UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

GABRIEL SILVA DA ROCHA

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR *Cupriavidus necator* CCT 2489 EM EXTRATO AQUOSO DA ALGAROBA (*Prosopis juliflora*)

JOÃO PESSOA – PB

2026

GABRIEL SILVA DA ROCHA

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR *Cupriavidus necator* CCT 2489 EM EXTRATO AQUOSO DA ALGAROBA (*Prosopis juliflora*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Profª. Drª. Andréa Farias de Almeida.
Coorientadora: Profª. Drª. Cristiani Viegas Brandão Grisi.

JOÃO PESSOA – PB

2026

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R672o Rocha, Gabriel Silva da.
Otimização da produção de polihidroxialcanoatos por Cupriavidus necator CCT 2489 em extrato aquoso da algaroba (Prosopis juliflora) / Gabriel Silva da Rocha. - João Pessoa, 2026.
70 f. : il.

Orientação: Andréa Farias de Almeida.
Coorientação: Cristiani Viegas Brandão Grisi.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Biopolímero. 2. Substratos renováveis. 3. Estratégias de cultivo. 4. Caracterização. I. Almeida, Andréa Farias de. II. Grisi, Cristiani Viegas Brandão. III. Título.

UFPB/BC CDU 577.11(043)

Elaborado por RUSTON SAMMEVILLE ALEXANDRE MARQUES DA SILVA - CRB-15/0386

GABRIEL SILVA DA ROCHA

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR *Cupriavidus necator* CCT 2489 EM EXTRATO AQUOSO DA ALGAROBA (*Prosopis juliflora*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br
ANDREA FARIAS DE ALMEIDA
Data: 02/06/2026 19:09:44-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida – DBTC/UFPB
(Orientadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br
CRISTIANI VIEGAS BRANDAO GRISI
Data: 03/06/2026 09:06:06-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Cristiani Viegas Brandão Grisi – DQ/UFPB
(Coorientadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br
LUCINEIDE BALBINO DA SILVA
Data: 03/06/2026 09:31:53-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Lucineide Balbino da Silva – DEMAT/UFPB
(Examinadora Externa)

Documento assinado digitalmente
gov.br
CAROLINA LIMA CAVALCANTI DE ALBUQUERQU
Data: 03/06/2026 09:49:41-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Carolina Lima Cavalcanti de Albuquerque – DTA/UFPB
(Examinadora Interna)

AGRADECIMENTOS

A Deus pai, todo poderoso, e a Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, por me cumular de bênçãos e graças ao longo de todo o mestrado, bem como, agradeço por toda a força, sabedoria, persistência e ânimo que me acompanharam em todos os momentos.

Aos meus pais, Gilson e Rita, por todo o incentivo, carinho, amor e por me animar nos dias difíceis e por nunca me deixarem perder a fé e a certeza de que tudo iria dar certo.

As minhas orientadoras, Profª Andréa e Profª Cristiane, por todo o empenho, orientação, dedicação e, principalmente, paciência comigo.

Aos amigos da turma de mestrado, Edivânia, João, Gilvan, Martha, Rodrigo, Ronald e Carlos, por todo o auxílio nas disciplinas que tive dificuldades. Um agradecimento especial a Edivânia, João e Gilvan que me ajudaram a levar o mestrado com mais leveza, compartilhando as dores nos momentos difíceis e rindo juntos nos momentos de alegria.

Ao secretário do programa, o senhor Fabrício, uma pessoa muito gentil e solícita que me atendeu em todas as minhas dúvidas sempre demonstrando gentileza comigo e todos ao meu redor.

As técnicas Clênia, Juliana, Geisa e Teresa Cristina que me forneceram materiais e maquinário vitais para realizar meus experimentos sempre me respondendo com grande solicitude.

Aos amigos de bancada do LEBp Natanael, Bárbara e Malu onde compartilhamos nossas histórias, causos, sonhos e angústias, sempre buscando a melhoria do laboratório e as boas práticas de convivência.

As professoras Lucineide e Carolina pela presença na banca julgadora da minha dissertação.

Ao professor Felipe Brum que, de forma muito solícita e companheira, auxiliou-me nas análises de coloração da bactéria, bem como, no manuseio e análise em microscopia de fluorescência.

Agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ-PB) pela bolsa de estudos concedida durante o desenvolvimento do meu mestrado.

RESUMO

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são polímeros naturais e biodegradáveis que podem ser produzidos por diversas linhagens bacterianas dos gêneros *Pseudomonas, Cupriavidus* e *Bacillus,* e obtidos, principalmente, a partir de biomassa renovável. As fontes mais comuns são cana-de-açúcar, milho, algas, mandioca e até resíduos agroindustriais. Contudo, estratégias devem ser pensadas para otimizar a produção dos biopolímeros, dentre as quais destaca-se o reaproveitamento de resíduos orgânicos com potencial fermentescível para o desenvolvimento dos microrganismos produtores. O nordeste brasileiro possui grande disponibilidade de biomassa renovável, como exemplo, a algaroba (*Prosopis juliflora*). A vagem da algaroba apresenta altas concentrações de carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos, o que a torna substrato potencial para a biossíntese de PHAs. Neste contexto, a hipótese do estudo foi analisar estratégias de produção dos polihidroxialcanoatos por *Cupriavidus necator* CCT 2489, utilizando o extrato aquoso da algaroba como substrato suplementado com óleo de soja comercial. Para otimização do processo foi realizado um planejamento fatorial 2^2, cujos fatores foram: a razão de aeração nos níveis 0,4; 0,5 e 0,6 e a quantidade de óleo de soja nos níveis 0,0; 0,5 e 1,0 g, e como variável resposta, a concentração de biopolímero. Os experimentos foram conduzidos em incubadora rotativa orbital (150 rpm e 37 ºC) utilizando frascos Erlenmeyer de 250mL durante 96 h de cultivo. Amostras foram retiradas a cada 2 h para determinação da concentração de PHAs. Para caracterização do PHA produzido foram realizadas análises por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - FTIR, difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As análises morfológicas da linhagem *C. necator* por microscopia de fluorescência também foram realizadas após o cultivo. Os resultados obtidos demonstraram que quantidades maiores do que 1 g de óleo de soja e razão de aeração menor que 0,4 tenderam a favorecer o acúmulo de PHA, sugerindo que condições de maior oferta de oxigenação e suplementação lipídica são mais adequadas para a biossíntese do polímero. Os resultados para caracterização do PHA extraído mostraram por meio de FTIR bandas características típicas dos grupos funcionais e ligações químicas que corresponderam aos PHAs. Os difratogramas de raios X apresentaram picos alinhados e bem definidos nas regiões cristalinas do PHA comercial e menor intensidade no biopolímero produzido inferindo uma região amorfa. A análise elementar do biopolímero produzido mostra predominância de carbono e hidrogênio nas concentrações de 52,05% e 7,12%, indicando baixo nível de impurezas correspondente ao nitrogênio presente no PHA bacteriano e ausente no PHA comercial. Esta observação pode ser explicada pelo fato do PHA produzido não ser purificado. As microfilmagens destacaram poros ou fissuras que influenciaram significativamente as propriedades do material, o grânulo do PHA bacteriano apresenta menos fissuras do que o PHA comercial analisado e, por consequência, sua solubilidade pode ter sido influenciada, pois ficaram mais intumescidos em ácido acético após 48h do que em água ou clorofórmio. Em vista dos resultados, a estratégia para otimizar a produção de PHAs por *C. necator* CCT 2489 utilizando o óleo de soja como indutor foi bem-sucedida.

Palavras-chave: Biopolímero; Substratos renováveis; Estratégias de cultivo; Caracterização.

ABSTRACT

The polyhydroxyalkanoates (PHAs) are natural and biodegradable polymers that can be produced by various bacterial strains of the genera Pseudomonas, Cupriavidus, and Bacillus, and are mainly obtained from renewable biomass. The most common sources are sugarcane, corn, algae, cassava, and even agro-industrial waste. However, strategies must be devised to optimize biopolymer production, among which the reuse of organic waste with fermentable potential for the development of producing microorganisms stands out. Northeastern Brazil has a large availability of renewable biomass, such as the mesquite (Prosopis juliflora). The mesquite pod has high concentrations of carbohydrates, proteins, and organic acids, making it a potential substrate for PHA biosynthesis. In this context, the hypothesis of this study was to analyze production strategies of polyhydroxyalkanoates by Cupriavidus necator CCT 2489 using aqueous extract of mesquite as a substrate supplemented with commercial soybean oil. To optimize the process, a 2^2 factorial design was carried out, with the factors analyzed being aeration ratio at levels 0.4, 0.5, and 0.6, and the amount of soybean oil at levels 0.0, 0.5, and 1.0 g, and the biopolymer concentration as the response variable. The experiments were conducted in a rotary orbital incubator (150 rpm and 37 °C) using 250 mL Erlenmeyer flasks for 96 h of cultivation. Samples were taken every 2 h to determine PHA concentration. To characterize the produced PHA, analyses were performed using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction, scanning electron microscopy, and gas chromatography coupled with mass spectrometry. Morphological analyses of the C. necator strain using fluorescence microscopy were also performed after cultivation. The results showed that concentrations greater than 1 g of soybean oil and an aeration ratio less than 0.4 tended to favor PHA accumulation, suggesting that conditions with higher oxygenation and lipid supplementation are more suitable for polymer biosynthesis. Characterization of the extracted PHA showed, through Fourier transform infrared spectroscopy, characteristic bands typical of functional groups and chemical bonds corresponding to PHAs. X-ray diffractograms of commercial PHA and produced PHA showed aligned and well-defined peaks in the crystalline regions of the produced sample and lower intensity in the commercial PHA, suggesting a semi-crystalline region. Elemental analysis of the produced biopolymer shows a predominance of carbon and hydrogen at concentrations of 52,05% and 7,12%, respectively, indicating a low level of impurities corresponding to the nitrogen present in bacterial PHA and absent in commercial PHA. This observation can be explained by the fact that the produced PHA was not purified. Microfilms highlighted pores or fissures that significantly influenced the material's properties. The bacterial granule presents fewer fissures than the commercial one analyzed, and consequently, its solubility may have been influenced, as it became more swollen in acetic acid after 48 hours than in water or chloroform. Based on the results, the strategy to optimize PHA production by C. necator CCT 2489 strain using soybean oil as an inducer was successful, although the characterization analyses performed have not yet allowed for a structural definition of the produced biopolymer.

Keywords: Biopolymer; Renewable substrates; Cultivation strategies; Characterization..

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Esquema estrutural dos principais polímeros petroquímicos. 14
Figura 3.2 - Representação geral dos PHAs: “R” denota um dos radicais mostrados na tabela, 100-30000 representa o número de repetições do(s) monômero(s) (que podem ser arranjados em tandem ou aleatoriamente) e “x” significa o número de grupos CH2 dentro da cadeia principal de cada monômero. 16
Figura 3.3 - Rotas metabólicas para síntese microbiana de polihidroxialcanoato. 22
Figura 4.1 - Esquema ilustrativo das metodologias aplicadas para a produção e caracterização de PHA por Cupriavidus necator CCT 2489 com uso do extrato da vagem de algaroba como substrato. 27
Figura 4.2 - Fluxograma simplificado do processo de fabricação do extrato da vagem de algaroba. 29
Figura 4.3 - Esquema ilustrativo do processo de extração do PHA. 32
Figura 5.1 - Diagrama de Pareto. 39
Figura 5.2 - Superfície de respostas e curvas de contorno. 41
Figura 5.3 - correlação entre o crescimento cinético, consumo de açúcar e peso seco do PHA produzido com as condições otimizadas. 42
Figura 5.4 - Espectro de RMN de 1H e espectro de RMN de 13C 45
Figura 5.5 - Espectrograma de FTIR comparando PHA bacteriano (a) e o PHA comercial (b) extraído após o processo fermentativo no extrato da vagem de algaroba. 48
Figura 5.6 - Perfis de difração de raios-X para PHA comercial (PHA COM) e PHA bacteriano (PHA BAC). 49
Figura 5.7 - Microscopia óptica com sobreposição (a), contraste de fase (b) e microscopia de fluorescência (c). 50
Figura 5.8 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia da superfície do grânulo bacteriano de PHA (a) e do grânulo de PHA comercial (b). 52
Figura 5.9 - Comparativo da análise de solubilidade entre os solventes: água (a), ácido acético (b), clorofórmio (c). 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Valores codificados e reais utilizados no delineamento composto central rotacional (DCCR) para produção de polihidroxialcanoatos (PHAs). 30
Tabela 5.1 - Matriz de delineamento experimental 22 com pontos axiais e repetições no ponto central, apresentando os efeitos (razão de aeração e quantidade de óleo de soja) com seus valores codificados, reais e o resultado da variável resposta (concentração de biopolímero). 37
Tabela 5.2 - Análise de variância para produção de polihidroxialcanoatos. 40
Tabela 5.3 - Composição elementar do polímero comercial e do polímero bacteriano. 43
Tabela 5.4 - Principais compostos de PHA obtido por CG-EM. 46

Lista de abreviaturas e siglas

AN – Ágar Nutriente

ANOVA – Análise de Variância

ART – açúcares redutores totais

C. necator – Cupriavidus necator

CCT – Coleção de Culturas Tropicais

$CDCl_3$ – Clorofórmio deuterado

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CN – Caldo Nutriente

D.O. – Densidade Óptica

DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DRX - Difração de Raios-X

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial*E. coli – Escherichia coli*

FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier*

lcl-PHAs – PHAs de cadeia longa

mcl-PHAs – PHAs de cadeia média

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

$p < 0,05$ – nível de significância estatística

P. juliflora – Prosopis juliflora

P.A. – Puro para Análise

pH – potencial hidrogeniônico

PHA - polihidroxialcanoatos

PHB – Polihidroxibutirato

PLA – Ácido Polilático

R. eutropha – Ralstonia eutropha

RMN – Ressonância Nuclear Magnética

rpm – rotações por minuto

scl-PHAs – PHAs de cadeia curta

TCA – ciclo do ácido cítrico

TGA - Análise Termogravimétrica

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
2 OBJETIVOS 12
2.1 OBJETIVO GERAL 12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 12
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 13
3.1 POLÍMEROS 13
3.2 BIOPOLÍMEROS E POLIHIDROXIALCANOATOS 14
3.3 ALGAROBA (*Prosopis juliflora*) 18
3.4 SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO VEGETAL DE SOJA 19
3.5 MICRORGANISMO *Cupriavidus necator* 21
3.6 APLICAÇÕES DE POLIHIDROXIALCANOATOS 23
3.7 ECONOMIA CIRCULAR 25
4 METODOLOGIA 27
4.1 MATERIAIS 27
4.2 MICRORGANISMO 28
4.3 PRÉ-INÓCULO 28
4.4 INÓCULO 28
4.5 PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DA ALGAROBA 28
4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO POLIHIDROXIALCANOATO 30
4.6.1. Determinação da concentração de biomassa microbiana 31
4.6.2. Determinação de açúcares redutores totais (ART) 31
4.7 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS PRODUZIDOS 32
4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS PRODUZIDOS 33
4.8.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier 33
4.8.2 Análise elementar 33
4.8.3 Ressonância Magnética Nuclear 33
4.8.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas 34
4.8.5 Coloração para microscopia de fluorescência e análise em microscopia de fluorescência 34
4.8.6 Microscopia eletrônica de varredura 35
4.8.7 Difração de raios-X 35

4.8.8 Análise da solubilidade 35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
5.1 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS 37
5.2 VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS 41
5.3 ANÁLISE ELEMENTAR 43
5.4 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO BIOPOLÍMERO 44
5.5 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO BIOPOLÍMERO 46
5.6 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DO BIOPOLÍMERO 47
5.7 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO BIOPOLÍMERO 48
5.8 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS BACTERIANAS 50
5.9 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO BIOPOLÍMERO 51
5.10 ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DO BIOPOLÍMERO 52
6 CONCLUSÕES 55
REFERÊNCIAS 57

1 INTRODUÇÃO

O termo “polímero” foi introduzido por Berzelius já no século XIX e desde então a indústria química desenvolveu projetos de materiais poliméricos com propriedades físicas e químicas muito bem definidas. A produção em larga escala do polietileno (PE), polipropileno (PP), e poliestireno (PS), por exemplo, revolucionou a fabricação de fibras artificiais, filmes plásticos, borrachas, embalagens. Esses novos materiais sintéticos superavam diversas macromoléculas naturais em termos de pureza, custo de produção e homogeneidade de propriedades. Porém, esses novos materiais resistem ao processo de intemperismo/degradação natural e tendem a perpetuar-se nos ambientes ao qual são inseridos poluindo de forma crônica sistemas aquáticos ou telúricos (NATARELLI et al., 2023).

A partir da segunda metade do século XX, as pesquisas por polímeros intensificaram-se, principalmente, com foco em biopolímeros, que são menos nocivos para a saúde humana e o meio ambiente (GIOSAFATTO et al., 2020). Os biopolímeros podem ser decompostos em moléculas mais simples no ambiente (MUKHERJEE E KOLLER, 2023) sendo classificados em três grupos, com base sobre sua origem: aqueles derivados da biomassa, incluindo polissacarídeos, proteínas (a exemplo do colágeno ou gelatina) e lipídios; aqueles produzidos a partir de intermediários derivados de matérias-primas renováveis, como derivados do ácido polilático (PLA); e aqueles produzidos por microrganismos, sendo os polihidroxialcanoatos (PHAs) os mais significativos e amplamente estudados (DINIZ et al., 2023; COSTA et al., 2023).

Os PHAs são poliésteres alifáticos produzidos por uma ampla variedade de microrganismos, incluindo linhagens dos gêneros *Pseudomonas, Cupriavidus e Bacillus* (ROND’OŠOVÁ et al., 2022). A linhagem *Cupriavidus necator* tem sido bastante explorada em pesquisas para produção de biopolímeros devido sua habilidade de utilizar para seu desenvolvimento uma variedade de substratos (MORLINO et al., 2023). Os PHAs apresentam características versáteis determinadas pelo tipo e pela distribuição dos monômeros em sua estrutura polimérica. Embora mais de 150 monômeros de hidroxialcanoato capazes de formar PHAs já tenham sido identificados, apenas algumas dessas estruturas atingiram escala e aplicabilidade industrial (KOLLER e MUKHERJEE, 2022).

Estes biopolímeros estão sendo usados na fabricação de garrafas, brinquedos, revestimentos de espuma e materiais de fibra. Isto devido as propriedades do PHA, as quais se assemelham às do polipropileno. Filmes de PHA e de misturas à base de PHA têm sido

utilizados em diversas aplicações agrícolas. Por exemplo, para cobertura de plantações os filmes feitos de PHA demonstraram uma taxa de degradação de 91% em um período de 90 dias (SHAHID et al., 2021). No entanto, a fragilidade e sua baixa resistência ao impacto limitam a aplicação do PHA no setor de embalagens de alimentos. Este problema pode ser superado pela copolimerização com outros monômeros. Para além disso, a proporção de monômeros pode ser variada para produzir bioplásticos com propriedades mecânicas aprimoradas (REDDY et al., 2022).

As fontes de carbono são cruciais na produção de PHAs porque fornecem os blocos de construção necessários para a síntese do polímero e a energia requerida pelos microrganismos para o crescimento. Tradicionalmente, açúcares simples como glicose e sacarose têm sido as fontes de carbono preferidas para a produção de PHA. Esses açúcares são facilmente metabolizados pela maioria das bactérias produtoras de PHA, que podem crescer rapidamente e acumular PHAs em condições favoráveis (GETINO; MARTÍN e CHAMIZO-AMPUDIA, 2024). No entanto, o uso dessas fontes de carbono tradicionais pode ser caro, principalmente em larga escala (BONG et al., 2021). Como resultado, tem havido um crescente interesse na utilização de fontes de carbono alternativas e mais sustentáveis, particularmente resíduos industriais e agrícolas, que podem ser abundantes, baratos e renováveis (CARVALHO et al., 2025).

Os resíduos agroindustriais, como palha de milho, melaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e cascas de frutas, foram identificados como fontes de carbono viáveis para a produção de PHA (GETINO; MARTÍN e CHAMIZO-AMPUDIA, 2024). Esses resíduos são frequentemente ricos em carboidratos, ácidos graxos e outros compostos orgânicos, que podem ser convertidos em açúcares fermentáveis ou ácidos graxos voláteis por meio de processos de pré-tratamento (CARVALHO et al., 2025).

Para além disso, o extrato aquoso da algaroba (*Prosopis juliflora*) apresenta-se como potencial fonte de carbono devido à alta concentração de carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos que são favoráveis para produção de PHA. Neste contexto, a hipótese do estudo foi analisar a otimização da produção de polihidroxialcanoato por *Cupriavidus necator* CCT 2489 usando o extrato aquoso da algaroba como substrato não convencional variando as concentrações do óleo vegetal de soja e razão de aeração.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de polihidroxialcanoatos a partir da linhagem bacteriana de *Cupriavidus necator* CCT 2489 e extrato aquoso da algaroba como meio de cultivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a suplementação do extrato aquoso da algaroba com óleo vegetal de soja como indutor da produção de PHAs;
- Realizar um planejamento experimental do tipo DCCR 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 5 repetições no ponto central totalizando 13 ensaios.
- Realizar a caracterização do biopolímero produzido por meio de FTIR, RMN e cromatografia gasosa;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 POLÍMEROS

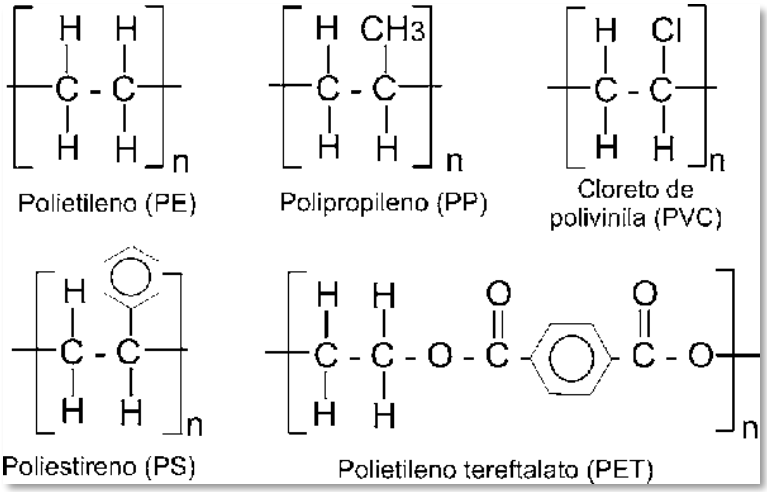
A palavra “polímero” foi introduzida por Jöns Jacob Berzelius na década de 1830 para descrever moléculas nas quais os mesmos grupos atômicos eram arranjados repetidamente. Ele considerou o benzeno (C_6H_6) como um polímero de acetileno (C_2H_2). Ao longo dos anos, o termo cobriu moléculas com um número de átomos cada vez maior, até que eventualmente foi usado para denotar as macromoléculas longas e flexíveis formadas por unidades múltiplas de repetição conhecidas como *meros* (*mero* é a palavra grega para partes). Assim, aquelas macromoléculas que apresentavam em sua estrutura unidades de repetição bem definidas foram classificadas como “polímeros” (poli é a palavra grega para muitos) (MORAWETZ, 2002; NATARELLI et al., 2023).

Em 1920, o químico alemão Hermann Staudinger publicou um artigo científico intitulado *Über Polymerisation* (*On Polymerization*). Nesse artigo, ele foi o primeiro pesquisador a propor uma estrutura molecular para a borracha. Em seu trabalho foi apresentado que cada molécula de borracha (polímero derivado do isopreno) seria composta por uma cadeia de unidades químicas idênticas (meros). Ele também afirmou que os comportamentos mecânicos da borracha (elevada elasticidade e resistência à tração) são resultado do grande comprimento dessas cadeias, ou seja, de sua elevada massa molar. Anos depois, Staudinger denominou tais moléculas de elevada massa molar de *Makromolekül* (macromoléculas) (NATARELLI et al., 2023).

As décadas de 1930 e 1940 marcaram um crescimento exponencial na descoberta e desenvolvimento de diversos polímeros sintéticos. Nessas décadas vários cientistas tanto nas universidades quanto nas indústrias estudavam rotas de síntese para conversão de monômeros abundantes e baratos em materiais poliméricos. Isso, por sua vez, permitiu o projeto de materiais poliméricos com propriedades físicas e químicas muito bem definidas. A produção em larga escala do polietileno (PE), polipropileno (PP), poliamidas (PA), neopreno (a primeira borracha sintética), politetrafluoroetileno (PTFE) e poliestireno (PS) (Figura 3.1) revolucionou a fabricação de fibras artificiais, filmes plásticos, borrachas, embalagens e adesivos. Esses novos materiais sintéticos superavam diversas macromoléculas naturais em termos de pureza, custo de produção e homogeneidade de propriedades (MORAWETZ, 2002; NATARELLI et al., 2023).

Todavia, o descarte e uso incorreto de produtos plásticos pode levar à migração de moléculas de baixa massa molar como resíduos monoméricos (estireno, bisfenol-A, formaldeído etc.) e aditivos (ftalatos, óxidos etc.) para o meio ambiente. Uma preocupação mundial crescente é que um grande volume de polímeros não biodegradáveis é descartado de forma inadequada. Esses resíduos são submetidos ao intemperismo e à fotodegradação resultando em pequenos fragmentos plásticos denominados de microplásticos. Muitos desses materiais apresentam menor densidade que a água e, uma vez que adentrem sistemas aquáticos ou telúricos, sua retirada e/ou separação se torna uma missão árdua e de alto custo econômico (NATARELLI et al*.,* 2023).

Figura 3.1 - Esquema estrutural dos principais polímeros petroquímicos.



Fonte: De Azeredo (2012)

3.2 BIOPOLÍMEROS E POLIHIDROXIALCANOATOS

Nos últimos anos, a busca e a produção de alternativas aos plásticos petroquímicos intensificaram-se, com foco em polímeros de base biológica que são menos nocivos para a saúde humana e o meio ambiente (GIOSAFATTO et al., 2020). Entre todas as alternativas aos plásticos petroquímicos, os polihidroxialcanoatos se destacam por formarem uma família de poliésteres naturais produzidos em pequenas quantidades por vários organismos procariontes e alguns eucarióticos. Esses PHAs atuam como componentes de armazenamento na forma de grânulos intracelulares, servindo como fontes de carbono de reserva (DINIZ et al., 2023).

Além disso, os PHAs são biodegradáveis e se degradam naturalmente em dióxido de carbono e água devido à ação de uma variedade de microrganismos (RODRIGUEZ-CONTRERAS, 2019). Por esse motivo, são considerados um substituto ideal para plásticos de

origem fóssil, pois oferecem os benefícios dos materiais tradicionais, ao mesmo tempo em que atendem a todos os requisitos de sustentabilidade ao longo de seu ciclo de vida (MUKHERJEE e KOLLER, 2023).

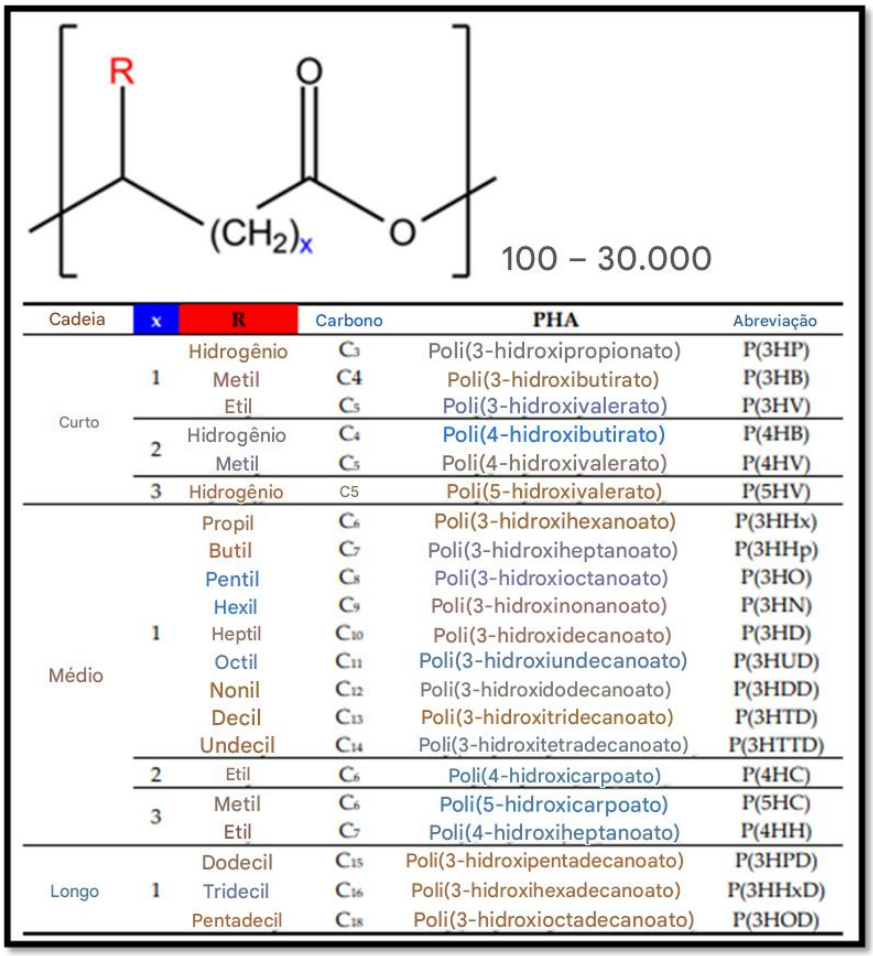
Os PHAs são reconhecidos por suas características únicas, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade. Essas propriedades permitem sua aplicação em diversos campos, incluindo medicina, agricultura e produção de biocombustíveis (BANO et al., 2024). Sua capacidade de biodegradação segura, aliada às suas propriedades físicas e químicas vantajosas, os posiciona como alternativas sustentáveis aos plásticos convencionais. Isso ajuda a reduzir a dependência desses recursos, ao mesmo tempo em que melhora a eficiência dos processos industriais e agrícolas (GETINO; MARTÍN e CHAMIZO-AMPUDIA, 2024).

Além do mais, o uso de fontes de carbono modificadas permite a criação de novos polímeros com grupos funcionais únicos em suas cadeias laterais, alterando assim sua morfologia e propriedades físicas (HANIK et al*.,* 2019). A exploração de modificações químicas dos PHAs está em andamento para aprimorar suas propriedades ou adaptá-los para novas aplicações. As modificações químicas, como carboxilação, hidroxilação e copolimerização por enxerto, podem modificar sua estrutura para melhorar características como hidrofobicidade e biocompatibilidade, tornando-os particularmente úteis para aplicações biomédicas (SNOCH et al., 2021).

Os PHAs são diferenciados com base no número de átomos de carbono na cadeia principal ou no radical “R” (MIU; EREMIA e MOSCOVICI, 2022), conforme apresentado na Figura 3.2. Esses biopoliésteres podem ser classificados com base no comprimento da cadeia carbônica (R) de seus monômeros: PHAs de cadeia curta (4 a 5 carbonos), PHAs de cadeia média (6 a 14 carbonos) e PHAs de cadeia longa (mais de 14 carbonos) (ALVES et al*.*, 2023). Alguns autores ainda propuseram que os mcl-PHAs (PHAs de cadeia média) incluem aqueles com número de carbonos entre 6 e 16, enquanto os lcl-PHAs (PHAs de cadeia longa) são aqueles com mais de 16 carbonos. O tamanho de suas cadeias laterais confere diferentes propriedades e aplicações aos PHAs (ISHAK et al*.*, 2021).

Além disso, os PHAs podem ser classificados por composição em homopoliésteres, que contêm um único tipo de monômero, ou heteropoliésteres, que incluem múltiplos tipos de monômeros. Os heteropoliésteres são ainda subdivididos em copoliésteres, terpoliésteres e quaterpoliésteres, com base na sua composição, seja de dois, três ou quatro monômeros diferentes, respectivamente (KOLLER, 2018).

Figura 3.2 - Representação geral dos PHAs: “R” denota um dos radicais mostrados na tabela, 100-30000 representa o número de repetições do(s) monômero(s) (que podem ser arranjados em tandem ou aleatoriamente) e “x” significa o número de grupos CH2 dentro da cadeia principal de cada monômero.



Cadeia	x	R	Carbono	PHA	Abreviação
Curto	1	Hidrogênio	C_3	Poli(3-hidroxipropionato)	P(3HP)
		Metil	C4	Poli(3-hidroxibutirato)	P(3HB)
		Etil	C_5	Poli(3-hidroxivalerato)	P(3HV)
	2	Hidrogênio	C_4	Poli(4-hidroxibutirato)	P(4HB)
		Metil	C_5	Poli(4-hidroxivalerato)	P(4HV)
	3	Hidrogênio	C5	Poli(5-hidroxivalerato)	P(5HV)
Médio	1	Propil	C_6	Poli(3-hidroxihexanoato)	P(3HHx)
		Butil	C_7	Poli(3-hidroxiheptanoato)	P(3HHp)
		Pentil	C_8	Poli(3-hidroxioctanoato)	P(3HO)
		Hexil	C_9	Poli(3-hidroxinonanoato)	P(3HN)
		Heptil	C_{10}	Poli(3-hidroxidecanoato)	P(3HD)
		Octil	C_{11}	Poli(3-hidroxiundecanoato)	P(3HUD)
		Nonil	C_{12}	Poli(3-hidroxidodecanoato)	P(3HDD)
		Decil	C_{13}	Poli(3-hidroxitridecanoato)	P(3HTD)
		Undecil	C_{14}	Poli(3-hidroxitetradecanoato)	P(3HTTD)
	2	Etil	C_6	Poli(4-hidroxicarpoato)	P(4HC)
	3	Metil	C_6	Poli(5-hidroxicarpoato)	P(5HC)
		Etil	C_7	Poli(4-hidroxiheptanoato)	P(4HH)
Longo	1	Dodecil	C_{15}	Poli(3-hidroxipentadecanoato)	P(3HPD)
		Tridecil	C_{16}	Poli(3-hidroxihexadecanoato)	P(3HHxD)
		Pentadecil	C_{18}	Poli(3-hidroxioctadecanoato)	P(3HOD)

Fonte: Getino; Martín; Chamizo-ampudia (2024)

A produção tradicional de PHA depende de culturas microbianas puras cultivadas em fontes de carbono refinadas, como glicose ou sacarose. Uma desvantagem significativa dessa abordagem é o alto custo da matéria-prima, que representa aproximadamente 40% das despesas totais de produção (KOURMENTZA et al., 2017). Estratégias alternativas, incluindo resíduos biológicos como uma fonte de carbono com boa relação custo-benefício, têm sido exploradas para mitigar os altos custos com a fonte de carbono do biorreator. Além de substratos orgânicos, a produção de PHA pode alavancar fontes de carbono inorgânico, como o CO_2. Os microrganismos fotoautotróficos, incluindo cianobactérias, usam CO_2 como fonte de carbono (PANUSCHKA et al., 2019). Outros micróbios, como *Rhodospirillum rubrum*, podem metabolizar gás de síntese (uma mistura de CO, CO_2 e H_2) para a biossíntese de PHA

(AMSTUTZ e ZINN, 2020). O metano (CH_4), do biogás e do gás natural, foi identificado como um substrato viável para bactérias metilotróficas (RODRÍGUEZ et al*.,* 2020).

Uma alternativa promissora à produção convencional de PHA é o uso de consórcios microbianos bem definidos em vez de culturas puras, pois essa abordagem elimina a necessidade de esterilização do aparelho e do meio e reduz significativamente os custos de produção (LEE et al., 2020). Na produção tradicional de PHA, a manutenção de culturas puras requer condições estéreis rigorosas, incluindo a esterilização de aparelhos, meios e biorreatores, o que aumenta significativamente o consumo de energia e as despesas operacionais. Em contraste, consórcios microbianos, compostos por comunidades microbianas naturalmente coexistentes ou modificadas, podem superar contaminantes e funcionar eficientemente em ambientes não estéreis, eliminando a necessidade de processos de esterilização dispendiosos. Além disso, os consórcios facilitam a utilização eficiente do substrato, permitindo a divisão do trabalho entre as espécies microbianas, levando a uma melhor conversão da fonte de carbono e a maiores rendimentos de PHA (OBRUČA et al., 2022).

As ferramentas genéticas avançadas, como CRISPR/Cas9, biologia sintética e otimização do fluxo metabólico, aumentaram ainda mais a capacidade de produção de PHA, melhorando o fornecimento de precursores, equilibrando estados redox e eliminando vias concorrentes. Avanços na biotecnologia industrial permitiram que *E. coli* e *R. eutropha* atingissem altas densidades celulares e produtividade, atingindo níveis de biomassa seca de 232 g/L e produtividade de 4,63 g/L/h, particularmente quando a *E. coli* recombinante foi projetada usando o *óperon* phaCAB de *A. latus* (CHOI et al., 2020).

Apesar dos avanços na engenharia de linhagens e na otimização de bioprocessos, várias limitações permanecem. Os altos custos de produção, variando de US$ 4 a 6 por kg, tornam os PHAs menos competitivos do que os plásticos derivados de combustíveis fósseis (PRADHAN; KHAN e MOHOLKAR, 2024). Os principais desafios incluem processos de esterilização caros, prevenção de contaminação, baixas taxas de conversão de alimentação para PHA e alto consumo de energia para aeração, como também, a dependência da glicose como principal matéria-prima apresenta preocupações econômicas e ambientais, incluindo o uso substancial de água e os custosos requisitos de processamento a jusante (YU; WU e CHEN, 2019).

Diante dos avanços significativos na produção de PHAs, é factível perceber que custos associados às matérias-primas e às etapas operacionais ainda representam um entrave para sua ampla comercialização mesmo que estratégias como engenharia metabólica ou consórcios

microbianos tenham ampliado o potencial produtivo desses biopolímeros. Logo, a busca por substratos renováveis, abundantes e de baixo custo, como exemplo o extrato aquoso da vagem de algaroba, rico em açúcares fermentescíveis e amplamente disponível em regiões semiáridas nordestinas, emerge como um fator determinante para sua escalabilidade produtiva como processo biotecnológico.

3.3 ALGAROBA (*Prosopis juliflora*)

As leguminosas são importantes na dieta humana e desempenham um papel importante na segurança alimentar e na sustentabilidade ambiental (TIDÅKER et al., 2021). O gênero *Prosopis* compreende árvores fixadoras de nitrogênio abrangendo 44 espécies, podendo destacar *Prosopis pallida, Prosopis juliflora, Prosopis farcta, Prosopis velutina, Prosopis glandulosa, Prosopis laevigata e Prosopis cineraria* (SHACKLETON et al., 2014). A maioria das espécies de *Prosopis* são nativas da América do Norte e do Sul; no entanto, três são originárias da Ásia e uma da África. Elas prosperam em regiões áridas, semiáridas, tropicais e subtropicais e podem sobreviver em solos salinos e alcalinos onde nenhuma outra espécie vegetal cresce (PÉREZ et al., 2014).

P. juliflora, originária do Peru, foi introduzida no Nordeste do Brasil por volta de 1942 no estado de Pernambuco pelo professor *JB Griffing*, como fonte de madeira e ração animal (ANDRADE et al., 2009). Posteriormente, a algaroba se espalhou por todo o estado do Rio Grande do Norte (1944) e Ceará (1954). A espécie é bem adaptada às condições adversas da Caatinga brasileira e cresce como arbustos ou árvores de até 10-12 m de altura com caules de até 1 m de diâmetro (BHATIA; GUPTA e SONI, 2014).

Os frutos de *Prosopis* são compostos por aproximadamente 70% de pericarpo e 30% de sementes (SCIAMMARO; RIBOTTA e PUPPO, 2016). Os frutos apresentam alta atividade higroscópica. Isso se deve ao seu teor de açúcar, que permite a absorção de umidade do ambiente com muita facilidade (SANDOVAL et al., 2020). O fruto pode ser consumido em bebidas, doces, xaropes, geleias, pães e biscoitos, utilizando a farinha obtida da moagem de vagens secas. Sua farinha, de coloração marrom-amarelada, possui aroma adocicado característico, comparável ao do cacau, coco ou caramelo (GONZÁLEZ-MONTEMAYOR et al., 2019). Além disso, a goma obtida da algaroba possui propriedades semelhantes às da goma arábica, um emulsificante amplamente utilizado na indústria alimentícia (VASILE et al., 2016). As vagens de algaroba podem fornecer uma variedade de produtos alimentares,

como farinha, xaropes semelhantes ao mel e bebidas alcoólicas e não alcoólicas (GUILHERME et al., 2009).

Segundo Silva et al. (2007), a concentração de açúcares totais na farinha das vagens de algaroba foi de cerca de 56,5%, sendo predominantemente composta por açúcares não-redutores (sacarose) e a discreta presença de glicose. Esta diferença em sua composição físico-química se deve por influência dos fatores como tipo de solo, condições de cultivo e clima, dentre outros. O teor de proteínas encontrado varia nos 9,0% e o teor de lipídios se encontra na casa dos 3%. Na polpa da vagem (56% do fruto) foram encontrados 1,6% de fibra solúvel associada a 0,88% de tanino solúvel e 31% de fibra insolúvel associada a 0,33% de tanino condensado (SILVA; BORA e NETO, 1997).

O conteúdo de cinzas da farinha de algaroba detectado (3,6%) fora determinado as concentrações de alguns dos minerais, tais como, Ca, P, Mg, Fe, Zn, Na, K, Mn e o restante dividido entre compostos nitrogenados, pectinas e ácidos (SILVA et al., 2007). O extrato aquoso da algaroba obtido por cozimento e infusão origina um xarope semelhante ao mel com alto teor de proteínas e carboidratos, tornando-se um excelente candidato a resíduo orgânico para processos fermentativos para produção de polihidroxialcanoato.

3.4 SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO VEGETAL DE SOJA

Aproximadamente 1,3 a 1,6 gigatoneladas de alimentos são desperdiçadas globalmente a cada ano, sendo 61% provenientes de residências (KNORR e AUGUSTIN, 2022). Transformar resíduos alimentares (RA) em recursos por meio da digestão anaeróbica pode gerar produtos de reciclagem de alto valor, como ácidos graxos voláteis (AGV) e biogás, contribuindo para a redução do desperdício (LI et al., 2020). Os RA são tipicamente caracterizados por um alto teor de lipídios que podem ser facilmente hidrolisados em ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) durante a digestão anaeróbica (LI et al., 2017).

Os fatores de influência dos AGCL em sistemas anaeróbios podem ser classificados da seguinte forma: (I) lavagem e formação de espuma, levando à perda de biomassa (ABOMOHRA et al., 2022); (II) adsorção à superfície microbiana e formação de uma barreira, limitando o transporte de nutrientes (DUAN et al., 2023); (III) desfavorabilidade termodinâmica na degradação, já que a degradação completa dos AGCL em produtos finais pela via da β-oxidação é um processo não espontâneo (ELSAMADONY et al., 2021). Esses fatores aparentemente desencadeiam inibição e instabilidade em sistemas anaeróbios; no

entanto, os AGCL são um dos precursores dos AGV. A degradação dos AGCL pela via da β-oxidação é considerada uma etapa crítica na produção de ácido acético e hidrogênio (LIU et al., 2023).

Os cinco ácidos graxos predominantes no óleo de soja incluem dois ácidos graxos saturados, o ácido palmítico (PA, 16:0) e o ácido esteárico (SA, 18:0), e três ácidos graxos insaturados, o ácido oleico (OA, 18:1), o ácido linoleico (LA, 18:2) e o ácido linolênico (LNA, 18:3) (FAN et al., 2015). Zheng e colaboradores (2024) analisaram os efeitos dos AGCL saturados e insaturados na capacidade de produção de ácidos graxos voláteis (AGV) durante a fermentação acidogênica de resíduos alimentares em biorreatores e concluíram que a produção de ácido acético foi intensificada pelo estresse causado pelos ácidos oleico e esteárico, resultando em um aumento de 5,08% e 20,66%, respectivamente, em comparação com o grupo controle. Para além disso, a produção de ácido n-butírico aumentou 29,24% e 36,06% com a adição de ácidos oleico e esteárico, respectivamente, quando comparado ao grupo controle e a produção de AGV aumentou 9,98% na presença de ácido esteárico.

De forma semelhante Jiang et al. (2025) investigaram a cofermentação anaeróbia de resíduos alimentares (RA) e efluentes de digestão anaeróbia (lodo) com o objetivo de quantificar a produtividade e a composição de ácidos graxos voláteis (AGV) em biorreatores onde perceberam que na proporção de 4:1 de resíduos alimentares e lodo anaeróbio houve um aumento de quase 9x no quantitativo de AGVs quando comparado ao grupo controle, bem como, houve um direcionamento nas vias metabólicas para maior produção de ácidos propiônico, butírico e valérico.

A compreensão do papel dos ácidos graxos de cadeia longa na formação de ácidos graxos voláteis é fundamental para o aprimoramento de processos biotecnológicos voltados à valorização desses substratos como fontes de carbono para a biossíntese de PHA. Esse conhecimento pode auxiliar no processo de otimização da produção de biopolímeros por microrganismos produtores desse produto, como a *Cupriavidus necator,* ao passo que, pode sugerir-se uma estratégia promissora para a eficiência e a qualidade dos PHAs produzidos a partir do consórcio bacteriano de *C. necator* e lodo ativado para a síntese de ácidos propiônico, butírico e valérico culminando na possível formação de copolímeros.

3.5 MICRORGANISMO *Cupriavidus necator*

Esses poliésteres alifáticos são produzidos por uma ampla variedade de microrganismos, incluindo linhagens dos gêneros *Pseudomonas, Cupriavidus e Bacillus* (HOFFMANN e REHM, 2004; ROND'OŠOVÁ et al., 2022). Os PHAs são acumulados intracelularmente por microrganismos como reserva de carbono e energia, podendo também atuar na remediação de fatores de estresse externos, como limitação de nutrientes, salinidade, radiação UV, temperatura ou estresse osmótico. Algumas cepas acumulam PHA dentro dos grânulos em concentrações que atingem mais de 80% do peso seco da célula (PCC), indicando seu potencial como um produto fermentativo viável (ZHANG et al., 2022). Devido à sua não toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, vários desses PHAs já receberam aprovação regulatória para aplicações em contextos de contato com alimentos e biomédicos (MAI et al., 2024).

Mcl-PHAs (*Medium-chain-length* comprimento de cadeia média) e scl-PHAs (*Short-chain-length* comprimento de cadeia curta) são as classes mais pesquisadas, das quais *Pseudomonas putida* e *Cupriavidus necator* funcionam como seus respectivos hospedeiros modelo de produção (KOLLER, 2018). Em particular, *C. necator,* notável por sua produção nativa de polihidroxibutirato homopolímero (PHB), possui múltiplas características que o tornam uma fábrica celular ideal para a produção de PHAs (HECTORS; DELMULLE e SOETAERT, 2025).

C. necator é uma bactéria Gram-negativa do solo que tem sido objeto de pesquisa sobre biopolímeros há décadas, anteriormente denominada *Hydrogenomonas eutropha, Alcaligenes eutropha, Wautersia eutropha* e *Ralstonia eutropha* (VANDAMME e COENYE, 2004). Seus diversos nomes encontrados na literatura estão enraizados nos diversos ambientes de onde essa bactéria foi coletada, o que alude à capacidade de *C. necator* de metabolizar uma ampla variedade de substratos (MORLINO et al., 2023).

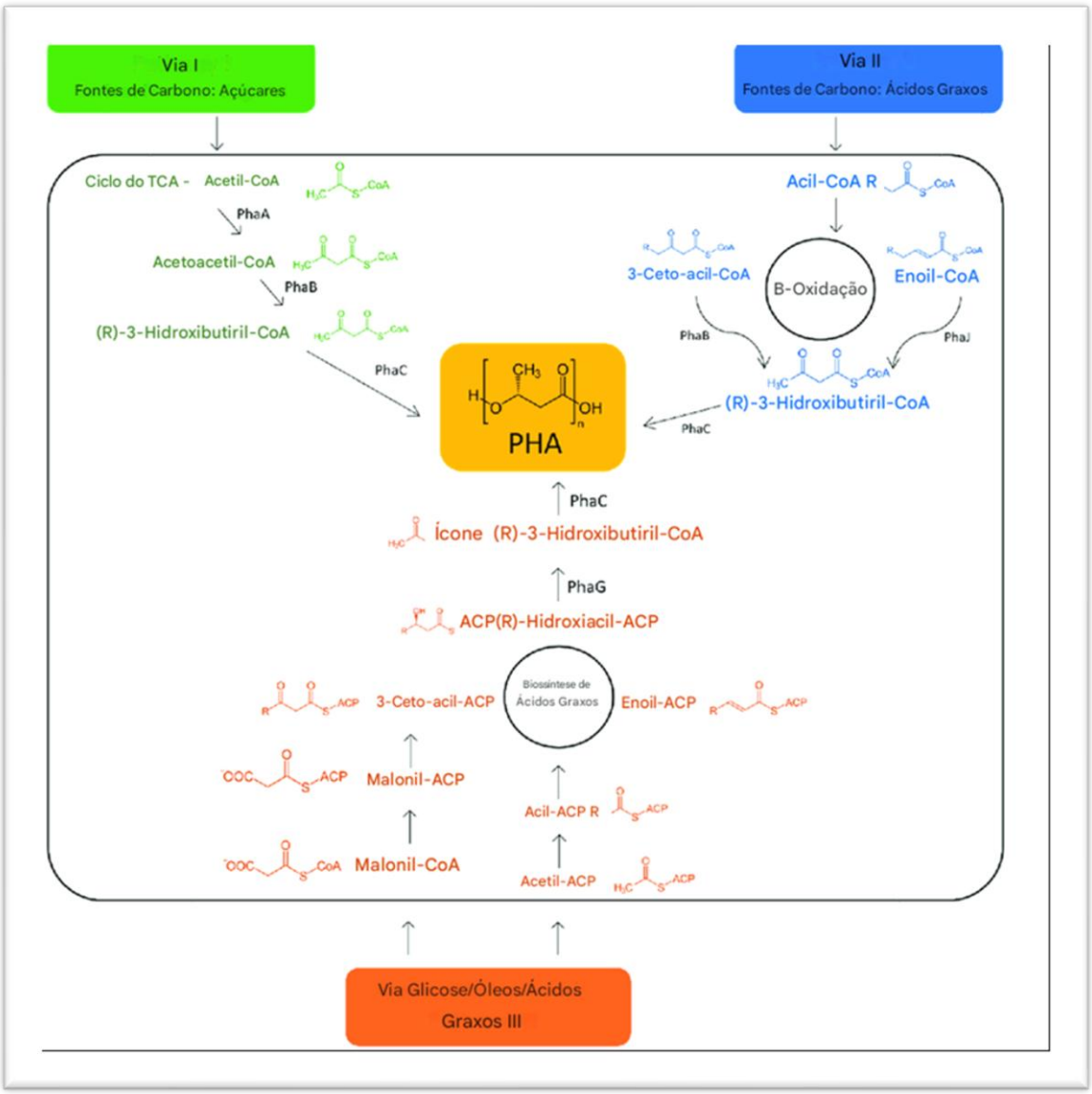
No entanto, a comercialização e a industrialização em larga escala estão atrasadas, visto que os PHAs são substancialmente mais caros do que os plásticos à base de petróleo que pretendem substituir. Atualmente, o custo dos PHAs é pelo menos três vezes maior que o do polipropileno e do polietileno (ROSENBOOM; LANGER e TRAVERSO, 2022).

A flexibilidade metabólica (Figura 3.3) que *C. necator* apresenta em relação à utilização do substrato significa que existem muitas rotas que podem levar à formação de grânulos intracelulares de PHB, mas todas convergem em acetil-CoA, tornando-se um ponto de interesse significativo para a engenharia metabólica. Um pré-requisito para a biossíntese de

PHB é um excesso de carbono associado à limitação de nitrogênio ou fósforo. O acúmulo de acetil-CoA e NAD(P)H inibe enzimas-chave do ciclo do TCA, redirecionando a acetil-CoA para a síntese de PHB (KOLLER; SALERNO e BRAUNEGG, 2013).

Também pode ser desencadeado pela limitação de oxigênio, fornecendo um reservatório alternativo para o excesso de equivalentes redutores (MOZUMDER et al., 2015). A biossíntese do PHB é predominantemente conduzida pelo *óperon* phaCAB constitutivamente expresso, que codifica as enzimas-chave acetil-CoA acetiltransferase (phaA), acetoacetil-CoA redutase (phaB1) e PHA sintase (phaC1) (SCHUBERT; STEINBÜCHEL e SCHLEGEL, 1988).

Figura 1.3 - Rotas metabólicas para síntese microbiana de polihidroxialcanoato.



Fonte: Vicente; Proença; Morais (2023).

3.6 APLICAÇÕES DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são frágeis por natureza e, portanto, misturas ou copolímeros são preparados para ampliar sua aplicação na indústria de embalagens. As misturas de PLA-PHB plastificadas com D-limoneno têm sido utilizadas na embalagem de alimentos devido às suas excelentes propriedades térmicas e mecânicas.

Além disso, elas foram consideradas facilmente degradáveis, de acordo com o estudo de análise do ciclo de vida. As misturas apresentam propriedades de contorno de oxigênio aumentadas e são resistentes à água superficial. A plastificação do PHA com D-limoneno produziu filmes mais flexíveis para aplicações em embalagens. A utilização de polihidroxibutirato na embalagem de alimentos gordurosos, como queijo e maionese, constatou-se que o material à base de PHA apresentou bons resultados em testes físicos, mecânicos e sensoriais. O impacto da purificação e da forma de embalar salada de carne prensada usando PLA-PHB provou que esse biopolímero é um plástico de origem biológica adequado para a utilização em embalagens de alimentos. (MUNEER et al., 2020; KHATAMI; PEREZ-ZABALETA e CETECIOGLUK, 2022).

Os PHAs são biocompatíveis por natureza, o que os torna um biomaterial potente para aplicação em engenharia de tecidos. Modificações químicas realizadas nos homopolímeros e copolímeros de PHA demonstraram melhorar as propriedades térmicas, por exemplo, amolecimento e mudança de temperatura do vidro. Ao fornecer substratos funcionalizados, a natureza hidrofílica dos PHAs pode ser melhorada. Para obter PHAs halogenados, várias modificações químicas são necessárias, como a expansão de halogênios, por exemplo, do grupo bromo ou do grupo cloro, para a extremidade vinílica do PHA. Esses PHAs halogenados passam por polimerização catiônica adicional para formar copolímeros de enxerto que atuam como bons biomateriais (KALIA et al., 2021; TAO; TAN e LI, 2021).

Em aplicações de liberação de fármacos, os PHAs anfifílicos são amplamente preferidos. Os polímeros anfifílicos são sintetizados pela introdução de grupos hidrofílicos ou polímeros hidrofílicos em uma fração hidrofóbica. A síntese dos PHAs anfifílicos pode ser realizada por meio de reações de funcionalização, a saber: transesterificação, hidroxilação e carboxilação das ligações duplas pendentes, epoxidação, condensação e polimerização por radicais livres. Essas nanopartículas anfifílicas contêm os copolímeros de PHA ocultos no núcleo interno da molécula e, consequentemente, a liberação controlada do medicamento pode ser realizada (SATHYA et al., 2018).

Quando a citotoxicidade *in vitro* foi avaliada em células neuronais do hipocampo de ratos, foi revelado que os copolímeros de PHA com modificação de superfície por mPEG não produziram efeitos tóxicos significativos. Verificou-se que esses copolímeros anfifílicos servem como uma entrega segura e eficiente de fármacos. Além disso, o PHA e seus copolímeros podem ser usados como um nanocarreador eficaz, quando conjugados com nanopartículas, onde os nanocarreadores são usados principalmente para entrega de fármacos em locais específicos (SINGH et al., 2019; MEHRPOUYA et al., 2021).

Os resíduos agrícolas e alimentares, ou seja, sobras, subprodutos e coprodutos gerados pelo cultivo e processamento de produtos agrícolas que não são convertidos em alimentos ou rações (GONTARD et al*.,* 2018) são frequentemente mal administrados, resultando em altos custos de gestão, riscos à saúde e problemas ambientais quando não manuseados adequadamente (BABU et al., 2022). Os resíduos agrícolas representam até 50% do peso fresco das culturas colhidas (BANCAL e RAY, 2022).

No contexto de uma economia circular, que visa a reutilização e a regeneração de materiais ou produtos orgânicos, esses resíduos agrícolas e alimentares devem ser considerados um recurso valioso e um reservatório de biomassa inexplorado. Sua conversão em compostos de base biológica de alto valor poderia, pelo menos parcialmente, substituir produtos químicos ou seus precursores, atualmente produzidos com materiais não renováveis e processos ambientalmente prejudiciais (GONTARD et al., 2018). A utilização de resíduos agroalimentares para esse fim também poderia ajudar a compensar as emissões de gases de efeito estufa do setor agrícola, que representam aproximadamente 11% da pegada de carbono total (JENSEN e SCALAMANDRÈ, 2023).

Vários compostos podem ser recuperados de resíduos agroalimentares, incluindo bioquímicos altamente funcionais (antimicrobianos ou antioxidantes), poliésteres (cutina, suberina e poli-hidroxialcanoatos), ingredientes de alimentos e rações (proteínas vegetais e microbianas, carotenóides), polissacarídeos (por exemplo, celulose, pectina, hemicelulose, quitina, glicogênio), fertilizantes e outros produtos valiosos (PRIYA et al., 2023; VIGNESWARI et al., 2024). Uma abordagem para valorizar esses fluxos de resíduos é a produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) (WANG et al., 2021). Os PHAs podem ser produzidos utilizando culturas microbianas puras ou mistas, cada uma com suas próprias vantagens e desvantagens. Atualmente, a maioria das empresas que comercializam PHAs com sucesso utilizam culturas puras (KOLLER e MUKHERJEE, 2022).

Diante da gama de aplicações do PHA, que abrange desde a composição de envoltórios alimentares, engenharia de tecidos até sistemas de liberação controlada, torna-se

evidente o uso desses biopolímeros como alternativas sustentáveis aos plásticos convencionais. Entretanto, a forma de produção e os custos operacionais para tal produção de PHAs está diretamente relacionada à escolha de matérias-primas renováveis, de baixo custo e amplamente disponíveis e por isso a valorização de subprodutos orgânicos como fonte de carbono para a síntese microbiana de PHAs desponta como uma estratégia promissora, capaz de integrar inovação tecnológica, redução de impactos ambientais e aproveitamento eficiente de biomassa residual culminando em um alinhamento com os princípios da economia circular.

3.7 ECONOMIA CIRCULAR

O conceito de desenvolvimento sustentável ganhou enorme popularidade desde a sua aparição no Relatório *Brundtland* em 1987. Isto tem sido impulsionado principalmente por questões ambientais e sociais em curso, como as alterações climáticas, a poluição, as preocupações com o esgotamento dos recursos naturais e a pobreza (RUGGERIO, 2021). Como resultado, os conceitos de desenvolvimento sustentável e sustentabilidade, que são frequentemente utilizados de forma intercambiável, são vistos como estratégias eficazes para enfrentar estes desafios. A definição de sustentabilidade é a capacidade de melhorar e sustentar sistemas ambientais, sociais e económicos para o desenvolvimento humano. Além disso, o estudioso também o descreve como a "distribuição eficiente e equitativa de recursos intrageracionalmente e intergeracionalmente com a operação de atividades socioeconômicas dentro dos limites de um ecossistema finito" (MENSAH et al., 2023).

A economia circular (EC) enfatiza as práticas dos 6Rs, a saber, reutilizar, reciclar, redesenhar, remanufaturar, reduzir e recuperar (MISROL et al., 2023). É um sistema econômico concebido para eliminar o desperdício e a utilização contínua de recursos, criando um sistema de circuito fechado onde produtos, materiais e recursos são reutilizados e reciclados. Tem como objetivo manter os produtos e materiais em uso pelo maior tempo possível, extraindo o máximo valor durante seu ciclo de vida e minimizando o impacto ambiental (CERDÁ-SUÁREZ et al., 2023).

A sustentabilidade e a economia circular ganharam enorme atenção nos últimos anos por parte de investigadores, governos, empresas, investidores e da sociedade em geral. A sustentabilidade preocupa-se em integrar a resiliência ambiental, o crescimento económico e a inclusão social para garantir o bem-estar das gerações atuais e futuras (PIERONI; MCALOONE e PIGOSSO, 2019). A EC desafia e muda o modelo econômico linear

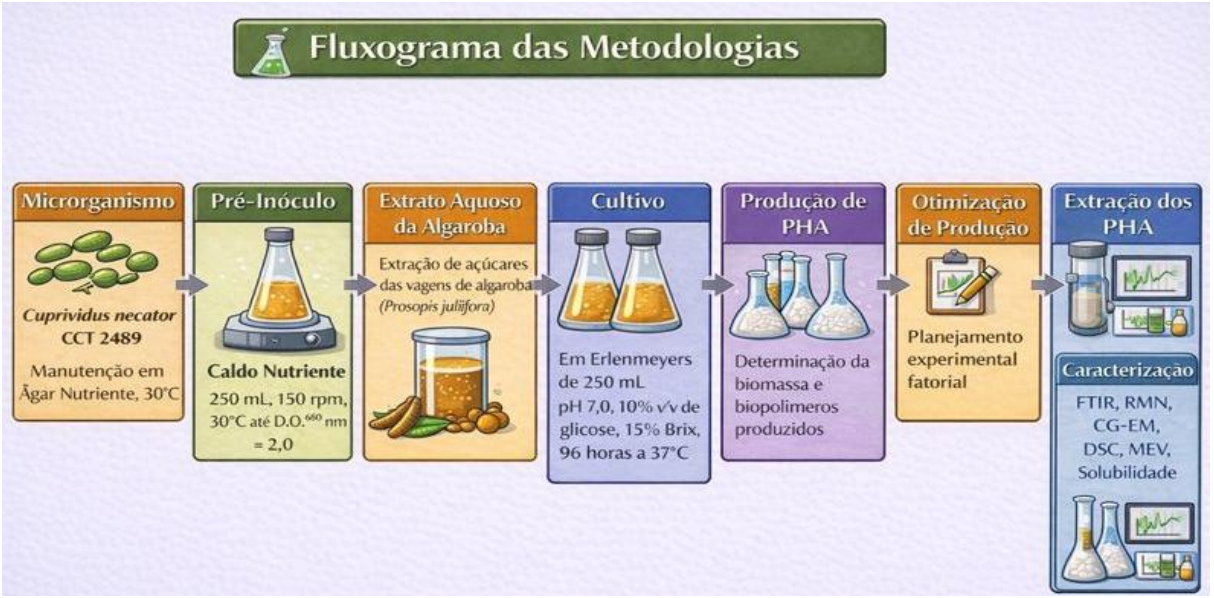
tradicional que segue o processo de pegar-fazer-usar-descartar. Incentiva as empresas a repensar e redesenhar as suas estratégias e operações em toda a cadeia de valor (TAPANINAHO e HEIKKINEN, 2022). Por exemplo, a criação de valor na EC está em causar uma mudança de paradigma do valor em transação para o valor em uso, onde as empresas entregam valor contínuo aos clientes (BERG et al*.,* 2018).

A economia circular versa sobre o uso e o reaproveitamento de resíduos e subprodutos nos ciclos produtivos, reduzindo a dependência de insumos químicos e minimizando os danos ambientais. Nesse contexto, o aproveitamento do extrato aquoso da algaroba como meio fermentescível surge como alternativa sustentável para polímeros de base biológica frente aos plásticos convencionais, por serem provenientes de fontes renováveis e apresentarem potencial biodegradável. O extrato, que é um resíduo abundante na região semiárida, destaca-se como estratégia alinhada a esse modelo, uma vez que agrega valor a um subproduto de baixo aproveitamento, ao mesmo tempo em que pode atuar como matéria-prima na obtenção de biopolímeros, contribuindo para o desenvolvimento de materiais mais sustentáveis e economicamente viáveis.

4 METODOLOGIA

A metodologia utilizada nesse estudo está ilustrada na Figura 4.1 que apresenta as etapas de produção, otimização e caracterização do polihidroxialcanoatos obtidos durante o processo. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) situado no Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Figura 2.1 - Esquema ilustrativo das metodologias aplicadas para a produção e caracterização de PHA por *Cupriavidus necator* CCT 2489 com uso do extrato da vagem de algaroba como substrato.



Fonte: Autoria própria

4.1 MATERIAIS

As vagens de algaroba foram coletadas na zona rural da cidade de Japi no Rio Grande do Norte. O PHB comercial (99,7% P.A., Mw 596.185,00 Da, *BIOCYCLE*® 1000) foi utilizado nas análises para comparar com o biopolímero produzido e extraído de *C.necator* CCT 2489. O PHB comercial foi nomeado nas análises como “PHA COM” enquanto a versão bacteriana foi nomeada “PHA BAC”. O óleo de soja refinado (marca Soya, Bunge, Brasil) utilizado como indutor para a produção de PHA foi adquirido em comércio local.

4.2 MICRORGANISMO

O microrganismo usado foi a linhagem *Cupriavidus necator* CCT 2489 obtida da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia Tropical, localizada em Campinas, São Paulo e cedido, gentilmente, pelo Laboratório de Bioengenharia (LaBio) do Centro de Tecnologia (CT) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

A manutenção da linhagem foi realizada em cabine de segurança biológica, em intervalos quadrimestrais, utilizando o meio Ágar Nutriente (AN) com pH 7. Os repiques foram realizados em placa de Petri e incubados em estufa bacteriológica a 30 °C por 24 h. Após esse período, as colônias foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

4.3 PRÉ-INÓCULO

O meio utilizado para ativação da linhagem foi Caldo Nutriente (CN). A transferência do microrganismo ao meio de ativação (pré-inóculo) foi realizada com auxílio de uma alça de platina para a retirada de colônias crescidas em placas de Petri de 10 cm para frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio CN com pH 7. O pré-inóculo foi mantido em incubadora rotativa orbital (150 rpm e 30±3 °C) até atingir a concentração ideal para inoculação.

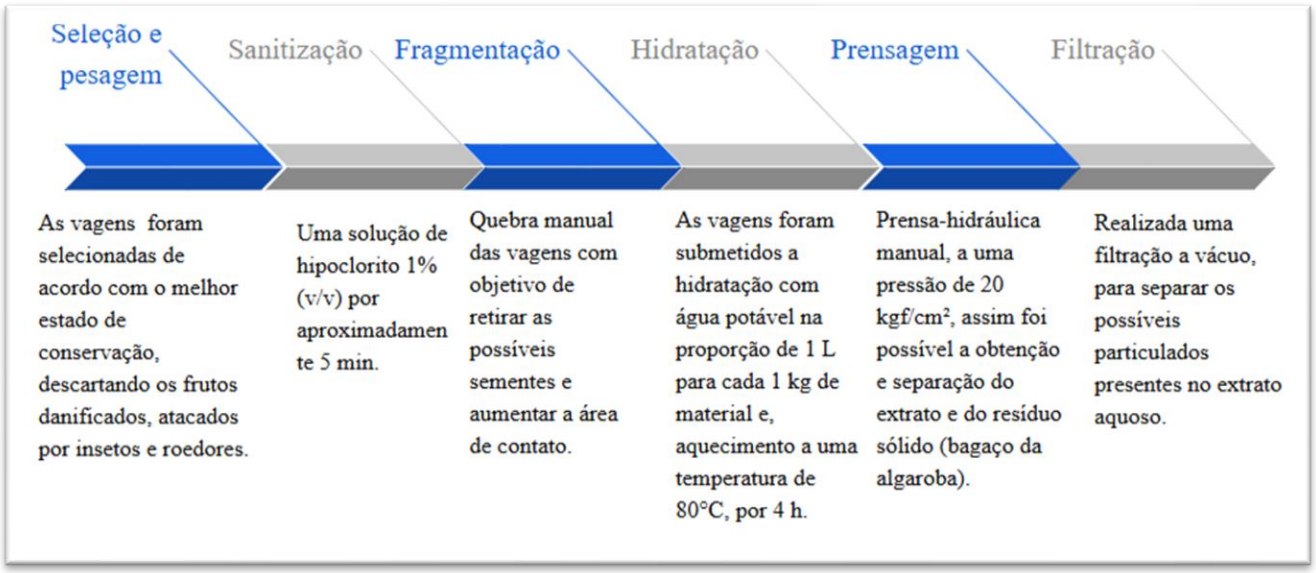
4.4 INÓCULO

O crescimento do microrganismo para o preparo do inóculo foi acompanhado por absorbância (D.O. a 600 nm), até atingir o valor de 2,0 sendo esse momento considerado o ideal para o inóculo ser transferido ao frasco de cultivo. Uma alíquota de 10% (v/v) do inóculo foi transferida para cada frasco de cultivo.

4.5 PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DA ALGAROBA

obtenção do extrato aquoso da vagem de algaroba foi utilizada a metodologia proposta por Silva (2003) seguindo as seguintes etapas, conforme o resumo esquemático da Figura 4.2.

Figura 4.2 - Fluxograma simplificado do processo de fabricação do extrato da vagem de algaroba.



Fonte: Autoria própria

O preparo do extração aquoso de algaroba por meio da seleção e pesagem - inicialmente, as vagens de algaroba foram selecionadas de acordo com o melhor estado de conservação, descartando as vagens ou frutos danificados, atacados por insetos e roedores, fungos, doenças, bem como, a retirada de resíduos sólidos, como pedras e galhos; sanitização - foi utilizada uma solução de hipoclorito 1% (v/v) por aproximadamente 5 minutos e, em seguida, lavada com água corrente até a retirada do excesso de hipoclorito; fragmentação e retirada de sementes – foi realizado o procedimento de quebra manual das vagens da algaroba com objetivo de retirar as possíveis sementes e aumentar a área de contato entre o solvente (água) e o soluto (açúcares); hidratação - as vagens foram submetidas ao processo de hidratação com água potável na proporção de 2 L para cada 1 kg de material e, posterior aquecimento a uma temperatura de 80 °C, por aproximadamente, 4 h objetivando melhor biodisponibilidade dos açúcares fermentescíveis; prensagem -

A extração foi realizada utilizando os fragmentos hidratados, que foram submetidos a prensagem, em prensa-hidráulica manual, a uma pressão de 20 kgf/cm², assim foi possível a obtenção e separação do extrato e do resíduo sólido (bagaço da algaroba) e filtração - por fim, foi realizada uma filtração a vácuo, em funil de *Büchner*, usando papel filtro qualitativo para separar os possíveis particulados presentes no extrato aquoso. Após a extração, o extrato foi armazenado em garrafas plásticas e mantido sob refrigeração a uma temperatura de 0° C. Com ajuda de um refratômetro foi aferido o teor de 18° Brix. Após a extração, o extrato obtido foi

armazenado em garrafas plásticas e conservadas em *freezer* a uma temperatura de -10°C, sendo posteriormente, utilizado como meio de cultivo para produção de PHA.

4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO POLIHIDROXIALCANOATO

Para o estudo da otimização da produção de PHAs pela linhagem de *Cupriavidus necator* CCT 2489, foi realizado um planejamento experimental fatorial do tipo DCCR (delineamento composto central rotacional) 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 5 repetições no ponto central, totalizando 13 ensaios, sendo estes realizados de forma aleatória. Os fatores analisados foram razão de aeração e porcentagem de óleo de soja (m/v) no meio em três níveis com os respectivos pontos axiais, conforme descrito na Tabela 4.1. A variável resposta foi a concentração de PHA produzido em mg/mL. Para a razão de aeração foi utilizado como nível inferior 0,36 e superior 0,64, e a massa de óleo de soja varia de 0 a 1,21. Estes valores foram direcionados de acordo com experimentos realizados por De Melo (2025).

Tabela 4.1 - Valores codificados e reais utilizados no delineamento composto central rotacional (DCCR) para produção de polihidroxialcanoatos (PHAs).

Variável	Código	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Razão de aeração (%)	X_1	0,36	0,4	0,5	0,6	0,64
Razão de aeração (ml)		90	100	125	150	160
Massa de óleo de soja (%)	X_2	0*	0,07	0,50	1,00	1,21
Massa de óleo de soja (g)		0	0,07	0,63	1,50	1,94

* - no cálculo para obtenção do valor axial de -α, o valor obtido ficou negativo, por isso foi tratado como valor zero durante os experimentos.

Os cultivos foram preparados em Erlenmeyer de 250 ml variando a taxa de aeração de 90 a 160 mL de extrato de algaroba e a massa de óleo de soja variou de 0 a 1,94 g em relação ao volume de extrato aquoso de algaroba (Tabela 4.1). Os cultivos foram colocados na incubadora rotativa orbital (150 rpm e 30 ºC), 15º Brix, pH ajustado a 7,0, durante 96 h de processo. Durante o cultivo, foram coletadas alíquotas de 1 mL a cada 2 h nas primeiras 48 h

e 2 coletas com intervalos de 12h até completar 72h de cultivos, para a realização de acompanhamento cinético, consumo de açúcar e peso seco.

A análise estatística para otimização da produção de biopolímero foi realizada com base nos resultados obtidos do Diagrama de Pareto, ANOVA e Superfície Resposta do planejamento experimental acima descrito. Esses dados foram analisados empregando o software *Statistica* 7 e a metodologia ANOVA com confiança estatística de 95% ($p < 0,05$). A validação do processo foi realizada em etapa seguinte em triplicata a partir do resultado do ensaio que apresentou a maior concentração de PHA.

4.6.1. Determinação da concentração de biomassa microbiana

O crescimento microbiano será acompanhado pelo método turbidimétrico (600 nm) e método gravimétrico por peso seco. Para o método turbidimétrico, uma alíquota de 2 mL do caldo fermentado será inserida em cubetas de vidro para leitura em espectrofotômetro a 600 nm. O branco analítico será o meio de cultivo isento de células. A turbidez gerada pelo crescimento microbiano será determinada pela absorbância lida e comparada com o branco. O peso seco será determinado pela retirada de uma alíquota de 1 mL de caldo fermentado e adicionado a um microtubo previamente pesado. Após, a amostra será centrifugada (3500 rpm por 10 min em centrífuga *MiniSpin* – Eppendorf) e, ao final da centrifugação, o sobrenadante foi separado em outro microtubo e congelado para posterior análise e o *pellet* sedimentado será lavado duas vezes com 1 mL de água destilada e, posteriormente, colocado em estufa (105 ºC por 24 h). A análise turbidimétrica foi realizada em triplicata e a análise de peso seco foi em duplicata.

4.6.2. Determinação de açúcares redutores totais (ART)

A quantificação do substrato foi realizada pela análise do caldo fermentado isento de células utilizando o método do DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) (MILLER, 1959). Para determinar a concentração dos açúcares redutores totais foi realizada a hidrólise da amostra, uma vez que os substratos são ricos em carboidratos. Uma alíquota de 1 mL de cada amostra será adicionada a 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl a 2N) em um balão volumétrico de 50 mL. O conjunto foi levado ao banho-maria (*SevenLabor*) por 10 minutos sobre a temperatura de 70 °C. Após realizada a hidrólise foram adicionados 6,0 mL de água destilada e 2 mL de solução de NaOH a 4,0M, após neutralização da mistura, completou-se o volume do balão

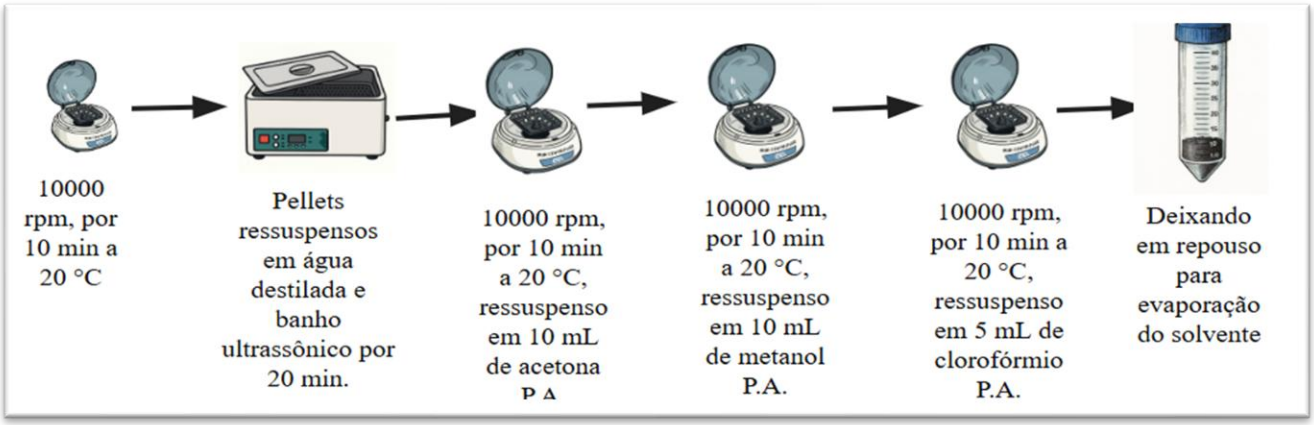
volumétrico com água destilada. Em seguida, uma alíquota de 0,5mL da amostra hidrolisada foi adicionada a 0,5 mL do reagente DNS em tubo de ensaio. A amostra foi levada ao banho-maria (*SevenLabor*) a 100 °C por 10 min. Após aquecimento, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos. Por último, adicionou-se 4 mL de água destilada à amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. O branco analítico foi composto de 0,5 mL de água destilada ao invés da amostra. A análise foi realizada em triplicata.

4.7 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS PRODUZIDOS

Transcorridas as 96 h tempo de cultivo, o meio foi transferido para tubos de centrifuga (Falcon) de 50 mL que seguiram para centrifugação a 10000 rpm, por 10 min a 20° C. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi guardado em outro tubo de centrífuga e os *pellets* formados foram utilizados para o processo de extração. Para avaliar a produção de PHA utilizou-se uma adaptação do método de extração proposto por Law e Slepecky (1961).

Para a extração, inicialmente, os *pellets* foram ressuspensos em 20 mL de água destilada e seguiram para o banho ultrassônico por 20 min visando o rompimento das células bacterianas. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm, por 10 min a 20 °C sendo o sobrenadante desprezado e os *pellets* foram utilizados na extração. Esse procedimento foi repetido para os solventes, acetona P.A. e metanol P.A sendo utilizado cerca de 10 mL de cada solvente, conforme descreve a Figura 4.3.

Figura 4.3 - Esquema ilustrativo do processo de extração do PHA.



Fonte: Autoria própria.

Por fim, os *pellets* foram solubilizados em 5 mL de clorofórmio P.A. e vertidos em tubos de centrífuga (Falcon) de 50 mL, previamente pesados. Os tubos foram deixados em repouso, dentro de capela de exaustão, até a completa evaporação do solvente. Posteriormente, os tubos contendo o biopolímero foram pesados em balança analítica para quantificação.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS PRODUZIDOS

4.8.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os grupos químicos do PHA obtido foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (FTIR *Shimadzu*, modelo IR *PRESTIGE*-21). Os espectros de transmitância foram obtidos para uma faixa de onda de 600–4000 cm^{-1}, com 20 varreduras e 4 cm^{-1} de resolução (GETACHEW & WOLDESENBET, 2016).

4.8.2 Análise elementar

Os teores de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) foram determinados por análise microelementar utilizando um analisador *Elementar Unicube*® (Elementar, Alemanha). O método baseia-se na combustão completa da amostra sob uma atmosfera controlada, seguida da separação e quantificação dos gases gerados, permitindo a determinação precisa da composição elementar do material.

4.8.3 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e de carbono-13 foram realizados utilizando CDCl3 (1 mL) como solvente e registrados em um espectrômetro *VARIAN® Mercury Spectra* AC 20 (400 MHz para RMN1H e 101 MHz para RMN13C).

4.8.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

O conteúdo de polihidroxialcanoatos foi determinado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) realizando a metanólise de monômeros de acordo com o método de Shamala et al. (2009). O polímero extraído (50 mg) foi submetido à metanólise em 1 mL de clorofórmio, 0,85 mL de metanol e 0,15 mL de H_2SO_4 concentrado a 100 °C por 140 min. A homogeneização das amostras foi realizada com água Milli-Q e a fase orgânica inferior foi utilizada para análise por GC (*Shimadzu* GC-MS QP 2010 Ultra). Fase estacionária: RTX-5MS capilar (5% Difenil / 95% dimetilpolisiloxano) Tamanho: 30 m (comprimento) / 0.25 mm de Diâmetro Interno / 0.25 um df, fase móvel: acetato de etila.

4.8.5 Coloração para microscopia de fluorescência e análise em microscopia de fluorescência

A metodologia utilizada foi adaptada a partir do método previamente desenvolvido por Ostle e Holt (1982), com biomassa em suspensão. As células foram lavadas duas vezes com solução salina NaCl 0,9%, em seguida, foi adicionada para formaldeído a 4% e deixou-se sob agitação por 1 h, em seguida os *eppendorfs* foram lavados com água destilada e centrifugados a 5000 rpm por 5 min. Posteriormente, a biomassa foi incubada a 55 °C durante 10 min com 100 µL do corante azul de Nilo a 1%. A amostra foi centrifugada a 5000 rpm durante 5 min. O depósito foi lavado com 0,9% NaCl e centrifugou-se novamente utilizando as condições anteriores. Finalmente, as células foram suspensas em 0,9% NaCl e vertidos em lâminas que seguiram no microscópio de fluorescência modelo *Nikon* C-LHGFI HG *lamp* (*Düsseldorf*, DE). Para as amostras coradas com azul de Nilo, foi usado um filtro de excitação de 530-550 nm e emissão a 591 nm.

4.8.6 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para avaliar a morfologia da superfície dos grânulos do polímero. As amostras foram fixadas em suporte metálico com fita adesiva de carbono de dupla face e revestidas com uma fina camada de ouro. A análise foi realizada em um microscópio modelo MIRA-3 LMH (*Tescan* São Paulo, SP, Brasil), com alta luminosidade e fonte de alto vácuo. As imagens foram capturadas utilizando o *software MiraTC* com tensão de aceleração de 5–10 kV, detectores SE com fluxo de 1750 mA e ampliação de 10 kx.

4.8.7 Difração de raios-X

A análise de difração de raios-X (DRX) foi obtida utilizando os parâmetros propostos por Spagnol Et al. (2018). Um difratômetro de raios X (Shimadzu, modelo LabX 6000, Brasil) foi utilizado com uma tensão aplicada de 30 kV e uma corrente de 30 mA (radiação CuKα = 1,5418 Å) na faixa de 2θ = 10–50° e uma velocidade de 2°/min. Os difratogramas resultantes foram processados e analisados utilizando o *software OriginPro*, versão 8.5 (*OriginLab Corporation, Northampton,* MA).

4.8.8 Análise da solubilidade

A solubilidade do pó seco bacteriano foi determinada segundo Gontard (1993). Inicialmente, foram pesadas as placas de Petri ao qual seriam vertidos o pó seco e o solvente. Em seguida, foi pesado e adicionado a cada placa 50 mg do pó seco e 5 mL de água destilada, clorofórmio e ácido acético. A mistura foi deixada em repouso sobre a bancada por 48 h a temperatura ambiente (30 ºC). Após esse período, as amostras foram secas em estufa a 105 °C por 24h para determinação da massa seca final (m_f). Todas as análises foram conduzidas em triplicata sendo cada solvente analisado em triplicata, totalizando nove determinações independentes por condição experimental. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. A porcentagem de solubilidade foi calculada com base na diferença de massa antes e depois da imersão, conforme Equação 4.1.

$$S = \frac{m_i - m_f}{m_i} * 100$$ Equação (4.1)

Em que:

S é a porcentagem de umidade do filme polimérico;

m_i é a massa inicial da amostra em gramas e

m_f é a massa final da amostra seca em gramas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Os resultados do planejamento fatorial realizado estão dispostos na Tabela 5.1, é possível perceber que a produção do biopolímero variou de 2,49 a 5,45 mg/mL. De modo geral, concentrações mais altas de óleo de soja e razão de aeração menor tendem a favorecer o acúmulo de PHA, sugerindo que condições de elevada oxigenação e maior suplementação lipídica são mais adequadas para a biossíntese do polímero.

Tabela 5.1 - Matriz de delineamento experimental 2^2 com pontos axiais e repetições no ponto central, apresentando os efeitos (razão de aeração e quantidade de óleo de soja) com seus valores codificados, reais e o resultado da variável resposta (concentração de biopolímero).

Ensaios	Razão de Aeração	Massa de óleo de soja	Razão de Aeração (%)	Massa de óleo de soja (%)	Concentração de Biopolímero (mg/mL)
1	-1	-1	0,40	0,07	4,88
2	-1	+1	0,40	1,00	5,45
3	+1	-1	0,60	0,07	2,49
4	+1	+1	0,60	1,00	4,19
5	-1,41	0	0,36	0,50	4,82
6	+1,41	0	0,64	0,50	3,28
7	0	-1,41	0,50	0	5,06
8	0	+1,41	0,50	1,21	6,74
9	0	0	0,50	0,50	3,14
10	0	0	0,50	0,50	3,82
11	0	0	0,50	0,50	3,10
12	0	0	0,50	0,50	4,39
13	0	0	0,50	0,50	4,65

Com relação à razão de aeração, as maiores concentrações de PHA foram obtidas nos ensaios 2 (5,45 mg/mL) e 5 (4,82 mg/mL), ambos associados a razões de aeração inferiores (0,4 e 0,36, respectivamente). Assim, pode-se inferir que a maior disponibilidade de oxigênio pode induzir o microrganismo a direcionar o metabolismo para a rota de armazenamento de carbono sob a forma de PHA. Em contrapartida, nos ensaios com razão de aeração mais elevada, nas condições de 0,6 e 0,64, como os ensaios 3 e 6, caracteriza menor espaço vazio

no frasco e como consequência menor oferta de oxigênio, resultou em concentrações de PHAs menores (2,49 e 3,28 mg/mL, respectivamente), o que reforça a hipótese de que a menor disponibilidade de oxigênio no meio inibe o crescimento microbiano e parcialmente o acúmulo do polímero.

Quanto ao efeito do óleo vegetal de soja, percebe-se que sua presença exerceu impacto positivo na concentração de PHA produzido. A suplementação de 1,5 g (ensaios 2 e 4) promoveu um maior quantitativo de biopolímero observado (maior concentração), quando comparado aos ensaios 1 e 3 que não receberam essa suplementação. Assim, a combinação de 0,4 de razão de aeração e 1,5 g de óleo de soja apresentou-se como a condição mais promissora para a otimização da produção de polihidroxialcanoatos por *Cupriavidus necator* CCT 2489.

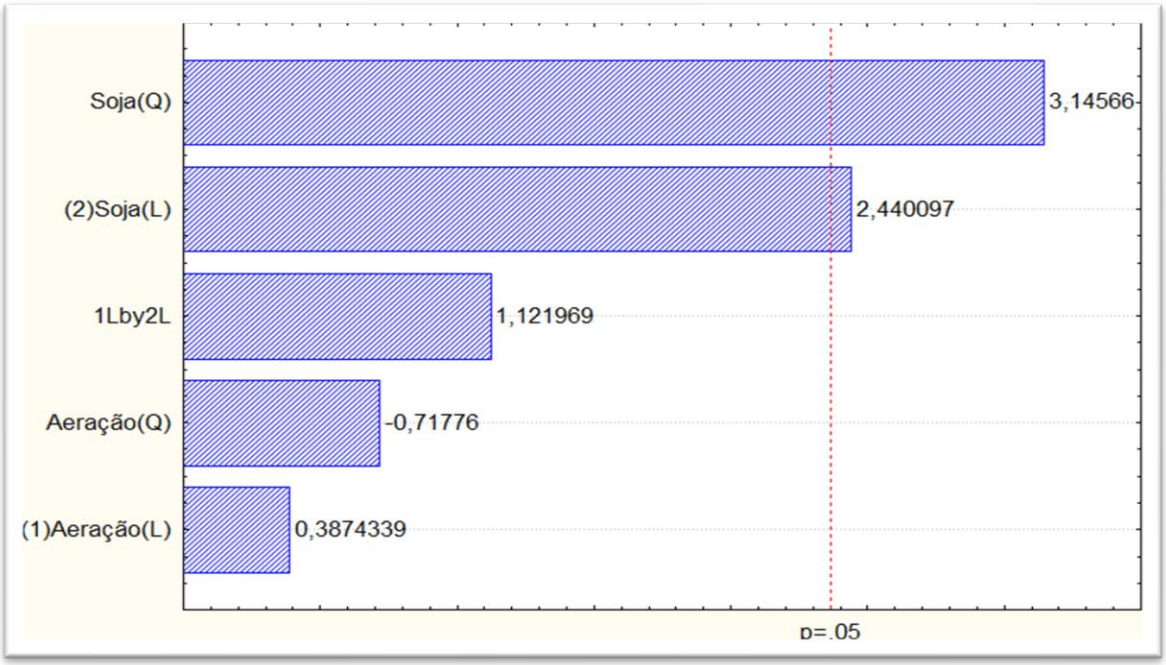
Diversos estudos têm explorado resíduos agroindustriais como substratos alternativos para a produção de PHA, visando reduzir custos Song e colaboradores (2025) utilizaram águas residuárias provenientes de uma planta piloto de produção de metano como fonte de carbono para *Cupriavidus necator* TISTR 1335, obtendo, em condições otimizadas, 3,02 g/L de PHA, valor pouco inferior ao obtido neste estudo com o extrato aquoso da vagem de algaroba que na média apresentou 4,30 g/L. De forma semelhante, Pérez-Camacho e colaboradores (2024) avaliaram a produção de PHA por *C. necator* utilizando frutose como substrato e óleo de amendoim ou propionato como adjuvantes à síntese dos biopolímeros. Os autores concluíram que o uso do óleo de amendoim foi mais vantajoso, proporcionando um aumento de 12,2% na biomassa e de 13,9% no acúmulo de PHA, com fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) superior a 0,80 g_x/g_s. De maneira comparável, neste trabalho observou-se que a adição de óleo de soja também favoreceu o processo de produção, resultando em maior quantidade de biopolímero após a extração.

Além disso, Yong e autores (2024) estudando o processo de otimização da produção de PHA a partir do resíduo do bagaço da cana de açúcar utilizando a linhagem de *Bacillus cereus* VIT-SSR1 concluíram que a relação entre o tempo de incubação (até 96h) e a temperatura (até 40 °C) é diretamente proporcional à produção de PHA. Por fim, o rendimento máximo de PHA produzido foi a 40 °C e 96 h para o bagaço da cana de açúcar.

A partir da análise do diagrama de Pareto (Figura 5.1), é possível aferir que a suplementação com óleo de soja demonstrou significância estatística, tanto em termos lineares, quanto em termos quadráticos, para a produtividade final do biopolímero, com efeito positivo, ou seja, a adição de óleo de soja ao meio de cultivo, elevou a produção de PHAs por *C. necator* CCT 2489. Entretanto, observando os valores da razão de aeração e sua interação

com o óleo de soja no diagrama de Pareto, conclui-se que a aeração não teve influência significativa na produção do biopolímero.

Figura 5.1 - Diagrama de Pareto.



Fonte: Autoria própria.

A análise de variância (ANOVA), expressa na Tabela 5.2, foi realizada para avaliar a influência dos fatores razão de aeração e quantidade de óleo de soja sobre a produção de polihidroxialcanoatos (PHA) por *Cupriavidus necator* CCT 2489. O modelo apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,726, o que demonstra capacidade preditiva satisfatória e adequação do modelo experimental.

De acordo com a análise de variância, é possível que a razão de aeração não tenha exercido influência significativa na produção de PHA, não representando uma variável limitante ao processo. Embora, fenomenologicamente, houve aumento do biopolímero em maior disponibilidade de oxigênio no frasco de cultivo. Por outro lado, o fator óleo de soja apresentou efeito estatisticamente significativo nos termos linear ($p = 0,0447$) e quadrático ($p = 0,0163$), indicando que a concentração deste componente exerce influência direta e não linear sobre a produção de PHA. O comportamento quadrático observado sugere a existência de um ponto ótimo de concentração, no qual ocorre o máximo acúmulo do biopolímero. As concentrações inferiores podem não fornecer nutrientes suficientes, enquanto níveis mais elevados possivelmente geram excesso de compostos que afetam negativamente o metabolismo celular.

Tabela 5.2 - Análise de variância para produção de polihidroxialcanoatos.

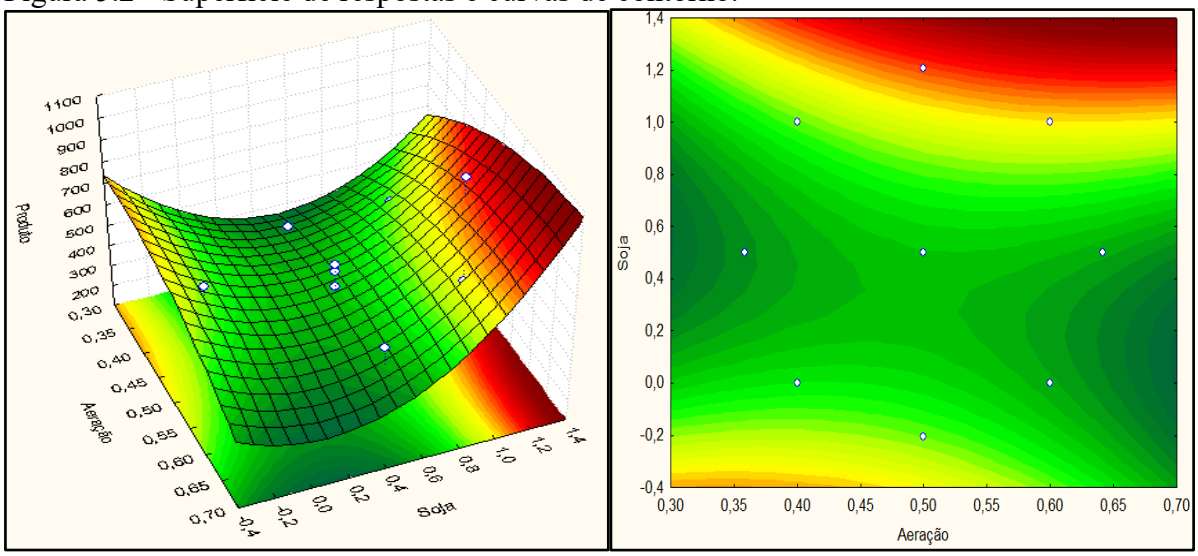
	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fator F	Nível de significância (p)
(1) Aeração (L)	1168,7	1	1168,70	0,150105	0,709946
Aeração (Q)	4011,1	1	4011,13	0,515179	0,496155
(2)Soja (L)	46357,8	1	46357,82	5,954073	0,044753
Soja (Q)	77043,0	1	77043,00	9,895195	0,016250
1L x 2L	9801,0	1	9801,00	1,258814	0,298882
Erro	54501,3	7	7785,90		
Total	198951,1	12			

Legenda: valores sublinhados têm efeito estatisticamente significativo na variável resposta

A interação entre os fatores razão de aeração e óleo de soja não foi significativa (p = 0,2988), demonstrando que o efeito da concentração de óleo de soja sobre a resposta não depende dos níveis de aeração. Dessa forma, o principal fator determinante para o aumento da produção de PHA, neste estudo, foi a concentração de óleo de soja, sendo este o parâmetro mais relevante para fins de otimização do processo.

A Figura 5.2 mostra a superfície de resposta e curvas de contorno, permite observar que as regiões com a maior concentração de PHA (em vermelho escuro) estão localizadas nos pontos em que há maior quantidade de óleo de soja e menor razão de aeração. Logo, em processos utilizando o extrato aquoso da algaroba como substrato na concentração de 15ºBrix, e razão de aeração inferior a 30% concomitante a uma quantidade igual ou superior a 1,5g de óleo de soja, favorecem a maior produção de PHAs.

Figura 5.2 - Superfície de respostas e curvas de contorno.



Fonte: Autoria própria

Para a produção otimizada de PHA por *C. necator* CCT 2489 obteve-se um modelo de segunda ordem expresso pela Equação 5.2.

$$[PHA] = 4{,}9294 - 2{,}8123\,X_2 + 4{,}3347\,(X_2)^2 \qquad (5.2)$$

Em que,

[PHA] = concentração de polihidroxialcanoatos (mg/mL)

X_2 = termo linear da quantidade de óleo de soja (g)

$(X_2)^2$ = termo quadrático da quantidade de óleo de soja (g)

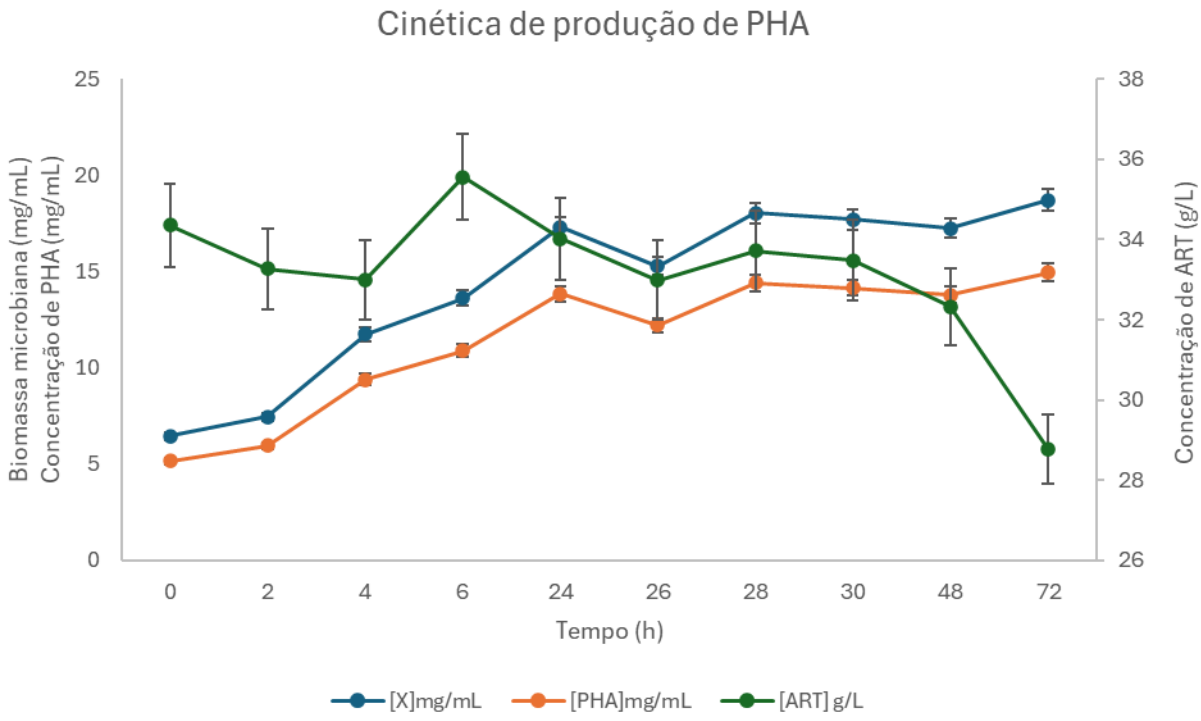
5.2 VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS

A Figura 5.3 demonstra o acompanhamento cinético da produção de polihidroxialcanoato, mostra o crescimento da linhagem de *C. necator* e sua relação direta com a concentração de PHA produzido, além do consumo de açúcares fermentescíveis presentes no meio de cultivo ao longo de 72h de processo.

Durante o processo, percebeu-se um crescimento acentuado da linhagem já no início evidenciando adaptação ao meio, vale salientar que a quantidade de inóculo adicionado ao meio foi responsável por essa adaptação. A fase exponencial de crescimento microbiano foi identificada no período de 0 a 24h, atingindo uma concentração de 17,29 g/L, após constatou-

se uma constância na concentração celular, identificando a fase estacionária do processo. Esse comportamento, mesmo em um meio não convencional, pode ser explicado devido a sinergia entre vias metabólicas glicolíticas, glicose oriunda do extrato aquoso da algaroba, e de β-oxidação, lipídeos oriundos do óleo vegetal de soja.

Figura 5.3 – Análise cinética da produção de polihidroxialcanoato na validação do processo otimizado.



Fonte: Autoria própria

O teor de açúcares redutores totais foi de 34,35 g/L no início do processo, e ao final foi de 28,76 g/L, tendo a linhagem consumido 5,59 g/L. Essa redução apresenta uma tendência geral ao longo do tempo, com pequenas oscilações intermediárias, todavia é possível notar que ainda há concentrações significativas de açúcar no meio, o que pode ser atribuído ao fato da *C. necator* não metabolizar sacarose diretamente. O extrato aquoso de algaroba é constituído também por glicose, assim, justificou-se o seu consumo para o desenvolvimento da linhagem durante o processo.

Durante a fase exponencial de crescimento microbiano, há um aumento consistente e progressivo na concentração de PHA atingindo seu máximo de 14,96 mg/mL ao final do cultivo, o que infere que, nesse período, a linhagem de *C. necator* foi capaz de acumular carbono na forma de biopolímero, e esse acúmulo pode ser ao redor de 90% do peso seco da

biomassa microbiana (SPIEKERMANN et al., 1999). Adicionalmente, constatou-se que o acúmulo intracelular de PHA ocorre de forma simultânea ao crescimento microbiano

5.3 ANÁLISE ELEMENTAR

Para a investigação da composição química do biopolímero formado, uma análise elementar comparativa foi realizada entre o PHA sintetizado por *C. necator* no extrato da vagem de algaroba (Tabela 5.3) e o PHB comercial. Esta análise mostra predominância de carbono e hidrogênio nas concentrações de 52,05% e 7,12%, respectivamente, o que sugere a formação de um composto polimérico.

Tabela 5.3 - Composição elementar do polímero comercial e do polímero bacteriano.

	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]
PHA comercial	0	55,44 ±1,53	6,56 ±0,21	0
PHA bacteriano	4,87 ±0,07	52,05 ±1,46	7,12 ±0,11	0

Legenda: N – Nitrogênio; C – Carbono; H – Hidrogênio e S – Enxofre

Fonte: Autoria própria

O nitrogênio está ausente no comercial visto que o comercial possui etapas de purificação passando por lavagem, precipitação e secagem do polímero para remoção de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e resíduos celulares. Aramvash; Moazzeni; Gholami (2018) estudaram a viabilidade de purificação de PHB produzido por *C. necator,* utilizando sete solventes não halogenados (ácido acético, hexano, propanol, metanol, DMSO, dimetilformamida (DMFO) e carbonato de etileno) e concluíram que carbonato de etileno obteve os melhores resultados de rendimento de recuperação e pureza de 98,6% e 98%, respectivamente, como também os PHBs purificados por carbonato de etileno e DMSO exibiram estabilidade térmica e peso molecular comparáveis aos de PHB comercial.

Todavia, os resultados indicam nitrogênio presente na amostra bacteriana que pode advir de proteínas não metabolizadas ou biomassa residual visto que não houve purificação da amostra. Esses achados consistem com as descobertas de Mukheem e autores (2020) que avaliaram a fabricação de um composto polihidroxialcanoato-quitosana com atividade antibacteriana para aplicações biomédicas e constataram que sua composição principal foi de carbono, hidrogênio, oxigênio e traços de nitrogênio.

Adicionalmente, Gladysz e coautores (2025) estudaram a eletroescrita por fusão de polihidroxialcanoatos para estruturas de suporte (scaffolds) degradáveis enzimaticamente e ao

analisarem a composição dos polímeros (PHBV+P34HB) por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX) que foram usados nos experimentos identificaram carbono (C) e oxigênio (O) em maior proporção, boro (B), nitrogênio (N), magnésio (Mg) e silício (Si) em menor proporção.

5.4 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO BIOPOLÍMERO

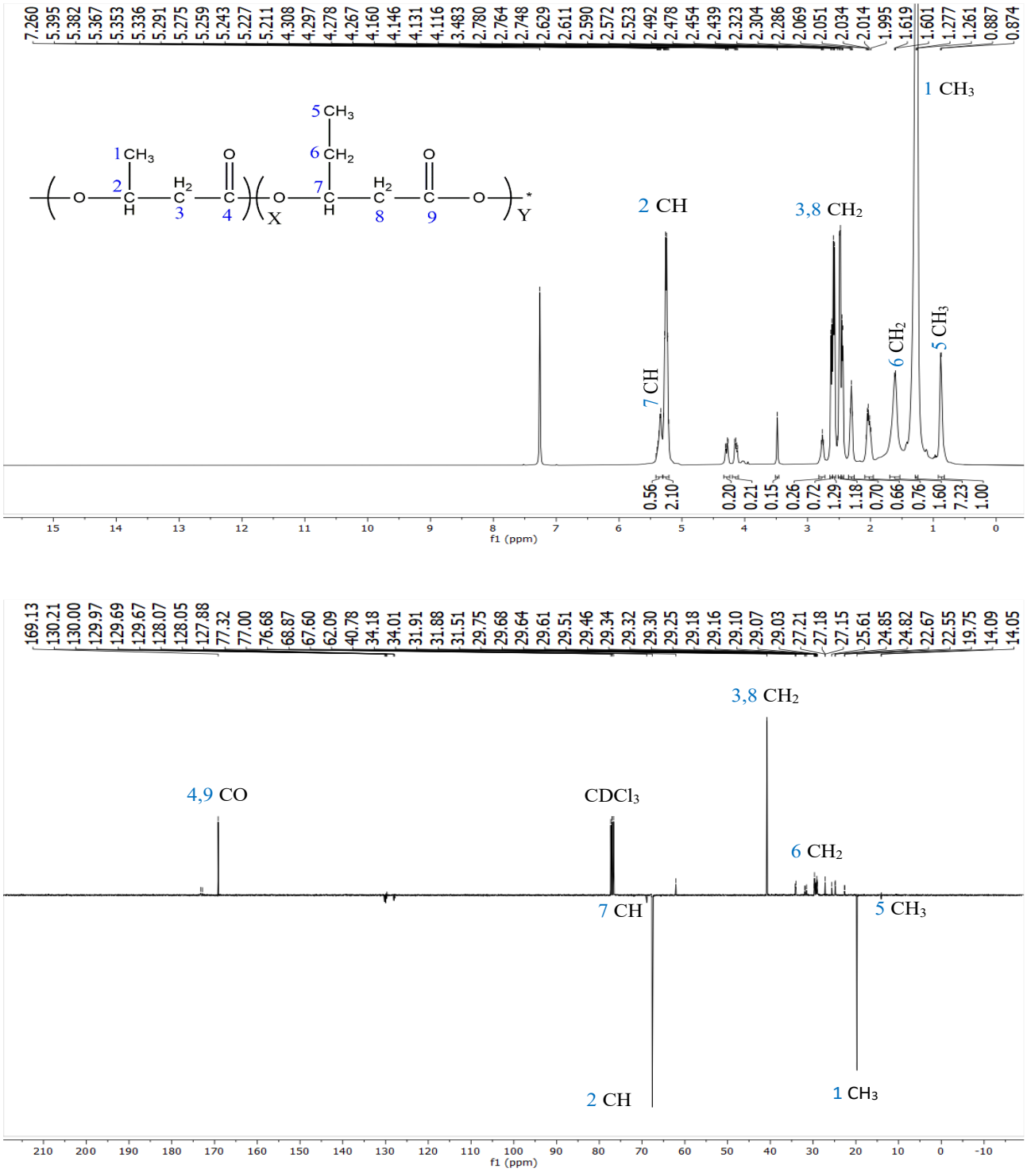
A Figura 5.4 mostra os espectros de RMN de 1H e 13C, respectivamente, correspondentes ao PHA produzido a partir do extrato aquoso de algaroba suplementado com óleo de soja, permitindo identificar diferentes unidades monoméricas do PHA. O sinal em aproximadamente 77 ppm era um tripleto correspondente ao solvente CDCl3.

Inicialmente, analisando os sinais do carbono 13C, os grupos {CO}, {CH}, {CH_2} e {CH_3}, apresentaram sinais de deslocamento químico (ppm) do monômero 3HB: 169,13 / 67,60 / 40,78 / 19,75, respectivamente. Adicionalmente, o espectro de carbono 13C também exibiu sinais nos valores de 68,87 / 40,78 / 29,68 e 14,09 ppm correspondente ao {CH}, {CH_2}, {CH_2} e {CH_3} do monômero 3HV, respectivamente. Os demais sinais não identificados e baixa intensidade no espectro do carbono 13C foram tratados como impurezas na amostra pelo fato de não ter havido uma etapa prévia de purificação da amostra.

Para o espectro de 1H, foi demonstrado que os prótons da metila {CH_3} da cadeia ramificado do monômero 3HB forneceu a ressonância dupleto sinal a 1,27 e 1,26 ppm; os prótons metileno {CH_2} forneceram 2 dupletos do sinal de ressonância quádrupla em 2,47–2,59 ppm; os prótons metano {OCH} forneceram o sinal de ressonância múltipla a 5,24–5,25 ppm. Adicionalmente, a metila {CH_3} da cadeia ramificada do monômero 3HV foi associada ao dupleto em 0,88 e 0,87 ppm. Os prótons de metileno {CH2} nos monômeros 3HB e 3HV forneceram o sinal de ressonância múltipla a 2,47–2,59 ppm; o próton metano {OCH} forneceu a ressonância múltipla sinal em 5,33–5,35 ppm; os prótons metileno {CH2} da cadeia ramificada no monômero 3HV forneceu o sinal de ressonância de 1,60 e 1,61.

Nygaard e autores (2023) ao avaliarem formas de melhorar as condições de fermentação para produzir PHAs, como PHB e PHBV, a partir de glicerol residual por uma linhagem do tipo selvagem de *C. Necator* obtiveram espectros e valores de sinais muito próximos aos encontrados nesse estudo o que reforça a formação de um heteropolímero de PHA a partir do extrato aquoso de algaroba.

Figura 5.4 - Espectro de RMN de 1H e espectro de RMN de 13C.



Fonte: Autoria própria

Para além disso, Aramvash e pesquisadores (2016) investigou os efeitos da utilização de uma combinação de substratos (frutose, propanol, ácido cítrico, ácido acético, ácido

propiônico e extrato de carne bovina) na síntese de PHBV e ao caracterizar o polímero produzido concluiu que era de fato o PHBV apresentando picos bastante próximos ao desse trabalho o que reforça e confirma a formação desse polímero neste trabalho.

5.5 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO BIOPOLÍMERO

A Tabela 5.4 apresenta os principais compostos obtidos da metanólise do PHA extraído de *C. necator*. Os 3 picos iniciais são do ácido butanoico e seus isômeros, todos derivados do processo de metanólise do biopolímero. Já próximo ao tempo de retenção de 10 minutos se refere ao ácido 3-metilbutírico (também conhecido como ácido isovalérico) derivado do catabolismo do aminoácido leucina.

Adicionalmente, analisando a Tabela 5.4, a porcentagem de área dos picos percebe-se um baixo grau de pureza pela ausência de um uma etapa de purificação prévia à análise de cromatografia, sendo o ácido butanoico o composto de maior pureza com 44,48%. Além disso, esses compostos menores, cerca de 4 a 5 carbonos, são derivados do PHA em virtude de a glicose ser a fonte primária no metabolismo do microrganismo.

Tabela 2.4 - Principais compostos de PHA obtido por CG-EM.

	Nome	Tempo de retenção (T_R)	Área	Área (%)
PHA extraído	Ácido butanoico, 3-hidroxi-, éster metílico,	5.709	2585796	9.61
	Ácido butanoico, 3-hidroxi-, éster etílico	7.174	11962985	44.48
	Ácido butanoico, 3-oxo-, éster metílico	9.025	2598707	9.66
	3 - metilbutirato de etila (isovalerato de etila)	10.003	7522427	27.97
	ácido 3 - metilbutírico (ácido isovalérico)	10.805	2224863	8.27
TOTAL			26894778	100.0

Fonte: Autoria própria

Hassan e colaboradores (2025) isolando e identificando PHA produzido por *Mycolicibacterium Smegmatis,* obtiveram ácido 2-butanoico e ácido-3-hidroxibutírico com 3.44 minutos e 17% de pureza e 6.01 minutos e 10,6% de pureza, respectivamente. Esses tempos são próximos ao encontrado no presente trabalho, todavia foram utilizados microrganismos diferentes e meios diferentes, o que altera o produto final e sua composição, grau de pureza e derivados metabólicos.

Ridella e companheiros (2025) exploraram a viabilidade de converter a gordura da casca do cacau em um recurso valioso para a produção de biopolímeros usando *C. necator* para realizar a fermentação da gordura extraída. A análise por CG revelou que a composição monomérica do PHA sintetizado era principalmente 3-hidroxibutirato (3HB) com 0,29% e 1,30% de conteúdo molar de 3-hidroxivalerato (3HV) e unidades de cadeia média (HAmcl), respectivamente. Essa distribuição monomérica é similar à observada no PHA derivado do óleo de amendoim que é rico em ácidos graxos saturados (Pérez-Arauz et al., 2019).

Já para Rodrigues; Silvério e Druzian (2019) que caracterizaram copolímeros biodegradáveis de linhagens de *Cupriavidus necator* (IPT 026 e IPT 027) usando glicerol bruto como substrato, concluíram que os principais monômeros eram o hidroxihexadecanoato e hidroxi-9,11-octadecadienoato, monômeros de cadeia longa, demonstrando forte influência da fonte de carbono utilizada na composição dos polímeros com tempos de retenção de 7.77 e 9.87 minutos, respectivamente.

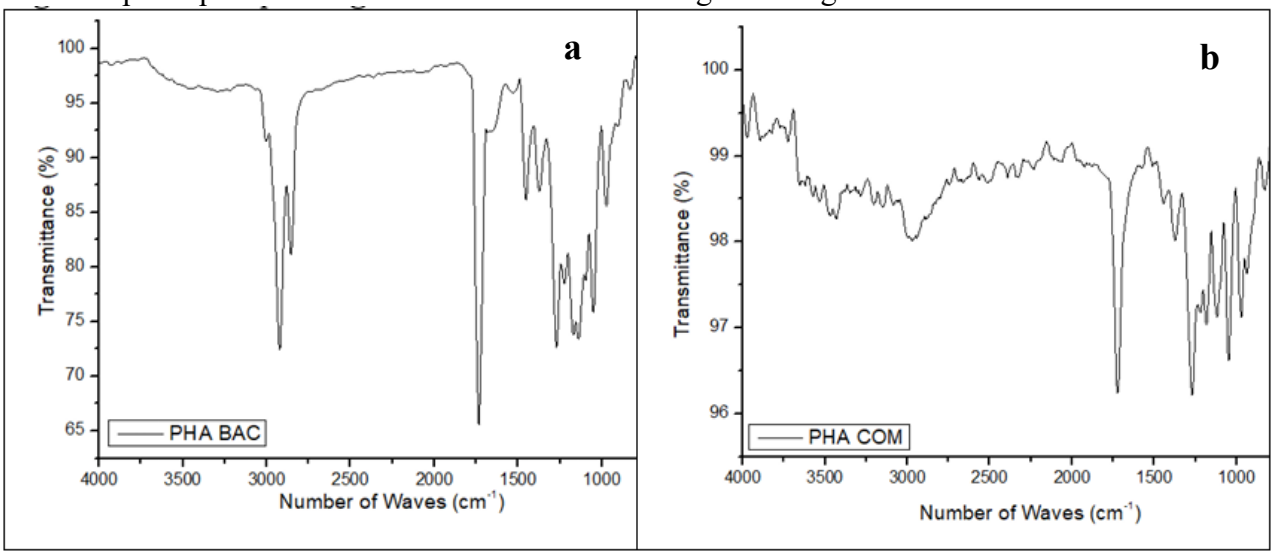
5.6 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DO BIOPOLÍMERO

O espectrograma da análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do PHA produzido a partir do material polimérico obtido no experimento com maior rendimento (experimento 8) como descrito no planejamento experimental mostrado na Figura 5.5.

O espectro mostra bandas características típicas de grupos funcionais de um PHA, como o estiramento da hidroxila (OH) em 3234 cm^{-1} (3200–3500 cm^{-1}), C-O-C (1185–1228 cm^{-1}) (WENG; WANG e WANG, 2011). Neste estudo, foi detectado um pico intenso em 2925 cm^{-1} que, provavelmente, seja do acúmulo de metileno ao longo do polímero PHBV (–C-H) (2922–2929 cm^{-1}), C-O (1000–1300 cm^{-1}) (SILVERSTEIN e BASSLER, 2005) e um

pico de absorção acentuado em 1736 cm^{-1}, que corresponde ao estiramento do grupo carbonila do éster (C=O) (1600–1850 cm^{-1}) (HONG et al., 1999).

Figura 5.5 - Espectrograma de FTIR comparando PHA bacteriano (a) e o PHA comercial (b) extraído após o processo fermentativo no extrato da vagem de algaroba.



Fonte: Autoria própria

O grupo carbonila é um grupo funcional chave no PHA, pois é responsável pela formação da ligação éster entre os monômeros de hidroxialcanoato, que pode influenciar as propriedades do PHA. A banda de absorção em 1736 cm^{-1} corresponde à vibração do grupo CH_2 alifático na cadeia principal do PHA (SACHAN et al., 2025). Além disso, a curvatura assimétrica de CH, apresentada nas faixas de 1450–1460 cm^{-1} e 1375–1385 cm^{-1}, correspondeu aos grupos CH_2 e CH_3, respectivamente, e foi relatada por Oliveira e autores (2007). Por fim, a análise do FTIR do composto isolado bacteriano, a partir dos grupos funcionais e ligações químicas associados às vibrações espectrais apresentados neste estudo, corresponderam ao polihidroxialcanoato corroborado pelos resultados similares obtidos nos estudos supracitados.

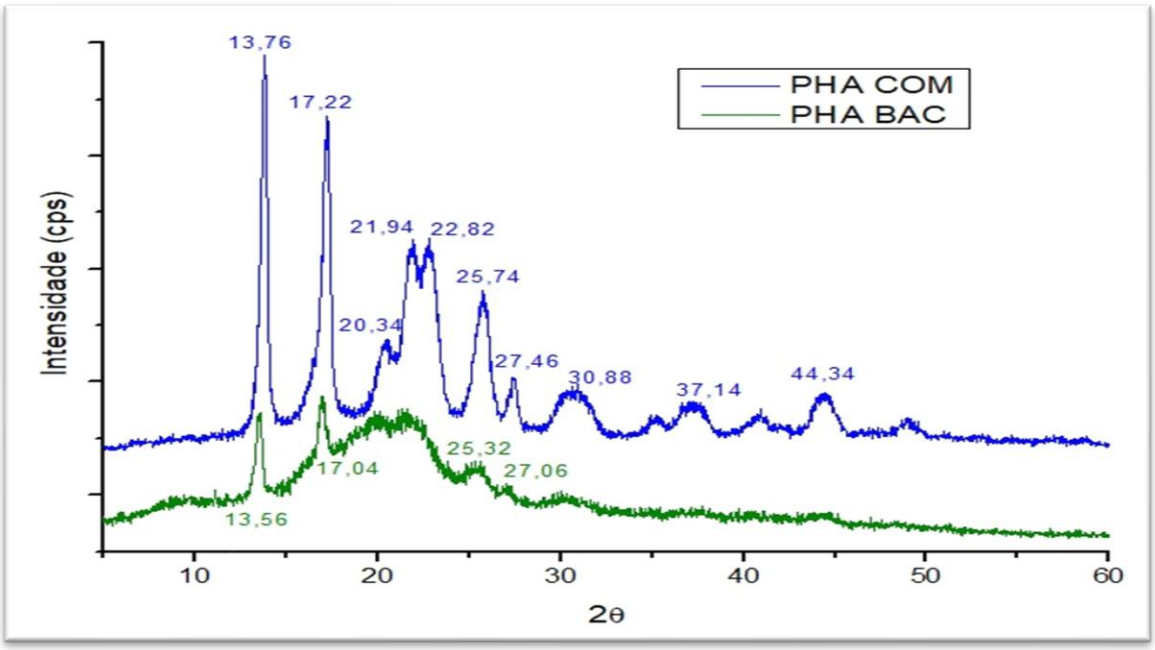
5.7 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO BIOPOLÍMERO

No comparativo dos difratogramas de raios X (Figura 5.6) entre o “PHA COM” e “PHA BAC” é possível notar a presença de picos alinhados ou bem definidos com as regiões 13,56 / 17,04 / 25,32 / 27,06 o que representa regiões cristalinas na amostra bacteriana,

todavia, a menor intensidade e o alargamento dos picos observados quando comparado ao comercial sugerem uma redução no grau dessa cristalinidade, indicando que o material apresenta natureza semicristalina que, possivelmente, seja explicada pelo fato do material polimérico bacteriano não ter sido submetido a um processo de purificação prévio a análise sendo submetido na forma de um material polimérico bruto contendo impurezas na sua composição.

Os picos nas proximidades de ~13° e ~17° no difratograma correspondem a reflexões cristalinas características do poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)), visto que esse é o monômero mais comum de PHA produzido por *C. necator*. O pico próximo a 13° é atribuído ao plano cristalino (020) da estrutura cristalina ortorrômbica do PHB. Já o pico próximo a 17° corresponde ao plano (110) ou outro plano de alta ordenação cristalina do mesmo composto.

Figura 5.6 - Perfis de difração de raios-X para PHA comercial (PHA COM) e PHA bacteriano (PHA BAC).



Fonte: Autoria própria

Etxabide e autores (2022) analisando o bagaço de uva como fonte de carbono para a produção de PHB *C. necator* observou picos distintos para o PHB em valores de 2θ de 13,21° e 16,64°, atribuídos aos planos (020) e (110), o que indica a estrutura cristalina do biopolímero.

Sachan e colaboradores (2025) submetendo bactérias produtoras de PHA em águas residuais a análise de DRX obteve picos em 27,28°, 31,63° e 45,35° e concluiu que sua amostra também era um PHA semicristalino. Apresenta-se também, para “PHA COM”, picos

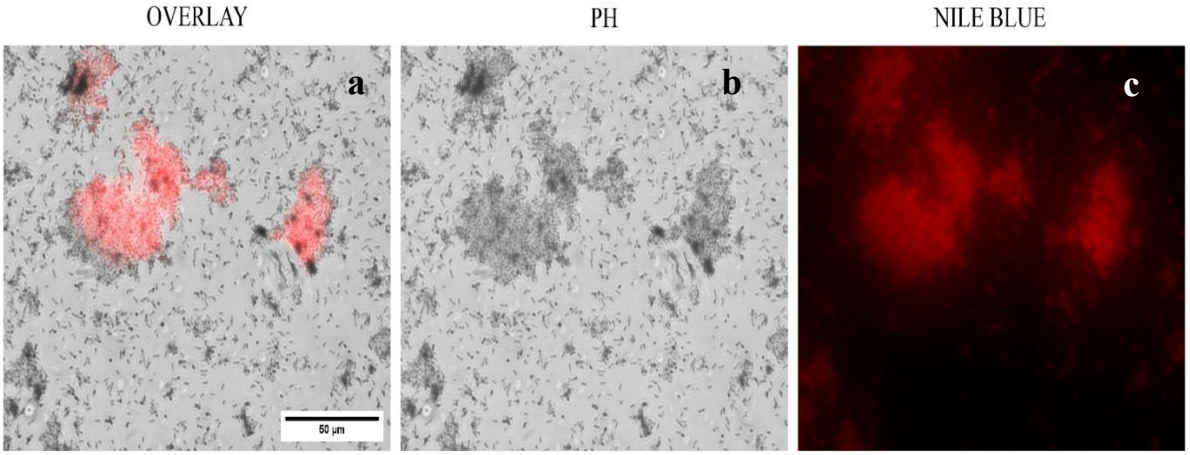
na casa de 20° onde segundo Wang e coautores (2008), esse pico de refração é atribuído à forma β dos cristais do polímero.

Aguiar e coautores (2021) comparando o processo de extração química e extração biológica do PHB em *C. necator* determinou que o grau de cristalinidade do PHB em extração química e extração biológica foi de 56,7 e 58,4%, respectivamente, e que esses valores se encontram dentro da faixa de cristalinidade, de 55 a 80% proposto por Machado e colaboradores (2010). Garcia e autores (2006) comparando o grau de cristalinidade entre PHB extraído quimicamente e purificado, e PHB extraído quimicamente e não purificado constatou apenas um aumento no grau de cristalinidade de 3,36% para a amostra obtida pelo método químico após a etapa de purificação em relação a amostra não purificada.

5.8 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS BACTERIANAS

A microscopia de fluorescência constituiu o marco inicial da investigação da produção de PHA. Por meio do uso do corante Azul do Nilo, um composto que apresenta afinidade pelo polímero, foi possível avaliar a presença ou ausência de PHA nas células bacterianas cultivadas em meio não convencional à base de extrato aquoso de algaroba, a microscopia está representada na Figura 5.7.

Figura 5.7 - Microscopia óptica com sobreposição (a), contraste de fase (b) e microscopia de fluorescência (c).



Fonte: Autoria própria

A microscopia óptica (b) permitiu a visualização da disposição das bactérias no campo analisado, evidenciando ora células dispersas, ora células agregadas devido a produção de muco, que é característica particular dessa espécie. Essa abordagem possibilita a observação

geral da densidade celular e da formação de agregados bacterinas, porém apresenta limitações quanto à visualização dos grânulos citoplasmáticos de PHA.

Em contrapartida, a microscopia de fluorescência (c) nos mostra regiões intensamente fluorescentes em tonalidades avermelhadas, correspondentes às áreas onde o fluoróforo se encontra associado aos grânulos de PHA. A sobreposição espacial (a) entre os aglomerados bacterianos observados na microscopia óptica e as regiões fluorescentes indicam uma correlação direta entre a presença do biopolímero no citoplasma bacteriano e o sinal de fluorescência, sugerindo marcação eficiente e seletiva. Dessa forma, a microscopia de fluorescência complementa a microscopia óptica ao fornecer maior contraste e especificidade, permitindo uma visualização mais precisa do acúmulo do biopolímero no interior das bactérias.

5.9 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO BIOPOLÍMERO

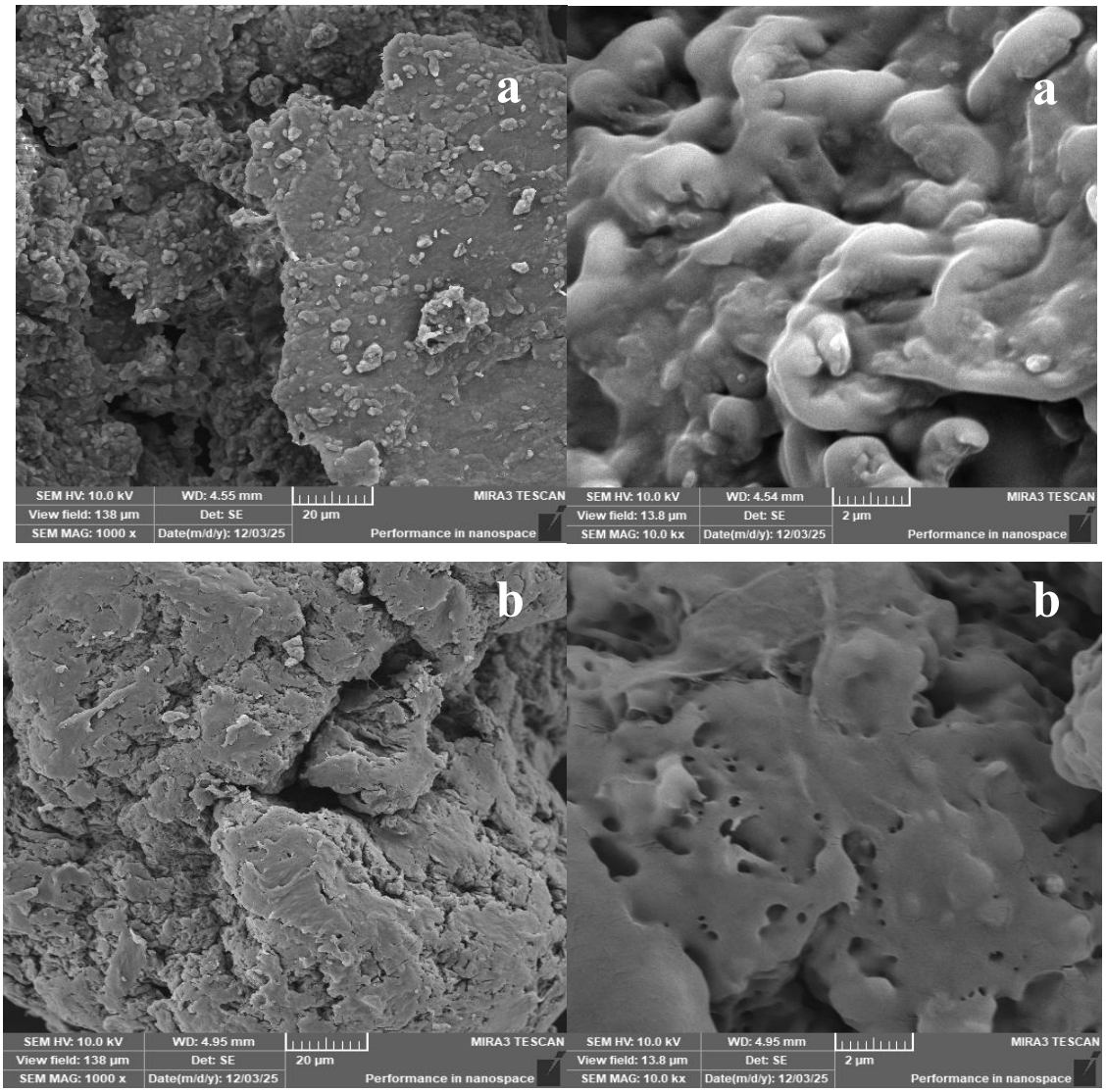
A observação de PHAs por meio de microscopia eletrônica de varredura – MEV (Figura 5.8) se mostra eficiente para obter informações sobre a morfologia e a estrutura da superfície desses polímeros tão versáteis. Essa técnica analítica facilita uma exploração acerca da superfície do material em escalas micro e nanométricas, revelando características como grânulos, rugosidade da superfície e textura geral. Além disso, a análise de MEV permite a quantificação precisa do tamanho e da dispersão das partículas, fornecendo informações essenciais sobre a uniformidade do polímero.

As micrografias representadas na Figura 5.8 destacam características específicas da superfície, incluindo poros ou fissuras, que influenciam significativamente as propriedades do material. Quando comparado ao comercial na magnificação de 1000x, o grânulo bacteriano apresenta menos fissuras o que impactará diretamente no seu grau de solubilidade. Além disso, o grânulo comercial, por ser submetido a toda uma cadeia de produção, apresenta grânulos com bordas mais definidas, enquanto o bacteriano é bastante variado e amorfo em sua conformação.

Como também, na magnificação de 10000x, a heterogeneidade das superfícies se mostra mais visível de forma que o grânulo bacteriano (C) se apresenta com mais vilosidades e de formato descontinuado o que culmina em uma amostra mais amorfa frente ao grânulo comercial (D), que se apresenta mais compacto e homogêneo e demonstra possuir uma

estrutura mais cristalina. Esse resulta se evidencia com a análise do DRX que demonstrou que o grânulo comercial apresentava regiões mais cristalinas quando comparado ao grânulo bacteriano. Essas conclusões são semelhantes às encontradas por Sachan e colaboradores (2025) ao analisarem grânulos de PHA produzidos por *Bacillus paranthracis* RSKS-3.

Figura 5.8 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia da superfície do grânulo bacteriano de PHA (a) e do grânulo de PHA comercial (b).



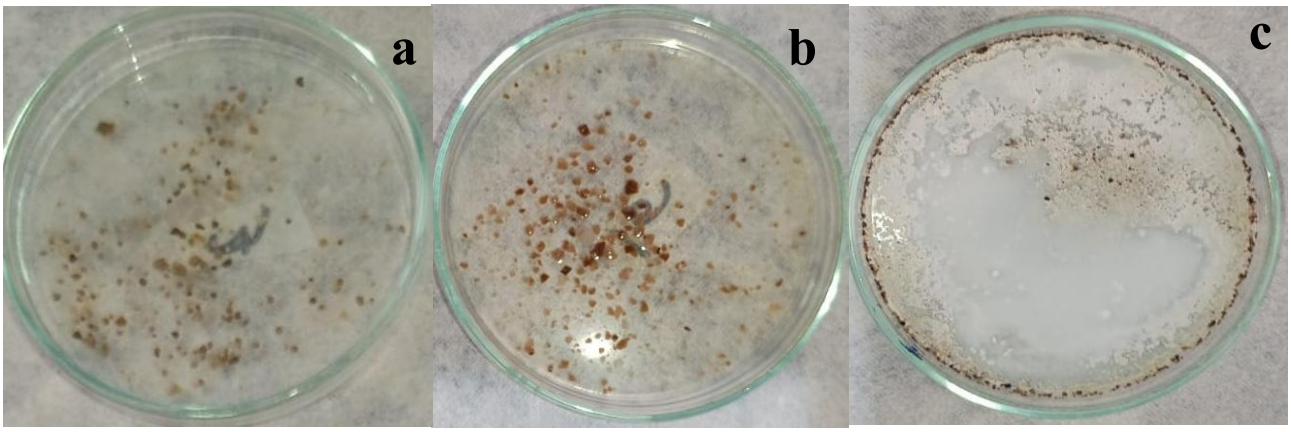
Fonte: Autoria própria

5.10 ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DO BIOPOLÍMERO

É possível analisar, empiricamente, que o tamanho de partícula influenciou na solubilidade, onde, por exemplo, observando a Figura 5.9 nota-se que os grânulos de PHA menores ficaram mais intumescidos em ácido acético após 48 h do que em água ou

clorofórmio. Além disso, a permanência desses solventes sobre a bancada não se mostrou um modo prático de analisar e comparar a solubilidade desses solventes, visto que, o clorofórmio volatilizou por completo já nas primeiras 12 h o que inviabilizou o cálculo final da solubilidade nas 48 h de experimento, como também, devido à baixa solubilidade do PHA em diversos solventes, mesmo em clorofórmio, deve-se utilizar de aquecimento da mistura para acelerar o processo de solubilidade e por isso, o autor sugere o aquecimento da mistura como observado nos experimentos de (ZHUIKOV e ZHUIKOVA, 2024) seguido do repouso a temperatura ambiente.

Figura 5.9 - Comparativo da análise de solubilidade entre os solventes: água (a), ácido acético (b), clorofórmio (c).



Fonte: Autoria própria

Os PHAs são poliésteres, em geral, pouco solúveis em água, mas solúveis em certos solventes orgânicos (TERADA e MARCHESSAULT, 1999). A solubilidade depende fortemente da composição (scl vs mcl, copolímeros, insaturações) e grau de cristalinidade. Para produzir filmes com boas propriedades mecânicas, é necessário o uso de um solvente com parâmetros de solubilidade similares aos do polímero (ANBUKARASU; SAUVAGEAU e ELIAS, 2015).

Os PHAs de cadeia curta (ex.: PHB) e copolímeros como P(3HB-co-3HHx) ou P(3HB-co-3H5HE) são tipicamente extraídos e analisados usando solventes halogenados como clorofórmio, diclorometano ou 1,2-dicloroetano, indicando boa solubilidade nesses meios (CONNERS e BOSE, 2025). Todavia, esses solventes são substâncias químicas mais nocivas à saúde humana e ao meio ambiente. Além disso, a grande afinidade do polímero com o clorofórmio pode acarretar na reminiscência de traços do solvente no material, mesmo após

longo tempo, o que poderia ser um grande risco à saúde humana quando utilizado em aplicações médicas ou alimentícias (ANBUKARASU; SAUVAGEAU e ELIAS, 2015).

O ácido acético (ZHUIKOV e ZHUIKOVA, 2024), carbonato de dimetila (DMC) (SAMORÌ et al., 2015), carbonato de propileno (PC) (FIORESE et al., 2009) surgem como solventes menos tóxicos e “mais verde”, todavia ainda são solventes pouco explorados dispondo de poucos materiais na literatura.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou a otimização da produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) pela linhagem *Cupriavidus necator* CCT 2489 utilizando o extrato aquoso da vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*) como substrato não convencional, suplementado com óleo vegetal de soja como indutor do acúmulo do biopolímero. Além disso, foi demonstrando o potencial do extrato aquoso da algaroba para o cultivo microbiano e para a biossíntese de PHAs, alinhado aos princípios da economia circular e da valorização de biomassas regionais abundantes no semiárido nordestino.

A partir do planejamento experimental proposto, verificou-se que a suplementação com óleo vegetal de soja teve influência significativa no acúmulo de PHAs, especialmente em concentrações superiores, indicando que a presença de fontes lipídicas favorece o direcionamento metabólico da *C. necator* para a biossíntese do polímero. Além disso, concluiu-se que a razão de aeração não teve significância estatística para o acúmulo intracelular de PHA.

Os experimentos conduzidos posteriormente ao processo de otimização validaram as condições otimizadas e confirmaram a reprodutibilidade do sistema de cultivo ao demonstrar que o crescimento microbiano foi acelerado pela sinergia da via glicolítica e da β-oxidação o que reforça a robustez da estratégia proposta.

As análises de caracterização indicaram que o material extraído apresenta características compatíveis com polihidroxialcanoatos. Os espectros de FTIR evidenciaram bandas típicas dos grupos funcionais associados aos PHAs, enquanto os difratogramas de raios X revelaram regiões cristalinas e semicristalinas no polímero produzido, em comparação ao material comercial analisado. A ressonância magnética nuclear elucidou a estrutura do biopolímero produzido sendo este o PHBV o que se soma e confirma na análise dos compostos encontrados na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas sendo estes isômeros do ácido butanoico e do ácido pentanoico.

As análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura mostraram diferenças na superfície dos grânulos, com menor incidência de fissuras no PHA bacteriano, o que influenciou no grau de solubilização observado na análise de solubilidade do biopolímero extraído. No estudo de solubilidade o biopolímero produzido apresentou maior intumescimento em ácido acético, de forma empírica, quando comparado à água e ao clorofórmio, comportamento que pode estar associado à sua morfologia superficial.

De forma geral, os resultados demonstram que a estratégia proposta para a produção de PHAs por *Cupriavidus necator* CCT 2489, utilizando extrato aquoso de algaroba suplementado com óleo vegetal de soja, mostrou-se promissora, contribuindo para o desenvolvimento de rotas biotecnológicas mais sustentáveis e economicamente atrativas para a produção de biopolímeros a partir de fontes renováveis e regionais.

E como perspectivas futuras para esta pesquisa pode-se indicar a avaliação de outras porcentagens do óleo de soja na composição do extrato aquoso da vagem, a utilização de solventes mais polares, como acetato de etila e dimetilsulfóxido, na solubilização do biopolímero produzido, e ainda, a verificação de possíveis aplicações do filme biodegradável.

REFERÊNCIAS

ABOMOHRA, A.; FAISAL, S.; EBAID, R.; HUANG, J.; WANG, Q.; ELSAYED, M. Recent advances in anaerobic digestion of lipid-rich waste: challenges and potential of seaweeds to mitigate the inhibitory effect. **Chemical engineering journal**, v. 449, p. 137829, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137829>.

AGUIAR, L. O.; STACHEWSKI, N.; GARCIA, M.C.F.; KUREK, A.P.; SCHNEIDER, A. L. S.; MOUGA, D. M. D. S.; PEZZIN, A. P. T. Avaliação das propriedades do biopolímero polihidroxibutirato (PHB) extraído por vermes de Zophobas morio Fabricius. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 26, p. e12938, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-707620210001.1238>.

ALVES, A. A.; SIQUEIRA, E. C.; BARROS, M. P. S.; SILVA, P. E. C.; HOULLOU, L. M. Polyhydroxyalkanoates: A review of microbial production and technology application. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 20, n. 3, p. 3409-3420, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04213-9>.

AMSTUTZ, V.; ZINN, M. Syngas as a sustainable carbon source for PHA production. In: **The Handbook of Polyhydroxyalkanoates**. CRC Press, 2020. p. 377-416. Disponível em:<https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9780429296611-17/syngas-sustainable-carbon-source-pha-production-v%C3%A9ronique-amstutz-manfred-zinn>. Acesso 22 set 2025.

ANBUKARASU, P.; SAUVAGEAU, D.; ELIAS, A. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 17884, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep17884>.

ANDRADE, L. A.; FABRICANTE, J. R.; OLIVEIRA, F. X. Invasão biológica por Prosopis juliflora (Sw.) DC.: impactos sobre a diversidade e a estrutura do componente arbustivo-arbóreo da caatinga no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta botânica brasílica**, v. 23, p. 935-943, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062009000400004>.

ARAMVASH, A.; MOAZZENI, Z. F.; GHOLAMI, B. N. Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from Cupriavidus necator. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 1, p. 20-28, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201700102>.

ARAMVASH, Asieh et al. Effective enhancement of hydroxyvalerate content of PHBV in Cupriavidus necator and its characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 87, p. 397-404, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.002>.

BABU, Subhash *Et al.* Exploring agricultural waste biomass for energy, food and feed production and pollution mitigation: A review. **Bioresource Technology**, v. 360, p. 127566, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127566>.

BANCAL, Victoria; RAY, Ramesh C. Overview of food loss and waste in fruits and vegetables: From issue to resources. In: **Fruits and vegetable wastes: Valorization to**

bioproducts and platform chemicals. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 3-29. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-981-16-9527-8_1>.

BANO, Sadia *Et al.* A mini-review on polyhydroxyalkanoates: Synthesis, extraction, characterization, and applications. **Process Biochemistry**, v. 146, p. 250-261, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.07.033>.

BERG, Vebjørn Et al. The role of data analytics in startup companies: Exploring challenges and barriers. In: **Conference on e-Business, e-Services and e-Society**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 205-216. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02131-3_19>.

BHATIA, Himani; GUPTA, P. K.; SONI, P. L. Structure of the oligosaccharides isolated from Prosopis juliflora (Sw.) DC. seed polysaccharide. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 438-443, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.039>.

BONG, Cassendra Phun Chien Et al. A review on the potential of polyhydroxyalkanoates production from oil-based substrates. **Journal of Environmental Management**, v. 298, p. 113461, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113461>.

CARVALHO, Ana Caroline Ferreira Et al. Valuing agro-industrial waste in the development of sustainable food packaging based on the system of a circular bioeconomy: A review. **Cleaner Waste Systems**, p. 100275, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clwas.2025.100275>.

CERDÁ-SUÁREZ, Luis Manuel Et al. Detecting circular economy strategies in the fourth sector: Overview of the Chilean construction sector as evidence of a sustainable business model. **Sustainability**, v. 15, n. 11, p. 8559, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/su15118559>.

CHOI, So Young *Et al.* Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. **Metabolic engineering**, v. 58, p. 47-81, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.05.009>.

CONNERS, Eric M.; BOSE, Arpita. State-of-the-art methods for quantifying microbial polyhydroxyalkanoates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 91, n. 9, p. e00274-25, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.00274-25>.

COSTA, Ana Et al. Bioplastics: innovation for green transition. **Polymers**, v. 15, n. 3, p. 517, 2023. DOI: < https://doi.org/10.3390/polym15030517>.

DE AZEREDO, Henriette Monteiro Cordeiro; FARIA, José de Assis Fonseca. Embalagens e suas interações com os alimentos. **Alimentos**, p. 223, 2012.

DE MELO, Débora JN; DA SILVA, Lucineide B.; SANTOS, Sharline FM. Biological Production and Structural Characterization of PHB from Commercial Sugarcane Molasses. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 33, n. 4, p. 2072-2090, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-025-03519-2>.

DUAN, Jian-Lu Et al. Single bubble probe atomic force microscope and impinging-jet technique unravel the interfacial interactions controlled by long chain fatty acid in

anaerobic digestion. **Water Research**, v. 231, p. 119657, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119657>.

ELSAMADONY, Mohamed Et al. Advances towards understanding long chain fatty acids-induced inhibition and overcoming strategies for efficient anaerobic digestion process. **Water Research**, v. 190, p. 116732, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116732>.

ETXABIDE, Alaitz et al. Polyhydroxybutyrate (PHB) produced from red grape pomace: Effect of purification processes on structural, thermal and antioxidant properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 217, p. 449-456, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.072>.

FAN, Shengxu Et al. Analysis of additive and epistatic quantitative trait loci underlying fatty acid concentrations in soybean seeds across multiple environments. **Euphytica**, v. 206, n. 3, p. 689-700, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1491-3>.

FIORESE, Mônica Lady Et al. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from Cupriavidus necator biomass by solvent extraction with 1, 2-propylene carbonate. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 6, p. 454-461, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.200900034>.

GARCIA, Michele Cristina Formolo Et al. Desenvolvimento de um processo de extração de poli (3-hidroxibutirato) produzido por Cupriavidus necator e seu efeito sobre as características do polímero. **FAO AGRIS - International System for Agricultural Science and Technology,** v. 1, p 94-96, 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/88691>. Acessado: 31/12/25.

GETACHEW, Anteneh; WOLDESENBET, Fantahun. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. **BMC research notes**, v. 9, n. 1, p. 509, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y>.

GETINO, Luis; MARTÍN, José Luis; CHAMIZO-AMPUDIA, Alejandro. A review of polyhydroxyalkanoates: characterization, production, and application from waste. **Microorganisms**, v. 12, n. 10, p. 2028, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102028>.

GIOSAFATTO, C. Valeria L. *Et al.* Microbial transglutaminase as a tool to improve the features of hydrocolloid-based bioplastics. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 10, p. 3656, 2020. DOI: < https://doi.org/10.3390/ijms21103656>.

GŁADYSZ, Magdalena Z. Et al. Melt electrowriting of polyhydroxyalkanoates for enzymatically degradable scaffolds. **Advanced healthcare materials**, v. 14, n. 6, p. 2401504, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.202401504>.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 206-211, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb03246.x>.

GONTARD, Nathalie *Et al.* A research challenge vision regarding management of agricultural waste in a circular bio-based economy. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 48, n. 6, p. 614-654, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1471957>.

GONZALEZ-MONTEMAYOR, Angela-Mariela *Et al.* Prosopis spp. functional activities and its applications in bakery products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 94, p. 12-19, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.023>.

GUILHERME, A. A. *Et al.* Quality evaluation of mesquite (Prosopis juliflora) pods and cashew (Anacardium occidentale) apple syrups. **Journal of Food Process Engineering**, v. 32, n. 4, p. 606-622, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00233.x>.

HANIK, Nils *Et al.* Influence of unusual co-substrates on the biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates produced in multistage chemostat. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, p. 301, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00301>.

HASSAN, Soulayma Et al. Isolation and Identification of Xylose-Utilising, Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacteria from Sugarcane Bagasse: First Report of PHA Production by Mycolicibacterium Smegmatis. **Journal of Polymers and the Environment**, p. 1-14, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-025-03600-w>.

HECTORS, Wim; DELMULLE, Tom; SOETAERT, Wim K. Metabolic Engineering Strategies for Enhanced Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production in Cupriavidus necator. **Polymers**, v. 17, n. 15, p. 2104, 2025. DOI: <https:// doi.org/10.3390/polym17152104>.

HOFFMANN, Nils; REHM, Bernd HA. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in Pseudomonas putida and Pseudomonas aeruginosa. **FEMS microbiology letters**, v. 237, n. 1, p. 1-7, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09671.x>.

HONG, K. *Et al.* A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 523-526, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530051427>.

ISHAK, Khairul Anwar *Et al.* Structure-property interpretation of biological polyhydroxyalkanoates with different monomeric composition: Dielectric spectroscopy investigation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 311-320, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.090>.

JENSEN L; Scalamandrè C. Impacto climático do sistema agroalimentar da UE. **Serviços de Pesquisa do Parlamento Europeu**. União Europeia. 2023. Disponível em: <https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/ATAG/2023/739327/EPRS_ATA(2023)739327_EN.pdf>. Acesso em: 23 set. 2025.

JIANG, Wei Et al. Enhanced volatile fatty acids production through anaerobic co-fermentation of dewatered sludge and food waste: Insights into performance, microbial dynamics and metabolic pathways. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, p. 119189, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.119189>

KALIA, Vipin Chandra *Et al.* Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 326, p. 124737, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124737>.

KHATAMI, Kasra; PEREZ-ZABALETA, Mariel; CETECIOGLU, Zeynep. Pure cultures for synthetic culture development: Next level municipal waste treatment for polyhydroxyalkanoates production. **Journal of Environmental management**, v. 305, p. 114337, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j. jenvman.2021.114337>.

KNORR, Dietrich; AUGUSTIN, Mary Ann. From food to gods to food to waste. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 64, n. 16, p. 5379-5397, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2153795>.

KOLLER, M. Chemical and biochemical engineering approaches in manufacturing polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters of tailored structure with focus on the diversity of building blocks. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 32, n. 4, p. 413-438, 2018. DOI: <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1385>.

KOLLER, Martin; MUKHERJEE, Anindya. A new wave of industrialization of PHA biopolyesters. **Bioengineering**, v. 9, n. 2, p. 74, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering9020074>.

KOLLER, Martin; SALERNO, Anna; BRAUNEGG, Gerhart. Polyhydroxyalkanoates: basics, production and applications of microbial biopolyesters. **Bio-Based Plastics: Materials and Applications**, p. 137-170, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118676646.ch7>.

KOURMENTZA, Constantina *Et al.* Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. **Bioengineering**, v. 4, n. 2, p. 55, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>.

LAW, John H.; SLEPECKY, Ralph A. Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. **Journal of bacteriology**, v. 82, n. 1, p. 33-36, 1961. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.82.1.33-36.1961>.

LEE, Jung-Kul *Et al.* Biomolecules from municipal and food industry wastes: an overview. **Bioresource technology**, v. 298, p. 122346, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122346>.

LI, Kun Et al. Performance assessment and metagenomic analysis of full-scale innovative two-stage anaerobic digestion biogas plant for food wastes treatment. **Journal of Cleaner Production**, v. 264, p. 121646, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121646>.

LI, Yangyang Et al. Effects of organic composition on the anaerobic biodegradability of food waste. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 836-845, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.028>.

LIU, Yu-Chen Et al. Psychrophilic and mesophilic anaerobic treatment of synthetic dairy wastewater with long chain fatty acids: Process performances and microbial community dynamics. **Bioresource technology**, v. 380, p. 129124, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129124>.

MACHADO, Miriam LC Et al. Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira. **Polímeros**, v. 20, p. 65-71, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-14282010005000011>.

MAI, Jingjing *Et al.* Synthesis and physical properties of polyhydroxyalkanoate (PHA)-based block copolymers: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 263, p. 130204, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130204>.

MEHRPOUYA, Mehrshad *Et al.* Additive manufacturing of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biopolymers: Materials, printing techniques, and applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 127, p. 112216, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112216>.

MENSAH, Derek Et al. Assessing non-hazardous solid waste business characteristics of Western Canadian provinces. **Ecological Informatics**, v. 75, p. 102030, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2023.102030>.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60147a030?casa_token=ZAWyfLxMQ6kAAAAA:S13yaLgJK9go_LakZxA64sZRUx5z4_dG0AcIWVE4X_Qr_pcYYCrbirkUGIimf10pFl9jMBUCmVf5h4p>. Acesso em 14 fev. 2025.

MISROL, Mohd Arif Et al. Process Optimization and Circular Economy: Bridging the Sustainable Connection Through Industrial Symbiosis. In: **A Sustainable Green Future: Perspectives on Energy, Economy, Industry, Cities and Environment**. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 23-52. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-24942-6_2>.

MIU, Dana-Maria; EREMIA, Mihaela Carmen; MOSCOVICI, Misu. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) as biomaterials in tissue engineering: production, isolation, characterization. **Materials**, v. 15, n. 4, p. 1410, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma15041410>.

MORAWETZ, Herbert. Berzelius coins a name. In: **Polymers: the origins and growth of a science**. Nova Iorque: Dover Publications, 2002. p. 3-6. ISBN: 0-486-49513-2.

MORLINO, Maria Silvia *Et al.* Cupriavidus necator as a platform for polyhydroxyalkanoate production: an overview of strains, metabolism, and modeling approaches. **Biotechnology Advances**, v. 69, p. 108264, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108264>.

MOZUMDER, Md Salatul Islam *Et al.* Poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) production from CO2: Model development and process optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 98, p. 107-116, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.031>.

MUKHEEM, Abdul Et al. Fabrication of biopolymer polyhydroxyalkanoate/chitosan and 2D molybdenum disulfide–doped scaffolds for antibacterial and biomedical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 7, p. 3121-3131, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10416-2>.

MUKHERJEE, Anindya; KOLLER, Martin. Microbial polyHydroxyAlkanoate (PHA) biopolymers—Intrinsically natural. **Bioengineering**, v. 10, n. 7, p. 855, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering10070855>.

MUNEER, Faizan *Et al.* Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs): efficient replacement of synthetic polymers. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 9, p. 2301-2323, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01772-1>.

NATARELLI, Caio Vinicius Lima Et al. Introdução aos Materiais Poliméricos. In: **Nanotecnologia aplicada a polímeros**, p. 49-90, 2023. DOI: 10.5151/9786555502527-02

NYGAARD, Daiana; YASHCHUK, Oxana; HERMIDA, Élida B. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from residual glycerol by wild type Cupriavidus necator. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, n. 5, p. 1489-1496, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01979-4>.

OBRUČA, Stanislav *Et al.* Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. **Biotechnology Advances**, v. 58, p. 107906, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107906>.

OLIVEIRA, Fabiane C. *Et al.* Characterization of poly (3-hydroxybutyrate) produced by Cupriavidus necator in solid-state fermentation. **Bioresource technology**, v. 98, n. 3, p. 633-638, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.022>.

OSTLE, Anthony G.; HOLT, J. G. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. **Applied and environmental microbiology**, v. 44, n. 1, p. 238-241, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.44.1.238-241.1982>.

PANUSCHKA, Sophie *Et al.* Photoautotrophic production of poly-hydroxybutyrate–First detailed cost estimations. **Algal Research**, v. 41, p. 101558, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101558>.

PÉREZ, María Jorgelina *Et al.* Polyphenolic compounds and anthocyanin content of Prosopis nigra and Prosopis alba pods flour and their antioxidant and anti-inflammatory capacities. **Food Research International**, v. 64, p. 762-771, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.013>.

PÉREZ-ARAUZ, A. O. Et al. Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 20, p. 100297, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.01.001>.

PÉREZ-CAMACHO, Irazú *Et al.* Microrespirometric Validation of a Two-stage Process for Polyhydroxyalkanoates Production from Peanut Oil and Propionate with Cupriavidus necator. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 18, n. 1, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/0118741231301420240306092952>.

PIERONI, Marina PP; MCALOONE, Tim C.; PIGOSSO, Daniela CA. Business model innovation for circular economy and sustainability: A review of approaches. **Journal of cleaner production**, v. 215, p. 198-216, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.036>.

PRADHAN, Sushobhan; KHAN, Mohd Tauhid; MOHOLKAR, Vijayanand S. Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Mechanistic Insights and Contributions to Sustainable Practices. **Encyclopedia**, v. 5, n. 4, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/encyclopedia4040126>.

PRIYA, A. K. *Et al.* Bio-based agricultural products: a sustainable alternative to agrochemicals for promoting a circular economy. **RSC Sustainability**, v. 1, n. 4, p. 746-762, 2023. DOI: <2.https://doi.org/10.1039/D3SU00075C>.

REDDY, V. Uttej Nandan *Et al.* Review of the developments of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs). **Bioengineering**, v. 9, n. 5, p. 225, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering9050225>.

RIDELLA, Florencia Et al. Polyhydroxyalkanoates production from cocoa bean shell fat: Bioprocess optimization and polymer characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 148407, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.148407>.

RODRÍGUEZ, Yadira *Et al.* Coupling biogas with PHA biosynthesis. **The Handbook of Polyhydroxyalkanoates**, v. 1, n. 1, p. 357-376, 2020.

RODRIGUEZ-CONTRERAS, Alejandra. Recent advances in the use of polyhydroyalkanoates in biomedicine. **Bioengineering**, v. 6, n. 3, p. 82, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering6030082>.

RODRIGUES, Plínio Ribeiro; SILVÉRIO, Tatiane Aparecida Barroso; DRUZIAN, Janice Izabel. Microbial synthesis and characterization of biodegradable polyester copolymers from Burkholderia cepacia and Cupriavidus necator strains using crude glycerol as substrate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19170498, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019170498>.

RONĎOŠOVÁ, Soňa *Et al.* Optimization of growth conditions to enhance PHA production by Cupriavidus necator. **Fermentation**, v. 8, n. 9, p. 451, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation8090451>.

ROSENBOOM, Jan-Georg; LANGER, Robert; TRAVERSO, Giovanni. Bioplastics for a circular economy. **Nature Reviews Materials**, v. 7, n. 2, p. 117-137, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00407-8>.

RUGGERIO, Carlos Alberto. Sustainability and sustainable development: A review of principles and definitions. **Science of the total environment**, v. 786, p. 147481, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147481>.

SACHAN, Rohan Samir Kumar Et al. Screening and characterization of PHA producing bacteria from sewage water identifying Bacillus paranthracis RSKS-3 for bioplastic production. **BMC microbiology**, v. 25, n. 1, p. 136, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-025-03841-8>.

SAMORÌ, Chiara Et al. Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass. **Green chemistry**, v. 17, n. 2, p. 1047-1056, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4GC01821D>.

SANDOVAL TORRES, Sadoth *Et al.* Drying technology of mesquite pods (Prosopis laevigata) and microstructural insights. **British Food Journal**, v. 122, n. 9, p. 2953-2963, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1108/BFJ-07-2019-0487>.

SATHYA, A. B. *Et al.* Production of polyhydroxyalkanoates from renewable sources using bacteria. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 9, p. 3995-4012, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1259-7>.

SCHUBERT, Peter; STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, HANS G. Cloning of the Alcaligenes eutrophus genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in Escherichia coli. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 12, p. 5837-5847, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.170.12.5837-5847.1988>.

SCIAMMARO, Leonardo Pablo; RIBOTTA, Daniel Pablo; PUPPO, Maria Cecilia. Traditional Food Product s from Prosopis sp. Flour. In: **Traditional foods: General and consumer aspects**. Boston, MA: Springer US, 2016. p. 209-216. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7648-2_14>.

SHACKLETON, Ross T. *Et al.* Prosopis: a global assessment of the biogeography, benefits, impacts and management of one of the world's worst woody invasive plant taxa. **AoB plants**, v. 6, p. plu027, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu027>.

SHAHID, Salma Et al. Polyhydroxyalkanoates: Next generation natural biomolecules and a solution for the world's future economy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 297-321, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.187>.

SHAMALA, T. R. *Et al.* Production and characterization of bacterial polyhydroxyalkanoate copolymers and evaluation of their blends by fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. **Indian journal of microbiology**, v. 49, n. 3, p. 251-258, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0031-z>.

SILVA, Celiane Gomes Maia da *Et al.* Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (Prosopis juliflora (Sw.) DC). **Food Science and Technology**, v. 27, p. 733-736, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400010>.

SILVA, Clóvis Gouveia *Et al.* Extração e fermentação do caldo de algaroba (Prosopis juliflora (Sw.) DC) para obtenção de aguardente. **Revista brasileira de produtos agroindustriais**, v. 5, n. 1, p. 51-56, 2003.
Disponível em: <http://plone.ufpb.br/lba/contents/arquivos/artigos/extrafercalalgaroba.pdf>. Acesso em: 14 jul 2025.

SILVA, José Barros da; BORA, Pushkar Singh; NETO, Vicente Queiroga. Caracterização de propriedades funcionais do isolado protéico de sementes de algaroba (Prosopis juliflora (SW) DC). modificado por acetilação. **Food Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 263-269, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20611997000300014>.

SILVERSTEIN, Robert M.; BASSLER, G. Clayton. Spectrometric identification of organic compounds. **Journal of Chemical Education**, v. 39, n. 11, p. 546, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1021/ed039p546>.

SINGH, Akhilesh Kumar *Et al.* Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: An insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 5, p. 2007-2032, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09604-y>.

SNOCH, Wojciech *Et al.* In Search of effective anticancer agents—novel sugar esters based on polyhydroxyalkanoate monomers. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 13, p. 7238, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22137238>.

SONG, Yu-Ting *Et al.* Optimization of polyhydroxyalkanoate (PHA) production from biohythane pilot plant effluent by Cupriavidus necator TISTR 1335. **Biodegradation**, v. 36, n. 1, p. 14, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10532-025-10110-y>.

SPAGNOL, Cristiane et al. Mechanically improved polyvinyl alcohol-composite films using modified cellulose nanowhiskers as nano-reinforcement. **Carbohydrate polymers**, v. 191, p. 25-34, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.001>.

SPIEKERMANN, P.; REHM, B.; KALSCHEUER, R.; BAUMEISTER, D. & STEINBUCHEL A. (1999). "A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds". Arch Microbiol. 171 (2): 73–80. doi:10.1007/s002030050681

TAO, Guan-Bao; TAN, Bi-Wei; LI, Zheng-Jun. Production of polyhydroxyalkanoates by a moderately halophilic bacterium of *Salinivibrio sp*. TGB10. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 186, p. 574-579, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.038>.

TAPANINAHO, Riikka; HEIKKINEN, Anna. Value creation in circular economy business for sustainability: A stakeholder relationship perspective. **Business Strategy and the Environment**, v. 31, n. 6, p. 2728-2740, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/bse.3002>.

TERADA, Mikio; MARCHESSAULT, R. H. Determination of solubility parameters for poly (3-hydroxyalkanoates). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 1-3, p. 207-215, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00036-7>.

TIDÅKER, Pernilla *Et al.* Towards sustainable consumption of legumes: How origin, processing and transport affect the environmental impact of pulses. **Sustainable production and consumption**, v. 27, p. 496-508, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.spc.2021.01.017>.

VANDAMME, Peter; COENYE, Tom. Taxonomy of the genus Cupriavidus: a tale of lost and found. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2285-2289, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63247-0>.

VASILE, Franco Emanuel *Et al.* Physicochemical, interfacial and emulsifying properties of a non-conventional exudate gum (Prosopis alba) in comparison with gum arabic. **Food**

hydrocolloids, v. 56, p. 245-253, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.12.016>.

VICENTE, Diogo; PROENÇA, Diogo Neves; MORAIS, Paula V. The role of bacterial polyhydroalkanoate (PHA) in a sustainable future: a review on the biological diversity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 4, p. 2959, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph20042959>.

VIGNESWARI, Sevakumaran *Et al.* Turning agricultural waste streams into biodegradable plastic: A step forward into adopting sustainable carbon neutrality. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 12, n. 2, p. 112135, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.112135>.

WANG, Chi; HSU, Chia-Hung; HWANG, I.-Hwe. Scaling laws and internal structure for characterizing electrospun poly [(R)-3-hydroxybutyrate] fibers. **Polymer**, v. 49, n. 19, p. 4188-4195, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.07.033>.

WANG, Jianfei *Et al.* A review on polyhydroxyalkanoate production from agricultural waste Biomass: Development, Advances, circular Approach, and challenges. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 126008, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126008>.

WENG, Yun-Xuan; WANG, Xiu-Li; WANG, Yu-Zhong. Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. **Polymer Testing**, v. 30, n. 4, p. 372-380, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2011.02.001>.

YONG, Ting Kang *Et al.* Synthesis and characterization of bioplastics, polyhydroxyalkanoates produced from sugarcane bagasse by using Bacillus cereus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 58, p. 103181, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103181>.

YU, Lin-Ping; WU, Fu-Qing; CHEN, Guo-Qiang. Next-generation industrial biotechnology-transforming the current industrial biotechnology into competitive processes. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 9, p. 1800437, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.201800437>.

ZHANG, Le *Et al.* A review on enhancing Cupriavidus necator fermentation for poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) production from low-cost carbon sources. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 10, p. 946085, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.946085>.

ZHENG, Yi Et al. Long-chain fatty acids facilitate acidogenic fermentation of food waste: Attention to the microbial response and the change of core metabolic pathway under saturated and unsaturated fatty acids loading. **Science of The Total Environment**, v. 951, p. 175565, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175565>.

ZHUIKOV, Vsevolod; ZHUIKOVA, Yulia. The Effect of Acetic Acid as a Solvent on the Structure and Properties of Poly (3-hydroxybutyrate)—Based Dried Gels. **Gels**, v. 10, n. 10, p. 664, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/gels10100664>.