator* e melaço de cana-de-açúcar comercial como substrato.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

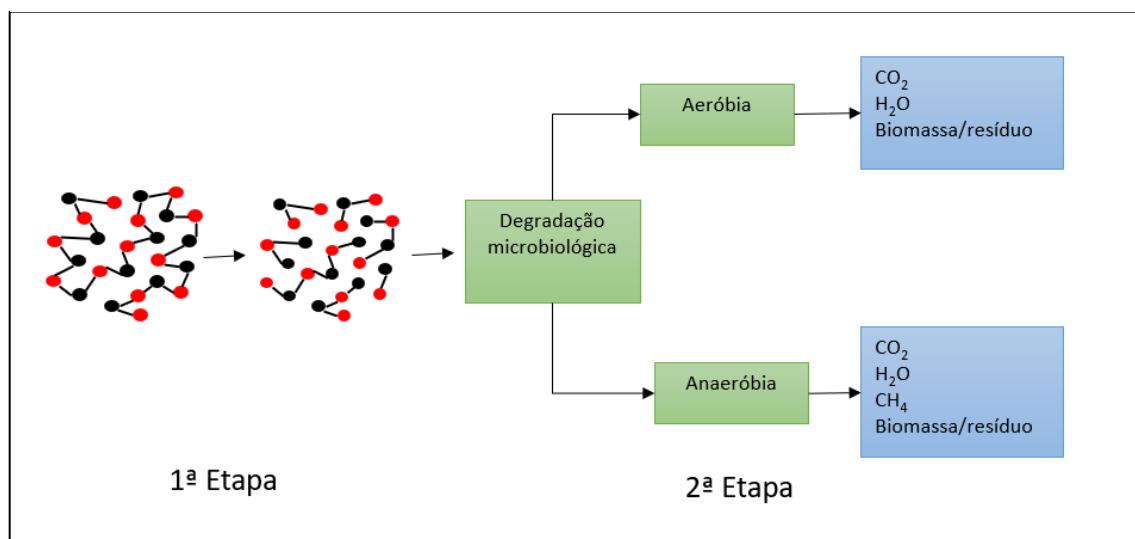
- Realizar as caracterizações físico-químicas do melaço de cana-de-açúcar comercial;
- Estudar os parâmetros cinéticos da produção de polihidroxibutirato;
- Verificar a influência das condições operacionais, temperatura de cultivo e concentração inicial de substrato, sobre a produção do biopolímero;
- Extrair o biopolímero dos cultivos e produzir os filmes;
- Realizar as caracterizações do PHB por meio das análises de FTIR, RMN e DRX;
- Investigar as propriedades térmicas, a cinética de degradação térmica e os parâmetros termodinâmicos;
- Estudar a biodegradação do PHB.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

A biodegradação de polímeros é definida como a decomposição química de substâncias por meio de microrganismos, via catálise enzimática, ocasionando alteração na composição química, nas propriedades mecânicas e estruturais. O resultado da biodegradação é a liberação de produtos metabólicos como biomassa, água, gás carbônio e metano (Samir *et al.*, 2022). A biodegradação ocorre em duas etapas, como mostrado na Figura 1:

Figura 1 - Processo de biodegradação de polímeros.

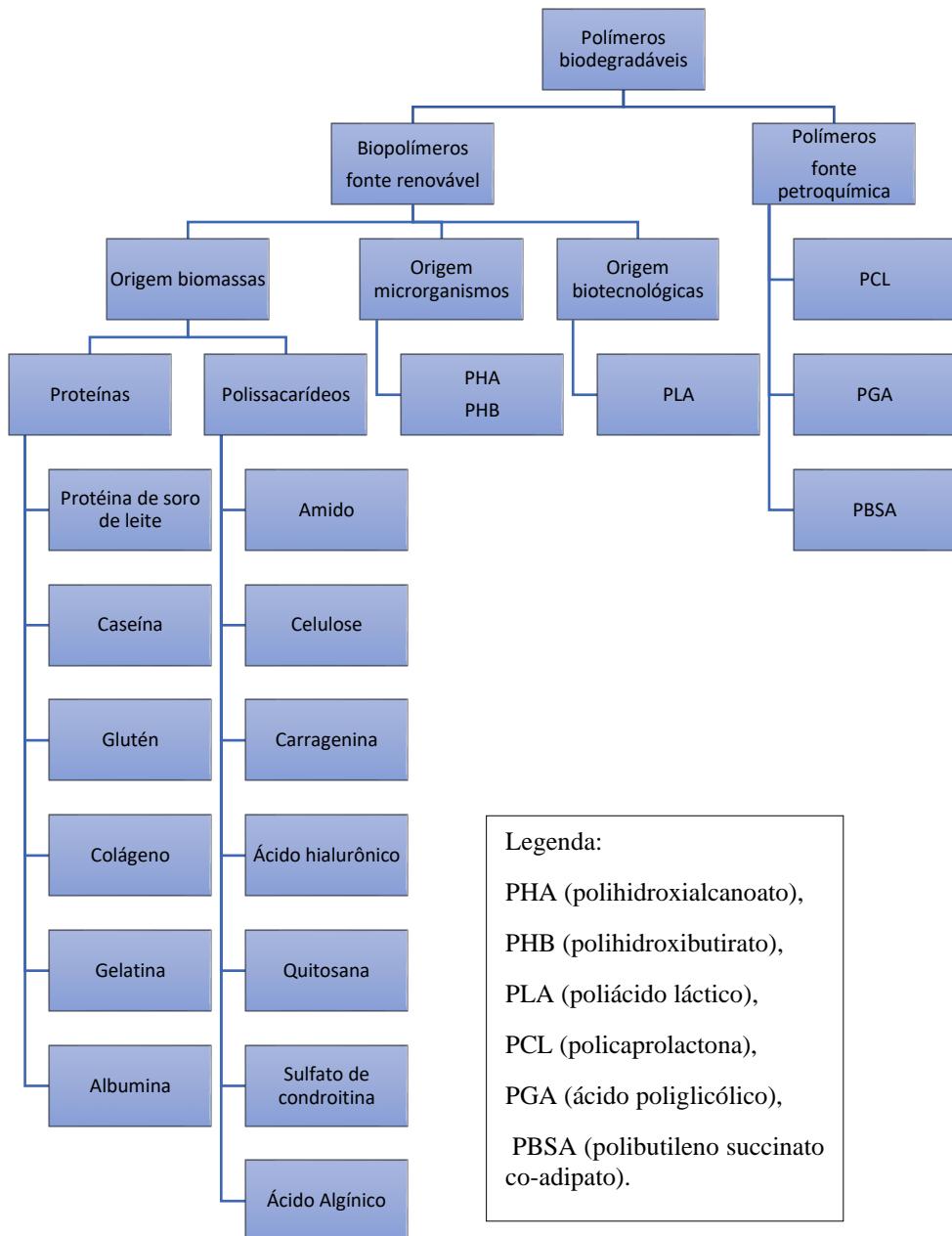


Fonte: Adaptado (Samir *et al.*, 2022).

Na primeira etapa do processo os polímeros de cadeias longas sofrem despolimerização, por meio de enzimas extracelulares e fatores abióticos como, oxidação fotodegradação e hidrólise, transformando-se em cadeias curtas ou oligômeros. Na segunda etapa os oligômeros e polímeros de cadeias curtas sofrem degradação microbiológica, no qual fungos e bactérias produzem, na presença de oxigênio, dióxido de carbono, água, biomassa e resíduos, e em meio anaeróbio produzem dióxido de carbono, água, metano, biomassa e resíduos (Samir *et al.*, 2022).

Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados em diferentes tipos, segundo seu processo de síntese e sua fonte de produção, como mostrado na Figura 2:

Figura 2 - Classificação dos polímeros biodegradáveis.



Fonte: Adaptado (Zhong *et al.*, 2020; Doppalapudi *et al.*, 2014).

### 3.1.1 Polímeros obtidos de proteínas

As proteínas são macromoléculas orgânicas compostas por cadeias lineares de aminoácidos que se ligam através de ligações peptídicas e possuem funções específicas (Ruffolo & Madani, 2024). Nos organismos, atuam como componentes estruturais, formando fibras como o colágeno e a queratina. Desempenham papel catalítico nas reações químicas ao

atuar como enzimas. São responsáveis pelo transporte de moléculas, como o oxigênio, através da hemoglobina, e pela regulação de processos metabólicos, como ocorre com hormônios como a insulina. No sistema imunológico, são fundamentais para a defesa do organismo, atuando como anticorpos. E apresentam função de armazenamento de nutrientes, exemplificado pela ferritina, que funciona como reservatório de ferro.

Diversas proteínas estão sendo utilizadas na produção de polímeros como forma de enfrentar os desafios ambientais associados aos plásticos convencionais, promovendo uma transição para materiais mais sustentáveis.

- **Proteína do soro de leite (*whey protein*):**

O soro de leite é um subproduto das indústrias produtoras de queijos e caseínas, possui uma carga orgânica muita alta, o que o torna um poluente ambiental (Yadav *et al.*, 2015). Pode ser produzido a partir de qualquer tipo de leite, nos países ocidentais o mais popular é o soro de leite de vaca, enquanto em outras regiões do mundo utiliza-se leite de cabras, ovelhas, búfalas e camelas (Smithers, 2008).

As proteínas do soro de leite são ricas em peptídeos bioativos e possuem propriedades antioxidantes, anti-hipertensivas e antimicrobianas, seus principais constituintes são  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, albumina sérica bovina, imunoglobulinas, lactoferrina bovina e uma pequena fração de glicomacropéptideo (Minj & Anand, 2020).

Segundo Kandasamy *et al.* (2021) a partir da proteína do soro de leite, pode-se produzir um filme polimérico comestível para produção de embalagens de alimentos. Esses filmes são flexíveis, incolores, inodoros, com excelentes propriedades mecânicas e de barreira quando comparados com polissacarídeos e outros filmes poliméricos.

- **Caseína:**

A caseína é a proteína mais abundante no leite, representa 80% da fração proteica, pertence à família das fosfoproteínas (Sattar *et al.*, 2019), é altamente biocompatível, de baixo valor econômico e de fácil digestão. Obtida do leite por meio da precipitação quando este está com pH 4,6. Também pode ser obtida por meio de filtração por membrana, processo cromatográfico, enzimático e por eletroforese. Quanto à composição ela contém quatro subfrações,  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína (Wusigale *et al.*, 2020).

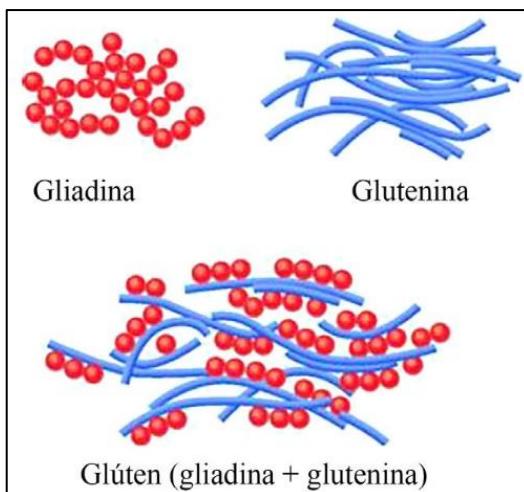
Por possuir a capacidade de se ligar a íons e pequenas moléculas facilmente e poder interagir com outras moléculas biológicas, está sendo estudada para aplicação na administração

de medicamentos. Outra vantagem da caseína é ter boas propriedades emulsificantes e gelificantes (Gandhi & Roy, 2021).

- Glúten:

O glúten é um composto de proteínas presentes nos cereais como o trigo, a cevada e o centeio. Esse grupo de proteínas é composto por duas proteínas, a gliadina, que é solúvel em etanol e possui baixo peso molecular e a glutenina, insolúvel em etanol e possui alto peso molecular, Figura 3. O glúten pode ser utilizado para produção de espumas poliméricas, elas possuem várias aplicações e diferentes propriedades mecânicas. A gliadina é responsável pelo comportamento viscoso da espuma e a glutenina pela elasticidade (Blomfeldt *et al.*, 2011).

Figura 3 - Modelo das proteínas gliadina, glutenina e do glúten.



Fonte: (Silva & Frísco, 2021).

- Colágeno:

O colágeno constitui cerca de 25% a 35% de toda a proteína do corpo humano, existem 28 tipos diferentes de colágenos, que são codificados por pelo menos 45 genes diferentes. Os principais tipos de colágenos são os tipos I, II e III. O tipo I é o mais abundante no corpo e pode ser encontrado nos ossos, peles, tendões e órgãos. O tipo II pode ser encontrado nas cartilagens e o tipo III nas fibras reticulares dos pulmões, fígado e baço, no sangue, na pele e na parede dos vasos (Jafari *et al.*, 2020).

Eles servem como proteínas-chaves em processos vitais, são responsáveis também pela elasticidade, estrutura e firmeza da pele e dos tendões. Têm sido amplamente utilizados em aplicações biomédicas como implantes protéticos, enxertos vasculares e de córnea, curativos

de feridas e queimaduras, regeneração de nervos, cirurgias plásticas e administração de medicamentos e suplementos proteicos (Rýglová *et al.*, 2017). O colágeno pode ser isolado de pele e osso de suínos e bovinos, pele, espinhas e escamas de peixes, por exemplo a carpa (Zhang *et al.*, 2009).

- Gelatina:

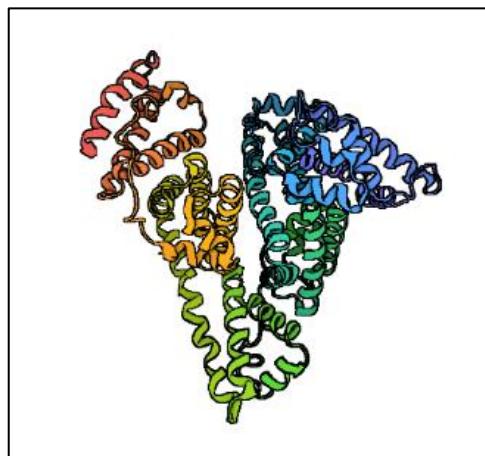
A gelatina é um polímero natural formado pela hidrólise parcial do colágeno. Dois tipos diferentes de gelatina podem ser produzidos com base no pré-tratamento do colágeno, tipo A e B. O primeiro tipo é uma gelatina obtida por via hidrólise ácida, esta tem um ponto isoelétrico em pH 6 a 9, sendo esse processo mais usado para o colágeno menos reticulado covalentemente, normalmente encontrado na pele de porcos. O tipo B é uma gelatina obtida por via hidrólise alcalina, que possui um ponto isoelétrico em pH 5 e pode ser obtida de colágenos mais complexos encontrados em peles bovinas (Alipal *et al.*, 2021).

A gelatina também pode ser obtida de colágenos derivados de peles, de tecidos conjuntivos e de ossos de outros animais, incluindo peixes e aves. A gelatina é utilizada na indústria de alimentos, cosmética, fotográfica e farmacêutica como cápsula de matéria-prima e medicamentos, também é utilizada na produção de biofilmes e na engenharia de tecidos (Zulkiflee & Fauzi, 2021).

- Albumina:

A albumina é uma proteína significativa do plasma sanguíneo humano e desempenha várias funções essenciais no corpo como a manutenção da pressão plasmática, o equilíbrio nutricional e o transporte de várias substâncias como hormônios, íons e outros compostos (Jahanban-esfahlan *et al.*, 2020). Está presente também no plasma sanguíneo de mamíferos de diversas espécies, como bovinos e roedores, e nos ovos representa a principal proteína da clara. É extraída de diferentes fontes, como ovalbumina (OVA), albumina sérica bovina (BSA), albumina sérica humana (HSA), Figura 4, e albumina sérica de rato (RSA). Na indústria farmacêutica, a albumina é utilizada como nanopartícula transportadora de medicamentos e possui a capacidade de reduzir os efeitos colaterais e aumentar a estabilidade dos medicamentos (Karami *et al.*, 2020).

Figura 4 - Representação da albumina sérica humana (HSA).



Fonte: Autoria própria.

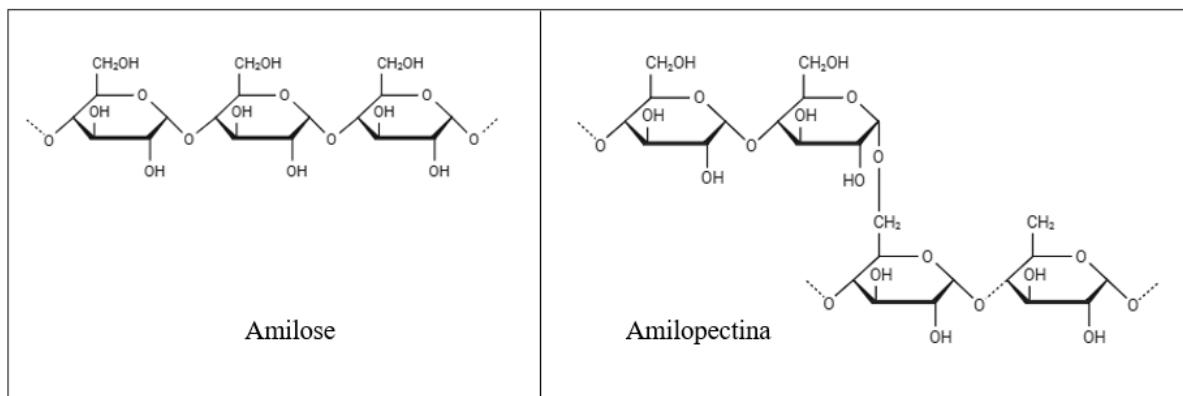
### 3.1.2 Polímeros obtidos de polissacarídeos

Polissacarídeos são macromoléculas de carboidratos complexos compostas por mais de dez monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas presentes em plantas, animais e microrganismos. São categorizados em polissacarídeos de armazenamento, como o amido presente em plantas e o glicogênio em animais e polissacarídeos estruturais como a celulose, quitina e a pectina (Cui & Zhu, 2020). A versatilidade dos polissacarídeos permite que eles sejam transformados em materiais com diferentes propriedades físicas, mecânicas e químicas, tornando-os ideais para substituir polímeros sintéticos em diversas aplicações industriais.

- Amido:

O amido é um carboidrato encontrado na maioria dos vegetais, têm como função o armazenamento de energia e consiste em unidades de glicose repetidas que se unem por meio de ligações glicosídicas. É composto por dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina (Doppalapudi *et al.*, 2014), como pode ser observado na Figura 5. O amido é um ótimo material para o desenvolvimento de produtos biodegradáveis, como os descartáveis, pois além de ter baixo custo ele pode ser processado com os mesmos equipamentos convencionais do processamento de plásticos petroquímicos (Jiang *et al.*, 2020), também pode ser utilizado na administração de medicamentos, produção de filmes e engenharia de tecidos.

Figura 5- Estruturas químicas da amilose e amilopectina.

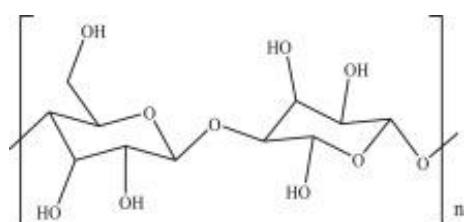


Fonte: Autoria própria.

- Celulose:

A celulose é o polímero orgânico natural mais abundante da Terra, pois pode ser encontrada em árvores, plantas, frutas, vegetais, resíduos agrícolas (Zainal *et al.*, 2021) e pode ser produzida por algumas espécies de microrganismos. É um polissacarídeo constituído por uma cadeia de unidades repetidas de D-glicose unidas por ligações glicosídicas, sua fórmula molecular é  $(C_6H_{10}O_5)_n$  e sua estrutura molecular está representada na Figura 6. Desempenha função estrutural nas plantas, algas e oomicetos (Dopalapudi *et al.*, 2014). A celulose possui regiões cristalinas e amorfas, pode ser utilizada na produção de curativos de hidrogel, na engenharia de tecidos, administração de medicamentos, produção de bioadesivos, emulsificantes e espessantes de alimentos (Eslahi *et al.*, 2019).

Figura 6 - Estrutura molecular da celulose.



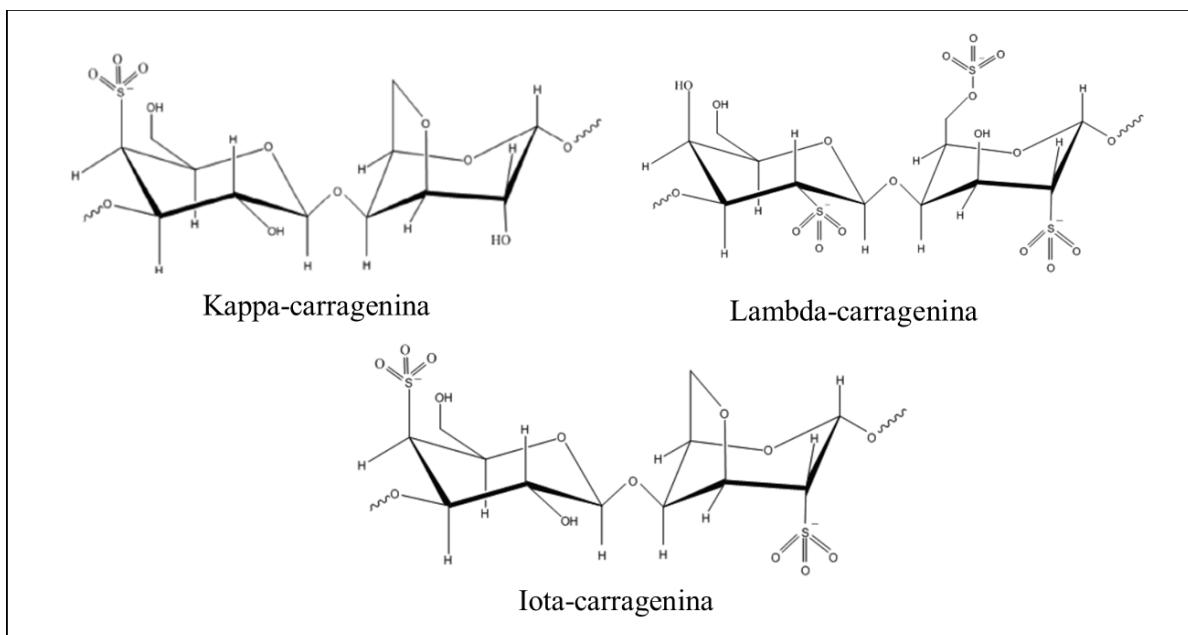
Fonte: Adaptado (Zainal *et al.*, 2021).

- Carragenina:

A carragenina, também conhecida como carragenana é um grupo de polissacarídeos sulfatados lineares, derivados das paredes celulares de algas marinhas vermelhas. Existem três

tipos de carrageninas mais relevantes industrialmente, a iota-carragenina, a kappa-carragenina e a lambda-carrgenina (Aga *et al.*, 2021), como pode ser visto na Figura 7.

Figura 7 - Principais tipos de carrageninas.



Fonte: (Qureshi *et al.*, 2019).

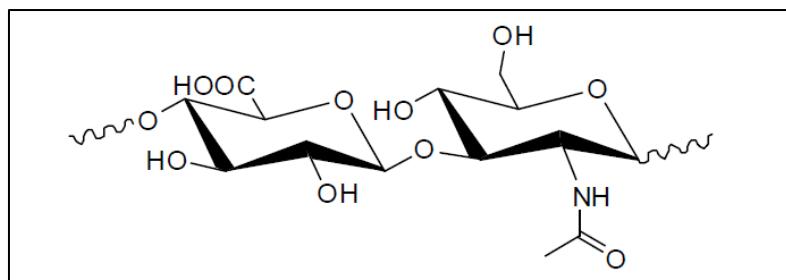
As carrageninas são utilizadas nas indústrias de alimentos e cosméticos como estabilizantes e agente espessantes de produtos lácteos, carnes, shampoos, loções e produtos de higiene bucal. As carrageninas possuem atividades antitrombóticas, antivirais, anticancerígenas e imunomoduladoras. Estudos estão sendo realizados com a carragenina como transportador de medicamentos e produção de filmes ativos para a indústria de alimentos (Qureshi *et al.*, 2019).

- **Ácido hialurônico:**

O ácido hialurônico pertence aos compostos glicosaminoglicanos, que são polissacarídeos. É uma macromolécula hidrofílica, possuindo alta solubilidade em água e forma soluções viscosas. Pode ser encontrado na pele, nas cartilagens, no núcleo pulposo entre as vértebras da coluna, no colo do útero e no glicocálice das células endoteliais que são as células que revestem os vasos sanguíneos e linfáticos (Sionkowska *et al.*, 2020). Pode ser obtido por meio da extração de tecidos animais, normalmente cristas de galo, ou produzidos por cepas bacterianas como a *Streptococcus zooepidemicus* ou por microrganismos geneticamente

modificados como, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Escherichia coli* e *Lactococcus*. Sua estrutura molecular pode ser vista na Figura 8.

Figura 8 - Estrutura molecular do ácido hialurônico.



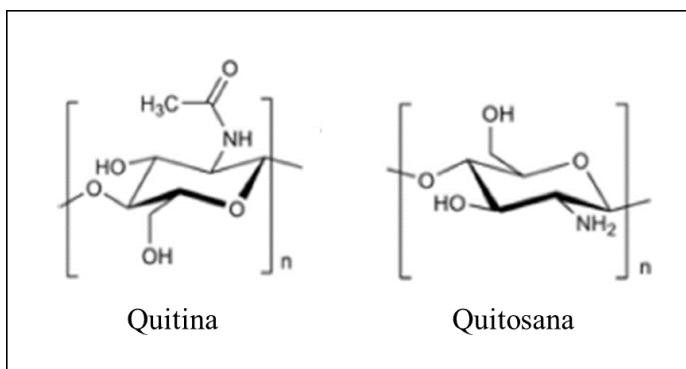
Fonte: (Sionkowska *et al.*, 2020).

O ácido hialurônico tem sido muito utilizado na formulação de cosméticos, em procedimentos estéticos para preenchimento facial, e em procedimentos médicos como o tratamento de cistite intersticial, incontinência urinária, refluxo vesicoureteral e osteoartrite (Al-khateeb & Olszewska-czyb, 2020). Também está sendo estudado no tratamento de feridas e na engenharia de tecidos.

- **Quitosana:**

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação da quitina, um biopolímero presente no exoesqueleto de crustáceos, nas cutículas de insetos, nas algas e na parede celular de alguns fungos. As estruturas moleculares da quitina e da quitosana podem ser vistas na Figura 9. A quitosana apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras, apresenta também atividade antioxidante, anti-inflamatória, pode ser utilizada na síntese de nanopartículas de metais. (Aranaz *et al.*, 2021).

Figura 9 - Estruturas moleculares da quitina e quitosana.



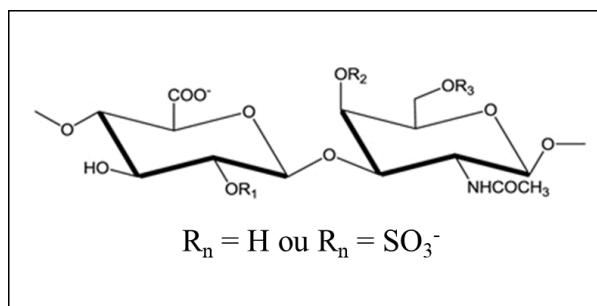
Fonte: (Kou *et al.*, 2021).

As matérias-primas mais utilizadas para produção de quitosana são exoesqueleto de camarões, caranguejos, lagostas, lagostins e conchas de ostras (Kou *et al.*, 2021). Materiais à base de quitosana se mostram promissores para uso em tratamentos de água, processamento de alimentos, aplicação em área farmacêutica, indústria têxtil e na agricultura (Wang & Zhuang, 2022).

- Sulfato de condroitina:

O sulfato de condroitina é um glicosaminoglicano, um heteropolissacarídeo aniónico encontrado nas cartilagens e tecidos animais. É biodegradável, biocompatível e possui atividades anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, anticoagulante e antitrombogênica. Na indústria farmacêutica é utilizado como suplemento nutricional e como medicamento para o tratamento de osteoartrites (Sharma *et al.*, 2022). A estrutura molecular do sulfato de condroitina está representada na Figura 10.

Figura 10 - Estrutura molecular do sulfato de condroitina.



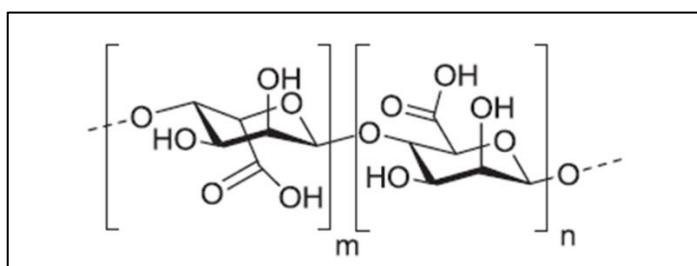
Fonte: Adaptado (Abdallah *et al.*, 2020).

Pesquisas recentes demostram sua aplicação no campo dos biomateriais, na engenharia de tecidos e liberação de medicamentos (Yang *et al.*, 2020). Para fins comerciais é extraído de anéis cartilaginosos da traqueia de bovinos, orelhas e focinho de porco e cartilagem de tubarões (Abdallah *et al.*, 2020). O sulfato de condroitina também pode ser produzido por via fermentativa utilizando fungos e bactérias (Sharma *et al.*, 2022).

- Ácido algínico:

O ácido algínico, também conhecido por algina, é um polissacarídeo natural, obtido geralmente de algas marrons, como a *Kelp*, *Gulfweed*, *Ascophyllum* e *Macroalgae*, mas que também pode ser produzido a partir de fermentação microbiana por meio do cultivo de bactérias (Guo *et al.*, 2020). Esse polímero é formado pelos monômeros de manuronato e guluronato, é biocompatível e biodegradável (Sikkema *et al.*, 2021), sua estrutura molecular está representada na Figura 11. Pesquisas no campo farmacêutico indicam que o ácido algínico tem atividades imunomoduladoras, antioxidantes, efeitos antinflamatórios, propriedades antianafiláticas, hipocolesterolêmico e anti-hipertensivo. O ácido algínico também tem sido pesquisado para outras aplicações como: catalisador, tratamento de água, embalagens, indústria de alimentos e na imobilização de células (Guo *et al.*, 2020).

Figura 11 - Estrutura molecular do ácido algínico.



Fonte: Adaptado (Doppalapudi *et al.*, 2014).

Em condições fisiológicas o ácido algínico assume a forma de um sal de sódio altamente solúvel (Sikkema *et al.*, 2021). O alginato de sódio possui as características de espessar, gelificar, formar filmes e fiar fibras, e por isso é muito utilizado nas indústrias alimentícia, de papel e cosméticas (Guo *et al.*, 2020).

### **3.1.3 Polímeros obtidos de microrganismos**

Microrganismos são organismos microscópicos, geralmente unicelulares, que só podem ser visualizados com o auxílio de um microscópio. Eles estão presentes em quase todos os ambientes da Terra. São representados por bactérias, fungos (leveduras e fungos filamentosos), protozoários e algas microscópicas. Neste grupo também estão os vírus, entidades acelulares (Tortora *et al.*, 2012).

Os microrganismos desempenham um papel crucial na indústria, sendo amplamente utilizados em diversos setores devido à sua capacidade de realizar processos biológicos eficientes, sustentáveis e econômicos. Sua aplicação se estende desde a produção de alimentos e bebidas, vacinas, antibióticos, biofertilizantes, controle de pragas, tratamento de resíduos, produção de biocombustíveis e até biopolímeros.

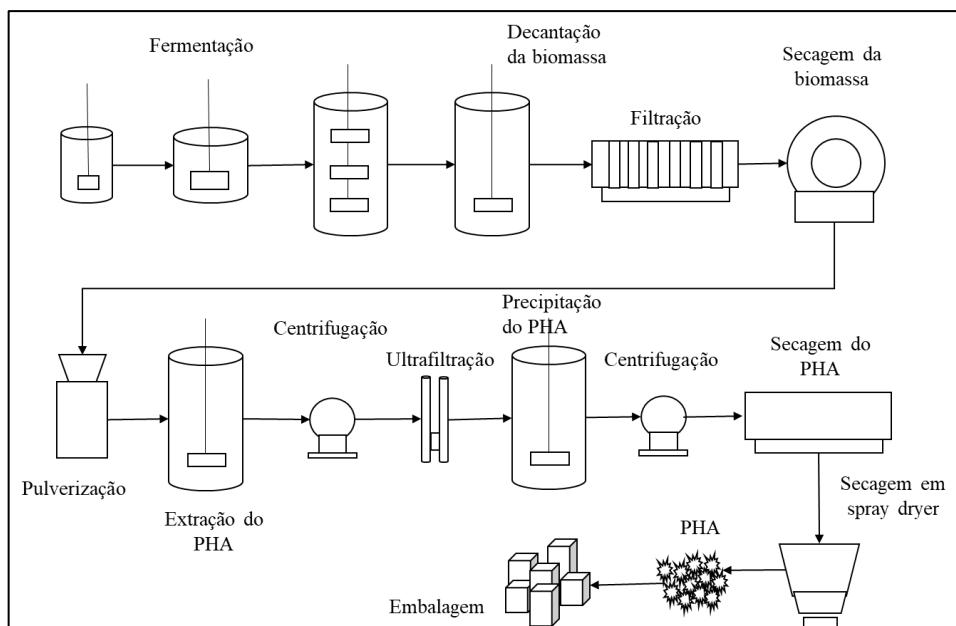
- Polihidroxialcanoatos (PHA) / Poli(3-hidroxibutirato) (PHB):

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são biopolímeros produzidos naturalmente por diferentes microrganismos procarióticos como bactérias gram-positivas, gram-negativas e archeas. O excesso de carbono e a deficiência de nutrientes induz a produção de PHA na forma de grânulos, que são acumulados no interior das células microbianas, e quando extraídos apresentam as mesmas propriedades dos polímeros de origem petroquímica mais vendidos, como o polipropileno, com a vantagem de serem biodegradáveis no solo, na água doce e em ambientes marinhos, e compostáveis (Sharma *et al.*, 2021).

Industrialmente são produzidos cinco tipos de PHAs, o poli(3-hidroxibutirato) mais conhecido como PHB, poli(4-hidroxibutirato), poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato (Koller & Mukherjee, 2022).

A produção industrial do PHA contém várias etapas, incluindo fermentação, separação da biomassa do caldo, secagem da biomassa, extração do PHA, secagem do PHA e embalagem (Chen, 2009), conforme Figura 12.

Figura 12 - Fluxograma geral de produção de polihidroxialcanoato.



Fonte: Adaptado (Chen, 2009).

### **3.1.4 Polímeros obtidos por processo biotecnológico**

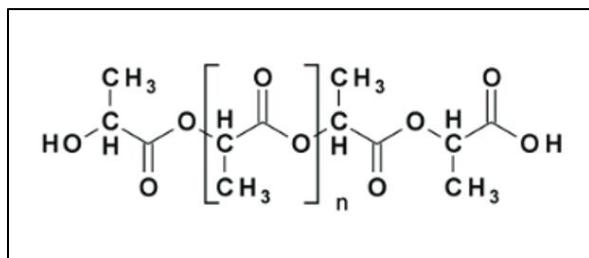
Processos biotecnológicos são técnicas que utilizam organismos vivos, células, componentes celulares ou biomoléculas para produzir bens e serviços. Esses processos combinam bioquímica, biologia, microbiologia e engenharia química para aproveitar as capacidades naturais de sistemas biológicos, otimizando-os para aplicações específicas em diversos setores, como saúde, agricultura, pecuária, preservação do meio ambiente e indústria (Schmidell *et al.*, 2001).

- Poliácido láctico (PLA)

O poliácido láctico é um polímero sintetizado a partir de uma base biológica. Ele é obtido pela polimerização do ácido láctico, uma substância produzida por meio da fermentação de matérias-primas renováveis como cultivos agrícolas de milho e de cana-de-açúcar (McKeown & Jones, 2020). A sua estrutura molecular está representada na Figura 13.

O PLA é seguro para ser decomposto após o seu uso sem poluir o meio ambiente e é comparável com plásticos convencionais como o polipropileno (PP) e polietileno tereftalato (PET) quanto as propriedades adequadas para uso industrial, como mecânicas, físicas, biocompatibilidade e de processabilidade (Taib *et al.*, 2022).

Figura 13 - Estrutura molecular do poliácido láctico.



Fonte: Adaptado (Inkinen *et al.*, 2011).

O PLA é utilizado na indústria têxtil e de embalagens, mas vem se destacando da bioengenharia com aplicações em usos ortopédicos, cardíacos, odontológicos e de engenharia de tecidos. Por ser termoplástico, biodegradável e biocompatível o PLA pode ser utilizado em impressoras 3D para fabricar andaimes na engenharia de tecidos específicos para cada paciente (Destefano *et al.*, 2020).

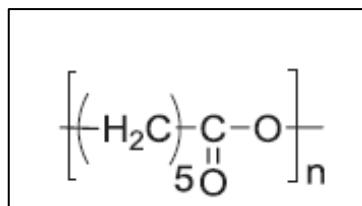
### 3.1.5 Polímeros de fonte petroquímica

Os polímeros obtidos a partir de fontes petroquímicas são materiais derivados de hidrocarbonetos presentes no petróleo e no gás natural. Eles desempenham um papel fundamental na indústria moderna devido às suas diversas propriedades físicas, podendo ser leves, flexíveis ou rígidos conforme a necessidade. Possuem fácil processabilidade, baixo custo e ampla gama de aplicações. A produção desses polímeros envolve a polimerização de monômeros, como o eteno, propeno e estireno.

- **Policaprolactona (PCL)**

A policaprolactona, conhecida como PCL, é um poliéster termoplástico obtido a partir de petróleo bruto e é sintetizado a partir das ligações entre os monômeros de ε-caprolactona (CAP). É um polímero biodegradável, possui baixo ponto de fusão e baixa viscosidade (Zhong *et al.*, 2020). Tem boa resistência à água, óleo, solvente e cloro, é hidrofóbico e semicristalino. A PCL possui aplicações na área de embalagens, implantes médicos e sistema de administração controlada de medicamentos. A sua comercialização tem sido limitada devido à complexidade da produção e do alto custo envolvido no processo, porém essas limitações têm sido superadas por pesquisadores pelo uso da PCL em compósitos (Mohamed & Yusoh, 2015). A estrutura molecular da PCL pode ser vista na Figura 14:

Figura 14 - Estrutura molecular da policaprolactona.



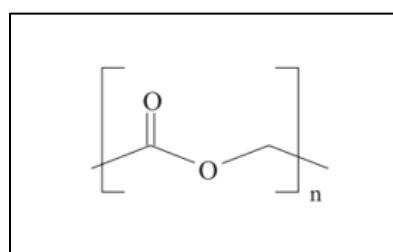
Fonte: Adaptado (Doppalapudi *et al.*, 2014).

- Poli(acido glicólico) (PGA)

O poli(ácido glicólico), também conhecido como ácido poliglicólico, é um polímero sintético, biodegradável e biocompatível. É um poliéster com estrutura semelhante ao PLA, mas sem o grupo lateral metil, o que faz com que suas cadeias poliméricas se agrupem mais facilmente e o torne mais cristalino, com uma cristalinidade em torno de 45 a 55%. Possui alta estabilidade térmica, resistência mecânica e rigidez, além de possuir propriedade de barreira de gases (Samantaray *et al.*, 2020). Sua estrutura molecular pode ser vista na Figura 15.

O PGA é bioabsorvível e exibe comportamento de degradação rápida, além de baixa toxicidade e alto módulo de elasticidade, essas características fizeram com que ele fosse utilizado no campo da medicina em diversas aplicações como suturas cirúrgicas, andaiques na engenharia de tecidos, fixação de fraturas, suporte e reparo de meniscos e tratamento de fraturas de osso esponjoso (Low *et al.*, 2020).

Figura 15 - Estrutura molecular do PGA.



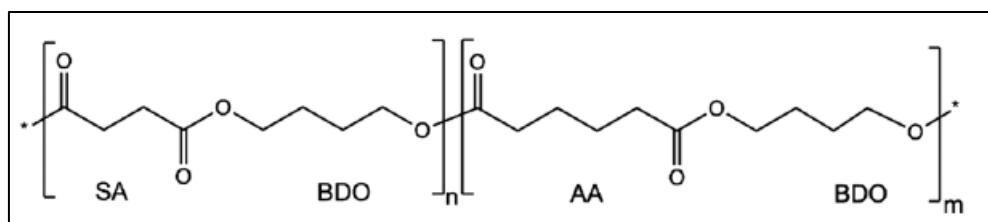
Fonte: Adaptado (Barbanti *et al.*, 2005).

- Poli(butileno succinato co-adipato) (PBSA)

O poli(butileno succinato co-adipato), mais conhecido como PBSA, é um copolímero da classe dos poliésteres alifáticos. Sua síntese é feita por meio da reação de policondensação entre o 1,4-butanodiol e os ácidos succínico e adípico, sua estrutura molecular pode ser visualizada na Figura 16. Como características principais ele possui boa resistência térmica e química, é altamente flexível, possui excelente resistência ao impacto e

processabilidade. Suas propriedades gerais como densidade, resistência à tração e rigidez são comparáveis com o polipropileno (PP), o polietilenotereftalato (PET), e com os polietilenos de alta densidade (PEAD) e baixa densidade (PEBD) (Palai *et al.*, 2020).

Figura 16 - Estrutura molecular do poli(butileno succinato co-adipato)



Fonte: (Harder *et al.*, 2023)

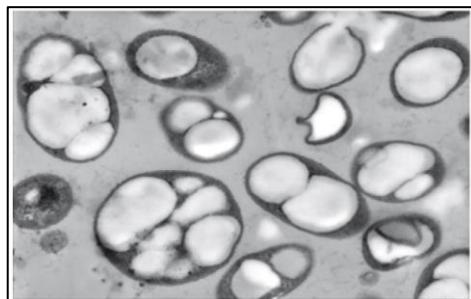
Estudos recentes mostram a aplicação do PBSA na produção de biocompósito reforçado com fibra natural de lúpulo (Harder *et al.*, 2023), produção de filmes ativos biodegradáveis PBSA-PLA aplicados a embalagens alimentícias e testado em fatias de salmão (Yang *et al.*, 2019) e em produtos de panificação (Suwanamornlert *et al.*, 2020).

### 3.2 POLIHIDROXIALCANOATOS

Polihidroxialcanoatos (PHA) são polímeros termoplásticos biodegradáveis e biocompatíveis pertencentes à classe dos poliésteres. São produzidos por mais de 300 espécies de bactérias gram-negativas, gram-positivas e uma ampla gama de arqueas, quando seu substrato de cultivo apresenta excesso de carbono, especialmente quando outro nutriente essencial como oxigênio, nitrogênio ou fósforo é limitante, ou após mudança de pH do meio (Laycoc *et al.*, 2013). Os grânulos de PHA são armazenados no citoplasma celular e utilizados como reserva de carbono e energia. Possuem, normalmente, 0,2 a 0,5 micrômetros de diâmetro e podem ser visualizados por meio de um microscópio de luz de contraste de fase devido à sua alta refratividade ou usando corantes como *Sudan black B*, corante azul do Nilo ou Nilo vermelho (Anjum *et al.*, 2016).

Quando bactérias contendo PHA são observadas em um microscópio eletrônico de transmissão, as inclusões de PHA aparecem como corpos eletrodensos (Sudesh *et al.*, 2000), como na Figura 17:

Figura 17 - Micrografia eletrônica de transmissão da bactéria *Cupriavidus necator* DSM 545 contendo PHA. Ampliação: 70.000x.



Fonte: Adaptado (Koller *et al.*, 2009).

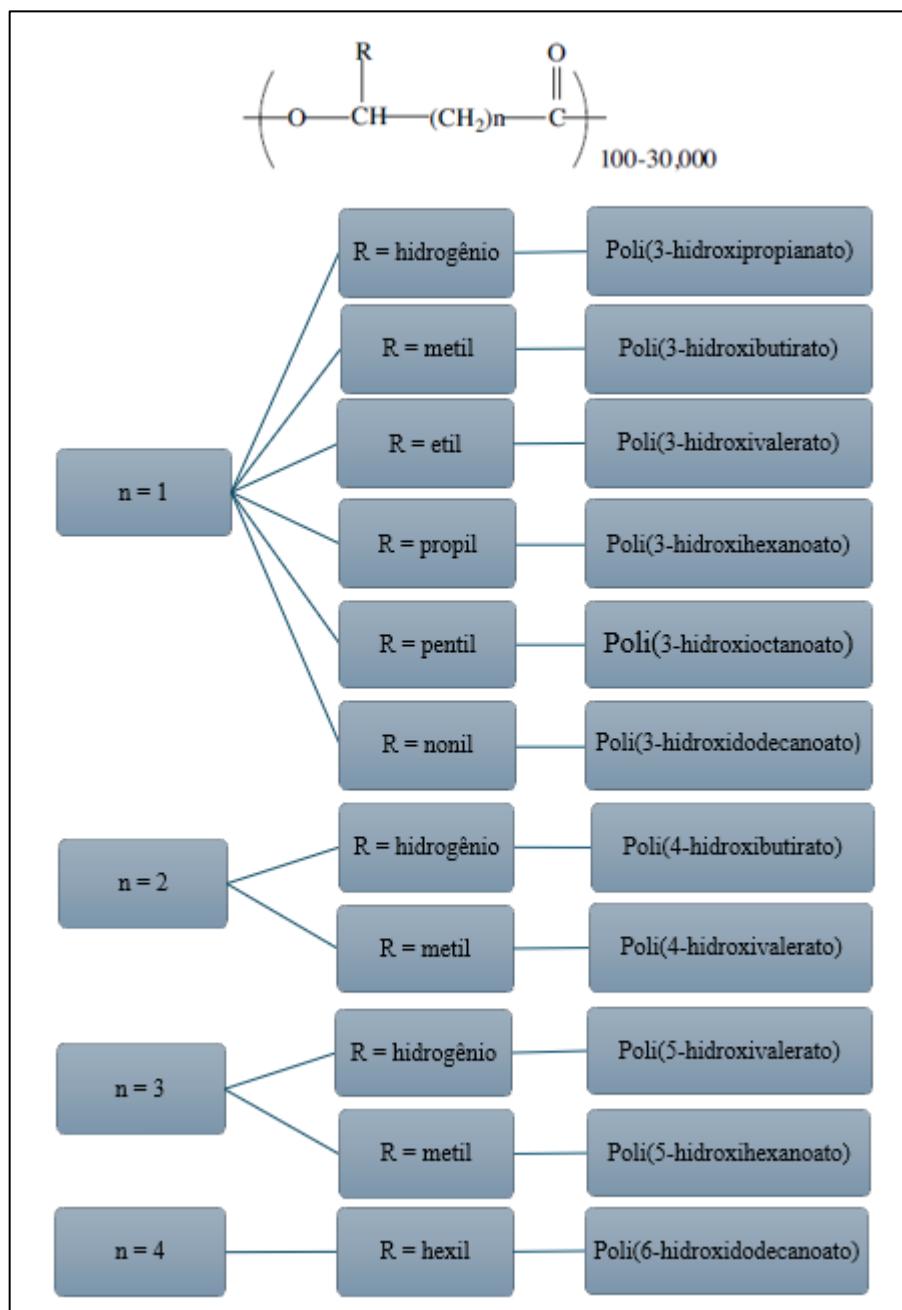
Estudos vêm sendo realizados e comprovando a produção de PHA por microrganismos além de bactérias, leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Pichia* sp. TSLS24, *Rhodotorula minuta* RY411 e *Kebeckera* spp., alguns desses microrganismos foram modificados geneticamente (Thu *et al.*, 2023).

### 3.2.1 Estrutura química e classificação dos PHAs

Uma molécula de PHA consiste nas unidades monoméricas de hidroxialcanoatos conectadas entre si por ligações éster, no qual um grupo hidroxila de um monômero se liga a um grupo carboxílico de outro monômero. Cada unidade monomérica possui um grupo R de cadeia lateral (Sharma *et al.*, 2021). Até agora, mais de 150 monômeros diferentes foram incorporados às cadeias de PHA sob diversas condições de fermentação, produzindo biopolímeros com diferentes características (Mitra *et al.*, 2020), o que é vantajoso porque aumenta o potencial de aplicações em diversas áreas.

Os PHAs podem ser produzidos com apenas um tipo de monômero na cadeia polimérica, os homopolímeros como o poli(3-hidroxibutirato) (PHB), ou ser produzidos por dois ou mais tipos de monômeros formando os co-polímeros, como o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV). A estrutura molecular geral dos PHAs pode ser vista na Figura 18.

Figura 18 - Estrutura molecular geral dos polihidroxialcanoatos e nomenclaturas.



Fonte: Adaptado (Anjum *et al.*, 2016).

Os PHAs podem ser classificados em três grandes classes de acordo com o tamanho dos monômeros constituintes que ocupam a configuração R na cadeia lateral. Os PHAs contendo até 5 carbonos são classificados como PHAs de cadeia curta (scl-PHA), entre 6 e 14 carbonos são classificados como PHAs de comprimento de cadeia média (mcl-PHA) e comprimento de cadeia longa acima de 14 carbonos (lcl-PHA) (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

### **3.2.2 Características dos PHAs**

Os PHAs são representados por uma grande variação de características físicas, desde materiais cristalinos e frágeis a materiais macios e pegajosos. Essas propriedades dependem do comprimento da cadeia alifática lateral. Entre as principais características dos PHAs estão incluídas: insolubilidade em ambientes aquáticos junto com uma relativa resistência à degradação por hidrólise, boa resistência aos raios UV, mas fraca resistência a ambientes ácidos e básicos (Briassoulis *et al.*, 2021).

Segundo Sharma *et al.*, (2021) além dessas características mencionadas os PHAs têm propriedades favoráveis, como tamanho de poro pequeno com alta propensão para ser reciclado, razão volume/superfície alta, biodegradabilidade, biocompatibilidade e fácil processamento.

Por serem polímeros semicristalinos, as propriedades térmicas dos PHAs são expressas em termos de temperatura de transição vítreia ( $T_g$ ) para a fase amorfã e temperatura de fusão ( $T_m$ ) para a fase cristalina. A temperatura de transição vítreia ( $T_g$ ) diminui à medida que o comprimento da cadeia lateral aumenta de 1 para 7 carbonos, e então estabiliza, enquanto a temperatura de fusão ( $T_m$ ) aumenta de 45 °C para 69 °C à medida que o comprimento da cadeia lateral muda de C4 para C7. Os mcl-PHAs apresentam valores correspondentes de  $T_g$  abaixo da temperatura ambiente, variando de -25 °C a 65 °C e possuem baixa temperatura de fusão entre 42 °C e 65 °C. A combinação da temperatura de transição vítreia e o baixo grau de cristalinidade confere a esses polímeros um comportamento elastomérico. Na verdade, os mcl-PHAs agem como verdadeiros elastômeros em uma faixa de temperatura muito estreita devido à sua baixa temperatura de fusão (Grigore *et al.*, 2019), diferente dos scl-PHA que são rígidos, quebradiços e possuem um alto grau de cristalinidade na faixa de 60 - 80% (Anjum *et al.*, 2016).

### **3.2.3 Biossíntese dos PHAs**

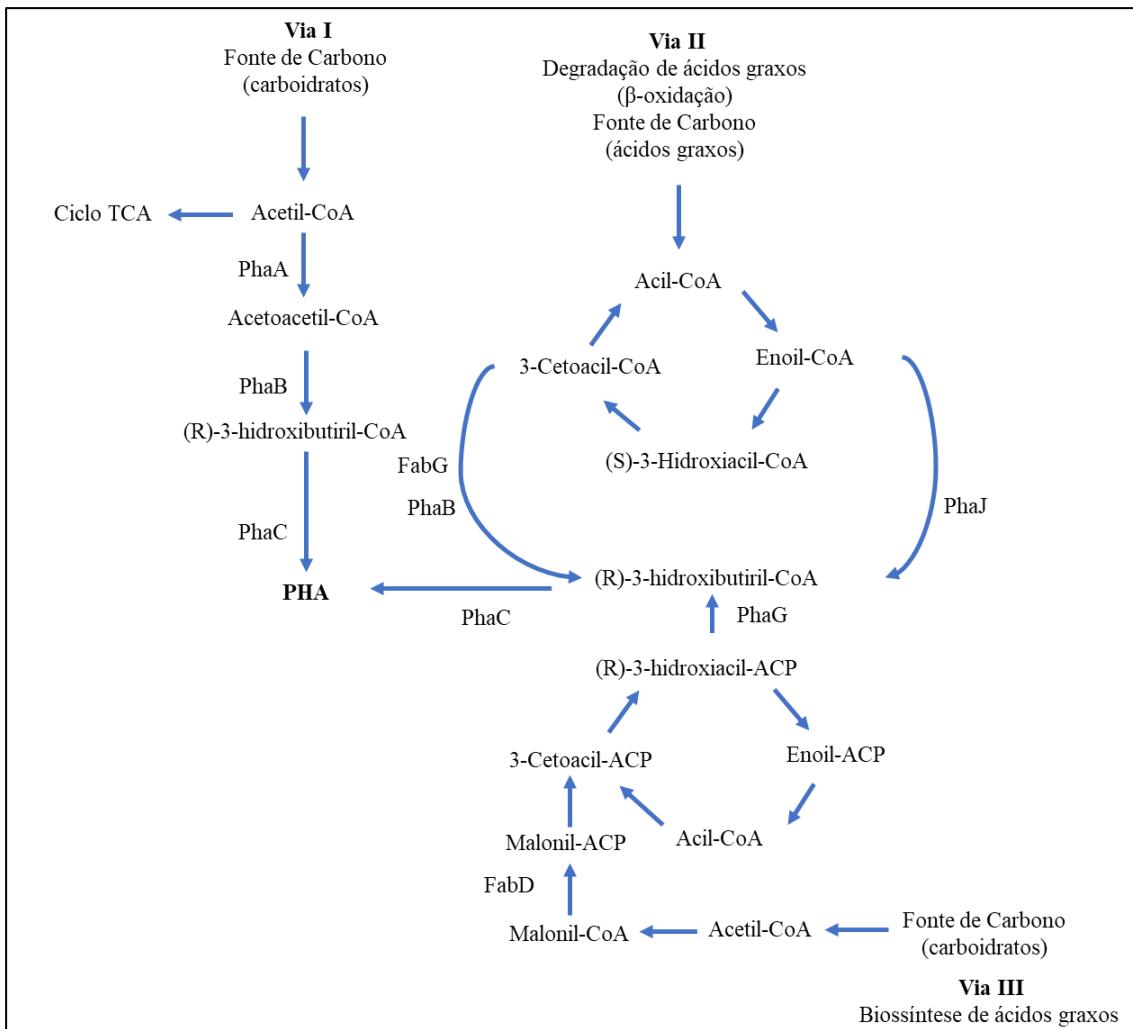
Existem três vias biossintéticas para produção de PHA conhecidas, conforme Figura 19: a via I é utilizada pelo *Cupriavidus necator* para produção do poli(3-hidroxibutirato) mais conhecido como PHB. Nesta via, os monômeros 3HB são gerados pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para formar acetoacetil-CoA pela enzima  $\beta$ -cetotiolase. A acetoacetil-CoA redutase atua no acetoacetil-CoA para formar 3-hidroxibutiril-CoA. Finalmente, a enzima PHA sintase catalisa a polimerização através da esterificação de 3-hidroxibutiril-CoA em poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)). As vias envolvidas

no metabolismo dos ácidos graxos geram diferentes monômeros de hidroxialcanoatos utilizados na biossíntese de PHA.

A  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos via II gera substratos que podem ser polimerizados pelas PHA sintases de *Pseudomonas* pertencentes ao grupo de homologia de RNA ribossômico I, como *Pseudomonas aeruginosa*. Esses microrganismos podem sintetizar PHA de cadeia média a partir de vários alcanos, alcenos e alcanoatos. A composição do monômero está relacionada à fonte de carbono utilizada. Em *Aeromonas caviae*, o intermediário da  $\beta$ -oxidação, trans2-enoil-CoA é convertido em (R)-hidroxiacil-CoA por uma enoil-CoA hidratase (R)-específica.

A via III é de interesse significativo porque ajuda a gerar monômeros para síntese de PHA a partir de fontes de carbono simples e baratas como glicose, sacarose e frutose. Os intermediários (R)-3-hidroxiacil do ácido graxo via biossintética são convertidos a partir de seu acil, forma de proteína transportadora (ACP), para a forma CoA pela enzima acil-ACP-CoA transacilase (codificada por *faG*). Esta enzima é o elo chave entre a síntese ácidos graxos e biossíntese de PHA (Philip *et al.*, 2007).

Figura 19 - Vias metabólicas da síntese dos polihidroxialcanoatos.



Fonte: Adaptado de (Philip *et al.*, 2007; Anjum *et al.*, 2016)

### 3.3 POLIHIDROXIBUTIRATO

#### 3.3.1 Histórico

O poli(3-hidroxibutirato), aqui descrito como PHB, foi descoberto em bactérias gram-positivas da espécie *Bacillus megaterium* na década de 1920, mais precisamente no ano de 1926, pelo microbiologista francês Maurice Lemoigne, que realizou seu isolamento e caracterização. O PHB é o primeiro e mais comum biopolímero pertencente aos PHAs (Keshavarz & Roy, 2010; Ke *et al.*, 2017).

Em 1957 Stanier, Wilkinson e seus colaboradores foram responsáveis pela pesquisa sobre os mecanismos de biossíntese do PHA. Em seguida, no ano de 1959, a empresa norte

americana, *WR Grace and Company*, patenteou um processo de produção de PHB usando bactérias e pela primeira vez houve a comercialização do biopolímero. Porém, a produção foi ineficiente devido à baixa estabilidade térmica e a limitação causada pela falta de tecnologias para extração do polímero. No entanto, em 1970, a *Imperial Chemical Industri* (ICI) do Reino Unido, comercializou o co-polímero P(3HB-co-3HV), sob o nome comercial de Biopol<sup>TM</sup>, produzido por uma cepa mutante de *Alcaligenes eutrophus* utilizando glicose e uma mistura de glicose e ácido propiônico (Lee & Chang, 1995; Laycock *et al.*, 2013). Em 1996, a tecnologia da Biopol, que havia sido passada da ICI para a Zeneca, foi vendida para a Monsanto e posteriormente para a Metabolix dos EUA. (Chanprateep, 2010).

Na década de 80, a tendência da pesquisa foi identificar e caracterizar todas as várias unidades potenciais de hidroxialcanoatos (HA) que poderiam ser um constituinte do poliéster bacteriano. Isso resultou na descoberta de vários constituintes de HA, incluindo o 4HA e o 5HA no final da década de 1980. Nesse período também clonaram os genes que codificam enzimas envolvidos na biossíntese de PHA da *Alcaligenes eutrophus* e os genes demonstraram ser funcionalmente ativos em *Escherichia coli* (Sudesh *et al.*, 2000).

Em 1992, Poirier *et al.*, estudaram a produção de PHB em plantas transgênicas por meio da introdução dos genes da bactéria *Alcaligenes eutrophus* através do vírus mosaico 35S da couve-flor na planta *Arabidopsis thaliana* (Poirier *et al.*, 1992).

Por volta do final da década de 80 a Procter & Gamble (P&G) desenvolveu um copolímero que consiste em 3-hidroxibutirato e uma quantidade comparativamente pequena de monômeros de comprimento de cadeia média com grupos laterais maiores ou iguais a três unidades de carbono. As unidades de cadeia média utilizadas incluem 3-hidroxihexanoato, 3-hidroxioctanoato e 3-hidroxidecanoato, esse polímero recebeu o nome de Nodax e em 2007 a P&G vendeu a Nodax para a Meridian (Noda *et al.*, 2009; Anjum *et al.*, 2016).

A Copersucar montou em 1995 uma planta piloto para produção de PHB em uma de suas usinas membros, a Usina da Pedra em Ribeirão Preto no Brasil, a planta produzia 5 toneladas por mês de PHB. O objetivo desta planta piloto era produzir PHB suficiente para abastecer o mercado de testes e ensaios e ser um centro de treinamento para futuros operadores (Nonato *et al.*, 2001).

No ano 2000 a Pedra Agroindustrial fecha uma parceria com o grupo Balbo para a ampliação e desenvolvimento do PHB. O projeto se torna a PHB Industrial e lança a marca Biocycle (Pedra agroindustrial, 2023).

### 3.3.2 Microrganismos produtores

Dentre as cepas bacterianas mais utilizadas para produção industrial de PHAs estão as espécies: *Ralstonia eutropha*, hoje chamada de *Cupriavidus necator*, *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Halomonas* sp., *Haloferax* sp., *Aeromonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Thermus thermophilus*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Saccharophagus degradans*, *Comamonas* sp., *Azohydromonas lata*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zobellella denitrificans*, lodo ativado, cianobactérias, *Chromobacterium* sp., *Erwinia* sp., e *E. coli* recombinante (Anjum *et al.*, 2016).

Na Tabela 01, abaixo, pode ser visualizado alguns microrganismos, os biopolímeros produzidos por eles e a fonte de carbono utilizada nas pesquisas referenciadas.

Tabela 1 - Microrganismos produtores de polihidroxibutirato e co-polímeros.

Polímero	Microrganismo	Fonte de carbono	Referência
PHB	<i>Cupriavidus necator H16</i>	Óleo de Jatropa; Resíduo de óleo de colza	Batcha <i>et al.</i> (2014)
PHB	<i>Cupriavidus necator DSM 545</i>	Glicerol residual; Vinhaça e melaço de cana-de-açúcar	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009); Dalsasso <i>et al.</i> (2019)
PHB	<i>Cupriavidus necator DSM 428</i>	Óleo de cozinha; Óleo de borra de café; glicerol	Cruz <i>et al.</i> (2015) Cruz <i>et al.</i> (2014) Das & Grover, (2018)
PHBV	<i>Cupriavidus necator H16</i>	Óleo de colza e propanol	Obruca <i>et al.</i> (2010)
PHB	<i>Caldimonas manganoxidans</i>	Glicerol	Hsiao <i>et al.</i> (2018)
PHB	<i>Cupriavidus necator</i>	Óleo de colza residual; melaço de cana-de-açúcar	Verlinden <i>et al.</i> (2011); Sen <i>et al.</i> (2018)
PHB	<i>Bacillus safensis EBT1</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Sakthiselvan & Madhumathi, (2018)
PHB	<i>Ralstonia eutropha ATCC 17699</i>	Substratos lignocelulósicos	Saratale & OH, (2015)

PHB	<i>Bacillus strain</i>	Resíduos de abacaxi e cana-de-açúcar	Suwannasing <i>et al.</i> (2015)
PHB	<i>Pseudomonas oleovorans NRRL B-14682</i>	Glicerol bruto	Ashby <i>et al.</i> (2011)
PHBV	<i>Haloferax mediterranei</i>	Biomassa de macroalgas	Ghosh <i>et al.</i> (2019)
PHB, 3-hidroxioctanoato, 3-hydroxidecanoato	<i>Pseudomonas mendocina PSU</i>	Resíduos líquidos de biodiesel	Chanasit <i>et al.</i> (2016)
PHB	<i>Bacillus megaterium</i>	Amido de mandioca	Krueger <i>et al.</i> (2012)
PHB	<i>Wautersia eutrophpha</i>	Hidrolisado de trigo	Xu <i>et al.</i> (2010)
PHB	Cultura mista	Biomassa de algas	Kumar <i>et al.</i> (2020)

Fonte: Adaptado de (Sirohi *et al.*, 2020).

### 3.3.2.1 *Cupriavidus necator*

As bactérias são classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas com base na composição de sua parede celular, essa distinção é feita pelo teste de coloração de Gram, que utiliza cristal violeta para diferenciar os dois grupos. As bactérias gram-positivas retêm a coloração violeta no teste de Gram, ficando roxas. Possuem uma parede celular mais rígida e espessa, composta principalmente por múltiplas camadas de peptidoglicanos e são geralmente mais resistentes a variações ambientais, porém mais suscetíveis a antibióticos que atacam o peptidoglicano, como a penicilina. Já as bactérias gram-negativas não retêm a coloração violeta no teste de gram e são coradas com safranina, apresentando coloração vermelha. Possuem uma parede celular fina com menos peptidoglicanos e apresentam uma membrana externa rica em lipopolissacarídeo, que dificulta a penetração de antibióticos (Zhang *et al.*, 2022).

A *Cupriavidus necator* é uma bactéria gram-negativa pertencente à família *Burkholderiaceae* e à classe *β-proteobacteria*. Está presente em ambientes de solo e água doce devido à sua versatilidade metabólica que permite a adaptação em diferentes condições ambientais. Pode crescer de forma heterotrófica ou litoautotrófica, utilizando CO<sub>2</sub>, compostos orgânicos e H<sub>2</sub> molecular como fontes de carbono e energia. Seu nome taxonômico passou por várias mudanças, sendo anteriormente conhecida como *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutrophpha* e *Wautersia eutrophpha*. Finalmente, *Cupriavidus necator* foi confirmado como o nome

válido, com base em estudos de similaridade taxonômica realizados por Vandamme e Coenye (2004), conforme o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (Sohn *et al.*, 2021).

Além de sua conhecida aplicação na produção de PHAs pode ser utilizada em sistemas de biorremediação porque possui alta tolerância a metais pesados como cádmio, cobre e zinco, devido à presença de mecanismos de detoxicação e sequestro desses metais. Os metais são armazenados nas suas estruturas celulares ou precipitados na forma de compostos insolúveis, tornando-os menos tóxicos e reduzindo sua mobilidade no meio ambiente (Vicentin *et al.*, 2018).

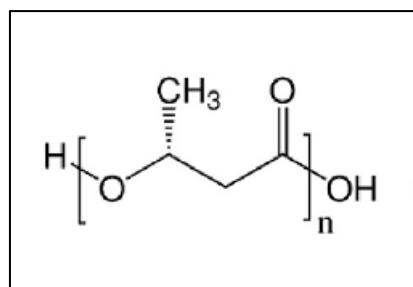
Pesquisadores demonstraram que também é capaz de produzir diversos biocombustíveis, como metil cetonas, isoprenoides, terpenos, isobutanol, alcanos e alcenos, além de uma ampla gama de produtos químicos básicos a partir de CO<sub>2</sub> (Panich *et al.*, 2021).

Dessa forma, a *C. necator* se destaca por possuir grande relevância industrial e ambiental, oferecendo soluções sustentáveis para desafios globais, como poluição plástica, emissões de carbono e contaminação ambiental. Com avanços na biotecnologia, pode desempenhar um papel ainda mais crucial na transição para uma economia circular e de baixo impacto ambiental.

### **3.3.3 Estrutura química e características do PHB**

O PHB produzido biologicamente possui uma macromolécula com uma estrutura isotática perfeita, com o carbono quiral de seus monômeros sendo configuração R absoluta. É um polímero semicristalino estereoregular com alto nível de degradabilidade. Já o PHB produzido através de rotas sintéticas, por meio da polimerização por abertura de anel da β-butirolactona, combina monômeros de configuração R e S, formando um polímero sindiotáctico. Consequentemente, o PHB isotáctico bacteriano apresenta maior cristalinidade em comparação com o PHB sindiotáctico sintético (Briassoulis *et al.*, 2021; Sudesh *et al.*, 2000).

Figura 20 - Estrutura molecular do polihidroxibutirato.



Fonte: Adaptado (Briassoulis *et al.*, 2021).

Quanto ao peso molecular o PHB pode ser classificado em três categorias: a primeira categoria é o PHB de alta massa molar que consiste em 10.000 a 1.000.000 unidades monoméricas, a segunda é o PHB de baixa massa molar, que contém de 100 a 300 unidades monoméricas (oligo-PHB), e a última categoria é a de PHB conjugado de cadeia curta (cPHB) que possui menos de 30 unidades monoméricas ligadas covalentemente a proteínas (Dedkova & Blatter, 2014).

O PHB é cristalino devido à sua estrutura de cadeia linear, contendo fases amorfas e cristalinas. Pode ser encontrado como polímero virgem ou como parte de copolímeros e blendas poliméricas. O PHB também tem uma série de vantagens sobre os polímeros sintéticos para aplicação em embalagens, incluindo: a permeabilidade da barreira do PHB é superior tanto ao polietileno (PE) quanto ao polipropileno (PP), e ele também é considerado mais rígido e menos flexível que o PP. Além disso, o PHB apresenta boas propriedades de barreira em comparação ao polietileno tereftalato (PET) e ao cloreto de polivinila (PVC) (Mcadam *et al.*, 2020). Algumas propriedades mecânicas e térmicas do PHB e de outros polímeros podem ser observada na Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades mecânicas e térmicas do polihidroxibutirato e polímeros de origem petroquímica.

<b>Propriedades Mecânicas/Térmicas</b>	<b>PHB</b>	<b>PP</b>	<b>PET</b>	<b>PEBD</b>	<b>PEAD</b>
Módulo de Elasticidade (GPa)	3 - 3,5	1,95	9,35	0,26 - 0,5	0,5 - 1,1
Resistência à tração (MPa)	20 - 40	31 - 45	62	30	30 - 40
Alongamento na ruptura (%)	5 - 10	50 - 145	230	200 - 600	500 - 700
Grau de Cristalinidade (%)	50 - 60	42,6 - 58,1	7,97	25 - 50	60 - 80
Temperatura de fusão (°C)	165 - 175	160 - 169,1	260	115	135
Temperatura de transição vítreia (°C)	5 - 9	(-20) - (-5)	67 - 81	(-130) - (-100)	(-130) - (-100)

Fonte: Adaptado (Mcadam *et al.*, 2020).

Observa-se na Tabela 2 que as propriedades do PHB se assemelham às do polipropileno, com exceção do alongamento na ruptura que no PHB é dez vezes menor. Para melhorar as propriedades mecânicas do polímero muitas vezes o PHB é copolimerizado com outros monômeros de PHA, como o PHBV (poli-3-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)).

Quando a porcentagem de 3-hidroxivalerato (3HV) adicionado para produzir copolímeros de PHA é aumentado de 0 a 25% em mol, a Tm e o grau de cristalinidade pode ser diminuído sem impactar significativamente a Tg e a temperatura de degradação, ampliando a janela do processamento. A incorporação de unidades adicionais de 3HV também melhoraram a resistência ao impacto, no entanto, isso também é acompanhado por uma redução na resistência à tração e no módulo de elasticidade (Mcadam *et al.*, 2020).

### 3.3.4 Aplicações do PHB

Diversas são as áreas de aplicação do PHB, por ser biocompatível e biodegradável ele pode ser usado no setor alimentício na produção de embalagens. Na medicina pode ser utilizado na produção de próteses, suturas, implantes, na engenharia de tecidos, na produção de curativos,

na liberação controlada de fármacos, entre outros. Na agricultura pode ser utilizado na liberação de fertilizantes e pesticidas, entre outras tantas aplicações.

Manikandan *et al.* (2020) estudaram a preparação de nanocompósitos de PHB incorporando várias concentrações (0 – 1,3% em peso) de nanoplaças de grafeno com intuito de avaliar sua aplicação em embalagens de alimentos. O melhor resultado foi obtido com 0,7% em peso de nanoplaças. Os nanocompósitos apresentaram ponto de fusão mais elevado, maior estabilidade térmica, maior resistência à tração e redução na permeabilidade de oxigênio e vapor de água. A transparência à luz UV e visível foi significativamente reduzida, o efeito citotóxico foi insignificante quando comparado ao PHB puro. Os nanocompósitos aumentaram o prazo de validade em 4 vezes dos alimentos estudados, e apresentaram alta biodegradabilidade pelos microrganismos do solo.

Uma das aplicações do PHB na engenharia de tecidos é a utilização como revestimento em andaimes cerâmicos. Parvizifard e Karbasi (2020) estudaram o efeito do revestimento de nanocompósitos de PHB-quitosana-nanotubos de carbono de paredes múltiplas depositados sobre andaimes de nano-biovidro -titânio, fabricados pelo método de replicação de espuma. Foram observadas a possibilidade de crescimento, aderência e proliferação nas células, portanto, o nanocompósito estudado pode ser aplicado na engenharia de tecido ósseo.

Um outro estudo relevante na engenharia de tecidos, utiliza curcumina e *Gymnema sylvestre* incorporadas em um compósito de óxido de grafeno - polihidroxibutirato - alginato de sódio como uma plataforma de matriz extracelular para melhorar a cicatrização de feridas em pacientes normais e diabéticos. Estudos *in vitro* com células de fibroblastos normais e diabéticas confirmaram que o compósito apresentou boas características biocompatíveis em termos de aumento da migração de células feridas. Assim, o compósito pode acelerar significativamente a cicatrização de feridas normais e diabéticas (Daisy *et al.*, 2020).

A aplicação do PHB na administração de medicamentos anticâncer foi estudada por Babos *et al.* (2020). Dois medicamentos, a doxorrubicina e o sorafenibe foram eficientemente co-encapsulados por PHB usando um método de evaporação emulsão-solvente. Para melhorar as características de liberação dos medicamentos foi realizado uma conjugação subsequente de polietilenoglicol (PEG). A liberação da doxorrubicina foi benéfica, uma vez que foi liberada mais rapidamente num ambiente ácido específico do tumor. A ligação do PEG desacelerou a liberação tanto da doxorrubicina como do sorafenibe, no entanto, a liberação do sorafenibe permaneceu ainda significativamente mais rápida com o aumento da explosão inicial em comparação com a doxorrubicina.

O PHB possui potencial para ser usado na agricultura. Daitx *et al.* (2020) estudaram o comportamento de sistemas de liberação controlada de fertilizantes NPK(nitrogênio, fósforo e potássio) por meio do PHB. Foram produzidas duas formulações, uma delas empregando 5% de fertilizante NPK puro e outra com 30% de nanopartículas de bentonita previamente modificadas com NPK. Os sistemas apresentaram bom controle de liberação, com 40% e 50% de fertilizante sendo liberados em 30 dias. A eficiência e aplicabilidade dos sistemas foram confirmadas por testes de germinação, que mostraram que ambos os sistemas contendo NPK favoreceram o crescimento das plantas.

### 3.4 PRODUÇÃO DE AÇÚCAR

#### 3.4.1 Produção de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é um grupo de espécies de plantas pertencentes à família das gramíneas (*Poaceae*) e do gênero *Saccharum*. São plantas semiperenes originárias de regiões tropicais da Ásia, especialmente da Índia. Contém cerca 57% de água, junto com palha, bagaço e açúcares. É a principal fonte de sacarose no mundo, conhecida por sua alta produtividade e como matéria-prima de alta qualidade para produção de açúcar, principalmente sacarose, glicose e frutose (Vandenbergh *et al.*, 2022).

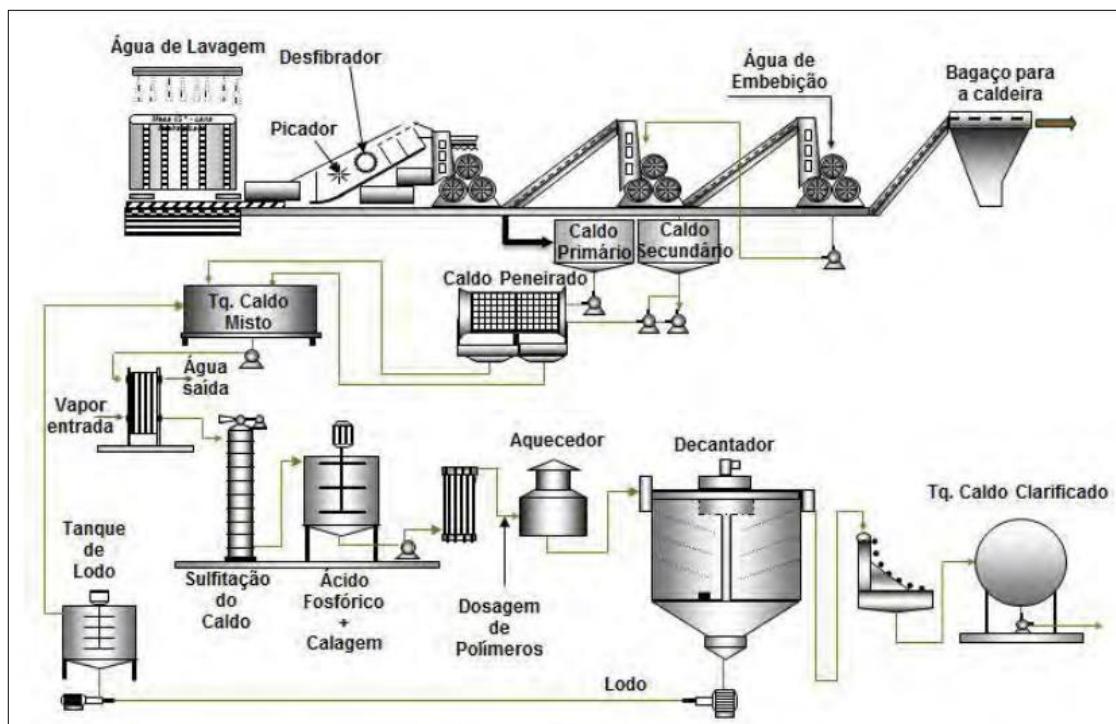
O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia, China, Paquistão e Tailândia (FAO, 2023).

A produção nacional de cana-de açúcar na safra 2022/23 foi estimada em 610,1 milhões de toneladas, o que correspondeu a uma área de plantio de 8.288,9 mil hectares. O estado responsável pela maior produção foi São Paulo com 312,9 milhões de toneladas, cerca de 50% da produção nacional. A Paraíba nesta safra produziu 7,3 milhões de toneladas, 28,4% a mais que a safra anterior 2021/2022. Nesta mesma safra 2022/23, a produção nacional de etanol anidro foi de 11,65 bilhões de litros, um aumento de 14% em relação ao ano anterior, em contrapartida a produção de etanol hidratado foi de 15,72 bilhões de litros, uma redução de 7,1%. A produção nacional de açúcar foi de 37 milhões de toneladas, a produção na safra 2022/23 cresceu 6% em relação ao ano anterior devido às razões mercadológicas e tributárias que tornaram este produto mais rentável na maioria das regiões produtoras. Na Paraíba a produção foi de 169,2 mil toneladas (CONAB, 2023).

### 3.4.2 Processo produtivo do açúcar

As etapas de produção do açúcar podem ser divididas em dois processos: a primeira etapa é a preparação do caldo e a segunda é o cozimento do caldo com cristalização do açúcar. A Figura 21 representa o processo de preparação do caldo.

Figura 21 - Fluxograma do processo de extração e tratamento do caldo de cana.

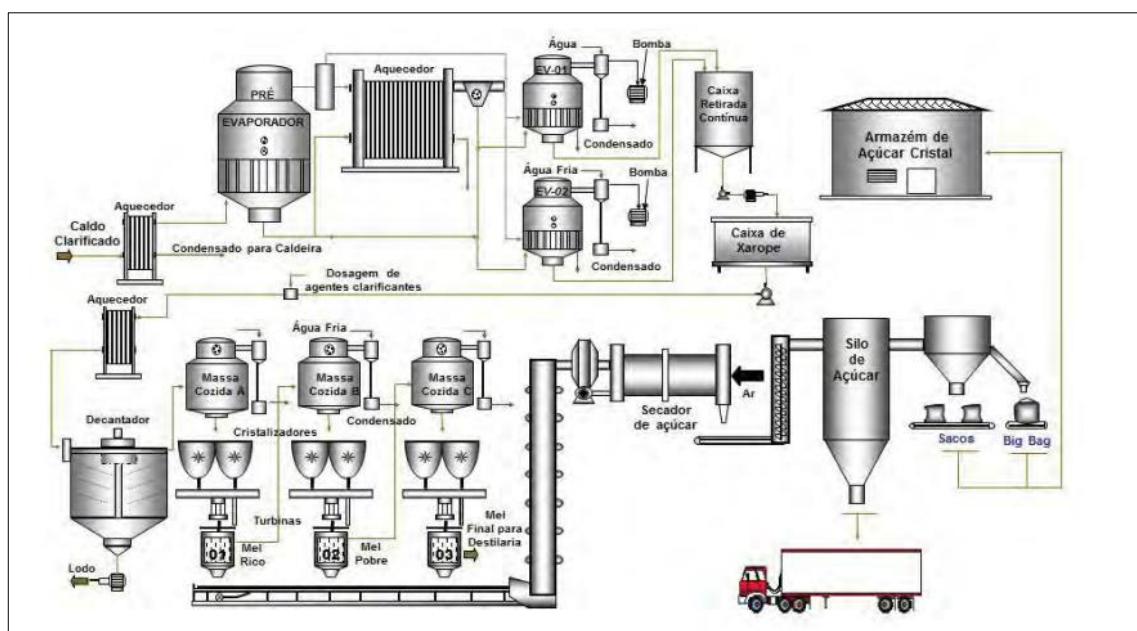


Fonte: (Crema, 2012).

Ao chegar à usina, a cana-de-açúcar é pesada e uma amostra é analisada em laboratório a fim de se verificar o teor de açúcares totais recuperáveis. Em seguida, a cana é conduzida para o processo de lavagem para a retirada de sujeiras provenientes da lavoura. Posteriormente, passa pelas navalhas do picador, onde é transformada em uma massa compacta de maior densidade, seguindo para o desfibrador que complementa a preparação e desintegração da cana facilitando a extração de caldo. A cana desfibrada é enviada à moenda (primeira prensa) para extração do caldo primário. O bagaço é embebido com água para diluir os açúcares existentes no interior das células e passa pelas moendas (segunda e terceira prensas) para extração do caldo secundário. O bagaço resultante do processo é utilizado na caldeira para produção de vapor e o caldo misto, que é composto pelos caldos primário e secundário, segue pelas peneiras para a retirada de bagacilhos e outras impurezas (Ribeiro, 2017).

O caldo misto recebe tratamentos físico-químicos para retirada do restante das impurezas. Ele passa por um trocador de calor para aquecimento, em seguida é sulfitado com dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), posteriormente caleado com leite de cal para coagular parte do material coloidal, precipitar as impurezas e regular o pH, recebe uma dosagem de agentes coagulantes e floculantes, é aquecido novamente e segue para o decantador. Após a decantação o sedimento, denominado lodo, retorna ao processo com o objetivo de recuperar o açúcar ainda presente e o caldo vai para o tanque de caldo clarificado (Crema, 2012). O processo de produção do açúcar a partir do caldo clarificado está representado na Figura 22.

Figura 22 - Fluxograma de processo de produção de açúcar cristal a partir do caldo clarificado.



Fonte: (Crema, 2012).

O caldo clarificado passa por aquecedores e evaporadores até reduzir o percentual de água tornando-se um xarope viscoso, neste estágio, o percentual de sólidos solúveis ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) do caldo passa de aproximadamente de 15 para 65  $^{\circ}\text{Brix}$ . O xarope segue para a etapa de cozimento, onde será evaporado até 85 a 95  $^{\circ}\text{Brix}$ , obtendo consistência sólida, denominada de massa cozida, que contém sacarose cristalizada ou cristalizável juntamente com o licor-mãe (mel residual). A massa cozida passa por centrífugas, denominadas de turbinas, para a separação dos cristais puros de sacarose do mel. Os cristais são lavados com água fria para reduzir o filme de mel de modo a dar a polarização desejada ao tipo de açúcar a ser produzido. Os cristais de açúcar seguem para o secador para a redução de sua umidade, e após resfriamento são

armazenados em silos, posteriormente são empacotados para distribuição (Crema, 2012). E o subproduto da produção do açúcar é obtido na saída das centrífugas, conhecido como mel final ou melaço.

### **3.4.3 Melaço de cana-de-açúcar**

O melaço é um líquido espesso, de cor marrom e consistência xaroposa, obtido a partir da produção de açúcar. As matérias-primas utilizadas na produção de açúcar podem ser a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) ou a beterraba sacarina (*Beta vulgaris*). Na beterraba a sacarose é extraído da raiz profunda enquanto, na cana-de-açúcar é obtida dos tecidos medulares do tronco (Mordenti *et al.*, 2021).

Quando as usinas são de produção mista elas produzem etanol e açúcar. Então o melaço produzido na fabricação do açúcar é utilizado nas destilarias junto ao caldo de cana como parte do mosto que será fermentado para produzir etanol.

Por ser rico nutricionalmente, conforme a Tabela 3, é utilizado como adjunto na ração animal do gado, de equinos e suínos, melhorando também a palatabilidade das forragens. Pode ser utilizado também como adubo e fertilizante.

Tabela 3 - Composição química do melaço de cana-de-açúcar.

Características	Unidade	Resultado
Acidez total (Ác. Acético)	g/kg	1,3
ART	%	59,16
Amido	mg/kg	1729
Brix refratômetro 20 °C	%	82,92
Cálcio	mg/kg	12156
Cinzas	% m/v	9,8
Cobalto	mg/kg	3,1
Cobre	mg/kg	3,8
Dextrana	mg/kg	<10
Ferro	mg/kg	64
Fósforo total	mg/L	1,14
Frutose	% m/m	7,66
Glicose	% m/m	5,3
Magnésio	mg/kg	4270
Manganês	mg/kg	27,1
pH	-	5,7
Potássio	mg/kg	25470
Proteína	%	0,44
Pureza	%	48,19
Resíduos Insolúveis Gravimétrico	mg/kg	706
Sacarose	% m/m	39,41
Selênio	mg/kg	<0,05
Sódio	mg/kg	118
Sulfito	mg/kg	<10
Umidade	%	18,4
Zinco	mg/kg	6,3

Fonte: (Melaços Brasileiros, 2023).

Por apresentar alto teor de açúcares fermentescíveis, vitaminas e minerais, o melaço se destaca como substrato alternativo no cultivo de vários microrganismos, sendo assim um potencial substituto aos meios de cultivos sintéticos na produção de PHB por via bacteriana.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O melaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), utilizado como fonte de carbono no cultivo da bactéria, foi adquirido em comércio local da cidade de João Pessoa - PB. Neste trabalho, foi denominado melaço de cana comercial (MCC). Sua composição nutricional fornecida no rótulo da embalagem pelo fabricante está descrita na Tabela 4.

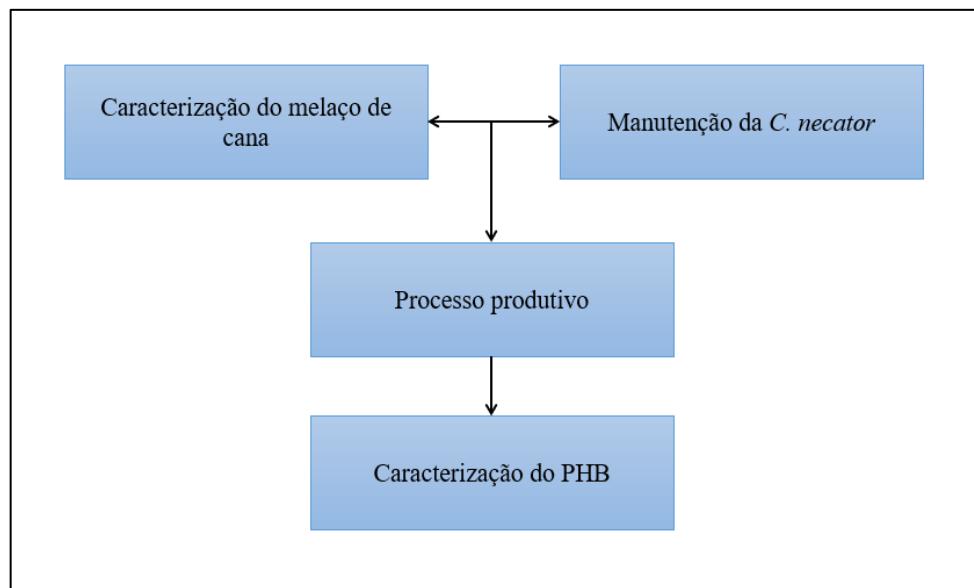
Tabela 4 - Informação nutricional do melaço de cana-de-açúcar.

Quantidade por porção de 5,0 g	
Valor energético	19 Kcal
Carboidratos	5,0 g
Proteínas	0,0 g
Gorduras totais	0,0 g

O PHB comercial poli(3-hidroxibutirato) rotulado neste trabalho como PHB-C e utilizado para medida de comparação com o PHB produzido pela *C. necator* foi fornecido pela PHB Industrial SA de São Paulo, Brasil.

As etapas desenvolvidas durante a pesquisa podem ser visualizadas na Figura 23, e os experimentos estão descritos na sequência.

Figura 23 - Fluxograma com a sequência de procedimentos experimentais.



Fonte: Autoria própria.

## 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO DE CANA

A caracterização físico-química do melaço de cana quanto ao pH, umidade, cinzas, sólidos solúveis (<sup>o</sup>Brix), açúcares redutores - AR e açúcares redutores totais-ART, foi realizada conforme procedimentos descritos a seguir.

### 4.1.1 pH

O pH foi medido por meio de leitura direta em potenciômetro digital de bancada, previamente calibrado com as soluções padrões (4 e 7) à temperatura ambiente.

### 4.1.2 Umidade

Para análise de umidade pesou-se, aproximadamente, 2 g da amostra em cadinhos de alumínio previamente secos e tarados. Os cadinhos foram colocados em estufa a 105 °C por 24 h e em seguida levados para resfriar em dessecador por 15 min. Os cadinhos foram então pesados e utilizou-se a equação abaixo para a medida do teor de umidade (Zenebon *et al.*, 2008).

$$Umidade(%) = \left( \frac{peso\ inicial - peso\ final\ da\ amostra}{peso\ final\ da\ amostra} \right) \times 100 \quad (1)$$

### 4.1.3 Cinzas

Pesou-se, aproximadamente, 2 g de amostra em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados. Os cadinhos foram então levados ao forno mufla a 550 °C por 5 h. Em seguida, os cadinhos contendo as cinzas foram colocados no dessecador para resfriar até a temperatura ambiente. Após o resfriamento os cadinhos foram pesados e o teor de cinzas foi calculado utilizando-se a equação abaixo (Zenebon *et al.*, 2008).

$$Cinzas(%) = \left( \frac{peso\ final\ da\ amostra}{peso\ inicial\ da\ amostra} \right) \times 100 \quad (2)$$

### 4.1.4 Teor de sólidos solúveis (<sup>o</sup>Brix)

Pesou-se 1 g de melaço de cana, foram adicionados 9 mL de água destilada e a amostra foi homogeneizada. Uma alíquota dessa solução foi colocada sobre o prisma do refratômetro

digital de ABBE. O resultado observado foi multiplicado por 10 a fim de corrigir o valor da diluição. (Zenebon *et al.*, 2008).

#### 4.1.5 Teor de Açúcares Redutores (AR)

Os açúcares redutores foram determinados utilizando-se o método do DNS, originalmente proposto por Miller (1959). Este método consiste na redução do ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS) a 3-amino-5-nitrosalicílico, conjuntamente com a oxidação do grupamento aldeído do açúcar ao grupo carboxílico. Após aquecimento a solução torna-se avermelhada sendo identificada no espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 540 nm.

Uma curva padrão foi construída para que a leitura em absorbância pudesse ser convertida em miligramas de açúcar redutor por mililitro de solução. Na construção da curva padrão foram pesados 100 mg (0,1 g) de glicose e dissolvido em 100 mL de água destilada em balão volumétrico. Após homogeneização, transferiu-se 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 e 9 mL da solução-mãe para tubos de ensaio e o volume foi completado para 10 mL com água destilada. Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos tipo vórtex e de cada tubo transferiu-se 0,5 mL da solução a adicionou-se 0,5 mL de DNS. Os tubos foram homogeneizados e aquecidos a 100°C em banho-maria por 5 minutos e então resfriados em banho com água fria por 3 minutos. A cada tubo foram adicionados 4 mL de água destilada, após homogeneizado, a absorbância foi lida a 540 nm. Foi construída a curva de absorbância versus concentração.

Para análise do melaço 1 g da amostra foi dissolvida em 100 mL de água destilada. Em seguida, 1 mL dessa solução foi adicionado a 9 mL de água destilada em um tubo de ensaio e homogeneizado em agitador de tubos vórtex. Transferiu-se 0,5 mL dessa solução diluída para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de solução DNS. Os tubos foram homogeneizados e levados para banho de água fervente por 5 minutos. Após este intervalo, os tubos foram retirados do banho de água quente e colocados em banho de água fria por três minutos, até completo resfriamento. Em cada tubo foi adicionado 4 mL de água destilada e feita à leitura imediatamente em espectrofotômetro a 540 nm.

A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução. Efetuaram-se os cálculos para expressar os resultados em miligramas de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg AR/g amostra).

#### **4.1.6 Teor de Açúcares Redutores Totais (ART)**

A análise de açúcares redutores totais segue o mesmo método do DNS descrito anteriormente, porém existe uma etapa de conversão da sacarose em açúcar redutor.

Para essa análise, 1 g de melaço foi dissolvido em 100 mL de água destilada. Em seguida, 1 mL dessa solução foi adicionado a 9 mL de água destilada em um tubo de ensaio e homogeneizado em agitador de tubos vórtex. Transferiu-se 1 mL dessa solução diluída para tubos de ensaio contendo 1 mL de HCl concentração 2 N. Os tubos foram homogeneizados e levados para banho de água fervente por 5 minutos. Após este intervalo, os tubos foram retirados do banho de água quente e colocados em banho de água fria por 3 minutos, até completo resfriamento. Em cada tubo foi adicionado 2 mL de NaOH concentração 2 N. De cada tubo retirou-se 0,5 mL dessa solução e adicionou-se 0,5 mL de DNS. Os tubos foram homogeneizados e levados para banho de água fervente por 5 minutos. Após este intervalo, os tubos foram retirados do banho de água quente e colocados em banho de água fria por 3 minutos, até completo resfriamento. Em cada tubo foi adicionado 4 mL de água destilada e feita à leitura imediatamente em espectrofotômetro a 540 nm.

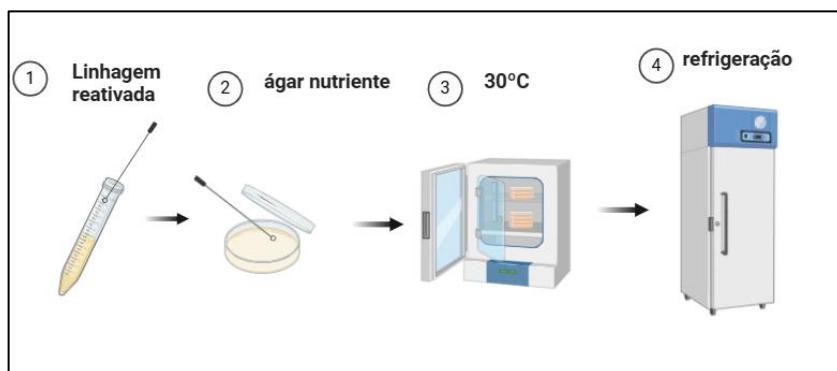
A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de solução. Efetuaram-se os cálculos para expressar os resultados em miligramas de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg AR/g amostra).

#### **4.2 MICRORGANISMO *Cupriavidus necator***

A bactéria utilizada na pesquisa foi a *Cupriavidus necator*, referência CCT 2489, obtida na Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello – FAT localizada em Campinas - SP. A bactéria foi enviada na forma reativada em meio sólido ágar nutritivo (NA) e conservada sob refrigeração.

Para manutenção da linhagem realizaram-se repiques periódicos. O processo de repique consistiu em espalhar, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, o microrganismo em uma placa de petri contendo meio de cultura NA estéril. Essas placas contendo o microrganismo foram incubadas a 30 °C até crescimento e posteriormente armazenadas sob refrigeração, como pode ser visto na Figura 24. A composição do meio de cultura NA está descrita na Tabela 5.

Figura 24 - Repique para manutenção de linhagem.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Composição do meio ágar nutritente.

Componente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Extrato de carne	1,0
Extrato de levedura	2,0
Peptona	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar	15,0

#### 4.3 PROCESSO PRODUTIVO

##### 4.3.1 Estudo das condições de cultivo na síntese do PHB

Para verificar a influência das variáveis: temperatura de cultivo e concentração inicial da fonte de carbono na produção do polihidroxibutirato foi elaborado um planejamento experimental fatorial completo  $2^2$ , sendo então 2 fatores e 2 níveis para cada fator com 3 repetições no ponto central, totalizando 7 experimentos, como mostra a Tabela 7.

Como variável de resposta, foi avaliado o percentual de produção de PHB. Os valores referentes às variáveis independentes estão ilustrados na Tabela 6, onde os níveis codificados estão representados como (-1), (0) e (+1). A escolha das temperaturas de cultivo se deu a partir da temperatura indicada pelo fornecedor da cultura, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, para o repique da *C. necator*. E para a escolha das concentrações iniciais da fonte de carbono no substrato, foram realizados testes preliminares para descobrir as concentrações que não causariam inibição de crescimento pelo substrato.

Tabela 6 - Variáveis de entrada com os níveis reais e codificados utilizados no planejamento experimental

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	30	34	38
Concentração de AR (g.L <sup>-1</sup> )	5	10	15

Os experimentos do planejamento foram realizados em uma incubadora rotacional *shaker* (marca Logen – LS4900 – THZ) com temperatura e rotação controladas. A Tabela 7 representa a matriz do planejamento experimental com as variáveis reais e codificadas.

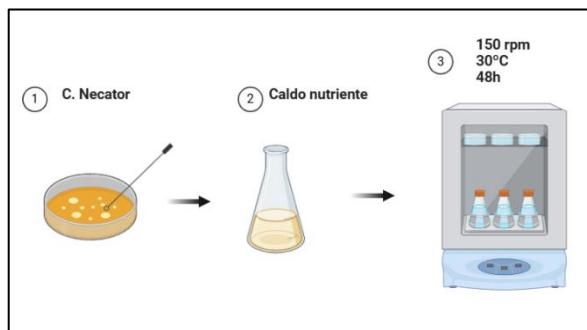
Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2<sup>2</sup> com três repetições no ponto central

Ensaio	Temperatura	Concentração
	(°C)	(g.L <sup>-1</sup> )
1	(-1)30	(-1)5
2	(+1)38	(-1)5
3	(-1)30	(+1)15
4	(+1)38	(+1)15
5	(0)34	(0)10
6	(0)34	(0)10
7	(0)34	(0)10

O pré-inóculo foi preparado utilizando uma câmara de fluxo laminar. Em condições assépticas, transferiram-se células da bactéria *Cupriavidus necator* da placa de Petri, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, para Erlenmeyers de 300 mL contendo 100 mL de meio de cultura caldo nutritivo esterilizado em autoclave vertical por 15 min a 121 °C, conforme Figura 25. O meio está descrito na Tabela 8. Em seguida esse inóculo foi levado à incubadora rotacional *shaker* (marca Logen – LS4900 – THZ) a uma temperatura de 30 °C e 150 rpm de velocidade por aproximadamente 48 h até atingir uma densidade ótica de aproximadamente 1,0 de absorbância. A densidade ótica do pré-inóculo foi verificada, por meio de absorbância, no espectofotômetro (modelo U2M da marca QUIMIS) no comprimento de onda de 600 nm. Uma alíquota do pré-inóculo foi adicionada aos meios de cultivos de forma que os cultivos iniciassem com uma densidade ótica de 0,05 de absorbância a 600 nm, o que equivale a uma concentração

de aproximadamente  $1 \times 10^4$  UFC/mL.

Figura 25 - Preparação do pré-inóculo.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 - Composição do meio caldo nutritente

Componente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Extrato de carne	1,0
Extrato de levedura	2,0
Peptona	5,0
Cloreto de sódio	5,0

Para o crescimento do microrganismo e produção do PHB foi utilizado o meio de cultura proposto por Santa Anna *et al.* (2001) e variou-se a concentração da fonte de carbono, conforme o planejamento experimental.

Em Erlenmeyers com capacidade de 300 mL foram adicionados 200 mL do meio e levados para esterilização em autoclave por 15 min a 121 °C. O meio de cultura utilizado está descrito na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição do meio de cultivo

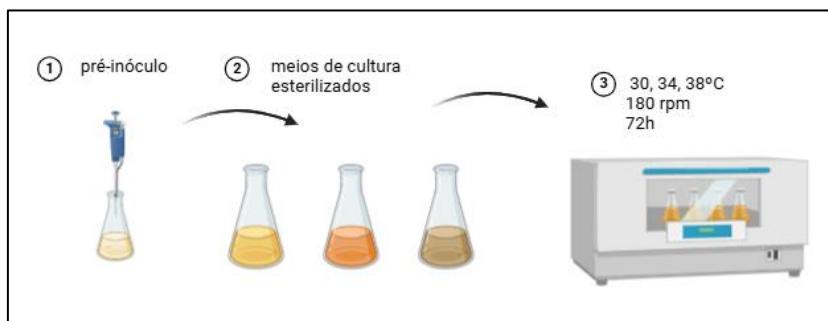
Componente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
Melaço de cana (AR)	variável

A razão carbono/nitrogênio para cada meio de cultivo foi variada de acordo com a equação abaixo:

$$\frac{C}{N} = \frac{\text{concentração de ART no meio de cultivo} \times 6}{\text{concentração de } (NH_4)_2SO_4 \times 2} \quad (3)$$

Os cultivos foram levados à incubadora rotacional *shaker* nas condições de temperatura de acordo com o planejamento da Tabela 7, a 180 rpm por 72 h, conforme Figura 26.

Figura 26 - Cultivo da *Cupriavidus necator*.



Fonte: Autoria própria.

Para avaliar o crescimento celular, foi utilizado o método da turbidimetria. Dessa forma, foram retiradas amostras dos cultivos nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72 h e analisadas as respectivas densidades óticas, por meio da absorbância, no espectrofotômetro a 600 nm. Uma curva de calibração de biomassa foi construída para correlacionar o crescimento medido em absorbância a valores de peso seco. Para isso, foram retiradas 5 amostras, de 2 mL cada, do cultivo ao final das 72 h e centrifugadas a 10000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi seca em estufa a 100 °C por 24 h em microtubos, previamente secos e pesados. Com isso, calculou-se a concentração da biomassa. Do mesmo cultivo, transferiu-se 1 mL para frascos de 5; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 100 mL e o volume foi completado com água destilada. As amostras foram homogeneizadas e analisadas por meio da absorbância, no espectrofotômetro a 600 nm. Relacionou-se a concentração das amostras diluídas com absorbância.

O consumo de substrato foi avaliado pela análise de açúcares redutores – AR pelo método do DNS, proposto por Miller (1959). Foram analisadas amostras nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72h.

Para avaliar a produção de PHB utilizou-se o método de extração proposto por Law e Slepecky (1961).

Ao final do tempo de cultivo, foram retirados 50 mL de alíquotas da cultura microbiana e centrifugadas a 5000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram ressuspensos em 10 mL de hipoclorito de sódio (5% de cloro ativo). As amostras foram homogeneizadas por um agitador de tubos e levadas ao banho-maria à 37 °C por 1 hora. Em seguida, os tubos foram centrifugados e os *pellets* foram lavados com água destilada. Essa mesma etapa foi repetida com os solventes, acetona P.A. e metanol P.A.

Por fim, os *pellets* foram solubilizados em 3 mL de clorofórmio P.A. e vertidos em placas de Petri, previamente pesadas. As placas foram deixadas em repouso, por aproximadamente 24h, até completa evaporação do solvente. Posteriormente as placas contendo o polímero foram pesadas em balança analítica. A concentração de PHB ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) é calculada pela razão entre a massa de PHB produzido pelo volume de cultura utilizado na extração. Já o percentual de PHB (%PHB) é calculado pela razão entre a concentração de PHB ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e a concentração de biomassa no final do cultivo ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) multiplicado por 100.

Figura 27 - a) *Cupriavidus necator*, b) biomassa e c) polihidroxibutirato bacteriano produzido



#### 4.3.2 Determinação dos parâmetros cinéticos e dos coeficientes de rendimento

A partir dos dados coletados durante o cultivo, foram construídas curvas de crescimento da *C. necator* e de consumo de substrato em função do tempo e, por meio delas, se determinaram os parâmetros cinéticos dos cultivos.

A velocidade instantânea de produção de células ( $r_x$ ) e a velocidade instantânea de consumo de substrato ( $r_s$ ) foram obtidas a partir das Equações 4 e 5, por meio das inclinações das curvas de crescimento e de consumo de substrato, respectivamente.

A velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e o tempo de geração ( $t_g$ ) foram calculados por meio das Equações 6 e 7, a partir da linearização das curvas de crescimento da *C. necator*.

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

$$r_S = \frac{dS}{dt} \quad (5)$$

$$\mu_{máx} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{máx}} \quad (7)$$

Onde:

X é a concentração de células

t é o tempo de cultivo

S é a concentração de substrato

Os coeficientes do rendimento são: a produtividade celular ( $P_X$ ), produtividade de produto ( $P_{PHB}$ ), a conversão do substrato em células ( $Y_{X/S}$ ), conversão do substrato em PHB ( $Y_{PHB/S}$ ) e conversão células em PHB ( $Y_{PHB/X}$ ). Foram calculados de acordo com as equações, abaixo:

$$P_X = \frac{(X_f - X_0)}{t} \quad (8)$$

$$P_{PHB} = \frac{(PHB_f - PHB_0)}{t} \quad (9)$$

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (10)$$

$$Y_{PHB/S} = \frac{(PHB_f - PHB_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (11)$$

$$Y_{PHB/X} = \frac{(PHB_f - PHB_0)}{(X_f - X_0)} \quad (12)$$

Nos quais:

$X_f$  = Concentração final da biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$X_0$  = Concentração inicial da biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$S_0$  = Concentração inicial de açúcares redutores no substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$S_f$  = Concentração final de açúcares redutores no substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$\text{PHB}_f$  = Concentração final de PHB ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$\text{PHB}_0$  = Concentração inicial PHB ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$t$  = Tempo (h)

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO PHB

A caracterização do polímero foi realizada com filmes produzidos a partir da biomassa do cultivo da bactéria, aqui denominados de PHB-B. As condições de cultivo foram 30 °C de temperatura, 180 rpm de velocidade e 15  $\text{g.L}^{-1}$  de AR no substrato. A extração do polímero foi feita com adaptação do método proposto por Law & Slepecky (1961).

Para medida de comparação foram produzidos filmes com PHB comercial, aqui denominados de PHB-C, gentilmente fornecido pela PHB *Industrial SA* de São Paulo (Brasil). O polímero comercial foi peneirado com o auxílio de uma peneira de 60 mesh, em seguida, para cada filme foi pesado 75 miligramas do polímero e levados aos tubos de ensaio. Adicionou-se 3 mL de clorofórmio aquecido a 60 °C, em seguida, os tubos foram agitados com o auxílio de um agitador de tubo vórtex até completa solubilização do polímero. As soluções poliméricas foram vertidas em placas de Petri e deixadas em repouso até evaporação do solvente. Os filmes foram então retirados com uma pinça e armazenados para posterior análise. As análises utilizadas na caracterização estão descritas a seguir:

##### 4.4.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

A espectroscopia no infravermelho foi realizada por transmissão, com um Espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier modelo IRTtracer-100, marca Shimadzu, no intervalo de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , com 32 varreduras e 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolução. O equipamento pertencente ao Laboratório de Síntese e Caracterização de Filmes Finos (LABFILM/ UFPB).

#### **4.4.2 Ressonância magnética nuclear – RMN**

A análise de ressonância magnética nuclear foi realizada no Laboratório Multusuário de Caracterização e Análise (LMCA/UFPB) por meio de um espetrômetro de RMN modelo Bruker Ascend 400. As amostras foram suspensas em clorofórmio deuterado de grau espectroquímico ( $\text{CDCl}_3$ ) e os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos a 400 MHz e os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos a 100 MHz. Utilizou-se a escala de deslocamento químico utilizada em partes por milhão (ppm).

#### **4.4.3 Difração de raios X – DRX**

A análise de DRX foi conduzida no Núcleo de Pesquisa e Extensão de Combustíveis e de Materiais (NPE-LACOM/UFPB), em um aparelho modelo Lab X/XRD-6000 da marca SHIMADZU. Os difratogramas foram registrados utilizando-se radiação  $\text{K}\alpha$  do cobre como fonte de radiação monocromática, tensão de 30kV, corrente de 30mA, varreduras no intervalo  $2\Theta$  entre 5 e 70° e velocidade de varredura de 1°/min.

#### **4.4.4 Caracterizações térmicas**

A caracterização térmica foi conduzida em um calorímetro da marca DSC25, TA Instruments, no Laboratório de Síntese e Caracterização de Polímeros (LSCP/UFPB). A massa das amostras foi de  $5,0 \pm 1,0$  mg, sob uma atmosfera de nitrogênio a uma vazão de  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e uma taxa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . O primeiro aquecimento se deu na temperatura de -10 até 200 °C, esta foi mantida por 3 min para eliminar o histórico térmico do material. O resfriamento ocorreu em seguida até -10 °C com taxa de resfriamento de  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . O segundo aquecimento ocorreu em seguida de -10 até 200 °C. No primeiro aquecimento a entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) foi obtida, no resfriamento a temperatura de cristalização ( $T_c$ ). A partir do segundo aquecimento, a temperatura de fusão ( $T_m$ ) e a temperatura de cristalização a frio ( $T_{cc}$ ) foram obtidas. O grau de cristalinidade ( $X_c$ ) foi calculado a partir da equação 13:

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_m - \Delta H_{cc}}{\Delta H_m^0} \times 100 \quad (13)$$

Onde  $X_c$  é o grau de cristalinidade (%);  $\Delta H_m$  é a entalpia de fusão ( $J.g^{-1}$ );  $\Delta H_{cc}$  é a entalpia de cristalização a frio ( $J.g^{-1}$ );  $\Delta H^0_m$  é a entalpia teórica de um PHB 100% cristalino ( $J.g^{-1}$ ), igual a 146  $J.g^{-1}$  (Barham *et al.*, 1984).

A Análise termogravimétrica (TG) foi realizada no Laboratório de Materiais e Química Ambiental (LabMaQ/UFPB). Foi utilizado o calorímetro SDT 650, TA. As amostras foram analisadas em atmosfera de gás nitrogênio, com uma vazão de 100  $mL.\min^{-1}$ . A taxa de aquecimento utilizada foi 10  $^\circ\text{C}.\min^{-1}$  e o aquecimento se deu a partir da temperatura ambiente 25  $^\circ\text{C}$  até 450  $^\circ\text{C}$ , para cada análise foi utilizado 5 mg de amostra em cadiños de alumina.

Para determinar os parâmetros termodinâmicos e ordem de reação a partir dos dados da análise termogravimétrica (TG), utilizou-se os métodos: Coats-Redfern (que utiliza uma abordagem integral que considera a relação linear entre temperatura e taxa de decomposição para calcular a energia de ativação), Horowitz-Metzger (baseado em aproximações de reação de primeira ordem, particularmente útil em condições de decomposição em baixas taxas de aquecimento) e Broido (estimativa de energia de ativação a partir de perda de massa, frequentemente usada para análise de decomposição de materiais poliméricos) (Çanakçı, 2020; González *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 2019).

Com base na análise termogravimétrica (TG) das amostras, onde a geometria da curva fornece informações sobre a estabilidade térmica dos subprodutos e produtos finais do material decomposto e permite a aquisição simultânea de dados físico-químicos da composição em decomposição (Çanakçı, 2020).

Os parâmetros cinéticos são calculados a partir das curvas de decomposição térmica (TG) utilizando um método de análise cinética baseado na equação de Arrhenius (equação 14).

$$\frac{d\alpha}{dT} = K(T)f(\alpha) \quad (14)$$

Onde o termo  $d\alpha/dt$  representa a taxa de reação,  $k(T)$  é a constante de velocidade de reação,  $f(\alpha)$  representa uma função que descreve a reação,  $\alpha$  o grau de conversão,  $T$  a temperatura do processo.

Sendo o grau de conversão  $\alpha$  definido como:

$$\alpha = \frac{W_i - W_f}{W_i - W_t} \quad (15)$$

No qual ( $Wi$ ) representa a massa inicial da amostra, ( $Wf$ ) é a massa final da amostra e ( $Wt$ ) a massa da amostra no decorrer do aquecimento.

A velocidade de reação  $K(T)$  é representada pela equação 16, onde ( $A$ ) é o fator pré-exponencial ( $\text{min}^{-1}$ ), estando relacionado com a frequência de colisão entre as moléculas, e é diretamente proporcional a energia de ativação, ( $Ea$ ) ( $\text{kJ/mol}$ ), ( $T$ ) é a temperatura de pico da reação ( $K$ ) e ( $R$ ) é a constante universal dos gases ( $0,008314 \text{ kJ/mol K}$ ).

$$K(T) = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (16)$$

Substituindo a equação (16) na equação de Arrhenius (14), obtém-se a equação (17).

$$\frac{d\alpha}{dT} = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) f(\alpha) \quad (17)$$

Que para experimentos não isotérmicos conduzidos a taxa de aquecimento constante, onde ( $\beta = \frac{dT}{dt}$ ), a equação da taxa de decomposição pode ser simplificada e rearranjada para a parte direita da equação 18.

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{A}{\beta} \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) f(\alpha) \quad (18)$$

Para a determinação da ( $E_a$ ), baseada no método de Horowitz-Metzger (H-M), no qual seus cálculos não dependem da ordem de reação, a equação reduz a equação 19.

$$\ln\left(\ln\left(\frac{1}{1-\alpha}\right)\right) = \frac{E_a}{RT_p^2} \theta \quad (19)$$

Onde, ( $\theta = T - T_p$ ) é a diferença entre as temperaturas no decorrer do aquecimento e a temperatura de pico e ( $T_p$ ) é a temperatura de pico da reação ( $K$ ).

Para o método de Coats-Redfern (C-R) a equação reduzida é dada pela equação 20.

$$\ln\left(\ln\left(\frac{1}{1-\alpha}\right)/T_p^2\right) = \frac{-E_a}{RT} \quad (20)$$

E para o método de Broido (B), pela equação 21.

$$\ln \left( \ln \left( \frac{1}{1-\alpha} \right) \right) = \frac{-E_a}{RT} \quad (21)$$

Para o cálculo do fator pré-exponencial (A) utiliza-se a equação 22.

$$A = \frac{E_a}{RT_p^2} \beta \exp \left( \frac{E_a}{RT_p} \right) \quad (22)$$

Onde  $\beta$  é a taxa de aquecimento.

Os parâmetros termodinâmicos: entalpia ( $H$ ), entropia ( $S$ ) e energia livre de Gibbs ( $G$ ) para os métodos de (H-M), (C-R) e (B) são calculados a partir das equações (23), (24) e (25), respectivamente.

$$\Delta H = E_a - RT_P \quad (23)$$

$$\Delta S = R * \ln \left( \frac{(A*h)}{(k*T_P)} \right) \quad (24)$$

$$\Delta G = H - T_P S \quad (25)$$

Onde,  $R$  é a constante dos gases ideais,  $k$  é a constante de Boltzmann e  $h$  é a constante de Planck.

#### 4.4.5 Estudo de biodegradação

O teste de biodegradação utilizou uma cultura mista obtida de uma amostra de solo. Para isso, 200 g de terra vegetal, adquirida em comércio local, foi adicionada a 1 L de água destilada autoclavada a 121 °C por 15 min. Após decantação a terra foi filtrada e em frascos Erlenmeyers com capacidade de 500 mL cada, foram adicionados 100 mL do sobrenadante e 200 mL de meio de cultura autoclavado. A composição do meio de cultura está descrita na Tabela 11.

Tabela 10 - Composição do meio de cultura.

Componente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Triptona	10
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	5,0

Amostras de filmes do PHB-B e do PHB-C foram cortadas em forma de quadrado no tamanho 2x2 cm, pesadas e adicionadas aos Erlenmeyers contendo o cultivo e sobrenadante do solo filtrado. Os frascos foram incubados a temperatura ambiente ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e deixados em repouso por 60 dias. A cada 10 dias as amostras eram filtradas e pesadas. Os experimentos foram realizados em triplicata. A degradação foi determinada pelo percentual da perda de massa que é calculada conforme equação 26 (Ansari & Fatma, 2016).

$$\%degradação = \frac{(W_0 - W_t)}{W_0} \times 100 \quad (26)$$

No qual:

$W_0$  é a massa inicial do polímero

$W_t$  é a massa ao longo dos dias do teste

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MELAÇO DE CANA COMERCIAL

A caracterização do melaço de cana comercial (MCC), utilizado como meio de cultura na produção de PHB por fermentação submersa, está apresentadas na Tabela 12. Os dados estão em base úmida.

Tabela 11 - Caracterização do melaço de cana.

Análise	Resultado
pH	$3,32 \pm 0,02$
Umidade	$19,85 \pm 0,21 \%$
Cinzas	$0,50 \pm 0,01 \%$
Sólidos solúveis	$86,67 \pm 0,58 ^\circ\text{Brix}$
Açúcares redutores (AR)	$654,01 \pm 8,11 \text{ mg/mL}$
Açúcares redutores totais (ART)	$921,64 \pm 8,79 \text{ mg/mL}$

A produção de PHB-B por *C. necator* é induzida pela presença de açúcares no meio de cultura. Assim, a caracterização do MCC visa quantificar esses açúcares, que são importantes na síntese desse biopolímero, juntamente com outros nutrientes. O parâmetro pH afeta o processo de fermentação. No presente trabalho, o pH do MCC foi de  $3,32 \pm 0,02$ , enquanto Ribeiro *et al.* (2022) relataram um pH de 5,48 para o melaço coletado diretamente da planta (Mamanguape, Paraíba, Brasil).

Dependendo das condições da cultura, como chuvas, temperatura, e tipo de solo, a cana-de-açúcar pode conter diferentes concentrações, o que pode, em certa medida, influenciar no pH (Ganzeveld *et al.*, 1999; Khok *et al.*, 2019). Para o preparo do meio de cultura, o melaço é diluído em água destilada até uma concentração de açúcares que possa ser assimilada pelo microrganismo sem causar inibição pelo substrato. Com as concentrações utilizadas nesta pesquisa, o pH do melaço, que era 3,32, passou a ser entre 6,57 e 6,88 nos cultivos, próximo ao ideal para o cultivo da *C. necator* que segundo Vu *et al.*, (2022) é 7,0.

A umidade do MCC foi de  $19,85 \pm 0,21 \%$ , considerada ideal para evitar contaminação microbiana e preservar suas características físico-químicas e organolépticas por mais tempo. Os valores de sólidos solúveis foram de  $86,67 ^\circ\text{Brix}$ , consistentes com os valores de açúcares

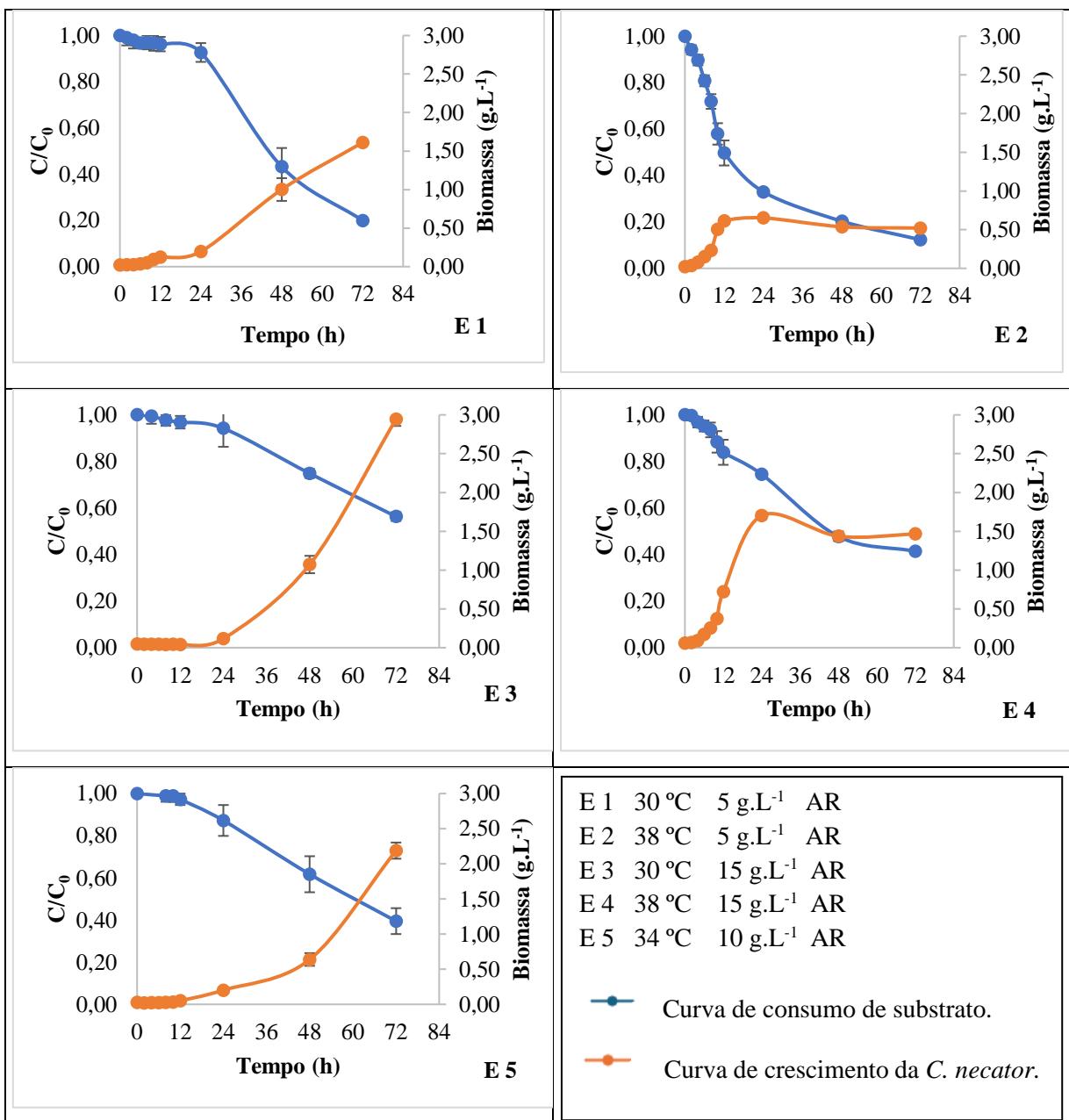
redutores (AR) ( $654,01 \pm 8,11$  mg.mL<sup>-1</sup>) e açúcares redutores totais (ART) ( $921,64 \pm 8,79$  mg.mL<sup>-1</sup>) encontrados no MCC. Os AR são importantes no cultivo de *C. necator* porque servem como fonte de carbono para o crescimento da bactéria e a produção de metabólitos de interesse.

A *C. necator* é um microrganismo que não assimila a sacarose em seus processos metabólicos (Arikawa *et al.*, 2017), e como a diferença entre os ART e os AR é a fração de sacarose contida nos ART, nesta pesquisa foram utilizados os AR como medida de concentração do substrato.

## 5.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DO CONSUMO DE SUBSTRATO

A Figura 28 apresenta as curvas de crescimento da *C. necator* e as curvas de consumo de substrato ao longo das 72h de cultivo para os experimentos de acordo com planejamento experimental. Os experimentos E1 e E2 foram realizados com 5 g.L<sup>-1</sup> de AR no meio de cultivo e foram incubados a 30 °C e 38 °C, respectivamente. Os cultivos E3 e E4 possuíam 15 g.L<sup>-1</sup> de AR inicialmente e foram incubados a 30 °C e 38 °C, respectivamente. O cultivo E5 foi preparado com 10 g.L<sup>-1</sup> de AR e foi incubado a 34 °C.

Figura 28 - Curvas de crescimento da *C. necator* e do consumo de substrato nos cultivos de acordo com o planejamento fatorial. ( $C/C_0$ ) representa a razão entre o valor final do substrato e o valor inicial.



Os parâmetros cinéticos dos cultivos, obtidos a partir das curvas da Figura 28, estão descritos na Tabela 12. As velocidades instantâneas foram calculadas no tempo de 72h.

Tabela 12 - Parâmetros cinéticos dos cultivos.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Concentração</b>	<b><math>r_x</math></b>	<b><math>r_s</math></b>	<b><math>\mu_{máx}</math></b>	<b><math>t_g</math></b>
	(°C)	(g/L)	(g/L.h)	(g/L.h)	(h <sup>-1</sup> )	(h)
1	(-1)30	(-1)5	0,0295	0,0151	0,0596	11,6300
2	(+1)38	(-1)5	-0,0027	0,0043	0,3186	2,1752
3	(-1)30	(+1)15	0,0589	0,0079	0,0912	7,6003
4	(+1)38	(+1)15	-0,0050	0,0069	0,2372	2,9222
5	(0)34	(0)10	0,0414	0,0099	0,0496	13,9747

O microrganismo estudado apresentou um bom desenvolvimento nos cultivos produzidos com melaço como fonte de carbono, obtendo uma maior concentração de biomassa, em especial nos cultivos com a maior concentração de AR e a menor temperatura de incubação, 15 g.L<sup>-1</sup> incubado a 30 °C (E3) e 10 g.L<sup>-1</sup> incubado a 34 °C (E5), conforme pode ser observado na Figura 28. A temperatura desempenha um papel significativo no crescimento e metabolismo bacteriano, influenciando os níveis de oxigênio dissolvido e a eficiência de transferência de massa (Wei *et al.*, 2011).

Conforme mostrado na Figura 28, as culturas incubadas a 38 °C atingiram maiores concentrações de biomassa em 24 horas, sendo elas E2 (5 g.L<sup>-1</sup> AR) e E4 (15 g.L<sup>-1</sup> AR) com 0,652 g.L<sup>-1</sup> e 1,703 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Após esse período, ambas as amostras apresentaram queda de crescimento, o que pode ser verificado, na Tabela 12, a partir do sinal negativo da velocidade instantânea de crescimento  $r_x$  -0,0027 g/L.h para E2 e -0,0050 g/L.h para E4. Essas culturas apresentaram maior velocidade específica de crescimento máxima e menor tempo de geração com  $\mu_{máx}$  0,3186 h<sup>-1</sup> e  $t_g$  2,1752 h para o cultivo E2 e  $\mu_{máx}$  0,2372 h<sup>-1</sup> e  $t_g$  2,9222 para o cultivo E4. A maior concentração de AR no cultivo E4 levou ao dobro da produção de biomassa quando comparada à E2.

As culturas incubadas a 30 °C, E1(5 g.L<sup>-1</sup> AR) e E3 (15 g.L<sup>-1</sup> AR) apresentaram maior concentração de biomassa em 72 horas com valores de 1,611 g.L<sup>-1</sup> e 2,944 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. E1 e E3 não apresentaram fase estacionária de crescimento, sugerindo potencial para maior crescimento com maior período de cultivo, suas velocidades específicas de crescimento máxima e tempos de geração foram  $\mu_{máx}$  0,0596 h<sup>-1</sup> e  $t_g$  11,63 h para o cultivo E1 e  $\mu_{máx}$  0,0912 h<sup>-1</sup> e  $t_g$  7,6003 h para o cultivo E3. Outros autores (Wei *et al.*, 2011; Saeed *et al.*, 2024) também utilizaram 30 °C para a maior produção de PHB. Foi observado que, para

uma mesma temperatura, as culturas com maior concentração de AR (E3 e E4) produziram mais biomassa do que a com menor (E1 e E2).

O cultivo E5 ( $10 \text{ g.L}^{-1}$  AR) incubado a  $34^\circ\text{C}$  também não apresentou fase estacionária de crescimento, produzindo  $2,188 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa, a segunda maior produção quando comparado com os outros cultivos. Sua velocidade específica de crescimento máxima apresentou o menor valor,  $\mu_{máx} 0,0496 \text{ h}^{-1}$ , e consequentemente o tempo de geração foi o maior dentre todos os cultivos, com  $t_g 13,9747 \text{ h}$ .

As culturas com maiores concentrações de AR apresentaram maior consumo de substrato ao longo das 72h de cultivo. Para o cultivo E4, foram consumidos  $7,510 \text{ g.L}^{-1}$  de AR, representando um total de 58,58%, enquanto a concentração de AR permaneceu praticamente estável entre 48 e 72 horas, sua velocidade instantânea de consumo de substrato  $r_s$  foi  $0,0069 \text{ (g/L.h)}$ . No caso do E3,  $5,582 \text{ g.L}^{-1}$  de AR foram consumidos lentamente,  $r_s 0,0079 \text{ (g/L.h)}$ , representando um total de 43,68%. Esta cultura apresentou a maior produção de biomassa.

Os cultivos E1 e E2, com os menores valores iniciais de AR ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ ), apresentaram valores de consumo de substrato de 3,234 e  $3,600 \text{ g.L}^{-1}$ , correspondendo a 80,05% e 87,67%, respectivamente. No cultivo E1, o substrato inicialmente foi consumido de forma lenta e permaneceu praticamente estável nas primeiras 24 horas, em seguida a velocidade de consumo aumenta e em 72h E1 apresenta a maior  $r_s$  com um consumo de  $0,0151 \text{ (g/L.h)}$ . De forma contrária, o E2 apresentou consumo acelerado inicialmente, com aproximadamente 60% do AR consumido em 12 horas, no tempo 72h apresentou a menor  $r_s$  com um consumo de  $0,0043 \text{ (g/L.h)}$ . O cultivo E5 consumiu  $4,687 \text{ g.L}^{-1}$  de AR, reduzindo o substrato em 60,2% e apresentou a segunda maior velocidade de consumo com  $r_s 0,0099 \text{ (g/L.h)}$ .

Comparando cultivos com as mesmas concentrações de substrato, mas temperaturas diferentes, pode-se observar que o aumento deste parâmetro térmico acelera o consumo do substrato inicialmente e no tempo de 72h a velocidade instantânea diminui. E entre todos os cultivos avaliados, o substrato não foi completamente consumido no meio.

### 5.3 DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE RENDIMENTO

A Tabela 13 apresenta os coeficientes de rendimento dos cultivos investigados.

Tabela 13 - Coeficientes de rendimento dos cultivos.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Concentração</b>	<b>P<sub>x</sub></b>	<b>P<sub>PHB</sub></b>	<b>Y<sub>x/s</sub></b>	<b>Y<sub>PHB/s</sub></b>	<b>Y<sub>PHB/x</sub></b>
	(°C)	(g/L)	(g/L.h)	(g/L.h)			
1	(-1)30	(-1)5	0,022	0,0024	0,491	0,0529	0,1077
2	(+1)38	(-1)5	0,007	0,0006	0,135	0,0111	0,0825
3	(-1)30	(+1)15	0,040	0,0134	0,519	0,1727	0,3330
4	(+1)38	(+1)15	0,020	0,0007	0,187	0,0068	0,0362
5	(0)34	(0)10	0,030	0,0061	0,610	0,1250	0,2050

O cultivo E3, produzido com 15 g/L de AR como fonte de carbono e incubado a 30 °C, apresentou os melhores resultados, com produtividade celular de 0,040 g/L.h, produtividade de produto 0,0134 g/L.h, rendimento na conversão de substrato em produto de 0,1727 g<sub>PHB-B/gsubstrato</sub> e na conversão de biomassa em produto de 0,3330 g<sub>PHB-B/gbiomassa</sub>. O cultivo E5, produzido com 10 g/L de AR como fonte de carbono e incubado a 34 °C, obteve o melhor rendimento na conversão de substrato em biomassa com 0,610 g<sub>biomassa/gsubstrato</sub> e quanto aos outros fatores de conversão ele apresentou os melhores resultados após o cultivo E3. A produtividade celular foi de 0,030 g/L.h, a produtividade de produto 0,0061, o rendimento na conversão de substrato em produto de 0,1250 g<sub>PHB-B/gsubstrato</sub> e a conversão de biomassa em produto foi de 0,2050 g<sub>PHB-B/gbiomassa</sub>.

Cavalheiro *et al.* (2009) utilizaram glicerol comercial e glicerol residual como fontes de carbono em uma cultura de *C. necator* DSM 545, e seus rendimentos na conversão de substrato em biomassa foram de 0,37 g<sub>biomassa/gsubstrato</sub> e 0,45 g<sub>biomassa/gsubstrato</sub>, respectivamente. Quanto à conversão de substrato em PHB, seus resultados foram de 0,36 g<sub>PHB/gsubstrato</sub> para a cultura com glicerol comercial e 0,34 g<sub>PHB/gsubstrato</sub> para a cultura com glicerol residual. No presente trabalho, os açúcares redutores no melaço de cana favoreceram o crescimento da biomassa, enquanto Cavalheiro *et al.* (2009) obteve maior produção de PHB com glicerol, este resultado pode ter sido ocasionado pelo uso de outra rota metabólica pelo microrganismo na síntese do PHB.

O cultivo E2, produzido com 5 g/L de AR como fonte de carbono e incubado a 38 °C, apresentou, para as 72 horas de cultivo, as menores produtividades celular e de produto, com 0,007 g/L.h e 0,0006 g/L.h, respectivamente. Em seguida, o cultivo E4, produzido com 15 g/L de AR como fonte de carbono e incubado também a 38 °C, produziu 0,020 g/L.h de biomassa e 0,0007 g/L.h de PHB-B. O cultivo E1, produzido com 5 g/L de AR como fonte de carbono e

incubado a 30 °C, apresentou as terceiras melhores produtividades celular e de produto com 0,022 g/L.h e 0,0024 g/L.h.

#### 5.4 PRODUÇÃO DE PHB

A Tabela 14 mostra os níveis das variáveis reais e codificadas do planejamento fatorial, bem como a resposta da produção de PHB-B.

Tabela 14 - Percentual de polihidroxibutirato produzido nos meios de cultura.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura</b> (°C)	<b>Concentração</b> (g/L)	<b>PHB-B</b> (%)	<b>PHB-B</b> (g.L <sup>-1</sup> )
1	(-1)30	(-1)5	10,982	0,17
2	(+1)38	(-1)5	8,333	0,04
3	(-1)30	(+1)15	35,704	0,96
4	(+1)38	(+1)15	6,071	0,05
5	(0)34	(0)10	20,888	0,43
6	(0)34	(0)10	21,292	0,45
7	(0)34	(0)10	20,426	0,43

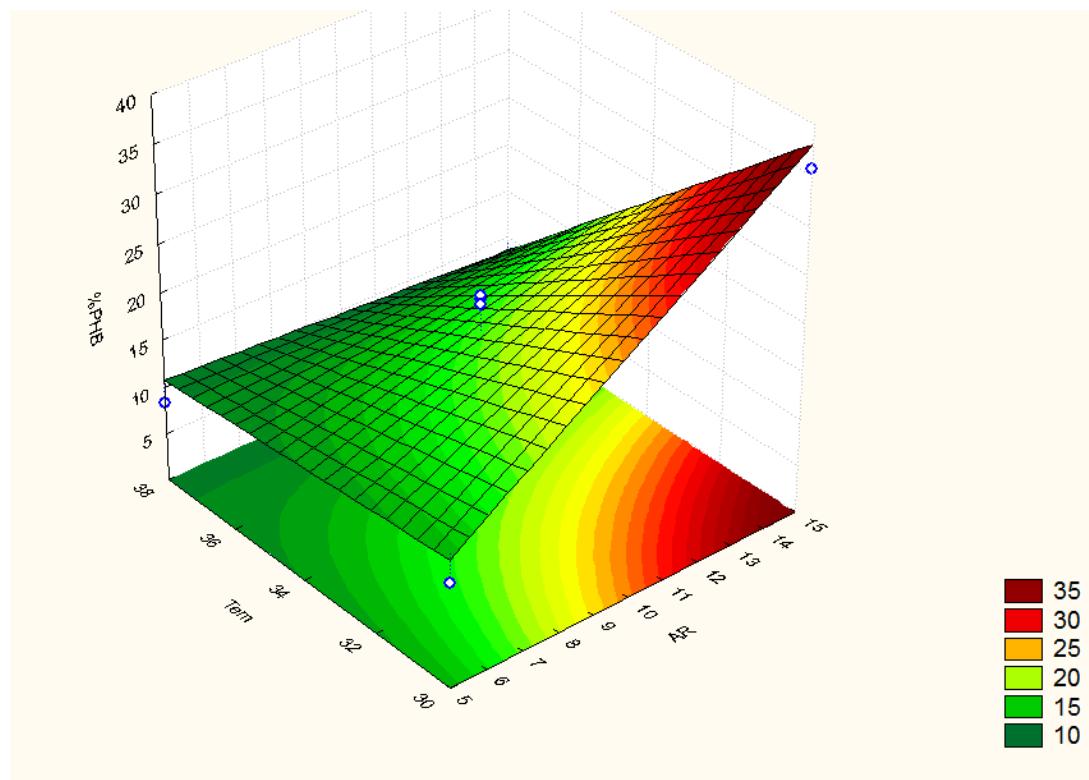
Utilizando os resultados do planejamento fatorial, obteve-se um modelo de regressão não linear com parâmetros estatisticamente significativos a 90% de confiança ( $p < 0,1$ ). Para a análise de variância, aplicou-se o teste F, com razão F calculado F tabelado de 1,94. O modelo é apresentado juntamente com o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

$$\text{PHB} (\%) = 17,66 - 8,05 (\text{T}) + 5,64 (\text{AR}) - 6,77 (\text{AR} \times \text{T})$$

$$R^2 = 91 \%$$

No presente trabalho, 1 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio foi usado como fonte de nitrogênio (N) e baixos níveis de 5, 10 e 15 g.L<sup>-1</sup> de açúcares redutores do MCC foram usados como fonte de carbono (C). Nesta sequência de composições, os valores da razão C/N foram 21,14; 42,28 e 63,41, resultando em produções de PHB-B de 10,98%, 20,87% e 35,70% a 30, 34 e 30 °C, respectivamente, em um período de 72 horas.

Figura 29 - Superfície de resposta do percentual de produção de polihidroxibutirato bacteriano.



A Figura 29 mostra que a produção de PHB-B foi favorecida pelo aumento da concentração de AR do MCC e diminuição da temperatura de fermentação entre 30°C e 38°C. A maior porcentagem de PHB-B produzido (35,70%) ocorreu na temperatura de 30 °C na maior concentração de substrato de 15 g.L<sup>-1</sup> AR o que correspondeu a 3,25 vezes maior que a produção de PHB-B na mesma temperatura de cultivo com concentração de 5 g.L<sup>-1</sup>.

Na condição C/N igual a 63,41 e produção de PHB-B de 35,70%, os resultados são comparáveis aos de Tu *et al.* (2022) que também produziram PHA em escala laboratorial a partir de *C. necator*, utilizando 200 g.L<sup>-1</sup> de glicose como fonte de carbono (C) e 2 g.L<sup>-1</sup> de amônia como fonte de nitrogênio (N). Eles variaram as relações C/N para 22, 44 e 73, com as produções obtidas sendo 35,9, 22,87 e 32,85%, respectivamente a 30 °C em um período de 72h. Notavelmente, a concentração de glicose utilizada por Tu *et al.* (2022) é 13,3 vezes maior que os açúcares redutores utilizados no presente estudo. Assim, a redução de custos no cultivo de *C. necator* utilizando MCC é evidente em comparação ao uso de glicose.

Sen *et al.*, (2019) também produziram PHB a partir de *C. necator* usando glicose, melaço de cana não tratado e melaço pré-tratado por hidrólise ácida para quebrar moléculas de sacarose, convertendo-as em glicose e frutose. Eles obtiveram uma porcentagem de PHB

produzido no cultivo com melaço pré-tratado de 27,30%, correspondendo a 1,68 vezes maior do que com melaço não tratado. Usando melaço de cana-de-açúcar hidrolisado por método enzimático e dissolvido em vinhaça de cana-de-açúcar, Dalsasso *et al.* (2019) obtiveram 56% de acúmulo de PHB na cultura de *C. necator* DSM 545 pela conversão de sacarose em glicose e frutose. Uma razão para seus resultados mais favoráveis do que os obtidos no presente trabalho foi porque eles usaram o método batelada alimentada, fornecendo dois pulsos a mais de melaço para não limitar a concentração da fonte de carbono no meio de cultura.

Outros autores trabalharam em condições de cultivo semelhantes às adotadas no presente estudo, mas com maiores concentrações de substrato e diferentes espécies bacterianas. Chaijamrus e Udpuy (2008) utilizaram *B. megaterium* e melaço fornecido pela indústria da cana-de-açúcar a 4% (v/v). Após pré-tratamento com carvão ativado, obtiveram acúmulo de PHB em torno de 33%. Suryawanshi *et al.*, (2020) obtiveram produção de PHB na faixa de 16,90 a 59,30%, utilizando teores de melaço de (10 - 40 g.L<sup>-1</sup>) com o *Bacillus cereus* 2156. El-Sheekh *et al.* (2015) utilizaram 30 g.L<sup>-1</sup> de melaço e *Bacillus flexus* ME-77, obtendo 35,2% de PHB que aumentou para 51% ao adicionar sais ao meio de cultura. Khok *et al.* (2019) realizaram hidrólise ácida hidrotérmica de melaço (1%) em um forno e obtiveram um acúmulo de PHB de 27,30% do *C. necator*. Jo *et al.* (2021) obtiveram uma produção de 29,1% de P(3HB-co-LA) a partir de melaço de cana-de-açúcar pré-tratado com carvão ativado e a *Ralstonia eutropha* recombinada com o gene *sacC* de *Mannheimia succiniciproducens* que codifica a β-frutofuranosidase e também recombinada com o gene *ldhA* de *Escherichia coli* que codifica a lactato desidrogenase. No presente estudo, 35,70% de PHB-B foi produzido usando 15 g.L<sup>-1</sup> de AR, sugerindo que o MCC é um substrato adequado para *C. necator*.

Em relação a outros tipos de substratos de baixo custo, Valdez-Calderón *et al.* (2022) investigaram cinco substratos diferentes baseados em resíduos de casca de frutas com a cepa *Klebsiella pneumoniae*, resultando em acúmulo de PHB na faixa de 26,40 a 32,90%. Pabitra *et al.* (2015) obtiveram produção de PHB de 33% a partir de *Bacillus sp.* CS-605 usando vários substratos como fonte de carbono. Zanfonato *et al.* (2018) alcançaram 26% de produção de PHB usando vinhaça de cana-de-açúcar e *C. necator*, atribuindo esse baixo valor ao teor limitado de carbono na vinhaça, sugerindo que ela deve ser usada em combinação com outra fonte de carbono para aumentar a biomassa. Martínez-Herrera *et al.* (2021) avaliaram a produção de PHB utilizando folhas de *Agave durangensis* (2% v/v) e *Bacillus cereus* 4N com o melhor resultado de 39,99% obtido após pré-tratamento ultrassônico por 30 min e 37,27% após pré-tratamento térmico. O tratamento prévio das folhas foi necessário para obtenção deste

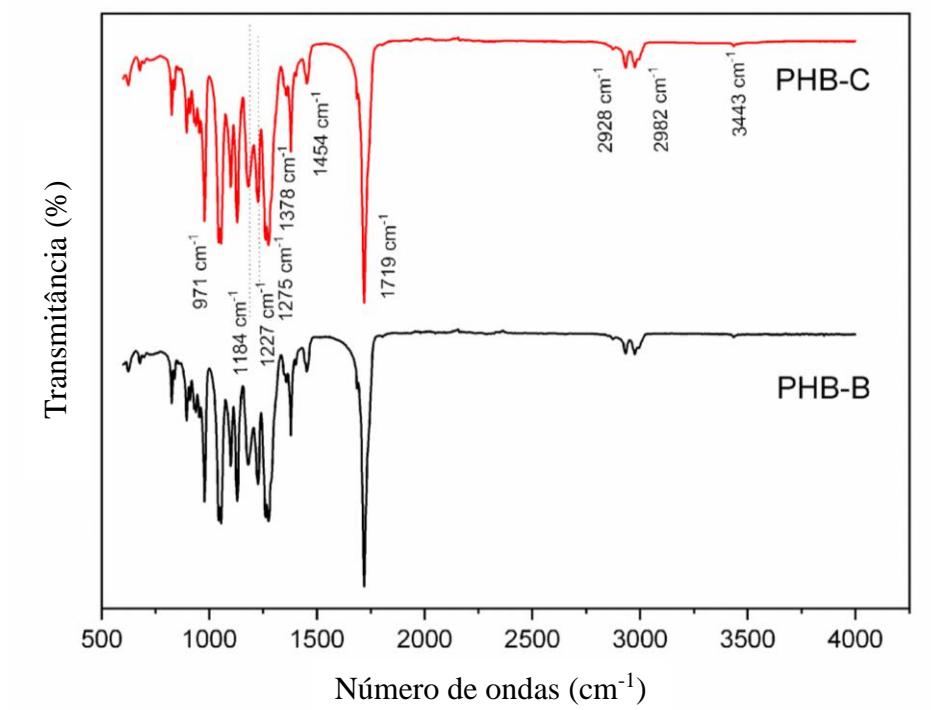
biopolímero. *C. necator* foi menos efetivo na produção de PHB utilizando resíduos de casca de mandioca pré-tratados pelo processo de hidrólise ácida (Vega-Castro *et al.*, 2021) com rendimentos ligeiramente inferiores aos obtidos para PHB-B.

No presente estudo, o PHB-B foi produzido de forma mais econômica e menos poluente, utilizando melaço comercial sem a necessidade de tratamentos prévios, como carvão ativado (Jo *et al.*, 2021) ou por hidrólise ácida (Khok *et al.*, 2019).

## 5.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR

A espectroscopia de infravermelho foi realizada para verificar os grupos funcionais presentes no PHB-B e PHB-C, confirmando que o PHB-B produzido é um biopolímero baseado em PHA. Os espectros de FTIR são mostrados na Figura 30. Pode-se observar que as bandas dos dois biopolímeros compartilham os mesmos comprimentos de onda, indicando que PHB-B e PHB-C são o mesmo material. As bandas posicionadas em 1227 e 1275 cm<sup>-1</sup> são sensíveis à cristalinidade, enquanto a banda em 1184 cm<sup>-1</sup> caracteriza a fase amorfa (Lambeek *et al.*, 1995). Essas bandas são visíveis na Figura 30, sugerindo que os biopolímeros consistem em estruturas cristalinas e amorfas, correspondendo à vibração de alongamento C-O-C assimétrica (Vega-Castro *et al.*, 2021; Ansari e Fatma, 2016). A banda em 1452 cm<sup>-1</sup> corresponde à deformação assimétrica da ligação CH<sub>2</sub> (Vega-Castro *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2007), enquanto a banda em 1376 cm<sup>-1</sup> corresponde à deformação assimétrica do grupo CH<sub>3</sub> (Valdez-Calderón *et al.*, 2022).

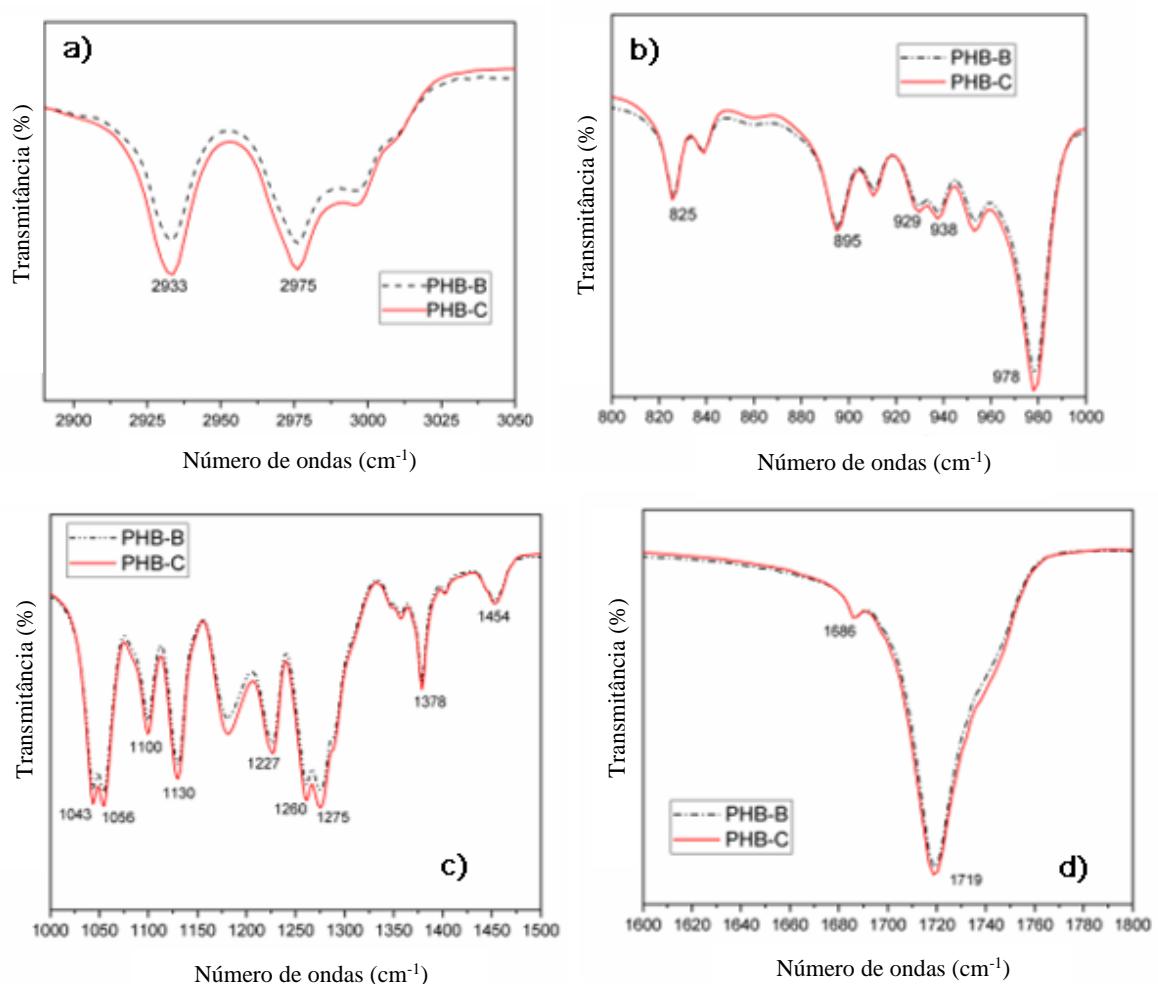
Figura 30 - Espectros no infravermelho por transformada de Fourier de polihidroxibutirato bacteriano e polihidroxibutirato comercial.



A banda de absorção em  $1723\text{ cm}^{-1}$  é considerada a mais intensa e nítida observada no espectro do PHB, correspondendo ao estiramento C=O do grupo éster e associada às vibrações de estiramento dos grupos carbonila cristalinos (Chen *et al.*, 2005). A vibração carbonila (C=O) da fase amorfa do PHB ocorreu em  $1740\text{ cm}^{-1}$  sendo representada por um pico largo ligado à banda cristalina em  $1723\text{ cm}^{-1}$  (Lambeek *et al.*, 1995). A banda em  $2933\text{ cm}^{-1}$  corresponde às vibrações de estiramento C-H dos grupos metil ( $\text{CH}_3$ ) e metíleno ( $\text{CH}_2$ ) (Susithra *et al.*, 2021), enquanto a banda em  $2975\text{ cm}^{-1}$  se refere ao metíleno ligado ao oxigênio alifático -CH (Updegraff, 1971). Zhang *et al.* (2005) observaram que essas bandas aumentaram gradualmente com o desenvolvimento da cristalinidade do PHB. A banda em  $3443\text{ cm}^{-1}$  indica estiramento -OH (Susithra *et al.*, 2021; Mohapatra *et al.*, 2017). Geralmente, os biopolímeros apresentam vibrações de estiramento C-C entre  $1000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ , com algumas bandas nessa faixa associadas à cristalinidade (Conti *et al.*, 2006). Na região de  $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ , as vibrações estão associadas às ligações C-O-C e C-O do tipo grupo éster presente nos biopolímeros (Valdez-Calderón *et al.*, 2022; Susithra *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2024). A análise espectroscópica FTIR identifica, portanto, a estrutura química do PHB-B como um homopolímero PHA, com um espectro coincidente com o do PHB comercial.

Um estudo mais detalhado dos espectros infravermelhos para avaliar os estados cristalinos e amorfos do PHB-B e PHB-C é proposto no presente trabalho. Isso se deve à presença de interações intermoleculares e conformações específicas que podem existir em apenas uma das fases, seja a fase cristalina ou amorfica (Conti *et al.*, 2006). A Figura 31a mostra o espectro FTIR do PHB-B e PHB-C na região ( $3050$ – $2900\text{ cm}^{-1}$ ), mostrando as bandas  $2933$  e  $2975\text{ cm}^{-1}$ . Zhang *et al.* (2005) sugerem que essas bandas fornecem evidências do desenvolvimento da estrutura cristalina do PHB; maiores intensidades das bandas  $2933$  e  $2975\text{ cm}^{-1}$  indicam um material mais cristalino. Portanto, sugere-se que o PHB-C é mais cristalino que o PHB-B.

Figura 31 – Espectros no infravermelho por transformada de Fourier de polihidroxibutirato bacteriano e polihidroxibutirato comercial em regiões selecionadas: a)  $3050$ – $2900\text{ cm}^{-1}$ , b)  $1000$ – $800\text{ cm}^{-1}$ , c)  $1500$ – $1000\text{ cm}^{-1}$  e d)  $1800$ – $1600\text{ cm}^{-1}$ .



Parte da unidade repetitiva do PHB é semelhante à do polipropileno, como confirmado pelas bandas que representam as formas helicoidais do polipropileno isostático na região de vibrações de estiramento C-C (1000-800 cm<sup>-1</sup>). A similaridade molecular entre PHB e polipropileno garante que suas características mecânicas sejam compatíveis em diversas aplicações. Segundo alguns autores (Conti *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005), na região (1000-800 cm<sup>-1</sup>), as bandas cristalinas características do P(3HB) foram cinco (978, 938, 929, 896 e 825 cm<sup>-1</sup>) correspondendo à formação da estrutura de hélice 2<sub>1</sub>. Neste estudo, essas bandas também são observadas nos espectros de PHB-B e PHB-C nesta região, conforme mostrado na Figura 31b. As bandas para PHB-C são mais intensas do que aquelas para PHB-B, indicando uma estrutura mais cristalina para o biopolímero comercial.

Outras bandas no espectro FTIR representam a conformação da cadeia do polímero e estão localizadas na região de 1500-1000 cm<sup>-1</sup>, o que é indicativo de alongamento C-O-C. De acordo com a literatura (Padermshoke *et al.*, 2005; Bloembergen *et al.*, 1986), a estrutura aleatória é representada por bandas em 1302 e 1257 cm<sup>-1</sup>, no entanto, estas não são identificadas nos espectros PHB-B e PHB-C, como visto na Figura 31c.

Além disso, quatro bandas indicativas são observadas em 1289, 1279, 1263 e 1228 cm<sup>-1</sup>, refletindo a estrutura da hélice, enquanto bandas menos proeminentes em 1134, 1102 e 1060 cm<sup>-1</sup> também demonstraram sensibilidade à cristalinidade. A Figura 31c mostra bandas em 1275, 1260, 1227, 1130, 1100 e 1056 cm<sup>-1</sup>, indicando a estrutura cristalina do PHB-B e PHB-C. Essas bandas são mais intensas para o PHB-C, sugerindo que ele tem um grau maior de cristalinidade do que o PHB bacteriano.

O espectro apresentado na região 1800-1600 cm<sup>-1</sup> mostra o estado cristalino bem ordenado representado em 1719 cm<sup>-1</sup>. A banda em 1686 cm<sup>-1</sup> indica uma estrutura com cristais defeituosos devido às interações entre o grupo OH final e o grupo C=O do biopolímero, conforme descrito por Conti *et al.* (2006). A Figura 31d apresenta a banda em 1719 cm<sup>-1</sup>, ligeiramente mais intensa para PHB-C, sugerindo que é mais cristalino que PHB-B. Nos espectros de PHB-B e PHB-C, não são observadas diferenças nas bandas de 1686 cm<sup>-1</sup>.

## 5.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR-RMN

Na análise de RMN, ambos os espectros do PHB-B e do PHB-C coincidem entre si, indicando que correspondem ao mesmo material. Pode-se observar os espectros de <sup>1</sup>H o PHB-C e do PHB-B nas Figuras 32 e 33, respectivamente. Nesses espectros, foram detectados três

sinais: um doubleto no deslocamento químicos de  $\delta = 1,28$  ppm corresponde a um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) acoplado a um próton, um multiplet em  $\delta = 2,50$  ppm devido a um grupo metíleno ( $\text{CH}_2$ ) adjacente a um átomo de carbono assimétrico contendo um único próton, outro multiplet em  $\delta = 5,26$  ppm atribuído ao próton próximo ao oxigênio carboxílico (CH) (El-Sheekh *et al.*, 2015; Pagliano *et al.*, 2020). Um outro sinal é observado no deslocamento em  $\delta = 7,28$  ppm atribuído ao solvente clorofórmio (Shalin *et al.*, 2014).

Figura 32 – Espectro de ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$  do polihidroxibutirato comercial.

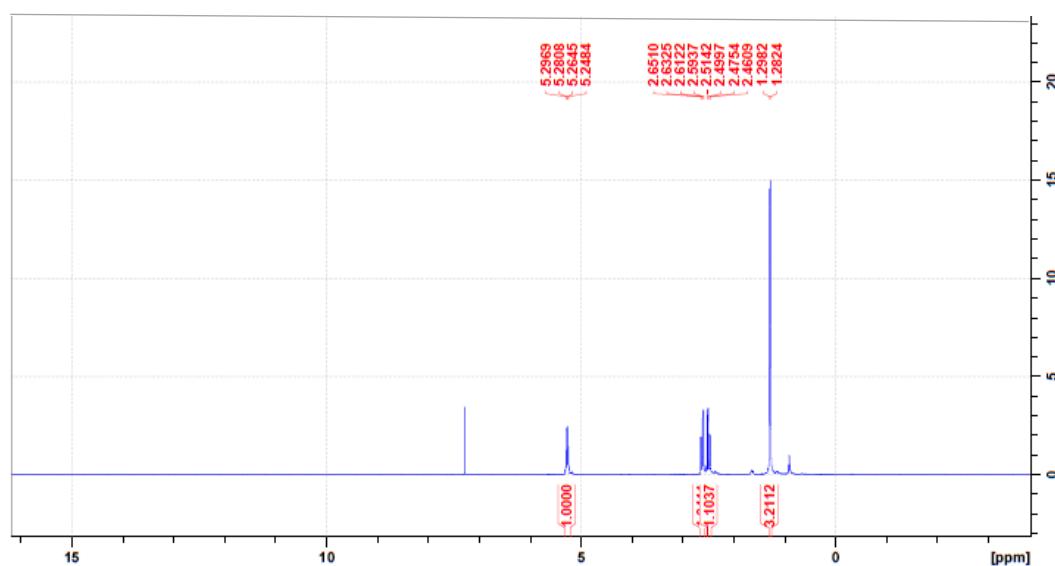
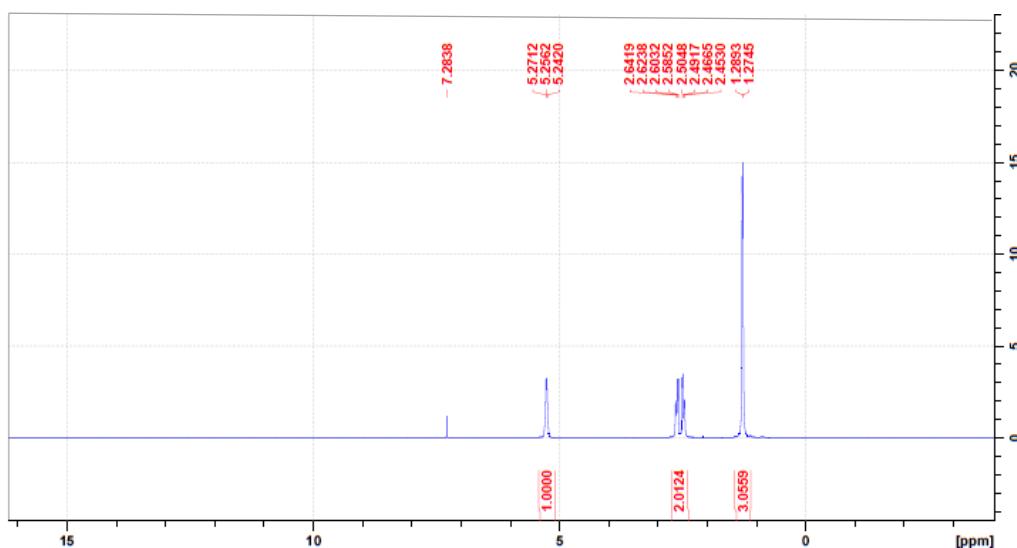


Figura 33 - Espectro de ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$  do polihidroxibutirato bacteriano.



Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  do PHB-C e do PHB-B podem ser observados nas Figuras 34 e 35. Quatro sinais são detectados nesses espectros. No deslocamento de  $\delta = 19,7$  ppm, o sinal foi atribuído à presença do grupo metil ( $\text{CH}_3$ ). O grupo metíleno ( $\text{CH}_2$ ) foi observado em  $\delta = 40,7$  ppm, em  $\delta = 67,6$  ppm o sinal indica a presença de carbono metínico ( $\text{CH}$ ) que está ligado diretamente ao átomo de oxigênio do grupo éster e à cadeia principal. O pico no deslocamento  $\delta = 169,88$  ppm indica a presença do grupo carbonila ( $\text{C=O}$ ) (Saravanan *et al.*, 2023; Pagliano *et al.*, 2020; Susithra *et al.*, 2021). Já o solvente nesse espectro se apresenta como um pico no deslocamento  $\delta = 77$  ppm.

Figura 34 - Espectro de ressonância magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  do polihidroxibutirato comercial.

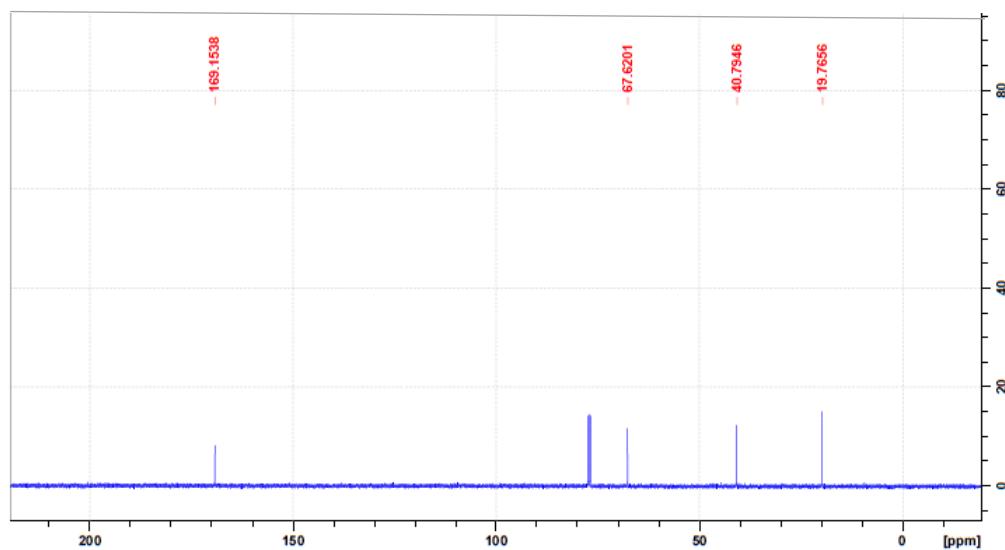
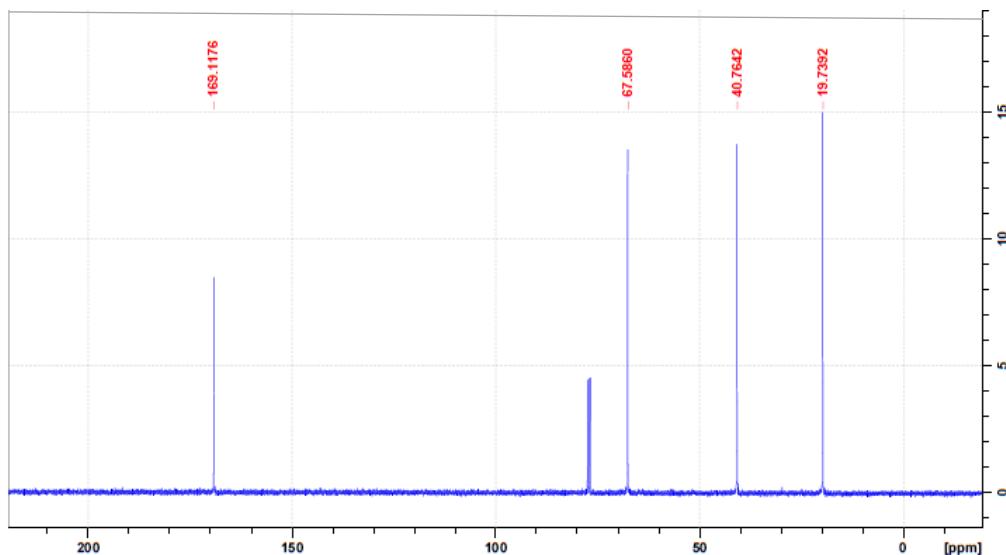


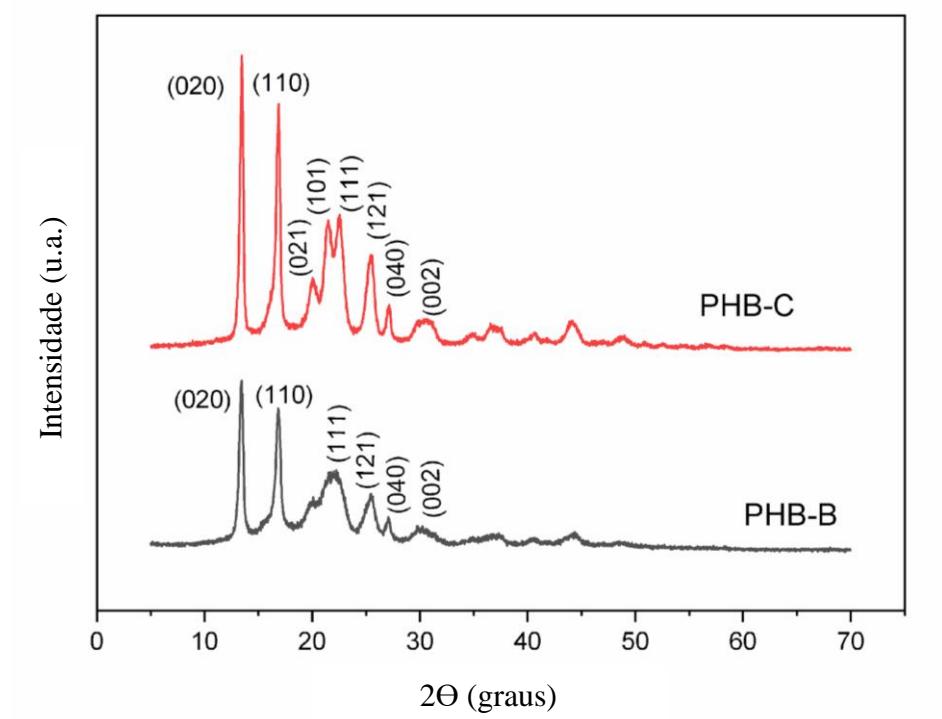
Figura 35 - Espectro de ressonância magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  do polihidroxibutirato bacteriano.



## 5.8 DIFRAÇÃO DE RAIOS X - DRX

As estruturas cristalinas do PHB-B e PHB-C foram avaliadas por difração de raios X em amplo ângulo (WAXD). A Figura 36 mostra os picos de difração correspondentes aos planos associados à estrutura cristalina desses materiais. Os padrões de difração de ambos os polímeros foram comparados com aqueles obtidos por Xie *et al.* (2008) e Chen *et al.* (2005) com localizações  $2\theta$  idênticas para PHB-B e PHB-C aproximadamente  $13,5^\circ$ ,  $16,9^\circ$ ,  $20,1^\circ$ ,  $21,5^\circ$ ,  $22,6^\circ$ ,  $25,5^\circ$ ,  $27,2^\circ$  e  $30,5^\circ$ . Os padrões de difração do PHB-C se alinham mais de perto com Xie *et al.* (2008) e Chen *et al.* (2005), que avaliaram um PHB comercial. Mohapatra *et al.* (2017) investigaram PHB bacteriano com padrões de difração semelhantes aos do PHB-B.

Figura 36 - Difratogramas de polihidroxibutirato bacteriano e polihidroxibutirato comercial



A partir dos difratogramas, os picos de difração do PHB-B parecem mais irregulares do que os do PHB-C. Além disso, o PHB-B não apresentou os padrões de difração (021) e (101) observados para o PHB-C, apresentando apenas um pico amplo em  $22,2^\circ$  correspondente à difração em (111). A ausência de picos de PHB bacteriano pode indicar diminuição em seu grau de cristalinidade (Chen *et al.*, 2005).

Para o PHB-B, observa-se uma diminuição nas intensidades dos picos em  $2\theta$  igual a  $13,5^\circ$  e  $16,9^\circ$  correspondentes aos planos cristalinos (020) e (110), quando comparado ao PHB

comercial. Segundo Wang *et al.* (2008), isso indica uma redução nos tamanhos dos cristais. Bhagowati *et al.* (2015) revelaram que a intensidade do pico de difração está relacionada ao empacotamento da estrutura cristalina. Com base nesses estudos, a estrutura cristalina do PHB-B é afetada por apresentar coalescência, alargamento e uma diminuição na intensidade do pico em comparação ao PHB-C.

## 5.9 ANÁLISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL-DSC

Neste trabalho, o PHB-C foi armazenado em temperatura ambiente em torno de 5 anos, enquanto o PHB-B foi produzido recentemente. As propriedades térmicas desses biopolímeros são representadas nos termogramas de DSC mostrados na Figura 37. Para eliminar o histórico térmico dos filmes, as temperaturas de transição foram determinadas no segundo aquecimento.

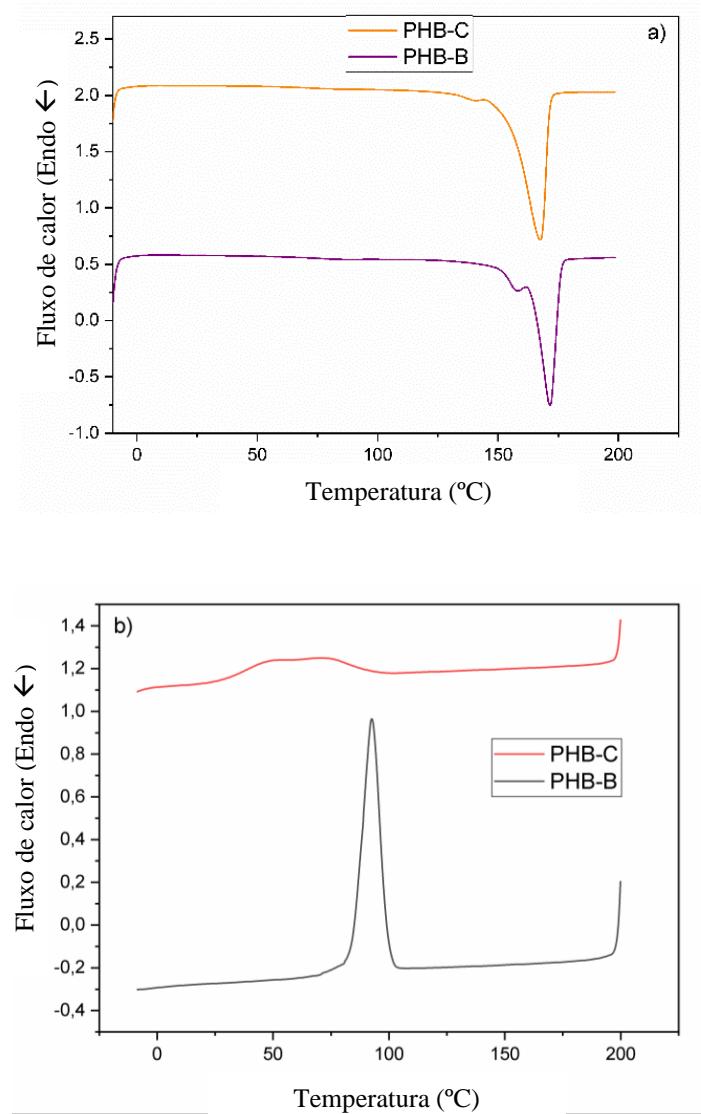
O efeito do processo de fusão na cristalinidade das amostras foi avaliado com base nas entalpias de fusão determinadas no primeiro aquecimento. Para ambos os biopolímeros, as temperaturas de transição vítreia ( $T_g$ ) não são observadas. O grau de cristalinidade ( $X_c$ ) do PHB-C foi de 62,01% e está de acordo com (González-Rojo *et al.*, 2024), enquanto para o PHB-B foi de 51,71%, em concordância com Horng *et al.* (2011), Conti *et al.* (2006). Bhagowati *et al.*, (2015) investigam PHB produzido por maltose e *Bacillus cereus* SE-1 com grau de cristalinidade de 44,23% quando misturado com um amido termoplástico (TS). Hernandez-Núñez, *et al.*, (2019) obtiveram 39,3% para o PHB bacteriano produzido.

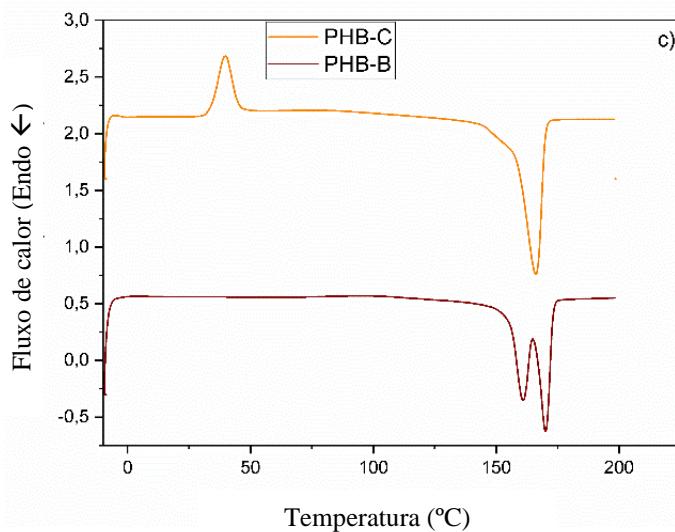
A diferença de cristalinidade entre PHB-C e PHB-B pode ser devido à diminuição da estabilidade térmica do PHB-C, resultando em cadeias de baixo peso molecular devido a degradação do PHB-C em acordo com Yeo *et al.* (2010). As cadeias de peso molecular mais baixo podem ter servido como núcleos para a cristalização do PHB-C, que aumentou a sua cristalinidade em relação ao PHB-B. Isto porque a cristalização do PHB é sensível a ação de núcleos e ao crescimento de esferulitas (Di Lorenzo *et al.*, 2006).

PHB-B mostra um pico de cristalização após o resfriamento ( $T_{cc}$ ) em torno de 92,64 °C em acordo com Hong *et al.* (2011), enquanto PHB-C tem um pico amplo em 61,53 °C (Figura 37b). Uma taxa de cristalização mais lenta pode ser sugerida para PHB-C, onde o tempo foi insuficiente para a formação de cristais durante o resfriamento. De fato, Vahabi *et al.* (2019) sugeriram que se não houver cristalização durante o segundo aquecimento ( $T_{cc}$ ), então ela ocorreu durante o resfriamento. Hong *et al.* (2008) encontraram um pico em torno de 40,05 °C para o PHB armazenado a temperatura ambiente, o qual foi muito próximo ao valor de 39,93

°C encontrado para o PHB-C (Figura 37c). O PHB-B não apresenta Tcc, o que indica que a formação de seus cristais ocorreu durante o processo de resfriamento.

Figura 37 - Termogramas de calorimetria de varredura diferencial do polihidroxibutirato bacteriano e polihidroxibutirato comercial: a) primeira varredura de aquecimento; b) resfriamento; c) segunda varredura de aquecimento.





O PHB-B apresenta picos de fusão duplos ( $T_m$ ) em 160,79 e 170,05 °C (Figura 37c). O pico em 160,79 °C corresponde à fusão parcial de cristais menores e imperfeitos, ou seja, estes apresentaram espessura lamelar mais fina e menor grau de ordem. Esses cristais também podem atuar como núcleos para o processo de recristalização, o que proporciona moléculas mais rearranjadas, formando cristais maiores e mais estáveis. O pico de 170,05 °C está relacionado a cristais perfeitos desenvolvidos a partir do processo de recristalização (Suttiwijitpukdee *et al.*, 2011; Pearce & Marchessault, 1994).

Além disso, o PHB-C apresentou apenas um valor de  $T_m$  a 166,09 °C, sugerindo que a cristalização a frio favoreceu a homogeneidade de seus cristais. Essa consideração é baseada em estudos de (Santos *et al.*, 2019) que observaram para o PHB Biocycle® um pico de fusão duplo a 160 e 172 °C e nenhum pico de cristalização a frio. Os valores de  $T_m$  do PHB-B e do PHB-C são semelhantes aos exibidos por Mai *et al.* (2023), Soni *et al.* (2023) e González-Rojo *et al.* (2024). A temperatura de fusão é um parâmetro térmico que assinala a dificuldade do processo de biodegradação de um plástico, quanto maior o valor de  $T_m$  mais difícil para ela acontecer (Tokiwa *et al.*, 2009). Portanto, duas respostas térmicas diferentes são identificadas para o PHB-B e PHB-C. Os valores dos parâmetros da análise térmica podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15 - Parâmetros da análise térmica por calorimetria de varredura diferencial.

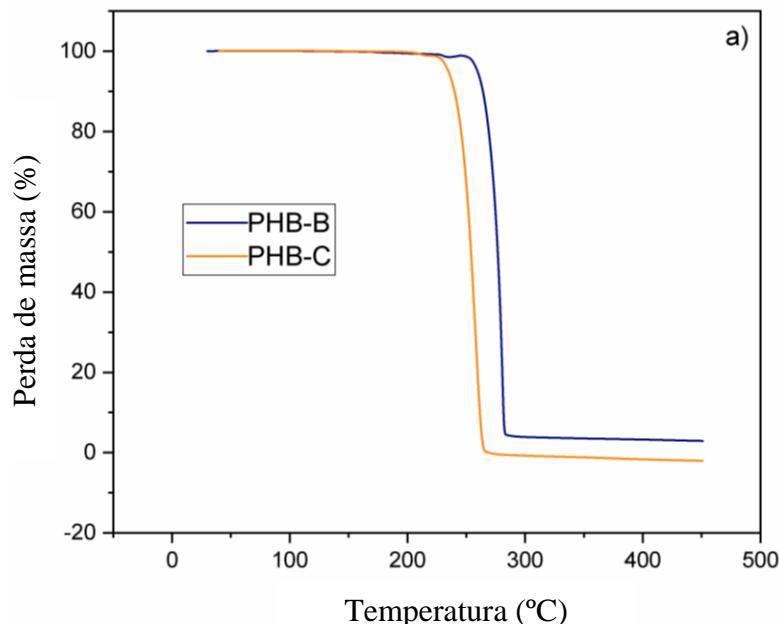
<b>Amostra</b>	<b>Tc (°C)</b>	<b>Tcc (°C)</b>	<b>Tm<sub>1</sub> (°C)</b>	<b>Tm<sub>2</sub> (°C)</b>	<b>ΔHm(J/g)</b>	<b>X<sub>c</sub>(%)</b>
PHB-B	92,64	----	160,79	170,05	75,45	51,71
PHB-C	61,53	39,93	166,09	---	90,54	62,01

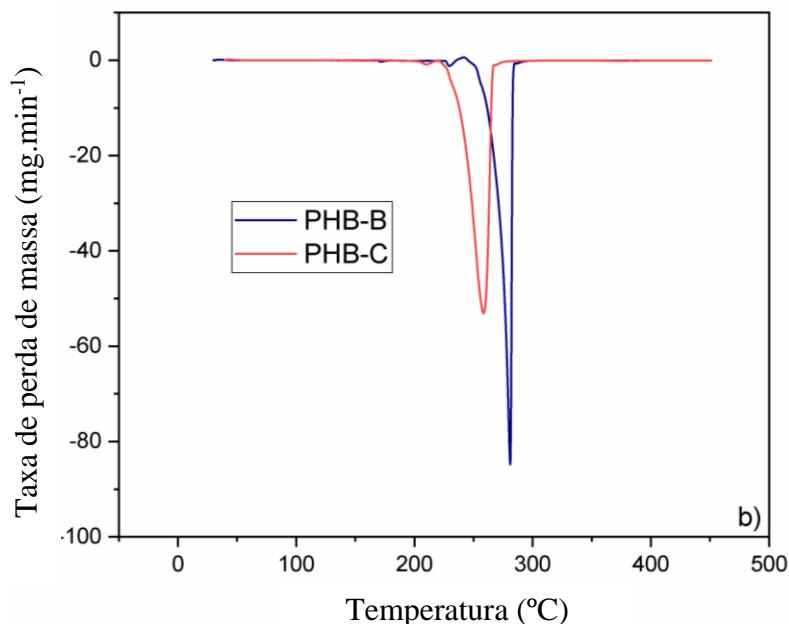
Tc é a temperatura de cristalização, Tcc temperatura de cristalização a frio, Tm<sub>1</sub> temperatura de fusão do primeiro pico, Tm<sub>2</sub> temperatura de fusão do segundo pico, ΔHm entalpia de fusão e X<sub>c</sub> é o grau de cristalinidade.

### 5.10 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA - TG

Pode ser observado na Figura 38 as curvas de perda de massa (TG) e da taxa de perda de massa (DTG) plotadas como uma função de temperatura para o PHB-B e PHB-C sob atmosfera de nitrogênio. A decomposição térmica foi avaliada a partir da temperatura de início (Tonset), temperatura a 20% de perda de massa (T20), temperatura de taxa máxima de decomposição (Tmax) mostrados na Tabela 16.

Figura 38 - Análise termogravimétrica do polihidroxibutirato bacteriano e polihidroxibutirato comercial: a) análise termogravimétrica e b) análise termogravimétrica diferencial.





Apenas uma perda de peso principal foi observada, que para o PHB-B foi 262-283 °C e para o PHB-C no intervalo de 233-266 °C. Conforme estabelecido na literatura, a decomposição térmica do PHB se dá em uma etapa por cisão das ligações ésteres em cadeia aleatória, a partir da clivagem térmica das ligações C=O e C-O (Herrera-Kao *et al.*, 2018; Hablot *et al.*, 2008). A partir de 301 e 276 °C o PHB-B e o PHB-C foram completamente degradados, respectivamente. Nessa fase, as cadeias do PHB são eliminadas facilitando a formação do ácido crôtonico, voláteis diméricos, triméricos e tetramétricos, CO<sub>2</sub>, acetaldeído, cetena (Kervran *et al.*, 2022; Xiang *et al.*, 2016; Yeo *et al.*, 2010; Aoyagi *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2005). A curva DTG (Figura 38b) mostra apenas uma única taxa de perda de massa a 279,92 °C para o PHB-B e 258,66 °C para o PHB-C. Hong *et al.* (2008) avaliaram os efeitos de impurezas e produtos químicos enxertados em PHB em seus comportamentos de cristalização e degradação térmica, indicando a melhoria da estabilidade térmica do biopolímero a partir dos aumentos na temperatura e no pico de DTG. Portanto, como pode ser visto na Figura 38b, o PHB-B é mais estável termicamente do que o PHB-C.

Nossos resultados estão em concordância com os obtidos por Silva *et al.* (2021) que trabalharam com PHB com a resistência a degradação térmica melhorada pela adição de pequenas quantidades de zircônio. O PHB-B apresentou valor de T<sub>máx</sub> em concordância com outros autores que trabalharam com amostras comerciais de PHB (Horng *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2008). Como também está em linha com os valores obtidos para várias amostras de PHB produzidas a partir da bactéria *Bacillus cereus* 4N e com o substrato folhas de agave submetidas a diversos tratamentos (Martínez-Herrera *et al.*, 2021). Os valores da T<sub>onset</sub> e T<sub>máx</sub> do PHB-B

são exatamente iguais aos valores obtidos por (Abdelwahab *et al.*, 2012) para o PHB Biocycle® (produzido pela Industrial, SA, Serrana, SP- Brasil).

O PHB-C avaliado no presente trabalho foi produzido pela mesma Empresa do PHB Biocycle®, porém a amostra do PHB-C ficou armazenado em temperatura ambiente. Sua estabilidade térmica deteriorada colabora com os valores encontrados por autores anteriores (Briassoulis *et al.*, 2021). Com relação ao PHB-B, vale ressaltar que o processo de cultivo adotado a partir da *C. necator* e o melaço de cana-de-açúcar conduziu a produção de um biopolímero com resistência térmica superior a de outros PHB bacterianos obtidos por outras vias de processo, usando a mesma bactérias e substratos diferentes (Gonzalez-Rojo *et al.*, 2024) ou com bactéria e substratos diferentes (Hong *et al.*, 2011).

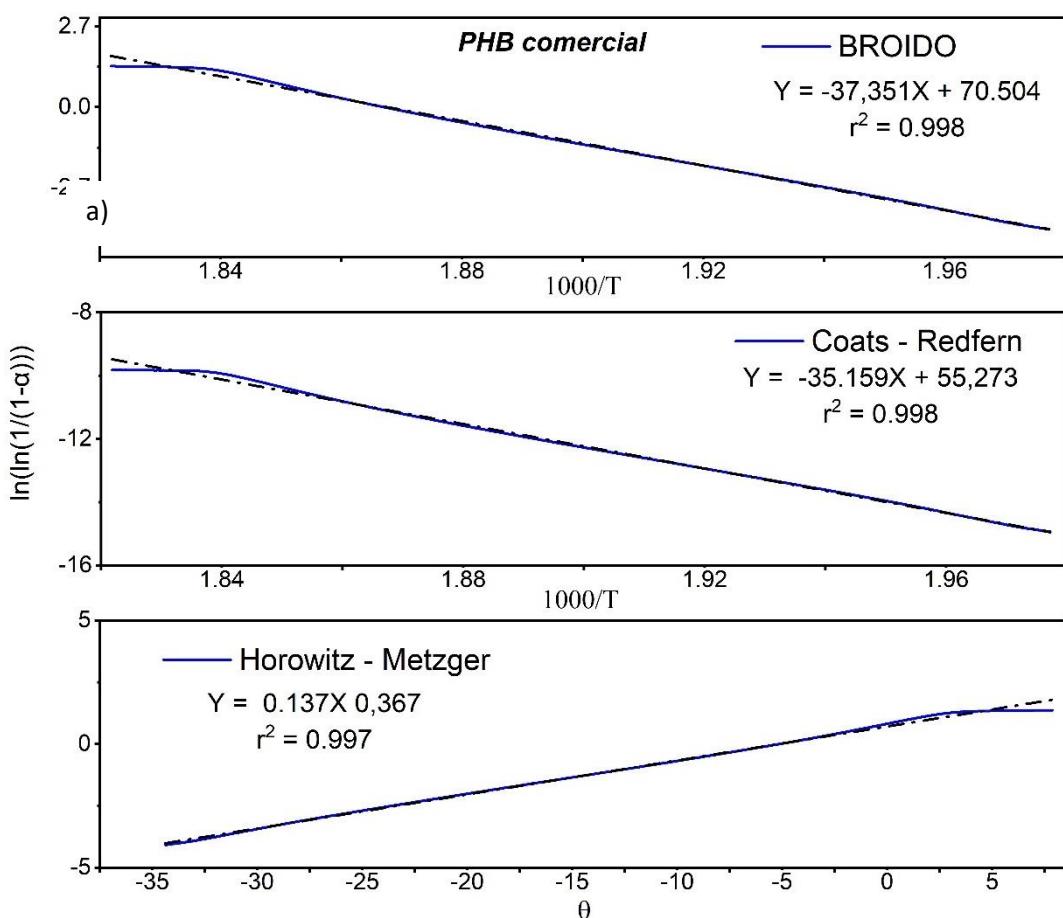
Tabela 16 - Parâmetros da análise termogravimétrica.

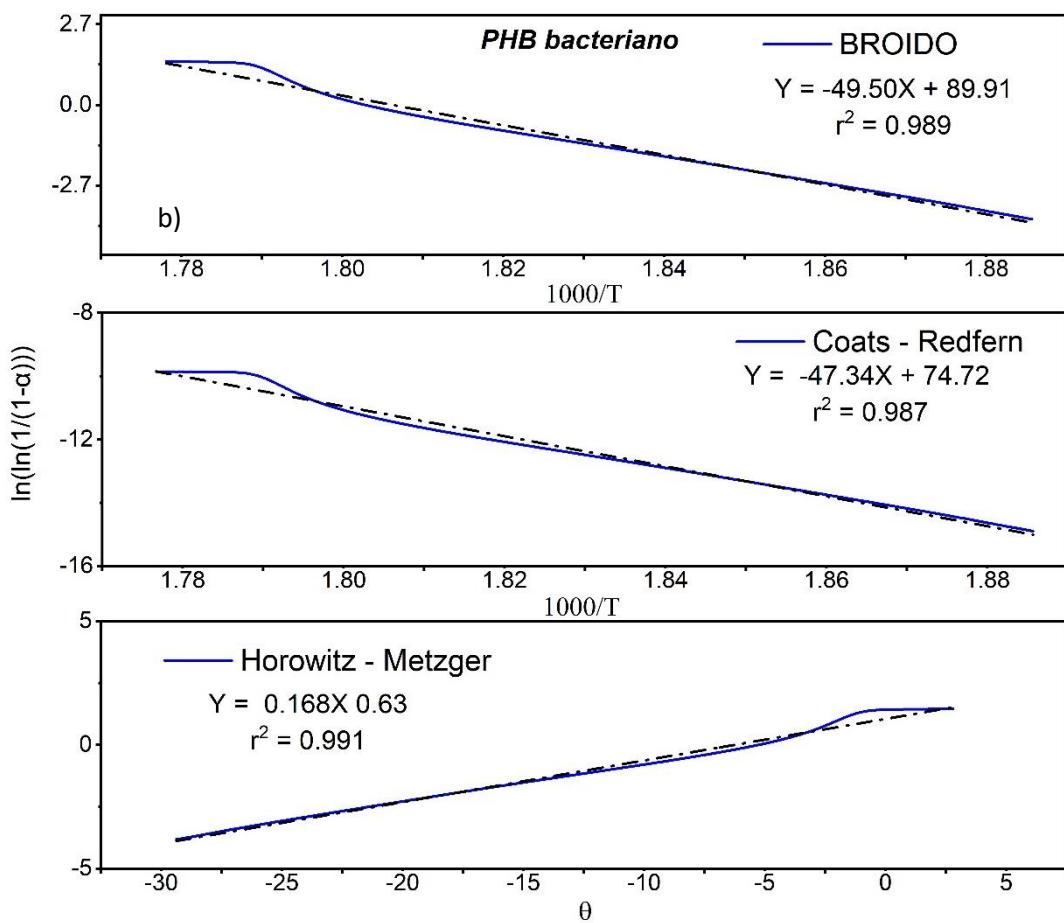
Amostra	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>20</sub> (°C)	T <sub>máx</sub> (°C)	T <sub>final</sub> (°C)
PHB-B	262,0	269,26	279,92	283,67
PHB-C	233,0	246,12	258,66	266,41

## 5.11 ANÁLISE CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA

A partir das curvas de TG E DTG do PHB-B e PHB-C mostradas na Figura 38 foram plotados os gráficos na Figura 39, utilizando o método de (H-M), (C-R) e (B), como também os seus coeficientes angulares e correlação foram determinados, respectivamente :

Figura 39 - Gráficos dos modelos cinéticos: a) polihidroxibutirato comercial e b) polihidroxibutirato bacteriano.





Utilizando os valores dos coeficientes angulares obtidos das curvas plotadas na Figura 39, nas equações (19), (20) e (21) foram calculados os valores da ( $E_a$ ) e ( $A$ ) das amostras, dados apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Valores calculados a partir dos métodos Horowitz-Metzger, Coats-Redfern e Broido

<b>Modelos cinéticos</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>PHB-C</b>	<b>PHB-B</b>
H-M		324,06	429,27
B	$Ea \left( \frac{kJ}{mol} \right)$	310,53	411,72
C-R		292,32	393,55
H-M		$3,96 \cdot 10^{31}$	$2,23 \cdot 10^{40}$
B	$A(s^{-1})$	$1,79 \cdot 10^{30}$	$4,74 \cdot 10^{38}$
C-R		$2,75 \cdot 10^{28}$	$8,79 \cdot 10^{36}$
H-M		0,997	0,991
B	$r^2$	0,998	0,989
C-R		0,998	0,987

Os resultados da análise cinética não isotérmica das amostras usando os métodos (H-M), (C-R) e (B) são apresentados na Tabela 17. Tem-se que a ( $Ea$ ) para o PHB-C variou entre 324,06-292,32 kJ/mol, e a do PHB-B variou entre 429,27-393,55 kJ/mol, conforme o modelo de cinética adotado. Estudos anteriores exploraram diferentes abordagens para determinar a ( $Ea$ ), na pesquisa de Iglesias-Montes *et al.*, (2023), com PHB comercial com massa molar de 492000 g/mol e polidispersão de 6,3 utilizado, foi determinada a ( $Ea$ ) usando os métodos Kissinger-Akahira-Sunose e Vyazovkin, indicando valores de 95,2 e 86,9 kJ/mol, respectivamente. Chen *et al.*, (2002), avaliaram a cinética da decomposição térmica do PHB comercial com massa molar de 731000 g/mol pelo método de Kissinger-Akahira-Sunose e Flynn-wall-Ozawa e as energias de ativação foram de 79,73 e 86,14 kJ/mol, respectivamente. Esses autores mesmo utilizando uma série de aquecimentos em diferentes taxas, obtiveram os valores de ( $Ea$ ) inferiores aos do PHB-B e PHB-C obtidos por cinética não isotérmica. Os métodos não isotérmicos (isoconvercionais), como o Kissinger-Akahira-Sunose (KAS), Vyazovkin, Flynn-Wall-Ozawa (FWO) tendem a fornecer valores de energia de ativação menores em comparação com métodos não isotérmicos (modelo de ajuste), como o (H-M), (C-R) e (B), devido às condições específicas em que cada método opera.

Nos métodos isotérmicos, a temperatura é mantida constante ao longo do tempo, permitindo que o sistema alcance um equilíbrio térmico. Isso significa que a ( $Ea$ ) calculada reflete mais diretamente a energia necessária para iniciar a decomposição em uma condição

estável. Já nos métodos não isotérmicos, a temperatura varia continuamente durante a análise. Essa variação pode resultar em uma superestimação da ( $E_a$ ), pois o sistema não tem tempo suficiente para se ajustar às mudanças de temperatura, capturando assim uma resposta a uma gama mais ampla de condições térmicas. Por isso, os métodos não isotérmicos de KAS e FWO frequentemente apresentam valores mais altos de ( $E_a$ ), por incluírem efeitos adicionais, como a influência da taxa de aquecimento, que não estão presentes nos métodos isotérmicos (Ghaderi *et al.*, 2017; Šimon, 2004).

Hablot *et al.* (2008) obtiveram por modelos de Coats e Redfern não isotérmicos valores de  $E_a$  para o PHB Biocycle® com resíduos de fermentação de 327 kJ/mol, para o purificado de 395 kJ/mol, enquanto que quando o PHB foi aditivado com sal quaternário de amônio, óleo vegetal e, cloreto de benzildimetilamônio foram de 200, 166, 131kJ/mol, respectivamente. O PHB-B mostra valor de ( $E_a$ ) bem superior, enquanto o valor do PHB-C (324,06 kJ/mol) se aproximam do valor PHB Biocycle® com resíduos de fermentação. Li *et al.* (2003) avaliaram PHB comercial usando Coats–Redfern e obtiveram valor de 307 kJ/mol, concordando com o do PHB-C, porém foi bem inferior ao observado para o PHB-B. Comparando os resultados de ( $E_a$ ) do presente trabalho com os obtidos por Yeo *et al.* (2010) para o PHB Biocyle® puro 136,8 kJ/mol e o valor foi ainda mais baixo quando nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) foi adicionado. Portanto, os valores de ( $E_a$ ) do PHB-B e do PHB-C (sem purificações) foram superiores aos obtidos por Yeo *et al.* (2010). Outros autores (Xiang *et al.*, 2014) avaliaram copolímeros à base de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) biodegradável (PHBV), usando a cinética de Horowitz-Metzger. Eles observaram que a ( $E_a$ ) do PHBV puro com massa molar de 116000 g/mol foi de 428,24 kJ/mol, valor semelhante ao observado para o PHB-B. Pachekoski *et al.* (2013), avaliaram a degradação térmica do PHB (massa molar, 534000 g/mol e polidispersão de 2,2), verificando uma ( $E_a$ ) de 235 kJ/mol, resultado obtido pela cromatografia de exclusão de tamanho (SEC). Pode se ver que ao se comparar os resultados por metodologia distintas (métodos isotérmicos, não isotérmicos ou por outras técnicas) se observa valores diferentes. Porém, vale ressaltar que os métodos não isotérmicos (H-M, C-R e B) mesmo apresentando uma superestimação do valor da ( $E_a$ ), nos fornece informações relevantes para compreensão da estabilidade térmica do PHB.

Avaliando a importância de ( $E_a$ ) se tem que seu valor elevado pode estar associada à alguns fatores tais quais: estabilidade térmica aumentada (maior estabilidade térmica, ou seja, é menos propenso a sofrer degradação ou reações indesejadas como oxidação, despolimerização ou decomposição) quando exposto a temperaturas elevadas; reatividade

química reduzida (são menos reativos sob condições normais); durabilidade e vida útil prolongadas (tendem a ter uma vida útil mais longa, especialmente quando utilizados em ambientes onde estão expostos a calor ou luz ultravioleta, que são fontes comuns de degradação); processamento requer temperaturas mais altas (para induzir as reações desejadas como fusão, sinterização, ou cura); e retardamento da degradação (são menos propensos a iniciar a combustão, retardando a degradação ou combustão do material).

O PHB pode ser sintetizado por diferentes métodos, como síntese microbiológica ou síntese química, cada uma influenciando as propriedades finais do polímero, incluindo a estabilidade térmica, ou seja, a ( $E_a$ ). De um modo geral, a degradação do PHB é causada quase exclusivamente por uma cisão aleatória na ligação éster em altas temperaturas (acima de 200 °C), por um mecanismo de cis-eliminação não radical e cisalhamento da cadeia polimérica, levando à redução da massa molar do polímero e à formação de ácido crotônico (Pachekoski *et al.*, 2013). Dessa forma, os resultados obtidos pelos métodos de (H-M), (C-R) e (B) comprovam que o PHB bacteriano apresenta melhor estabilidade térmica que os PHB comercial, sugerindo sofrer menor degradação térmica no processamento a partir do fundido.

Na Tabela 17, também se verifica os valores do fator pré-exponencial ( $A$ ) para o PHB-B e o PHB-C, os quais são elevados. O PHB bacteriano possui maior valor de ( $A$ ) igual a  $2,23 \times 10^{40}$ , indicando que há uma alta frequência de colisões entre as moléculas reagentes. Como resultado, em ambos eventos podem ocorrer um aumento na taxa de reação e ou interações moleculares que aumentam a estabilidade, corroborando com o maior valor da  $E_a$ .

O fator de colisão ( $A$ ) elevado pode estar associado à alguns fatores tais quais: alta frequência de colisões (que as moléculas no sistema reagem frequentemente); alta taxa de reação (a taxa de reação pode ser alterada independente da ( $E_a$ ); influência da estrutura polimérica (facilita interações entre as cadeias poliméricas ou entre o polímero e reagentes externos, promovendo mais colisões eficazes); estabilidade térmica (sob temperaturas elevadas, a mobilidade das cadeias poliméricas aumenta, permitindo mais colisões entre os segmentos do polímero ou com reagentes); e interações moleculares específicas (interações específicas que facilitam as colisões eficazes).

Comparando os resultados obtidos a partir dos métodos utilizados no presente trabalho (H-M), (C-R) e (B), Tabela 17, se observa uma redução de todos os valores de ( $E_a$ ) e ( $A$ ) na seguinte ordem (H-M)>(B)>(C-R). No entanto, conforme os valores ( $r^2$ ), as regressões apresentaram um ajuste satisfatório dos resultados.

Podem ser observados na Tabela 18 os valores dos parâmetros termodinâmicos: ( $\Delta H$ ), ( $\Delta S$ ) e ( $\Delta G$ ) do PHB-C e PHB-B.

Tabela 18 - Parâmetros termodinâmicos do polihidroxibutirato comercial e do polihidroxibutirato bacteriano.

<b>Modelos cinéticos</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>PHB-C</b>	<b>PHB-B</b>
H-M		130,49	135,09
B	$\Delta G \left( \frac{KJ}{mol} \right)$	130,67	135,28
C-R		130,94	135,49
H-M		319,63	424,66
B	$\Delta H \left( \frac{KJ}{mol} \right)$	306,11	407,11
C-R		287,89	388,94
H-M		0,355	0,522
B	$\Delta S \left( \frac{KJ}{K.mol} \right)$	0,329	0,490
C-R		0,295	0,457

Os valores de ( $\Delta H$ ) que ocorrem durante as degradações térmicas do PHB-C e PHB-B são positivos, indicando que o perfil de degradação térmica é endotérmico. Há correlação dos resultados de ( $\Delta H$ ) com os obtidos para ( $E_a$ ), apresentando a mesma tendência para o PHB-C e PHB-B. O maior valor da entalpia de degradação observado na Tabela 18 para o PHB-B indica que apresentou a melhor estabilidade térmica. Esse resultado é colaborado pelo de Shekh *et al.* (2018) que realizaram estudo cinético não isotérmico em copolímeros de metacrilato e seus compósitos com nano-CdS e observaram que o valor da entalpia ( $\Delta H$ ) foi positivo, indicando a natureza endotérmica da degradação térmica desses polímeros.

A ( $\Delta S$ ) é uma medida de energia termodinâmica que indica a desordem de um sistema, que depende apenas do primeiro e do último estado de um sistema, independe do caminho tomado pela reação. Dessa forma, quanto maior a entropia, maior será a desordem e a aleatoriedade, que promove inherentemente a mistura em sistemas (Çanakçi, 2020; Hou *et al.*, 2021). Os resultados de ( $\Delta S$ ) observados na Tabela 18 indicam que PHB-B e PHB-C apresentam ( $\Delta S$ ) positivo, sugerindo que seus processos de degradação são espontâneos. O

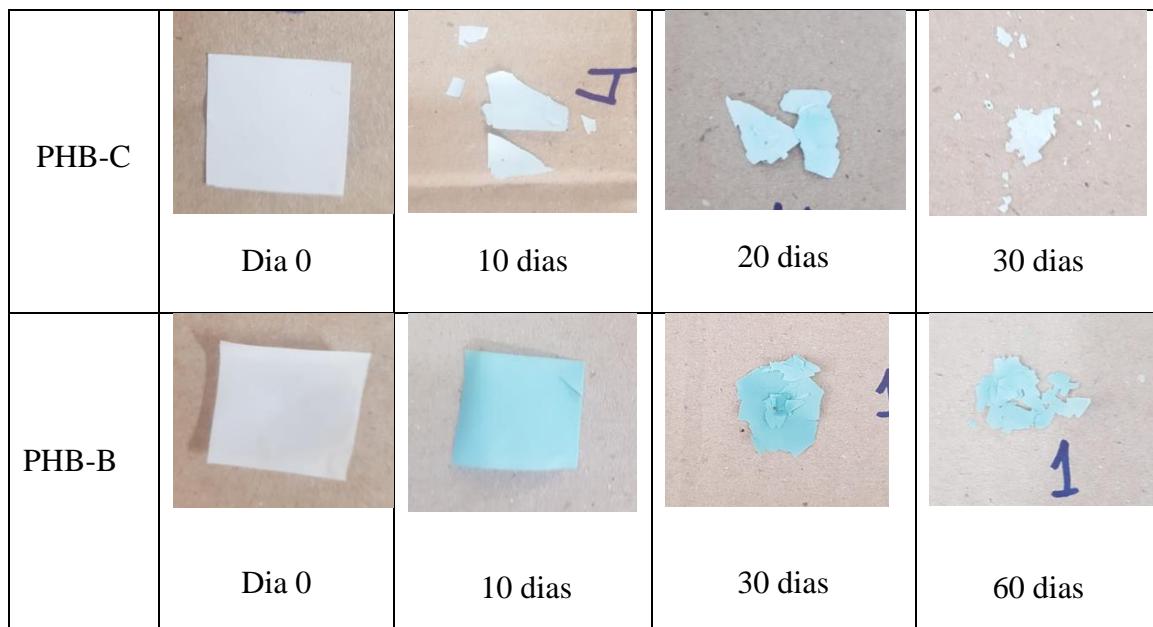
valor de ( $\Delta S$ ) maior para o PHB-B, indica sua maior desordem, proveniente do maior fator de colisão entre as moléculas observado no fator pré-exponencial. Segundo Shekh *et al.* (2018) o equilíbrio do sistema poderia se definir a partir do valor da mudança de entropia ( $\Delta S$ ), indicando duas situações: valores menores indicam que a reação é lenta, ou vice-versa e valor negativo para um processo de decomposição indica que as etapas não são espontâneas. Didovets *et al.* (2022) realizaram um estudo do processo de degradação térmica do nylon 6 e do PHB, por meio do método da teoria do funcional da densidade (DFT) e observaram para o PHB uma mudança de entropia relativa, definido com uma razão para a possível espontaneidade da última etapa da degradação térmica do PHB.

A ( $\Delta G$ ) do PHB-B e PHB-C foram positivas, com valores variando entre 130 e 136 kJ/mol, indicando que eles são termodinamicamente dependentes do calor introduzido e suas decomposições definida como reações de decomposição não espontâneas. Os resultados de ( $\Delta G$ ) do PHB-B e PHB-C são corroborados pelos de Didovets *et al.* (2022) que verificaram na temperatura de 673 K (~400 °C) um valor da ( $\Delta G$ ) para o PHB em torno 30,83 Kcal/mol (128,99 KJ/mol).

## 5.12 ANÁLISE DE BIODEGRADAÇÃO

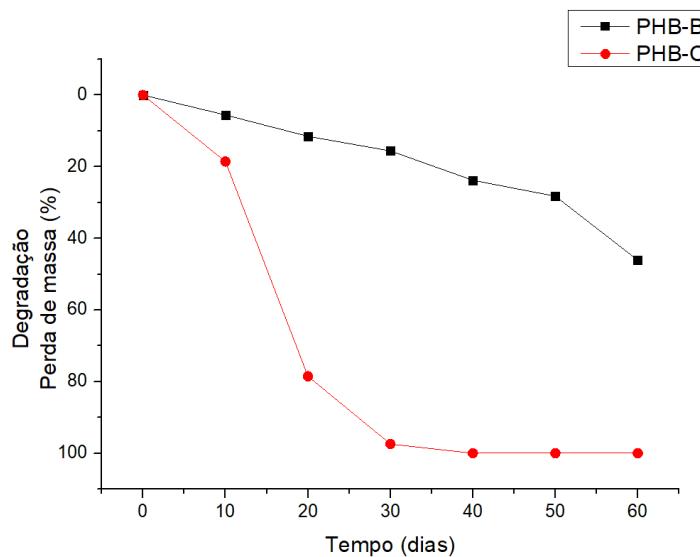
Na Figura 40, podem ser visualizadas fotografias das amostras de filmes do PHB-B e do PHB-C que foram submersas em uma cultura microbiana mista de solo. A análise visual mostra claramente a fragilização, fragmentação, mudança de cor e desintegração dos filmes. Segundo a literatura, a degradação do PHB ocorre na superfície por erosão ocasionada pela secreção de enzimas extracelulares pelos microrganismos do meio. A enzima despolimerase converte o polímero PHB em oligômeros e unidades monoméricas de hidroxibutirato que são utilizadas como fonte de carbono pelos próprios microrganismos (Sudesh *et al.*, 2000; Manikandan *et al.*, 2020).

Figura 40 – Fotografias dos filmes de polihidroxibutirato bacteriano e comercial durante o teste de biodegradação.



Na Figura 41 podem ser visualizadas as curvas de biodegradação do PHB-B e do PHB-C na presença de uma cultura microbiana mista de solo ao longo de 60 dias de análises.

Figura 41 - Curvas de biodegradação do polihidroxibutirato bacteriano e comercial.



O PHB-B degradou 5,58% de sua massa nos primeiros 10 dias, atingindo 15,61% em 30 dias e 46,10% em 60 dias. Já o PHB-C apresentou uma degradação mais rápida com 18,59% em 10 dias e chegando a 97,44% em 30 dias, em seguida a amostra foi totalmente degradada. O PHB-C já estava armazenado à temperatura ambiente, sob abrigo de luz, por mais de 5 anos,

podendo estar já em fase de degradação, visto que segundo Weng *et al.* (2011) a degradação inicia pela fase amorfa o que faz com que a cristalinidade aumente, o que pode ser comprovado pela diferença de cristalinidade entre o PHB-C e PHB-B que apresentaram 62,01 e 51,71% de cristalinidades, respectivamente.

Ansari e Fatma. (2016) realizaram mesmo experimento com PHB produzido por uma cultura de cianobactéria da espécie *Nostoc muscorum* NCCU- 442 e compararam com polipropileno, um polímero petroquímico. Em seu estudo o PHB obteve uma perda de massa, em 60 dias de contato com a cultura mista de solo, de 24,58% enquanto o polipropileno praticamente não sofreu alteração com uma perda de massa de 1,68%.

Os resultados obtidos confirmam a biodegradabilidade do PHB-B e do PHB-C, ficando evidente a vantagem ambiental do PHB como uma alternativa promissora para a substituição de polímeros convencionais, contribuindo para a redução do impacto ambiental causado por resíduos plásticos persistentes.

## 6 CONCLUSÕES

A produção de PHB bacteriano utilizando melaço de cana-de-açúcar e *C. necator* foi bem-sucedida. O delineamento experimental indicou que o aumento da concentração de AR e a diminuição da temperatura de cultivo favoreceram a produção de PHB. As condições ótimas de cultivo: melaço de cana-de-açúcar comercial como fonte de carbono 15 g.L<sup>-1</sup> de AR, temperatura 30°C, período de incubação 72 h, velocidade de agitação 180 rpm e fonte de nitrogênio 1 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> produziram um rendimento máximo de PHB de 35,70%. Isso foi obtido sob as condições descritas pela análise de superfície de resposta.

Ao comparar o PHB-B com o PHB-C produzido comercialmente, as análises de FTIR, <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de RMN e DRX revelaram que os polímeros eram semelhantes, pertencentes à mesma classe PHA. O PHB-C apresentou um estado cristalino mais ordenado, com bandas mais intensas, enquanto o PHB-B apresentou cristais mais defeituosos, sugerindo maior flexibilidade, o que pode ser vantajoso para aplicações de filmes flexíveis a custos menores e com benefícios ambientais.

O PHB-B apresentou propriedades térmicas e termodinâmicas promissoras, com grau de cristalinidade de 51,71%, em comparação com 62,01% do PHB-C. A ATG mostrou que o PHB-B tem maior resistência à degradação, com temperaturas de degradação inicial e máxima 29 °C e 21 °C mais altas, respectivamente. Além disso, seu pico de DTG foi mais intenso, sugerindo maior estabilidade térmica. Ambos os biopolímeros se degradaram em uma única etapa endotérmica e espontânea, com a energia de ativação da degradação do PHB-B cerca de 25% superior à do PHB-C. Essa é uma contribuição relevante do presente trabalho porque amplia o tempo de prateleira dos produtos. Como também, a partir de expectativa da produção em escala industrial, o PHB-B pode ser manufaturado por técnicas de fabricação a partir do fundido.

No teste biodegradabilidade o PHB-B e o PHB-C apresentaram uma perda de massa de 46,10% e 100% em 60 dias de contato com uma cultura microbiana mista de solo, respectivamente. Esse estudo destaca o potencial do PHB como uma alternativa viável aos polímeros convencionais, auxiliando na mitigação do impacto ambiental gerado pelo acúmulo de resíduos plásticos de difícil degradação. E devido à sua estrutura cristalina mais defeituosa, o PHB-B pode ser mais flexível do que o PHB-C. Isso pode ser vantajoso para aplicações que envolvam filmes flexíveis que liberam produtos farmacêuticos e até fertilizantes para agricultura de forma ambientalmente segura e economicamente benéfica.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, M.I., AMELIA, T.S.M., BHUBALAN, K., VIGNESWARI, S., RAMAKRISHNA, S., AMIRUL, A. A.A. (2024). Bioprospecting waste for polyhydroxyalkanoates production: embracing low carbon bioeconomy. *Int. J. Environ. Sci.* <https://doi.org/10.1007/s13762-024-05831-1>
- ABDALLAH, M. M., FERNÁNDEZ, N., MATIAS, A. A., & BRONZE, M. R. (2020). Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: Extraction and purification methods. *Carbohydrate Polymers*, 243, 116441. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116441>
- ABDELWAHAB, M. A., FLYNN, A., CHIOU, B. S., IMAM, S., ORTS W., CHIELLINI, E. (2012). Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA-PHB blends, *Polymer Degradation and Stability*, V. 97(9), 1822-1828. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.036>
- AGA, M. B., DAR, A. H., NAYIK, G. A., PANESAR, P. S., ALLAI, F. M., KHAN, S. A., SHAMS, R., KENNEDY, J. F., & ALTAF, A. (2021). Recent insights into carrageenan-based bio-nanocomposite polymers in food applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 192, 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.212>
- ALIPAL, J., PU'AD, N. M., LEE, T., NAYAN, N. H. M., SAHARI, N., BASRI, H., IDRIS, M. I., & ABDULLAH, H. Z. (2021). A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings*, 42, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.922>
- AL-KHATEEB, R., & OLSZEWSKA-CZYŻ, I. (2020). Biological molecules in dental applications: hyaluronic acid as a companion biomaterial for diverse dental applications. *Heliyon*, 6(4), e03722. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03722>
- ANDLER, R., VALDÉS, C., URTUVIA, V., ANDREESEN, C., & DÍAZ-BARRERA, A. (2021). Fruit residues as a sustainable feedstock for the production of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Journal of Cleaner Production*, 307, 127236. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127236>
- ANJUM, A., ZUBER, M., ZIA, K. M., NOREEN, A., ANJUM, M. N., & TABASUM, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- ANSARI, S., & FATMA, T. (2016). Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. *PLoS ONE*, 11(6), e0158168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168>
- AOYAGI, Y., YAMASHITA, K., & DOI, Y. (2002). Thermal degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly[ $\epsilon$ -caprolactone], and poly[(S)-lactide]. *Polymer Degradation and Stability*, 76(1), 53–59. [https://doi.org/10.1016/s0141-3910\(01\)00265-8](https://doi.org/10.1016/s0141-3910(01)00265-8)

ARANAZ, I., ALCÁNTARA, A. R., CIVERA, C., ARIAS, C., ELORZA, B., CABALLERO, A. H., & ACOSTA, N. (2021). Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*, 13(19), 3256. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>

ARIKAWA, H., MATSUMOTO, K., & FUJIKI, T. (2017). Produção de poli-hidroxialcanoato a partir de sacarose por cepas de *Cupriavidus necator* que abrigam genes csc de *Escherichia coli* W. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (20), 7497–7507. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8470-7>

ASHBY, R. D., SOLAIMAN, D. K. Y., & STRAHAN, G. D. (2011). Efficient utilization of crude glycerol as fermentation substrate in the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) biopolymers. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(7), 949–959. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1755-6>

BABOS, G., RYDZ, J., KAWALEC, M., KLIM, M., FODOR-KARDOS, A., TRIF, L., & FECZKÓ, T. (2020). Poly(3-Hydroxybutyrate)-Based nanoparticles for sorafenib and doxorubicin anticancer drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7312. <https://doi.org/10.3390/ijms21197312>

BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C. A. C., & DUEK, E. A. R. (2005). Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*, 15(1), 13–21. <https://doi.org/10.1590/s0104-14282005000100006>

BARHAM, P. J., KELLER, A., OTUN, E. L., HOLMES, P. A. (1984). Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Materials Science*, 19(9), 2781–2794. <https://doi.org/10.1007/bf01026954>

BATCHA, A. F. M., PRASAD, D. M. R., KHAN, M. R., & ABDULLAH, H. (2014). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* H16 from jatropha oil as carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(5), 943–951. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1066-4>

BHAGOWATI P, PRADHAN S, DASH HR, DAS S. (2015). Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp. *Biosci Biotechnol Biochem.*;79(9):1454-63. doi: 10.1080/09168451.2015.1034651

BISHOP, B. D. C., SANUSI, I. A., & KANA, G. E. B. (2024). Enhanced substrate suitability of autoclave-assisted acid pre-treated waste sugarcane molasses: Pre-treatment optimization, sequential nano-based detoxification strategies, and bioproduct production. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-024-06127-7>

BLOEMBERGEN S., HOLDEN D. A., HAMER G. K., BLUHM T. L., MARCHESSAULT R. H. (1986) Studies of composition and crystallinity of bacterial poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate. *Macromol*. <https://doi.org/10.1021/ma00165a034>

BLOMFELDT, T., KUKTAITE, R., JOHANSSON, E., & HEDENQVIST, M. S. (2011). Mechanical properties and network structure of wheat gluten foams. *Biomacromolecules*, 12(5), 1707–1715. <https://doi.org/10.1021/bm200067f>

BRIASSOULIS, D., TSEROTAS, P., & ATHANASOULIA, I. (2021). Alternative optimization routes for improving the performance of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) based plastics. *Journal of Cleaner Production*, 318, 128555. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128555>

ÇANAKÇI, D. (2020). Synthesis, Spectroscopic, Thermodynamics and Kinetics analysis study of novel polymers containing various Azo chromophore. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57264-3>

CAVALHEIRO, J., DE ALMEIDA, M. C. M., GRANDFILS, C., & DA FONSECA, M. M. R. (2009). Poly(3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator using waste glycerol. *Process Biochemistry*, 44(5), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.01.008>

CHAIJAMRUS S., UDPUAY, N. (2008) Production and characterization of polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. *Agric. Eng. Int.*: CIGR J. 10:1–12

CHANASIT, W., HODGSON, B., SUDESH, K., & UMSAKUL, K. (2016). Efficient production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Pseudomonas mendocina* PSU using a biodiesel liquid waste (BLW) as the sole carbon source. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(7), 1440–1450. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1158628>

CHANPRATEEP, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>

CHEN, C., FEI, B., PENG, S., ZHUANG, Y., DONG, L., & FENG, Z. (2002). The kinetics of the thermal decomposition of poly(3-hydroxybutyrate) and maleated poly(3-hydroxybutyrate). *Journal of Applied Polymer Science*, 84(9), 1789–1796. <https://doi.org/10.1002/app.10463>

CHEN, G. (2009). Industrial production of PHA. In *Microbiology monographs* (pp. 121–132). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_6)

CHEN, G., ZHOU, X., ZHUANG, Y., DONG L. (2005) Thermal Behavior and Intermolecular Interactions in Blends of Poly(3-hydroxybutyrate) and Maleated Poly(3-hydroxybutyrate) with Chitosan. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*. <https://doi.org/10.1002/polb.10742>

CHOI, J, LEE, S.Y. (1999) Factors affecting the economics of poly-hydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s002530051357>

CONAB (2023). *Acomp. safra brasileira de cana-de-açúcar*, Brasília, <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>

CONAB (2024) *Acomp. safra brasileira de cana-de-açúcar*, Brasília, <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>

CONTI, D., YOSHIDA, M., PEZZIN, S., COELHO, L. (2006). Miscibility and crystallinity of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) blends. *Thermochimica Acta*, 450(1–2), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2006.07.018>

CREMA, L. C.; Clarificação por flotação com ar dissolvido (FAD) da calda de açúcar cristal para produção de açúcar refinado. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) -UNESP, São José do Rio Preto - SP, 2012.

CRUZ, M., PAIVA, A., LISBOA, P., FREITAS, F., ALVES, V. D., SIMÕES, P., BARREIROS, S., & REIS, M. A. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology. *Bioresource Technology*, 157, 360–363. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.013>

CRUZ, M., SARRAGUÇA, M. C., FREITAS, F., LOPES, J. A., & REIS, M. A. (2015). Online monitoring of P(3HB) produced from used cooking oil with near-infrared spectroscopy. *Journal of Biotechnology*, 194, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.11.022>

CUI, R., & ZHU, F. (2020). Ultrasound modified polysaccharides: A review of structure, physicochemical properties, biological activities and food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 107, 491–508. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.018>

DAISY, E. A. C., RAJENDRAN, N. K., HOUERLD, N. N., MARRAIKI, N., ELGORBAN, A. M., & RAJAN, M. (2020). Curcumin and Gymnema sylvestre extract loaded graphene oxide-polyhydroxybutyrate-sodium alginate composite for diabetic wound regeneration. *Reactive and Functional Polymers*, 154, 104671. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104671>

DAITX, T. S., DE LIMA, V. S., GRYCZAK, M., PETZHOLD, C. L., CARLI, L. N., & MAULER, R. S. (2020). Poly(hydroxybutyrate)-based systems behavior on the controlled release of NPK fertilizers. *Polymers for Advanced Technologies*, 31(11), 2579–2587. <https://doi.org/10.1002/pat.4985>

DALSASSO, R. R., PAVAN, F. A., BORDIGNON, S. E., ARAGÃO, G. M. F., & POLETTO, P. (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB) production by Cupriavidus necator from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. *Process Biochemistry*, 85, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.007>

DAS, M., & GROVER, A. (2018). Fermentation optimization and mathematical modeling of glycerol-based microbial poly(3-hydroxybutyrate) production. *Process Biochemistry*, 71, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.017>

DEDKOVA, E. N., & BLATTER, L. A. (2014). Role of  $\hat{\text{I}}^2$ -hydroxybutyrate, its polymer poly- $\hat{\text{I}}^2$ -hydroxybutyrate and inorganic polyphosphate in mammalian health and disease. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00260>

DESTEFANO, V., KHAN, S. A., & TABADA, A. (2020). Applications of PLA in modern medicine. *Engineered Regeneration*, 1, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2020>

- DI LORENZO, M.L., SAJKIEWICZ, P., LA PIETRA, P., GRADYS, A. (2006). Irregularly shaped DSC exotherms in the analysis of polymer crystallization. *Polym. Bull.* 57, 713–721. <https://doi.org/10.1007/s00289-006-0621-4>
- DIDOVETS, Y., & BRELA, M. Z. (2022). Theoretical study on the thermal degradation process of nylon 6 and polyhydroxybutyrate. *Physchem*, 2(4), 334–346. <https://doi.org/10.3390/physchem2040024>
- DOPPALAPUDI, S., JAIN, A., KHAN, W., & DOMB, A. J. (2014). Biodegradable polymers—an overview. *Polymers for Advanced Technologies*, 25(5), 427–435. <https://doi.org/10.1002/pat.3305>
- EL-SHEEKH, M. M., EL-ABD, M. A., EL-DIWANY, A. I., ISMAIL, A. S., & OMAR, T. H. (2015). Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus flexus* ME-77 using some industrial wastes. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche E Naturali*, 26(2), 109–119. <https://doi.org/10.1007/s12210-014-0368-z>
- ESLAHI, N., MAHMOODI, A., MAHMOUDI, N., ZANDI, N., & SIMCHI, A. (2019). Processing and Properties of Nanofibrous Bacterial Cellulose-Containing Polymer Composites: A review of recent advances for biomedical applications. *Polymer Reviews*, 60(1), 144–170. <https://doi.org/10.1080/15583724.2019.1663210>
- FAO - World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2023. (2023). In *FAO eBooks*. <https://doi.org/10.4060/cc8166en>
- GANDHI, S., & ROY, I. (2021). Drug delivery applications of casein nanostructures: A minireview. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66, 102843. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102843>
- GANZEVELD, K. J., VAN HAGEN, A., VAN AGTEREN, M. H., DE KONING W., UITERKAMP, A. J.M S. (1999) Upgrading of organic waste: production of the copolymer poly-3-hydroxybutyrate-co-valerate by *Ralstonia eutrophus* with organic waste as sole carbon source. *J. Clean. Prod.* [https://doi.org/10.1016/S0959-6526\(99\)00159-6](https://doi.org/10.1016/S0959-6526(99)00159-6)
- GHADERI, F., NEMATI, M., SIAHI-SHADBAND, M. R., VALIZADEH, H., & MONAJJEMZADEH, F. (2017). Evaluation of activation energy conformity derived from model-free non-isothermal predictions and Arrhenius isothermal results. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 130(3), 1417–1427. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6279-3>
- GHOSH, S., GNAIM, R., GREISERMAN, S., FADEEV, L., GOZIN, M., & GOLBERG, A. (2019). Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei*. *Bioresource Technology*, 271, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.108>
- GONZALEZ, A., IRUSTA, L., FERNÁNDEZ-BERRIDI, M., IRIARTE, M., & IRUIN, J. (2005). Application of pyrolysis/gas chromatography/Fourier transform infrared spectroscopy and TGA techniques in the study of thermal degradation of poly (3-hydroxybutyrate). *Polymer Degradation and Stability*, 87(2), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.09.005>

GONZÁLEZ, J., ALBANO, C., SCIAMANNA, R., ICHAZO, M., ROSALES, C., MARTÍNEZ, J., & CANDAL, M. (2000). Dynamic thermal decomposition of blends of polyamide 6 with functionalized and non-functionalized PP. *Polymer Degradation and Stability*, 68(1), 9–19. [https://doi.org/10.1016/s0141-3910\(99\)00160-3](https://doi.org/10.1016/s0141-3910(99)00160-3)

GONZÁLEZ-ROJO S., PANIAGUA-GARCÍA A. I., DÍEZ-ANTOLÍNEZ R. (2024). Pilot scale-up production of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) from starch-based wastewater: A halogen-free process optimization for polymer recovery, *Journal of Cleaner Production*, V.463:142657, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.142657>

GOUDA, M. K., SWELLAM, A. E., OMAR, S. H. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugar cane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiol. Res.* <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00104>

GRIGORE, M. E., GRIGORESCU, R. M., IANCU, L., ION, R., ZAHARIA, C., & ANDREI, E. R. (2019). METHODS OF SYNTHESIS, PROPERTIES and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(9), 695–712. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1605866>

GUO, X., WANG, Y., QIN, Y., SHEN, P., & PENG, Q. (2020). Structures, properties and application of alginic acid: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 618–628. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.180>

HABLOT, E., BORDES, P., POLLET, E., & AVÉROUS, L. (2008). Thermal and thermo-mechanical degradation of poly(3-hydroxybutyrate)-based multiphase systems. *Polymer Degradation and Stability*, 93(2), 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.018>

HARDER, N., RODRIGUEZ-URIBE, A., SNOWDON, M. R., MISRA, M., & MOHANTY, A. K. (2023). Hop natural fiber-reinforced poly(butylene succinate-co-butylene adipate) (PBSA) biodegradable plastics: effect of fiber length on the performance of biocomposites. *Materials Advances*, 4(6), 1502–1514. <https://doi.org/10.1039/d2ma00831a>

HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E., MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, C. A., LÓPEZ-CORTÉS, A., AGUIRRE-MACEDO, M. L., TABASCO-NOVELO, C., GONZÁLEZ-DÍAZ, M. O., & GARCÍA-MALDONADO, J. Q. (2019). Physico-chemical Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate) Produced by *Halomonas salina*, Isolated from a Hypersaline Microbial Mat. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(5), 1105–1111. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01417-y>

HERRERA-KAO, W. A., LORÍA-BASTARRACHEA, M. I., PÉREZ-PADILLA, Y., CAUCH-RODRÍGUEZ, J. V., VÁZQUEZ-TORRES, H., & CERVANTES-UC, J. M. (2018). Thermal degradation of poly(caprolactone), poly(lactic acid), and poly(hydroxybutyrate) studied by TGA/FTIR and other analytical techniques. *Polymer Bulletin*, 75(9), 4191–4205. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2260-3>

HONG, S., GAU, T., & HUANG, S. (2011). Enhancement of the crystallization and thermal stability of polyhydroxybutyrate by polymeric additives. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 103(3), 967–975. <https://doi.org/10.1007/s10973-010-1180-3>

HONG, S., LIN, Y., & LIN, C. (2008). Crystallization and degradation behaviors of treated polyhydroxybutyrates. *Reactive and Functional Polymers*, 68(11), 1516–1523. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2008.08.003>

HORNG Y-T, CHIEN C-C, WEI Y-H ET AL. (2011). Functional cisexpression of phaCAB genes for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 52:475–483. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03029.x>

HOU, X., CHEN, S., KOH, J. J., KONG, J., ZHANG, Y., YEO, J. C. C., CHEN, H., & HE, C. (2021). Entropy-Driven Ultratough Blends from Brittle Polymers. *ACS Macro Letters*, 10(4), 406–411. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.0c00844>

HSIAO, L., LEE, M., CHUANG, P., KUO, Y., LIN, J., WU, T., & LI, S. (2018). The production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Caldimonas manganoxidans* from glycerol. *Journal of Polymer Research*, 25(4). <https://doi.org/10.1007/s10965-018-1486-6>

IGLESIAS-MONTES, M. L., D'AMICO, D. A., MALBOS, L. B., SEOANE, I. T., CYRAS, V. P., & MANFREDI, L. B. (2023). Thermal degradation kinetics of completely biodegradable and biobased PLA/PHB blends. *Thermochimica Acta*, 725, 179530. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2023.179530>

INKINEN, S., HAKKARAINEN, M., ALBERTSSON, A., & SÖDERGÅRD, A. (2011). From Lactic Acid to Poly(lactic acid) (PLA): Characterization and Analysis of PLA and Its Precursors. *Biomacromolecules*, 12(3), 523–532. <https://doi.org/10.1021/bm101302t>

JAFARI, H., LISTA, A., SIEKAPEN, M. M., GHAFFARI-BOHLOULI, P., NIE, L., ALIMORADI, H., & SHAVANDI, A. (2020). Fish collagen: extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering. *Polymers*, 12(10), 2230. <https://doi.org/10.3390/polym12102230>

JAHANBAN-ESFAHLAN, A., ROUFEGARINEJAD, L., TABIBIAZAR, M., & AMAROWICZ, R. (2020). Latest developments in the detection and separation of bovine serum albumin using molecularly imprinted polymers. *Talanta*, 207, 120317. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120317>

JIANG, T., DUAN, Q., ZHU, J., LIU, H., & YU, L. (2020). Starch-based biodegradable materials: Challenges and opportunities. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.003>

JO, S.Y., SOHN, Y.J., PARK, S.Y., SON, J., YOO, J.I., BARITUGO, K.-A., DAVID, Y., KANG, K.H., KIM, H., CHOI, J., RHIE, M.N., KIM, H.T., JOO, J.C., PARK, S.J. (2021) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from sugarcane molasses by recombinant *Ralstonia eutropha* strains. *Korean J. Chem. Eng.* <https://doi.org/10.1007/s11814-021-0783-7>

KANDASAMY, S., YOO, J., YUN, J., KANG, H. S., SEOL, K., KIM, H. W., & HAM, J. (2021). Application of Whey Protein-Based Edible Films and Coatings in food Industries: An updated overview. *Coatings*, 11(9), 1056. <https://doi.org/10.3390/coatings11091056>

KARAMI, E., BEHDANI, M., & KAZEMI-LOMEDASHT, F. (2020). Albumin nanoparticles as nanocarriers for drug delivery: Focusing on antibody and nanobody delivery and albumin-

based drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55, 101471. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101471>

KARP, S.G., SCHMITT, C.C., MOREIRA, R., PENHA, R. O., MELLO, A.F.M., HERRMANN, L.W., SOCCOL, C. R (2022). Sugarcane Biorefineries: Status and Perspectives in Bioeconomy. *Bioenergy Res.* <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10406-4>

KE, Y., ZHANG, X., RAMAKRISHNA, S., HE, L., & WU, G. (2017). Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: Preparation and biomedical application. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 1107–1119. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.114>

KERVRAN, M., VAGNER, C., COCHEZ, M., PONÇOT, M., SAEB, M. R., & VAHABI, H. (2022). Thermal degradation of polylactic acid (PLA)/polyhydroxybutyrate (PHB) blends: A systematic review. *Polymer Degradation and Stability*, 201, 109995. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2022.109995>

KESHAVARZ, T., ROY, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006>

KHOK, Y. S., HUSSIN, M. H., BAIDURAH, S. (2019) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source. *Biocatal Agric Biotechnol*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.00>

KIM, B. S., CHANG, H. N. (2000). Control of glucose feeding using exit gas data and its application to the production of PHB from cassava hydrolysates by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Tech.* <https://doi.org/10.1007/BF00638861>

KOLLER, M., & MUKHERJEE, A. (2022). A new wave of industrialization of PHA biopolymers. *Bioengineering*, 9(2), 74. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9020074>

KOLLER, M., ATLIĆ, A., DIAS, M., REITERER, A., & BRAUNEGG, G. (2009). Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. In *Microbiology monographs* (pp. 85–119). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_5)

KOU, S. G., PETERS, L., & MUCALO, M. R. (2021). Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>

KOVALCIK, A., PERNICOVA, I., OBRUCA, S., SZOTKOWSKI, M., ENEV, V., KALINA, M., MAROVA, I. (2020). Grape winery waste as a promising feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates and other value-added products. *Food Bioproc. Tech.* <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.003>

KRUEGER, C. L., RADETSKI, C. M., BENDIA, A. G., DE OLIVEIRA, I. M., CASTRO-SILVA, M. A., RAMBO, C. R., ANTÔNIO, R. V., & DE SOUZA LIMA, A. O. (2012). Bioconversion of cassava starch by-product into *Bacillus* and related bacteria polyhydroxyalkanoates. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(3). <https://doi.org/10.2225/vol15-issue3-fulltext-6>

KULKARNI, A. B., MATHAD, S. N., & BAKALE, R. P. (2019). The evaluation of kinetic parameters for cadmium doped Co-Zn ferrite using thermogravimetric analysis. *Analele Universității "Ovidius" Constanța. Seria Chimie/"Ovidius" University Annals of Chemistry*, 30(1), 60–64. <https://doi.org/10.2478/auoc-2019-0011>

KUMAR, A., CHATTERJEE, S., HEMALATHA, M., ALTHURI, A., MIN, B., KIM, J. S., & MOHAN, S. V. (2020). Deoiled algal biomass derived renewable sugars for bioethanol and biopolymer production in biorefinery framework. *Bioresource Technology*, 296, 122315. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122315>

LAMBEK, G., VORENKAMP, E. J., & SCHOUTEN, A. J. (1995). Structural Study of Langmuir-Blodgett Mono- and Multilayers of Poly(.beta.-hydroxybutyrate). *Macromolecules*, 28(6), 2023–2032. <https://doi.org/10.1021/ma00110a041>

LAW, J. H., & SLEPECKY, R. A. (1961). ASSAY OF POLY-B-HYDROXYBUTYRIC ACID. *Journal of Bacteriology*, 82(1), 33–36. <https://doi.org/10.1128/jb.82.1.33-36>. 1961

LAYCOCK, B., HALLEY, P. J., PRATT, S., WERKER, A., & LANT, P. (2013). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, 38(3–4), 536–583. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003>

LEE, S. Y., & CHANG, H. N. (1995). Production of poly(hydroxyalkanoic acid). In *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* (pp. 27–58). <https://doi.org/10.1007/bfb0102315>

LEMOIGNE M (1926) Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide bétahydroxybutyrique. *Bulletins de la Société de Chimie Biologique* 8:770–782

LENFELD, P., BRDLÍK, P., BORŮVKA, M., BĚHÁLEK, L., & HABR, J. (2020). Effect of radiation crosslinking and surface modification of cellulose fibers on properties and characterization of biopolymer composites. *Polymers*, 12(12), 3006. <https://doi.org/10.3390/polym12123006>

LI, S., HE, J., YU, P. H., & CHEUNG, M. K. (2003). Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as studied by TG, TG-FTIR, and Py-GC/MS. *Journal of Applied Polymer Science*, 89(6), 1530–1536. <https://doi.org/10.1002/app.12249>

LIU, H., KUMAR, V., JIA, L., SARSAIYA, S., KUMAR, D., JUNEJA, A., ZHANG, Z., SINDHU, R., BINOD, P., BHATIA, S. K., & AWASTHI, M. K. (2021). Biopolymer polyhydroxyalkanoates (PHA) production from apple industrial waste residues: A review. *Chemosphere*, 284, 131427. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131427>

LOW, Y. J., ANDRIYANA, A., ANG, B. C., & ABIDIN, N. I. Z. (2020). Bioresorbable and degradable behaviors of PGA: Current state and future prospects. *Polymer Engineering and Science*, 60(11), 2657–2675. <https://doi.org/10.1002/pen.25508>

LU, J., TAPPEL, R. C., & NOMURA, C. T. (2009). Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*, 49(3), 226–248. <https://doi.org/10.1080/15583720903048243>

MAHATO, R. P., KUMAR, S., & SINGH, P. (2023). Production of polyhydroxyalkanoates from renewable resources: a review on prospects, challenges and applications. *Archives of Microbiology*, 205(5). <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03499-8>

MAI, J., GARVEY, C. J., CHAN, C. M., PRATT, S., & LAYCOCK, B. (2023). Synthesis and characterisation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) multi-block copolymers comprising blocks of differing 3-hydroxyvalerate contents. *Chemical Engineering Journal*, 475, 146175. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.146175>

MANIKANDAN, N. A., PAKSHIRAJAN, K., & PUGAZHENTHI, G. (2020). Preparation and characterization of environmentally safe and highly biodegradable microbial polyhydroxybutyrate (PHB) based graphene nanocomposites for potential food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 866–877. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.084>

MARTÍNEZ-HERRERA, R. E., ALEMÁN-HUERTA, M. E., FLORES-RODRÍGUEZ, P., ALMAGUER-CANTÚ, V., VALENCIA-VÁZQUEZ, R., ROSAS-FLORES, W., MEDRANO-ROLDÁN, H., OCHOA-MARTÍNEZ, L. A. AND RUTIAGA-QUIÑONES, O. M. (2021). “Utilization of *Agave durangensis* leaves by *Bacillus cereus* 4N for polyhydroxybutyrate (PHB) biosynthesis,” *International Journal of Biological Macromolecules*, 175, 199-208. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.167>

MCADAM, B., FOURNET, M. B., MCDONALD, P., & MOJIĆEVIĆ, M. (2020). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. *Polymers*, 12(12), 2908. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>

MCKEOWN, P., & JONES, M. D. (2020). The Chemical Recycling of PLA: A review. *Sustainable Chemistry*, 1(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/suschem1010001>

MELAÇOS BRASILEIROS, Especificações Técnicas Melaço de Cana. Disponível em <<https://melacos.com.br/especificacoes-tecnicas>>. Acesso em: 01 de dez. de 2023.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analitical Chemistry*, v.31, p.426 – 428, 1959.

MINJ, S., & ANAND, S. K. (2020). Whey proteins and its derivatives: bioactivity, functionality, and current applications. *Dairy*, 1(3), 233–258. <https://doi.org/10.3390/dairy1030016>

MITRA, R., XU, T., XIANG, H., & HAN, J. (2020). Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory. *Microbial Cell Factories*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01342-z>

MOHAMED, R. M., & YUSOH, K. (2015). A review on the recent research of polycaprolactone (PCL). *Advanced Materials Research*, 1134, 249–255. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.1134.249>

MOHAPATRA, S., SARKAR, B., SAMANTARAY, D. P., Daware, A., MAITY, S., PATTNAIK, S., & BHATTACHARJEE, S. (2017). Bioconversion of fish solid waste into PHB

using *Bacillus subtilis* based submerged fermentation process. *Environmental Technology*, 38(24), 3201–3208. <https://doi.org/10.1080/0959330.2017.1291759>

MORDENTI, A., GIARETTA, E., CAMPIDONICO, L., PARAZZA, P., & FORMIGONI, A. (2021). A review regarding the use of molasses in animal nutrition. *Animals*, 11(1), 115. <https://doi.org/10.3390/ani11010115>

MOSTAFA, Y.S., ALRUMMAN, S. A., ALAMRI, S. A., OTAIF, K. A., MOSTAFA M. S., ALFAIFY A. M. (2020). Bioplastic (poly-3-hydroxybutyrate) production by the marine bacterium *Pseudodonghicola xiamenensis* through date syrup valorization and structural assessment of the biopolymer. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65858-5>

NGUYEN, S., YU, G., & MARCHESSAULT, R. H. (2002). Thermal degradation of poly(3-hydroxyalkanoates): preparation of Well-Defined oligomers. *Biomacromolecules*, 3(1), 219–224. <https://doi.org/10.1021/bm0156274>

NODA, I., LINDSEY, S. B., & CARAWAY, D. (2009). NodaXTM Class PHA Copolymers: Their properties and Applications. In *Microbiology monographs* (pp. 237–255). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_10)

NONATO, R. V., MANTELATTO, P. E., & ROSSELL, C. E. V. (2001). Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s002530100732>

OBRUČA, S., MÁROVÁ, I., ŠNAJDAR, O., MRAVCOVÁ, L., & SVOBODA, Z. (2010). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*, 32(12), 1925–1932. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0376-8>

OLIVEIRA, C. T., LUNA, M. M., & CAMPOS, L. M. (2019). Understanding the Brazilian expanded polystyrene supply chain and its reverse logistics towards circular economy. *Journal of Cleaner Production*, 235, 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.319>

OLIVEIRA, F. C., DIAS, M. L., CASTILHO, L. R., FREIRE, D. M. (2007). Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.022>

OLIVEIRA, R. F., SOUSDALEFF, M. S., LIMA, M. V. S., LIMA, H. O. S. (2009). Lactic acid production by fermentation from sugarcane molasses with *Lactobacillus casei*. *Braz. J. Food Technol.* 7: 34–40

PABITRA, B., SHREEMA, P., HIRAK R. D., SURAJIT, D. (2015) Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp. *Biosci Biotechnol Biochem*. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1034651>

PACHEKOSKI, W. M., DALMOLIN, C., & AGNELLI, J. A. M. (2013). The influence of the industrial processing on the degradation of poly(hydroxybutyrate) - PHB. *Materials Research*, 16(2), 237–332. <https://doi.org/10.1590/s1516-14392012005000180>

PADERMSHOKE A., KATSUMOTO Y., SATO H., EKGASIT S., NODA I., OZAKI Y. (2005) Melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy *Spectrochim. Acta Part A*. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.05.004>

PAGLIANO, G., GUGLIUCCI, W., TORRIERI, E., PICCOLO, A., CANGEMI, S., DI GIUSEPPE, F. A., ROBERTIELLO, A., FARACO, V., PEPE, O., & VENTORINO, V. (2020). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from dairy wastewater effluent: bacterial accumulation, structural characterization and physical properties. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00197-1>

PALAI, B., MOHANTY, S., & NAYAK, S. K. (2020). Synergistic effect of polylactic acid(PLA) and Poly(butylene succinate-co-adipate) (PBSA) based sustainable, reactive, super toughened eco-composite blown films for flexible packaging applications. *Polymer Testing*, 83, 106130. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.106130>

PANICH, J., FONG, B., & SINGER, S. W. (2021). Metabolic Engineering of *Cupriavidus necator* H16 for Sustainable Biofuels from CO<sub>2</sub>. *Trends in Biotechnology*, 39(4), 412–424. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.01.001>

PARVIZIFARD, M., & KARBASI, S. (2020). Physical, mechanical and biological performance of PHB-Chitosan/MWCNTs nanocomposite coating deposited on bioglass based scaffold: Potential application in bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 645–662. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.266>

PEARCE, R., & MARCHESSAULT, R. (1994). Multiple melting in blends of isotactic and atactic poly(β-hydroxybutyrate). *Polymer*, 35(18), 3990–3997. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(94\)90285-2](https://doi.org/10.1016/0032-3861(94)90285-2)

PEDRA AGROINDUSTRIAL, Linha do tempo. Disponível em: <<https://www.pedraagroindustrial.com.br/linha-do-tempo/>>. Acesso em: 20 de nov. de 2023.

PHILIP, S. E., KESHAVARZ, T., & ROY, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82(3), 233–247. <https://doi.org/10.1002/jctb.1667>

PILAPITIYA, P. N. T., & RATNAYAKE, A. S. (2024). The world of plastic waste: A review. *Cleaner Materials*, 11, 100220. <https://doi.org/10.1016/j.clema.2024.100220>

POIRIER, Y., DENNIS, D., KLOMPARENS, K. L., & SOMERVILLE, C. (1992). Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science*, 256(5056), 520–523. <https://doi.org/10.1126/science.256.5056.520>  
polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 607-619, 2005

PURCEL, J., SAYYAD, K., HEINZMANN, L., AWRAMENKO, S., DORNER-MÜLLER, S. (2023). Plastic pollution: Pathways to net zero. *Credit Suisse Center for Sustainability* (CfS). [https://www.credit-suisse.com/media/assets/corporate/docs/news-and-expertise/articles/2023/06/plastic-pollution-pathways-to-netzero-report-en.pdf](https://www.credit-suisse.com/media/assets/corporate/docs/news-and-expertise/articles/2023/06/plastic-pollution-pathways-to-net-zero-report-en.pdf)

QURESHI, D., NAYAK, S. K., MAJI, S., KIM, D., BANERJEE, I., & PAL, K. (2019). Carrageenan: A Wonder Polymer from Marine Algae for Potential Drug Delivery Applications.

*Current Pharmaceutical Design*, 25(11), 1172–1186.  
<https://doi.org/10.2174/1381612825666190425190754>

RAMADAS, N. V., SINGH, S. K., SOCCOL, C. R., & PANDEY, A. (2009). Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(1), 17–23. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132009000100003>

RIBEIRO, L. B., SILVA, F.L.H, OLIVEIRA, M.F, CARVALHO, J.A.R, ALMEIDA, A. F., SANTOS, S.F.M. (2022) Alcoholic fermentation: use of ozoneclarified juice from different stages of the sugar and ethanol industry process. *Rev. Principia*. <https://doi.org/10.18265/1517-0306a2021id4847>

RIBEIRO, L. B.; **Fermentação alcóolica a partir de caldos ozonizados de diferentes etapas do processo da indústria sucroalcoleira.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - UFPB, João Pessoa-PB, 2017.

RUFFOLO, J. A., & MADANI, A. (2024). Designing proteins with language models. *Nature Biotechnology*, 42(2), 200–202. <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02123-4>

RÝGLOVÁ, Š., BRAUN, M., & SUCHÝ, T. (2017). Collagen and Its Modifications-Crucial Aspects with Concern to Its Processing and Analysis. *Macromolecular Materials and Engineering*, 302(6), 1600460. <https://doi.org/10.1002/mame.201600460>

SAEED, S., FIRYAL, S., TAYYAB, M. IRFAN, M., UDDIN, A.M., MEHMOOD, T. (2024). Bioconversion of apple peels (*Malus domestica*) to polyhydroxybutyrate using statistical design to optimize process parameters through *Bacillus thuringiensis* via solid-state fermentation. *Biomass Convers Biorefin*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02762-0>

SAHU, O. (2018). Assessment of sugarcane industry: Suitability for production, consumption, and utilization. *Annals of Agrarian Science*, 16(4), 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.08.001>

SAKTHISELVAN, P., & MADHUMATHI, R. (2018). Kinetic evaluation on cell growth and biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus safensis* EBT1 from sugarcane bagasse. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 11(3), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.eaef.2018.03.003>

SAMANTARAY, P. K., LITTLE, A., HADDLETON, D. M., MCNALLY, T., TAN, B., SUN, Z., HUANG, W., JI, Y., & WAN, C. (2020). Poly(glycolic acid) (PGA): a versatile building block expanding high performance and sustainable bioplastic applications. *Green Chemistry*, 22(13), 4055–4081. <https://doi.org/10.1039/d0gc01394c>

SAMIR, A., ASHOUR, F. H., HAKIM, A. A. A., & BASSYOUNI, M. (2022). Recent advances in biodegradable polymers for sustainable applications. *Npj Materials Degradation*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41529-022-00277-7>

SANTA ANNA, L. M., SEBASTIAN, G. V., PEREIRA, N., ALVES, T. L. M., MENEZES, E. P., FREIRE, D. M. G. (2001). Production of biosurfactant from a new and promising strain of

Pseudomonas aeruginosa PA1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91–93(1–9), 459–468. <https://doi.org/10.1385/abab:91-93:1-9:459>

SANTOS, E. B. C., BARROS, J. J. P., MOURA, D. A., MORENO, C. G., FIM, F. C., & SILVA, L. B. (2019). Rheological and thermal behavior of PHB/piassava fiber residue-based green composites modified with warm water. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(1), 531–540. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2018.05.005>

SANTOS, T. I. D., DANTAS, A. C. S., OLIVIER, N. C., MOREIRA, A., OLIVEIRA, C., MOURA, J. A. S. (2024) Production of PHB Scaffolds Reinforced with HAp Through Electrospinning. *Mater. Res.* <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2023-0472>

SARATALE, G. D., & OH, M. K. (2015). Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from Ralstonia eutropha using an alkali-pretreated biomass feedstock. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 627–635. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.034>

SARAVANAN, K., SUBRAMANIAM, Y., & KATHIRVEL, P. (2023). Valorization of custard apple (*Annona squamosa*) waste through polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus megaterium* MAPCS4: optimization, characterization, and biodegradation studies. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04691-y>

SATTAR, H., BIBI, Z., KAMRAN, A., AMAN, A., & QADER, S. A. U. (2019). Degradation of complex casein polymer: Production and optimization of a novel serine metalloprotease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101256. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101256>

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. (2001). **Biotecnologia industrial** - vol. 2: *engenharia bioquímica*. São Paulo: Blucher.

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

SHALIN, T., SINDHU, R., BINOD, P., SOCCOL, C. R., & PANDEY, A. (2014). Mixed cultures fermentation for the production of poly-SS-hydroxybutyrate. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 644–652. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132013005000016>

SHARMA, R., KUCHE, K., THAKOR, P., BHAVANA, V., SRIVASTAVA, S., MEHRA, N. K., & JAIN, S. (2022). Chondroitin Sulfate: Emerging biomaterial for biopharmaceutical purpose and tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 286, 119305. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119305>

SHARMA, V., SEHGAL, R., & GUPTA, R. (2021). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and modifications. *Polymer*, 212, 123161. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123161>

SHEKH, M. I., PATEL, D. M., PATEL, N. N., PATEL, U. S., PATEL, K. P., & PATEL, R. M. (2018). Methacrylate copolymers and their composites with nano-CdS: synthesis, characterization, thermal behavior, and antimicrobial properties. *International Journal of Industrial Chemistry*, 9(2), 153–166. <https://doi.org/10.1007/s40090-018-0146-3>

SIKKEMA, R., KEOHAN, B., & ZHITOMIRSKY, I. (2021). Alginic acid Polymer-Hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Polymers*, 13(18), 3070. <https://doi.org/10.3390/polym13183070>

SILVA, A. N., & FRÍSCIO, F. C. (2021). A química do pão de fermentação natural e as transformações na nossa relação com o preparo desse alimento. *Química Nova Na Escola*, 43(3). <https://doi.org/10.21577/0104-8899.20160239>

SILVA, D. C. P., MENEZES, L. R., Silva, P. S. R. C., & Tavares, M. I. B. (2021). Evaluation of thermal properties of zirconium-PHB composites. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 143(1), 165–172. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-09106-7>

ŠIMON, P. (2004). Isoconversional methods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 76(1), 123–132. <https://doi.org/10.1023/b:jtan.0000027811.80036.6c>

SIONKOWSKA, A., GADOMSKA, M., MUSIAŁ, K., & PIĄTEK, J. (2020). Hyaluronic acid as a component of natural polymer blends for biomedical applications: A review. *Molecules*, 25(18), 4035. <https://doi.org/10.3390/molecules25184035>

SIROHI, R., PANDEY, J. P., GAUR, V. K., GNANSOUNOU, E., & SINDHU, R. (2020). Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). *Bioresource Technology*, 311, 123536. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123536>

SMITHERS, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold.’ *International Dairy Journal*, 18(7), 695–704. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>

SOHN, Y. J., SON, J., JO, S. Y., PARK, S. Y., YOO, J. I., BARITUGO, K., NA, J. G., CHOI, J., KIM, H. T., JOO, J. C., & PARK, S. J. (2021). Chemoautotroph *Cupriavidus necator* as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem: A review. *Bioresource Technology*, 340, 125693. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125693>

SONI, S., CHHOKAR, V., BENIWAL, V., KUMAR, R., BADGUJJAR, H., CHAUHAN, R., DUDEJA, S., & KUMAR, A. (2023). Cost effective media optimization for PHB production by *Bacillus badius* MTCC 13004 using the statistical approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123575. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123575>

SUDESH, K., ABE, H., & DOI, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503–1555. [https://doi.org/10.1016/s0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/s0079-6700(00)00035-6)

SUNITA, A., RAMALINGAM, K., MOUMITA, B., SAMUEL J., DEBAJYOTI K. (2024). “Advancements in microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from wastes for sustainable active food packaging: An eclectic review”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 60, 103288. DOI: 10.1016/j.bcab.2024.103288

SURIYAMONGKOL, P., WESELAKE, R. J., NARINE, S. S., MOLONEY, M. M., & SHAH, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in

microorganisms and plants — A review. *Biotechnology Advances*, 25(2), 148–175. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.007>

SURYAWANSHI, S. S., SARJE, S. S., LONI, P. C., BHUJBAL, S., KAMBLE, P. P. (2020) Bioconversion of Sugarcane Molasses into Bioplastic (Polyhydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* 2156 under Statistically Optimized Culture Conditions. *Anal. Chem. Lett.* <https://doi.org/10.1080/22297928.2020.1746197>

SUSITHRA, K., NARAYANAN, K.B., RAMESH, U., RAJA, C. E., PREMKUMAR, G., VARATHARAJU, G., VIJAYAKUMAR, A., KANNAN, M., RAJARATHINAM, K. (2021). Statistical Optimization of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Biosynthesis Using the Spent Mushroom Substrate by *Bacillus tequilensis* PSR-2. *Waste Biomass Valor.* <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01460-8>

SUTTIWIJITPUKDEE, N., SATO, H., ZHANG, J., HASHIMOTO, T., & OZAKI, Y. (2010). Intermolecular interactions and crystallization behaviors of biodegradable polymer blends between poly (3-hydroxybutyrate) and cellulose acetate butyrate studied by DSC, FT-IR, and WAXD. *Polymer*, 52(2), 461–471. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.11.021>

SUWANAMORNLERT, P., KERDDONFAG, N., SANE, A., CHINSIRIKUL, W., ZHOU, W., & CHONHENCHOB, V. (2020). Poly(lactic acid)/poly(butylene-succinate-co-adipate) (PLA/PBSA) blend films containing thymol as alternative to synthetic preservatives for active packaging of bread. *Food Packaging and Shelf Life*, 25, 100515. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100515>

SUWANNASING, W., IMAI, T., & KAEWKANNETRA, P. (2015). Cost-effective defined medium for the production of polyhydroxyalkanoates using agricultural raw materials. *Bioresource Technology*, 194, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.087>

TAIB, N. A. B., RAHMAN, M. R., HUDA, D., KUOK, K. K., HAMDAN, S., BAKRI, M. K. B., JULAIHI, M. R. M., & KHAN, A. (2022). A review on poly lactic acid (PLA) as a biodegradable polymer. *Polymer Bulletin*, 80(2), 1179–1213. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04160-y>

THU, N. T. T., HOANG, L. H., CUONG, P. K., VIET-LINH, N., NGA, T. T. H., KIM, Đ. Đ., LEONG, Y. K., & NHI-CONG, L. T. (2023). Evaluation of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Pichia* sp. TSLS24 yeast isolated in Vietnam. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28220-z>

TOKIWA, Y., CALABIA, B. P., UGWU, C. U., & AIBA, S. (2009). Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. (2012). *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artesmed.

TU, W., CHU, H., HUANG, C., CHEN, C., OU, C., GUO, G. (2022). Polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator* with inedible rice. *BioResources*. <https://doi.org/10.15376/biores.17.2.2202-2213>

UPDEGRAFF, D. M. (1971). Utilization of cellulose from waste paper by *Myrothecium verrucaria*. *Biotechnol. Bioeng.* <https://doi.org/10.1002/bit.260130106>

VAHABI, H., MICHELY, L., MORADKHANI, G., AKBARI, V., COCHEZ, M., VAGNER, C., RENARD, E., SAEB, M. R., & LANGLOIS, V. (2019). Thermal stability and flammability behavior of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) based composites. *Materials*, 12(14), 2239. <https://doi.org/10.3390/ma12142239>

VALDEZ-CALDERÓN, A., BARRAZA-SALAS, M., QUEZADA-CRUZ, M., ISLAS-PONCE, M. A., ANGELES-PADILHA, A. F., CARRILLO-IBARRA, S., RODRIGUEZ, M., ROJAS-AVELIZAPA, N. G., GARRIDO-HERNÁNDEZ, A., RIVAS- CASTILLO, A. M. (2022) Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by a novel *Klebsiella pneumoniae* strain using low-cost media from fruit peel residues. *Biomass Convers Biorefin.* <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01147-5>

VANDAMME, P., & COENYE, T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Internacional journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(6), 2285–2289. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.63247-0>

VANDENBERGHE, L. P. S., VALLADARES-DIESTRA, K. K., BITTENCOURT, G. A., TORRES, L. A. Z., VIEIRA, S., KARP, S. G., SYDNEY, E. B., DE CARVALHO, J. C., SOCCOL, V. T., & SOCCOL, C. R. (2022). Beyond sugar and ethanol: The future of sugarcane biorefineries in Brazil. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 167, 112721. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112721>

VEGA-CASTRO, O., LEÓN, E., ARIAS, M., CESARIO, M. T., FERREIRA, F., FONSECA, M. M. R., SEGURA, A., VALENCIA, P., SIMPSON, R., NUÑEZ, H., CONTRERAS-CALDERON, J. (2021). Characterization and Production of a Polyhydroxyalkanoate from Cassava Peel Waste: Manufacture of Biopolymer Microfibers by Electrospinning. *J. Polym. Environ.* <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01861-1>

VERLINDEN, R. A. J., HILL, D. J., KENWARD, M., WILLIAMS, C. D., PIOTROWSKA-SEGET, Z., & RADECKA, I. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-11>

VICENTIN, R. P., SANTOS, J. V. D., LABORY, C. R. G., COSTA, A. M., SOUZA MOREIRA, F. M., & ALVES, E. (2018). Tolerance to and Accumulation of Cadmium, Copper, and Zinc by *Cupriavidus necator*. *Revista Brasileira De Ciência Do Solo*, 42(0). <https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20170080>

VOGT, B. D., STOKES, K. K., & KUMAR, S. K. (2021). Why is Recycling of Postconsumer Plastics so Challenging? *ACS Applied Polymer Materials*, 3(9), 4325–4346. <https://doi.org/10.1021/acsapm.1c00648>

VU, D. H., MAHBOUBI, A., ROOT, A., HEINMAA, I., TAHERZADEH, M. J., & ÅKESSON, D. (2022). Thorough Investigation of the Effects of Cultivation Factors on Polyhydroalkanoates (PHAs) Production by *Cupriavidus necator* from Food Waste-Derived Volatile Fatty Acids. *Fermentation*, 8(11), 605. <https://doi.org/10.3390/fermentation8110605>

- WANG, C., HSU, C., & HWANG, I. (2008). Scaling laws and internal structure for characterizing electrospun poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers. *Polymer*, 49(19), 4188–4195. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.07.033>
- WANG, J., & ZHUANG, S. (2022). Chitosan-based materials: Preparation, modification and application. *Journal of Cleaner Production*, 355, 131825. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131825>
- WEI, Y-H., CHEN, W-C., HUANG, C-K., WU, H-S., SUN, Y-M., LO, C-W., JANARTHANAN, O-M. (2011) Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms12010252>
- WENG, Y., WANG, X., & WANG, Y. (2011). Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. *Polymer Testing*, 30(4), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2011.02.001>
- WUSIGALE, LIANG, L., & LUO, Y. (2020). Casein and pectin: Structures, interactions, and applications. *Trends in Food Science and Technology*, 97, 391–403. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.027>
- XIANG, H. X., WANG, S. C., WANG, R. L., WEN, X. S., ZHOU, Z., & ZHU, M. F. (2014). Synthesis, structure and thermal properties of poly(A-block-B-block-A) copolymer based on biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and amorphous polystyrene. *Materials Research Innovations*, 18(sup4), S4-868. <https://doi.org/10.1179/1432891714z.000000000793>
- XIANG, H., WEN, X., MIU, X., LI, Y., ZHOU, Z., & ZHU, M. (2016). Thermal depolymerization mechanisms of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Progress in Natural Science Materials International*, 26(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2016.01.007>
- XIE, Y., NODA, I., & AKPALU, Y. A. (2008). Influence of cooling rate on the thermal behavior and solid-state morphologies of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(4), 2259–2268. <https://doi.org/10.1002/app.28278>
- XU, Y., WANG, R., KOUTINAS, A., & WEBB, C. (2010). Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochemistry*, 45(2), 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.001>
- YADAV, B., TALAN, A., TYAGI, R.D., DROGUI, P. (2021) Concomitant production of value-added products with polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis: a review. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH>
- YADAV, J. S., YAN, S., PILLI, S., KUMAR, L., TYAGI, R. D., & SURAMPALLI, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6), 756–774. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>

- YANG, C., TANG, H., WANG, Y., LIU, Y., WANG, J., SHI, W., & LI, L. (2019). Development of PLA-PBSA based biodegradable active film and its application to salmon slices. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100393. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100393>
- YANG, J., SHEN, M., WEN, H., LUO, Y., HUANG, R., RONG, L., & XIE, M. (2020). Recent advance in delivery system and tissue engineering applications of chondroitin sulfate. *Carbohydrate Polymers*, 230, 115650. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115650>
- YEO, S., TAN, W., BAKAR, M. A., & ISMAIL, J. (2010). Silver sulfide/poly(3-hydroxybutyrate) nanocomposites: Thermal stability and kinetic analysis of thermal degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 95(8), 1299–1304. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.02.025>
- ZAINAL, S. H., MOHD, N. H. H., SUHAILI, N., ANUAR, F. H., LAZIM, A. M., & OTHAMAN, R. (2021). Preparation of cellulose-based hydrogel: a review. *Journal of Materials Research and Technology*, 10, 935–952. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.12.012>
- ZANFONATO, K., SCHMIDT, M., QUINES, L.K., GAI, C.S, SCHMIDELL, W., ARAGÃO, G.M.F. (2018) Can vinasse be used as carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator DSM 545? *Braz. J. Chem. Eng.* <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180353s20170265>
- ZENEBO, O., PASCUET, N. S., TIGLEA, P. (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4th edn. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo
- ZHANG, J., DUAN, R., TIAN, Y., & KONNO, K. (2009). Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 116(1), 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.053>
- ZHANG, J., SATO, H., NODA, I., OZAKI, Y. (2005). Conformation Rearrangement and Molecular Dynamics of Poly(3-hydroxybutyrate) during the Melt-Crystallization Process Investigated by Infrared and Two-Dimensional Infrared Correlation Spectroscopy. *Macromol.* <https://doi.org/10.1021/ma0501343>
- ZHANG, J., SU, P., CHEN, H., QIAO, M., YANG, B., & ZHAO, X. (2022). Impact of reactive oxygen species on cell activity and structural integrity of Gram-positive and Gram-negative bacteria in electrochemical disinfection system. *Chemical Engineering Journal*, 451, 138879. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138879>
- ZHONG, Y., GODWIN, P. M., JIN, Y., & XIAO, H. (2020). Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.002>
- ZULKIFLEE, I., & FAUZI, M. B. (2021). Gelatin-Polyvinyl alcohol Film for Tissue Engineering: A Concise Review. *Biomedicines*, 9(8), 979. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080979>