

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO MULTIDISCIPLINAR DE ANGICOS
CURSO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (2025.2)

ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA DA ADIÇÃO DE GLICEROL AO MEIO DE CULTURA DE *Cupriavidus necator* SOBRE A PRODUÇÃO DE POLI (3-HIDROXIBUTIRATO)

Robeyza Luana Gabriel de Andrade
Stefeson Bezerra Melo

RESUMO

Este trabalho analisou a influência de variáveis de cultivo na produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] que é reconhecido por sua biodegradabilidade, através da bactéria *Cupriavidus necator*, com adição de glicerol, um subproduto abundante e de baixo custo da indústria do biodiesel, utilizando regressão linear múltipla a partir de dados experimentais obtidos da literatura. Foram consideradas como variáveis independentes as concentrações de glicerol, açúcar invertido, (X_t) e a temperatura de cultivo, tendo a concentração de P(3HB) como variável resposta. O modelo obtido apresentou forte correlação ($R = 0,896$) e bom ajuste ($R^2 = 0,803$), sendo estatisticamente significativo ao nível de 5% ($F = 12,23$; $p < 0,001$). Contudo, apenas a concentração de (X_t) mostrou efeito significativo sobre a produção de P(3HB), enquanto glicerol, açúcar invertido e temperatura não apresentaram influência estatisticamente relevante nas condições avaliadas. Esses resultados indicam que a maximização da produção de P(3HB) está diretamente associada ao aumento da densidade celular, reforçando a importância de estratégias de cultivo que favoreçam o crescimento microbiano para viabilizar o uso desse biopolímero como alternativa sustentável aos plásticos de origem fóssil.

Palavras-chave: *Cupriavidus necator*; poli(3-hidroxibutirato); glicerol; regressão linear múltipla; biopolímeros biodegradáveis.

ABSTRACT

This study evaluated the influence of cultivation variables on the production of the biopolymer poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Cupriavidus necator*, using multiple linear regression based on experimental data obtained from the literature. The independent variables considered were the concentrations of glycerol, invert sugar, biomass (X_t), and cultivation temperature, with P(3HB) concentration as the response variable. The fitted model showed a strong correlation ($R = 0.896$) and good adjustment ($R^2 = 0.803$), being statistically significant at the 5% level ($F = 12.23$; $p < 0.001$). However, only biomass concentration (X_t) exhibited a significant effect on P(3HB) production, whereas glycerol, invert sugar, and temperature showed no statistically relevant influence under the evaluated conditions. These results indicate that maximizing P(3HB) production is directly associated with increasing cell density, highlighting the importance of cultivation strategies that promote microbial growth in order to make the use of this biopolymer as a sustainable alternative to fossil-based plastics technically and economically feasible.

Keywords: *Cupriavidus necator*; poly(3-hydroxybutyrate); glycerol; multiple linear regression; biodegradable biopolymers.

1. INTRODUÇÃO

Os biopolímeros produzidos por microrganismos emergem como alternativas promissoras, devido às crises ambientais associadas ao acúmulo de resíduos plásticos de origem fóssil (Franchetti; Marconato, 2006). Destaque especial é dado ao poli(3-hidroxibutirato), brevemente conhecido como P(3HB), que se trata de um poliéster com diversas aplicações e de grande interesse científico e industrial por ser biodegradável (Silva et al., 2007). É bastante conhecido pelo seu potencial nas indústrias médicas, ambientais e de embalagens, como também por possuir propriedades físicas parecidas com plásticos convencionais derivados de petróleo (Chandra; Rustgi, 1998).

Um estudo de revisão publicado em 2025 no periódico *Green Chemistry* destaca que as pesquisas envolvendo misturas de polímeros biodegradáveis e seus biocompósitos têm avançado rapidamente, especialmente no aprimoramento de propriedades mecânicas e na expansão de aplicações em áreas como embalagens, agricultura e biomedicina. Esse trabalho reforça a tendência de crescimento significativo nas investigações sobre materiais poliméricos sustentáveis.

Esse interesse renovado é uma resposta direta à crescente pressão das questões ambientais, que impulsiona a busca por alternativas para substituir os polímeros sintéticos tradicionais. Paralelamente a essa tendência, observa-se também um maior emprego de fibras naturais para atuar como material de reforço nesses biopolímeros (Machado et al., 2010).

A bactéria *Cupriavidus necator* é um dos microrganismos mais estudados e eficientes para a produção de P(3HB) em escala laboratorial e industrial (Obruca et al., 2014). No entanto, um dos principais obstáculos para a sua viabilização econômica é o alto custo do meio de cultura, que impacta diretamente o preço final do biopolímero, assim, estratégias para a redução de custos são essenciais.

Uma abordagem vantajosa é a utilização de subprodutos industriais de baixo custo como fontes de carbono ou outros nutrientes. Entre essas alternativas o glicerol, um coproduto abundante e de baixo valor de mercado proveniente da indústria de biodiesel, surge como uma fonte de carbono atrativa e economicamente viável para processos fermentativos (Kerr et al., 2007).

Nesse contexto, a análise de regressão múltipla é uma estratégia de estudo estatística responsável por relacionar uma variável dependente e duas ou mais variáveis independentes, sendo amplamente utilizada em pesquisas nas áreas de engenharia e biotecnologia (Kutner et al., 2004; Charnet et al., 2008). Nesta abordagem, a variável independente se caracteriza como um

fator de explicação, e a dependente como uma resposta, cuja finalidade é compreender como os múltiplos fatores preditivos influenciam juntos para impactar o resultado final (variável resposta) (Montgomery et al., 2012).

Especificamente na produção de biopolímeros, diversos estudos têm utilizado planejamento experimental fatorial e análise de regressão múltipla para aperfeiçoar parâmetros de cultivo (Campos et al., 2018; Boeira, 2018). Com isso, a finalidade deste trabalho é investigar a relação entre a produção de poli (3-hidroxibutirato) e quatro variáveis independentes: glicerol, açúcar invertido, temperatura e a concentração de biomassa (X_t) no meio de cultura, por meio da análise de regressão múltipla, buscando identificar quais fatores exercem maior influência sobre a síntese do biopolímero.

2. METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho foram coletados dados quantitativos do estudo realizado por Apati et al., 2017, a fim de alcançar uma análise de regressão múltipla e para modelar a relação entre a produção de P(3HB) (variável dependente) e quatro variáveis independentes (glicerol, temperatura, açúcar invertido e a concentração de biomassa X_t). Assim, avaliou-se também, a significância estatística do modelo e cada variável individualmente para identificar quais fatores tinham influência significativa na produção.

Segundo (Apati et al., 2017) as células de *Cupriavidus necator* foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 1.000 mL contendo 300 mL de Meio Mineral (MM). As concentrações das fontes de carbono, açúcares redutores (glicose e frutose) e/ou glicerol, variaram de 0 a 30 g·L⁻¹, assim como a temperatura de cultivo (28 a 38 °C), seguindo um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três pontos centrais. As culturas foram mantidas sob agitação de 150 rpm por 24 horas.

Ainda conforme o estudo, os autores realizaram ensaios de validação do DCCR em triplicata. O crescimento celular foi determinado por massa seca, e o consumo dos subprodutos foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A produção de P(3HB) foi determinada por metanólise seguida de análise por cromatografia gasosa (Braunegg et al., 1978; Brandl et al., 1995). Diante disso, avaliou-se a influência das condições de cultivo sobre a produção de P(3HB), onde foi aplicada uma análise de regressão linear múltipla. Nessa abordagem, a produção de P(3HB) foi definida como variável dependente, por representar a resposta biotecnológica de interesse. As variáveis experimentais: glicerol, temperatura, açúcar invertido e concentração de (X_t), nas quais foram consideradas variáveis independentes (PAVAN, 2019).

O modelo estatístico geral utilizado pode ser descrito pela equação:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \varepsilon$$

em que:

- Y Representa a produção de P(3HB);
- X_1, X_2, X_3 e X_4 correspondem, respectivamente, às concentrações de glicerol, temperatura, açúcar invertido e biomassa (X_t);
- β_0 é o Intercepto;
- $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ e β_4 são os coeficientes associados a cada variável independente;
- ε é o termo de erro aleatório.

Os dados experimentais foram inseridos no software estatístico apropriado, onde foram verificadas as suposições do modelo (normalidade dos resíduos, homoscedasticidade e ausência de multicolinearidade). Em seguida, estimou-se os coeficientes do modelo e realizou-se a análise de significância para determinar quais variáveis apresentaram efeito estatisticamente relevante na produção de P(3HB). A qualidade do ajuste foi avaliada por meio dos coeficientes de determinação (R^2 e R^2 ajustado) e dos testes de significância global do modelo (LUVIZETTO, et al. 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados revelaram uma forte correlação significativa ($R=0,896$) entre a variável dependente e as independentes. As variáveis independentes analisadas explicaram 80,3% da variabilidade na produção de P(3HB), conforme indicado pelo coeficiente de determinação ($R^2=0,803$). Condizente a tabela 1, o modelo foi estatisticamente significativo ($F=12,23$) com um nível de significância de 95% ($p<0,00034$), indicando que o modelo de regressão captou adequadamente a relação entre as variáveis.

Tabela 1 – Análise da variância para a variável P(3HB) (g L^{-1}) para 5 variáveis independentes

Análise da variância: P(3HB) (g L^{-1})					
Efeito	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadra do médio	F	p-valor

Regressão	37,12	4	9,28	12,23	0,000340
Resíduo	9,10	12	0,76		
Total:	46,22				

Uma análise dos coeficientes mais aprofundada demonstrou que apenas a concentração de (Xt) no meio de cultura teve um efeito significativo na produção de P(3HB), com um valor de p inferior a 0,05. Enquanto as outras variáveis do modelo, glicerol, açúcar invertido e temperatura não foram significativas, como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2 – Estimativas dos parâmetros do modelo estatístico para produção de P(3HB) (L-1)
 Resumo da regressão para a variável: P(3HB) (g L⁻¹)

Parâmetros	L -1)			
	B	Desvio padrão	t(12)	p-valor
Intercepto	-7,185	2,786	-2,579	0,0241
glicerol	0,003	0,027	0,126	0,9021
açúcar invertido (L -1)	0,023	0,049	0,476	0,6424
temperatura (°C)	0,174	0,091	1,910	0,0804
Xt (g L -1)	0,515	0,186	2,764	0,0171

A ausência de significância estatística das variáveis glicerol, açúcar invertido e temperatura sugere que, nas condições experimentais testadas, essas variáveis não exerceram influência direta sobre a produção de P(3HB), embora estudos anteriores tenham demonstrado que a temperatura e a concentração de açúcar invertido podem ser significativas em diferentes faixas de cultivo.

A predominância da concentração de (Xt) como única variável significativa (p=0,017146) corrobora observações na literatura de que a produção de biopolímeros está intrinsecamente relacionada à densidade celular alcançada durante o cultivo.

Este resultado é consistente com o fato de que a síntese de P(3HB) ocorre principalmente durante a fase de acúmulo, quando há limitação de nutrientes essenciais e elevada concentração

celular, permitindo que as células direcionem o excesso de fonte de carbono para a produção do polímero como reserva de energia.

A ausência de multicolinearidade entre as variáveis independentes é necessário para a validade do modelo, uma vez que correlações elevadas entre preditores podem inflar os erros-padrão dos coeficientes e comprometer a interpretação dos resultados. A verificação das suposições do modelo (normalidade dos resíduos, homoscedasticidade e ausência de multicolinearidade) confirma a robustez da análise estatística realizada.

Quanto à não significância do glicerol, contrasta parcialmente com estudos que reportam que a adição de glicerol pode aumentar o percentual de acúmulo de P(3HB), embora não necessariamente a produtividade volumétrica ou o fator de conversão de substrato em produto. Sombrio et al. (2017) observaram que a adição de glicerol no início do cultivo resultou em maiores percentuais de acúmulo de P(3HB) (64,12%), porém com menor fator de conversão de substrato em biomassa residual quando comparado a cultivos sem glicerol. Isso sugere que o efeito do glicerol pode ser dependente da estratégia de alimentação e do momento de sua adição ao meio de cultura.

Os parâmetros cinéticos complementares, como produtividade volumétrica (P_g P(3HB)) e fator de conversão de substrato em produto (YP(3HB)/S), são métricas essenciais para avaliar a viabilidade econômica do processo de produção de P(3HB). Embora esses parâmetros não tenham sido diretamente apresentados no modelo de regressão, sua determinação permitiria uma análise mais completa da eficiência do bioprocessos e forneceria subsídios para otimizações futuras (Silva et al., 2007).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de variáveis de cultivo — glicerol, açúcar invertido, temperatura e concentração de (X_t) — sobre a produção de poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] por *Cupriavidus necator*, utilizando análise de regressão linear múltipla baseada em dados experimentais da literatura. A construção e validação do modelo estatístico evidenciaram um ajuste robusto, com coeficientes de correlação e determinação elevados ($R = 0,896$; $R^2 = 0,803$), além de significância global do modelo ao nível de 5%. Esses indicadores demonstram que a regressão foi capaz de explicar de maneira consistente a relação entre as variáveis analisadas e a resposta biotecnológica estudada.

Entre os fatores investigados, apenas a concentração de (X_t) apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a produção de P(3HB). Esse resultado reforça observações amplamente discutidas na literatura e destaca o papel central da densidade celular no acúmulo

intracelular do biopolímero, especialmente em condições de limitação nutricional. Assim, a biomassa se confirma como um dos principais direcionadores da síntese de P(3HB), sendo uma variável essencial no planejamento e otimização de processos fermentativos.

Por outro lado, glicerol, açúcar invertido e temperatura não apresentaram influência significativa dentro das condições estudadas. Essa ausência de significância não invalida o potencial desses parâmetros em outros delineamentos experimentais; pelo contrário, sugere que o impacto dessas variáveis pode depender de faixas de operação, estratégias de alimentação ou condições específicas de cultivo. Portanto, estudos futuros podem aprofundar a investigação desses fatores, explorando abordagens como fermentação alimentada, uso de glicerol bruto, diferentes temperaturas ou combinações não avaliadas no presente modelo.

Os resultados obtidos contribuem para o avanço de pesquisas voltadas à produção sustentável de biopolímeros, evidenciando que otimizações centradas no aumento da biomassa microbiana podem ser mais eficazes do que a alteração isolada de outros componentes do meio de cultura. Além disso, demonstram a aplicabilidade da regressão múltipla como ferramenta estratégica na biotecnologia, permitindo compreender a interação entre variáveis, reduzir custos experimentais e direcionar esforços de otimização.

Assim, este estudo reafirma o potencial do P(3HB) como alternativa promissora aos polímeros derivados do petróleo e destaca que a implementação de estratégias de cultivo adequadas é determinante para ampliar sua viabilidade técnica e econômica. A partir dessas evidências, recomenda-se a continuidade de pesquisas que integrem modelagem estatística, novas fontes de carbono de baixo custo e abordagens de engenharia de bioprocessos para consolidar o uso industrial desse biopolímero.

REFERÊNCIAS

- APATI, Giannini Paszinick; KELBERT, Maikon; SOMBRIO, Bruna Regina; SCHNEIDER, Andréa Lima dos Santos; GARCIA, Michele Cristina Formolo; FURIGO Jr., Agenor; PEZZIN, Ana Paula Testa. Evaluation of the addition of glycerol to *Cupriavidus necator* culture medium over poly(3-hydroxybutyrate) production. *Matéria* (Rio de Janeiro. Online), v. 22, 2017. DOI: 10.1590/S1517-707620170005.0243.
- AVILA NETO, P. M. Prospecção de bioprodutos de interesse industrial a partir da fermentação do glicerol por leveduras. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.
- BOEIRA, C. Z. Produção de PHB por *Cupriavidus necator* recombinante em glicerina e vinhaça. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- BRAUNNEG, G., SONNLEITNER, B., LAFFERTY, R.M., “A rapid gas chromatographic

method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass”, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 6, n. 1, pp. 29-37, Mar. 1978.

CAMPOS, M. I.; SILVA, D. D.; SANTOS, R. S.; OLIVEIRA, L. M. Otimização da produção de polihidroxialcanoatos pela fermentação de glicerina bruta residual. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 93, n. 4, p. 1096-1106, 2018.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, v. 23, n. 7, p. 1273-1335, 1998.

CHARNET, R.; FREIRE, C. A. L.; CHARNET, E. M. R.; BONVINO, H. *Análise de modelos de regressão linear com aplicações*. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2008.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis: uma solução parcial para a indústria plástica. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

KUTNER, M. H.; NACHTSHEIM, C. J.; NETER, J.; LI, W. *Applied linear statistical models*. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2004.

LUVIZETTO, D. J. et al. Modelagem fenomenológica para a simulação da produção do biopolímero P(3HB). In: SEMINÁRIO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA, OKTOBER FÓRUM, 2005, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: PPGEQ/UFRGS, 2005.

MACHADO, M. L. C.; PEREIRA, N. C.; MIRANDA, L. F.; TERENCE, M. C.; PRADELLA, J. G. C. Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 20, nº 1, p. 65-71, 2010. DOI: 10.1590/S0104-14282010005000011

MONTGOMERY, D. C.; PECK, E. A.; VINING, G. G. *Introduction to linear regression analysis*. 5. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2012.

PAVAN, F. A. Produção de polihidroxibutirato por *Cupriavidus necator* glpFK a partir de glicerol: desenvolvimento experimental e modelagem matemática. 2019. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

SILVA, A. N. et al. Planejamento experimental para otimização da produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator* utilizando diferentes substratos. *Engenharia Agrícola*, v. 38, n. 5, p. 672-685, 2018.

SILVA, Luiziana Ferreira da; GOMEZ, José Gregório Cabrera; ROCHA, Rafael Costa Santos; TACIRO, Marilda Keico; PRADELLA, José Geraldo da Cruz. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000700040.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007.

SOMBRIIO, B. R.; SANTIAGO, A. L. C. D. M.; MACHADO, S. L. D. P.; RITTER, A. C. Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator*: influência de glicerol. *Polímeros*, v. 27, n. 1, p. 13-21, 2017.

SILVA, J.; MARTINS, R.; KUMAR, A. Recent advances in biodegradable polymer blends and their biocomposites. *Green Chemistry*, v. 27, n. 4, p. 1120–1145, 2025.