

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia

## **“Avaliação da produção de biopolímeros pelas cepas bacterianas DsA.N042 e DsA.N049 isoladas de *Diabrotica speciosa* usando subprodutos industriais”**

**Bárbara Evelin Denadae\***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientadores: Dr. Moacir Rossi Forim

Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Sousa

\*bolsista CNPq

**São Carlos - SP**

**2018**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bárbara Evelin Denadae, realizada em 26/10/2018:

---

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim  
UFSCar

---

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur  
UFSCar

---

Profa. Dra. Ariele Cristina Moreira  
UNESP

*“A gravidade explica os movimentos dos planetas, mas não pode explicar quem colocou os planetas em movimento. Deus governa todas as coisas e sabe tudo que é ou que pode ser feito.”*

*Isaac Newton*

## Agradecimentos

A Deus, primeiramente, pelo dom da vida, pelo amor incondicional e pela maravilhosa graça;

Aos meus pais, Marilaine e Edson, que me apoiaram em todos os momentos, aprenderam pacientemente os “termos técnicos” da química para discutirem e clarearem a minha mente, por terem sido meu refúgio em todas as dificuldades;

Ao Farid, pelo companheirismo e palavras de conforto, por ter estado comigo na alegria e na tristeza;

Ao professor Moacir R. Forim pela orientação e ensinamentos, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa desde a iniciação científica e me concedido a oportunidade de continuar no grupo na pós-graduação e ao professor Clóvis W. O. de Souza, que também teve a disposição e empenho em me co-orientar;

Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais, por conseguirem me fazer rir nos momentos mais inusitados, pelas conversas de corredor e discussões pertinentes referentes ao trabalho, especialmente aos queridos Clara, João Gabriel, Luis, Luize e Marília, que sempre tinham a disponibilidade de “estender a mãozinha”;

À professora Dulce Helena por ter cedido espaço em seu laboratório para as análises de DNA e às alunas Ariele e Juliana que me acompanharam e compartilharam seu conhecimento no LBFE;

Ao Dr. Pierre Basmaji, por doar seu tempo e trabalho e pelas reflexões que fizemos sobre a vida;

Aos membros da banca de qualificação, professora Dulce Helena, professor Felipe Wouters e Bruno Perlatti, que contribuíram com seus apontamentos para as etapas seguintes do desenvolvimento da pesquisa;

À Universidade Federal de São Carlos, que foi minha casa nos últimos oito anos, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por fornecerem estrutura para que a pesquisa fosse desenvolvida;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos;

A todos os que de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal, emocional, intelectual, minha eterna gratidão!

## RESUMO

O crescente desenvolvimento mundial traz diversos benefícios aos seres humanos. Contudo, a grande produção de materiais manufaturados, como os plásticos, tem gerado um desequilíbrio ambiental, principalmente quando descartados de maneira inapropriada. Devido a essa preocupação ambiental, diversas pesquisas vêm sendo conduzidas buscando novos materiais que tenham as mesmas propriedades dos plásticos derivados de petróleo, porém, que sejam biodegradáveis. Os bioplásticos são uma alternativa de substituição desses produtos, principalmente por serem facilmente degradados. Os micro-organismos vêm sendo estudados como produtores dessas biomoléculas, uma vez que podem sintetizá-las naturalmente quando submetidos a condições específicas de cultivo. Outra vantagem na utilização de bactérias na produção biotecnológica de moléculas é a utilização de substratos alternativos, como os resíduos industriais. Assim, o presente estudo, teve como objetivos identificar duas cepas de bactérias provenientes do trato gastrintestinal de *Diabrotica speciosa* por metodologias de sequenciamento de rDNA 16S e perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa, bem como avaliar a sua viabilidade técnica e econômica na produção de biopolímeros por métodos validados de cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Não foi possível a identificação das cepas bacterianas à nível de espécie pelas metodologias utilizadas, o que reporta resultados ainda não descritos na literatura, porém os gêneros encontrados para as cepas em estudo foram *Aureimonas sp.* e *Delftia sp.* Os resultados para o perfil de ácidos graxos apresentaram uma maior variedade de moléculas para *Delftia sp.* (15 ácidos graxos) do que para *Aureimonas sp.* (10 ácidos graxos). Os micro-organismos se mostraram capazes de utilizar glicerol e soro de leite bovino como fontes de nutrientes para produção de biopolímeros (polihidroxialcanoatos) em diferentes concentrações. Para *Aureimonas sp.*, a concentração de glicerol que obteve o maior rendimento de recuperação de polímero foi a de 2,0% (v/v) e para o soro de leite, 10,0% (v/v). Já para *Delftia sp.*, 6,0% (v/v) de glicerol foi a melhor concentração avaliada e 5,0% de soro de leite obteve o maior rendimento dentre todos os tratamentos, com 38,7% de PHB/massa seca celular, comprovando a viabilidade na utilização desta cepa e substratos para a produção de biopolímeros.

## ABSTRACT

The global development has enabling the improvement of daily life to human. However, the large production of manufactured materials such as plastics, it has generating environmental unbalanced, especially when they are discarded in an inappropriate manner. Due to this environmental concern, several researches have been carried out looking for materials as same mechanical properties of petroleum-based plastics, however, plastic-environmental friendly. In this context, bioplastics are a good alternative to replacing the petroleum-based plastics since they can be obtained in production processes that are less aggressive to the environment, and easily degraded. Microorganisms such as bacteria are a important source of the bioplastics. They can synthesize them naturally when subjected to specific growth conditions. Another advantage to the use of bacteria in the biotechnological production of (bio) molecules is the use of alternative substrates such as industrial waste (subproducts). Thus, the present study aimed to identify two strains of bacteria from *Diabrotica speciosa*'s gut using 16S rDNA sequencing methodologies, and through fatty acid profiling by gas chromatography-mass spectrometry, as well as to assess their technical and economic viability in the production of biopolymers using industrial subproducts. It was not possible to identify the strains at species level, suggesting new species not described in the literature yet. However, the genera found for the strains in this study were identified as *Aureimonas* sp. and *Delftia* sp. The results for the fatty acid profiling showed a wider variety of molecules for *Delftia* sp. (15 different types) than to *Aureimonas* sp. (10 types of molecules), although both of they contained palmitic and stearic acid as major compounds. The investigated microorganisms were able of to use glycerol and whey as sources of nutrients to produce biopolymers (polyhydroxyalkanoates), in different concentrations. For *Aureimonas* sp., the concentration of glycerol and whey that presented the highest yield of biopolymer recovery were 2.0 and 10.0% (v/v), respectively. In its turn, the results for *Delftia* sp. indicated that 6.0 and 5.0% (v/v) of glycerol and whey, respectively, were the best concentrations evaluated to production of biopolymers in all treatments. The batch using whey at 5.0% (v/v) and the strain of *Delftia* sp., it produced 38.7% of PHB/cell dry weight, proving the feasibility of



the use of the subproducts such as whey to produce biopolymers, as well as the importance to look for microorganisms in new microbiomes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do homopolímero glicogênio, formado exclusivamente por monômeros de glicose, e da borracha sintética, copolímero composto por monômeros de butadieno e estireno .....	2
Figura 2 - Demanda de plásticos na Europa por segmentos e tipos de polímeros em 2016. ....	3
Figura 3 - Estrutura química dos polihidroxicanoatos: (a) poli(hidroxibutirato) - PHB, (b) poli(hidroxivalerato) – PHV e (c) poli(hidroxibutirato-co-valerato) – P(3HB-co-3HV) .....	7
Figura 4 - Micrografia eletrônica de transmissão mostrando os grânulos intracelulares de <i>Delftia tsuruhatensis</i> Bet002 crescida em ácido oleico .....	8
Figura 5 - Detalhes da estrutura dos grânulos de reserva de PHAs, mostrando o centro amorfo e hidrofóbico onde os biopolímeros são armazenados, as enzimas PHA sintase e depolimerase e proteínas e fosfolipídeos que compõe a membrana que envolve as moléculas acumuladas.....	9
Figura 6 - Representação da rota biossintética de produção de PHB em bactérias.....	10
Figura 7 - Representação das possíveis rotas biossintéticas para a produção de PHB e PHV. PhaA, PhaB e PhaC são as enzimas responsáveis pela biossíntese dos biopolímeros, específicas para cada substrato específicas para cada substrato (PhaA: condensação de precursores; PhaB: redutase específica; PhaC: PHA sintase) .....	11
Figura 8 - Ciclo de vida de <i>Diabrotica speciosa</i> .....	13
Figura 9 - Esquema geral das etapas realizadas na para identificação de microorganismos por sequenciamento .....	17
Figura 10 - Avaliação do potencial de produção de biopolímeros para microorganismos isolados do trato gastrointestinal de <i>D. speciosa</i> . A) Aspecto das colônias; B) Resultado da incidência de iluminação ultra-violeta nas cepas produtoras de PHA's crescidas em meio contendo vermelho do Nilo. ....	19
Figura 11 - Esquema da reação de metanólise em condições ácidas para PHB .....	29
Figura 12 - Gráfico de Crescimento bacteriano em caldo nutriente. A) DsA.N049; B) DsA.N042 .....	33

Figura 13 - Gel de agarose com o resultado da amplificação dos fragmentos de rDNA 16S da cepa A) DsA.N042; B) DsA.N049. (1) Padrão de tamanho de fragmentos (pb); (2) Produtos de PCR em quintuplicata; (C) Controle negativo .....	34
Figura 14 - Eletroferograma parcial correspondente ao sequenciamento da cepa DsA.042.....	35
Figura 15 - Eletroferograma parcial correspondente ao sequenciamento da cepa DsA.049.....	35
Figura 16 - Esquema geral de transmetilação de ácidos graxos em meio ácido e a transferência de um grupo metila oriundo do metanol (Adaptado de Brondz, 2002). .....	37
Figura 17 - Cromatograma total referente ao perfil de ácidos graxos encontrados para <i>Delftia sp.</i> A) Cromatograma de íons totais; B) Ampliação da região entre 3 e 14 min; C) Ampliação da região entre 14 e 28 min; D) Ampliação da região entre 28 e 42 min. Ácidos correspondentes aos picos: 1- ácido heptanoico; 2- ácido caprílico; 3- ácido pelargônico; 4- ácido láurico; 5- ácido azelaico; 6- ácido sebáico; 7- ácido mirístico; 8- ácido pentadecanoico; 9- ácido palmítico; 10- ácido margárico; 11- ácido linolelaídico; 12- ácido elaidico; 13- ácido oleico; 14- ácido esteárico; 15- ácido eicosanoico.....	40
Figura 18 - Cromatograma referente ao perfil de ácidos graxos encontrados para <i>Aureimonas sp.</i> A) Cromatograma de íons totais; B) Ampliação da região entre 3 e 18 min; C) Ampliação da região entre 18 e 30 min; D) Ampliação da região entre 30 e 42 min. Ácidos correspondentes aos picos: 1- ácido azelaico; 2- ácido sebáico; 3- ácido mirístico; 4- ácido palmítico; 5- ácido margárico; 6- ácido linoleico; 7- ácido elaidico; 8- ácido trans-vacênico; 9- ácido esteárico; 10- ácido oleico.....	42
Figura 19 - Etapas de obtenção de biopolímeros para <i>Aureimonas sp.</i> crescida em soro de leite. A) Erlenmeyers utilizados para o crescimento em batelada após o crescimento celular; B) células precipitadas após centrifugação; C) células liofilizadas (0,1%, 0,5%, 1,0% e 2,0%); D) tubos de ensaio contendo células e meio reacional após a derivatização. ....	43

- Figura 20 - Gráfico combinado de variação de rendimento de biopolímero (colunas) e massa seca celular (marcadores de dispersão) por concentração de glicerol (%) para *Aureimonas sp.* ..... 44
- Figura 21 - Variação de rendimento de massa celular seca (mg.mL<sup>-1</sup>) vs. concentração de nutrientes (%) (v/v) para a cepa *Delftia sp.* A) Glicerol; B) Soro de leite..... 47
- Figura 22 - Ampliação da região entre 3 e 5 min dos cromatogramas obtidos após análise de cromatografia gasosa dos monômeros presentes nos polímeros produzidos por *Aureimonas sp.* utilizando glicerol como fonte de carbono nas concentrações 0,1% (em azul), 0,5% (em roxo) e 1,0% (em verde) (v/v) destacando a produção de 3- hidroxibutirato de metila (tR= 3,78). As condições analíticas podem ser encontradas no item 3.4.2.2. .... 49
- Figura 23 - Ampliação da região entre 3 e 5 min do cromatograma obtido após análise de cromatografia gasosa dos monômeros presentes nos polímeros produzidos por *Delftia sp.* utilizando glicerol (6,0% v/v) como fonte de carbono, destacando a produção de 3-hidroxibutirato de metila (tR= 5,59). .... 49
- Figura 24 - Proposta de fragmentação e espectro de massas correspondente ao monômero de 3-hidroxibutirato de metila. (Adaptado de Perlatti, 2016) ..... 50
- Figura 25 - Cromatogramas obtidos após análise de cromatografia gasosa dos monômeros presentes nos polímeros produzidos por *Delftia sp.* utilizando soro de leite (1,0%, 5,0%, 20,0% e 40,0% (v/v)) como fonte de carbono. A) Cromatogramas completos, diferenciando a quantidade de nutrientes adicionada pela cor da linha do gráfico (1,0% - azul claro; 5,0% - azul escuro; 20,0% - verde; 40,0% - vermelho; controle – roxo). O padrão de heptadecano (tR= 12,94) é indicado pela seta, assim como a variedade de ácidos graxos encontrados na matriz. B) Ampliação da região entre 5 e 6,5 min dos cromatogramas, destacando a produção de 3-hidroxibutirato de metila (tR= 5,59). .... 51
- Figura 26 - Cromatograma referente à amostra controle, evidenciando a ausência de picos da matriz ausente do analito em 5,59 min e de padrão interno em 12,94 min..... 53
- Figura 27 - Cromatograma referente à amostra contendo o analito 3-hidroxibutirato de metila em 5,59 min e o padrão interno em 12,94 min. .... 53

Figura 28 - Comparação das curvas de calibração construídas utilizando solvente puro (clorofórmio) e matriz, relacionando a concentração de analito com a razão das áreas obtidas pela integração dos picos do analito e do padrão interno. ....	55
Figura 29 - Gráfico combinado de variação de rendimento de biopolímero (colunas) e concentração recuperada de biopolímero (marcadores de dispersão) por concentração de soro de leite (%) para <i>Delftia sp.</i> .....	60

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Exemplos de microrganismos isolados para a produção de biopolímeros e suas respectivas fontes de carbono utilizadas.....	5
Tabela 2 - Parâmetros utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) .	23
Tabela 3 - Soluções elaboradas para preparo de ésteres de ácidos graxos para análises de CG (MIDI, 2001).....	25
Tabela 4 - Perfil de ácidos graxos encontrados para <i>Delftia sp.</i> após análise por CG-EM/EM. ....	38
Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos encontrados para <i>Aureimonas sp.</i> após análise por CG-EM/EM.....	41
Tabela 6 - Valores quantitativos de produção de PHAs utilizando fontes de carbono alternativas por <i>Aureimonas sp.</i> e <i>Delftia sp.</i> ....	46
Tabela 7 - Concentração do padrão 3-hidroxi-butirato de metila, razão entre as áreas do analito e do padrão interno, coeficiente de variação (CV%) e exatidão (%) das curvas de calibração. A) Em clorofórmio; B) Na matriz. ....	56
Tabela 8 - Equação da reta encontrada para curvas de calibração construídas em solvente puro (clorofórmio) e matriz, razão entre os coeficientes angulares e lineares, porcentagem encontrada para o efeito negativo de matriz e coeficiente de correlação.....	57
Tabela 9 - A) limites de detecção e de quantificação encontrados para a curva na matriz; B) porcentagem de recuperação do analito em diferentes concentrações e coeficientes de variação (%) correspondentes.....	58
Tabela 10 - Dados de quantificação da produção de biopolímeros por <i>Delftia sp.</i> , demonstrando concentração de massa seca, concentrações encontradas a partir das áreas dos cromatogramas e substituindo os valores na equação da curva de calibração construída na matriz, o rendimento de biopolímero relacionado com a massa seca celular e o coeficiente de variação. ....	59

**LISTA DE ABREVIATURAS**

%EM – Porcentagem do Efeito de Matriz

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BLAST - Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico

CDW - Massa Seca Celular

dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfato

EM - Espectrometria de Massas

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

*m/z* - Razão massa/carga

NCBI - Centro Nacional de Informação Biotecnológica

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PF – *Primer Forward*

PHA – Polihidroxialcanoato

PHB – Polihidroxibutirato

PR – *Primer Reverse*

PTFE - Politetrafluoretileno

rDNA - DNA ribossomal

TIC - Cromatograma de Íons Totais

T<sub>R</sub> - Tempo de retenção

UFC – Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	Biopolímeros .....	3
1.2.	Polihidroxicanoatos.....	6
1.3	Produção de PHAs por bactérias .....	7
1.4	Biossíntese de polihidroxicanoatos.....	9
1.5	Fontes de carbono alternativas para produção de biopolímeros com destaque para glicerol e soro de leite.....	12
1.6	<i>Diabrotica speciosa</i> e o potencial biotecnológico de micro-organismos associados a insetos .....	13
1.7	Identificação de micro-organismos .....	16
1.8	Escolha dos micro-organismos .....	18
2.	OBJETIVO GERAL.....	20
2.1	Objetivos específicos.....	20
3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	21
3.2	Reativação dos micro-organismos e curvas de crescimento.....	21
3.2	Identificação das cepas .....	22
3.2.1	Análise genética .....	22
3.3.2	Análise do perfil de ácidos graxos.....	24
3.4	Cultivo das cepas selecionadas em fontes de carbono alternativas .....	25
3.4.1	Otimização da fonte de carbono.....	26
3.4.2	Avaliação da produção de PHA's .....	27
3.4.2.1	Análise do rendimento de produção polimérica por Cromatografia Gasosa .....	27
3.4.2.2	Análise dos polímeros por CG-EM/EM.....	28
3.4.2.3	Avaliação quantitativa e validação analítica .....	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32



4.1 Curva de crescimento microbiano .....	32
4.2 Identificação bacteriana.....	33
4.3 Análise do perfil de ácidos graxos .....	36
4.4 Análise da produção de polímeros .....	42
4.4.1 Produção de biopolímeros.....	42
4.5 Caracterização cromatográfica dos biopolímeros biossintetizados .....	48
4.6 Desenvolvimento do método quantitativo e sua validação analítica.....	51
4.6.1 Seletividade .....	52
4.6.2 Faixa linear de trabalho e avaliação do efeito de matriz.....	53
4.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação .....	57
4.6.4 Precisão e exatidão .....	58
4.7 Quantificação da produção de biopolímeros por <i>Delftia</i> sp. utilizando a curva de calibração .....	59
5. CONCLUSÃO.....	62
6. REFERÊNCIAS .....	63
7. ANEXOS .....	71
Anexo 1 - Sequências de nucleotídeos .....	71
Anexo 2 - Espectros da identificação de ácidos graxos .....	73
Anexo 3: Análise estatística da porcentagem de biopolímeros recuperada ..	82
Anexo 4: Tabela ANOVA.....	84

# 1. INTRODUÇÃO

Os polímeros estão presentes na vida dos seres humanos por todos os lados, desde o momento do seu nascimento. As moléculas biológicas essenciais para o nosso desenvolvimento são polímeros: proteínas (ligações de unidades de aminoácidos), polissacarídeos (ligações de unidades de carboidratos) e ácidos nucleicos (ligações de unidades de nucleotídeos). A palavra “polímero” tem origem grega - “*polymeros*” - cujo prefixo *poly* – muitos - e o sufixo *meros* – partes – trazem o significado de que vários componentes são necessários para a existência de um todo. Estas “partes” são unidades químicas repetitivas conhecidas como monômeros (Vert et al, 2012).

Os monômeros são unidos pelo processo de polimerização para a formação de macromoléculas, os polímeros. Essa reação é muito comum na natureza, principalmente a polimerização por condensação, que acontece, por exemplo, na combinação de monossacarídeos para gerar polissacarídeos, onde uma molécula de água é eliminada como subproduto da reação. Porém, esse processo também pode acontecer sinteticamente, uma vez que a grande maioria dos polímeros utilizados no dia-a-dia dos seres humanos é produzido artificialmente. Outro tipo de reação é a polimerização de adição onde monômeros são incorporados um ao outro para formar a cadeia do polímero, tendo como início da reação a quebra de uma dupla ligação entre carbonos olefínicos presentes no monômero, formando um radical com elétron livre ou carbocátion, reativo com outra olefina e assim por diante, formando longas estruturas poliméricas (Piatti and Rodrigues, 2005).

Os monômeros que constituem um polímero podem ser iguais entre si, como é o caso do glicogênio, composto por unidades de glicose, ou então por monômeros diferentes em si, como a borracha sintética, que possui monômeros de estireno e butadieno. Quando compostos pelos mesmos monômeros, os polímeros são classificados em homopolímeros; já quando a constituição ocorre pela ligação de diferentes unidades, é denominado copolímero (Vert et al, 2012) (Figura 1).

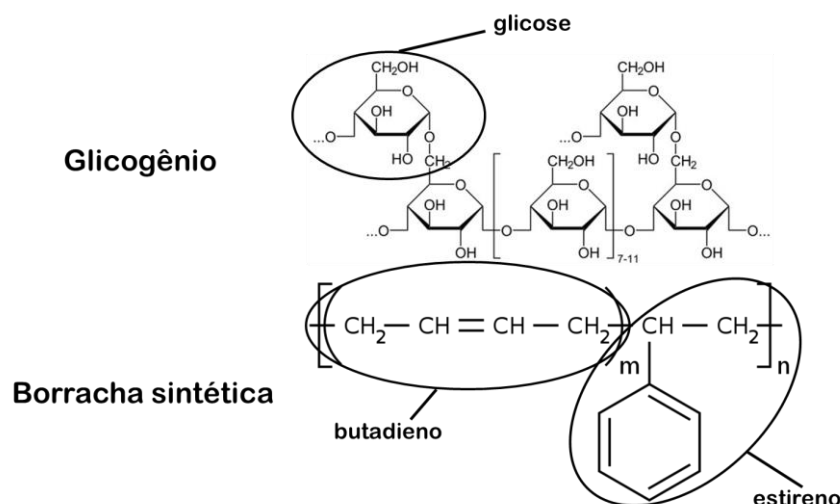


Figura 1 - Estrutura do homopolímero glicogênio, formado exclusivamente por monômeros de glicose, e da borracha sintética, copolímero composto por monômeros de butadieno e estireno

Derivada também da raiz grega, a palavra “plástico” (em grego, *plastikus*) significa “apto para moldagem”. O termo, portanto, se refere à maleabilidade do material e à plasticidade durante a fabricação, características que permitem que ele seja fundido, extrusado, prensado e transformado em uma infinidade de formas, como fios, chapas, garrafas, caixas, entre outros (PlasticsEurope, 2018). Entre as décadas de 70 e 80 se observou um grande aumento no consumo dos produtos derivados de petróleo, principalmente pela disponibilidade das novas reservas de petróleo e o aumento da taxa de recuperação dos resíduos das refinarias (Merdrignac and Espinat, 2007).

Os plásticos sintéticos são leves, resistentes, versáteis, flexíveis e duráveis, características atribuídas a um material de relativo baixo custo e capaz de substituir muitas vezes outras matérias-primas, como o papel, vidro ou metais (Albuquerque and Malafaia, 2018). São aplicados nas mais diferentes áreas, como a medicina, a construção civil, a indústria têxtil, utensílios domésticos, com destaque para a indústria de embalagens, que é responsável por quase 40% da demanda europeia desses polímeros (Figura 2). Todavia, é exatamente a sua durabilidade que tem se tornado um problema ambiental ao se utilizar os polímeros como matéria-prima para confeccionar bens de consumo (Cangemi et al., 2005).

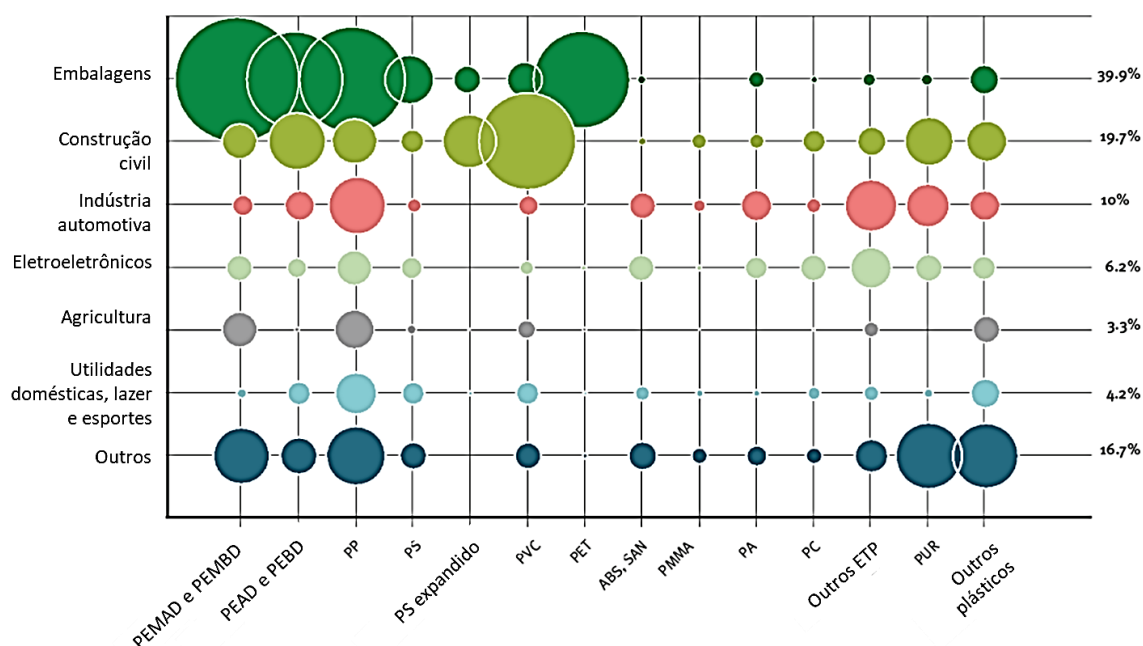


Figura 2 - Demanda de plásticos na Europa por segmentos e tipos de polímeros em 2016. (Adaptado de Plastics Europe, 2018)

## 1.1 Biopolímeros

Os plásticos fazem parte de uma classe de compostos mais utilizados e produzidos no mundo, excedendo inclusive a produção de aço desde 1989 (PlasticsEurope, 2015). Em 2015, a estimativa de produção mundial de plásticos foi de 300 milhões de toneladas, 34 milhões de toneladas de resíduos de material e destes, 93% foram despejados nos oceanos ou descartados em aterros sanitários (Thakur et al., 2018). A produção de plásticos à base de petróleo traz grandes desvantagens ao meio ambiente, gerando produtos e resíduos não biodegradáveis, característica adquirida graças à alta massa molecular e complexidade da estrutura destes compostos (Akaraonye et al., 2010), resultando em muitas décadas para serem decompostos na natureza, geralmente acompanhado da produção de toxinas durante este processo (Gross and Kalra, 2002). Ainda que os polímeros sintéticos usados comercialmente tenham componentes não poliméricos que proporcionam uma pequena

susceptibilidade biológica, no quesito da biodegradação, não é um tempo considerado significativo (Cangemi et al., 2005).

Esse fato levou a uma crescente preocupação por agências governamentais e ambientais, resultando num impulso científico global pela busca por polímeros alternativos biodegradáveis que possam substituir os materiais plásticos derivados de petróleo, como por exemplo, os poliésteres. (Raza et al., 2018). Outro fator que influencia no aumento das pesquisas nesse âmbito, é o fato das reservas de petróleo serem finitas (fonte não renovável) e existir uma grande dependência industrial dos combustíveis fósseis como fonte de energia (Suriyamongkol et al., 2007)

Os polímeros biodegradáveis podem ter os monômeros de sua composição oriundos de derivados de petróleo, entretanto ainda assim possuir uma estrutura capaz de sofrer degradação por meios abióticos (luz, umidade, calor), bem como pela ação de micro-organismos, de modo biótico, sendo convertidas em moléculas de menor peso molecular que podem posteriormente serem utilizadas como fonte de carbono para células microbianas (Perlatti et al., 2017). É importante destacar que um polímero degradável não é necessariamente biodegradável, mas um polímero biodegradável é consequentemente degradável (Vert et al., 2012).

Pelas normas da IUPAC, os biopolímeros são substâncias compostas por um tipo de biomacromolécula (molécula de alta massa molar feita com múltiplas repetições de pequenas moléculas, produzida por organismos vivos) (Vert et al., 2012). O bioplástico é um polímero de base biológica, derivado ou feito a partir de monômeros derivados de biomassa, proveniente de uma matriz natural, que tem origem renovável (Thakur et al., 2018). Esse material é degradado por micro-organismos (bactérias, fungos ou algas) e sua degradação é dependente das condições ambientais (temperatura, água, oxigênio) e químicas da composição do polímero (Kale et al., 2007). Esse é um mercado que vem crescendo ano após ano, reforçando a produção mundial de biopolímeros, chegando à previsão de produção de 6,2 milhões de toneladas em 2018 (Mostafa et al., 2018).

A maior parte dos biopolímeros, quando comparados com os plásticos convencionais, requerem um tempo menor para degradação. Entretanto, esses bioplásticos ainda despendem um alto custo de produção. Uma das formas

encontradas para minimizar os custos é misturar esses compostos com outros materiais naturais, como por exemplo fibras de sisal, sem perder suas características biodegradáveis (Wu, 2012; Thakur et al., 2018). Apesar dessa saída, o fator que mais contribui para elevar os custos da produção de biopolímeros são os substratos utilizados no processo fermentativo, que podem chegar a 50% dos custos totais de produção (Solaiman et al., 2006). Como consequência, os esforços em se encontrar fontes alternativas e baratas de nutrientes para a produção vêm crescendo (Tabela 1). As industriais associadas à agricultura produzem resíduos atrativos para uso na produção microbiana de biopolímeros, pois possuem, em geral, alto conteúdo de carbonos, são renováveis, e, do ponto de vista econômico, são derivadas de subprodutos excedentes no processo, o que abaixa o custo de produção (Solaiman et al., 2006). Resíduos da indústria de alimentos e da produção de biocombustíveis tem sido os mais explorados, pela grande geração de subprodutos que se encaixam nas características necessárias para utilização nos processos fermentativos.

Tabela 1 - Exemplos de microrganismos isolados para a produção de biopolímeros e suas respectivas fontes de carbono utilizadas.

Micro-organismo	Biopolímeros produzidos	Substratos	REF
<i>Cupriavidus sp.</i> <i>USMAA1020</i>	Poli(3-hidroxi- <i>butirato-co-4-hidroxi- butirato</i> )	$\gamma$ -butirolactona	A
<i>Comamonas sp.</i> EB172	Poli(3-hidroxi- <i>butirato</i> )	Resíduos de óleo de palma	B
<i>Delftia tsuruhatensis</i> <i>Bet002</i>	Poli(3-hidroxi- <i>butirato</i> )	Mistura de ácidos graxos	C
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Poli(3-hidroxi- <i>butirato-co-4-hidroxi- butirato</i> ) e poli(3-hidroxi- <i>butirato-4-hidroxi- butirato-3-hidroxi- valerato</i> )	Resíduos de glicerol, $\gamma$ -butirolactona e ácido propiônico	D
<i>Pannonibacter phragmitetus</i> ERC8	(R)-3-hidroxi- <i>butirato</i> e hidroxi- <i>alcanoatos</i> de cadeia média	Resíduos de glicerol	E
Cultura mista de bactérias	3-hidroxi- <i>butirato</i> e poli(3-hidroxi- <i>butirato-co-3-hidroxi- valerato</i> )	Soro de leite	F
Mutantes de <i>Pandoraea sp.</i> MA03	Poli(3-hidroxi- <i>butirato-co-3-hidroxi- valerato</i> )	Sub produtos de biodiesel e ácido propiônico	G

Referências: **A:** Amirul et al., 2008; **B:** Zakaria et al., 2010; **C:** Gumel et al., 2012; **D:** Cavalheiro et al., 2012; **E:** Ray et al., 2016; **F:** Colombo et al., 2016; **G:** de Paula et al., 2017.

Este estudo deu enfoque aos poliésteres, classe de biopolímeros constituídos por ligações éster entre ácidos orgânicos, com enfoque nos

polihidroxicanoatos, que possuem monômeros de ácidos hidroxicanoicos e são produzidos por fermentação microbiana (Albuquerque and Malafaia, 2018; Garavand et al., 2017).

## 1.2. Polihidroxicanoatos

A intersecção de áreas como a química, a microbiologia e a biologia molecular permitiu de forma eficiente o desenvolvimento de processos industriais biotecnológicos envolvendo micro-organismos que sintetizam diversas biomoléculas como, por exemplo, os polihidroxicanoatos (PHA's) (Erickson et al., 2012; Gavrilescu & Chisti, 2005; Kiss et al., 2015). Esta tecnologia de materiais biodegradáveis já é utilizada em produtos como embalagens, garrafas de xampu, aparelhos de barbear descartáveis, copos descartáveis, alfinetes cirúrgicos, facas e garfos descartáveis, fraldas, espumas, fibras, filmes, etc. Para fins agrícolas, os PHAs têm sido usados na formulação de herbicidas, inseticidas e inoculantes bacterianos utilizados para melhorar a fixação de nitrogênio nas plantas (Anjum et al., 2016).

Os polihidroxicanoatos fazem parte dos compostos mais estudados para a substituição dos derivados petroquímicos, devido às suas características biodegradáveis e propriedades mecânicas semelhantes aos plásticos convencionais (Dias et al., 2006). Esses biopolímeros podem ser degradados rapidamente (entre 3 e 9 meses) por micro-organismos, se em condições adequadas, mineralizados à dióxido de carbono e água, utilizando enzimas específicas presentes no metabolismo desses seres vivos (Jendrossek, 2001). Diversos são os poliésteres de cadeia longa, sendo conhecidos mais de 150 tipos diferentes de monômeros que podem constituir-los. Essas moléculas podem ser divididas em PHAs de cadeia curta (PHA<sub>scl</sub> – *small chain length*), com monômeros de 4 a 5 átomos de carbono, e PHAs de cadeia média (PHA<sub>mcl</sub> – *medium chain length*), com 6 ou mais átomos de carbono em cada monômero (Thomson et al., 2010). A grande diversidade de monômeros encontrados nos PHAs fornecem ampla gama de propriedades físicas. Os que possuem cadeias laterais curtas comportam-se de modo semelhante ao polipropileno, enquanto os que possuem cadeias laterais mais longas têm propriedades elásticas (Gross &

Kalra, 2002). O PHB (poli-3-hidroxi-butirato) é um homopolímero, semelhante ao polipropileno, relativamente rígido e quebradiço, com uso limitado (Suriyamongkol et al, 2007). A Figura 3 apresenta a estrutura de alguns PHAs e copolímeros.

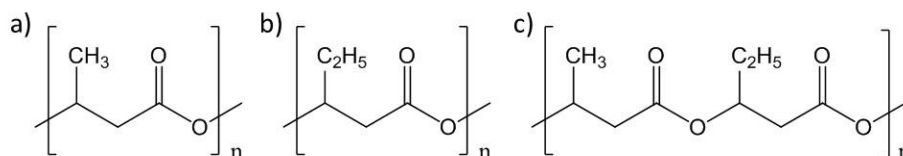


Figura 3 - Estrutura química dos polihidroxi-alcenoatos: (a) poli(hidroxi-butirato) - PHB, (b) poli(hidroxi-valerato) - PHV e (c) poli(hidroxi-butirato-co-valerato) - P(3HB-co-3HV)

Os principais organismos capazes de produzir PHAs em larga escala são as plantas e as bactérias. Porém, as células vegetais não são capazes de obter altos rendimentos de produção, pois com níveis entre 10-40% de biopolímeros/massa seca celular (m/m), existe um efeito negativo no crescimento e desenvolvimento do vegetal (Verlinden et al., 2007). Já nas bactérias, o nível de acúmulo é bem mais alto, podendo chegar a 90% de biopolímeros/massa seca celular sem que haja prejuízos para a célula (Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003).

### 1.3 Produção de PHAs por bactérias

A ocorrência de PHAs em bactérias tem sido conhecida desde a década de 1920, quando o microbiologista Maurice Lemoigne relatou a formação de PHB dentro das células bacterianas, caracterizando a molécula (Lemoigne, 1926; Verlinden et al, 2007). Diversos micro-organismos já foram isolados e utilizados para a produção de biopolímeros (Tabela 1).

Os PHAs podem ser sintetizados por micro-organismos a partir de fontes renováveis de carbono, permitindo assim que o processo seja mais sustentável (Braunegg et al., 1998). Os micro-organismos produtores de biopolímeros também costumam ser cultivados em condições amenas, tais como temperatura ambiente, pH fisiológico e utilizam água como solvente, eliminando



o uso de compostos tóxicos, alinhando seu o processo de produção com princípios da Química Verde (Whittall & Sutton, 2012).

Os biopolímeros são sintetizados naturalmente pelas bactérias quando a célula sofre um período de estresse, geralmente causado pela limitação de nutrientes essenciais ao crescimento, como o nitrogênio, fósforo ou microelementos, aliado ao excesso de fonte de carbono no meio de cultura (Dias et al., 2006). Enquanto houver um ambiente favorável para seu desenvolvimento, a célula bacteriana utilizará sua energia para a divisão celular e crescimento ao invés de acumular reservas energéticas para momentos de escassez de nutrientes (Daigger and Grady, 1982). Apesar do nitrogênio ser conhecido como o nutriente mais limitante para a indução do aumento da produção de biopolímeros, algumas bactérias, como a *Azotobacter* spp, tem maior efetividade de produção quando o oxigênio está em quantidade limitante (Anderson and Dawes, 1990).

O desbalanço nutricional provoca o acúmulo de biopolímeros na forma de grânulos intracelulares de reserva (Figura 4), uma vez que essas moléculas são insolúveis em água (Verlinden et al, 2007). Estes grânulos são inclusões intracelulares esféricas, com um núcleo amorfo e hidrofóbico, que é rodeada por proteínas envolvidas no metabolismo dos PHAs (Rehm, 2010).

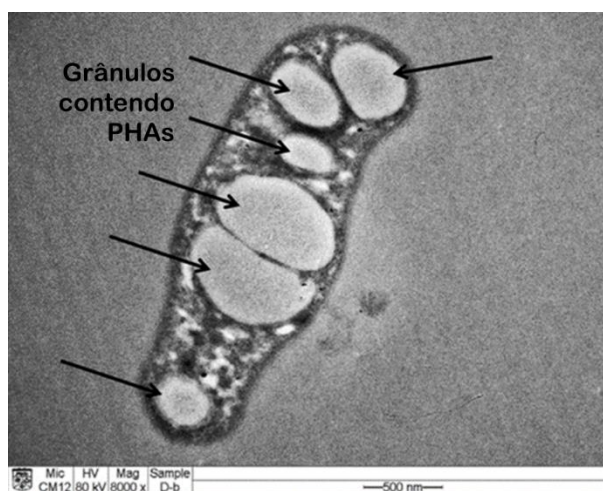


Figura 4 - Micrografia eletrônica de transmissão mostrando os grânulos intracelulares de *Delftia tsuruhatensis* Bet002 crescida em ácido oleico (Adaptado de Gumel et al., 2012)

A PHA sintase, enzima responsável pela polimerização dos monômeros dos álcoois orgânicos em biopolímeros, é um componente da membrana do

grânulo que armazena os PHAs, bem como a depolimerase, enzima que quebra essas moléculas para que sejam usadas na falta de nutrientes como fonte de energia (Figura 5).

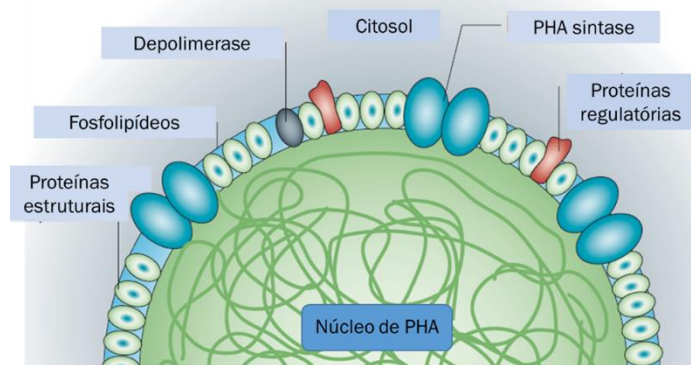


Figura 5 - Detalhes da estrutura dos grânulos de reserva de PHAs, mostrando o centro amorfo e hidrofóbico onde os biopolímeros são armazenados, as enzimas PHA sintase e depolimerase e proteínas e fosfolipídeos que compõe a membrana que envolve as moléculas acumuladas (Adaptado de Rehm, 2010).

É vantajoso para as células armazenarem o excesso de nutrientes intracelularmente, pois esses grânulos não interferem no desenvolvimento do micro-organismo e nem alteram seu estado osmótico, devido aos intermediários solúveis serem polimerizados em moléculas insolúveis. Dessa maneira, a perda destes compostos importantes para o meio extracelular é impedida e as reservas de nutrientes estarão seguramente disponíveis, por um baixo custo de manutenção (Peters & Rehm, 2005).

#### 1.4 Biossíntese de polihidroxicanoatos

O tipo de PHA produzido por uma espécie bacteriana é determinado pela especificidade do substrato da enzima PHA sintase, que catalisa a polimerização dos monômeros de (*R*)-hidroxiacil-Coenzima A (CoA) (Thomson et al., 2010). Esta importante característica tem sido alvo de estudos que visam alterar a especificidade da enzima pelo substrato, para que assim os polímeros obtidos estejam de acordo com as propriedades desejadas (Rehm, 2006).

Podemos separar a biossíntese de PHAs em três etapas. A primeira delas é a entrada de uma fonte de carbono capaz de ser convertida em biopolímeros

através da membrana celular por um transporte específico ou por difusão. A segunda etapa é constituída das reações anabólicas e catabólicas responsáveis pela conversão da fonte de carbono em hidroxiacil-CoA, substrato da PHA sintase. A última etapa é conduzida pela PHA sintase, enzima chave da biossíntese, que utiliza as moléculas de hidroxiacil-CoA como substrato e catalisa a reação de ligação éster entre elas, com simultânea liberação do grupo S-CoA (Figura 6). A segunda etapa é considerada a crucial para a biossíntese de biopolímeros, pois é a que torna o substrato adequado para a reação da enzima PHA sintase (Steinbüchel and Steinbüchel, 1995).

Resumidamente, a biossíntese de PHB (polihidroxibutirato), ocorre primeiramente via condensação de duas moléculas de acetil-CoA, reação catalisada pela enzima  $\beta$ -cetotiolase, levando à formação de acetoacetil-CoA. Esta molécula, por sua vez, é reduzida à (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA pela (*R*)-acetoacetil-CoA redutase específica. A (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA é um substrato para a poliéster sintase (PHA sintase) e precursor direto da síntese de PHB (Rehm, 2006) (Figura 6).

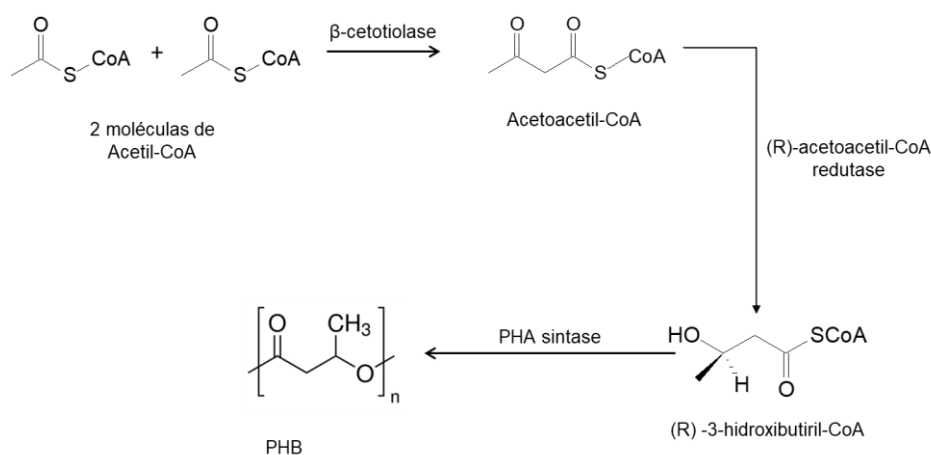


Figura 6 - Representação da rota biossintética de produção de PHB em bactérias (Adaptado de Rehm, 2006).

Diversas fontes de carbono vêm sendo estudadas como substratos precursores de PHAs, porém as que mais obtêm sucesso são as que possuem algum tipo de ácido hidroxialcanoico em sua composição. Caso a fonte de nutrientes não seja um substrato precursor direto, mas sim um intermediário central do metabolismo, ela deverá passar por mais reações enzimáticas complexas até que seja convertida em um precursor adequado. Cada micro-

organismo possui mecanismos diferentes na conversão de nutrientes à PHAs, já que a informação genética contida em cada um dá origem à diferentes enzimas responsáveis por esse metabolismo. Quando comparados os rRNAs, existem semelhanças que podem levar à elucidação do mecanismo de conversão que seja mais semelhante entre algumas espécies e mais divergente em outras. Algumas bactérias têm preferência pela adição de monômeros que compreendem de 3 a 5 átomos de carbono, enquanto outras incorporam moléculas alifáticas insaturadas que compreendem de 6 a 14 átomos de carbono (Steinbüchel and Valentin, 1995).

O PHB é produzido por bactérias com diferentes tipos de substratos. Já outros tipos de biopolímeros, como os que possuem monômeros de PHV (polihidroxivalerato) necessitam da adição de precursores específicos, como o ácido valérico e o propiônico (Figura 7) (Urtuvia et al., 2014; Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003).

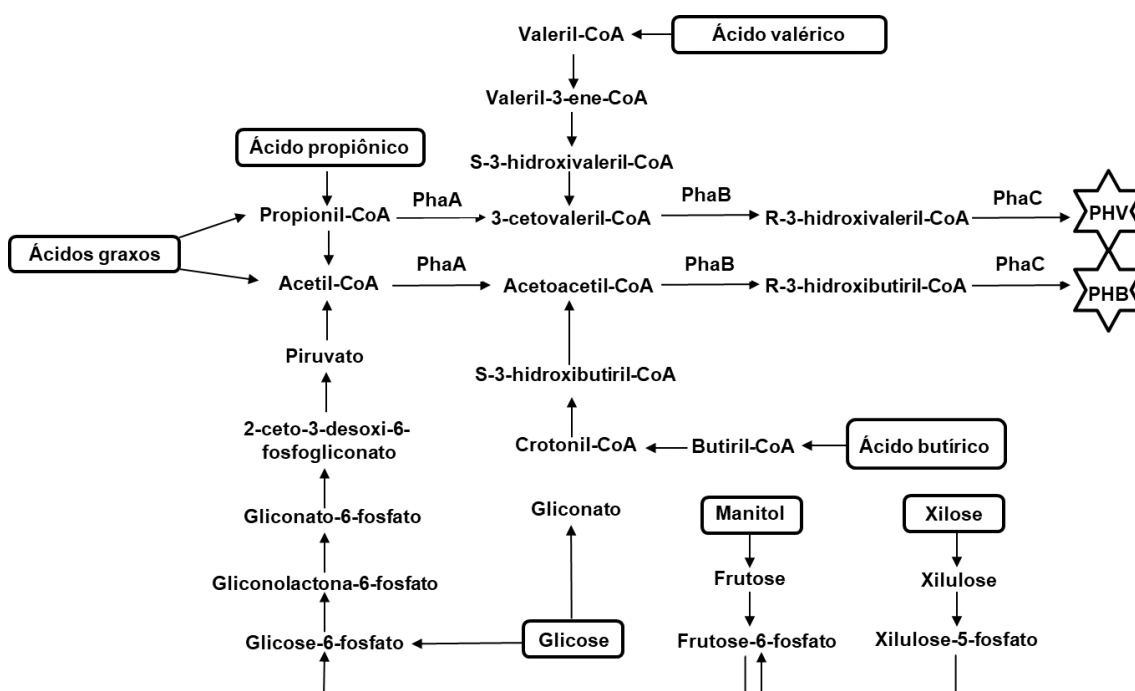


Figura 7 - Representação das possíveis rotas biossintéticas para a produção de PHB e PHV. PhaA, PhaB e PhaC são as enzimas responsáveis pela biossíntese dos biopolímeros, específicas para cada substrato (PhaA: condensação de precursores; PhaB: redutase específica; PhaC: PHA sintase) (Adaptado de Urtuvia et al., 2014).

## **1.5 Fontes de carbono alternativas para produção de biopolímeros com destaque para glicerol e soro de leite**

O glicerol pode ser usado como fonte de carbono para a produção de biopolímeros, pois a sua conversão em piruvato o integra à biossíntese dessa classe de moléculas, sendo posteriormente convertido em acetil-CoA e, após as modificações necessárias realizadas pelas enzimas específicas, transformado em biopolímeros (da Silva et al., 2009). Apesar desta elucidação, outras rotas podem levar à produção dessas moléculas pelo glicerol, uma vez que o destino do piruvato não é o mesmo em diferentes cepas bacterianas (Leja et al., 2011; Raghunandan et al., 2014). O glicerol é um subproduto do biodiesel, sendo correspondente por aproximadamente 10% do total de produtos oriundos da reação para a obtenção desse biocombustível, levando à grandes quantidades excedentes sem destino (de Paula et al., 2017; Yang et al., 2012). Seu reaproveitamento é promissor para a bioconversão em compostos de valor agregado, pois é um subproduto de baixo custo, abundante e apresenta compatibilidade aos processos de fermentação microbiana. O fato de ser produzido naturalmente por diversos organismos para o metabolismo de lipídeos e catabolismo auxilia na grande taxa de estudos relacionados ao glicerol em processos fermentativos industriais (Solomon et al., 1995; Barbirato & Bories, 1997; Menzel et al., 1997; da Silva et al., 2009).

Os ácidos graxos são outra classe de moléculas eficientes como fonte de carbono e podem ser convertidas tanto em precursores de PHV quanto PHB (da Silva et al., 2009). O soro de leite é uma fonte rica em açúcares e gorduras, contendo aproximadamente metade dos sólidos totais do leite, compreendendo proteínas solúveis, sais, lactose e ácidos graxos (Oliveira et al., 2012). A aplicação deste resíduo é de grande interesse industrial, pois é um dos maiores efluentes descartados no ambiente, podendo acarretar sérios problemas ambientais quando eliminados inadequadamente, devido à grande quantidade de matéria orgânica, favorecendo a quantidade de micro-organismos no nicho e modificando propriedades físico-químicas que afetam na vida de animais aquáticos e plânctons (Mizubuti, 1994; Oliveira et al., 2012).

## 1.6 *Diabrotica speciosa* e o potencial biotecnológico de microorganismos associados a insetos

*Diabrotica speciosa*, popularmente conhecido como vaquinha, é um besouro pertencente à família Chrysomelidae, considerada uma praga altamente polífaga, que é amplamente encontrada em estados brasileiros e em outros países da América Latina, sendo a praga mais comum da América do Sul (Ávila & Santana, 2013; Cabrera Walsh & Cabrera, 2016; Perlatti et al., 2017). Esse inseto inclui em seu desenvolvimento de fase imatura períodos de ovo, larva, pré-pupa, pupa e por fim, a fase adulta. Seu ciclo de vida dura de 24 a 40 dias, sendo de 5 a 7 dias de ovo, 14 a 26 dias de larva (que contempla três ínstaes) e 5 a 7 dias de pupa (Zucchi et al., 1993) (Figura 8).

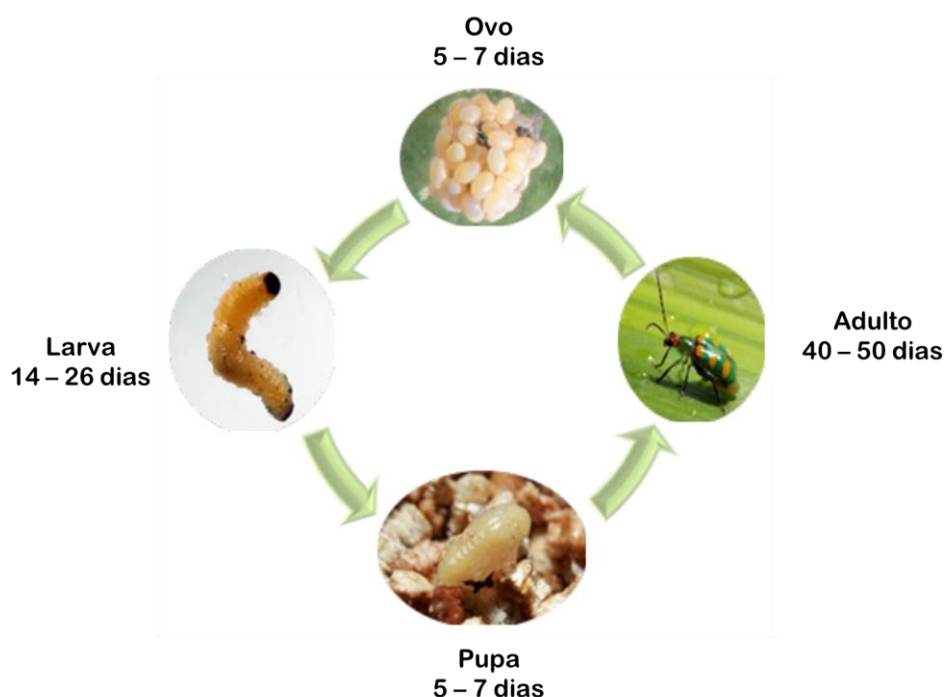


Figura 8 - Ciclo de vida de *Diabrotica speciosa* (Adaptado de Rosa et. al, 2013)

Tanto as larvas quanto os indivíduos adultos causam danos a culturas agrícolas, dentre elas, as hortaliças, feijoeiro, soja, girassol, milho e tubérculos (Viana, 2010, Laumann et al., 2004). A larva de *D. speciosa* provoca danos ao sistema radicular das plantas, reduzindo sua capacidade em absorver água e nutrientes, além aumentar a susceptibilidade às doenças nas raízes e provável tombamento pelo enfraquecimento (Khaler et al., 1985; Marques et al., 1999). Os adultos danificam a parte aérea das plantas, causando desfolha, podem

atacar os frutos, reduzindo sua qualidade comercial, além de atuarem como vetores de patógenos causadores de viroses e doenças bacterianas (Rosa et al., 2013; Viana, 2010; Laumann et al., 2004).

Os insetos são uma das classes de animais mais bem sucedidos no quesito de adaptabilidade para sobrevivência e diversidade (Krishnan et al., 2014). A ligação entre os micro-organismos e a ecologia e evolução dos insetos é perceptível desde que surgiram estudos relacionados a bactérias simbióticas intracelulares, transmitidas hereditariamente, em geral associadas ao tecido gastrointestinal ou nutrição do inseto (Engel and Moran, 2013). O termo “simbiose” (do grego, *simbios* – vivendo juntos) foi cunhado por Anton de Bary, cuja definição é :“*associação permanente entre dois ou mais organismos especificamente distintos, pelo menos durante uma parte do ciclo de vida*” (Gil et al., 2004). Apesar do autor ter explicitado que essa associação pode ser positiva, negativa ou neutra, a maior parte dos pesquisadores considera que a simbiose ocorre apenas quando a associação é benéfica para ambos os organismos (Gil et al., 2004).

Grande parte dos insetos estabelecem uma relação interdependente com bactérias, a qual fornece oportunidades de interação metabólica e até transferência gênica do micro-organismo para o hospedeiro (Gil et al., 2004; Keeling and Palmer, 2008; Poelchau et al., 2016). Os micro-organismos endossimbiontes (simbiontes que se abrigam no hospedeiro) colonizam os insetos e possuem um papel muito importante no seu metabolismo e digestão, estabelecendo uma relação íntima com seu hospedeiro (Poelchau et al., 2016). Os simbiontes hereditários podem ser classificados em obrigatórios e facultativos. Os endossimbiontes obrigatórios geralmente colonizam o citosol das células hospedeiras especializadas, conhecidas como bacteriócitos, fornecendo nutrientes necessários aos hospedeiros que não poderiam ser adquiridos de outra maneira (Baumann, 2005). Ambos os organismos envolvidos nessa simbiose se especializam para que a interação entre eles seja benéfica, porém seu mecanismo e interação entre o micro-organismo e o sistema imunológico do hospedeiro ainda não é completamente compreendido na maioria das vezes (Engel and Moran, 2013). Em alguns casos, o inseto se utiliza de moléculas secretadas pelos endossimbiontes para sua proteção (Laughton et

al., 2011), enquanto outros possuem defesas dentro do seu próprio organismo especificamente para que a bactéria simbiótica não prolifere para outros tecidos, que não os bacteriócitos (Login and Heddi, 2013). Já os endossimbiontes facultativos não são exigidos pelos hospedeiros, ou seja, podem ser transmitidos maternalmente, porém a transmissão é ocasional, fazendo com que essa associação seja desacoplada. O papel desses micro-organismos é, além do fornecimento de alguns nutrientes, conferir características ao hospedeiro de resistência a inimigos naturais, inseticidas e adaptação ao estresse térmico (Yuval, 2017). Apesar disso, esses micro-organismos parecem se desenvolver apenas na presença do seu hospedeiro (Oliver et al., 2010). Esse tipo de simbionte possui genoma maior, incluindo mecanismos de invasão dos tecidos do hospedeiro, afetando sua fisiologia e aumentando a frequência de infecção (Hotopp et al., 2007; Oliver et al., 2010).

Yuval (2017) obteve resultados que sugerem que as bactérias presentes no intestino dos insetos provocam mudanças nas preferências alimentares e na aptidão da busca por alimentos dos seus hospedeiros. A relação de dependência nessa interação de simbiose vem sendo comprovada por experimentos que identificam genes importantes na sobrevivência do inseto que provêm de origem bacteriana, demonstrando a evolução constante na adaptabilidade do hospedeiro oriunda da associação (Hotopp et al., 2007; Poelchau et al., 2016).

Os micro-organismos possuem um grande potencial para a produção de biomoléculas e o nicho em que eles se encontram pode providenciar diferentes adaptações, induzindo a síntese de moléculas diversas. Além de benéficas para o inseto, essas moléculas podem ser extraídas para aplicação em produtos de valor agregado, como, por exemplo, no isolamento de enzimas, produção de vitaminas, moléculas sinalizadoras (Krishnan et al., 2014) e biopolímeros.

Visto que os micro-organismos podem ser isolados de diversas origens, é interessante a investigação de fontes ainda pouco estudadas, como o trato digestivo de insetos, e a identificação dessas espécies pode auxiliar na manipulação das tais, bem como sinalizar para novas espécies passíveis de estudos na obtenção de produtos biotecnológicos.



## 1.7 Identificação de micro-organismos

Diversos genes são utilizados para estudar a filogenia dos micro-organismos, porém o gene que codifica o rRNA 16S tem sido, sem dúvidas, o marcador genético mais comum para identificação de espécies bacterianas (Kim et al., 2014). Esse gene é o responsável pela molécula de RNA ribossomal da subunidade menor; essa subunidade tem como função uma plataforma de pareamento entre o tRNA e o mRNA, desencadeando a tradução (Madigan et al., 2010).

Dentre as razões pelas quais o gene 16S é o mais utilizado em estudos filogenéticos estão: sua presença em praticamente todas as bactérias, a conservação da função do gene 16S ao longo do tempo, expressão constitutiva e o tamanho do gene em questão (aproximadamente 1.500 pb), que é suficientemente grande para fins informativos (Janda and Abbott, 2007; Patel, 2001).

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* – PCR) (Figura 9) é a primeira etapa necessária para o procedimento de identificação do gene 16S. Ela consiste na replicação das moléculas de DNA em regiões específicas de interesse a serem estudadas. Para tal, são utilizados *primers*, pequenos fragmentos de DNA complementares que se anelam às extremidades da sequência de interesse do ácido nucleico a ser replicado e necessária para que a enzima *Taq* polimerase seja ativada, uma vez que existe a necessidade de um grupo hidroxila livre (presente na extremidade 3' do *primer*) para iniciar a reação de polimerização. Os *dNTPs* (desoxinucleotideo trifosfato - adenina, guanina, citosina e timina) também devem ser adicionados, pois são o substrato para a reação (Carriço et al., 2013). Os quatro elementos (enzima *Taq* polimerase, *dNTPs*, DNA molde e *primers*) são submetidos a ciclos de temperaturas elevadas e resfriamento por determinados períodos por um equipamento termociclador, a fim de executar as etapas necessárias de separação da dupla fita de DNA, anelamento dos *primers* e polimerização das moléculas de DNA para obtenção do produto final em quantidades representativas do fragmento de interesse (Weier & Gray, 1988).

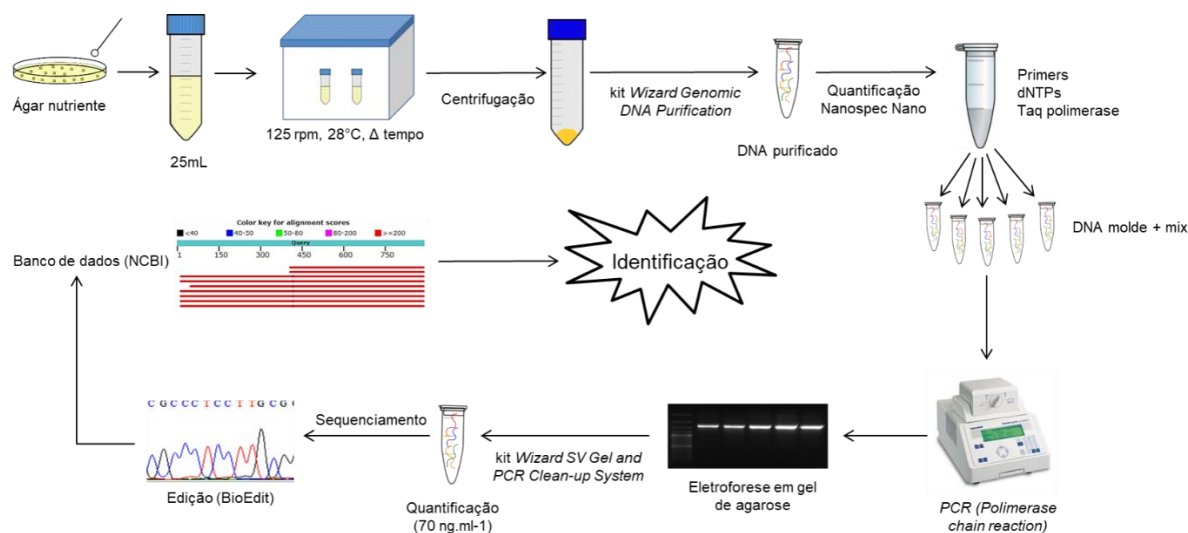


Figura 9 - Esquema geral das etapas realizadas na para identificação de micro-organismos por sequenciamento

O sequenciamento é a técnica que permite ‘enxergar’ as divergências do DNA quando comparado entre espécies. Por esse método, é possível localizar cada par de bases e sua posição na fita de DNA permitindo comparar a sequência com banco de dados (GenBank (NCBI), DNA Data Bank of Japan (DDBJ), European Bioinformatics Institute (EBI), etc). Dependendo da taxa de similaridade entre os resultados e os dados previamente publicados é possível fazer a determinação de gênero ou espécie, ou ainda propor se a bactéria em estudo faz parte de um grupo de espécies ainda desconhecidas.

Apesar de todas as vantagens, essa técnica nem sempre é suficiente para a diferenciação entre espécies. Algumas delas têm alta similaridade (acima de 99%) em suas sequências de nucleotídeos, porém quando utilizados kits de identificação ou outras técnicas de biologia molecular, mostram-se nitidamente resultados distintos (Janda and Abbott, 2007). Sendo assim, existe a necessidade da inserção de outras técnicas que confirmem o resultado obtido, como, por exemplo, a análise de ácidos graxos para as bactérias.

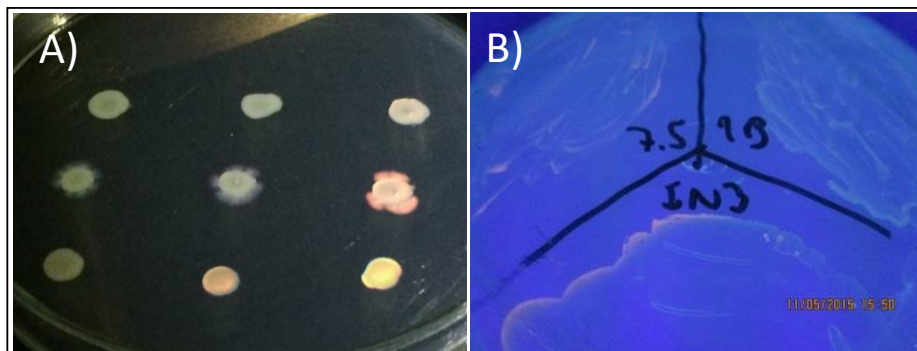
Dezenas de genes são responsáveis por codificar enzimas essenciais para a síntese de ácidos graxos em bactérias. Alguns desses genes são conservados através das espécies, porém outros não o são, assumindo a responsabilidade da síntese de enzimas adicionais que permitem alteração nas moléculas de ácidos graxos em resposta a alterações ambientais (Li et al., 2010; White et al., 2005; Grogan et al., 1997). Em geral, os constituintes da membrana

celular das espécies bacterianas são conservados, ou seja, quando analisada a composição dessa barreira de proteção entre micro-organismos da mesma espécie, se encontra o mesmo perfil de moléculas. Entretanto, para espécies diferentes, a constituição deste perfil químico é diferenciada, sendo assim a metodologia de comparação da composição de ácidos graxos da membrana uma forma eficaz na distinção de espécies (Li et al., 2010).

A diferenciação dessa classe de moléculas lipídicas está vinculada à cadeia hidrofóbica de átomos de carbono e hidrogênio, que podem ser saturadas, insaturadas, ramificadas ou hidroxiladas. Pode-se exemplificar o estudo feito por Li et al (2010), em que foram identificados diferentes perfis de lipídeos para três espécies de bactérias, evidenciando inclusive os ácidos graxos como marcadores para a diferenciação de bactérias gram-positivas e gram-negativas, pela preferência de ácidos graxos ramificados como substrato para gram-positivas, enquanto gram-negativas preferem ácidos graxos de cadeia linear para seu metabolismo.

## **1.8 Escolha dos micro-organismos**

As duas cepas selecionadas para o seguinte projeto foram isoladas do trato digestivo das larvas do inseto *Diabrotica speciosa* pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar – São Carlos. Em estudos prévios realizados por Perlatti et al. (2016) as cepas DsA.N042 e DsA.N049 apresentaram variação no aspecto de crescimento em placa quando comparadas a outras cepas, com aparente produção de gomas sendo visualizado pela textura das colônias (Figura 10.A). Devido a este fato, estas cepas foram submetidas pelo Dr. Bruno Perlatti à ensaios sendo avaliado seu potencial pela produção de biomoléculas, como os biopolímeros. Assim, as cepas foram cultivadas na presença de Vermelho de Nilo (Spiekermann et al., 1999) onde se pode confirmar o potencial destas bactérias para produção de PHAs (Figura 10.B).



Fotos: Bruno Perlatti, 2015.

Figura 10 - Avaliação do potencial de produção de biopolímeros para micro-organismos isolados do trato gastrointestinal de *D. speciosa*. A) Aspecto das colônias; B) Resultado da incidência de iluminação ultra-violeta nas cepas produtoras de PHA's crescidas em meio contendo vermelho do Nilo.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de cepas bacterianas endossimbiontes do inseto *Diabrotica speciosa* investigando a produção de polímeros biodegradáveis e o uso de resíduos de baixo valor agregado do setor agroindustrial como possíveis fontes de nutrientes.

### 2.1 Objetivos específicos

- a) Identificar a nível de gênero e espécie as bactérias selecionadas para o trabalho;
- b) Avaliar a produção de PHAs em batelada, identificando as variáveis mais significativas na produção de polímeros degradáveis;
- c) Identificar novos substratos para cultivo microbiano avaliando subprodutos do setor agroindustrial, objetivando rendimentos satisfatórios do ponto de vista industrial;
- d) Caracterizar qualitativamente e quantitativamente os biopolímeros obtidos estabelecendo os rendimentos por volume e massa seca de produção.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.2 Reativação dos micro-organismos e curvas de crescimento

Os experimentos prévios de avaliação da capacidade de produção de PHAs confirmaram que as cepas DsA.N042 e DsA.N049 eram produtoras de biopolímeros, justificando assim o interesse em aprofundar o conhecimento sobre elas. As cepas se encontravam criopreservadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  (Ultrafreezer Sanyo MDF – U56VC) em solução aquosa contendo 50% de glicerol (v/v). A reativação dos micro-organismos foi realizada pela repicagem das bactérias pela técnica de estriamento em placa de Petri contendo meio ágar nutriente (extrato de carne  $1,0\text{g.L}^{-1}$ , extrato de levedura  $2,0\text{g.L}^{-1}$ , peptona  $5,0\text{g.L}^{-1}$ , cloreto de sódio  $5,0\text{g.L}^{-1}$  e ágar  $15,0\text{g.L}^{-1}$ ) e incubadas em estufa BOD (SL-200, SOLAB), a temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h, até crescimento vigoroso das UFC.

Com o propósito de estimar as fases de desenvolvimento microbiano e o tempo de cada experimento, foi necessário construir de uma curva de crescimento para cada um dos micro-organismos estudados. Sendo assim, foi feito um pré-inóculo para ambos os micro-organismos, onde uma colônia foi retirada da placa de Petri com o auxílio de uma alça de platina e inoculada em tubo falcon (50 mL) contendo 15 mL de meio caldo nutriente (extrato de carne  $1,0\text{g.L}^{-1}$ , extrato de levedura  $2,0\text{g.L}^{-1}$ , peptona  $5,0\text{g.L}^{-1}$  e cloreto de sódio  $5,0\text{g.L}^{-1}$ ) e, posteriormente, colocado em incubadora orbital (TE-421, Tecnal) com agitação de 125 rpm e temperatura controlada de  $28^{\circ}\text{C}$ , permanecendo por 14 h. Após esse período, 500  $\mu\text{L}$  desse meio de crescimento foram transferidos para um erlenmeyer (500 mL) contendo 50 mL de meio caldo nutriente previamente autoclavado (inóculo 1,0% v/v). Uma alíquota (1 mL) foi retirada a cada uma hora (iniciando em  $t = 0$ ) por 7h consecutivas, exceto no período noturno e quando notada densidade óptica constante, e o meio de cultura mantido nas condições anteriores por todo o período do experimento. A leitura da densidade óptica foi feita em espectrofotômetro (700 Plus, Femto) num comprimento de onda de 600 nm sendo o equipamento calibrado com meio de cultivo ausente de células (Sezonov et al., 2007).

## 3.2 Identificação das cepas

Para a identificação das cepas em estudo, a metodologia utilizada foi a de sequenciamento do fragmento de rDNA referente ao gene 16S (Fox et al., 1977; Olsen and Woese, 1993). Os procedimentos foram realizados de maneira idêntica para ambos os micro-organismos em estudo.

### 3.2.1 Análise genética

Para a análise do gene 16S, uma colônia foi inoculada em tubo falcon (50 mL) contendo 25 mL de meio de cultura caldo nutriente e mantidas em incubadora orbital (TE-421, Tecnal) por um período de 14 e 48 h para as cepas DsA.N049 e DsA.N042, respectivamente, com agitação de 125 rpm e à temperatura de 28°C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados  $12.860 \times g$  à temperatura de 4°C, por 15 min para precipitação celular. A extração e purificação do DNA genômico bacteriano foi feita com o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Estados Unidos), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Após a obtenção do DNA purificado (Promega, Estados Unidos), o mesmo foi quantificado por espectrofotometria (BioSpec-Nano UV-VIS; Shimadzu) e, quando necessário, diluído para a montagem da mistura de reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação de PCR era composta por uma mistura contendo desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) (Sigma-Aldrich), enzima *Taq* DNA Polimerase (Sigma-Aldrich), tampão Tris-HCl  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,3 com  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  KCl (Sigma -Aldrich),  $\text{MgCl}_2$  ( $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich), água autoclavada livre de nucleases e os *primers Forward* e *Reverse Primer* (Exxtend, Campinas, Brasil). Os *primers* utilizados foram os descritos por Weisburg (1991) (Weisburg et al., 1991) *27f* (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3') e *1525r* (5'- AAGGAGGTGWTCCARCC -3'), e são considerados eficientes para a amplificação da região 16S do DNA ribossomal para grande parte das bactérias. Os parâmetros utilizados no termociclador (Bio-Rad T100, Hercules, CA, EUA) estão dispostos na Tabela 2. As reações foram feitas em quintuplicata para a obtenção de material genético suficiente para o sequenciamento.

Tabela 2 - Parâmetros utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR)

<i>Primers</i>	Sequência do primer	Reagentes	Volume
PF	5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'	H <sub>2</sub> O	16,0 µL
PR	5'AAGGAGGTGWTCCARCC 3'	Tampão	2,5 µL
		MgCl <sub>2</sub>	2,0 µL
<b>Programação do termociclador</b>		dNTPs 10mM	1,0 µL
94°C	5 min.	PF 10mM	1,0 µL
94°C	2 min.	RP 10mM	1,0 µL
49°C	1 min.	<i>Taq</i> DNA Polimerase	0,5 µL
72°C	4 min.		
72°C	10 min.		
4°C	∞	DNA (50 µg.mL <sup>-1</sup> )	1,0 µL
		<b>Volume final</b>	25,0 µL

Após a amplificação dos fragmentos de DNA, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) (Sigma-Aldrich), contendo 25 µL.L<sup>-1</sup> de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich), adicionados antes da polimerização. Esta etapa é importante para a constatação da efetividade da reação (especificidade dos *primers*) e verificação de contaminação por outro fragmento de DNA. O resultado esperado era de apenas uma banda com fragmento de 1500 pb. A cada reação (25 µL) foram adicionados 5 µL do corante *Orange Dye* (Sigma-Aldrich) e todo o volume foi aplicado em poços no gel de agarose. A voltagem para a separação das bandas na eletroforese foi de 90 V e o tampão condutor utilizado foi o Tris-acetato-EDTA (1x) com pH 8,0, com volume suficiente para cobrir o bloco de gel. Ao final da separação eletroforética, foi realizada a análise das bandas obtidas em transiluminador e, posteriormente, tais bandas foram recortadas do gel e purificadas com o uso do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega, Estados Unidos) seguindo o protocolo do fabricante. Os produtos da PCR foram novamente quantificados (BioSpec-Nano UV-VIS; Shimadzu) após a purificação (3 µL foram submetidos à eletroforese) e a concentração ajustada para 70 ng.µL<sup>-1</sup>, com os mesmos primers utilizados na PCR, para então serem enviadas para sequenciamento (ABI 3730 DNA Analyser, Life Technologies – Applied Biosystems) para o Instituto de Biociências da USP (São Paulo). As sequências resultantes (*forward* e *reverse*) foram alinhadas e editadas no *software* BioEdit, com auxílio da ferramenta ClustalX, tendo como base de comparação os picos mais resolvidos do eletroferograma correspondente para maior confiabilidade do tipo de nucleotídeo. Seguidamente, as sequências finais foram alinhadas com as do



banco de dados do GenBank (NCBI) pelo algoritmo BLAST (ferramenta blastn) para avaliação da similaridade entre elas.

### 3.3.2 Análise do perfil de ácidos graxos

O delineamento do perfil de ácidos graxos foi feito com base no protocolo de extração do *Microbial Identification System* (Sasser, 2001) e análise posterior num Cromatógrafo à Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas Sequencial (CG-EM/EM; Cromatógrafo à Gás Shimadzu 2010 AF-Plus com injetor AOC-5000 e detector Espectrômetro de Massas Sequencial TQ-8040) conforme protocolo proposto por Yuan et al. (2014) com modificações. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Uma colônia com crescimento de sete dias foi depositada no fundo de um tubo de ensaio com tampa de rosca e adicionado 1 mL da solução 1 (Tabela 3). Os tubos foram agitados em vórtex por 10 s e, em seguida, colocados em banho-maria a 100°C por 5 min. Após esse período, os tubos foram agitados novamente em vórtex por mais 10 s e colocados em banho-maria na mesma temperatura, por outros 25 min. Após resfriamento a temperatura ambiente, foram adicionados 2 mL da solução 2 (Tabela 3) aos tubos de ensaio, agitados em vórtex por 10 s e permaneceram em banho-maria a 80°C por 10 min. Na etapa de extração, foram adicionados 1,25 mL da solução 3 (Tabela 3) e os tubos foram suavemente agitados em incubadora orbital (TE-421, Tecnal) por 10 min à temperatura ambiente sendo a fase aquosa (inferior) descartada com auxílio de pipeta de Pasteur. Na última etapa, foram adicionados 3 mL da solução 4 (Tabela 3) ao conteúdo do tubo, novamente agitados em incubadora orbital por 5 min e a fase orgânica (aproximadamente 1 mL) transferida para um *vial* para análise no CG-EM/EM.

Tabela 3 - Soluções elaboradas para preparo de ésteres de ácidos graxos para análises de CG (MIDI, 2001).

Solução 1	Saponificação	45g hidróxido de sódio 150 mL metanol 150 mL água destilada
Solução 2	Metilação	325 mL ácido clorídrico 275 mL metanol
Solução 3	Extração	200 mL hexano 200 mL metil-tert-butil-éter
Solução 4	Lavagem	10,8g hidróxido de sódio 900mL água destilada

\*Os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co.

Para a análise do perfil de ácidos graxos das cepas, as soluções obtidas foram injetadas (1  $\mu$ L de amostra) em uma coluna Rtx-5 MS (5% difenil / 95% dimetil polisiloxano; 30,00 m  $\times$  0,25 mm id  $\times$  0,25  $\mu$ m de recobrimento; Restek, Bellefonte, PA, EUA). Os parâmetros utilizados para separação cromatográfica foram descritos por Yuan et al., 2014. A temperatura do auto injetor, da fonte de íons e da interface programada foi de 280°C, com split 1:5 e vazão do gás de arraste (He) de 1,5ml.min<sup>-1</sup>. O gradiente de temperatura do forno da coluna de separação foi programado do seguinte modo: temperatura inicial 80°C (espera por 1 min), taxa de 20°C.min<sup>-1</sup> até 140°C (espera 5 min), 4°C.min<sup>-1</sup> até 280°C (espera 5 min).

O modo de ionização selecionado foi ionização por elétrons operando com uma energia de 70 eV. O detector de massas foi programado para registrar os espectros no modo *fullscan* (Q3) no intervalo de massas de 45-700 Da a partir de 3,0 min. Os picos registrados após o tempo de separação dos compostos presentes nas amostras foram analisados com base na biblioteca Nist<sup>®</sup> 11 do espectrômetro de massas para sua identificação.

### 3.4 Cultivo das cepas selecionadas em fontes de carbono alternativas

Duas fontes de nutrientes foram selecionadas para avaliar o crescimento das bactérias e análise do acúmulo de PHAs sendo o glicerol (Synth) e o soro

de leite, fornecido pelo laticínio Bonura (São Carlos). Ambos são subprodutos industriais da produção de biodiesel e alimentícia, respectivamente.

### 3.4.1 Otimização da fonte de carbono

Para o cultivo das cepas em meio líquido com glicerol como fonte única de carbono, foi utilizado como base o meio salino mínimo descrito por Fukuda et al. (2002), contendo  $3,39 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaCl}$ ,  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,01 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  e  $0,001 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$  (pH 7,0). Todos os sais utilizados no preparo do meio salino foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O meio de cultivo foi autoclavado e as soluções de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaCl}_2$  foram preparadas e esterilizadas separadamente e suplementadas ao meio salino após atingir a temperatura ambiente, para que não houvesse precipitação.  $\text{FeSO}_4$ , foi filtrado em filtro estéril com membrana de PTFE e poro de  $0,22 \mu\text{m}$  e posteriormente acrescentado ao meio salino.

Primeiramente, os inóculos das colônias DsA.N049 e DsA.N042 cultivadas em meio ágar nutriente foram inoculadas em meio de cultura caldo nutriente e permaneceram sob agitação a 150 rpm em um incubadora orbital (TE-421, Tecnal) durante 14 e 48 h (seção 4.1), respectivamente, e à temperatura de  $28^\circ\text{C}$ . Após crescimento, foi utilizado 1 mL (1% v/v; D.O. 0,7) como pré-inóculo em cada erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio salino, e avaliadas as concentrações de 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0%, 4,0% e 6,0% (v/v) de glicerol para a cepa DsA.N042 e 2,0%, 4,0% e 6,0% (v/v) para DsA.049, tendo como controle positivo de produção de biopolímeros o meio de cultivo contendo  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de dextrose e  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de acetato de sódio (Perlatti, 2016). Os erlenmeyers foram submetidos às mesmas condições de agitação e temperatura descritos anteriormente, mantendo os experimentos para DsA.N049 e DsA.N042 durante 48 e 96 h, respectivamente.

Os experimentos com soro de leite tiveram os mesmos procedimentos de crescimento, parâmetros de agitação e temperatura que os escolhidos para glicerol, porém com um meio de cultivo diferente. O soro teve primeiramente seu pH ajustado para 7 com uma solução de  $\text{NaOH } 1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Posteriormente, foi

filtrado em filtro estéril com membrana de PTFE e poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e adicionado apenas em água destilada autoclavada, não usando o meio salino sendo, o soro de leite, uma fonte de nutrientes mais complexa. Para a cepa DsA.N042, foram adicionadas as proporções de 1,0%, 5,0% e 10% (v/v) de soro aos erlenmeyers que continham 100 mL de água e, para DsA.N049, 1,0%, 5,0%, 20% e 40% (v/v) em 200 mL de água.

### **3.4.2 Avaliação da produção de PHA's**

#### **3.4.2.1 Análise do rendimento de produção polimérica por Cromatografia Gasosa**

Após o período de crescimento, as células foram removidas por centrifugação ( $12.860 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15 min), ressuspendidas em 1 mL de água destilada, agitadas em vórtex para o pellet se desprender do tubo falcon e liofilizadas. Após a completa secagem, as células foram pesadas em balança analítica para a obtenção do seu peso seco (*Cell Dry Weight – CDW*) e submetidas ao processo de extração dos biopolímeros ou extração simultânea à reação de derivatização, para avaliação de sua produção.

A cada 25 mg de *CDW*, foi adicionado 1 mL de clorofórmio em tubo de ensaio com tampa de rosca e vaso selado (10 cm x 1 cm, 8 mL). Os tubos foram submetidos ao aquecimento em banho-seco com temperatura de  $80^\circ\text{C}$  por 72 h e, após esse período, resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi filtrada para retirada dos fragmentos celulares, adicionado *n*-hexano na proporção 9:1 *n*-hexano:clorofórmio (v/v) e centrifugadas à  $12.860 \times g$ ,  $0^\circ\text{C}$ , por 10 min, para a recuperação do polímero. A maior parte do solvente foi descartada e, após a secagem do solvente residual, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio para a ressolubilização do polímero e metanol na proporção final 9:1 metanol:clorofórmio (v/v). Os tubos foram novamente centrifugados nas mesmas condições e, após a secagem completa do solvente, o polímero foi pesado para estimar a porcentagem de produção, comparado à massa seca celular (Perlatti, 2016).

### 3.4.2.2 Análise dos polímeros por CG-EM/EM

Para que a molécula de biopolímero de PHA pudesse ser analisada pelo método de cromatografia gasosa, foi necessário torná-la volatilizável. Para tanto, os polímeros puros foram submetidos a um processo de metanólise, formando derivados de ésteres metílicos, utilizando 2 mL de uma solução contendo ácido sulfúrico:metanol na proporção 20:80 (v/v) e 2 mL de clorofórmio, adicionados a um tubo de ensaio com tampa de rosca, sendo mantidos em banho-seco sob a temperatura de 100°C por 100 min. Como padrão interno foi utilizado heptadecano (Sigma-Aldrich) (0,1 mg.mL<sup>-1</sup>). Após o resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 2 mL de água destilada e o conteúdo centrifugado (6.400 ×g , 20°C, 1 min) para a separação das fases e quebra da emulsão. A fase aquosa (superior) foi retirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e a fase inferior (orgânica) seca com sulfato de sódio. O líquido foi filtrado para a retirada dos resquícios do sal e então adicionado em *vials* para análise no CG-EM/EM (adaptado de Perlatti, 2016).

Numa segunda metodologia, a massa seca celular obtida para cada falcon foi submetida aos processos de extração e derivatização simultaneamente, adicionando-se 2 mL de clorofórmio e 2 mL de uma solução contendo ácido sulfúrico:metanol na proporção 20:80 (v/v), condicionados num tubo de ensaio com tampa de rosca, e mantidos em banho-seco sob a temperatura de 100°C por 3,5 h (Serafim et al., 2004) (Figura 11). Após o resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 2 mL de água destilada e os tubos foram submetidos à agitação em vórtex por 10 s e ,posteriormente, centrifugados (6.400 ×g , 20°C, 1 min) para a separação das fases e quebra da emulsão. A fase aquosa foi retirada e novamente, foram adicionados mais 2 mL de água e seguiram-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente, para a retirada dos componentes miscíveis em metanol (ácido sulfúrico e grande parte dos ácidos graxos). A fase orgânica foi retirada e seca com sulfato de sódio, filtrada em filtro de PTFE com membrana de poro 0,22 µm e condicionada em um *vial* para análise. O padrão de heptadecano foi adicionado diretamente ao *vial*, pois não necessitava da etapa de derivatização.

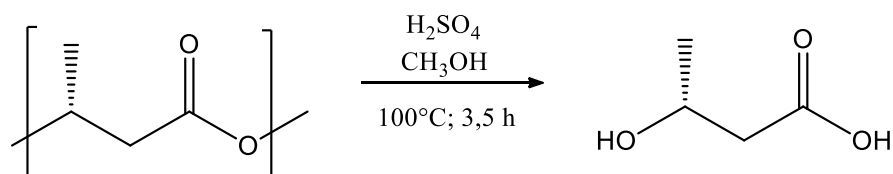


Figura 11 - Esquema da reação de metanólise em condições ácidas para PHB

Para a análise das soluções obtidas na etapa de preparo de amostras foi injetado no cromatógrafo à gás 1  $\mu\text{L}$  de amostra em uma coluna Rtx-5 MS (5% difenil / 95% dimetil polisiloxano; 30,00 m  $\times$  0,25 mm id  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$  de recobrimento; Restek, Bellefonte, PA, EUA). Algumas análises foram realizadas com os parâmetros: temperatura do auto injetor de 250°C, temperatura da fonte de íons e da interface programada foi de 280°C, com split 1:30 e vazão do gás de arraste (He) de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O gradiente de temperatura do forno da coluna de separação foi programado do seguinte modo: temperatura inicial 60°C (espera por 3 min), taxa de 18°C. $\text{min}^{-1}$  até 280°C (espera 1 min). Porém, após avaliação, foi verificado que o aumento na temperatura do autoinjeter, da fonte de íons e da interface auxiliou na eluição cromatográfica, favorecendo a análise dos compostos de interesse, bem como o padrão interno. A razão do split também diminuiu para evitar a saturação do detector do espectrômetro de massas, obtendo-se assim o programa final: temperatura do auto injetor de 280°C, temperatura da fonte de íons e da interface programada foi de 290°C, com split 1:50 e vazão do gás de arraste (He) de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O gradiente de temperatura do forno da coluna de separação foi programado do seguinte modo: temperatura inicial 40°C (espera por 3 min), taxa de 18°C. $\text{min}^{-1}$  até 290°C (espera 1 min).

O modo de ionização selecionado foi ionização por elétrons operando com uma energia de 70 eV. O detector de massas foi programado para registrar os espectros no modo *fullscan* (Q3) no intervalo de massas de 45-500  $m/z$  a partir de 3,0 min. Os picos obtidos foram analisados com base na biblioteca NIST® 11 do espectrômetro de massas.

### 3.4.2.3 Avaliação quantitativa e validação analítica

O método analítico quantitativo e sua validação foram estabelecidos

conforme os parâmetros recomendados pela ANVISA (ANVISA, 2017).

Para a análise quantitativa de biopolímeros, foram preparadas soluções do monômero 3-hidroxi-butirato de metila (Sigma-Aldrich) ( $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e do padrão de heptadecano (Sigma-Aldrich) ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) as quais serviram como solução estoque para a construção das curvas de calibração por padronização externa e na matriz (sobreposição de matriz) e como padrão interno, respectivamente.

Para definição da faixa de aplicação foram construídas duas curvas de calibração, reportando os resultados correspondentes à curva de calibração por padronização externa (em solvente) e a curva de sobreposição de matriz. Cada concentração foi analisada em triplicata. Após sucessivas diluições as concentrações finais do padrão 3-hidroxi-butirato de metila usado na construção das curvas de calibração foram: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 e 12,0  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Por sua vez, a concentração final do padrão interno foi 0,1  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

Para a avaliação da eficiência do método analítico foi realizada sua validação observando parâmetros como seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e recuperação.

Para a curva de calibração na matriz, foram utilizados 10,0 mg de células liofilizadas por tubo de ensaio, previamente cultivadas em meio caldo nutriente visto que os micro-organismos crescidos nesse meio de cultivo não apresentaram acúmulo de biopolímero. O processo de derivatização dos pontos da curva da matriz foi o mesmo aplicado para as amostras que estavam sendo avaliadas com os meios de cultivo com fontes de nutrientes alternativas. Para a curva em solvente e validação do método analítico, foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico:metanol 3:97 (v/v), que demonstrou melhores resultados de derivatização do padrão puro e o tempo de reação de 2 h, à  $100^\circ\text{C}$  em banho seco (Oehmen et al., 2005).

Para a determinação da exatidão e precisão do método, foi executado o ensaio de recuperação do analito em diferentes níveis (Ribani et al., 2004). A primeira concentração escolhida foi 120% do menor valor encontrado para a curva analítica, correspondente à  $3,60 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; o ponto intermediário

correspondente à 45% da maior concentração da curva, com valor de 5,40 mg.mL<sup>-1</sup>, ambos em triplicata; e por fim, o último ponto, com repetição de seis vezes, foi executado com 96% da maior concentração de analito da curva, chegando à concentração de 11,05 mg.mL<sup>-1</sup>.

Neste estudo, o LD e LQ foram obtidos pelas seguintes equações (Ribani et al., 2004):

$$LD = 3,3 \times \frac{\text{desvio padrão do intercepto}}{\text{coeficiente angular}}$$

$$LQ = 10 \times \frac{\text{desvio padrão do intercepto}}{\text{coeficiente angular}}$$

Os dois pontos iniciais (1,0 e 2,0mg.mL<sup>-1</sup>) estavam fora da linearidade da curva, portanto foram excluídos. As curvas estão dentro das normas da ANVISA, que estabelece uma curva com no mínimo 5 pontos e em triplicata (ANVISA, 2017).



## 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do potencial biotecnológico de micro-organismos é composta por diversas metodologias, uma vez que a complexidade do assunto a ser explorado exige um empenho de áreas tanto exatas quanto biológicas. Assim, neste estudo foi necessária a avaliação de crescimento para estimativa do tempo de cultivo ideal, condições específicas de balanço de nutrientes e avaliações analíticas para reconhecimento do produto obtido.

### 4.1 Curva de crescimento microbiano

Quando se visa aperfeiçoar um processo, é importante conhecer os parâmetros necessários para se atingir o objetivo (Oliveira et al., 2013). Os micro-organismos possuem muitas diferenças entre si, incluindo o seu tempo de desenvolvimento. Esse fator pode alterar a produção e rendimentos de moléculas específicas, por exemplo, quando as células são retiradas do meio de cultivo antes de entregarem tudo o que poderiam produzir.

A curva de crescimento microbiano é caracterizada por três fases. A fase lag é definida como a fase de adaptação do micro-organismo ao meio, fator que pode depender da espécie (fenótipo) do micro-organismo, estado fisiológico da população e alterações físico-químicas, como a disponibilidade de nutrientes, temperatura e pH, sendo difícil de fazer a previsão da duração do tempo dessa fase latente sem experimentação (McMeekin et al., 2002; Massaguer, 2006; Tortora et al., 2012; Oliveira et al., 2013). Na fase log, ou de crescimento exponencial, é encontrado o momento de maior atividade metabólica, onde a duplicação celular ocorre de maneira constante e exponencial, representada graficamente por uma linha reta cuja inclinação corresponde à velocidade de crescimento máximo (Massaguer, 2006; Tortora et al., 2012). A estabilização na população celular ocorre na fase estacionária, em que a velocidade de crescimento é a mesma da velocidade de morte, obtendo densidade constante (Massaguer, 2006; Oliveira et al., 2013).

Para o acompanhamento do crescimento das cepas bacterianas, foi gerado um gráfico plotando o tempo de crescimento (horas) vs. a densidade ótica

(D.O.), onde foi observada uma curva de ajuste exponencial contendo a etapa de adaptação dos micro-organismos (fase *lag*), o crescimento exponencial (fase *log*) e a fase estacionária. É possível notar nas Figuras 12.A e 12.B a diferença entre o desenvolvimento das bactérias DsA.N049 e DsA.N042. A cepa DsA.N049 atinge a fase estacionária após 7 h, enquanto a cepa DsA.N042 só consegue atingir o patamar em aproximadamente 50 h. O maior tempo provoca também o estresse de nutrientes, que quando entram em escassez, promovem o acúmulo dos biopolímeros como forma de sobrevivência celular. Dessa forma, foi determinado que os experimentos para DsA.N049 fossem delineados em 48 h, enquanto os de DsA.N042 durassem 96 h.

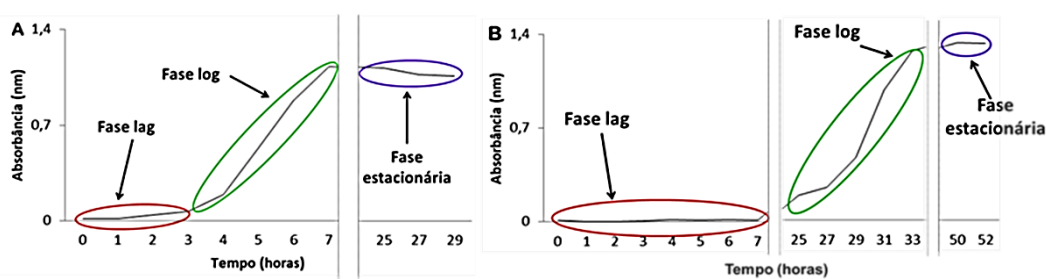


Figura 12 - Gráfico de Crescimento bacteriano em caldo nutriente. A) DsA.N049; B) DsA.N042

Vale ressaltar que a fisiologia do micro-organismo foi a principal variável para a diferença de crescimento, uma vez que o mesmo meio de cultivo e condições físico-químicas foram utilizadas para ambos os experimentos.

## 4.2 Identificação bacteriana

O DNA 16S é muito utilizado para caracterização de bactérias, porque é transcrito no rRNA 16S, material genético presente na subunidade menor do ribossomo procariótico, essencial para a tradução de proteínas. Cada espécie possui uma sequência diferente e sua comparação com um banco de dados com fragmentos conhecidos permite resultados com um valor de confiabilidade maior, associando um *score* (nota atribuída para a quantidade de pareamentos perfeitos e imperfeitos), *gaps* (onde nenhum nucleotídeo foi pareado e inserido um “espaço” para acomodar melhor a sequência) e probabilidade do alinhamento ter ocorrido ao acaso, com valores numéricos (Amaral et al., 2007).

Na figura 13.A podemos observar o fragmento de DNA amplificado na PCR, utilizando como molde o DNA extraído das bactérias, para a cepa DsA.N049, e na figura 12.B, para a cepa DsA.N042. O controle negativo foi o mesmo para ambas as análises, pois foi utilizado o mesmo mix. Podemos concluir que os primers utilizados foram específicos para a sequência de interesse, pois não houve amplificação inespecífica de fragmentos de DNA com tamanhos diferentes, que o tamanho do fragmento de DNA obtido de 1500 pb está correto conforme o esperado e que, pela intensidade das bandas (2), houve a obtenção de quantidades de produto da PCR e, em contrapartida, não houve bandas referentes ao (C), indicando ausência de fragmentos contaminantes.

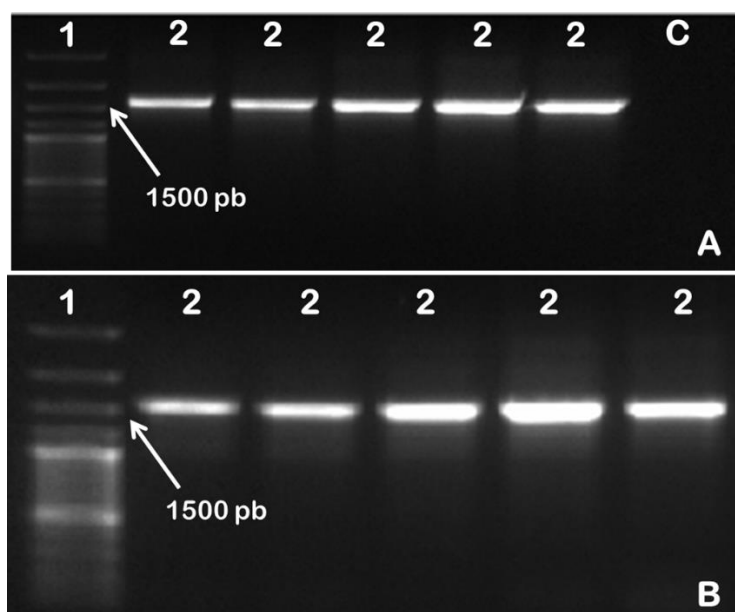


Figura 13 - Gel de agarose com o resultado da amplificação dos fragmentos de rDNA 16S da cepa A) DsA.N042; B) DsA.N049. (1) Padrão de tamanho de fragmentos (pb); (2) Produtos de PCR em quintuplicata; (C) Controle negativo

Os resultados de sequenciamento dos fragmentos de rDNA 16S obtidos para as cepas DsA.N042 e DsA.N049 são parcialmente exemplificados nos eletroferogramas abaixo (Figuras 14 e 15). As sequências dos *contigs* obtiveram 926 e 855 pb para DsA.N042 e DsA.N049, respectivamente. Os eletroferogramas mostram que o sequenciamento teve uma boa resolução dos picos, permitindo identificar com acurácia qual eram as sequências de nucleotídeos (Anexo 1).

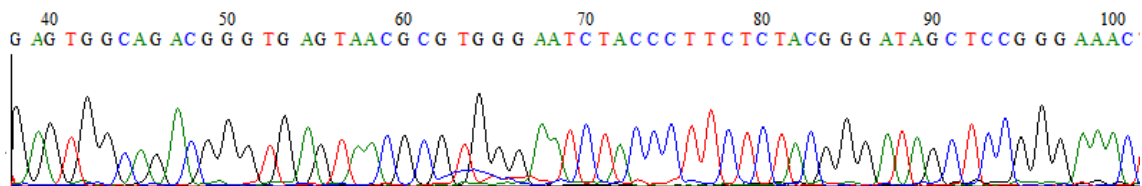


Figura 14 - Eletroferograma parcial correspondente ao sequenciamento da cepa DsA.042.

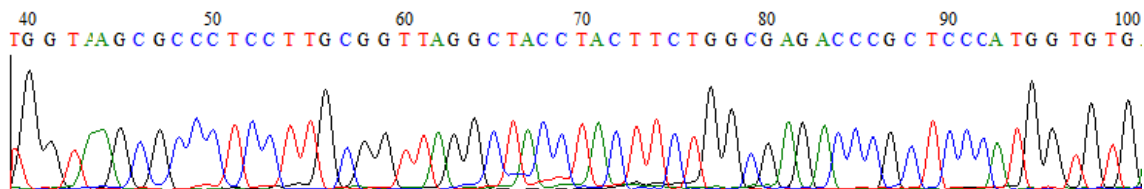


Figura 15 - Eletroferograma parcial correspondente ao sequenciamento da cepa DsA.049.

Uma comparação com a base de dados do GenBank mostrou maior significância de resultados para as espécies *Aureimonas altamirensis* (DsA.042) (número de acesso NCBI - KC581669.1) e *Delftia tsuruhatensis* (DsA.049) (número de acesso NCBI - KY867535.1). Contudo, os resultados não se mostraram conclusivos para determinar as espécies em questão. Para DsA.N042, mais de um número de acesso teve sua sequência alinhada com identidade igual a 97%, sendo em sua grande maioria do gênero *Aureimonas*. Grande parte dos taxonomistas considera que uma similaridade inferior a 97% significa que as sequências se referem a espécies diferentes (Janda, 2007). Ainda assim, valores acima desta porcentagem ainda não demonstram clareza na identificação, uma vez que as variáveis históricas evolutivas das bactérias podem ter influenciado na geração de pequenas modificações nas sequências (Pieretti et al., 2015; Petti, 2007; Drancourt et al, 2000). As identificações a nível de espécies são consideradas confiáveis, em geral, quando as sequências têm limite de identidade superiores a 99,5% (Janda, 2007). Neste caso, através da análise da região 16S rDNA não foi possível identificar a cepa DsA.042 num nível de espécie, apenas seu gênero como pertencente à *Aureimonas* sp. A cepa DsA.N049 apresentou 98% de similaridade com a espécie *Delftia tsuruhatensis*. Contudo, igualmente como ocorrido para a cepa DsA.042, também não foi possível sua identificação a nível de espécie sendo classificada com uma cepa do gênero *Delftia* sp.

Rathsack et al. (2011) propuseram uma reclassificação de algumas espécies do gênero *Aurantimonas* para *Aureimonas*, porque apesar de sua

sequência de nucleotídeos para o gene 16S ser muito similar, elas não possuíam a mesma composição de lipídeos polares e quinonas. A avaliação desse tipo de molécula se faz essencial quando há necessidade de caracterização de novas espécies de bactérias, bem como técnicas de análise de ácidos graxos, conteúdo de guanina-citosina no DNA genômico, análises por microscopia eletrônica de varredura para verificação da morfologia celular, testes de catalase-oxidase e utilização de kits de identificação (API20 (Biomerieux), Bactray (Laborclin), etc), como demonstrado em um levantamento feito entre artigos dessa natureza (Cho et al, 2015; Madhaian et al, 2013; Lin et al, 2013; Teramoto, 2014; Yuan et al. 2014). Além dessas divergências, encontramos também diferentes locais de isolamento dessas bactérias. Os micro-organismos do gênero *Aurantimonas* têm sido isolados de ambientes aquáticos, terrestres ou aéreos, enquanto o gênero *Aureimonas* tem sido mais comumente isolado de ambientes aquáticos salinos (Rathsack et al., 2011).

Acima de 96,5% de similaridade na sequência de rDNA, podemos considerar que as espécies comparadas são do mesmo gênero. Abaixo dessa porcentagem de similaridade, são considerados micro-organismos intergênero, entretanto, esse valor é variável dependendo do gênero em questão (Götz et al., 2006). Quando existem entre 2-3% de diferenças entre as sequências alinhadas, consideramos uma identificação duvidosa, sendo necessários ainda mais experimentos para que os resultados sejam conclusivos (Woo et al., 2009). Para tanto, consideramos que a cepa DsA.N049 corresponde a um micro-organismo pertencente ao gênero *Delftia sp.* e a cepa DsA.N042 ao gênero *Aureimonas sp.* e iniciamos as próximas etapas de identificação das espécies com o delineamento do perfil de ácidos graxos das cepas.

Assim, os dados obtidos até o momento sinalizam que as espécies estudadas ainda não foram classificadas, não havendo relatos na literatura ou no banco de dados.

### **4.3 Análise do perfil de ácidos graxos**

Por muitos anos a análise do perfil de ácidos graxos se tornou uma prática comum de identificação de micro-organismos, principalmente os compostos com cadeias de até 20 átomos de carbono (Sasser, 2001). Visto a enorme quantidade

de moléculas que se enquadram neste grupo, verificando quais delas são produzidas por cada micro-organismo e sua quantidade na porcentagem dos ácidos graxos totais, é possível diferenciar uma espécie da outra, uma vez que a probabilidade de se encontrar um perfil igual para espécies diferentes é estatisticamente improvável (Sasser, 2001).

Para análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa é necessário que essas moléculas passem por uma etapa de derivatização, processo que altera a volatilidade dos componentes lipídicos e melhora a forma do pico, proporcionando melhor separação (Liu, 1994). O método mais disseminado de derivatização para esta classe de biomoléculas é a conversão dos ácidos graxos em ésteres correspondentes, em geral, metil ésteres, pelo processo de transesterificação (Brondz, 2002) (Figura 16).

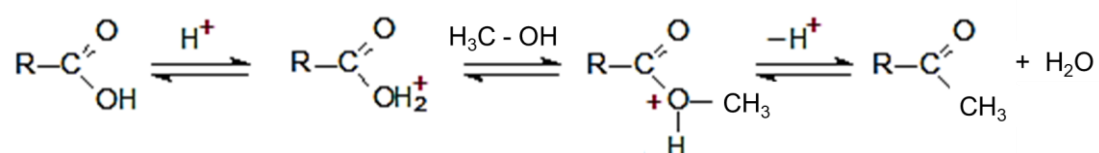


Figura 16 - Esquema geral de transesterificação de ácidos graxos em meio ácido e a transferência de um grupo metila oriundo do metanol (Adaptado de Brondz, 2002).

Os ácidos graxos são constituintes de componentes principais da estrutura celular, na forma de lipopolissacarídeos, lipoproteínas, e triglicerídeos, que não são alterados conforme o meio de cultivo é variado, uma vez que a funcionalidade da membrana, de proteção e transporte seletivo se mantem os mesmos (Brondz, 2002). Graças a isso, a análise de ácidos graxos tem sido amplamente usada na identificação de micro-organismos, pela maior parte dos trabalhos de descrição de espécies (Mehnaz et al., 2007; Weon et al., 2007; Zhang and Dong, 2009).

Os resultados obtidos para os perfis químicos dos ácidos graxos (os espectros de massa para cada éster derivado do ácido graxo podem ser encontrados no Anexo 2) dos micro-organismos em estudo estão demonstrados nas Tabelas 4 e 5. *Delftia* sp. apresentou uma maior variedade de moléculas de ácidos graxos (Figura 17), sendo encontrados um total de 15 compostos, e apenas 10 em *Aureimonas* sp. (Figura 18). As moléculas de ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0) foram as mais abundantes, muito comumente

encontrados em bactérias (Bronz, 2002), sendo correspondentes a aproximadamente 93 e 83% (m/m) do total de ácidos graxos de *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp., respectivamente.

Tabela 4 - Perfil de ácidos graxos encontrados para *Delftia* sp. após análise por CG-EM/EM.

<b><i>Delftia</i> sp.</b>				
Número do pico correspondente	Molécula (ácido graxo)	Características/fórmula molecular	Tempo de retenção (min)	Área <sup>a</sup> (% m/m)
1	Heptanoico	C7:0 (C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> )	3,359	0,09
2	Caprílico	C8:0 (C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> )	4,182	0,10
3	Pelargônico	C9:0 (C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> )	5,148	0,14
4	Láurico	C12:0 (C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> )	11,137	0,26
5	Azeláico	C9:0 (C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> )	11,873	0,32
6	Sebáico	C10:0 (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> )	14,840	0,54
7	Mirístico	C14:0 (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )	17,009	1,19
8	Pentadecanoico	C15:0 (C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> )	19,824	0,22
9	Palmítico	C16:0 (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	22,511	40,4
10	Margárico	C17:0 (C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	25,054	0,48
11	Linonelaídico	C18:2 (trans-9,trans-12) ω6 (C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	26,718	0,20
12	Elaidico	C18:1 (trans-9)ω9 (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	26,862	3,40
13	Oléico	C18:1 (9)ω9 (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	27,008	0,43
14	Esteárico	C18:0 (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	27,482	51,9
15	Eicosanoico	C20:0 (C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> )	31,998	0,31

<sup>a</sup> % em relação a área total de ácidos graxos presentes

Os ácidos graxos que contém menos de 12 átomos de carbono em sua composição foram encontrados em proporções menores do que as moléculas que possuíam mais átomos de carbono sendo 1,45 e 1,49% (m/m) em *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp., respectivamente. Estes valores estão de acordo com a

maioria das bactérias (O'Leary, 1962). Um total de 80 e 60% dos ácidos graxos encontradas em *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp., respectivamente, eram saturados.

A maior parte dos ácidos graxos encontrados para *Delftia* sp. não foram descritos por Shigematsu et al. (2003) em seu trabalho descrevendo *Delftia tsuruhatensis* (proposta para DsA.049). O maior conteúdo de ácido palmítico foi compatível, porém em proporções diferentes sendo 33,2% sugerida por Shigematsu et al. (2003) e 40,4% do presente estudo do total (m/m) de metil ésteres de ácidos graxos encontrados. O segundo ácido graxo mais abundante (C16:1) na descrição da espécie não foi encontrado nas amostras de *Delftia* sp., assim como o ácido esteárico não foi detectado em Shigematsu et al. (2003). Além disso, foram identificados no presente trabalho os ácidos sebácico (C10:0), láurico (C12:0), mirístico (C14:0), pentadecanoico (C15:0) e margárico (C17:0) em quantidades significativas, ainda não reportados na literatura para essa espécie.



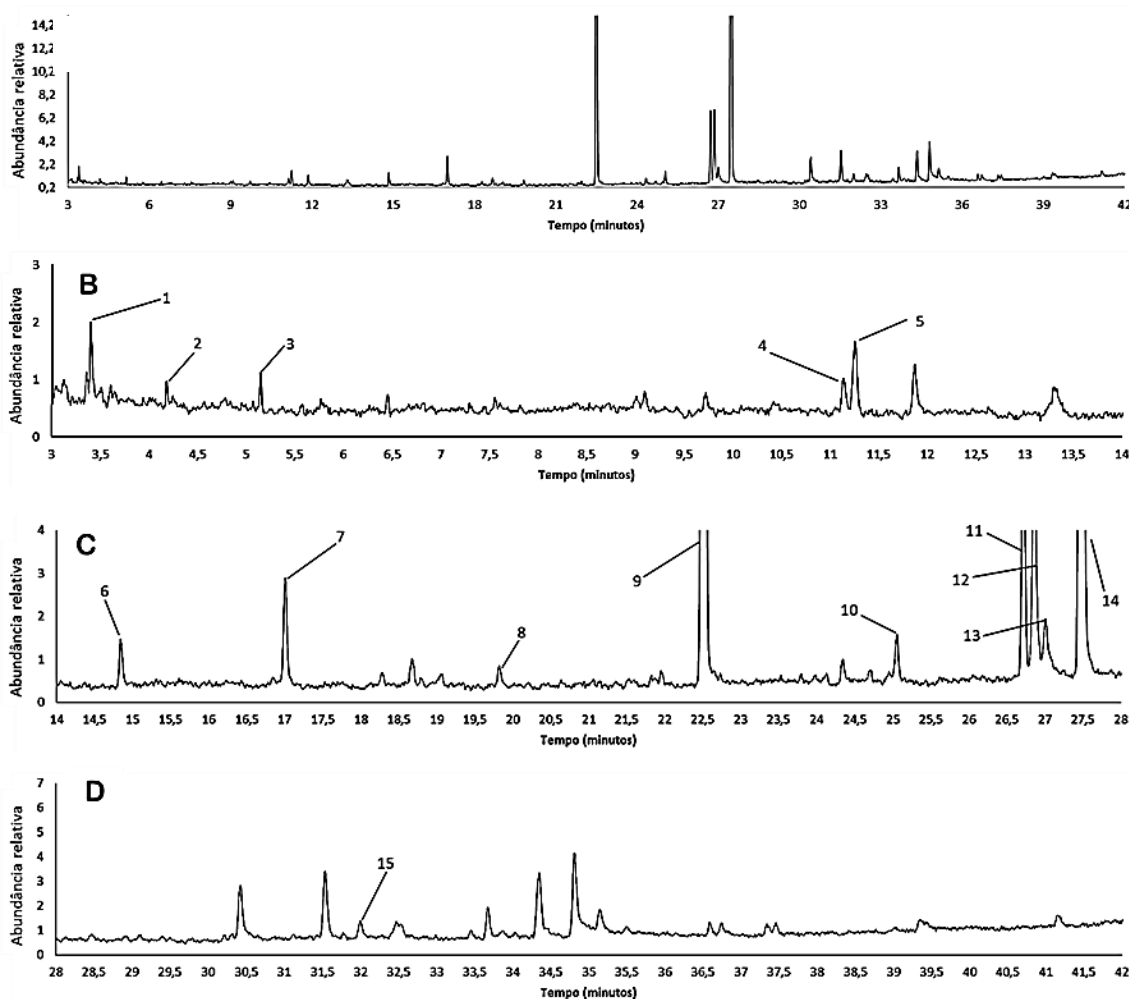


Figura 17 - Cromatograma total referente ao perfil de ácidos graxos encontrados para *Delftia* sp. A) Cromatograma de íons totais; B) Ampliação da região entre 3 e 14 min; C) Ampliação da região entre 14 e 28 min; D) Ampliação da região entre 28 e 42 min. Ácidos correspondentes aos picos: 1- ácido heptanoico; 2- ácido caprílico; 3- ácido pelargônico; 4- ácido láurico; 5- ácido azelaico; 6- ácido sebácico; 7- ácido mirístico; 8- ácido pentadecanoico; 9- ácido palmítico; 10- ácido margárico; 11- ácido linolelaídico; 12- ácido elaidico; 13- ácido oleico; 14- ácido esteárico; 15- ácido eicosanoico.

Na descrição de *Aureimonas altamirensis* (proposta para DsA.042) realizada por Jurado et al. (2006), as principais moléculas encontradas foram do ácido *cis*-7-octadecenoico (C18:1 $\omega$ 7c), correspondente a 74,4% (m/m) do total, e de ácido palmítico (C16:0), com valor de 11,3% (m/m). Esses números divergem quanto aos encontrados pelas análises realizadas neste estudo, principalmente a respeito do ácido esteárico, predominante nas amostras com quase metade da porcentagem total de ácidos graxos e correspondente a 0,7% do encontrado por Jurado et al. (2006). A molécula de ácido *cis*-7-octadecenoico não foi encontrada para a para DsA.042; os ácidos elaidico e *trans*-vacênico, iguais ao C18:1 $\omega$ 7c em número de carbonos e insaturações, mas diferentes na

posição da insaturação e na geometria espacial, tiveram uma representatividade significativa. Os ácidos graxos com cadeia menor que 16 átomos de carbono também não foram encontrados na descrição da espécie publicada por Jurado et al. (2006). Além disso, no presente estudo, pode-se notar a presença de ácidos graxos C9, C10 e C14.

Assim, os padrões de ácidos graxos totais das cepas de bactérias estudadas corroboram com os resultados obtidos pela análise do gene 16S do rDNA, propondo serem novas espécies ainda não reportadas na literatura.

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos encontrados para *Aureimonas sp.* após análise por CG-EM/EM.

<b><i>Aureimonas sp.</i></b>				
Número do pico correspondente	Molécula (ácido graxo)	Características/ fórmula molecular	Tempo de retenção (min)	Área <sup>a</sup> (% m/m)
1	Azeláico	C9:0 (C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> )	11,864	1,11
2	Sebácico	C10:0 (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> )	14,844	0,38
3	Mirístico	C14:0 (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )	17,000	1,59
4	Palmítico	C16:0 (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	22,504	39,8
5	Margárico	C17:0 (C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	25,054	0,61
6	Linoleico	C18:2 (9,12) ω6 (C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	26,716	0,29
7	Elaidico	C18:1 (trans-9)ω9 (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	26,855	2,01
8	Trans-vacênico	C18:1 (trans-11)ω7 (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	26,995	10,2
9	Estearico	C18:0 (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	27,475	42,7
10	Oleico	C18:1 (9)ω9 (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	37,376	1,24

<sup>a</sup> % em relação a área total de ácidos graxos presentes;

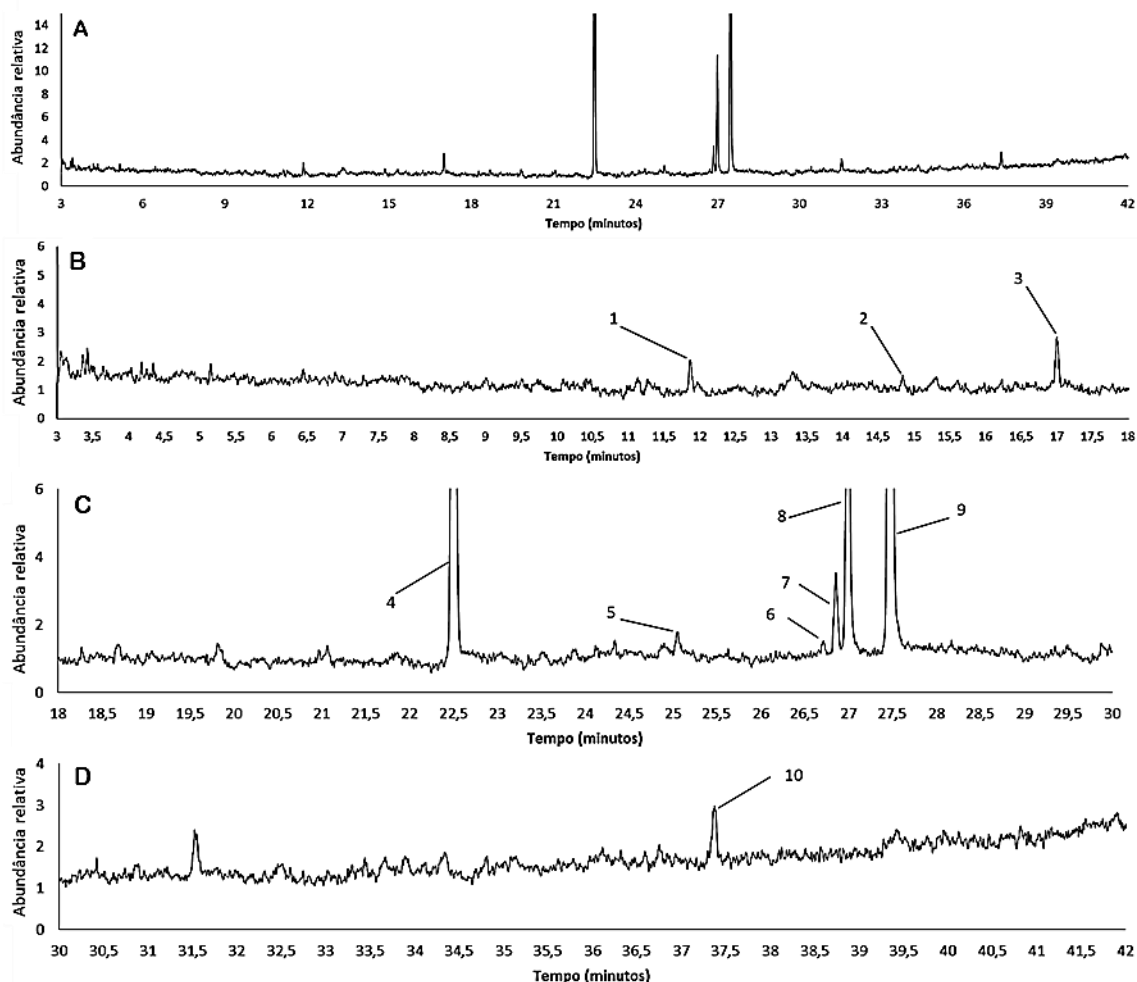


Figura 18 - Cromatograma referente ao perfil de ácidos graxos encontrados para *Aureimonas sp.* A) Cromatograma de íons totais; B) Ampliação da região entre 3 e 18 min; C) Ampliação da região entre 18 e 30 min; D) Ampliação da região entre 30 e 42 min. Ácidos correspondentes aos picos: 1- ácido azelaico; 2- ácido sebáico; 3- ácido mirístico; 4- ácido palmítico; 5- ácido margárico; 6- ácido linoleico; 7- ácido eláidico; 8- ácido trans-vacênico; 9- ácido esteárico; 10- ácido oleico.

## 4.4 Análise da produção de polímeros

### 4.4.1 Produção de biopolímeros

O acúmulo de polímero (ou outras moléculas de reserva) se dá quando a célula sofre um período de estresse, em geral, devido ao desbalanço de nutrientes (Thomson et al., 2010). Com a limitação de compostos contendo fósforo ou nitrogênio, a produção de algumas macromoléculas essenciais para o crescimento celular, como os ácidos nucleicos e enzimas, podem ser suprimidas, e ao mesmo tempo, se adicionada uma fonte de carbono em

excesso, é possível estimular a célula a produzir e armazenar moléculas como reserva energética (Dias et al., 2006). Na figura 19 estão demonstradas as etapas realizadas desde a produção dos biopolímeros em batelada até a sua extração/ derivatização para análise em CG-EM/EM para *Aureimonas* sp. crescida em meio de cultivo contendo soro de leite em diferentes proporções e o meio de cultivo controle.

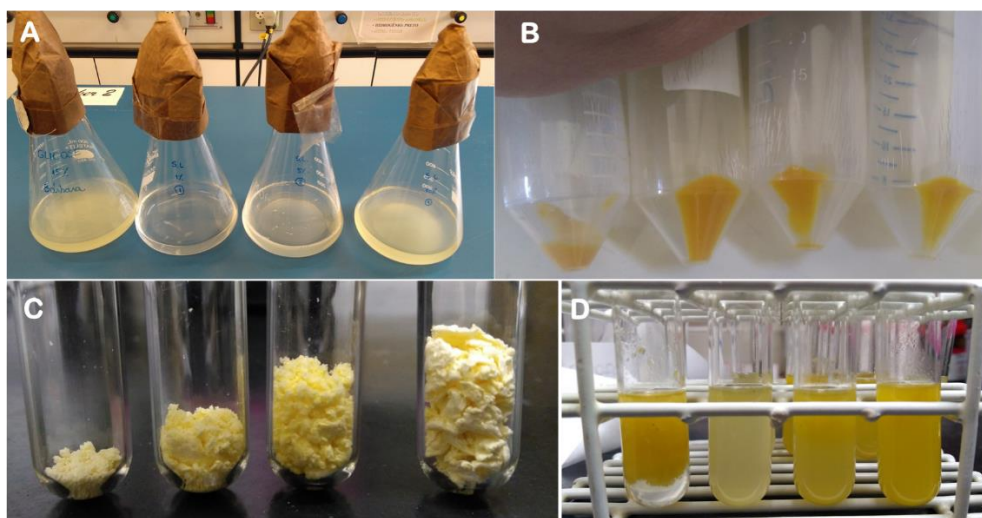


Figura 19 - Etapas de obtenção de biopolímeros para *Aureimonas* sp. crescida em soro de leite. A) Erlenmeyers utilizados para o crescimento em batelada após o crescimento celular; B) células precipitadas após centrifugação; C) células liofilizadas (0,1%, 0,5%, 1,0% e 2,0%); D) tubos de ensaio contendo células e meio reacional após a derivatização.

Os dados obtidos após a pesagem da massa seca celular e a massa de polímeros estão dispostos na tabela 6. Para *Aureimonas* sp., podemos notar claramente que a variação da quantidade de glicerol influenciou no crescimento celular (Figura 20). O ápice do crescimento foi indicado com 1,0% de glicerol (v/v), porém apesar da maior massa, não foi o parâmetro que obteve a maior recuperação de polímero (em porcentagem m/m). Analisando o padrão de crescimento demonstrado, é possível notar que o crescimento celular foi aumentando até a proporção de 1,0% (v/v), indicando que existe uma quantidade ótima de fonte de carbono necessária para o desenvolvimento celular. Entretanto, acima de 2,0% (v/v) houve uma diminuição do crescimento, quando comparada às proporções menores de carbono, afetando em seu desenvolvimento. Em 6,0% (v/v), a concentração foi alta o suficiente para interferir tanto no crescimento celular quanto na produção de biopolímero, que não foi identificada nessa condição.

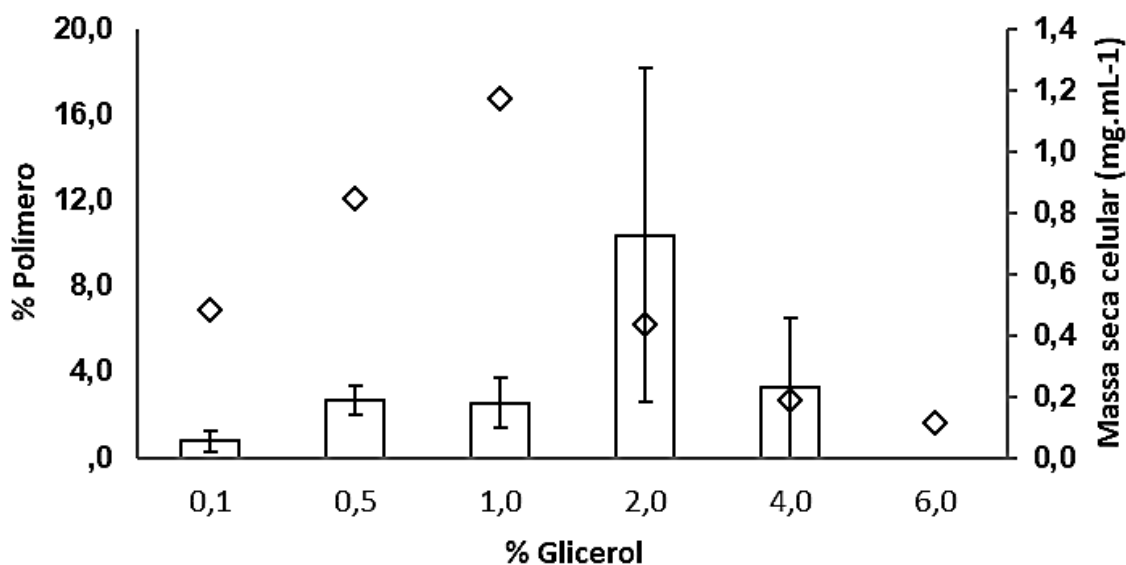


Figura 20 - Gráfico combinado de variação de rendimento de biopolímero (colunas) e massa seca celular (marcadores de dispersão) por concentração de glicerol (%) para *Aureimonas sp.*

Apesar de não possuir o melhor valor de *CDW*, a concentração de 2,0% mostrou o melhor acúmulo de polímero para a proporção de massa seca, sendo uma quantidade em excesso para o consumo celular, indicando uma condição que interferiu no crescimento, mas suficiente para induzir a célula a produzir mais compostos de reserva energética, que são o foco desse estudo. Após análises (Anexo 4), a média dos resultados encontrados para a concentração 2,0% e 4,0% de glicerol não obtiveram diferença estatística significativa.

O glicerol pode atravessar a membrana celular por meio da difusão passiva, pois estas possuem uma alta permeabilidade intrínseca por esse soluto (Fu et al., 2000). Entretanto, as células que possuem apenas esse tipo de transporte para o glicerol apresentam uma desvantagem de crescimento quando em baixas concentrações deste substrato (da Silva et al., 2009). Assim, alguns micro-organismos realizam o *uptake* de glicerol por difusão facilitada, mediada por uma proteína transmembrana integral (*GlpF* – *glycerol facilitator*), estudada principalmente em *Escherichia coli* (Heller et al., 1980; Fu et al., 2000). A taxa de influxo máxima dessa fonte de carbono pela *GlpF* é de 200 mmol.L<sup>-1</sup> (Fu et al., 2000). O glicerol intracelular é posteriormente convertido em glicerol 3-fosfato pela enzima glicerol quinase, permanecendo aprisionado dentro da célula até que seja metabolizado (da Silva et al., 2009). Esta quinase e a proteína transmembrana são codificadas pelo mesmo *operon*, desta forma, o *turnover* (o valor máximo de reações enzimáticas catalisadas por segundo) do glicerol

quinase é considerado o mesmo que a taxa de influxo de glicerol, segundo dados de Heller et al. (1980), ou seja, 200 moléculas de glicerol fosforiladas por segundo, por enzima. A etapa seguinte do metabolismo é dada pela oxidação de glicerol-3-fosfato pela enzima glicerol oxidase, formando dihidroxiacetona-fosfato (DHAP). Essa enzima sofre inibição pelo produto (os produtos da reação são peróxido de hidrogênio e DHAP) e quando em concentrações aproximadas de  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ , mantém sua atividade em apenas 20%, contudo, esses valores podem variar entre os micro-organismos (Schümperli et al., 2007).

No presente estudo, as maiores concentrações de glicerol adicionadas foram de  $109 \text{ mmol.L}^{-1}$  (4,0%) e  $163 \text{ mmol.L}^{-1}$  (6,0%). Para 4,0% (v/v), a concentração está próxima aos  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  (considerando a conversão completa do glicerol em DHAP), o que corrobora com os resultados de Schumperli et al. (2007), de que há inibição pelo produto gerado por meio da oxidação, mas ainda é notada a recuperação de biopolímero. Já em 6,0%, conclui-se que houve inibição total do glicerol oxidase, pela ausência de PHAs.

O soro de leite, sendo uma matriz complexa, não nos permite adicionar proporções conhecidas e exatas dos nutrientes. Dessa forma, podemos variar as proporções totais dos nutrientes no meio de crescimento, adicionando volumes conhecidos dessa fonte. *Aureimonas* sp. teve uma boa adaptação ao meio contendo soro de leite, demonstrando crescimento celular maior conforme a quantidade de soro disponível. Apesar disso, só foram notadas quantidades de acúmulo de PHAs com 5,0 e 10% (v/v) da quantidade de nutrientes no meio de cultivo (não foi possível verificar a massa nos experimentos de 5,0%). O CDW encontrado foi menor que o obtido para quase todas as concentrações de glicerol, exceto pelo meio que continha a maior quantidade de soro adicionado.

*Delftia* sp. (Tabela 6) apresentou acúmulo de biopolímero na condição que continha maior concentração de glicerol (6,0% v/v), o que nos leva a propor que é a quantidade mínima em excesso que a célula precisa para que seja estimulada a produzir moléculas de reserva energética.

Tabela 6 - Valores quantitativos de produção de PHAs utilizando fontes de carbono alternativas por *Aureimonas sp.* e *Delftia sp.*

Micro-organismo	Substrato	v/v	CDW (mg.mL <sup>-1</sup> )	% de polímero
<i>Aureimonas sp.</i>	Glicerol	0,1%	0,484 ± 0,153	0,778 ± 0,495
		0,5%	0,843 ± 0,040	2,669 ± 0,668
		1,0%	1,170 ± 0,145	2,545 ± 1,175
		2,0%	0,437 ± 0,011	10,37 ± 7,802
		4,0%	0,186 ± 0,065	3,254 ± 3,253
		6,0%	0,112 ± 0,008	N.D.
	Soro de leite	1,0%	0,042 ± 0,013	N.D.
		5,0%	0,107 ± 0,004	N.D.
		10,0%	0,214 ± 0,008	8,655 ± 4,022
	<i>Delftia sp.</i>	Glicerol	2,0%	0,176 ± 0,038
4,0%			0,824 ± 0,345	N.D.
6,0%			1,879 ± 0,170	2,988 ± 0,327
Soro de leite		1,0%	0,063 ± 0,009	*
		5,0%	0,230 ± 0,014	*
		20,0%	0,996 ± 0,040	*
		40,0%	2,051 ± 0,019	*
Controle (dextrose, acetato de sódio e extrato de levedura)		Padrão	0,163 ± 0,007	*
		Sem acetato	N.D.	N.D.
		Sem dextrose	0,233 ± 0,003	*

\*quantificação feita por cromatografia gasosa

O desenvolvimento celular foi crescente conforme uma maior quantidade de fonte de carbono era adicionada ao meio (Figura 21.A). Ainda na tabela 6 são encontrados os valores de massa seca celular obtidas para as quatro concentrações de soro de leite para *Delftia sp.* Foi observado um crescimento linear na massa, proporcional à quantidade de nutriente adicionada, ou seja, quanto maior a quantidade de soro, maior o peso seco celular (Figura 21.B).

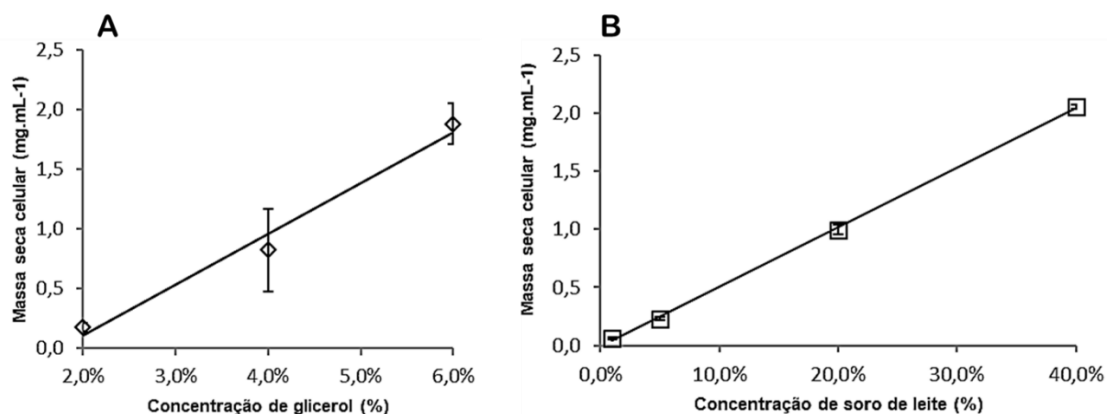


Figura 21 - Variação de rendimento de massa celular seca (mg.mL<sup>-1</sup>) vs. concentração de nutrientes (%) (v/v) para a cepa *Delftia sp.* A) Glicerol; B) Soro de leite.

As literaturas que descrevem o uso do soro de leite/soro de queijo para a produção de biopolímeros propõe modificações no soro, como o enriquecimento dessa fonte de nutrientes (Bosco and Chiampo, 2010; Colombo et al., 2016), etapas para precipitação de proteínas (Berwig et al., 2016) e acréscimo de sais (Pais et al., 2014; Pantazaki et al., 2009). Para a obtenção de PHAs de *Aureimonas sp.* e *Delftia sp.*, o meio de cultivo para o crescimento continha apenas água destilada e soro de leite filtrado, diminuindo assim o custo da produção proveniente da fonte de nutrientes, viabilizando o processo. Grande parte dos estudos que empregam glicerol ou resíduos como fonte de carbono adicionam quantidades de precursores para a produção de biopolímeros, como ácido propiônico, ácido valérico,  $\gamma$ -butirolactona e ácidos graxos de cadeia curta (Cavalheiro et al., 2012; de Paula et al., 2017; Khanna and Srivastava, 2007; Lemos et al., 2006; Moorkoth and Nampoothiri, 2016). *Delftia sp.* e *Aureimonas sp.* foram capazes de sintetizar estas biomoléculas sem a necessidade da adição de precursores, mais uma vez comprovando a viabilidade em se utilizar essas cepas na produção de PHAs.

Outra avaliação foi feita, modificando-se os componentes do meio de cultivo controle. Mantendo a quantidade da fonte de nitrogênio (extrato de levedura), foram variadas as quantidades de dextrose e acetato de sódio (apenas acetato de sódio e apenas dextrose), para identificar qual das fontes era a primordial para a produção de biopolímeros. Foi observado crescimento celular no controle padrão e sem dextrose (Tabela 6), entretanto não houve crescimento



celular no meio de cultivo com apenas dextrose como fonte de carbono. Sendo assim, buscamos um tratamento com a mesma quantidade de acetato de sódio e extrato de levedura, substituindo a dextrose pela mesma concentração (v/v) de glicerol, porém também não foi notado crescimento celular nessas condições.

Pela dificuldade na pesagem de polímero extraída/recuperada, notou-se a necessidade de quantificar os PHAs por métodos mais sensíveis, lançando mão da construção de uma curva de calibração utilizando o padrão de monômeros de 3-hidroxi-butirato de metila, que será discutida na seção 4.7.

#### **4.5 Caracterização cromatográfica dos biopolímeros biossintetizados**

As figuras 22 e 23 ilustram o perfil de monômeros nos cromatogramas das amostras extraídas dos micro-organismos em investigação. Na figura 24 está ilustrado o espectro de massas e a proposta de fragmentação para caracterização estrutural do monômero esterificado de polihidroxi-butirato. Para otimização da separação cromatográfica, inicialmente, foi explorado o método de injeção começando com a temperatura de 60°C e o tempo de retenção para o monômero metil-3-hidroxi-butirato foi de 3,78 min (Figura 22). As análises para *Aureimonas* sp. foram executadas nesse parâmetro. Na figura 22 podemos visualizar os picos correspondentes ao monômero de 4 átomos de carbono, correspondentes ao monômero esterificado de polihidroxi-butirato produzido por *Aureimonas* sp. nas concentrações de 0,1%, 0,5% e 1,0% de glicerol.

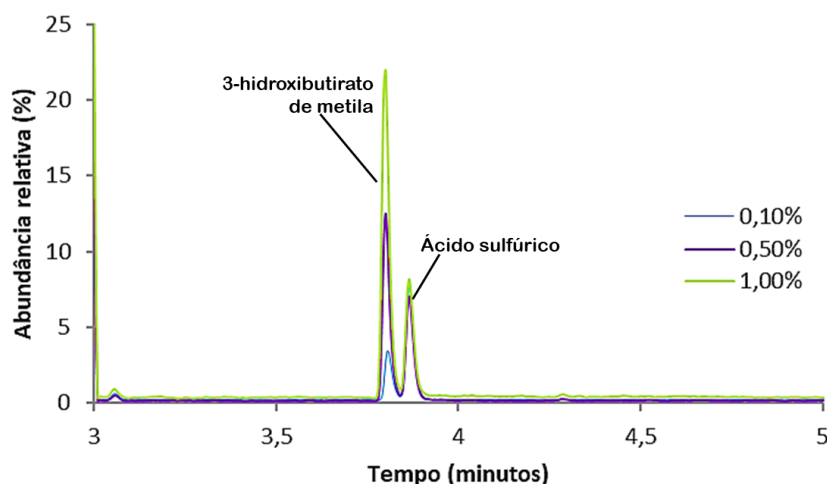


Figura 22 - Ampliação da região entre 3 e 5 min dos cromatogramas obtidos após análise de cromatografia gasosa dos monômeros presentes nos polímeros produzidos por *Aureimonas sp.* utilizando glicerol como fonte de carbono nas concentrações 0,1% (em azul), 0,5% (em roxo) e 1,0% (em verde) (v/v) destacando a produção de 3- hidroxiacetato de metila ( $t_R = 3,78$ ). As condições analíticas podem ser encontradas no item 3.4.2.2.

Apesar de visualizada a presença do polímero à 60°C, foi observado que a temperaturas iniciais menores, o cromatograma apresentava uma melhor resolução entre os tempos de retenção dos compostos em análise. Assim, foi adotada a temperatura de 40°C, que aumentou o tempo de retenção do 3-hidroxiacetato de metila para 5,59 min (Figura 23).

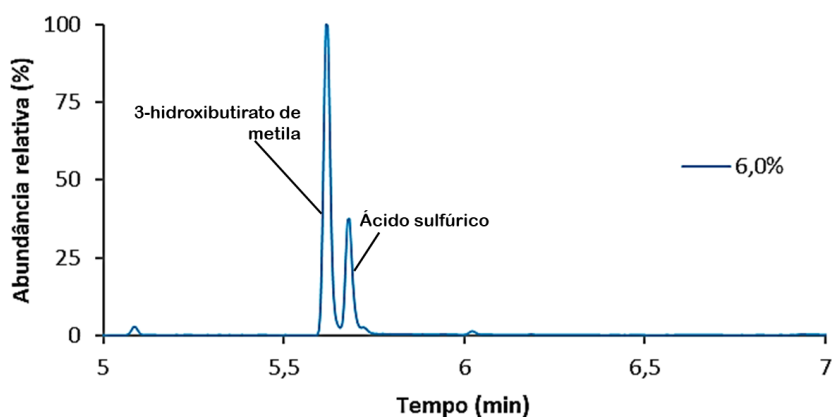


Figura 23 - Ampliação da região entre 3 e 5 min do cromatograma obtido após análise de cromatografia gasosa dos monômeros presentes nos polímeros produzidos por *Delftia sp.* utilizando glicerol (6,0% v/v) como fonte de carbono, destacando a produção de 3-hidroxiacetato de metila ( $t_R = 5,59$ ).

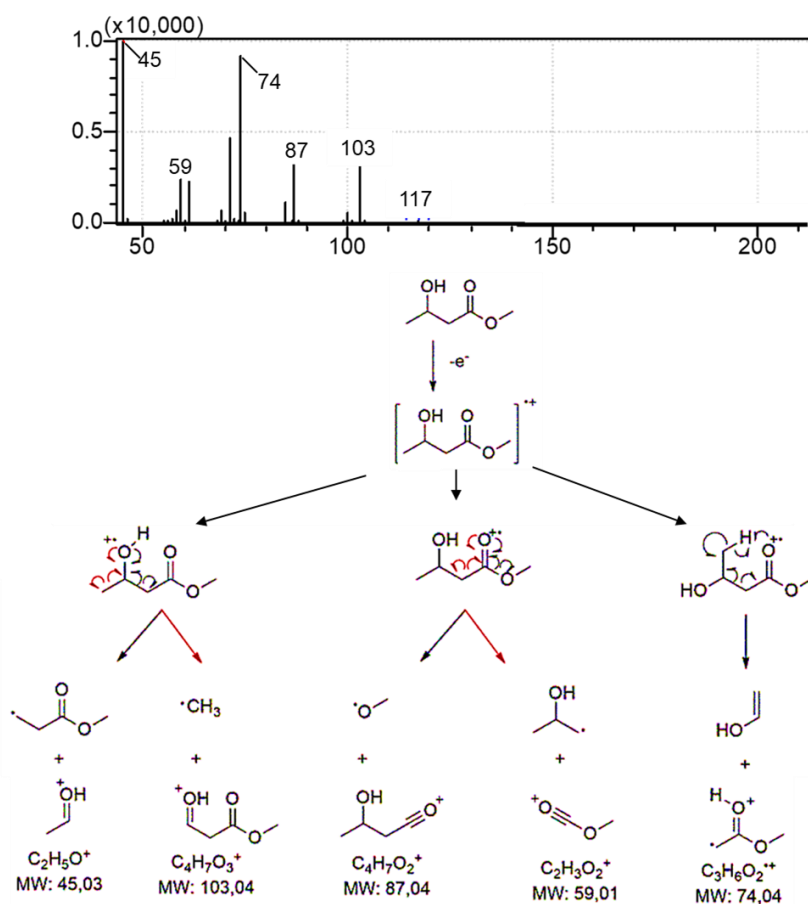


Figura 24 - Proposta de fragmentação e espectro de massas correspondente ao monômero de 3-hidroxibutirato de metila. (Adaptado de Perlatti, 2016)

A utilização de soro como fonte de carbono também produziu resultados satisfatórios para *Delftia* sp, com considerável produção de biopolímeros (Figura 25). Os resultados sobre a quantificação estão descritos no item 4.7. Pela grande quantidade de massa celular, foi possível também observar a presença de ácidos graxos na matriz, sendo o maior pico o de ácido palmítico ( $t_R = 14,29$ ).

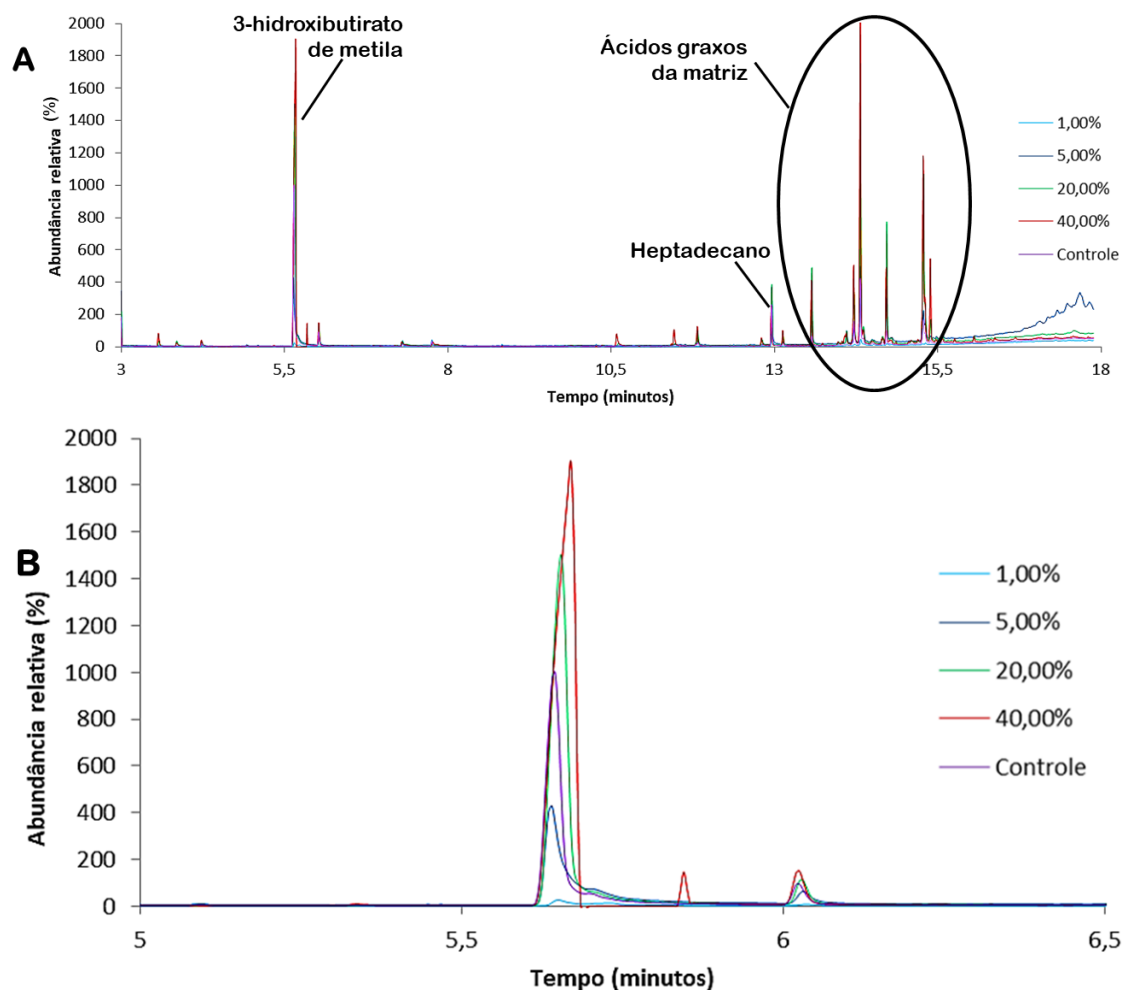


Figura 25 - Cromatogramas obtidos após análise de cromatografia gasosa dos monômeros presentes nos polímeros produzidos por *Delftia sp.* utilizando soro de leite (1,0%, 5,0%, 20,0% e 40,0% (v/v)) como fonte de carbono. A) Cromatogramas completos, diferenciando a quantidade de nutrientes adicionada pela cor da linha do gráfico (1,0% - azul claro; 5,0% - azul escuro; 20,0% - verde; 40,0% - vermelho; controle - roxo). O padrão de heptadecano ( $t_R = 12,94$ ) é indicado pela seta, assim como a variedade de ácidos graxos encontrados na matriz. B) Ampliação da região entre 5 e 6,5 min dos cromatogramas, destacando a produção de 3-hidroxibutirato de metila ( $t_R = 5,59$ ).

#### 4.6 Desenvolvimento do método quantitativo e sua validação analítica

A validação analítica foi considerada indispensável para o método quantitativo do produto de interesse garantindo que o valor a ser quantificado é real, ou seja, se houver a presença de algum interferente que influencie na análise ou resposta ao detector, ele deve ser previamente constatado para que as análises seguintes não encontrem um falso-positivo.

#### 4.6.1 Seletividade

Com a validação se objetiva demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito, avaliando a relação entre os as questões que o método deveria responder e os resultados experimentais obtidos (Brito et al., 2003; Walsh, 1999).

A seletividade busca garantir que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse, sem interferente de outras impurezas (Ribani et al., 2004; Vessman et al., 2001). Para cumprir tal requisito, uma amostra isenta do analito de interesse (um branco) deve ser analisada nos mesmos parâmetros das amostras contendo o analito, para a verificação de algum composto que possa ter o mesmo tempo de retenção e influencie na análise.

Comparando uma amostra controle, preparada com o meio de cultivo de caldo nutriente, com as amostras de cultivo para produção do biopolímero não foi observado nenhum composto interferente no tempo de retenção 5,59 min, referente ao 3-hidroxibutirato de metila sob os parâmetros operacionais de análise, previamente definidos. A Figura 26 ilustra o cromatograma da amostra controle onde se pode observar que não houve nenhum pico correspondente ao tempo de retenção do monômero de 3-hidroxibutirato de metila ( $t_R = 5,59$ ) e do padrão interno heptadecano ( $t_R = 12,94$ ), demonstrando que o método analítico foi seletivo para o composto de interesse a ser analisado. Os picos em  $t_R = 14,21$  min e  $t_R = 14,29$  min são ácidos graxos provenientes da matriz. Na figura 27 é ilustrado um cromatograma referente à amostra onde houve produção de PHB.

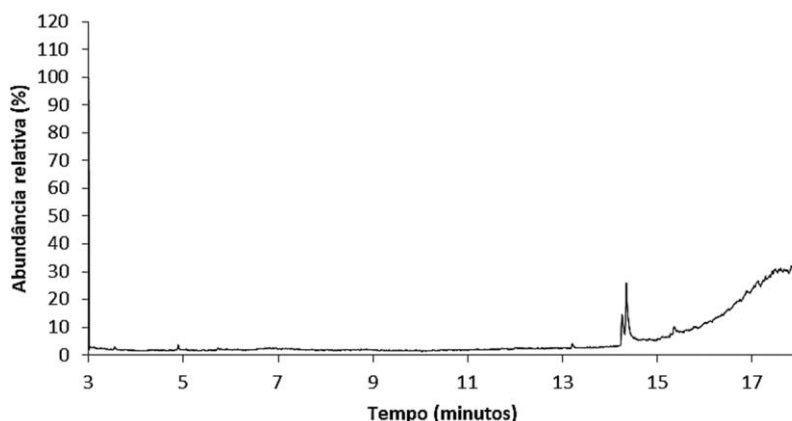


Figura 26 - Cromatograma referente à amostra controle, evidenciando a ausência de picos da matriz ausente do analito em 5,59 min e de padrão interno em 12,94 min.

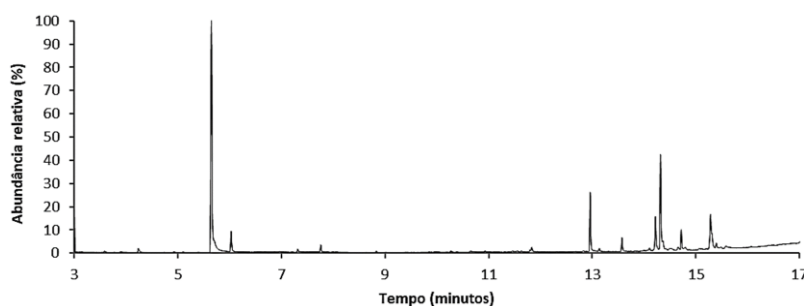


Figura 27 - Cromatograma referente à amostra contendo o analito 3-hidroxiburirato de metila em 5,59 min e o padrão interno em 12,94 min.

#### 4.6.2 Faixa linear de trabalho e avaliação do efeito de matriz

A cromatografia gasosa é uma ferramenta avançada na identificação e quantificação de compostos, porém a sua susceptibilidade aos efeitos de matriz pode afetar a quantificação do composto de interesse quando a amostra em questão é complexa (Kwon et al., 2012). Moléculas da matriz extraídas juntamente com o analito de interesse, como pigmentos, lipídeos e outros componentes de alto peso molecular, podem permanecer solubilizados nos extratos orgânicos e serem responsáveis pelo efeito de matriz durante a análise cromatográfica (Prestes et al., 2009).

Moléculas interferentes podem influenciar na resposta obtida para o analito por sua interação em diferentes partes do sistema cromatográfico, como o injetor, a coluna e o detector. No injetor, a principal interação possível de ocorrer é com os sítios ativos do *liner* (De Sousa et al., 2013). Na coluna, a diminuição da resposta induzida pela matriz pode acontecer quando seus

componentes se acumulam no sistema cromatográfico, competindo com o analito de interesse pelo sítio ativo, modificando significativamente os sinais obtidos entre uma solução padrão contida em solvente puro e em extratos (controle) da matriz (Garrido Frenich et al., 2009). Outra explicação pode ser dada pela co-eluição de componentes que afetam a ionização do analito alvo, provocando a supressão ou o aumento do sinal analítico (Chambers et al., 2007).

Assim, o pré-tratamento (*clean-up*) das amostras é a primeira etapa do método indicado para sanar problemas relacionados ao efeito de matriz, podendo ser retirado grande parte das impurezas que podem interferir nas análises cromatográficas (De Sousa et al., 2013; Lambropoulou and Albanis, 2007). Apesar disso, nem sempre as etapas de pré-tratamento são suficientes para suprir essa dificuldade. Sendo assim, uma possibilidade indicada é a execução do método de superposição de matriz ("*matrix-matched*"), que consiste na adição do padrão do analito de interesse em uma matriz similar à da amostra, porém isenta do composto alvo, em diferentes concentrações, para a construção da curva de calibração que relacione as áreas obtidas pela integração dos picos dos cromatogramas do padrão com as áreas referentes às amostras de interesse a serem quantificadas (Ribani et al., 2004).

Em geral, o efeito de matriz é observado pela resposta à razão entre o coeficiente angular obtido para a curva na matriz e no solvente, pois a diferença entre os coeficientes lineares pode acontecer devido ao aumento da linha de base com a perda de sensibilidade analítica, não necessariamente pela influência quantitativa dos componentes da matriz (De Sousa et al., 2013). Se a razão entre os coeficientes angulares for igual a zero, o efeito de matriz não existe. Se o valor for maior ou menor que 1, a matriz induz um aumento ou redução da resposta do detector, respectivamente (Zhou et al., 2017). Entretanto, existe uma margem para considerar essa influência. Quando expresso em porcentagem, valores abaixo de 10% na razão entre os coeficientes angulares não são considerados como efeito de matriz estando geralmente dentro da faixa de incerteza analítica (Lambropoulou and Albanis, 2002).

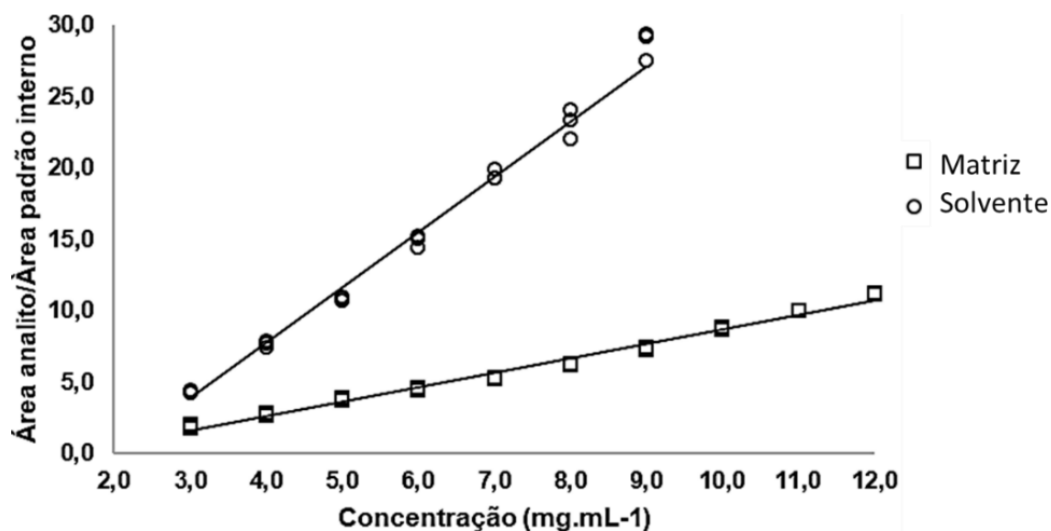


Figura 28 - Comparação das curvas de calibração construídas utilizando solvente puro (clorofórmio) e matriz, relacionando a concentração de analito com a razão das áreas obtidas pela integração dos picos do analito e do padrão interno.

Neste estudo foi possível observar que as curvas não são paralelas, demonstrando que existe um efeito de matriz que suprime a resposta ao detector em maiores concentrações do analito (Figura 28). Para tanto, a faixa de avaliação necessária para a análise na matriz variou entre 3,0 e 12 mg.mL<sup>-1</sup> para compreender os valores das razões área do analito/ área do padrão interno das amostras bacterianas de produção de biopolímeros. As razões das áreas do analito/padrão interno estão demonstradas nas tabelas 7.A e 7.B.



Tabela 7 - Concentração do padrão 3-hidroxi-butirato de metila, razão entre as áreas do analito e do padrão interno, coeficiente de variação (CV%) e exatidão (%) das curvas de calibração. A) Em clorofórmio; B) Na matriz.

<b>A - Solvente puro (clorofórmio)</b>					
	Razão área analito/área padrão interno				
Concentração de 3-hidroxi-butirato de metila (mg.mL <sup>-1</sup> )	R1	R2	R3	CV(%)	Exatidão (%)
3,0	1,79	1,91	2,00	2,67	106,66
4,0	2,65	2,80	2,65	2,94	100,96
5,0	3,83	3,71	3,85	1,26	96,49
6,0	4,44	4,44	4,61	2,84	97,17
7,0	5,25	5,32	5,25	1,69	99,60
8,0	6,23	6,31	6,22	4,45	98,47
9,0	7,39	7,26	7,42	3,61	102,86

<b>B - Matriz</b>					
	Razão área analito/ área padrão interno				
Concentração de 3-hidroxi-butirato de metila (mg.mL <sup>-1</sup> )	A1	A2	A3	CV(%)	Exatidão (%)
3,0	1,79	1,91	2,00	5,57	111,03
4,0	2,65	2,80	2,65	3,29	102,74
5,0	3,83	3,71	3,85	2,10	103,62
6,0	4,44	4,44	4,61	2,17	97,74
7,0	5,25	5,32	5,25	0,80	94,60
8,0	6,23	6,31	6,22	0,79	94,71
9,0	7,39	7,26	7,42	1,21	96,16
10,0	8,81	8,83	8,70	0,80	100,45
11,0	9,97	9,99	9,99	0,09	101,98
12,0	11,3	11,1	11,2	0,77	103,31

Os coeficientes angulares obtidos pelas curva de calibração no solvente e na matriz foram utilizados para avaliar a porcentagem do efeito de matriz (%EM) para a análise do analito 3-hidroxi-butirato de metila, comparando-se a razão entre esses coeficientes pela seguinte equação (Walorczyk, 2014):

$$\%EM = 100 \times \left( 1 - \frac{\text{Coeficiente angular da curva no solvente}}{\text{Coeficiente angular da curva na matriz}} \right)$$

O resultado proveniente dessa equação está disposto na tabela 8, bem como as equações das retas no ajuste das curvas construídas na matriz e no solvente (clorofórmio).

Tabela 8 - Equação da reta encontrada para curvas de calibração construídas em solvente puro (clorofórmio) e matriz, razão entre os coeficientes angulares e lineares, porcentagem encontrada para o efeito negativo de matriz e coeficiente de correlação.

	Equação	$CA_m/CA_s$	$CL_m/CL_s$	%EM	$R^2$
Solvente	$y = 0,004x - 8,544$				0,989
Matriz	$y = 0,001x - 1,513$	0,255	0,177	-292,648	0,989

$CA_m$  = coeficiente angular da matriz;  $CA_s$  = coeficiente angular do solvente;  $CL_m$  = coeficiente linear da matriz;  $CL_s$  = coeficiente linear do solvente;

A razão encontrada entre os coeficientes angulares está contida entre 0 e 1, o que confirma o efeito causado pela matriz. Pela porcentagem calculada de EM, podemos notar que o efeito é extremamente negativo, chegando a quase -300%. A variação na exatidão pode ser explicada pelo forte efeito de matriz, em que os componentes presentes no meio de cultivo bacteriano possuem influência na sensibilidade de ionização do analito, entretanto, por ser uma amostra complexa, os padrões se encontram dentro da faixa aceitável de trabalho de 20% (De Sousa et al., 2013). O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,989 mostrou-se adequado, com uma correlação fortíssima segundo as normas da IUPAC (Brito et al., 2003; Currie and Svehla, 1994) e acima do mínimo recomendado pelo INMETRO de 0,90 (INMETRO, 2007). A tabela de análise de variância ANOVA com significância de 95% (anexo 4) demonstrou que a curva de calibração por sobreposição de matriz foi estatisticamente significativa, podendo ser utilizada para a quantificação dos biopolímeros produzidos pelas cepas bacterianas, sendo descartada a curva no solvente.

#### 4.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são importantes parâmetros que compõem a validação do método analítico. O limite de detecção

diz respeito à menor quantidade de substância em análise capaz de ser detectada, mas não necessariamente quantificada, em um procedimento experimental. Já o limite de quantificação diz respeito à menor concentração capaz de ser quantificada com exatidão por um determinado procedimento experimental (Agency, 2011; INMETRO, 2007; Ribani et al., 2004).

Os resultados atingidos estão dispostos na tabela 9.A e os valores de recuperação e coeficiente de variação na tabela 9.B.

Tabela 9 - A) limites de detecção e de quantificação encontrados para a curva na matriz; B) porcentagem de recuperação do analito em diferentes concentrações e coeficientes de variação (%) correspondentes.

<b>A - Limite de detecção e limite de quantificação</b>					
Matriz		LD (mg.mL <sup>-1</sup> )		LQ (mg.mL <sup>-1</sup> )	
		0,94		2,83	
<b>B – Recuperação na matriz</b>					
3,60 <sup>a</sup>		7,65 <sup>a</sup>		11,05 <sup>b</sup>	
% R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
107,94 ± 1,92	3,57	97,28 ± 0,05	0,87	104,81 ± 0,27	0,33

<sup>a</sup>: experimentos realizados em triplicata; <sup>b</sup>: experimentos realizados com seis repetições

#### 4.6.4 Precisão e exatidão

A precisão é estimada pela dispersão dos resultados entre ensaios interdependentes, que sejam repetidos a partir de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou de soluções padrão, em uma mesma condição definida. A medida de exatidão faz referência ao grau de concordância entre cada resultado individual encontrado em uma determinada análise e um valor de referência tido como verdadeiro. (Agency, 2011; ANVISA, 2017; Ribani et al., 2004).

A recuperação encontrada variou entre 97 e 108%, valores que se enquadram ao permitido para amostras complexas, que chega à variação de 70 à 120% do valor esperado (GARP, 1999; Ribani et al., 2004). Quando referente ao coeficiente de variação, a concentração do analito a ser avaliada interfere no intervalo de valor aceito para a precisão. Para as concentrações avaliadas no presente estudo, são aceitos valores de coeficiente de variação de até 4,0%

(Brito et al., 2003; Wood, 1999) , portanto, podemos concluir que os resultados obtidos estão coerentes e apresentam a precisão e exatidão necessários para a validação do método analítico.

#### 4.7 Quantificação da produção de biopolímeros por *Delftia* sp. utilizando a curva de calibração

Após a validação da curva analítica na matriz, o método desenvolvido foi aplicado à quantificação do 3-hidroxi-butirato de metila. As áreas correspondentes aos biopolímeros obtidas após análises cromatográficas foram integradas e plotadas pela razão entre a área de polímero/área do padrão interno. Os dados estão contidos na tabela 10.

Tabela 10 - Dados de quantificação da produção de biopolímeros por *Delftia* sp., demonstrando concentração de massa seca, concentrações encontradas a partir das áreas dos cromatogramas e substituindo os valores na equação da curva de calibração construída na matriz, o rendimento de biopolímero relacionado com a massa seca celular e o coeficiente de variação.

<i>Delftia</i> sp.					
Substrato	v/v	CDW (mg.mL <sup>-1</sup> )	Concentração obtida pela curva de calibração (mg.mL <sup>-1</sup> )	Rendimento de polímero (%)	CV(%)
Controle		0,163 ± 0,007	0,160 ± 0,009	98,06	2,91
Soro de leite	1,0%	0,063 ± 0,009	0,042 ± 0,003	a	a
	5,0%	0,230 ± 0,015	0,089 ± 0,008	38,74	15,29
	20,0%	0,996 ± 0,040	0,253 ± 0,039	25,52	19,47
	40,0%	2,051 ± 0,020	0,341 ± 0,055	16,61	16,43
Acetato de sódio		0,233 ± 0,004	0,212 ± 0,016	91,00	8,34

<sup>a</sup>: concentração abaixo do LQ

A alta variação no coeficiente de variação do rendimento dos biopolímeros pode ser atribuída principalmente à etapa de partição, onde são separadas a fase orgânica da fase aquosa, para posterior análise cromatográfica (Jan et al., 1995). Esta etapa é realizada para que seja retirado o excesso de ácido sulfúrico e metanol existentes na amostra após a etapa de derivatização, bem como a retirada de mais interferentes que sejam solúveis nestes solventes (*clean up*), como é o caso dos ácidos graxos.

Os meios de cultivo controle e contendo apenas acetato de sódio como fonte de carbono apresentaram os melhores resultados, uma vez que o acetato é precursor da biossíntese de PHAs e a glicose, a principal molécula utilizada para obtenção de energia pela via glicolítica. Seus resultados foram excelentes, compreendendo rendimentos acima de 90,0%, chegando o controle a 99,0% da relação massa de polímero/massa seca celular.

A concentração de 1,0% (v/v) de soro de leite obteve valores de concentração de produção de PHB abaixo do limite de quantificação para a curva de calibração, portanto não teve os resultados utilizados para comparação. Bosco & Chiampo (2010) promoveram estudos de produção de biopolímeros utilizando agentes de fortificação no meio de cultivo e soro de leite como principal fonte de nutrientes. O maior resultado encontrado para o rendimento de biopolímeros foi de 13,8% para o meio fortificado com ácido acético e 8,7% para meio de cultivo salino MR. O maior rendimento de biopolímeros no presente estudo foi obtido na concentração de 5,0% (v/v) de soro de leite. Apesar dessa concentração não ter sido a de maior produção, a razão entre o crescimento celular e a quantidade de PHB acumulado foi próxima de 40%. Quando em termos de biopolímero recuperado, a maior concentração de soro foi a que obteve uma maior produção ( $0,341 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (Figura 29).

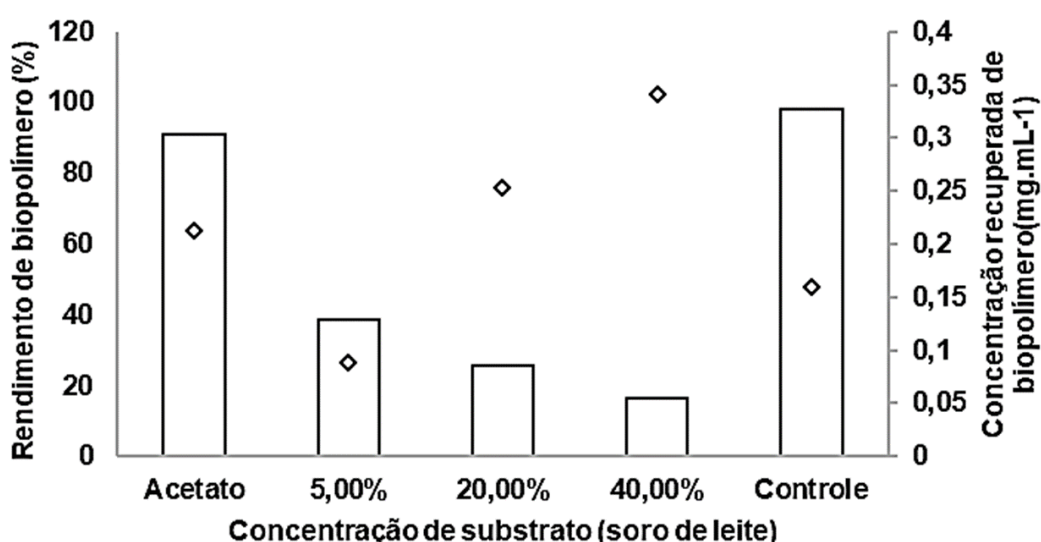


Figura 29 - Gráfico combinado de variação de rendimento de biopolímero (colunas) e concentração recuperada de biopolímero (marcadores de dispersão) por concentração de soro de leite (%) para *Delftia sp.*

Uma vez que o soro de leite é um subproduto, muitas vezes descartado, é possível pensar na possibilidade de maior obtenção polimérica bruta, pois a adição de mais nutrientes não seria um fator limitante ao valor agregado ao produto. O meio de cultivo em questão teve apenas a adição de soro de leite estéril à água destilada autoclavada, ou seja, o custo de nutrientes que compõe o meio de cultivo foi mínimo, pois não foram adicionados precursores e nem agentes fortificantes que induzissem a produção de tais moléculas, comprovando assim a viabilidade em se utilizar subprodutos agroindustriais como fonte de nutrientes para a produção de biopolímeros com meios de cultivo de baixo custo.

## 5. CONCLUSÃO

O trato gastrointestinal de *Diabrotica speciosa* mostrou-se um rico microbioma para o isolamento de bactérias com potencial de produção de biomoléculas de valor agregado, como os biopolímeros.

As técnicas de sequenciamento do gene r16S DNA e caracterização do perfil de ácidos graxos das cepas bacterianas se mostraram satisfatórias para a identificação dos micro-organismos a nível de gênero. Apesar de grande similaridade das sequências de rDNA 16S obtidas com as sequências depositadas, a porcentagem de 97% não nos permite finalizar a identificação. A comparação com o perfil de ácidos graxos encontrados para *Delftia sp.* e *Aureimonas sp.* se mostraram divergentes quanto aos artigos que elucidaram sua identificação, levando-nos a concluir que são espécies ainda não identificadas.

Ambas as cepas deste estudo se mostraram capazes de produzir biopolímeros a partir de fontes de nutrientes alternativas, como os subprodutos da indústria alimentícia (soro de leite) e de biocombustível (glicerol). A maior porcentagem de rendimento encontrada para *Aureimonas sp.* utilizando-se glicerol como fonte única de carbono, foi a de 2,0% (10,37% de rendimento); utilizando-se soro como fonte de nutrientes, a proporção de 10,0% mostrou-se a mais eficaz (8,65% de rendimento). *Delftia sp.* foi capaz de produzir biopolímeros a partir da proporção de 6,0% de glicerol, com rendimento de 2,99% de massa polimérica; o soro de leite a 5,0% se mostrou a concentração mais eficiente dentre todos os tratamentos, com rendimento de 38,74% de PHB.

Com esses resultados podemos concluir que as cepas em questão são grandes potenciais em estudos para a produção de biopolímeros em larga escala, devido a seu grande rendimento e utilização de fontes de baixo custo para a produção de moléculas de alto valor agregado.

## 6. REFERÊNCIAS

- Agency, E.M., 2011. European Medicines Agency: An unacceptable choice. *Prescrire Int.* 20, 278.
- Albuquerque, P.B.S., Malafaia, C.B., 2018. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *Int. J. Biol. Macromol.* 107, 615–625.
- Amaral, A.M., Reis, M.S., Silva, F.R., 2007. O programa BLAST : guia prático de utilização. *Embrapa Recur. Genéticos e Biotecnol.* 24.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S., 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 161–174.
- ANVISA, 2017. Ministério da Saúde (MS ) - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. *Diário Of. da República Fed. do Bras.* 2017, 1–22.
- Ávila, C.J. & Santana, A.G., 2013. *Diabrotica speciosa*: an important soil pest in South America. *Potential Invasive Pests of Agricultural Crops* (ed. by J. E. Peña), pp. 75–85.
- Baumann, P., 2005. Biology of Bacteriocyte-Associated Endosymbionts of Plant Sap-Sucking Insects. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 155–189.
- Berwig, K.H., Baldasso, C., Dettmer, A., 2016. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) generated by *Alcaligenes latus* using lactose and whey after acid protein precipitation process. *Bioresour. Technol.* 218, 31–37.
- Bosco, F., Chiampo, F., 2010. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge. Production of bioplastics using dairy residues. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 418–421.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K.F., 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65, 127–161.
- Brito, N.M., Junior, O.D.P.A., Polese, L., RIBEIRO, M.L., 2003. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. *Pestic. R.Ecotoxicol. e Meio Ambient.* 13, 129–146.
- Brondz, I., 2002. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques [Review]. *Anal. Chim. Acta* 465, 1–37.
- Cabrera Walsh, G. & Cabrera, N., 2016. Biogeografia de *Diabrotica* lato sensu



- Neotropicais. *Diabrotica speciosa* (ed. by D. E. Nava, C. J. Ávila and A. S. Pinto), p. 200. Ocasio, Brazil.
- Cangemi, M.J., Santos, A.M. dos, Claro Neto, S., 2005. Biodegradação: Uma Alternativa para Minimizar os Impactos Decorrentes dos Resíduos Plásticos. *Química Nov. na Esc.* 22, 17–21.
- Cariço, J.A., Sabat, A.J., Friedrich, A.W., Ramirez, M., 2013. Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: databases, tools and the next-generation sequencing revolution, on behalf of the ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM). *Eurosurveillance* 18, 1–9.
- Cavalheiro, J.M.B.T., Raposo, R.S., de Almeida, M.C.M.D., Teresa Cesário, M., Sevrin, C., Grandfils, C., da Fonseca, M.M.R., 2012. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresour. Technol.* 111, 391–397.
- Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D.M., Lu, Z., Mazzeo, J.R., 2007. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 852, 22–34.
- Cho, Y., Lee, I., Yang, Y.Y., Baek, K., Yoon, S.J., Lee, Y.M., Kang, S.H., Lee, H.K., Hwang, C.Y., 2015. *Aureimonas glaciistagni* sp. nov., isolated from a melt pond on arctic sea ice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 3564–3569.
- Colombo, B., Sciarria, T.P., Reis, M., Scaglia, B., Adani, F., 2016. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresour. Technol.* 218, 692–699.
- Currie, L.A., Svehla, G., 1994. Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis (IUPAC Recommendations 1994). *Pure Appl. Chem.* 66, 595–608.
- da Silva, G.P., Mack, M., Contiero, J., 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* 27, 30–39.
- Daigger, G.T., Grady, C.P.L., 1982. The dynamics of microbial growth on soluble substrates. A unifying theory. *Water Res.* 16, 365–382.
- de Paula, F.C., de Paula, C.B.C., Gomez, J.G.C., Steinbüchel, A., Contiero, J., 2017. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from biodiesel by-product and propionic acid by mutant strains of *Pandoraea* sp. *Biotechnol. Prog.* 33, 1077–1084.
- De Sousa, F.A., Costa, A.I.G., De Queiroz, M.E.L.R., Teófilo, R.F., De Pinho, G.P., Neves, A.A., 2013. Influence of pH and matrix components in the chromatographic response of pesticides. *Chromatographia* 76, 67–73.
- Dias, J.M.L., Lemos, P.C., Serafim, L.S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque,

- M.G.E., Ramos, A.M., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2006. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: From the substrate to the final product. *Macromol. Biosci.* 6, 885–906.
- Engel, P., Moran, N.A., 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 699–735.
- Fox, G.E., Magrum, L.J., Balch, W.E., Wolfe, R.S., Woese, C.R., 1977. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 4537–4541.
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L.J.W., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., Stroud, R.M., 2000. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* (80-. ). 290, 481–486.
- Garavand, F., Rouhi, M., Razavi, S.H., Cacciotti, I., Mohammadi, R., 2017. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 104, 687–707.
- Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., Fernández Moreno, J.L., Romero-González, R., 2009. Compensation for matrix effects in gas chromatography-tandem mass spectrometry using a single point standard addition. *J. Chromatogr. A* 1216, 4798–4808.
- Gil, R., Latorre, A., Moya, A., 2004. Bacterial endosymbionts of insects: Insights from comparative genomics. *Environ. Microbiol.* 6, 1109–1122.
- Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K.-H., 2006. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*, *The Prokaryotes*.
- Gross, R.A., Kalra, B., 2002. Biodegradable Polymers for the Environment. *Science* (80-. ). 297, 803–807.
- Heller, K.B., Lin, E.C.C., Hastings Wilson, T., 1980. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 144, 274–278.
- Hotopp, J.C.D., Clark, M.E., Oliveira, D.C.S.G., Foster, J.M., Fischer, P., Torres, M.C.M., Giebel, J.D., Kumar, N., Ishmael, N., Wang, S., Ingram, J., Nene, R. V, Shepard, J., Tomkins, J., Richards, S., Spiro, D.J., Ghedin, E., Slatko, B.E., Tettelin, H., Werren, J.H., 2007. Widespread Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes. [10.1126/science.1142490](https://doi.org/10.1126/science.1142490). *Science* (80-. ). 317, 1753–1756.
- INMETRO, 2007. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos - DOQ-CGCRE-008. *Inst. Nac. Metrol. e Norm. e Qual. Ind.* 25.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2761–2764.
- Jurado, V., Gonzalez, J.M., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C., 2006. *Aurantimonas*

- altamirensis sp. nov., a member of the order Rhizobiales isolated from Altamira Cave. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2583–2585.
- Keeling, P.J., Palmer, J.D., 2008. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Genet.* 9, 605–618. <https://doi.org/10.1038/nrg2386>
- Khanna, S., Srivastava, A.K., 2007. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) having a high hydroxyvalerate content with valeric acid feeding. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 457–461.
- Kim, M., Oh, H.S., Park, S.C., Chun, J., 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 346–351.
- Krishnan, M., Bharathiraja, C., Pandiarajan, J., Prasanna, V.A., Rajendhran, J., Gunasekaran, P., 2014. Insect gut microbiome – An unexploited reserve for biotechnological application. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4, S16–S21.
- Kwon, H., Lehotay, S.J., Geis-Asteggiate, L., 2012. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. *J. Chromatogr. A* 1270, 235–245.
- Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2007. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1663–1683.
- Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2002. Headspace solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3359–3365.
- Laumann, A. R., Ribeiro, P. H., Pires, C. S. S., Schmid, F. G. V., Borges, M. M. C., Moraes, B., Sujii, E. R., 2004. Diversidade de crisomelídeos-praga (Coleoptera: Chrysomelidae) no Distrito Federal. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 22p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 76).
- Lemos, P.C., Serafim, L.S., Reis, M.A.M., 2006. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *J. Biotechnol.* 122, 226–238.
- Li, Y., Wu, S., Wang, L., Li, Y., Shi, F., Wang, X., 2010. Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1380–1383.
- Lin, S.Y., Hameed, A., Liu, Y.C., Hsu, Y.H., Lai, W.A., Shen, F.T., Young, L. Sen, Tsai, C.F., Young, C.C., 2013. *Aureimonas ferruginea* sp. nov. and *Aureimonas rubiginis* sp. nov., two siderophore-producing bacteria isolated from rusty iron plates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2430–2435.

- Liu, K.S., 1994. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 1179–1187.
- Login, F.H., Heddi, A., 2013. Insect immune system maintains long-term resident bacteria through a local response. *J. Insect Physiol.* 59, 232–239.
- Marques, G. B. C., Ávila, C. J., & Parra, J. R. P., 1999. Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34(11), 1983-1986.
- McMeekin, T.A., Olley, J., Ratkowsky, D.A., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: Towards the interface and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 395–407.
- Mehnaz, S., Weselowski, B., Lazarovits, G., 2007. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2805–2809.
- Moorkoth, D., Nampoothiri, K.M., 2016. Production and characterization of poly(3-hydroxy butyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate. *Bioresour. Technol.* 201, 253–260.
- Mostafa, N.A., Farag, A.A., Abo-dief, H.M., Tayeb, A.M., 2018. Production of biodegradable plastic from agricultural wastes. *Arab. J. Chem.* 11, 546–553.
- O'leary, W.M., 1962. the Fatty Acids of Bacteria. *Bacteriol. Rev.* 26, 421–447.
- Oehmen, A., Keller-Lehmann, B., Zeng, R.J., Yuan, Z., Keller, J., 2005. Optimisation of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems. *J. Chromatogr. A* 1070, 131–136.
- Oliveira, A., Silva, C., Rezende, M., Sola, M.C., Feistel, J.C., Oliveira, J.J., 2013. *Microbiologia Preditiva*. Enciclopédia Biosf. Cent. Científico Conhecer 9, 1909–1928.
- Oliveira, D.F. de, Bravo, C.E.C., Tonial, I.B., 2012. Artigo de Revisão: Soro de leite : um subproduto valioso. *Whey of milk : a valuable product*. *Rev. Inst. Latic.* “Cândido Tostes” 67, 64–71.
- Oliver, K.M., Degnan, P.H., Burke, G.R., Moran, N.A., 2010. Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 247–266.
- Olsen, G.J., Woese, C.R., 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* 7, 113–123.
- Pais, J., Farinha, I., Freitas, F., Serafim, L.S., Martínez, V., Martínez, J.C., Arévalo-Rodríguez, M., Auxiliadora Prieto, M., Reis, M.A.M., 2014. Improvement on the yield of polyhydroxyalkanoates production from cheese whey by a recombinant *Escherichia coli* strain using the proton suicide

- methodology. *Enzyme Microb. Technol.* 55, 151–158.
- Pantazaki, A.A., Papaneophytou, C.P., Pritsa, A.G., Liakopoulou-Kyriakides, M., Kyriakidis, D.A., 2009. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochem.* 44, 847–853.
- Perlatti, B., Luiz, A.L., Prieto, E.L., Fernandes, J.B., da Silva, M.F. das G.F., Ferreira, D., Costa, E.N., Boiça Júnior, A.L., Forim, M.R., 2017. MALDI-TOF MS identification of microbiota associated with pest insect *Diabrotica speciosa*. *Agric. For. Entomol.* 19, 408–417.
- Piatti, T.M., Rodrigues, R.A.F., 2005. Plásticos: características, usos, produção e impactos ambientais. *Série Conversando sobre ciências em alagoas* 51.
- Pieretti, I., Cociancich, S., Bolot, S., Carrèr, S., Morisset, A., Rott, P., Royer, M., 2015. Full genome sequence analysis of two isolates reveals a novel xanthomonas species close to the sugarcane pathogen *Xanthomonas albilineans*. *Genes (Basel)*. 6, 714–733.
- PlasticsEurope, 2018. Annual Review 2017-2018. *Annu. Rev.* 15, 28–1.
- Poelchau, M.F., Coates, B.S., Childers, C.P., Pérez De León, A.A., Evans, J.D., Hackett, K., Shoemaker, D.W., 2016. Agricultural applications of insect ecological genomics. *Curr. Opin. Insect Sci.* 13, 61–69.
- Prestes, O.D., Friggi, C.A., Adaime, M.B., Zanella, R., 2009. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim. Nova* 32, 1620–1634.
- Raghunandan, K., Mchunu, S., Kumar, A., Kumar, K.S., Govender, A., Permaul, K., Singh, S., 2014. Biodegradation of glycerol using bacterial isolates from soil under aerobic conditions. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 49, 85–92.
- Rathsack, K., Reitner, J., Stackebrandt, E., Tindall, B.J., 2011. Reclassification of *Aurantimonas altamirensis* (Jurado et al. 2006), *Aurantimonas ureilytica* (Weon et al. 2007) and *Aurantimonas frigidaquae* (Kim et al. 2008) as members of a new genus, *Aureimonas* gen. nov., as *Aureimonas altamirensis* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2722–2728.
- Raza, Z.A., Abid, S., Banat, I.M., 2018. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 126, 45–56.
- Rehm, B.H.A., 2006. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. *Biotechnol. Lett.* 28, 207–213.
- Rehm, B.H.A., 2010. Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and

- applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 578–592.
- Ribani, M., Grespan Bottoli, C.B., Collins, C.H., Fontes Jardim, I.C.S., Costa Melo, L.F., 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 27, 771–780.
- Rosa, A. P. S. A. da, Trecha, C. O. & Medina, L. B., 2013. Bioecologia de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) visando fornecer subsídios para estudos de criação em dieta artificial. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 31 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 1516-8840, 375).
- Schümperli, M., Pellaux, R., Panke, S., 2007. Chemical and enzymatic routes to dihydroxyacetone phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 33–45.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2004. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 145–160.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., D'Ari, R., 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189, 8746–8749.
- Shigematsu, T., Yumihara, K., Ueda, Y., Numaguchi, M., Morimura, S., Kida, K., 2003. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1479–1483.
- Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Foglia, T.A., Marmer, W.N., 2006. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 783–789.
- Spiekermann, P., Rehm, B.H.A., Kalscheuer, R., Baumeister, D., Steinbüchel, A., 1999. S002030050681 73–80.
- Steinbüchel, A., Steinbüchel, A., 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic. *FEMS Microbiol. Lett.* 128, 219–228.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., Shah, S., 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. *Biotechnol. Adv.* 25, 148–175.
- Thakur, S., Chaudhary, J., Sharma, B., Verma, A., Tamulevicius, S., Thakur, V.K., 2018. Sustainability of bioplastics: Opportunities and challenges. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 13, 68–75.
- Thomson, N., Summers, D., Sivaniah, E., 2010. Synthesis, properties and uses of bacterial storage lipid granules as naturally occurring nanoparticles. *Soft Matter* 6, 4045–4057.
- Urtuvia, V., Villegas, P., González, M., Seeger, M., 2014. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *Int. J. Biol. Macromol.* 70, 208–213.

- Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., Radecka, I., 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1437–1449.
- Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schue, F., 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* 84, 377–410.
- Viana, P. A., 2010. Manejo de *Diabrotica speciosa* na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 141).
- Walorczyk, S., 2014. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. *Talanta* 120, 106–113.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.
- Weon, H.Y., Kim, B.Y., Yoo, S.H., Joa, J.H., Lee, K.H., Zhang, Y.S., Kwon, S.W., Koo, B.S., 2007. *Aurantimonas ureilytica* sp. nov., isolated from an air sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1717–1720.
- White, S.W., Zheng, J., Zhang, Y.-M., Rock, C.O., 2005. the Structural Biology of Type II Fatty Acid Biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 791–831.
- Woo, P.C.Y., Teng, J.L.L., Wu, J.K.L., Leung, F.P.S., Tse, H., Fung, A.M.Y., Lau, S.K.P., Yuen, K.Y., 2009. Guidelines for interpretation of 16S rRNA gene sequence-based results for identification of medically important aerobic Gram-positive bacteria. *J. Med. Microbiol.* 58, 1030–1036.
- Wood, R., 1999. How to validate analytical methods. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 18, 624–632.
- Yuan, X., Nogi, Y., Tan, X., Zhang, R.G., Lv, J., 2014. *Arenimonas maotaiensis* sp. nov., isolated from fresh water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 3994–4000.
- Yuval, B., 2017. Symbiosis: Gut Bacteria Manipulate Host Behaviour. *Curr. Biol.* 27, R746–R747.
- Zhang, K., Dong, X., 2009. *Selenomonas bovis* sp. nov., isolated from yak rumen contents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2080–2083.
- Zhou, W., Yang, S., Wang, P.G., 2017. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis* 9, 1839–1844.
- Zucchi, R. A., Silveira Neto, S., Nakano, O., 1993. Guia de identificação de pragas agrícolas. Piracicaba: FEALQ. 139 p.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1 - Sequências de nucleotídeos

#### Cepa DsA.N042

Query: número de acesso KC581669.1

Sequence ID: Query\_173383 Length: 926 Number of Matches: 2

Range 1: 489 to 926		<a href="#">Graphics</a>		▼ Next Match	▲ Pre
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
730 bits(395)	0.0	424/438(97%)	2/438(0%)	Plus/Plus	
Query 985	GTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCC			1044	
Sbjct 489	GTAGTCAGATATTGTAGTCAGATGTGGGGTAAAGTCCCTCAACGAGCGCAACCCTCGCCC			548	
Query 1045	TTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAA-GGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGA			1103	
Sbjct 549	TTAGTTGCCATCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAAAGGA			608	
Query 1104	AGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAA			1163	
Sbjct 609	AGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAA			668	
Query 1164	TGGCGGTGACAATGGGCAGCCAACCTCGCGAGAGTGCCTAATCCCAAAAAGCCGTCTCAG			1223	
Sbjct 669	TGGCGGTGACAATGGGCAGCCAACCTCGCGAGAGTGCCTAATCCCAAAAAGCCGTCTCAG			728	
Query 1224	TTCGGATTGCACTCTGCAACTCGGGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCA			1283	
Sbjct 729	TTCGGATTGCACTCTGCAACTCGGGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCA			788	
Query 1284	GCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGG-CCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAG			1342	
Sbjct 789	GCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAG			848	
Query 1343	TTGGTTCTACCCGAAGGTGGTGCCTAACCAGGAGGAGCCAAACCACGGTAGGGTCA			1402	
Sbjct 849	TTGGTTCTACCCGAAGGTGGTGGCTAACCAGGAGGAGCCAAACCACGGTAGGGTCA			908	
Query 1403	GCGACTGGGGTGAAGTCG	1420			
Sbjct 909	GCGACTGGGGTGAAGTCG	926			



## Cepa DsA.N049

Delftia tsuruhatensis strain E2330 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Sequence ID: [KY867535.1](#) Length: 1508 Number of Matches: 2

Range 1: 982 to 1461 [GenBank](#) [Graphics](#)

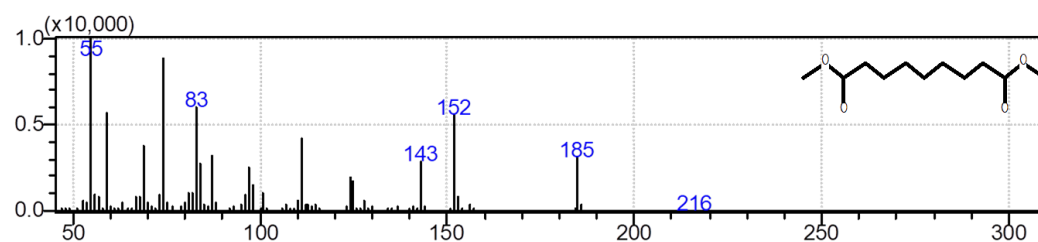
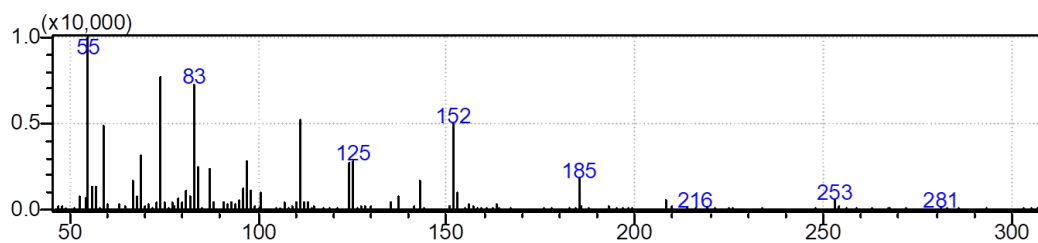
▼ Next Match ▲ Pre

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
846 bits(458)	0.0	476/484(98%)	4/484(0%)	Plus/Plus
Query 387	GGCAAAAAGCTCCCAGAGATGGATTCTGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCA			446
Sbjct 982	GGCAGGAAGTTTCCAGAGATGGATTCTGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCA			1041
Query 447	TGGCTGTGCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGAACGAGCGCAACCC			506
Sbjct 1042	TGGCTGT-CGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGAACGAGCGCAACCC			1100
Query 507	TTGTCATTAGTTGCTACATTGAGTTCAGTTGAGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAAATCCG			566
Sbjct 1101	TTGTCATTAGTTGCTACATTGAGTTCAGTTGAGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAA--CCG			1158
Query 567	GAGGAAGGTGGGGATGACGTCTAAGTCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTC			626
Sbjct 1159	GAGGAAGGTGGGGATGACGTC-AAGTCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTC			1217
Query 627	ATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCAACCCTGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAAACCA			686
Sbjct 1218	ATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCAACCCTGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAAACCA			1277
Query 687	GTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG			746
Sbjct 1278	GTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG			1337
Query 747	CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA			806
Sbjct 1338	CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA			1397
Query 807	TGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCAGCAAGGAGGGCGCTTACCACGGCG			866
Sbjct 1398	TGGGAGCGGGTCTCGCCAGAAGTAGGTAGCCTAACCAGCAAGGAGGGCGCTTACCACGGCG			1457
Query 867	GGGT 870			
Sbjct 1458	GGGT 1461			

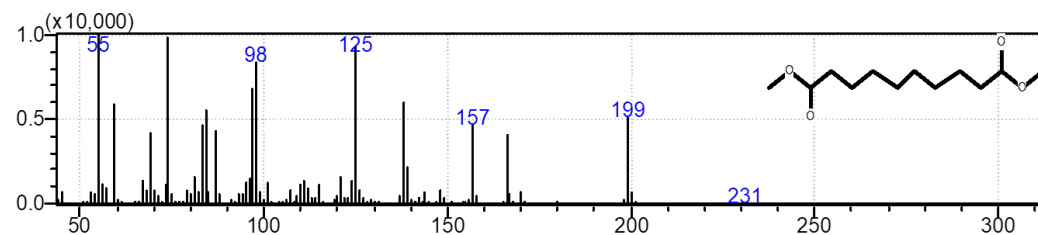
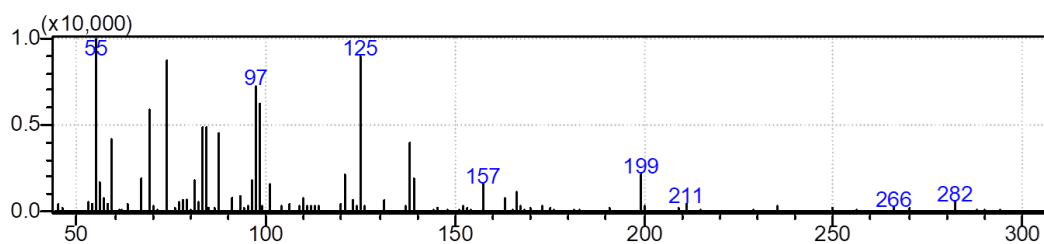
## Anexo 2 - Espectros da identificação de ácidos graxos

### Cepa DsA.N042

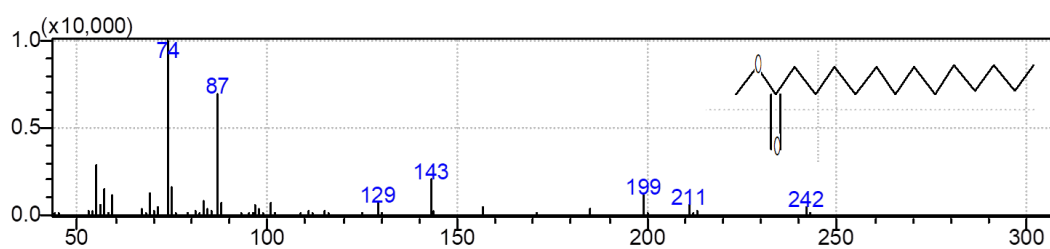
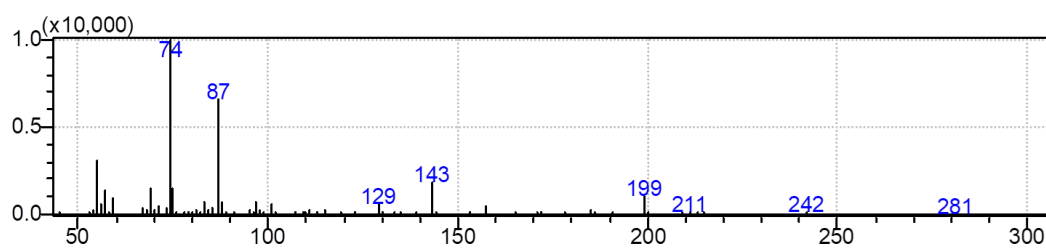
Ácido azelaico ( $t_R = 11,864$ )



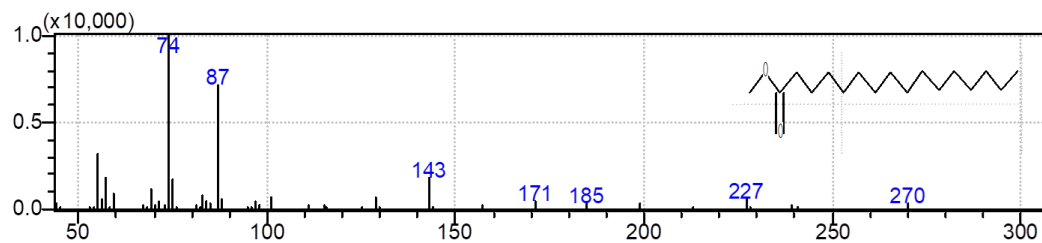
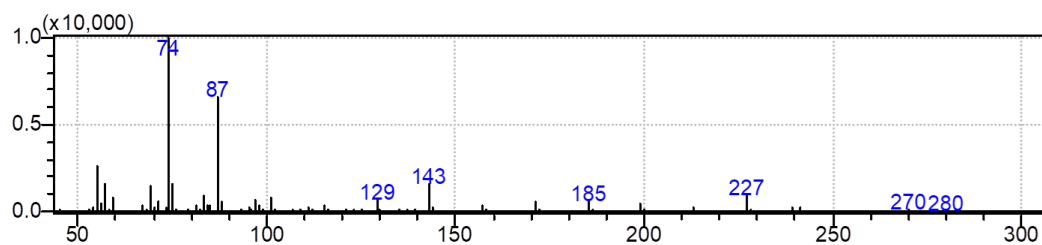
Ácido sebácico ( $t_R = 14,844$ )



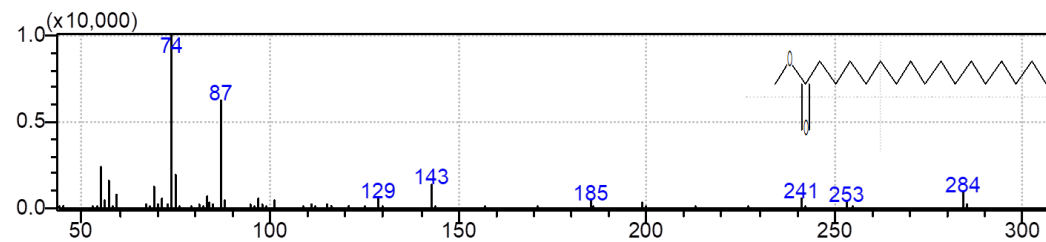
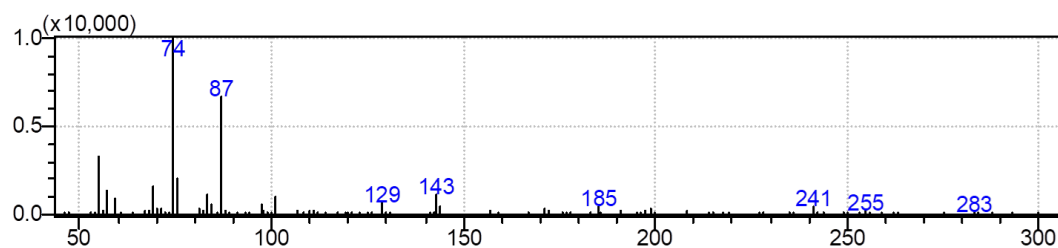
### Ácido mirístico (t<sub>R</sub>= 17,000)



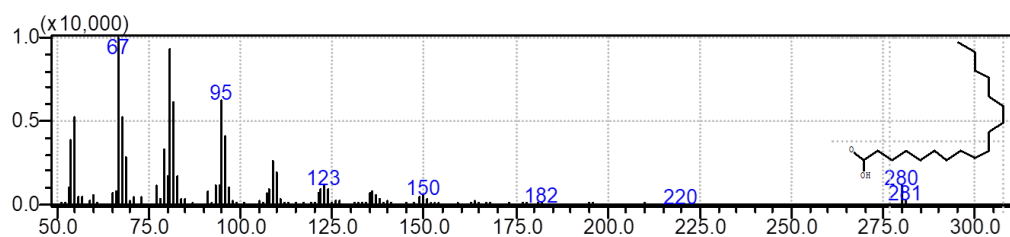
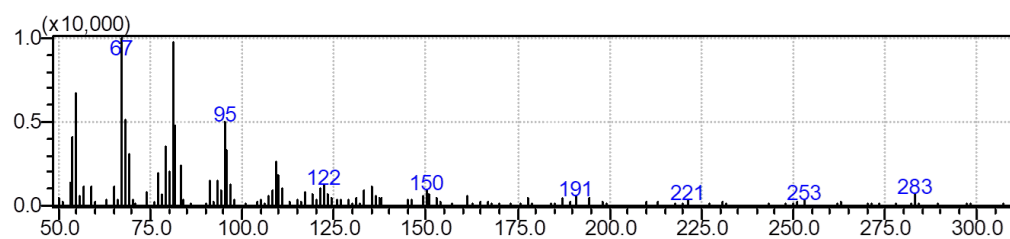
### Ácido palmítico (t<sub>R</sub>= 22,504)



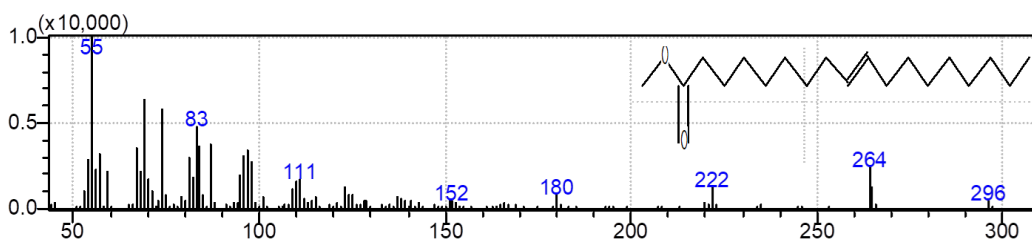
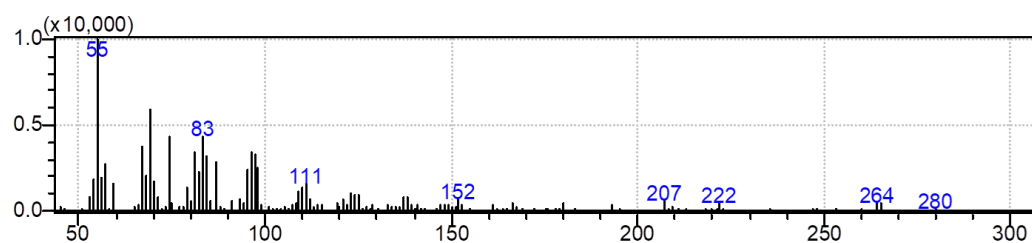
### Ácido margárico (t<sub>R</sub>= 25,054)



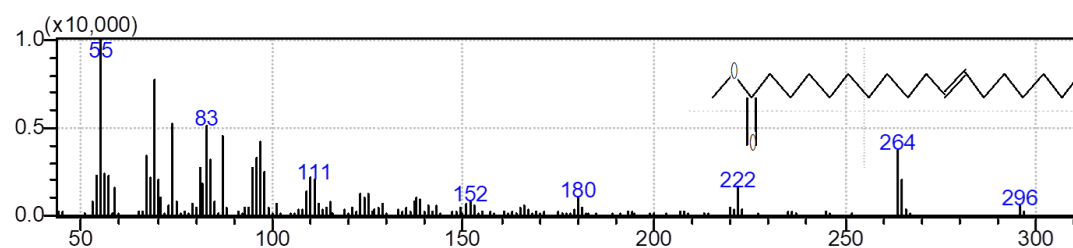
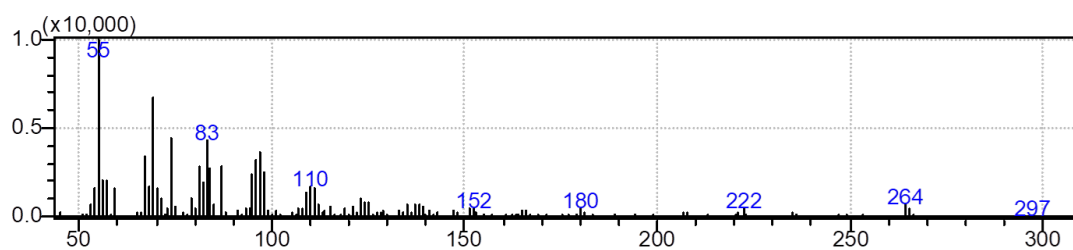
### Ácido linoleico ( $t_R= 26,716$ )



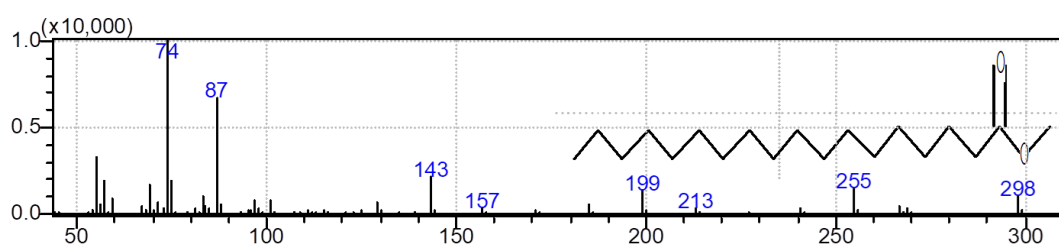
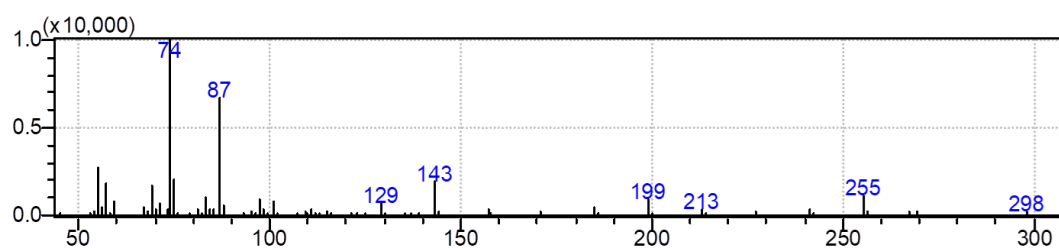
### Ácido elaidico ( $t_R= 26,855$ )



### Ácido trans-vacênico ( $t_R= 26,995$ )

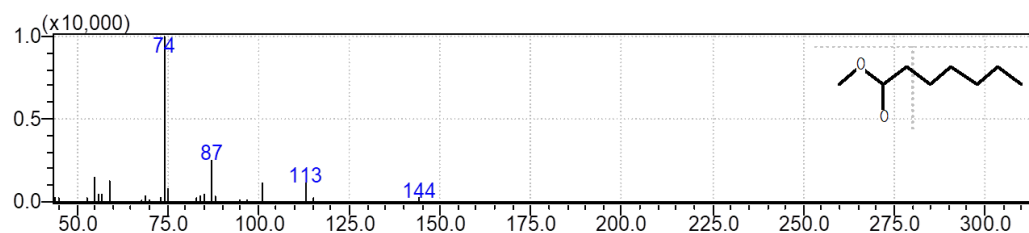
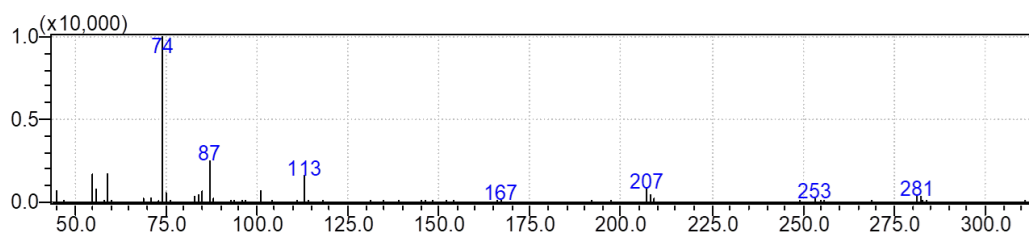


### Ácido esteárico ( $t_R = 27,475$ )

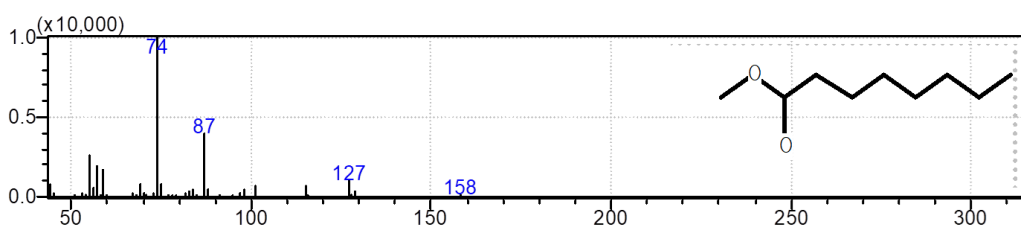
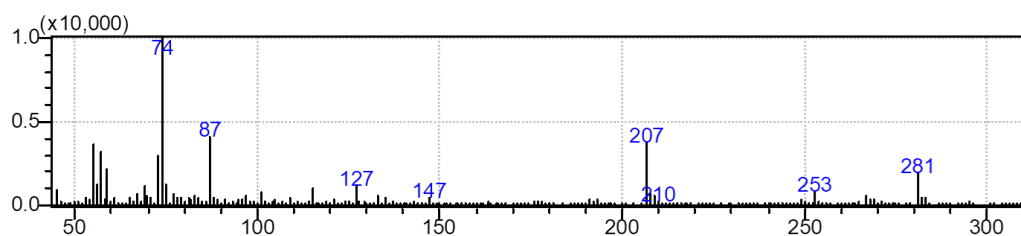


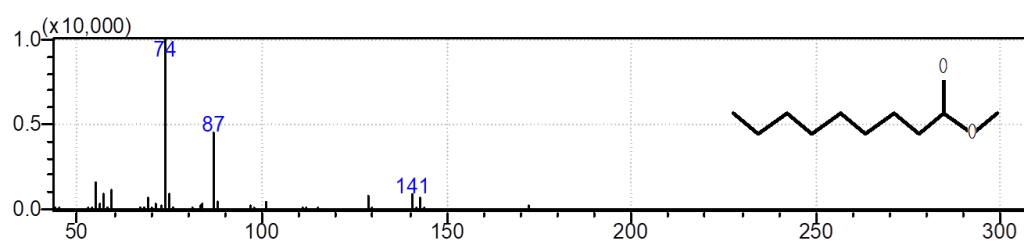
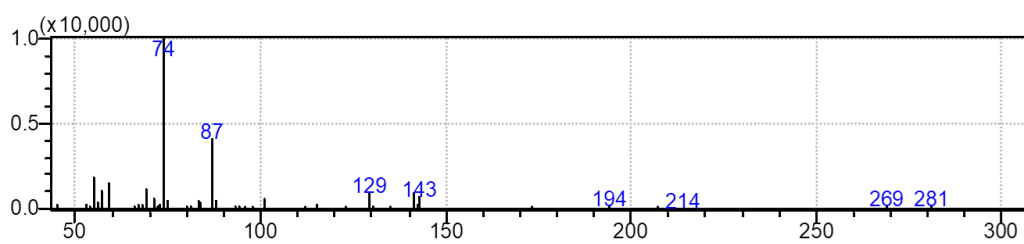
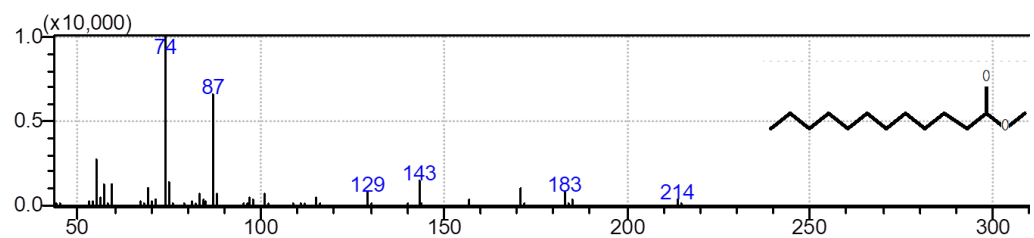
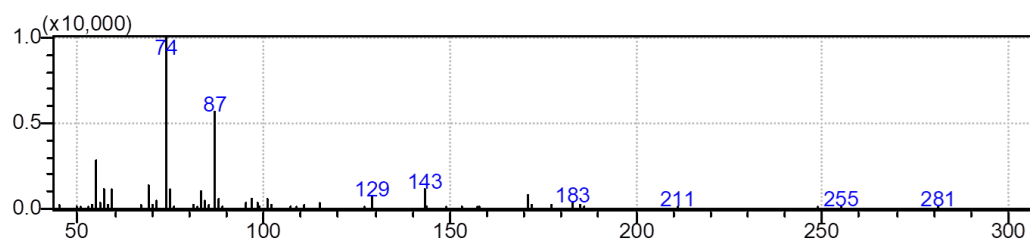
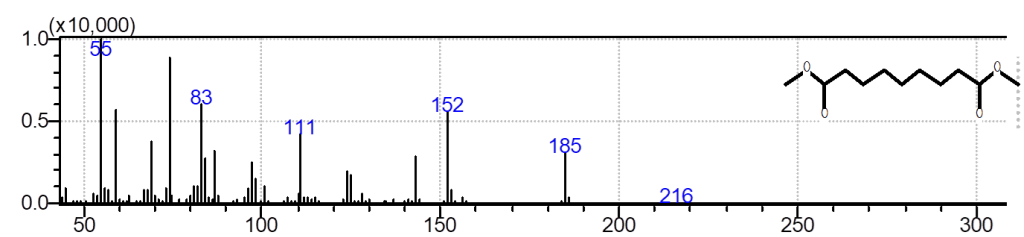
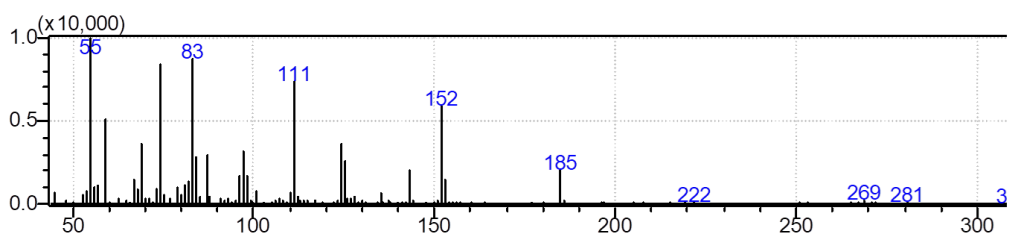
### Cepa DsA.049

#### Ácido heptanóico ( $t_R = 3,359$ )

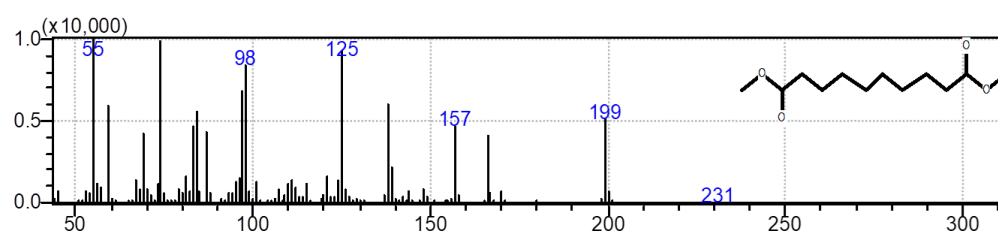
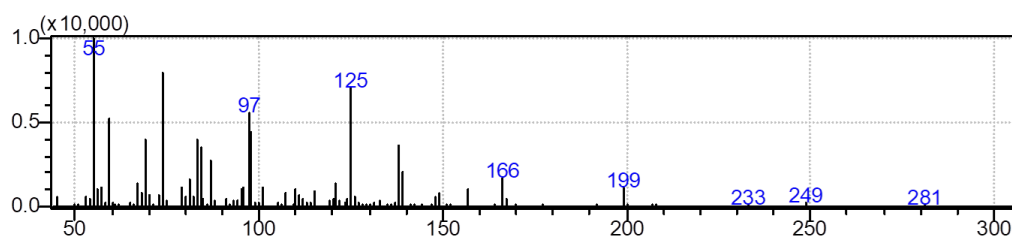


#### Ácido caprílico ( $t_R = 4,182$ )

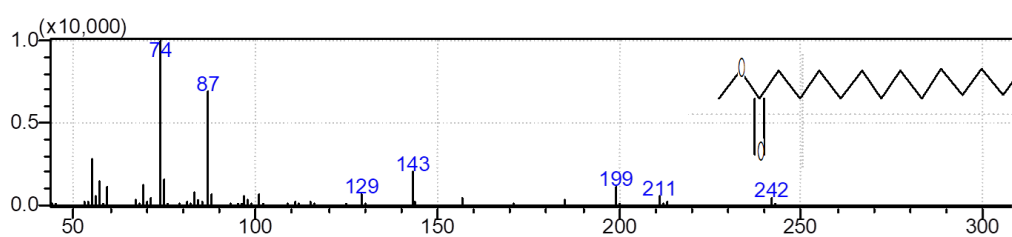
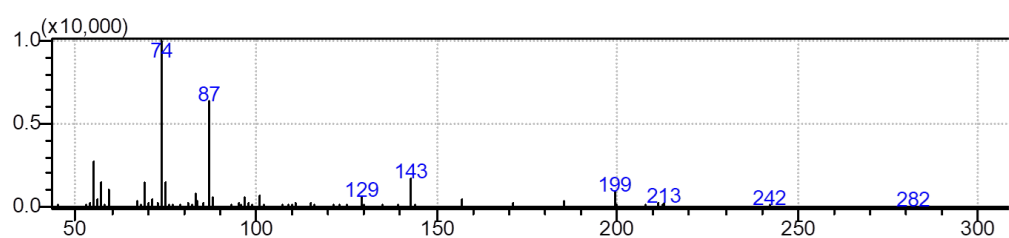


Ácido pelargônico ( $t_R = 5,148$ )Ácido láurico ( $t_R = 11,137$ )Ácido azelaico ( $t_R = 11,873$ )

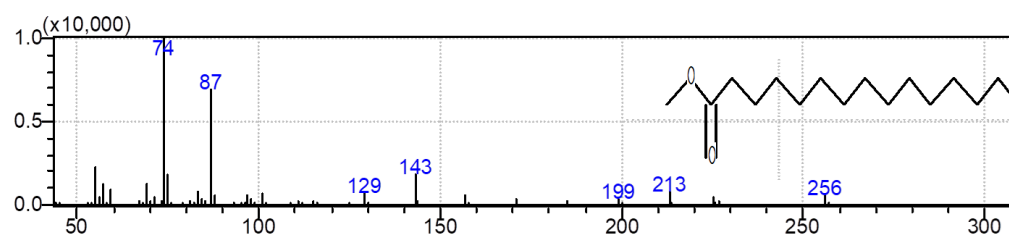
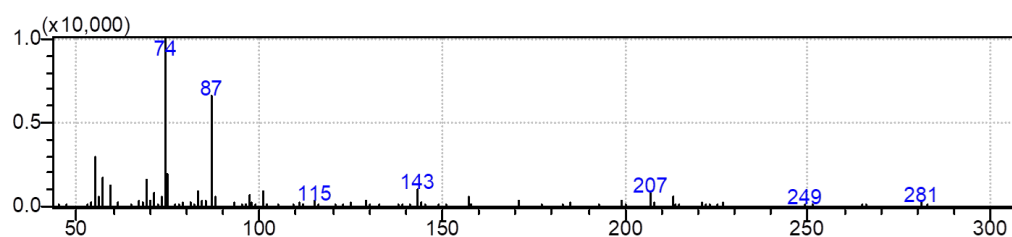
### Ácido sebácico ( $t_R = 14,840$ )



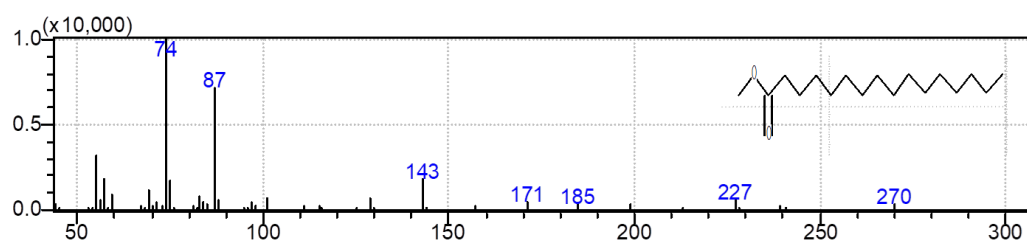
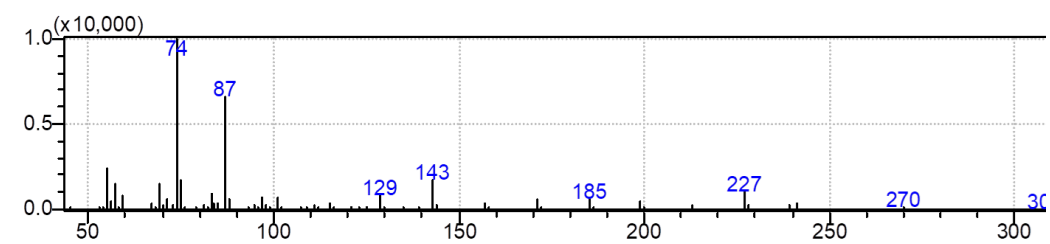
### Ácido mirístico ( $t_R = 17,009$ )



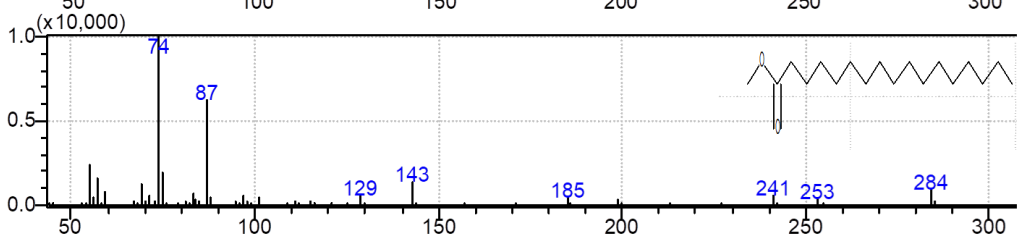
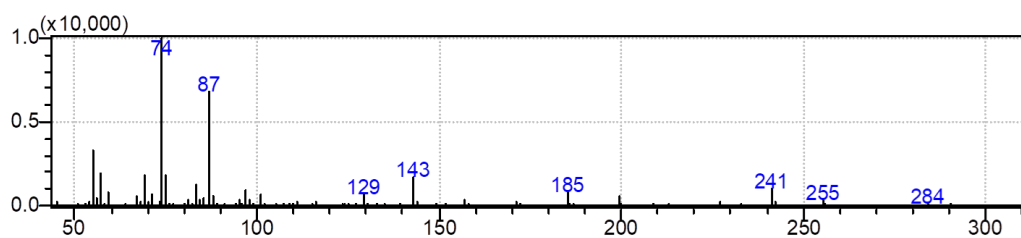
### Ácido pentadecanoico ( $t_R = 19,824$ )



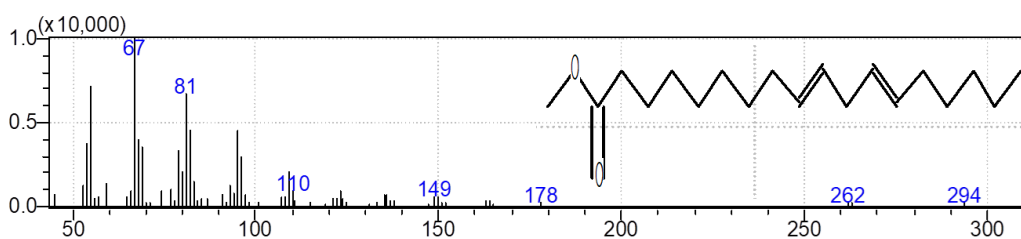
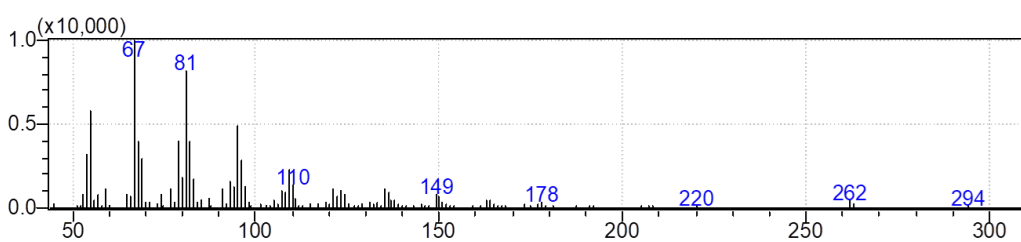
### Ácido palmítico ( $t_R = 22,511$ )



### Ácido margárico ( $t_R = 25,054$ )

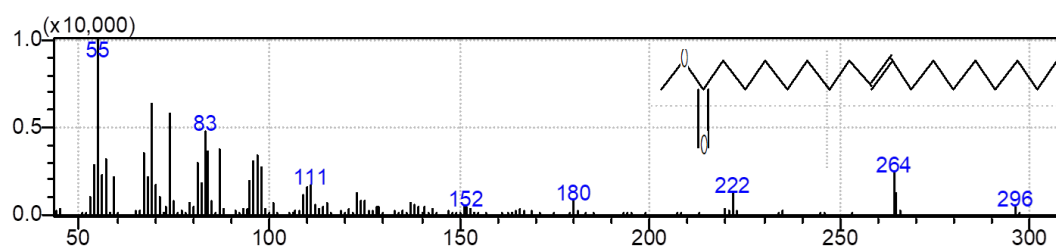
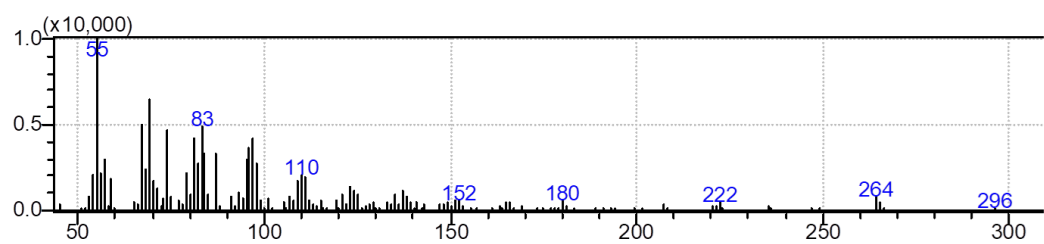


### Ácido linoleáidico ( $t_R = 26,718$ )

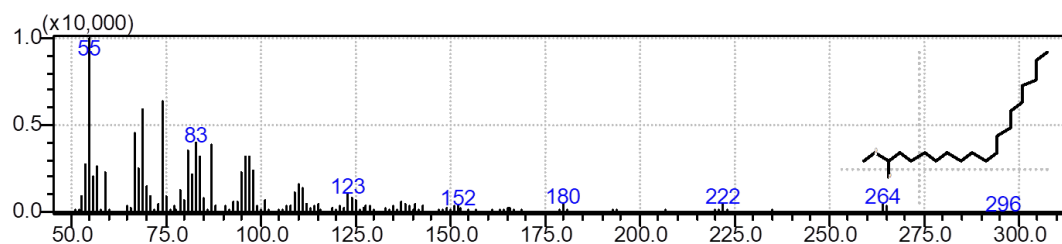
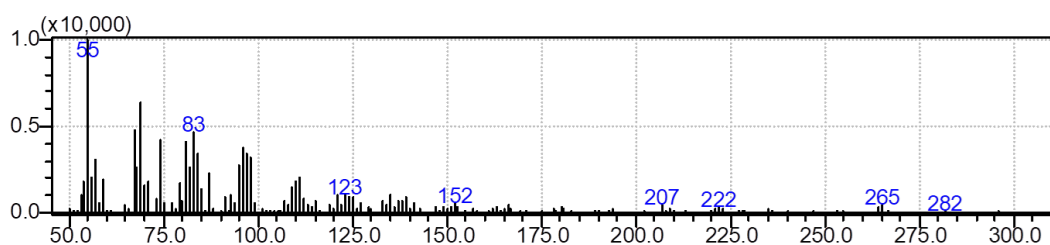




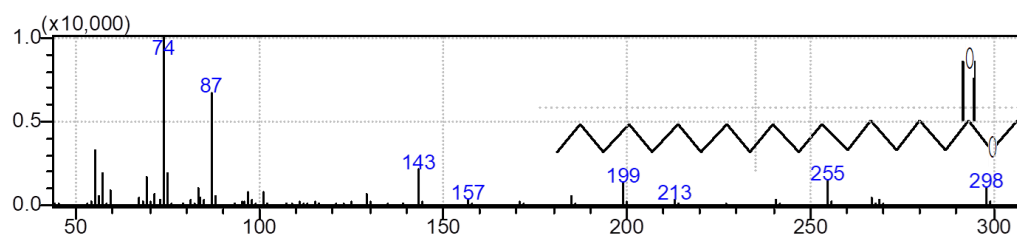
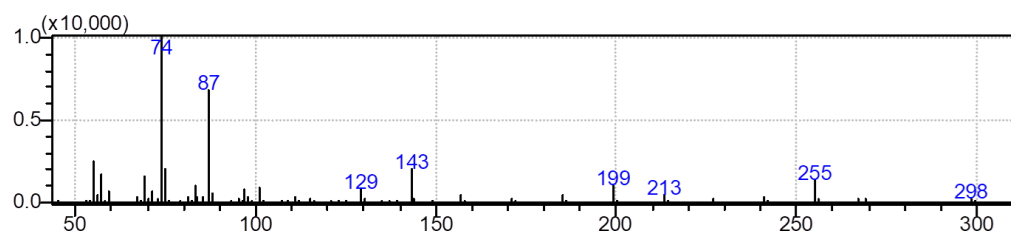
### Ácido eláidico ( $t_R = 26,862$ )

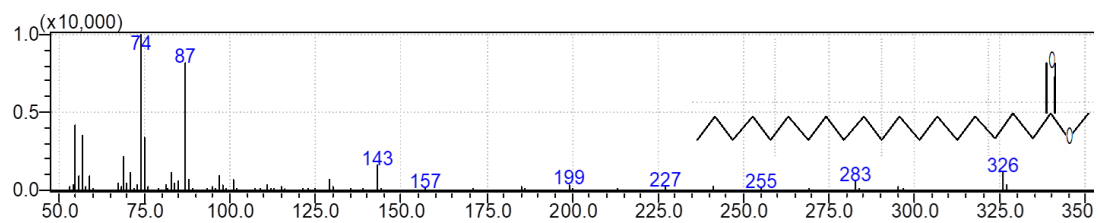
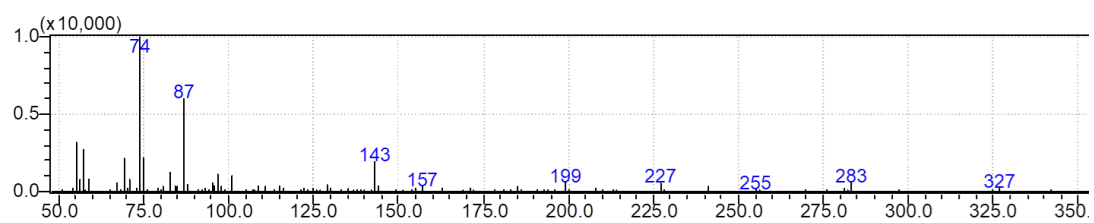


### Ácido oleico ( $t_R = 27,008$ )



### Ácido esteárico ( $t_R = 27,482$ )



Ácido araquídico ( $t_R = 31,998$ )

### Anexo 3: Análise estatística da porcentagem de biopolímeros recuperada

Software Sisvar 5.6

Resultados dos testes acompanhados de mesma letra/número não possuem diferença estatística significativa.

Teste de Tukey com 95% de significância.

#### *Aureimonas sp.*

Tratamentos: 1) Glicerol 0,1%; 2) Glicerol 0,5%; 3) Glicerol 1,0%; 4) Glicerol 2,0%; 5) Glicerol 4,0%

### ANOVA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
repetição	4	166.062627	41.515657	5.495	0.0133
erro	10	75.552267	7.555227		
Total corrigido	14	241.614893			
CV (%) =	70.11				
Média geral:	3.9206667	Número de observações:	15		

Teste Tukey para a FV repetição

DMS: 7,38953789709068 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 1,58694955461378

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.776667	a1
3	2.546667	a1
2	2.663333	a1
5	3.250000	a1 a2
4	10.366667	a2

***Delftia sp.***

Tratamentos: 1) Acetato de sódio; 2) Soro de leite 5,0%; 3) Soro de leite 10,0%;  
4) Soro de leite 20,0%; 5) Soro de leite 40,0%

**ANOVA**

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
concentração	4	17257.662867	4314.415717	161.984	0.0000
erro	10	266.348467	26.634847		
Total corrigido	14	17524.011333			
CV (%) =	9.56				
Média geral:	53.9833333	Número de observações:	15		

Teste Tukey para a FV concentração

DMS: 13,8745412383403 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3  
Erro padrão: 2,97964464697088

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
4	16.610000	a1
3	25.513333	a1 a2
2	38.736667	a2
1	90.993333	a3
5	98.063333	a3

## Anexo 4: Tabela ANOVA

Tabela de variância para as curvas de calibração

<b>Matriz</b>					
	SQ	g.l	MQ	Fcal.	Ftab.
SQR	259,94	1	256,94	259,94	4.49
SQr	2,70	28	0.09		
SQT	262,65	29			
SQEP	0,12	20	0.01	0,02	1,05
SQFaj	2,58	8	0.32		

<b>Solvente</b>					
	SQ	g.l	MQ	Fcal.	Ftab.
SQR	1360,16	1	1360,16	97,70	4.38
SQr	13,92	19	0,73		
SQT	1374,08	20			
SQEP	5,02	14	0,36	0,20	1,09
SQFaj	8,90	5	1,78		