

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo da produção de biopolímeros polihidroxialcanoatos por  
bactérias isoladas do inseto-praga *Diabrotica speciosa***

**Marília Silva Pires\***

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de  
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

**Orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim**

**\*Bolsista CNPq**

**SÃO CARLOS – SP**

**2023**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Marília Silva Pires, realizada em 26/05/2023.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro (UFSCar)

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters (UFSCar)

Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite (UTFPR)

Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa (UFCAT)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedico esse trabalho aos meus pais e à  
minha irmã. Os meus maiores  
apoiadores e incentivadores desde  
sempre ... e para sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Roberto e Lúcia, e à minha irmã, Letícia, por todo o suporte e incentivo em todas as escolhas da minha vida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa durante esses anos e por toda orientação, confiança e paciência durante o Mestrado e Doutorado;

À Júlia por todo o companheirismo, incentivo, compreensão e suporte em todos os momentos;

Aos amigos Clara e João Gabriel pelos bons momentos e pelo suporte, na pesquisa e na vida;

Aos amigos do PN e do Separare por tornarem esses anos mais leves e agradáveis;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Dulce e às alunas Kelli, Bruna e Katia pelos ensinamentos, discussão científica e por me acompanharem na utilização do Laboratório LBFÉ na etapa de identificação e sequenciamento dos genes;

À Ana Felizatti e ao Hugo César pela ajuda nos experimentos de biologia molecular e na interpretação dos resultados;

Aos colegas de grupo do Laboratório de Produtos Naturais pela convivência, discussões científicas e auxílios;

Ao Prof. Dr. Renato Lajarim e à Dr<sup>ª</sup>. Kelli Micocci pelas contribuições como banca no seminário de qualificação;

Ao Departamento de Química, aos Professores e à UFSCar, por me acolherem desde a graduação e me conduzirem até hoje a uma formação completa e de excelência;

A todos os meus familiares e amigos que torceram para a realização dessa etapa da minha vida;

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Universo que sempre coloca as pessoas certas no meu caminho  
quando eu mais preciso.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3-HB - 3-hidroxi-butanoato

3-HV – 3-hidroxi-valerato

3-HO – 3-hidroxi-octanoato

3-HD – 3-hidroxi-decanoato

3-HBMe - 3-hidroxi-butanoato de metila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BLAST - Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfato

D.O. – Densidade óptica

GC - Cromatografia Gasosa

LB – Luria Bertani

*m/z* - Razão massa/carga

MS - Espectrometria de Massas

NCBI - Centro Nacional de Informação Biotecnológica

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PF – Primer Forward

PHA – Polihidroxi-álcanoato

PHB – Polihidroxi-butirato

PR – Primer Reverse

PTFE – Politetrafluoretileno

SIM - Monitoramento de íons selecionados

TIC - Cromatograma de Íons Totais

T.R. - Tempo de retenção

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Exemplos de termoplásticos e termofixos. Adaptado de PLASTICS EUROPE, 2019.....	2
TABELA 1.2 - Classificação dos plásticos e exemplos de cada categoria. Adaptado de IWATA (2015). ....	5
TABELA 1.3 – Exemplos de PHAs e grupos alquil R correspondentes. ....	10
TABELA 1.4 - Propriedades materiais de duas classes principais de PHAs em comparação com o polipropileno (PP). Adaptado de REHM, 2003.....	11
TABELA 1.5 - Exemplos de PHAs comercialmente importantes para aplicações. Adaptado de SUDESH; IWATA, 2008. ....	12
TABELA 1.6 - Exemplos de microrganismos isolados de diferentes origens com potencial para a produção de PHAs a partir de diferentes fontes de carbono. ...	14
TABELA 3.1 - Equipamentos utilizados. ....	25
TABELA 3.2 - Parâmetros utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR). ....	28
TABELA 3.3 - Parâmetros utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando as enzimas pFU e phu. ....	29
TABELA 3.4 – Concentração das fontes de carbono utilizadas nos ensaios iniciais para avaliar a influência de diferentes meios no crescimento celular e acúmulo de PHA. Ensaios realizados em 100 mL de meio de cultivo.....	30
TABELA 3.5 - Rampa de aquecimento da coluna cromatográfica. ....	34
TABELA 3.6 - Parâmetros de operação do método no cromatógrafo gasoso....	35
TABELA 3.7 – Valores de $m/z$ do analito em estudo e do padrão interno para os íons monitorados. ....	36
TABELA 3.8 - Níveis codificados das variáveis independentes avaliadas no processo de crescimento celular e produção PHAs em meio complexo e glicerol por <i>Delftia</i> sp.....	39

TABELA 3.9 - Níveis codificados das variáveis independentes avaliadas no processo de crescimento celular e produção PHAs em meio soro de leite por <i>Delftia</i> sp. e <i>Aureimonas</i> sp. ....	39
TABELA 4.1 – Informações relativas à quantificação dos DNAs de <i>Delftia</i> sp. e <i>Aureimonas</i> sp. em espectrofotômetro BioSpec-nano®. ....	42
TABELA 4.2 – Características gerais do genoma de <i>Delftia</i> sp. ....	49
TABELA 4.3 - Características gerais do genoma de <i>Aureimonas</i> sp. ....	50
TABELA 4.4 - Genes de <i>Delftia</i> sp. previstos para estarem envolvidos na biossíntese e degradação de PHAs. ....	51
TABELA 4.5 - Genes de <i>Aureimonas</i> sp. previstos para estarem envolvidos na biossíntese e degradação de PHAs. ....	51
TABELA 4.6 – Valores de massa seca celular e composição monomérica dos PHAs produzidos por <i>Delftia</i> sp. cultivada em diferentes meios de cultivo. As células foram cultivadas em 100 mL de cada meio de cultivo acrescidas dos substratos mencionados na Tabela 3.4, durante 72 h à 28°C. ....	62
TABELA 4.7 – Valores de massa seca celular e composição monomérica dos PHAs produzidos por <i>Aureimonas</i> sp. cultivada em diferentes meios de cultivo. As células foram cultivadas em 100 mL de cada meio de cultivo acrescidas dos substratos mencionados na Tabela 3.4, durante 72 h à 28°C. ....	68
TABELA 4.8 - Valores de precisão e exatidão obtidos para o método quantitativo de análise do monômero 3-HB. ....	76
TABELA 4.9 - Matriz do planejamento fatorial contendo as variáveis codificadas e as respostas obtidas para a avaliação de cultivo de <i>Delftia</i> sp. em glicerol em meio complexo e/ou soro de leite. ....	78
TABELA 4.10 - Desejabilidades individuais e globais obtidas para os experimentos usando meio complexo-Glicerol e soro de leite como substratos para <i>Delftia</i> sp. ....	80



TABELA 4.11 - Matriz do planejamento fatorial contendo as variáveis codificadas e as respostas obtidas para a avaliação de cultivo de <i>Aureimonas</i> sp. em soro de leite. ....	84
TABELA 4.12 - Desejabilidades individuais e global obtidas para os experimentos usando soro de leite como substrato para <i>Aureimonas</i> sp.....	85

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Distribuição da demanda de plásticos na Europa por setor e tipo de polímero em 2020. Os setores de embalagens e construção representam o maior uso de plásticos. Adaptado de PLASTICS EUROPE, 2021.....	3
FIGURA 1.2 – Comparação da produção global de bioplásticos em 2021 e uma projeção para o ano de 2026, por tipo de material. Adaptado de EUROPEAN BIOPLASTICS (2021).....	6
FIGURA 1.3 - Estruturas químicas de alguns exemplos de biopolímeros produzidos por bactérias. Adaptado de REHM (2010).....	7
FIGURA 1.4 - Estrutura química dos PHAs.....	9
FIGURA 1.5 – Micrografia eletrônica de transmissão de células recombinantes de <i>R. eutropha</i> PHB <sup>+</sup> 4 contendo grandes quantidades de PHAs. Adaptado de SUDESH; ABE; DOI, 2000.....	10
FIGURA 1.6 – A) Biodegradação de PHA colocado em solo. O filme desapareceu completamente em menos de quatro meses; B) Microscopia eletrônica de varredura mostrando microrganismos de degradação na superfície do PHA. Adaptado de IWATA, 2015. ....	13
FIGURA 1.7 – Representação esquemática das três vias metabólicas de produção de PHAs já identificadas em espécies bacterianas. Adaptado de THOMAS et al., 2019. ....	17
FIGURA 1.8 - Reação de polimerização catalisada por PhaC. Polimerização do substrato, 3-hidroxi-butiril coenzima A (3HB-CoA), em poli 3-hidroxi-butirato (PHB) é catalisada por PhaC com liberação de CoA. Adaptado de CHEK et al., 2017. ....	18
FIGURA 1.9 - Fase larval e adulta do inseto-praga <i>D. speciosa</i> .....	23
FIGURA 3.1 – Reação de metanólise para PHA em condições ácidas.....	33
FIGURA 4.1 – A) Via biossintética principal para produção de PHAs. O PHA é sintetizado em uma via de três etapas pela ação sucessiva das enzimas PhaA, PhaB	

e PhaC. As três enzimas são codificadas pelos genes do operon <i>phbCAB</i> ; B) Exemplos da organização dos principais genes envolvidos na produção de PHAs em diferentes espécies bacterianas. Os genes não necessariamente estão agrupados e sua organização varia de espécie para espécie. Adaptado de MADISON; HUISMAN, 1999. ....	43
FIGURA 4.2 - Gel de agarose obtido após o gradiente de temperatura de reação de PCR para A) <i>Delftia</i> sp.; B) <i>Aureimonas</i> sp.....	44
FIGURA 4.3 - Eletroferograma parcial obtido para o fragmento de interesse de cerca de 3,8 kb da cepa <i>Delftia</i> sp.....	45
FIGURA 4.4 – Resultados do gel de agarose obtido para reações de PCR utilizando as enzimas pFU e phu para <i>Delftia</i> sp. e <i>Aureimonas</i> sp.....	46
FIGURA 4.5 – Representação do processo de amplificação em ponte que ocorre na técnica de sequenciamento genômico utilizando a plataforma Illumina®. Adaptado de GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE (2016). ....	48
FIGURA 4.6 – A) Estrutura tridimensional da enzima PhaC de <i>Chromobacterium</i> sp. USM2 e os sítios ativos envolvidos na polimerização de monômeros para a produção de PHAs (Adaptado de CHEK et al., 2017); B) Mecanismo de reação da enzima PhaC proposto por TIAN; SINSKEY; STUBBE, 2005. ....	53
FIGURA 4.7 – Representação das vias metabólicas de biossíntese e degradação intracelular de PHA. 1: PhaA, $\beta$ -cetotiolase; 2: PhaB, acetoacetil-CoA redutase; 3: PhaC, PHA sintase; 4: PhaZ, PHA depolimerase; 5: (R)-3-hidroxi-butirato desidrogenase; 6: Acetoacetil-CoA sintetase. Adaptado de WANG; LIU, 2014. ....	55
FIGURA 4.8 - Etapas de obtenção de biopolímeros PHAs, desde o cultivo até a etapa de extração. A) Erlenmeyers utilizados para o cultivo celular; B) células precipitadas após centrifugação; C) células após a etapa de liofilização; D) tubos de ensaio contendo células secas para a medida da massa seca celular; E) meio reacional após a extração e derivatização. ....	59

FIGURA 4.9 - Cromatogramas obtidos após metanólise das células de <i>Delftia</i> sp. cultivadas nos meios avaliados. A) Cromatograma de íons totais (TIC); B) Ampliação da região entre 4,5 e 6,75 min, com destaque para o sinal do monômero metilado 3-HBMe (T <sub>R</sub> . 5,49 min). .....	60
FIGURA 4.10 - Espectro de massas e proposta de fragmentação da molécula do monômero metilado, 3-hidroxi-butarato de metila (Adaptado de PERLATTI, 2016).....	61
FIGURA 4.11 - Cromatogramas obtidos após metanólise das células de <i>Aureimonas</i> sp. cultivadas nos meios avaliados. A) Cromatograma de íons totais (TIC); B) Ampliação da região entre 4,5 e 6,75 min, com destaque para o sinal do monômero metilado 3-HBMe (T <sub>R</sub> . 5,49min). .....	67
FIGURA 4.12 - Diagrama esquemático da regulação do metabolismo dos PHAs. Adaptado de VELÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2020. ....	70
FIGURA 4.13 – Cromatograma obtido da solução padrão dos compostos estudados em clorofórmio (T <sub>R</sub> . = 6,00 min – 3-hidroxi-butarato de metila; T <sub>R</sub> . = 7,28 min – 3-hidroxi-valerato de metila; T <sub>R</sub> . = 8,78 min – Benzoato de metila). As condições de análise são apresentadas nas Tabelas 3.5 e 3.6. ....	71
FIGURA 4.14 – Seletividade do método analítico desenvolvido. A) cromatograma do extrato de <i>Delftia</i> sp. antes do processo de secagem do solvente; B) cromatograma do extrato após o processo de secagem, utilizado como matriz; C) exemplos de cromatogramas comparando a seletividade do método desenvolvido para <i>Delftia</i> sp.; D) exemplos de cromatogramas comparando a seletividade do método desenvolvido para <i>Aureimonas</i> sp. ....	73
FIGURA 4.15 - Curvas de calibração referentes ao monômero 3-HB. A) em solvente puro (clorofórmio); B) em matriz (extrato do meio de cultivo LB para <i>Delftia</i> sp. isento do analito). ....	74
FIGURA 4.16 - Gráficos dos efeitos e porcentagem de cada efeito das variáveis sobre o crescimento celular e acúmulo de PHA em <i>Delftia</i> sp. nos meios glicerol	

em meio complexo (A e B) e soro de leite (C e D). V1: concentração do substrato; V2: tempo de cultivo; V3: agitação. ....	81
FIGURA 4.17 - Gráficos dos efeitos e porcentagem de cada efeito das variáveis sobre o crescimento celular e acúmulo de PHA em <i>Aureimonas</i> sp. no meio de cultivo utilizando soro de leite (A e B). V1: concentração do substrato; V2: tempo de cultivo; V3: agitação.....	86
FIGURA 4.18 – Influência do meio de cultivo (glicerol em meio complexo e soro de leite) nas respostas avaliadas para <i>Delftia</i> sp. A) massa seca celular; B) concentração de 3HB; C) rendimento biopolimérico. Os experimentos são referentes aos planejamentos fatoriais apresentados na Tabela 4.9.....	87
FIGURA 4.19 - Influência da cepa bacteriana ( <i>Delftia</i> sp. e <i>Aureimonas</i> sp.) nas respostas avaliadas em meio de cultivo utilizando soro de leite A) massa seca celular; B) concentração de 3HB; C) rendimento biopolimérico. Os experimentos são referentes aos planejamentos fatoriais apresentados nas Tabelas 4.9 e 4.11. ....	88

## RESUMO

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS POLIHIDROXIALCANOATOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO INSETO-PRAGA *Diabrotica speciosa*. Materiais plásticos derivados do petróleo são fundamentais no nosso cotidiano devido às características como resistência e durabilidade. Todavia, o uso indiscriminado desses materiais é um dos grandes responsáveis por problemas ambientais, uma vez que esses materiais não são biodegradáveis e ficam acumulados no ambiente. Biopolímeros produzidos por microrganismos se mostram uma alternativa para substituir os materiais plásticos convencionais, sendo de origem renovável, biodegradáveis e, ainda assim, apresentarem propriedades semelhantes às dos polímeros sintéticos e adequadas para diversas aplicações industriais. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de biopolímeros PHAs por *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp. utilizando diferentes meios de cultivo e substratos, bem como descrever aspectos da organização do genoma dessas cepas com base na produção de PHAs. A análise do genoma das duas bactérias permitiu a identificação de possíveis genes envolvidos na biossíntese de PHAs, como *phaA*, *phaB* e *phaC*. Foi avaliado o comportamento referente ao crescimento celular, produção e composição dos PHAs dessas cepas em diferentes meios de cultura (meio complexo e meio salino) e utilizando diferentes substratos, como soro de leite, glicerol, lignina e óleo vegetal. Os PHAs produzidos para cada condição foram caracterizados em termos de estrutura monomérica e composição por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os resultados mostraram variabilidade na composição monomérica e crescimento celular dependendo do meio de cultivo utilizado, com destaque para o cultivo de *Delftia* sp. em meio complexo com glicerol, que apresentou os monômeros 3-HB, 3-HV, 3-HO e 3-HD no PHA produzido e crescimento celular de 2,34 g/L. Um método analítico foi desenvolvido e validado por GC-MS para a análise quantitativa do monômero 3-HB. Com isso, uma

análise multivariada foi utilizada para determinar as variáveis que mais influenciam o processo de crescimento celular e produção PHAs, com base na seleção das melhores condições estabelecidas na avaliação dos meios de cultivo para cada bactéria. As variáveis concentração de substrato, tempo de cultivo e oxigenação do meio se mostraram influentes sobre o bioprocesso. As melhores condições de cultivo apresentaram valores de 4,30 g/L,  $1,19 \times 10^{-1}$  g/L e 2,77% para crescimento celular, concentração de polímero e rendimento, respectivamente, para *Delftia* sp. em meio complexo com glicerol e 2,60 g/L,  $1,30 \times 10^{-1}$  g/L e 4,98% em meio soro de leite. Para *Aureimonas* sp. cultivada em soro de leite as melhores condições apresentaram valores em torno de 1,51 g/L,  $7,60 \times 10^{-1}$  g/L e 5,05%. Nesse estudo, foi possível perceber o potencial das linhagens em produzir PHAs utilizando diferentes substratos, evidenciando e destacando a possível utilização de fontes de carbono de baixo custo para a produção de moléculas de alto valor agregado.

## ABSTRACT

STUDY OF THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATE BIOPOLYMERS BY BACTERIA ISOLATED FROM THE INSECT PEST *Diabrotica speciosa*. Petroleum-derived plastic materials are fundamental in our daily lives due to characteristics such as strength and durability. However, the indiscriminate use of these materials is one of the main causes of environmental problems, since these materials are not biodegradable and accumulate in the environment. Biopolymers produced by microorganisms are an alternative to replace conventional plastic materials, being of renewable origin, biodegradable and, even so, presenting properties similar to those of synthetic polymers and suitable for several industrial applications. In this context, the objective of this work was to study the production of PHAs biopolymers by *Deftia* sp. and *Aureimonas* sp. using different culture media and substrates, as well as describing aspects of the genome organization of these strains based on the production of PHAs. The analysis of the genome of the two bacteria allowed the identification of possible genes involved in the biosynthesis of PHAs, such as *phaA*, *phaB* and *phaC*. The behavior related to cell growth, production and composition of PHAs of these strains in different culture media (complex medium and saline medium) and using different substrates, such as whey, glycerol, lignin and vegetable oil, was evaluated. The PHAs produced for each condition were characterized in terms of monomeric structure and composition by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The results showed variability in the monomeric composition and cell growth depending on the culture medium used, with emphasis on the cultivation of *Deftia* sp. in complex medium with glycerol, which showed the monomers 3-HB, 3-HV, 3-HO and 3-HD in the PHA produced and cell growth of 2,34 g/L. An analytical method was developed by GC-MS for the quantitative analysis of 3-HB monomer and showed satisfactory results of the validation parameters. With that, a multivariate analysis was used to determine



the variables that most influence the process of cell growth and PHAs production, based on the selection of the best conditions established in the evaluation of the culture media for each bacterium. The variables substrate concentration, cultivation time and oxygenation of the medium were influential on the bioprocess. The best cultivation conditions showed values of 4,30 g/L,  $1,19 \times 10^{-1}$  g/L and 2,77% for cell growth, polymer concentration and yield, respectively, for *Deftia* sp. in complex medium with glycerol and 2,60 g/L,  $1,30 \times 10^{-1}$  g/L and 4.98% in whey medium. For *Aureimonas* sp. grown in whey the best conditions showed values around 1,51 g/L,  $7,60 \times 10^{-1}$  g/L and 5,05%. In this study, it was possible to perceive the potential of the strains to produce PHAs using different substrates, evidencing and highlighting the possible use of low-cost carbon sources for the production of molecules with high added value.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	Plásticos convencionais e seus problemas ambientais.....	1
1.2	Plásticos ecologicamente corretos: os biopolímeros .....	4
1.3	Os Polihidroxicanoatos (PHAs).....	9
1.4	Potencial bacteriano para a produção de PHAs .....	13
1.5	Biossíntese de PHAs e genes envolvidos .....	14
1.6	Fontes alternativas como substrato para a produção de PHAs .....	19
1.7	Microrganismos associados a insetos e seu potencial para a produção de biopolímeros PHAs .....	22
1.8	Inseto-praga <i>D. speciosa</i> .....	23
2	OBJETIVOS .....	24
2.1	Objetivo Central.....	24
2.2	Objetivos Específicos.....	24
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	25
3.1	Equipamentos.....	25
3.2	Seleção e manutenção dos microrganismos.....	26
3.3	Identificação dos genes relacionados à biossíntese de PHAs.....	27
3.3.1	Técnicas moleculares .....	27
3.3.2	Sequenciamento genômico .....	29
3.4	Ensaio em frascos agitados utilizando diferentes fontes de carbono e meios de cultivo .....	30
3.4.1	Ensaio em meio complexo .....	31
3.4.2	Ensaio em meio salino.....	31

3.5	Preparo das amostras para análises de PHAs por GC-MS .....	32
3.6	Análises cromatográficas .....	33
3.6.1	Preparo de soluções padrão.....	33
3.6.2	Análises por GC-MS.....	34
3.6.3	Validação do método analítico .....	36
3.7	Planejamento Fatorial .....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	Identificação dos genes relacionados à biossíntese de PHAs .....	41
4.1.1	Técnicas moleculares .....	41
4.1.2	Sequenciamento genômico - Illumina .....	47
4.2	Efeito de diferentes meios de cultivo no crescimento celular e biossíntese de PHAs.....	58
4.3	Desenvolvimento e validação do método de análise por GC-MS para análises quantitativas.....	70
4.3.1	Seletividade.....	72
4.3.2	Linearidade e efeito de matriz .....	73
4.3.3	Limite de detecção e Limite de quantificação .....	75
4.3.4	Precisão e Exatidão .....	75
4.4	Planejamento Fatorial para o estudo de variáveis e seus efeitos .....	77
5	CONCLUSÕES.....	90
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
7	APÊNDICE .....	105

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Plásticos convencionais e seus problemas ambientais

Desde o início da história, a humanidade tem se empenhado em desenvolver materiais que oferecem benefícios não encontrados em materiais de origem natural. O desenvolvimento de materiais plásticos teve início com a utilização de materiais naturais que apresentavam propriedades plásticas intrínsecas, como a goma-laca e a goma de mascar; e, com base na modificação química de diversos desses materiais, deu-se origem a ampla gama de materiais totalmente sintéticos que conhecemos como plásticos modernos e que começou a ser desenvolvida há cerca de 100 anos (PLASTICS EUROPE, 2019).

Plásticos são, por definição, polímeros sólidos orgânicos amorfos que compreendem uma ampla gama de produtos de polimerização, adequados para a manufatura dos mais diversos produtos (MEKONNEN et al., 2013).

Desde 1970, os plásticos derivados de petróleo (ou seja, tradicionais) têm sido considerados o material mais usado no mundo (SRIRANGAN et al., 2016), sendo amplamente utilizados em diversos setores, como embalagem de alimentos, roupas, abrigo, comunicação, transporte, construção, saúde e indústrias de lazer (IWATA, 2015). O petróleo bruto é uma mistura complexa de milhares de compostos, sendo necessária a separação em frações para o processo de produção dos plásticos. Cada fração é uma mistura de cadeias de hidrocarbonetos que se diferem no tamanho e estrutura de suas moléculas (PLASTICS EUROPE, 2019) e que, sob temperatura e condições controladas, são quebradas em moléculas menores chamadas de monômeros. Esses monômeros são os blocos de construção dos polímeros (HALDEN, 2010). No reator de polimerização, os monômeros, como por exemplo o etileno e propileno, são ligados formando as cadeias poliméricas, sendo que cada polímero tem suas propriedades, estrutura e tamanhos característicos dependendo dos vários tipos de monômeros empregados

(PLASTICS EUROPE, 2019). Como resultado, esses polímeros de origem química apresentam qualidades versáteis como força, leveza, durabilidade e resistência à degradação (LÓPEZ-CUELLAR et al., 2011).

Os plásticos podem ser divididos em duas principais categorias: termoplásticos e termofixos. Um polímero termoplástico é aquele que amolece com o aquecimento e depois endurece novamente com o resfriamento (PLASTICS EUROPE, 2019). As moléculas são mantidas juntas por ligações fracas, criando plásticos que amolecem quando expostos ao calor e voltam à condição original em temperatura ambiente (HALDEN, 2010). Já um polímero termofixo é aquele que se solidifica de forma irreversível uma vez que é aquecido, sendo úteis por sua durabilidade e resistência e, portanto, usados principalmente em automóveis e aplicações de construção (HALDEN, 2010). A Tabela 1.1 mostra exemplos de polímeros termoplásticos e termofixos.

TABELA 1.1 - Exemplos de termoplásticos e termofixos. Adaptado de PLASTICS EUROPE, 2019.

<b>Exemplos de termoplásticos</b>	<b>Exemplos de termofixos</b>
Acrilonitrila butadieno estireno (ABS)	Resina Epóxi (EP)
Policarbonato (PC)	Resina fenol-formaldeído (PF)
Polietileno (PE)	Poliuretano (PUR)
Polietileno tereftalato (PET)	Resina poliéster insaturadas (UP)
Politetrafluoroetileno (PTFE)	
Cloreto de polivinila (PVC)	
Metacrilato de polimetila (PMMA)	
Polipropileno (PP)	
Poliestireno (PS)	

Em 2020, a produção global de plásticos atingiu, em média, 367 milhões de toneladas, sendo só a Europa, responsável por 55 milhões. A Figura 1.1 mostra a distribuição da demanda de plásticos na Europa por setor e por tipo de plástico no ano de 2020.

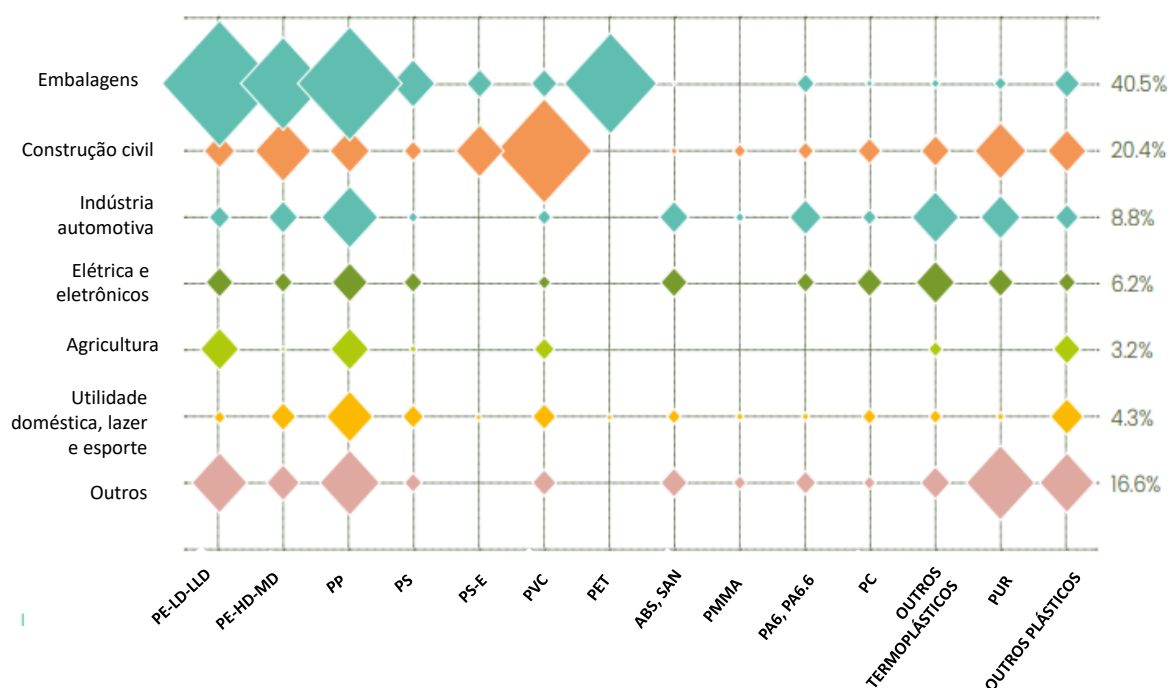


FIGURA 1.1 - Distribuição da demanda de plásticos na Europa por setor e tipo de polímero em 2020. Os setores de embalagens e construção representam o maior uso de plásticos. Adaptado de PLASTICS EUROPE, 2021.

Muitas atividades humanas têm alterado o ecossistema natural, produzindo grandes quantidades de resíduos que estão colocando em risco a sobrevivência de todas as formas de vida na Terra (SUDESH; IWATA, 2008). O tempo útil da maioria desses materiais é muito curto, especialmente quando são usados como embalagens (LÓPEZ-CUELLAR et al., 2011). Assim, o enorme uso de plásticos provenientes do petróleo é a principal causa de poluição ambiental, pois os plásticos são descartados no ambiente e levam anos para se degradarem em monômeros solúveis, além de produzirem vários tipos de gases tóxicos

durante o processo de decomposição (HASSAN et al., 2016). Além disso, existe o desejo crescente de minimizar a dependência do petróleo para necessidades materiais da sociedade devido ao esgotamento antecipado desse recurso fóssil barato em um futuro próximo; sem falar na contribuição do aumento da emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera, que é considerada uma das principais razões do aquecimento global e de mudanças climáticas no planeta, que também é causado pelo uso excessivo do petróleo (SUDESH; IWATA, 2008).

O uso indiscriminado desses materiais sintéticos é um dos grandes responsáveis por sérios problemas ambientais, uma vez que esses materiais não são biodegradáveis e ficam acumulados no ambiente. Isso porque os plásticos à base de petróleo são altamente resistentes à temperatura, pressão, solventes químicos, luz UV, dentre outros fatores que favorecem o uso amplo em todos os campos da indústria (CARDOZO et al., 2016). Assim, há uma demanda crescente por plásticos ecológicos, para que se tenha uma sociedade mais sustentável, solucionando vários dos problemas ambientais e de gestão de resíduos (IWATA, 2015).

## **1.2 Plásticos ecologicamente corretos: os biopolímeros**

Os bioplásticos são uma forma de plástico que podem ser tanto derivados de fontes de biomassa renováveis, como óleos vegetais, amido, proteínas, dentre outras (BUGNICOURT et al., 2014), quanto materiais biodegradáveis, ou seja, quando expostos à determinados microrganismos presentes no ambiente (na água ou no solo, por exemplo) são totalmente degradados e mineralizados a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (REHM, 2010). Em outras palavras, esses materiais são conhecidos como plásticos biobaseados (produzidos a partir de recursos renováveis) e plásticos biodegradáveis (que degradam no meio ambiente) (IWATA, 2015). De forma geral, considerando sua biodegradabilidade

e matérias-primas, os plásticos podem ser classificados em quatro categorias, as quais são mostradas na Tabela 1.2, juntamente com exemplos de cada uma.

TABELA 1.2 - Classificação dos plásticos e exemplos de cada categoria. Adaptado de IWATA (2015).

	Plásticos Biobaseados (Recursos renováveis)	Plásticos à base de petróleo (Recursos fósseis)
Plásticos Biodegradáveis	Poliácido láctico (PLA)	Policaprolactona (PCL)
	Polihidroxialcanoato (PHA)	Polibutileno succinato/adipato (PBS/A)
	Derivados de polissacarídeos (baixo DS*)	Polibutileno adipato-co-tereftalato (PBA/T)
	Poli(aminoácidos)	
Plásticos não- biodegradáveis	Derivados de polissacarídeos (alto DS)	Polietileno (PE)
	Poliuretano polioli	Polipropileno (PP)
	Bio-polietileno (Bio-PE)	Poliestireno (OS)
	Bio-polietileno tereftalato (Bio-PET)	Polietileno tereftalato (PET)

\*DS: grau de substituição

Os materiais biopoliméricos apresentam diversas vantagens em comparação aos polímeros de origem sintética, principalmente no que diz respeito às questões ambientais. Por esse motivo, tecnologias têm sido desenvolvidas e direcionadas para a produção de materiais menos agressivos ao meio ambiente e o mercado hoje é impulsionado pela evolução na ideia desses plásticos ecologicamente corretos.

Atualmente, os plásticos biodegradáveis, dentre eles os PHAs, PLAs, misturas de amido e outros, compreendem juntos mais de 64% (equivalente a mais de 1,5 milhão de toneladas) da capacidade global de produção de bioplásticos (EUROPEAN BIOPLASTICS, 2021). É estimado que a produção de plásticos biodegradáveis deva aumentar para quase 5,3 milhões em 2026, resultado de um grande desenvolvimento de polímeros, como PBAT (polibutileno adipato tereftalato) e PBS (polibutileno succinato), além de um crescimento constante de



ácidos poliláticos (PLAs) (EUROPEAN BIOPLASTICS, 2021). A Figura 1.2 apresenta a comparação da produção global de bioplásticos em 2021 e uma projeção para o ano de 2026 por tipo de material.

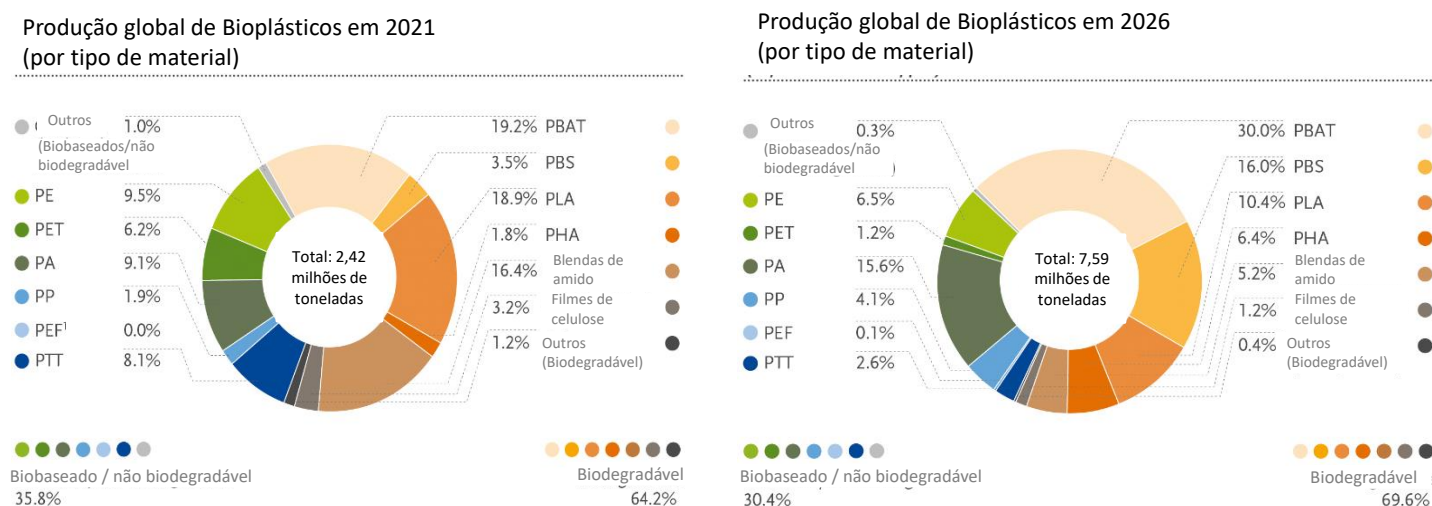


FIGURA 1.2 – Comparação da produção global de bioplásticos em 2021 e uma projeção para o ano de 2026, por tipo de material. Adaptado de EUROPEAN BIOPLASTICS (2021).

Entretanto, apesar de todas as vantagens encontradas nos polímeros biobaseados e biodegradáveis, os quais possuem características que os tornam melhores de um ponto de vista ambiental, quando comparados aos polímeros convencionais, ainda assim apresentam algum problema ambiental associado ao seu desenvolvimento e aplicação (PERLATTI, 2016). Pensando nisso, a utilização de polímeros que apresentem ao mesmo tempo as características de biobaseado e biodegradável consiste na melhor alternativa para um material que cause menor impacto ambiental, tanto na sua produção quanto na sua disposição (PERLATTI, 2016).

Para a produção desses biopolímeros os microrganismos são utilizados como agentes sintetizadores, na maioria dos casos. Desde o início do século XX tecnologias relacionadas à produção microbiana de biomoléculas, tais como enzimas, metabólitos, antibióticos e polímeros têm passado por um grande

avanço (ÖNER, 2013). Além de apresentarem um papel fundamental na transformação de polímeros, através da biodegradação, diversos microrganismos já se mostraram capazes de sintetizar uma grande variedade de materiais biopoliméricos, os quais podem exercer funções biológicas e possuir propriedades adequadas para diversas aplicações industriais (REHM, 2010). A Figura 1.3 ilustra a estrutura química de alguns exemplos de biopolímeros sintetizados por bactérias.

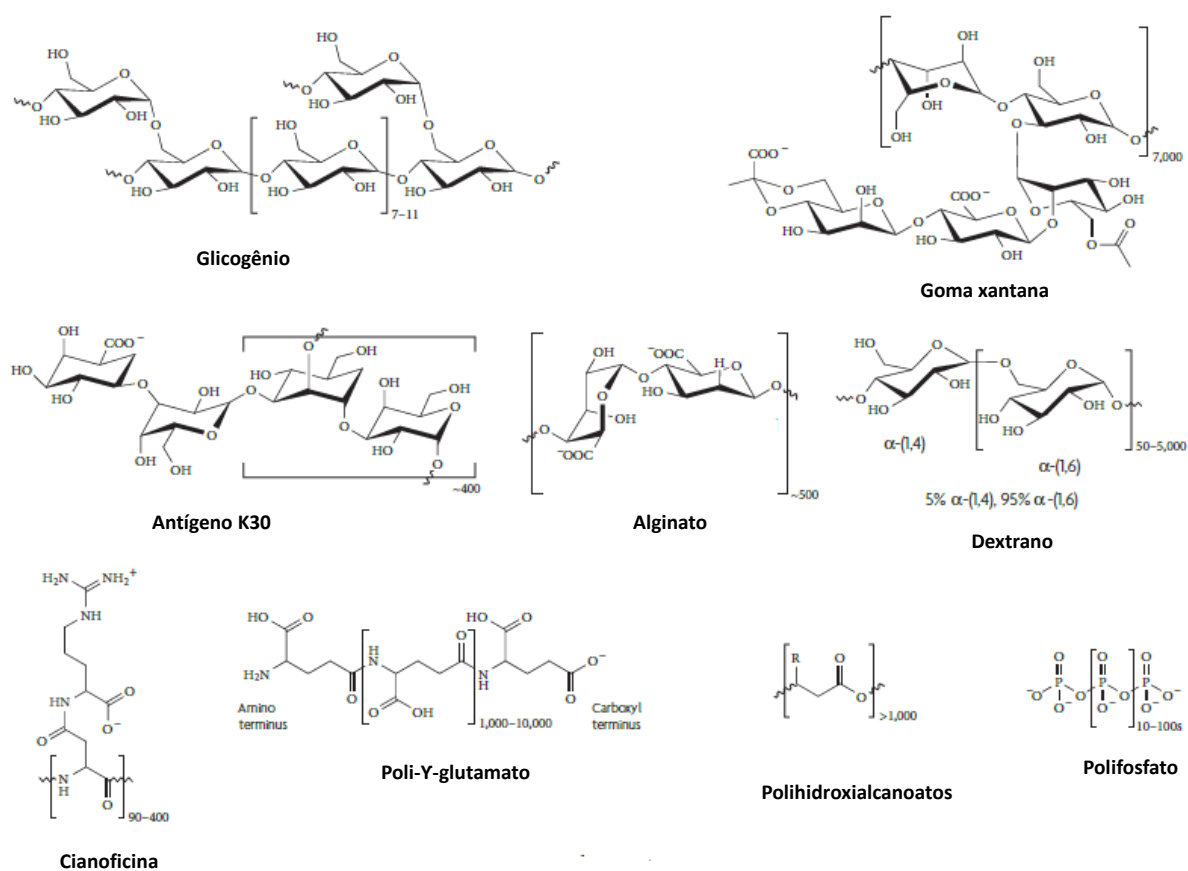


FIGURA 1.3 - Estruturas químicas de alguns exemplos de biopolímeros produzidos por bactérias. Adaptado de REHM (2010).

Dentre as funções biológicas que os biopolímeros exercem nas bactérias, destacam-se como material de reserva energética ou como proteção estrutural, fornecendo vantagens sob determinadas condições ambientais. Desse modo, existem caminhos regulatórios complexos para controlar a biossíntese

desses polímeros, até mesmo os estímulos externos (condições ambientais) estão relacionados com a propriedades do material (REHM, 2010). Os biopolímeros também estão relacionados com a defesa da bactéria contra o ataque de fatores ambientais (JAMIL; AHMED; EDWARDS, 2007). Além disso, os microrganismos geralmente possuem um sistema enzimático seletivo para produção de biomoléculas específicas, que são cultivados em condições brandas, tais como baixas temperaturas, pH fisiológico e água como solvente, eliminando o uso de reagentes e solventes tóxicos (WHITTALL; SUTTON, 2012).

Outra vantagem que torna viável o uso de bactérias para a produção de biopolímeros é que esses organismos são capazes de converter, de forma eficiente, diferentes fontes de carbono em polímeros com um ampla variedade química e propriedades do material (REHM, 2010). Tendo em mente o possível uso de fontes de carbono variáveis como substrato, torna-se possível a exploração de subprodutos de processos industriais na produção de biopolímeros microbianos, como por exemplo, resíduos da indústria de milho, soja, açúcar, biocombustíveis, etc., o que substitui o uso de materiais de origem fóssil (MEEKS et al., 2015).

Com relação à estrutura, os biopolímeros podem ser classificados de acordo com sua composição monomérica, e incluem diversos polissacarídeos, poliamidas (proteínas e ácidos nucleicos), poliisoprenoides (borracha natural), polifosfatos, poliésteres, etc. (JAMIL; AHMED; EDWARDS, 2007), que podem ser produzidos por microrganismos, animais, vegetais, dentre outros. Um exemplo desses poliésteres são os polihidroxicanoatos (PHAs), que são considerados uma boa alternativa dentre outros polímeros biodegradáveis devido à características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, uso de recursos renováveis como matéria-prima e propriedades plásticas e elastoméricas similares aos polímeros de origem petroquímica (KUMBHAKAR; SINGH; VIDYARTHI, 2012). São termoplásticos de origem natural, sendo a maioria de suas aplicações

destinadas à substituição dos polímeros petroquímicos atualmente usados em embalagens e aplicações de revestimento (MADISON; HUISMAN, 1999).

### 1.3 Os Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Os polímeros polihidroxialcanoatos são poliésteres compostos por diversos monômeros de ácidos 3-hidroxialcanóicos, sendo que o grupo carboxila de um dos monômeros forma uma ligação éster com o grupo hidroxila do monômero vizinho (MADISON; HUISMAN, 1999). A Figura 1.4 representa a estrutura química dos PHAs. O grupo alquil R, representado na figura, pode variar de grupos metila (C1) a tridecila (C13) e os ácidos graxos com o grupo hidroxila nas posições 4, 5 ou 6 e os grupos alquila R contendo substituintes ou insaturações também são conhecidos (VERLINDEN et al., 2007). Existe uma enorme variação possível no comprimento e na composição das cadeias laterais desses polímeros, sendo essas variações o que as tornam adequadas para diversas aplicações. Mais de 150 monômeros já foram sintetizados como grânulos no interior das células por diversos microrganismos (KUMAR et al., 2017). Alguns dos PHAs mais comuns, cuja estrutura é representada na Figura 1.4, são mostrados na Tabela 1.3.

Nos PHAs que têm sido caracterizados, o átomo de carbono substituído com uma hidroxila apresentam uma estereoquímica de configuração (R) devido à estereoespecificidade da enzima polimerase, PHA sintase (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

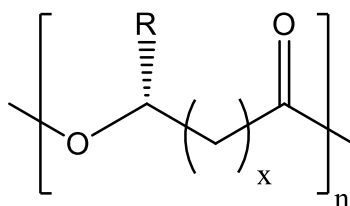


FIGURA 1.4 - Estrutura química dos PHAs.

TABELA 1.3 – Exemplos de PHAs e grupos alquil R correspondentes.

x	Grupo R	Nome completo	Abreviação
1	H	Poli(3-hidroxibpropionato)	PHP
1	CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxibutirato)	PHB
1	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxivalerato)	PHV
1	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxihexanoato)	PHHx
1	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxidedacanoato)	P3HDD
2	H	Poli(4-hidroxibutirato)	P4HB
3	H	Poli(5-hidroxivalerato)	P5HV

Os PHAs podem ser classificados com base no comprimento da cadeia, ou seja, número de carbonos, sendo os PHAs de cadeia média (PHA-*mcl*) aqueles que constituem cadeias carbônicas entre C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, e os PHAs de cadeia curta (PHA-*scl*), que constituem cadeias entre C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> (REHM, 2010).

Também conhecidos como bioplásticos bacterianos, os PHAs se acumulam no interior das células na forma de material de reserva como resultado do excesso de fonte de carbono disponível no meio quando o crescimento é limitado devido à falta de outros nutrientes, como nitrogênio e fósforo (REHM, 2010) e oxigênio (DE PAULA et al., 2017). A Figura 1.5 ilustra os grânulos de PHAs dentro de uma célula bacteriana.

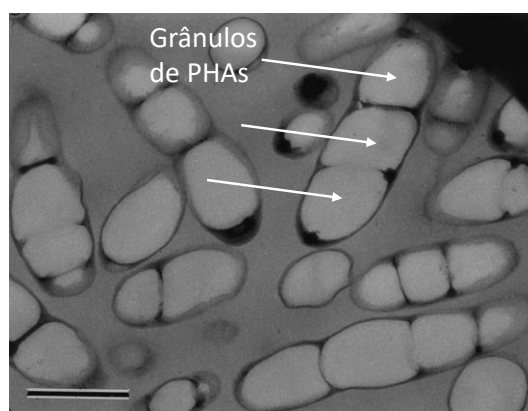


FIGURA 1.5 – Micrografia eletrônica de transmissão de células recombinantes de *R. eutropha* PHB<sup>-4</sup> contendo grandes quantidades de PHAs. Adaptado de SUDESH; ABE; DOI, 2000.

Os PHAs, insolúveis em água, exibem massas moleculares relativamente altas, características termoplásticas e/ou elastoméricas e algumas outras propriedades físicas e materiais interessantes (REHM, 2003) (TABELA 1.4).

TABELA 1.4 - Propriedades materiais de duas classes principais de PHAs em comparação com o polipropileno (PP). Adaptado de REHM, 2003.

Propriedades	PHA <sub>SCL</sub>	PHA <sub>MCL</sub>	Polipropileno
Tm (°C)	177	71	176
Tg (°C)	2	-36	-10
Cristalinidade (%)	70	30	60
Alongamento até a ruptura (%) <sup>5</sup>		300	400

The image shows two chemical structures of polyhydroxyalkanoates (PHAs). The top structure, labeled C3-C5 (SCL), represents a short-chain length PHA with a repeating unit containing a methyl group on the side chain. The bottom structure, labeled C6-C14 (MCL), represents a medium-chain length PHA with a repeating unit containing a longer side chain ending in a methyl group.

Além disso, vários métodos como epoxidação, carboxilação, cloração, hidroxilação e pirólise já foram empregados para modificar as propriedades dos PHAs, o que permite diversas aplicações desses materiais, dentre elas no setor de embalagens, engenharia têxtil, energia, implantes e suturas, sistema de liberação de fármacos, agricultura, etc. (GADGIL; KILLI; RATHNA, 2017). A Tabela 1.5 apresenta alguns exemplos de PHAs comercialmente importantes, bem como informações sobre seus produtores antigos e mais recentes.

TABELA 1.5 - Exemplos de PHAs comercialmente importantes para aplicações. Adaptado de SUDESH; IWATA, 2008.

<b>Categoria</b>	<b>Polímero</b>	<b>Produtor</b>	<b>Nome comercial</b>
Polímero Biosintético	Polihidroxialcanoato	Biomer, Alemanha	Biomer <sup>®</sup>
		Telles, EUA	Mirel <sup>™</sup>
		Mitsubishi Gas, Japão	Biogreen <sup>®</sup>
		PHB Industrial S/A, Brasil	Biocycle <sup>®</sup>
		Metabolix, EUA	Biopol <sup>®</sup>
		Kaneka, Japão	

Um dos benefícios mais importantes desses polímeros biodegradáveis é que eles são totalmente degradados produzindo como resíduos água, dióxido de carbono e metano por muitos microrganismos em condições anaeróbias e em vários ambientes como solo, mar, água de lago e esgoto e, portanto, são facilmente descartados em fluxo de resíduos sem exercer qualquer efeito prejudicial sobre o meio ambiente (SINGH; GOSWAMI; VIDYARTHI, 2015). Na natureza, um vasto consórcio de microrganismos é capaz de degradar PHAs por meio de PHA hidrolases e depolimerases secretadas; e a atividade dessas enzimas pode variar dependendo da composição do polímero, de sua forma física (amorfo ou cristalino), das dimensões e condições ambientais (MADISON; HUISMAN, 1999). Além disso, em condições normais, isto é, na ausência de agentes biológicos, da mesma forma que os polímeros sintéticos, os PHAs praticamente não estão sujeitos à perda de massa (BOYANDIN et al., 2013). A Figura 1.6 mostra a biodegradação de filmes de PHAs em menos de quatro meses em solo.

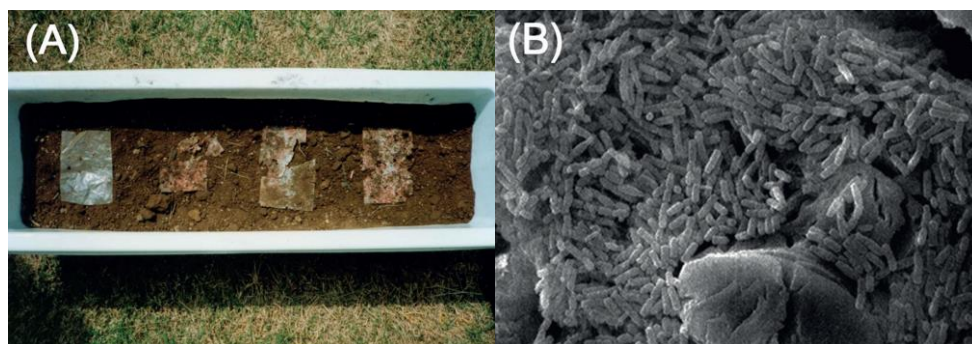


FIGURA 1.6 – A) Biodegradação de PHA colocado em solo. O filme desapareceu completamente em menos de quatro meses; B) Microscopia eletrônica de varredura mostrando microrganismos de degradação na superfície do PHA. Adaptado de IWATA, 2015.

#### **1.4 Potencial bacteriano para a produção de PHAs**

Diversas espécies de bactérias já se mostraram capazes de acumular PHA como material de reserva. O PHA promove a sobrevivência de bactérias a longo prazo sob escassez de nutrientes, atuando como reserva de carbono e energia para uma série de bactérias Gram positivas e Gram negativas (TAN et al., 2014). Para valorizar as grandes quantidades de espécies bacterianas produtoras de PHAs, é necessário isolá-las do ambiente natural e projetar suas cepas genéticas recombinantes (SINGH; GOSWAMI; VIDYARTHI, 2015). A Tabela 1.6 ilustra alguns exemplos de microrganismos produtores de PHAs a partir de diferentes fontes de carbono e a diversidade de locais em que eles podem ser encontrados.



TABELA 1.6 - Exemplos de microrganismos isolados de diferentes origens com potencial para a produção de PHAs a partir de diferentes fontes de carbono.

<b>Microrganismo</b>	<b>Origem</b>	<b>PHA produzido</b>	<b>Substrato</b>	<b>REF.</b>
<i>Bacillus sp.</i>	Amostras de solo	P3HB	Glicose	(HASSAN et al., 2016)
<i>Pseudomonas sp.</i> <b>CMG607w</b>	Sedimento marinho	mcl-PHA	Gluconato	(JAMIL; AHMED; EDWARDS, 2007)
<i>Pandorea sp.</i> <b>MA03</b>	Mata Atlântica	P3HB	Glicerol	(DE PAULA et al., 2017)
<i>Burkholderia</i> <b>VK-12</b>	Nódulos radiculares	P3HB	Sacarose	( KUMBHAKAR et al., 2012)
<i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i> <b>WM001</b>	Solo	P-(3HB-co-3HV)	Glicose	(MA et al., 2018)

Apesar da grande diversidade de espécies já conhecidas para a produção desses materiais, a busca por novas espécies e novos biomas para isolamento desses microrganismos se faz muito necessária. Por exemplo, a procura por coleções de microrganismos com cepas capazes de produzir PHB a partir de sacarose trouxe resultados insatisfatórios, já que algumas cepas eram capazes de utilizar sacarose, mas realizavam a conversão a polímero de modo ineficiente. Outras cepas se mostraram capazes de acumular altas quantidades do polímero de forma eficiente a partir de glicose e frutose, mas não foram capazes de crescer em sacarose (SILVA et al., 2007). Desse modo, o estudo de microrganismos provenientes de um inseto-praga se mostra bastante interessante, pois além da própria produção de biopolímeros degradáveis em si, é possível relacionar o impacto do envolvimento dessas bactérias no processo de digestão do inseto-praga com a relação de simbiose entre esses organismos.

## 1.5 Biossíntese de PHAs e genes envolvidos

A partir de vários estudos envolvendo os diversos genes que codificam enzimas envolvidas na formação dos PHAs, foi ficando mais claro que a natureza aprimorou diferentes caminhos para essa síntese, cada um otimizado

para o nicho ecológico do microrganismo produtor de PHA (MADISON; HUISMAN, 1999).

As propriedades dos polímeros PHAs são dependentes das matérias-primas constituintes da fonte de carbono, das vias metabólicas para a conversão dessas matérias-primas em precursores de PHAs e das atividades específicas e especificidades de substratos e enzimas envolvidas no processo (LU; TAPPEL; NOMURA, 2009). As vias biossintéticas dos PHAs estão intimamente ligadas às vias metabólicas centrais da bactéria, incluindo glicólise, ciclo de Krebs,  $\beta$ -oxidação, catabolismo de aminoácidos, ciclo de Calvin e via da Serina (TAN et al., 2014).

Até hoje, três diferentes rotas metabólicas de biossíntese de PHAs que envolvem moléculas de acetil-CoA ou acil-CoA como intermediários são descritas; sendo essas rotas dependentes tanto da natureza da fonte de carbono empregada, quanto da especificidade da enzima PHA sintase (PhaC) do microrganismo (THOMAS et al., 2019).

A rota I de biossíntese de PHAs, voltada para os polímeros de cadeia curta, envolve a condensação de dois monômeros acetil-CoA (obtidas no processo de glicólise de açúcares), catalisada pela enzima  $\beta$ -cetotiolase (PhaA), também conhecida como 3-cetoacil-CoA tiolase ou acetil-CoA acetiltransferase, com subsequente redução (R)-específica catalisada por acetoacil-CoA redutase (PhaB), levando à formação de (R)-3-hidroxi-butiril-CoA (ou (R)-3-hidroxi-valeril-CoA) (REHM, 2010), que é convertido em PHA pela polihidroxi-alcanoato sintase (PhaC) (THOMAS et al., 2019) (Figura 1.7). A incorporação de outros monômeros de cadeia curta, como por exemplo o 3-hidroxi-valerato (3HV) ou 4-hidroxi-butirato (4HB) aos PHAs pode fornecer melhorias relacionadas às propriedades físicas do polímero, e essas melhorias ampliam o número de aplicações nas quais os polímeros de cadeia curta podem ser usados (LU; TAPPEL; NOMURA, 2009).

A rota II é derivada da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Diversos monômeros podem ser incorporados ao polímero PHA através da suplementação do meio de cultivo com substratos relacionados ao monômero precursor, sendo esses precursores relacionados geralmente à variedades de ácidos graxos que podem ser processados em monômeros de PHA através da atividade enzimática via  $\beta$ -oxidação (LU; TAPPEL; NOMURA, 2009). A biossíntese dos PHAs de cadeia média recruta enzimas específicas como a enzima específica (R)-enoil-CoA hidratase (PhaJ) e (R)-3-hidroxiacil ACP: CoA transacilase (PhaG) para desviar intermediários do metabolismo de ácidos graxos (tais como enoil-CoA e proteína transportadora (R) -3-hidroxiacil acila (ACP)) para as vias de biossíntese de precursores (FUKUI; SHIOMI; DOI, 1998; REHM; KRÜGER; STEINBÜCHEL, 1998). Conseqüentemente, a molécula 3-hidroxiacil-CoA é usada pela PHA sintase para a síntese de PHAs.

Finalmente, a rota III envolve a conversão da proteína transportadora 3-hidroxiacila (ACP), derivada da síntese de ácidos graxos a partir de açúcares, para 3-hidroxiacil através da 3-hidroxiacil-ACP-CoA transferase, seguido pela síntese de PHA pela PHA sintase (THOMAS et al., 2019).

A Figura 1.7 ilustra as rotas biossintéticas descritas envolvidas na formação dos PHAs por bactérias.

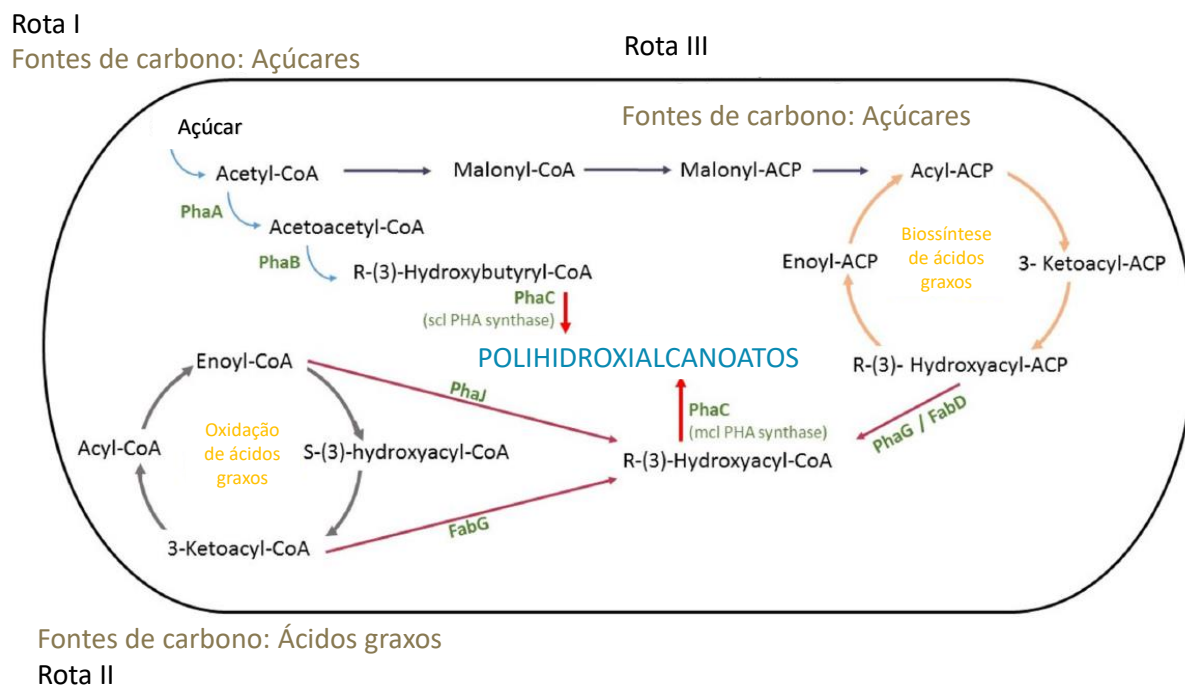


FIGURA 1.7 – Representação esquemática das três vias metabólicas de produção de PHAs já identificadas em espécies bacterianas. Adaptado de THOMAS et al., 2019.

A PHA sintase (PhaC) é a enzima chave envolvida na biossíntese de PHAs e funciona atuando na polimerização de substratos de monômeros de hidroxialcanoatos (CHEK et al., 2017). A Figura 1.8 ilustra uma reação de polimerização catalisada pela enzima. A PhaC pertence à família de enzimas  $\alpha / \beta$  hidrolases e catalisa a conversão estereosseletiva do precursor ativado (R)-3-hidroxiacil-CoA para polioxoésteres, com a liberação concomitante de CoA (REHM, 2003).

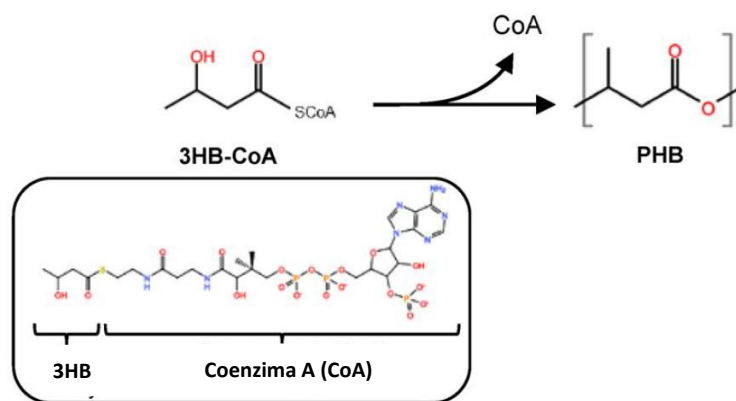


FIGURA 1.8 - Reação de polimerização catalisada por PhaC. Polimerização do substrato, 3-hidroxibutiril coenzima A (3HB-CoA), em poli 3-hidroxilbutirato (PHB) é catalisada por PhaC com liberação de CoA. Adaptado de CHEK et al., 2017.

Um número notável de genes da PHA sintase foram clonados e sequenciados a partir de bactérias e várias outras sequências de sintase homólogas que podem ser encontradas nos genomas em bancos de dados (FAVARO; BASAGLIA; CASELLA, 2019). O alinhamento múltiplo das estruturas primárias dessas PHA sintases mostrou uma identidade geral de 8-96% com apenas oito resíduos de aminoácidos estritamente conservados (REHM, 2003). A ampla variedade de microrganismos produtores de PHA representaria um vasto espectro de condições intracelulares às quais essas enzimas teriam que ser adaptadas. Isso poderia explicar o baixo nível de identidade geral de sequência conservada entre as diferentes PHA polimerases (MADISON; HUISMAN, 1999).

As PHA sintases compreendem uma família de enzimas com características únicas, principalmente considerando o papel funcional na biogênese das estruturas subcelulares insolúveis em água denominadas grânulos de PHA e a associação com uma monocamada de fosfolipídios (REHM, 2003).

Essas enzimas são divididas em quatro classes. As PHA sintases pertencentes às classes I e II compreendem enzimas com apenas um tipo de subunidade (PhaC); as de classe I (presentes em *Cupriavidus necator*, por exemplo) utilizam especificamente substratos de três à cinco átomos de carbono

e são responsáveis pela produção de PHAs de cadeia curta (PHA-*scl*), enquanto as de classe II (que podem ser encontradas, por exemplo, em espécies de *Pseudomonas aeruginosa*) incorporam preferencialmente substratos com seis à 14 átomos de carbono e são responsáveis por produzir os PHAs de cadeia média (PHA-*mcl*) (REHM, 2003; THOMAS et al., 2019). As PHA sintases de classes III e IV são compostas por dois genes, *phaC-phaE* e *phaC-phaR*, respectivamente (CHEK et al., 2017). As de classe III possuem especificidade por substratos de três a cinco átomos de carbono, assim como as de classe I, mas também são capazes de sintetizar PHAs com seis à oito átomos (THOMAS et al., 2019). As de classe IV (presentes em *Bacillus megaterium*) são semelhantes às sintases de classe III, mas a PhaE é substituída pela PhaR (REHM, 2003).

## **1.6 Fontes alternativas como substrato para a produção de PHAs**

Atualmente a produção comercial de PHA utiliza matérias-primas e produtos químicos caros como fontes de matéria orgânica, o que acarreta altos custos de produção em escala industrial (RODRIGUEZ-PEREZ et al., 2018). O custo total para produção de PHAs depende dos microrganismos envolvidos (rendimento e produtividade), das fontes de carbono e nitrogênio (substratos), das condições de fermentação (temperatura, aeração, pH) e dos processos de recuperação e purificação (CAMPOS et al., 2014). À medida que o processo é ampliado, a fonte de carbono pode representar até 50% do custo total, portanto a viabilidade econômica da produção de PHA requer o desenvolvimento de sistemas biotecnológicos eficientes com processos que usam fontes de carbono de baixo custo (FAVARO; BASAGLIA; CASELLA, 2019). O desenvolvimento de bioprocessos viáveis para a produção de plásticos biodegradáveis a partir de recursos renováveis de baixo custo é possível com a utilização de resíduos da indústria de alimentos e de produtos agrícolas como substrato (SINGH; GOSWAMI; VIDYARTHI, 2015).

O uso de soro, resíduo da indústria alimentícia, como fonte de carbono para a produção de PHA tem sido explorado por muitos pesquisadores, já que somente um número limitado de cepas bacterianas é capaz de converter diretamente lactose em PHB. OBRUCA et al. (2011) estudaram a conversão direta do soro obtido na produção de queijo em PHB utilizando a bactéria *Bacillus megaterium* CCM 2037. Após a otimização da composição do meio, foram obtidos rendimentos de 2,82 e 1,05 g/L para biomassa e PHB, respectivamente. KOLLER et al. (2008) estudaram a capacidade de *Pseudomonas hydrogenovora* DSM 1749 em produzir o copolímero poli-(3HB-co-21%3HV) a partir de soro e o precursor valerato, acumulando uma concentração máxima de polímero de 1,44 g/L.

Quantidades consideráveis de resíduos ricos em lipídios são produzidos por diversas atividades industriais, além de enormes quantidades de resíduos de óleo de cozinha e gorduras animais são gerados diariamente em todo o mundo. A comparação dos rendimentos de PHA a partir de óleos e ácidos graxos (>0,65% g PHA g<sup>-1</sup> fonte de carbono) com aqueles a partir de glicose (0,32-0,48 g PHA g<sup>-1</sup> glicose) sugerem que diversos lipídios de diferentes origens podem ser explorados como substratos para a produção de PHAs (RIEDEL et al., 2014). LÓPEZ-CUELLAR et al. (2011) identificaram *Waustersia eutropha* como sendo capaz de sintetizar PHAs de cadeia média quando usado óleo de canola como fonte de carbono. O polímero produzido apresentou quatro monômeros em sua composição, sendo eles identificados como 3-hidroxibutirato (3HB), 3-hidroxivalerato (3HV), 3-hidroxiocetanoato (3HO) e 3-hidroxidodecanoato (3HDD). Uma concentração final de 18,27 g/L de produto foi atingida após 40 h de fermentação em biorreator. VERLINDEN et al. (2011) realizaram estudos de fermentação em pequena escala com a cepa *Cupriavidus necator* usando diferentes concentrações de óleo vegetal puro, óleo vegetal aquecido e resíduo de óleo usado em fritura. Como resultado, foi observado que a concentração de PHB obtida com óleo de fritura foi de 1,2 g/L, similar à concentração obtida utilizando

glicose como substrato e maior que as concentrações obtidas com óleo vegetal puro, mostrando esse resíduo como uma alternativa ao uso de glicose e óleo vegetal puro.

Devido à presença de glicerol na natureza, uma grande diversidade de microrganismos é capaz de utilizá-lo como fonte de carbono em seu metabolismo. Muitas delas ainda são capazes de acumular PHAs em suas células. O glicerol é um subproduto da hidrólise de gordura da fabricação de sabão e também é gerado em grandes quantidades como resíduo principal da produção de biodiesel. Para se ter ideia da dimensão gerada, o glicerol bruto produzido por reações de transesterificação é de aproximadamente 10% do peso final do biodiesel (FAVARO; BASAGLIA; CASELLA, 2019). DE PAULA et al. (2019) isolaram uma nova bactéria identificada como *Burkholderia glumae* MA13 de amostras de solo da mata Atlântica para a produção de PHA utilizando glicerol bruto, além de óleo de cozinha e melado de cana-de-açúcar, mostrando um acúmulo intracelular de P3HB de 51,3; 51,4 e 49% com relação à massa seca celular, respectivamente.

Segundo FAVARO; BASAGLIA; CASELLA (2019), para que seja alcançada uma produção de PHAs em larga escala com alto custo-benefício, pesquisas ainda são necessárias focadas em estratégias como (i) a busca por novas cepas naturais capazes de converterem de forma eficiente os subprodutos em questão em PHAs, sob condições mais realistas; (ii) a engenharia de microrganismos que podem produzir PHAs com alta eficiência; ou (iii) a engenharia da bactéria que é naturalmente capaz de utilizar fontes de carbono simples e complexas mas não são capazes de produzir PHAs.



## **1.7 Microrganismos associados a insetos e seu potencial para a produção de biopolímeros PHAs**

Como já visto, os microrganismos capazes de produzir PHAs têm sido encontrados e isolados de diversos biomas, como sedimentos, plantas, ambientes marinhos, etc. Uma outra fonte que apresenta uma microbiota diversificada e pouco explorada são os insetos.

O sucesso evolucionário dos insetos tem sido atribuído ao fato de serem capazes de ocupar uma grande diversidade de habitats terrestres, sendo alguns deles fortemente limitados em nutrientes ou providos apenas de fontes de alimentos não-balanceados (FELDHAAR; GROSS, 2009). No entanto, ter a capacidade de se alimentar de fontes altamente diversificadas requer especializações morfológicas e fisiológicas (COLL; GUERSHON, 2002). Uma via de evolução alternativa foi a exploração do potencial metabólico de microrganismos associados à insetos, tornando-os capazes de se especializarem em fontes de alimentos não-balanceados; ricos em certos nutrientes, mas deficientes em outros (BAUMANN, 2005). Dentre diversos organismos multicelulares, os insetos formam um grupo que possui inúmeras relações de associação com microrganismos, inclusive bactérias que vivem exclusivamente dentro do hospedeiro, podendo ser transmitidos de geração para geração (transmissão vertical) (WERNEGREN, 2004). O corpo desses organismos multicelulares serve como um importante habitat para microrganismos, pois são estáveis, persistentes e ricos em nutrientes (MORAN, 2006).

É notável uma grande diversidade metabólica e de espécies, o que faz desse ambiente uma alternativa para a exploração de novos organismos com potencial biotecnológico. Desse modo, visto que os testes iniciais realizados pelo grupo de pesquisa se mostraram promissores, mesmo sem um controle rigoroso das condições de produção, foi possível obter polihidroxicanoatos de interesse industrial.

## 1.8 Inseto-praga *D. speciosa*

*Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) é um inseto-praga de grande importância na América Latina, sendo responsável por causar grandes danos em várias espécies de vegetais (VENTURA et al., 2001). Esse inseto se caracteriza por ser uma praga polífaga e se distribui por diversos estados brasileiros e alguns países da América do Sul (VIANA, 2010), sendo uma das dez espécies de pragas de maiores danos agrícolas no Brasil (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009). Os principais danos são causados na fase larval desse inseto. A larva possui hábitos subterrâneos que prejudicam o sistema radicular de plantas como milho, trigo e outros cereais (VIANA, 2010). O inseto adulto possui coloração verde, três manchas amarelas em cada élitro e cabeça marrom, sendo conhecida popularmente como “patriota” e “vaquinha” (VIANA, 2010) (Figura 1.9) e ataca a folhagem das plantas.



FIGURA 1.9 - Fase larval e adulta do inseto-praga *D. speciosa*.

Esse inseto se mostra como uma fonte de microrganismos muito diversificada e que pode ser ricamente estudada. Trabalhos anteriores do grupo comprovam isso, pois foram isolados um total de 79 bactérias e 14 fungos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Central

O presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de biopolímeros polihidroxialcanoatos (PHAs) pelas bactérias *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp., previamente isoladas do trato gastrointestinal do inseto-praga *Diabrotica speciosa*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os principais genes envolvidos na produção de PHAs pelas cepas bacterianas estudadas;
- Avaliar diferentes fontes de carbono para o cultivo microbiano e biossíntese de biopolímeros PHAs, principalmente resíduos do setor industrial, como soro de leite, glicerol, lignina e óleo vegetal;
- Identificar a composição monomérica dos PHAs através de análises por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas;
- Desenvolver e validar um método analítico para a análise quantitativa do monômero 3-HB;
- Utilizar ferramentas quimiométricas para avaliar as principais variáveis responsáveis pelo crescimento celular e biossíntese de PHAs, bem como condições para a otimização do processo por meio do Planejamento Fatorial Completo.

### 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Equipamentos

Na Tabela 3.1 são apresentados os equipamentos utilizados durante a realização desse trabalho.

TABELA 3.1 - Equipamentos utilizados.

<b>Equipamento</b>	<b>Marca e modelo</b>
Autoclave vertical	Phoenix Luferco <sup>®</sup>
Capela de fluxo laminar vertical	Bio SEG <sup>®</sup> 09
Ultrafreezer	Sanyo <sup>®</sup> MDF-U56VC
Estufa incubadora (B.O.D)	Solab <sup>®</sup> SL200
Agitador orbital	TECNAL <sup>®</sup> TE-421
Balança analítica	BEL engineering <sup>®</sup> Classe II
Centrífuga	Eppendorf <sup>®</sup> Centrifuge 5804 R
Liofilizador	Modulyo <sup>®</sup>
Banho seco com agitação	KASVI <sup>®</sup> K80200
Vórtex	IKA <sup>®</sup> LabDancer
Espectrofotômetro UV/Vis	Shimadzu BioSpec-Nano <sup>®</sup>
Termociclador	Bio-Rad <sup>®</sup> T100

### 3.2 Seleção e manutenção dos microrganismos

Os microrganismos utilizados nesse estudo foram isolados do trato digestivo das larvas do inseto *Diabrotica speciosa* por LUIZ (2014).

Uma das grandes vantagens dessa microbiota é que vários subprodutos agroindustriais podem ser metabolizados pelos microrganismos isolados, uma vez que fazem parte da cadeia alimentar do inseto. A seleção das bactérias utilizadas nesse estudo foi baseada em trabalhos já iniciados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar que, além de demonstrarem potencial para a produção de PHAs, se mostraram capazes de produzi-los a partir de fontes de carbono variadas (DENADAE, 2018; PERLATTI, 2016). As cepas nativas, designadas DsA.N049 e DsA.N042, tiveram sua identificação taxonômica determinada a nível de gênero com base na semelhança da sequência do gene rDNA 16S e na análise do perfil de ácidos graxos e mostraram-se pertencer aos gêneros *Delftia* e *Aureimonas*, respectivamente (DENADAE, 2018).

Para a manutenção das cepas dos microrganismos, após o isolamento, foram preservados em criotubos estéreis contendo meio LB (extrato de levedura 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; triptona 10,0 g/L; Accumedia) e 50% (v/v) de glicerol (Synth) e armazenados em ultrafreezer a -80°C. A reativação dos microrganismos criopreservados foi feita por semeadura por estrias em superfície em placas de ágar nutriente (extrato de carne 1,0 g/L, extrato de levedura 2,0 g/L, peptona 5,0 g/L, cloreto de sódio 5,0 g/L e ágar 15,0 g/L; Accumedia) e incubadas em estufa B.O.D. a 28°C por aproximadamente 48 h. As placas contendo as colônias crescidas foram armazenadas a 4°C e repicadas para uma nova placa a cada duas semanas.

### 3.3 Identificação dos genes relacionados à biossíntese de PHAs

#### 3.3.1 Técnicas moleculares

Inicialmente, foram realizadas tentativas para a identificação dos principais genes relativos à produção de PHAs por meio de técnicas moleculares. Os procedimentos foram executados de maneira idêntica para ambas as bactérias estudadas. Para isso, uma colônia de cada cepa foi inoculada em tubo falcon (50 mL) contendo aproximadamente 15 mL de meio de cultivo LB e mantidas sob agitação de 125 rpm, por cerca de 15 h a temperatura de 28°C. Após o crescimento, o meio de cultivo foi centrifugado ( $12.860 \times g$ , 4°C, 10 min) para a precipitação das células e o sobrenadante foi removido. As etapas de extração e purificação do DNA genômico foram feitas utilizando-se o kit *Bacteria DNA Preparation Kit* (Cellco, Brasil), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. O DNA extraído e purificado foi então quantificado por espectrofotometria pelo BioSpec-Nano. Para as reações de PCR foram utilizados o DNA purificado, água livre de nucleases, os *primers Forward* e *Reverse* (Exxtend, Campinas, Brasil) e o reagente PCR Master Mix<sup>®</sup> (Promega Corporation), composto por uma mistura de Taq DNA Polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> e tampão. O desenho dos *primers*, *phaCAB-F* (5'-CGAACAAGGATGCAGCATGAA-3') e *phaCAB-R* (5'-TCCTTTGCAGCGCGAACC-3'), foi feito com base em regiões consenso entre seis genes de confirmação de *Delftia* spp. que produzem as enzimas-alvo. Os reagentes, as concentrações e as condições do termociclador, utilizadas em cada reação são apresentados na Tabela 3.2.

TABELA 3.2 - Parâmetros utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Programação do termociclador		Reagentes	Volume
95°C	30 s	Taq <sup>®</sup> 2X Master Mix	12,5 µL
95°C	30 s	<i>Primer</i> direto (5 µM)	0,5 µL
45 – 68°C	60 s	<i>Primer</i> reverso (5 µM)	0,5 µL
68°C	6 min	DNA genômico (80 ng/µL)	1,0 µL
68°C	5 min	Água <i>nuclease-free</i>	10,5 µL
4°C	∞	Volume final	25,0 µL

Após a reação de PCR e amplificação dos fragmentos, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%, m/v) (Sigma-Aldrich) e a cada reação foram adicionados 5 µL do corante *Orange Dye* (Sigma-Aldrich) e aplicados em poços na cuba de eletroforese. As reações otimizadas foram realizadas em quintuplicata para a obtenção de material suficiente para sequenciamento. O tampão condutor utilizado foi Tris-acetato-EDTA (1×) com pH = 8,0 e voltagem aplicada para separação das bandas de 120 V. A análise das bandas foi feita em transiluminador e as possíveis bandas de interesse foram recortadas do gel e purificadas com o kit *Agarose Gel Extraction Kit<sup>®</sup>* (Cellco, Brasil) seguindo o protocolo do fabricante. Os produtos das reações foram quantificados e a concentração ajustada para 75 ng/µL, juntamente com os *primers* para serem enviados ao Instituto de Biociências da USP (São Paulo) para sequenciamento. As sequências resultantes (*forward* e *reverse*) finais foram alinhadas com as do banco de dados do GenBank (NCBI) pelo algoritmo BLAST (ferramenta Blastn) para avaliação da similaridade entre elas.

Na tentativa de serem obtidas melhor qualidade de sequenciamento, foram testadas as polimerases *Pfu DNA Polymerase<sup>®</sup>* (Cellco, Brasil) (pFU) e *Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) (phu). Para essas reações, além das enzimas, foram adicionados desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) (Sigma-Aldrich), tampão Tris-HCl

0,02 mol/L, pH 8,3 com 0,1 mol/L KCl (Sigma -Aldrich) e água autoclavada livre de nucleases. As condições de reação são apresentadas na Tabela 3.3.

TABELA 3.3 - Parâmetros utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando as enzimas pFU e phu.

Programação do termociclador		Reagentes	Volume
		Polimerase Pfu/Phusion	0,25 µL
95°C	30 s	<i>Primer</i> direto (5 µM)	0,40 µL
95°C	30 s	<i>Primer</i> reverso (5 µM)	0,40 µL
58,8°C	60 s	DNA genômico (82-190 ng/µL) Água <i>nuclease-free</i> dnTp (10mM) Tampão	1,00 µL 6,75 µL 0,20 µL 1,00 µL
72°C	3 min		
72°C	6 min		
4°C	∞		
		Volume final	10,00 µL

### 3.3.2 Sequenciamento genômico

O sequenciamento genômico das cepas foi realizado usando a plataforma *Illumina*®. Inicialmente, foi realizada a extração do DNA genômico, da mesma maneira descrita no item 3.3.1. e após a obtenção do DNA purificado e sua rehidratação, as amostras foram conduzidas para serem sequenciadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar, sob supervisão do Prof. Dr. Flávio Henrique Silva. Para a realização do sequenciamento genômico, foi utilizado um sequenciador NextSeq®550.

As etapas de pré-processamento, montagem e anotação dos genomas foram realizadas em parceria com o Dr. Célio Santos Dias Júnior. Para isso, diferentes réplicas de sequenciamento para cada genoma foram mescladas e a qualidade das leituras foi controlada usando Trimmomatic e avaliada usando a ferramenta FastQC. As leituras foram montadas usando Skesa e Megahit com comprimento mínimo de contig de 250. As montagens foram usadas par-a-par



para produzir um *scaffold* com o *software* Medusa, e o melhor *scaffold* foi escolhido com o *software* MetaQUAST. Os genes foram anotados pelo Prokka usando diferentes bancos de dados, entre eles: ISFinder, NCBI Bacterial ARGs collection, Uniprot KB, HAMAP e PFAM. A completude do genoma e a contaminação foram avaliadas usando CheckM.

### 3.4 Ensaios em frascos agitados utilizando diferentes fontes de carbono e meios de cultivo

Os meios de cultivo e as fontes de carbono utilizadas para a avaliação do crescimento celular e acúmulo de PHA para as duas cepas bacterianas foram selecionadas com base em trabalhos já reportados. As condições utilizadas para cada experimento são apresentadas na Tabela 3.4.

TABELA 3.4 – Concentração das fontes de carbono utilizadas nos ensaios iniciais para avaliar a influência de diferentes meios no crescimento celular e acúmulo de PHA. Ensaios realizados em 100 mL de meio de cultivo.

Fonte de carbono	Concentração (g/L)	Referência
Soro de leite	5% (v/v) – <i>Delftia</i> sp.	(DENADAE, 2018)
	10% (v/v) – <i>Aureimonas</i> sp.	
Glicerol	6% (v/v) – <i>Delftia</i> sp.	(DENADAE, 2018)
	2% (v/v) – <i>Aureimonas</i> sp.	
Óleo vegetal	2% (m/v)	(VERLINDEN et al., 2011)
Lignina	2 g/L	(KUMAR et al., 2017)

Dentre os substratos utilizados, o glicerol foi adquirido de fornecedor local, de grau P.A. (Synth), o soro de leite foi fornecido pelo laticínio Bonura (São Carlos), a lignina foi fornecida pela Suzano (São Paulo) e o óleo vegetal de soja comprado em mercado local (Concordia®). Todos os substratos foram

autoclavados (121°C e 1 atm durante 20 min) separadamente antes de serem adicionados aos respectivos meios de cultivo.

### 3.4.1 Ensaio em meio complexo

Para avaliar as diferentes fontes de carbono na produção de PHAs, as duas cepas estudadas foram inicialmente reativadas conforme descrito no item 3.2. Após o crescimento de colônias bem isoladas em placa de Petri®, uma colônia de cada cepa foi pré-inoculada em aproximadamente 10 mL de meio LB estéril e mantida em incubadora orbital a 28°C e 125 rpm durante aproximadamente 15 e 48 h para *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp., respectivamente. Após crescimento vigoroso, 1 mL do pré-inóculo (1% v/v; D.O. 0,7), foi inoculado em frascos *erlenmeyers* de 500 mL contendo 100 mL de meio LB acrescidos com os respectivos substratos a serem avaliados descritos na Tabela 3.4. Cada experimento foi mantido em incubadora orbital a 28°C e 125 rpm durante 72 h.

### 3.4.2 Ensaio em meio salino

Para a avaliação das diferentes fontes de carbono na produção de PHAs em meio salino, foi utilizado o meio descrito por FUKUDA; NAGATA; TANIGUCHI (2002), composto por 3,39 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 g/L de NaCl, 0,5 g/L de NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01 g/L de CaCl<sub>2</sub> e 0,001 g/L de FeSO<sub>4</sub> (Synth) e o pH foi ajustado para 7,0. O meio de cultivo foi autoclavado e as soluções de CaCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O foram esterilizadas separadamente e adicionadas ao meio salino após atingida a temperatura ambiente. Uma solução de FeSO<sub>4</sub> foi preparada e filtrada em filtro estéril com membrana PTFE® e poro de 0,22 µm e adicionada ao meio salino. Da

mesma forma como foi descrito no item anterior (3.4.1) as fontes de carbono foram acrescentadas ao meio salino nas concentrações apresentadas na Tabela 3.4.

### **3.5 Preparo das amostras para análises de PHAs por GC-MS**

Após o período de crescimento, o caldo de fermentação de cada experimento foi centrifugado ( $12.860 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min) e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com água destilada, centrifugadas novamente sob as mesmas condições e finalmente ressuspendidas em 1 mL de água destilada e liofilizadas por aproximadamente 15 h. Após essa etapa, foi estimada a massa celular seca para cada experimento através da pesagem em tubos de ensaio com tampa de rosca.

Para que os monômeros constituintes dos polímeros obtidos fossem identificados, as amostras de massa seca celular foram submetidas aos processos de extração e derivatização de forma simultânea, para a obtenção de moléculas compatíveis com a análise pela técnica de GC-MS. Um esquema da reação de metanólise é apresentado na Figura 3.1. Os procedimentos foram seguidos de acordo com o método descrito por BRAUNEGG; SONNLEITNER; LAFFERTTY (1978), com modificações. Para o preparo da reação, o conteúdo celular (no caso dos experimentos de triagem) ou entre 10-20 mg (experimentos quantitativos) de massa celular seca foram transferidos para tubos de ensaio com tampa de rosca (10 cm x 1 cm, 8 mL) e adicionados 2 mL de clorofórmio (Honeywell) e 2 mL de metanol (Honeywell) acidificado com 20% (v/v) de ácido sulfúrico (Synth). As reações foram conduzidas a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 3,5 h em banho seco para a conversão do PHA em monômeros de ésteres de hidroxiacil metilados. Após esse tempo as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e lavadas com 2 mL de água destilada por duas vezes para a retirada de componentes miscíveis em metanol, como ácido sulfúrico e ácidos graxos, o que levou a separação das fases inferior orgânica e superior aquosa. Por fim, a fase orgânica

contendo os produtos da reação foi seca com sulfato de sódio anidro, para eliminar qualquer resquício de água, e filtrada em filtro PTFE® (0,22 µm) diretamente nos *vials* para posterior análise em GC-MS. A cada amostra foi adicionado benzoato de metila previamente derivatizado, como padrão interno.

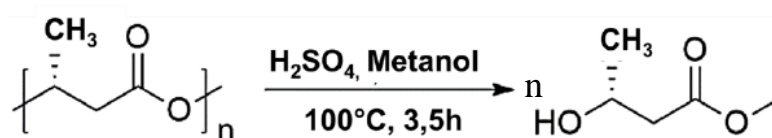


FIGURA 3.1 – Reação de metanólise para PHA em condições ácidas.

## 3.6 Análises cromatográficas

### 3.6.1 Preparo de soluções padrão

Inicialmente, foram preparadas a Solução Estoque (SE) e as Soluções Trabalho (ST) com o padrão do monômero metilado estudado. Para isso, uma quantidade conhecida do padrão foi adicionada em um balão volumétrico e o volume completado com clorofórmio grau HPLC, a fim de se obter uma solução na concentração de 10 mg/mL (SE). Essa solução foi diluída sucessivas vezes para a obtenção das ST nas concentrações de 1,0 e 0,1 mg/mL.

Para a avaliação do efeito de matriz, a solução estoque e, conseqüentemente, as soluções trabalho foram preparadas utilizando-se o extrato bacteriano cultivado em meio LB como diluente, nas mesmas concentrações utilizadas em solvente puro. O mesmo foi feito para a construção da curva de calibração em matriz e estimativas de LoD e LoQ.

Como padrão interno (PI), foi utilizado o composto benzoato de metila na concentração de 200 µg/mL, que foi adicionado à cada amostra previamente às análises no cromatógrafo (BIGLARI et al., 2018; RAZAIF-MAZINAH et al., 2017). Para a obtenção da solução de benzoato de metila, foi

preparada uma solução de ácido benzóico (40 mg/mL) em metanol grau HPLC e, dessa solução, 200  $\mu$ L foram adicionados em tubos de ensaio com tampa de rosca para a etapa de derivatização, através da reação de metanólise, seguindo o procedimento descrito no item 3.5.

### 3.6.2 Análises por GC-MS

As análises das amostras foram realizadas em Cromatógrafo à Gás GC-2010 Plus (Shimadzu, Japão) acoplado a Espectrômetro de Massas TQ8040 (Shimadzu, Japão) (CG-EM), equipado com auto-injetor (Combi PAL AOC-5000), coluna DB-5ms UI (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m) (Agilent, Estados Unidos) fundida com sílica. A aquisição, interpretação e tratamento dos dados foram feitos utilizando-se o *Software* GCMS Solutions<sup>®</sup> versão 4.20.

O método desenvolvido para a análise das amostras, composto pelo gradiente de aquecimento da coluna cromatográfica e os parâmetros operacionais, são mostrados nas Tabelas 3.5 e 3.6, respectivamente. Como gás de arraste foi utilizado Hélio 5.0 (White Martins).

TABELA 3.5 - Rampa de aquecimento da coluna cromatográfica.

	Taxa de variação (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (minutos)
0	-	40	3
1	18	290	1

TABELA 3.6 - Parâmetros de operação do método no cromatógrafo gasoso.

Temperatura inicial do forno	40°C
Temperatura do injetor	280°C
Volume de injeção	1 µL
Pressão	58,7 kPa
Fluxo na coluna	1,0 mL/min
Fluxo de purga	3,0 mL/min
Fluxo total	19 mL/min
Velocidade linear	36,1 cm/seg
Split	1:30 – Estudos qualitativos para seleção de substratos 1:15 – Validação de método e quantificação

Como instrumento de detecção foi utilizado um Espectrômetro de Massas, sendo a ionização realizada por impacto eletrônico (70 eV) e ambas as temperaturas da fonte de íons e da interface foram mantidas a 290°C.

Para a identificação dos analitos presentes nas amostras o Espectrômetro de Massas foi operado no modo de varredura total de íons (*Full Scan*). Após a aquisição de dados do cromatograma de íons totais (TIC) das soluções padrão em modo *Scan*, os picos foram identificados com base nos tempos de retenção e através dos respectivos espectros de massa. A identificação foi confirmada através da abundância relativa dos íons, que foi comparada com a dos espectros de referência da biblioteca NIST®17.

Para a quantificação e validação, o detector foi operado em modo SIM (*Selected Ion Monitoring*). As análises foram baseadas em um íon de quantificação e dois íons de confirmação. Os valores de razão massa-carga ( $m/z$ ) selecionados para o analito em estudo e o padrão interno são apresentados na Tabela 3.7.

TABELA 3.7 – Valores de  $m/z$  do analito em estudo e do padrão interno para os íons monitorados.

Analito	Íon de quantificação	Íons de confirmação
3-hidroxibutirato de metila	74.00	71.00 e 103.00
Benzoato de metila	105.00	77.00 e 136.00

### 3.6.3 Validação do método analítico

Uma vez desenvolvido um método que atendesse ao uso pretendido, partiu-se para a avaliação da confiabilidade do método. A validação de um método deve ser realizada quando um procedimento analítico é desenvolvido ou quando um procedimento já validado sofre alguma modificação (PEREZ, 2010). Normalmente são avaliados os critérios de seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão, conforme proposto por RIBANI et al. (2004), os quais são descritos a seguir.

A seletividade do método em relação à possíveis interferentes da matriz foi determinada por meio da comparação de cromatogramas obtidos do extrato de amostras de cultivo bacteriano na presença em cada condição de cultivo, na tentativa de identificar possíveis compostos produzidos durante o cultivo com mesmo tempo de retenção e mesmos íons selecionados do analito.

A partir das diluições das soluções estoque e de trabalho, foram construídas curvas de calibração para o analito. Para determinar a linearidade do método foi utilizado o cálculo de regressão linear e do coeficiente de determinação,  $r^2$ , por meio da construção dos gráficos da razão de áreas entre o sinal do detector para o analito e para o padrão interno em solução *versus* concentração nominal da solução em  $\mu\text{g/mL}$ . As equações de reta obtidas permitiram o cálculo de concentração do analito nas amostras.

O efeito de matriz foi avaliado através da construção de curvas de calibração em matriz, por meio da adição de solução padrão preparada em extrato das células bacterianas após serem cultivadas em meio de cultura LB. Essas curvas foram comparadas com as curvas construídas em solvente puro, ambas compreendendo as concentrações finais de padrão variando entre  $1,50 \times 10^{-2}$  e 1,20 mg/mL.

O limite de quantificação (LoQ) foi determinado pela análise das amostras com concentrações conhecidas do analito em matriz, estabelecendo-se o nível mínimo em que o analito pôde ser quantificado com valores aceitáveis de precisão e exatidão. O limite de detecção (LoD) foi obtido através de diluições sucessivas da solução padrão em concentrações conhecidas, até que fosse encontrada uma razão entre sinal do analito/sinal ruído do instrumento de 3 vezes.

A precisão do método foi realizada através dos controles de qualidade (CQ), por meio da preparação de soluções do analito em matriz em três concentrações diferentes. O primeiro CQ teve uma concentração limitada até 120% do ponto inicial da curva de calibração; o segundo abrangeu uma concentração entre 40-60% do maior ponto da curva e o terceiro compreendeu 90-100% também do maior ponto da curva de calibração. Para cada ponto, as análises foram feitas em quintuplicata ( $n=5$ ), sendo cada amostra preparada e injetada de forma autêntica. Para cada concentração foram calculados o desvio padrão  $s(x)$  e o coeficiente de variação  $CV(\%)$  através das equações 1 e 2 mostradas abaixo. As concentrações de cada analito foram determinadas utilizando-se as equações de reta das curvas de calibração em matriz.

$$s(x) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2} \quad (1)$$

$$CV(\%) = \frac{s(x)}{\bar{x}} \times 100 \quad (2)$$

$x_j$ : valor medido;



n: número de valores obtidos para cada concentração;

$\bar{x}$ : média das replicatas para cada concentração.

A exatidão foi obtida através da equação 3 com as mesmas amostras utilizadas na determinação da precisão.

$$\text{Exatidão}(\%) = \left( \frac{x_i - \bar{x}}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (3)$$

$x_i$ : concentração experimental;

$\bar{x}$ : concentração nominal.

### 3.7 Planejamento Fatorial

A otimização multivariada foi utilizada para estudar as variáveis que mais influenciam o processo de crescimento celular e produção de PHAs pelas duas cepas estudadas. Para isso, nesse trabalho, um planejamento fatorial completo  $2^3$  foi realizado para investigar a influência dos principais parâmetros de condições de cultivo. As variáveis investigadas, em dois níveis, foram: variação da concentração de substrato (V1), tempo de cultivo (V2) e taxa de oxigenação do meio (V3) (Tabelas 3.8 e 3.9). Além disso, para uma melhor avaliação de tendências e da reprodutibilidade da metodologia analítica envolvida, um ponto central ensaiado em quadruplicata foi incluído no estudo. A seleção das variáveis empregadas no estudo, os níveis em que estas foram ensaiadas e ainda as respostas utilizadas para processar o planejamento foram estabelecidos com base em estudos prévios do grupo e com base na literatura (DE PAULA et al., 2019; DENADAE, 2018).

Como meios de cultivo e substrato, foram utilizados os materiais que apresentaram melhores resultados nos experimentos qualitativos de triagem, sendo glicerol em meio complexo e soro de leite para *Delftia* sp. e soro de leite

para *Aureimonas* sp. Cada planejamento resultou em 12 experimentos, que foram realizados em frascos *erlenmeyers* de 500 mL contendo 100 mL dos respectivos meios de cultivo com diferentes concentrações de fonte de carbono, tempo de cultivo e agitação e volume de inóculo de 1% (v/v). Após a retirada de cada experimento, as células seguiram o procedimento descrito no item 3.5.

TABELA 3.8 - Níveis codificados das variáveis independentes avaliadas no processo de crescimento celular e produção PHAs em meio complexo e glicerol por *Delftia* sp.

Variáveis		Níveis		
		-1	0	1
V1	Concentração do substrato (% v/v)	3	6	9
V2	Tempo de cultivo (h)	48	96	144
V3	Agitação (rpm)	50	125	200

TABELA 3.9 - Níveis codificados das variáveis independentes avaliadas no processo de crescimento celular e produção PHAs em meio soro de leite por *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp.

Variáveis		Níveis		
		-1	0	1
V1	Concentração do substrato (% v/v)	10	30	50
V2	Tempo de cultivo (h)	48	96	144
V3	Agitação (rpm)	50	125	200

A quantidade de polímero produzida foi avaliada com base na produção do monômero 3-HB. As variáveis dependentes avaliadas foram massa celular (g/L), concentração de 3-HB (g/L) e rendimento biopolimérico (razão entre a concentração de 3-HB e a massa celular, multiplicada por 100 (%)), ambos

importantes parâmetros para avaliar o potencial das cepas bacterianas para essa aplicação biotecnológica sob determinadas condições de cultivo.

No caso de múltiplas respostas, que muitas vezes envolvem valores incomensuráveis e conflitantes, devem ser otimizadas de forma simultânea, uma vez que suas análises separadas podem resultar em soluções incompatíveis (COSTA; LOURENÇO; PEREIRA, 2011). Dessa forma, foi aplicada a função desejabilidade, uma estratégia amplamente utilizada que consiste em converter as múltiplas respostas em uma única (COSTA; LOURENÇO; PEREIRA, 2011). Os valores obtidos para cada resposta foram transformados em um valor adimensional, a desejabilidade individual ( $d_i$ ), que varia entre  $d = 0$  (para um valor de resposta inaceitável) e  $d = 1$  (para um completamente desejável) (FERREIRA et al., 2007). A desejabilidade global ( $D$ ) foi calculada combinando-se os valores individuais de desejabilidade e então um algoritmo foi aplicado à função  $D$  para determinar o conjunto de valores de variáveis que a maximizam (FERREIRA et al., 2007).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Identificação dos genes relacionados à biossíntese de PHAs**

#### **4.1.1 Técnicas moleculares**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica para amplificar um ou mais genes em um genoma. Essa etapa é a primeira necessária para o procedimento de identificação dos genes relacionados à biossíntese de PHAs através de técnicas moleculares. Por meio dessa técnica é possível obter a replicação de segmentos do DNA de interesse se a sequência de pelo menos porções das extremidades desse segmento é conhecida e, posteriormente, por meio do sequenciamento desse fragmento é possível localizar cada par de bases e sua respectiva posição na fita, o que permite a comparação da sequência com banco de dados, por exemplo, GenBank (NCBI) (NELSON; COX, 2014). Dependendo da taxa de similaridade entre os resultados obtidos e os dados depositados no banco, é possível propor se o gene amplificado corresponde, de fato, ao gene de interesse.

A extração do DNA foi realizada em duplicata para que fossem obtidos em maiores quantidades de material e, exemplos das informações de quantificação do material genético obtidas, são apresentados na Tabela 4.1.

TABELA 4.1 – Informações relativas à quantificação dos DNAs de *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp. em espectrofotômetro BioSpec-nano®.

Bactéria	Delftia_I	Delftia_II	Aureimonas_I	Aureimonas_II
Concentração de ácido nucleico (ng/μL)	586,12	742,66	194,05	136,22
OD (260/280)	2,01	2,01	2,05	1,55

Na Tabela 4.1 podem ser observados resultados da quantificação de DNA extraído e purificado das duas cepas bacterianas através da análise espectrofotométrica no BioSpec-nano®. O cálculo da razão OD (260/280) permite conhecer o grau de pureza do material analisado, uma vez que as leituras a 260 nm (OD<sub>260</sub>) são específicas para ácidos nucleicos, enquanto as leituras das amostras a 280 nm (OD<sub>280</sub>) são realizadas para monitorar a presença de proteínas residuais vindas dos processos de extração.

Os principais genes responsáveis por codificarem as enzimas relacionadas à biossíntese de PHAs geralmente são organizados em um operon, como ocorre em *Cupriavidus necator*, o organismo modelo para a produção de PHAs, no qual os genes *phaC*, *phaA* e *phaB* constituem o operon *phaCAB* (SUDESH; ABE; DOI, 2000). Entretanto, esses genes não necessariamente estão sempre agrupados, a organização dos *operons* da biossíntese varia nas bactérias de espécie para espécie (MADISON; HUISMAN, 1999). A Figura 4.1 ilustra a organização do operon *phaCAB*, como encontrado em *Cupriavidus necator*, e exemplos de diferentes organizações desses genes em diversas espécies de bactérias.

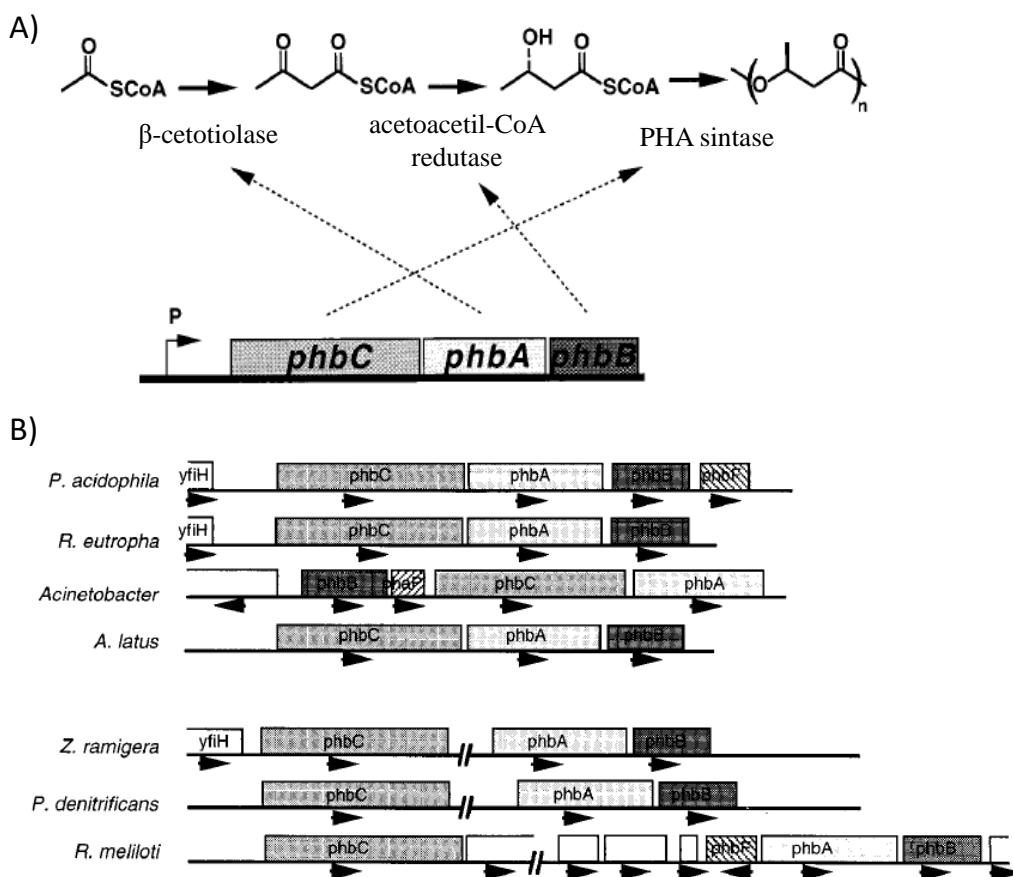


FIGURA 4.1 – A) Via biossintética principal para produção de PHAs. O PHA é sintetizado em uma via de três etapas pela ação sucessiva das enzimas PhaA, PhaB e PhaC. As três enzimas são codificadas pelos genes do operon *phbCAB*; B) Exemplos da organização dos principais genes envolvidos na produção de PHAs em diferentes espécies bacterianas. Os genes não necessariamente estão agrupados e sua organização varia de espécie para espécie. Adaptado de MADISON; HUISMAN, 1999.

Pensando nisso e com base em genomas de espécies já conhecidas de *Delftia* spp., foram desenhados *primers* que permitissem a amplificação dos três genes em sequência (*phaCAB*) com um tamanho esperado de cerca de 3,8 kb. De modo similar, através dos primers utilizados por YEE et al. (2012), o fragmento total dos genes *phaCAB*<sub>C<sub>0</sub></sub> foi amplificado do DNA genômico de *Comamonas* sp. EB172.

Após a quantificação do DNA genômico extraído (Tabela 4.1), focou-se na otimização das temperaturas das reações de PCR, por meio de um gradiente, para avaliar possível amplificação bandas do tamanho esperado com resolução para cada bactéria. Apesar do *primer* não ter sido desenhado de forma específica para *Aureimonas* sp., as mesmas condições foram testadas para essa cepa a fim de tentar encontrar alguma informação sobre a organização do genoma. O controle negativo (C) foi o mesmo para ambas as análises, pois foi utilizado o mesmo mix nas reações. As condições de reação e o gradiente de temperatura são apresentados na Tabela 3.2 e os resultados, na Figura 4.2.

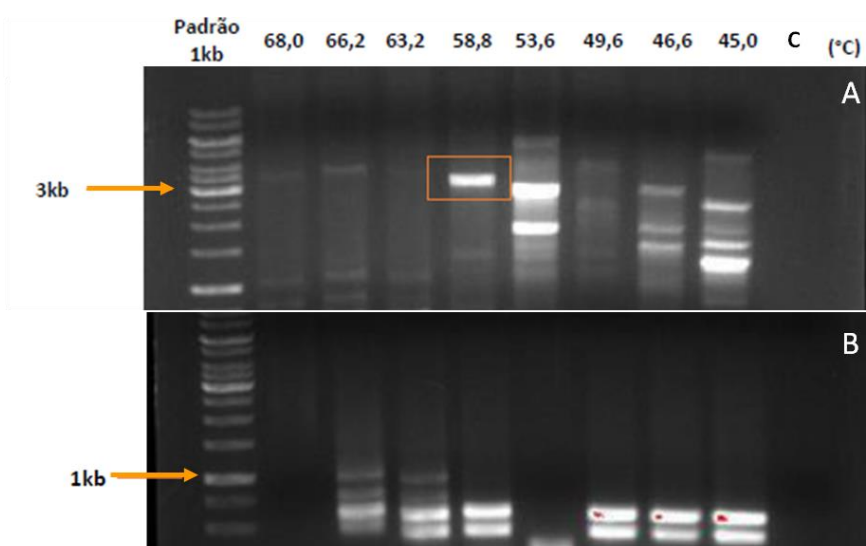


FIGURA 4.2 - Gel de agarose obtido após o gradiente de temperatura de reação de PCR para A) *Delftia* sp.; B) *Aureimonas* sp.

Com base na Figura 4.2, observa-se amplificação de um fragmento próximo a 3,8 kb na faixa de temperatura de 58,8°C, que possivelmente corresponde à extensão do fragmento de interesse para a identificação da sequência dos genes *phaCAB* de *Delftia* sp. Para *Aureimonas* sp. não foi observada banda do tamanho esperado que possa corresponder ao fragmento de interesse. Entretanto, foi observada segunda banda (próxima a 1 kb), indicando que, de fato, a reação não foi específica para o fragmento que se esperava e

possivelmente, *Aureimonas* sp. não possui organização dos genes relacionados à biossíntese de PHAs similar ao de *Delftia* sp. Não foram observadas bandas referentes ao controle, indicando ausência de fragmentos contaminantes.

Após a identificação da banda correspondente à temperatura de 58,8°C para *Delftia* sp., foram realizadas reações de PCR em quintuplicata nessas condições para a obtenção de maiores quantidades de material genético e envio para sequenciamento. Os resultados do sequenciamento desses fragmentos de *Delftia* sp. são parcialmente exemplificados na Figura 4.3.

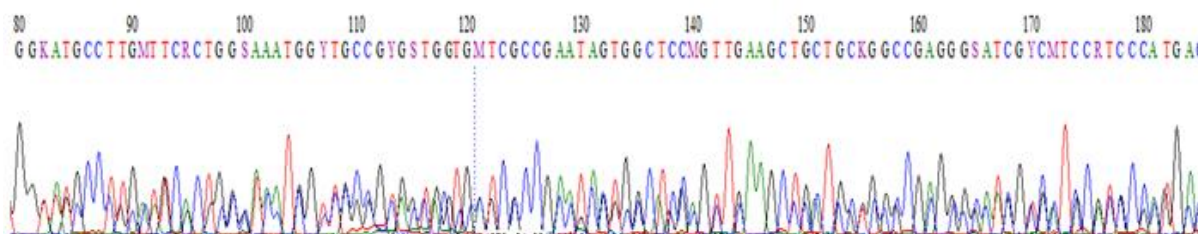


FIGURA 4.3 - Eletroferograma parcial obtido para o fragmento de interesse de cerca de 3,8 kb da cepa *Delftia* sp.

Os resultados do sequenciamento não permitiram a identificação completa da sequência nucleotídica, devido à baixa resolução dos picos e identificação de pequena parte do fragmento já que se trata de fragmentos com elevado número de pares de bases. Portanto, apesar de apresentar banda do tamanho do fragmento de interesse, não foi possível confirmar se os fragmentos amplificados se referem realmente aos genes de interesse. O tamanho e qualidade de sequências observadas em um eletroferograma, também dependem da qualidade da amostra e da reação de sequenciamento realizadas.

Assim, na tentativa de se obter maior concentração do fragmento em estudo e melhor qualidade das amostras, foram testadas duas outras enzimas DNA polimerases nas reações de PCR, pFU e phu. Ambas as enzimas são indicadas para amplificar fragmentos longos e são termicamente mais estáveis, eliminando os erros de inserção das bases. No trabalho reportado por CESPEDES et al. (2018)



o DNA genômico de dez espécies diferentes de *Aeromonas* spp. foi testado por PCR para a identificação do operon *phaPCJ* utilizando a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polimerase e apenas uma cepa produziu um amplicon correspondente ao tamanho esperado de *phaPCJ*, de aproximadamente 2,7 Kb. Para as reações realizadas nesse trabalho utilizando essas enzimas, foram usadas as condições representadas nas Tabela 3.3 e os resultados do gel obtido são apresentados na Figura 4.4.

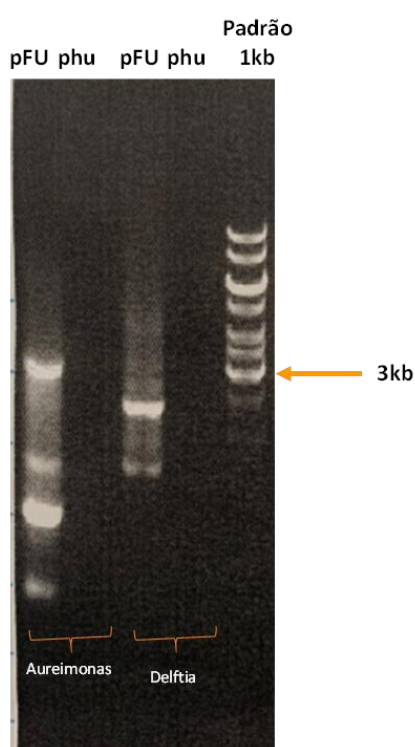


FIGURA 4.4 – Resultados do gel de agarose obtido para reações de PCR utilizando as enzimas pFU e phu para *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp.

Com base na Figura 4.4 pode ser observada uma banda muito próxima à região de interesse encontrada para *Aureimonas* sp. utilizando a polimerase pFU. Entretanto os primers utilizados não foram específicos para esse fragmento. Já para *Delftia* sp., utilizando-se a mesma enzima, foi observada uma banda intensa na região um pouco abaixo de 3 kb.

As etapas posteriores para a otimização das condições da reação e sequenciamento utilizando essas enzimas foram interrompidas por conta da Pandemia da Covid-19. De qualquer forma, com os resultados obtidos até aqui, não foi possível chegar a conclusões concretas quanto à identificação dos principais genes responsáveis pela produção de PHAs utilizando técnicas moleculares. Entretanto, diante das dificuldades de se obter amostras e sequenciamento de qualidade, é possível sugerir que a tentativa de sequenciamento dos três genes juntos não tenha sido a melhor estratégia a ser utilizada em um primeiro momento. HIROE; USHIMARU; TSUGE (2013), por exemplo, analisaram os três genes individualmente.

#### **4.1.2 Sequenciamento genômico - Illumina**

O conhecimento de vias bioquímicas e enzimas relacionadas à biossíntese e degradação de PHAs se mostra como uma ferramenta útil para auxiliar na produção industrial. O sequenciamento genômico é uma técnica que permite identificar a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA na ordem correta, e a partir disso é possível ter conhecimento sobre as informações genéticas contidas nessa estrutura (FIETTO; MACIEL, 2015). Atualmente diversas tecnologias de sequenciamento são utilizadas mundialmente, e dentre elas a plataforma Illumina®. O sequenciamento realizado por essa plataforma é baseado em cores. Brevemente, para iniciar o processo, como toda técnica de sequenciamento de segunda geração, uma biblioteca é gerada a partir da clivagem do DNA a ser sequenciado e os fragmentos de tamanho apropriado são selecionados e ligados à sequências complementares de adaptadores em ambas as extremidades (FIETTO; MACIEL, 2015). A amplificação dos fragmentos de DNA da biblioteca ocorre através da PCR em forma de ponte, que acontece em uma célula de vidro (*flow cell*) e é controlada pelo instrumento de sequenciamento (HU et al., 2021). O sequenciamento é baseado na leitura óptica

da incorporação nucleotídeos fluorescentes acoplados a um terminador reversível pela DNA polimerase. Um único dNTP reversível marcado com fluorescência ligado ao terminador é incorporado na cadeia de ácido nucleico durante cada ciclo de sequenciamento, e o sinal fluorescente resultante é imageado (HU et al., 2021). O fluoróforo e o grupo de bloqueio podem então ser removidos e um novo ciclo pode começar (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016). A Figura 4.5 ilustra o processo de amplificação em ponte que ocorre nesse tipo de sequenciamento.

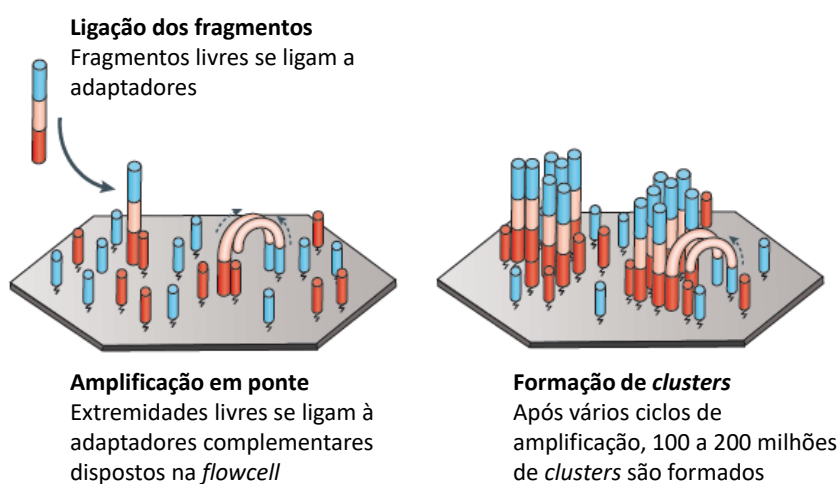


FIGURA 4.5 – Representação do processo de amplificação em ponte que ocorre na técnica de sequenciamento genômico utilizando a plataforma Illumina®. Adaptado de GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE (2016).

Diante disso, essa etapa do trabalho teve como objetivo obter informações sobre o genoma das duas cepas em estudo e poder entender e relacionar algumas características de funções gênicas com base na produção de PHAs. Também é possível descrever aspectos da organização do genoma e composição gênica, comparando as cepas entre si e entre organismos do mesmo gênero.

### 4.1.2.1 Características gerais do genoma

O sequenciamento do genoma de *Delftia* sp. mostrou que é composto por um cromossomo de 6.343.550 pb, sendo um total de 5840 genes identificados, dentre eles 5743 codificadores de proteínas, 2 rRNA, 67 tRNA, 27 miscRNA e 1 tmRNA. Todas essas informações estão resumidas na Tabela 4.2.

Comparações foram feitas com outras cepas de *Delftia* spp. relacionadas e se mostraram similares quanto à algumas características, como o tamanho do genoma e número de genes. MOREL et al. (2016), por exemplo, estudaram o genoma de *Delftia* sp. JD2 isolada de solo e os resultados sugeriram um genoma composto por um único cromossomo circular com um comprimento de 6,76 Mb, 6051 genes codificantes e 87 tRNA.

TABELA 4.2 – Características gerais do genoma de *Delftia* sp.

Característica	Valores
Número de contigs	99
Tamanho do genoma (pb)	6.343.550
Genes (totais)	5840
CDS (codificantes)	5743
mRNA	5840
miscRNA	27
rRNA	2
tRNA	67
tmRNA	1

O sequenciamento do genoma de *Aureimonas* sp. mostrou que é composto por um cromossomo de 4.053.782 pb, sendo um total de 3878 genes identificados, dentre eles 3801 codificadores de proteínas, 2 rRNA, 49 tRNA, 25 miscRNA e 1 tmRNA. Todas essas informações estão resumidas na Tabela 4.3.

Comparações foram realizadas com outras espécies de *Aureimonas* spp. e os resultados das características gerais do genoma também se mostraram

bastante similares à espécie em estudo. ESHAGHI et al. (2015) isolaram a cepa *Aureimonas altamirensis* ON-56566 de sangue humano e encontraram um genoma de 4.202.944 pb, além de 3594 genes totais, dentre eles 3 rRNAs e 47 tRNAs. Uma outra cepa, *Aureimonas* sp. OT7, foi estudada por GANZORIG; LEE (2021) e apresentou um único cromossomo contendo 4.181.223 pb e 3875 genes, dentre eles 3 rRNA e 51 tRNA.

TABELA 4.3 - Características gerais do genoma de *Aureimonas* sp.

Característica	Valores
Número de contigs	34
Tamanho do genoma (pb)	4.053.782
Genes (totais)	3878
CDS (codificantes)	3801
mRNA	3878
miscRNA	25
rRNA	2
tRNA	49
tmRNA	1

#### 4.1.2.2 Genes envolvidos na biossíntese de PHAs

A anotação dos genomas das duas cepas estudadas permitiu a identificação dos principais genes envolvidos no metabolismo de PHAs como *phaA*, *phaB* e *phaC*, responsáveis pela codificação das enzimas acetil-CoA acetiltransferase, acetoacetil-CoA redutase e poli(3-hidroxiacanoato) polimerase, respectivamente. A identificação dos genes que codificam essas enzimas denota a presença da via completa de biossíntese de PHAs de cadeia curta (PHA-*scl*) em *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp. Esses resultados são apresentados nas Tabelas 4.4 e 4.5 para *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp., respectivamente.

TABELA 4.4 - Genes de *Delftia* sp. previstos para estarem envolvidos na biossíntese e degradação de PHAs.

	Gene	Produto	Nº EC	Tamanho (pb)	Locus tag
<b>Biossíntese PHAs</b>	phaA_1	Acetil-CoA acetiltransferase	2.3.1.9	1209	S9_01708
	phaC	Poli(3-hidroxiacanoato) polimerase subunidade PhaC	2.3.1.-	1890	S9_02141
	phaA_2	Acetil-CoA acetiltransferase	2.3.1.9	1182	S9_02142
	phaB	Acetoacetil-CoA redutase	1.1.1.36	738	S9_02143
<b>Degradação de PHAs</b>		D-(-)3-hidroxiacetil-CoA oligomero hidrolase	3.1.1.22	2205	S9_01942
	bdhA_1	D-beta-hidroxiacetil-CoA desidrogenase	1.1.1.30	819	S9_02001
	bdhA_2	D-beta-hidroxiacetil-CoA desidrogenase	1.1.1.30	783	S9_03475
	bdhA_3	D-beta-hidroxiacetil-CoA desidrogenase	1.1.1.30	795	S9_05153

TABELA 4.5 - Genes de *Aureimonas* sp. previstos para estarem envolvidos na biossíntese e degradação de PHAs.

	Gene	Produto	Nº EC	Tamanho (pb)	Locus tag
<b>Biossíntese PHAs</b>	phaC	Poli(3-hidroxiacanoato) polimerase subunidade PhaC	2.3.1.-	1818	S10_00765
	phaB	Acetoacetil-CoA redutase	1.1.1.36	726	S10_02768
	phaA	Acetil-CoA acetiltransferase	2.3.1.9	1185	S10_02769

No que diz respeito à organização desses genes no genoma, as duas cepas apresentaram diferenças. A análise dos genomas mostrou que *Delftia* sp. carrega um operon biossintético de PHA (*phaCAB*), semelhante à organização dos genes encontrada em *Comamonas* sp. EB172, *C. testosteroni* CNB-2 e *Acidovorax* sp. JS42 (YEE et al., 2012). Pode ser observada ainda a presença de um segundo gene *phaA*, caso semelhante também foi encontrado no genoma de *Jeongeupia* sp. USM3 (ZAIN et al., 2020). Em *Aureimonas* sp. o gene *phaA* está adjacente ao *phaB*, constituindo o operon *phaBA*, e o gene *phaC* está claramente distante dos outros dois. Organização similar foi reportada por NIKEL et al. (2006) encontrada na cepa *Azotobacter* sp. FA8.

Como já mencionado, a enzima PHA sintase (PhaC) desempenha um papel crucial na biossíntese de PHAs, atuando de forma a catalisar a conversão de substratos (R)-hidroxialcil-CoA a PHAs, com a eliminação concomitante de uma molécula de CoA. Segundo estudo realizado por TIAN; SINSKEY; STUBBE (2005) o início da síntese realizada por enzimas desse tipo requer a ativação do grupo tiol do resíduo de cisteína do sítio ativo da PhaC pela histidina conservada no mesmo sítio ativo, permitindo um ataque nucleofílico na ligação tioéster do substrato (R)-3-hidroxiacil-CoA, liberando concomitantemente uma molécula de CoA e formando um intermediário enzima-substrato. Um resíduo de ácido aspártico da PhaC ativa o grupo hidroxila da ligação de outro substrato, que então ataca a ligação tioéster localizada entre uma segunda unidade de substrato e a cisteína do sítio ativo de uma segunda subunidade PhaC, juntando-se as duas moléculas. O substrato de entrada é então ligado covalentemente à cisteína livre e, após ativação de seu grupo hidroxila, o próximo ataque nucleofílico estenderá a cadeia de poliéster por outra unidade. Um exemplo da estrutura de uma PhaC estudada por CHEK et al. (2017), com destaque para os sítios ativos envolvidos na reação de polimerização e a representação da proposta do mecanismo para essa reação são apresentados na Figura 4.6.

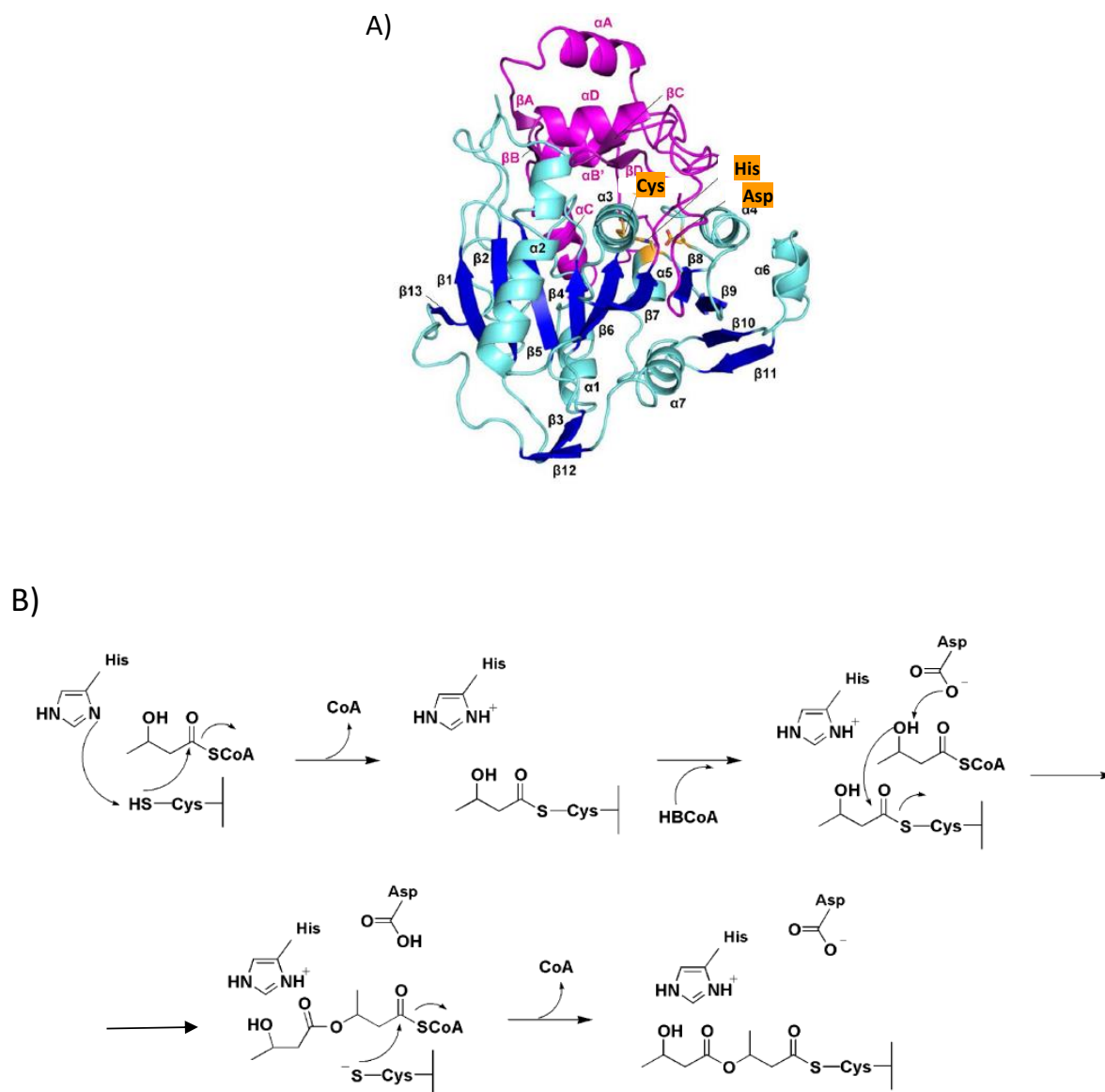


FIGURA 4.6 – A) Estrutura tridimensional da enzima PhaC de *Chromobacterium* sp. USM2 e os sítios ativos envolvidos na polimerização de monômeros para a produção de PHAs (Adaptado de CHEK et al., 2017); B) Mecanismo de reação da enzima PhaC proposto por TIAN; SINSKEY; STUBBE, 2005.

Os genes *phaC* foram identificados no genoma das duas cepas estudadas, sendo que a sequência de aminoácidos da PhaC de *Delftia* sp. apresentou 629 aminoácidos (1890 pb) enquanto a sequência da enzima de *Aureimonas* sp., apresentou 605 aminoácidos (1818 pb).



Ao ser realizada a comparação de ambas as phaCs com a base de dados GenBank, por exemplo, observou-se que para *Delftia* sp. diversos números de acesso tiveram sua sequência de aminoácidos alinhada com identidade igual ou maior a 99%, compreendendo em sua totalidade espécies do gênero *Delftia*. Como exemplo podem ser mencionadas *Delftia acidovorans* (número de acesso NCBI: WP\_016445927.1, 99,68%), *Delftia tsuruhatensis* (número de acesso NCBI: WP\_133072385.1, 99,68%) e *Delftia lacustris* (número de acesso NCBI: WP\_034363921.1, 99,36%). Os resultados orientam a classificação da PHA sintase de *Delftia* sp. para a classe I. A cepa se mostrou capaz de produzir PHAs de cadeia curta e, além disso, não foram encontrados os genes *phaE* e *phaR*. Desse modo, é provável que a PHA sintase do organismo em estudo não pertença às classes II, III e IV. HIROE; USHIMARU; TSUGE (2013) realizaram o estudo de caracterização da enzima PHA sintase derivada de *Delftia acidovorans* DS-17 que foi classificada como sintase de classe I.

Para *Aureimonas* sp. foram encontrados dois números de acesso com sua sequência de aminoácidos alinhada com identidade igual ou maior a 97%, que correspondem à espécie *Aureimonas altamirensis* (número de acesso NCBI: WP\_060600772.1, 98,51% e WP\_232412305.1, 97,69%). Apesar de bactérias dessa espécie apresentarem a enzima descrita como poli-(R)-ácido hidroxialcanoico sintase de classe I, não há relatos na literatura da produção de PHAs por cepas do gênero *Aureimonas*.

Por fim, comparando-se as sequências de aminoácidos, as duas PhaCs mostraram uma similaridade de 40,75%, com uma cobertura de 83% de alinhamento entre elas (Apêndice 1). A PhaC da cepa *Jeongeupia* sp. USM3 reportada por ZAIN et al. (2020) mostrou 75% da sequência de aminoácidos idêntica a *Andreprevotia chitinilytica*, organismo com quem apresentou maior taxa de similaridade dessa enzima. A similaridade entre as PhaCs de diferentes cepas confirma a autenticidade de enzimas desse tipo, mas também mostra a conservação de algumas regiões.

Genes relacionados às rotas de degradação desses polímeros também foram buscados nos genomas de ambas as cepas. O PHA pode ser degradado intracelularmente por enzimas depolimerases da bactéria sob condições de estresse causadas pela limitação de fonte de carbono, na qual os grânulos de PHA acumulados nas células são hidrolisados a fontes de carbono e energia (MADISON; HUISMAN, 1999; ONG et al., 2017). O PHB, por exemplo, é primeiro degradado a monômeros ou oligômeros de 3-hidroxibutirato (como dímeros, trímeros e tetrâmeros de 3-HB) pela enzima PHB depolimerase (PhaZ). Os oligômeros de 3-HB são hidrolisados a 3-HB pela enzima oligômero hidrolase, seguida da desidrogenação do 3-HB a acetoacetato (LU; TAKAHASHI; UEDA, 2014). Um modelo cíclico do metabolismo de PHA que mostra essa rota de degradação é demonstrado na Figura 4.7.

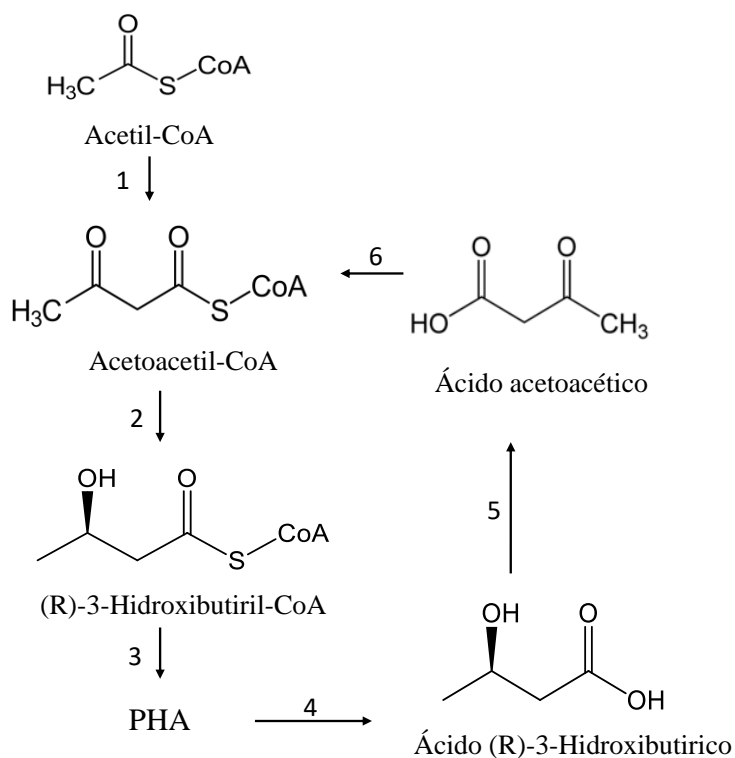


FIGURA 4.7 – Representação das vias metabólicas de biossíntese e degradação intracelular de PHA. 1: PhaA,  $\beta$ -cetotiolase; 2: PhaB, acetoacetil-CoA redutase; 3: PhaC, PHA sintase; 4: PhaZ, PHA depolimerase; 5: (R)-3-hidroxiacetilato desidrogenase; 6: Acetoacetil-CoA sintetase. Adaptado de WANG; LIU, 2014.

Após a busca desses genes relacionados à degradação de PHAs, foi encontrado no genoma de *Delftia* sp. o gene responsável pela codificação da enzima D-(-)3-hidroxi-butirato oligomero hidrolase (E.C. 3.1.1.22), também encontrado nos genomas de *Delftia* sp. JD2 (MOREL et al., 2016) e *Paucimonas lemoignei* (UCHINO et al., 2007). A presença de três D-beta-hidroxi-butirato desidrogenase (E.C. 1.1.1.30) também foram detectadas no genoma de *Delftia* sp. De forma similar, as enzimas 3-hidroxi-butirato oligomero hidrolase e 3-hidroxi-butirato desidrogenase foram identificadas e caracterizadas no trabalho realizado por LU; TAKAHASHI; UEDA (2014), confirmando o envolvimento dessas enzimas na degradação intracelular de polihidroxi-butirato e polihidroxi-valerato em *Paracoccus denitrificans*. Em *Aureimonas* sp. não foram identificados genes específicos relacionados à degradação desses polímeros.

O ciclo da  $\beta$ -oxidação resulta em uma fonte de substrato para a biossíntese de monômeros de PHAs. O intermediário da  $\beta$ -oxidação, trans-2-enoil-CoA, é convertido em (R)-3-hidroxiacil-CoA pela ação da enzima enoil-CoA hidratase (R)-específica ((R)-hidratase, PhaJ) e assim, PhaJs são capazes de canalizar produtos da  $\beta$ -oxidação para a biossíntese de PHA (KIHARA et al., 2017), como demonstrado no esquema da Figura 1.7. Diante dessas observações, foi realizada uma busca no genoma das bactérias em estudo voltada para essa via metabólica. O sequenciamento do genoma da bactéria produtora de PHA, *Halomonas* sp. SF2003, em trabalho realizado por THOMAS et al. (2019), foi capaz de identificar a enzima enoil-CoA hidratase/proteína da família isomerase. No genoma de *Delftia* sp. Foram detectadas cinco enzimas do tipo enoil-CoA hidratase (E.C. 4.2.1.17), também encontradas no genoma de *Delftia* sp. JD2, estudado por MOREL et al. (2016). Além dessas, foram identificadas três enzimas enoil-CoA hidratases de cadeia curta. Já no genoma de *Aureimonas* sp. foram localizadas duas enzimas enoil-CoA hidratase (E.C. 4.2.1.17). Apesar de não ser possível afirmar que alguma dessas enzimas identificadas exiba atividade

específica R-hidratase, são candidatas a estarem envolvidas no metabolismo de PHAs.

Um outro intermediário envolvido na  $\beta$ -oxidação é o isômero (S)-3-hidroxiacil-CoA. Devido à estereoespecificidade da enzima PHA polimerase uma etapa biossintética adicional é necessária para a síntese do monômero (R)-3-hidroxiacil-CoA (MADISON; HUISMAN, 1999). O estudo feito por MOREL et al. (2016), que realizou o sequenciamento genômico de *Delftia* sp. JD2, permitiu a identificação da enzima 3-hidroxiacil-CoA epimerase. Ambas as enzimas identificadas são responsáveis pela reação que catalisa a conversão do isômero (S)-3-hidroxiacil-CoA em (R)-3-hidroxiacil-CoA, que, conseqüentemente, é usado pela PHA sintase (PhaC) para a síntese do PHA. Apesar de identificada a presença de monômeros na condição utilizando óleo vegetal em *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp., a sequência responsável por codificar alguma enzima capaz dessa conversão entre os isômeros não foi detectada no genoma de nenhuma das cepas estudadas.

MOREL et al. (2016) também encontraram a enzima cetoacil-CoA redutase no genoma de *Delftia* sp. JD2. Essa enzima é responsável pela conversão de 3-cetoacil-CoA em (R)-3-hidroxiacil-CoA para conseqüente formação de PHA pela polimerase. O gene responsável por codificar essa proteína também não foi identificado nas cepas estudadas.

As tentativas de compreender os mecanismos genéticos envolvidos na biossíntese de PHAs são amplas e envolvem diversos estudos, como a amplificação de genes, criando cópias relacionadas à síntese e acúmulo de PHAs, deleção e a expressão heteróloga de genes possivelmente envolvidos. Em relação aos resultados observados, a função de cada enzima, atuando de forma conjunta ou separadamente na biossíntese de PHAs, ainda deve ser investigada. Assim como reportado por HIROE et al. (2012), novos arranjos de operon em *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp. podem fornecer melhores taxas de produção e acúmulo intracelular.

## 4.2 Efeito de diferentes meios de cultivo no crescimento celular e biossíntese de PHAs

A triagem e otimização do meio de cultivo são os principais fatores que desempenham um papel crítico no crescimento celular e na expressão do metabólito e que afetam diretamente a produtividade (RAO et al., 2019). Durante o crescimento bacteriano normal, a enzima 3-cetotiolase (PhaA) é inibida pela coenzima-A livre que sai do ciclo de Krebs. Mas quando a entrada de acetil-CoA no ciclo de Krebs é restrita (restrição de N e P), que limitam a formação de enzimas (durante a limitação de nutrientes não carbônicos), o excesso de acetil-CoA é canalizado para a biossíntese de PHB (RAY et al., 2016). Considerando o fato, é essencial estudar o efeito da interação do carbono e fonte de nitrogênio em várias concentrações para a produção de PHA. Desse modo outra etapa do trabalho consistiu em avaliar a produção de PHAs em *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp. utilizando fontes de carbono que poderiam ser interessantes para tornar a produção desses materiais economicamente mais atrativas e verificar a influência desses substratos no acúmulo desses polímeros. Essa etapa envolve um estudo qualitativo de monômeros de PHA produzidos pelas cepas com base nas análises por GC-MS.

Diversos trabalhos têm reportado que a concentração de nitrogênio no meio de cultivo influencia fortemente a produção de PHAs intracelulares (OJHA; DAS, 2018; RAO et al., 2019; VERLINDEN et al., 2011). VERLINDEN et al. (2011) reportaram que a partir de experimentos de raio-X verificou-se que o meio de cultura complexo TSB (caldo triptona de soja) contém cerca de 4,4 g/L de nitrogênio, sendo a maior parte proveniente de aminoácidos de cadeia curta. Em contrapartida, o meio salino utilizado por eles, continha cerca de 0,35 g/L de nitrogênio. De modo similar, no presente trabalho o meio de cultura LB, um meio complexo, e o meio salino descrito por FUKUDA; NAGATA; TANIGUCHI

(2002), foram utilizados nesses experimentos para avaliar a influência da concentração de nitrogênio no crescimento celular e produção de PHAs.

Após os cultivos e a obtenção das células secas de cada experimento, estas foram submetidas ao processo de metanólise para serem analisadas por GC-MS sem a necessidade de extração do polímero. Após essa reação de extração e derivatização simultânea ocorrida para cada condição experimental, foi realizada a injeção da fase orgânica no GC-MS. A Figura 4.8 mostra as etapas realizadas das amostras desde o cultivo até a etapa de extração para posterior análise.

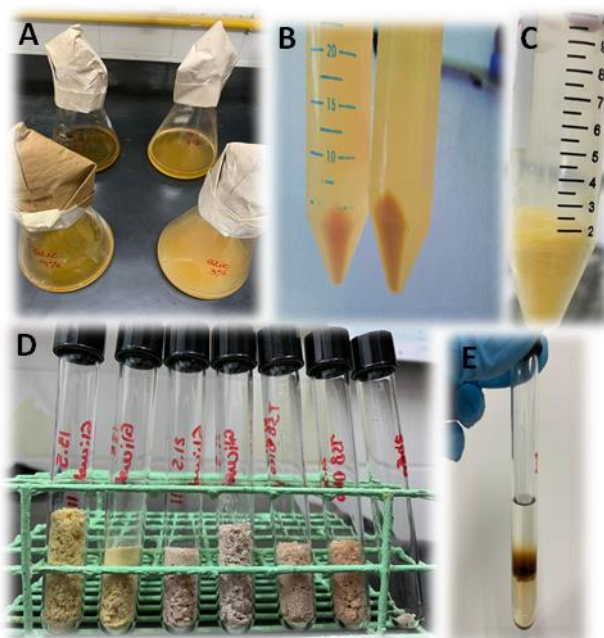


FIGURA 4.8 - Etapas de obtenção de biopolímeros PHAs, desde o cultivo até a etapa de extração. A) *Erlenmeyers* utilizados para o cultivo celular; B) células precipitadas após centrifugação; C) células após a etapa de liofilização; D) tubos de ensaio contendo células secas para a medida da massa seca celular; E) meio reacional após a extração e derivatização.

Os PHAs produzidos para cada condição foram caracterizados em termos de estrutura monomérica e composição por GC-MS. Os cromatogramas obtidos para cada condição em *Delftia* sp. são apresentados na Figura 4.9.

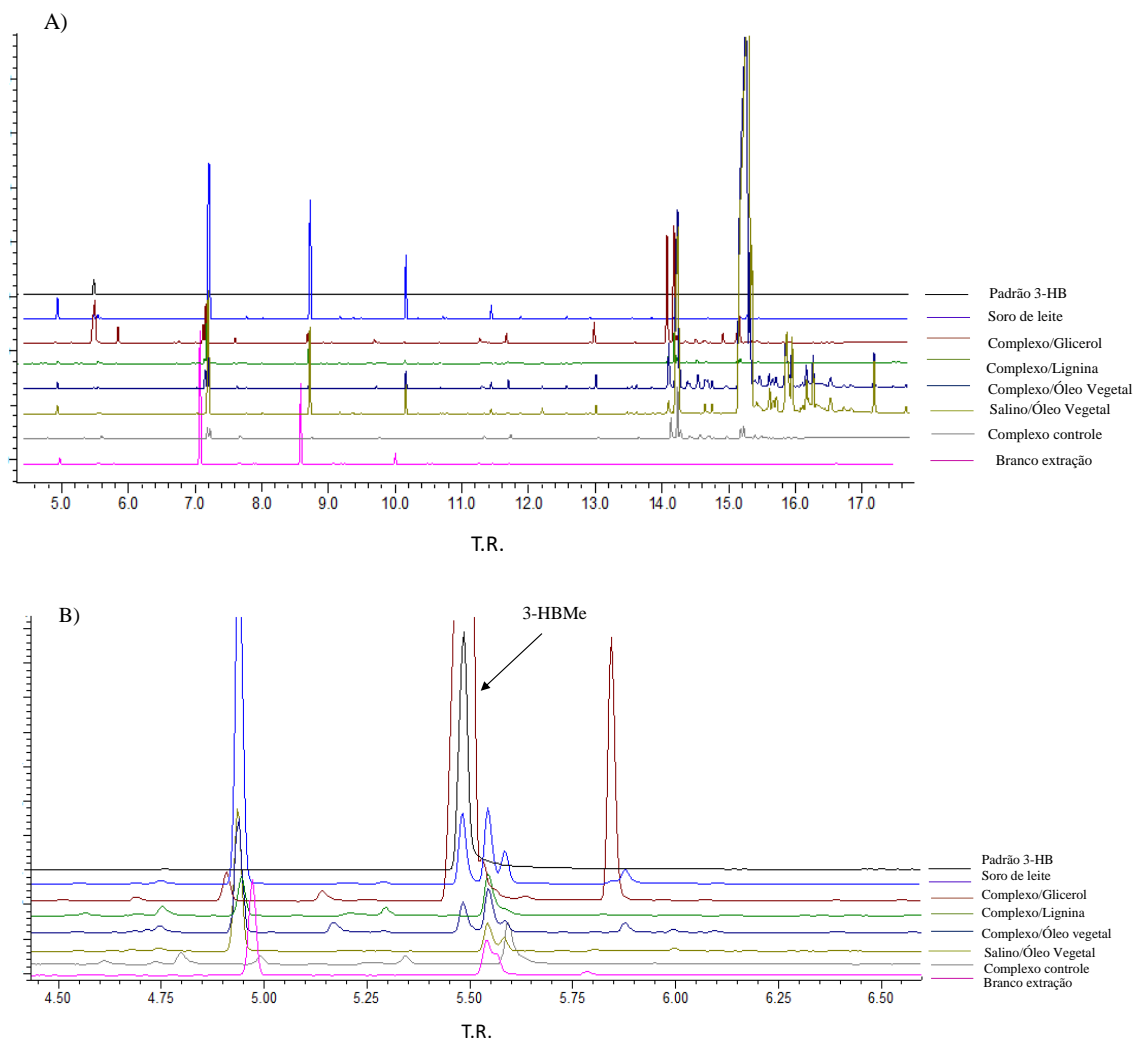


FIGURA 4.9 - Cromatogramas obtidos após metanólise das células de *Delftia* sp. cultivadas nos meios avaliados. A) Cromatograma de íons totais (TIC); B) Ampliação da região entre 4,5 e 6,75 min, com destaque para o sinal do monômero metilado 3-HBMe (T.R. 5,49 min).

Os cromatogramas mostram uma grande quantidade de compostos presentes nos extratos de *Delftia* sp., derivados de reações paralelas e componentes celulares. É possível notar que nas condições em que foi observada grande quantidade de massa celular produzida tem-se uma quantidade ainda maior de compostos, sendo muitos deles identificados como ésteres metílicos de ácidos graxos, como por exemplo o ácido oleico (T.R. 14,59) e o ácido palmítico (T.R. 14,70), provavelmente derivados da estrutura celular microbiana. O

cromatograma do branco da reação, bem como os de todas as condições que passaram pela reação de metanólise, apresentaram um sinal muito próximo ao do monômero 3-HBMe, com T<sub>R</sub>. de 5,57 min. Esse pico foi identificado através da biblioteca NIST®17 como sendo a molécula dimetil sulfato, resultado da reação paralela de metoxilação da molécula de ácido sulfúrico por metanol.

O produto de interesse, 3-HBMe, que foi utilizado como referência para avaliar a quantidade de PHA produzida, qual foi observado com tempo de retenção de 5,49 min.

O perfil de fragmentação para a molécula de interesse 3-HBMe, bem como as propostas de mecanismos de fragmentação que levam aos principais íons observados são representados na Figura 4.10.

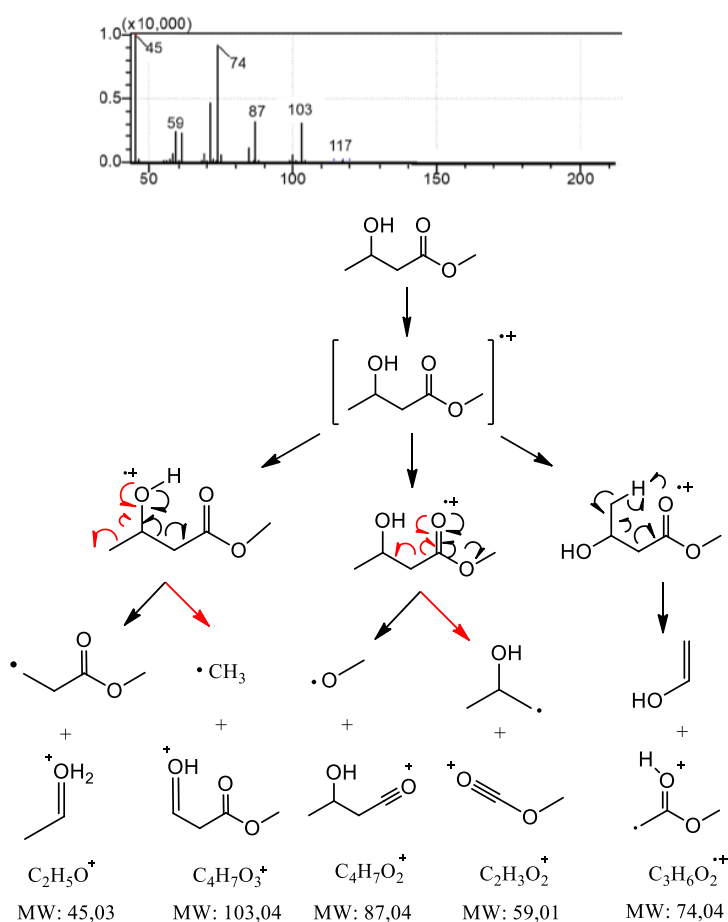


FIGURA 4.10 - Espectro de massas e proposta de fragmentação da molécula do monômero metilado, 3-hidroxibutirato de metila (Adaptado de PERLATTI, 2016).



Para algumas das condições de cultivo avaliadas, além do monômero 3-HBMe, também foram identificadas as moléculas metiladas dos monômeros 3-HV (T.R. 6,75 min), 3-HO (T.R. 9,69 min) e 3-HD (T.R. 11,27 min) (Apêndice 2). Os sinais dos monômeros foram integrados para se obter uma proporção relativa (mol %) da presença de cada monômero em cada condição estudada. Os dados obtidos para cada condição de massa seca celular e a composição monomérica dos PHAs produzidos, caracterizados por GC-MS, são apresentados na Tabela 4.6.

TABELA 4.6 – Valores de massa seca celular e composição monomérica dos PHAs produzidos por *Delftia* sp. cultivada em diferentes meios de cultivo. As células foram cultivadas em 100 mL de cada meio de cultivo acrescidas dos substratos mencionados na Tabela 3.4, durante 72 h à 28°C.

Cepa/ Substrato	Massa seca celular (g/L)	Composição PHA (mol %)			
		3-HB (C4)	3-HV (C5)	3-HO (C8)	3-HD (C10)
<b>Delftia sp.</b>					
Soro de Leite	0,17 a ± 0,00	100	ND	ND	ND
<b>Meio Complexo</b>					
Meio controle	1,52 b ± 0,01	ND	ND	39,50 ± 0,01	60,50 ± 0,01
Glicerol	2,34 c ± 0,03	85,30 ± 2,80	2,80 ± 0,10	4,10 ± 0,90	7,80 ± 2,00
Óleo vegetal	2,88 d ± 0,05	20,40 ± 4,00	ND	24,90 ± 0,60	54,70 ± 3,40
Lignina	0,26 a ± 0,00	ND	ND	37,70 ± 2,80	62,20 ± 2,90
<b>Meio salino</b>					
Controle	0,05 a ± 0,00	ND	ND	ND	ND
Óleo vegetal	0,37 a ± 0,01	ND	ND	ND	ND

Os resultados correspondem às médias dos experimentos em triplicata. A composição dos PHAs foi determinada por GC-MS através da identificação dos monômeros metilados.

ND: não detectado. Resultados dos testes acompanhados de mesma letra não possuem diferença estatística significativa. Teste Scott-Knott com 95% de significância.

De modo geral, com base nos resultados obtidos podemos notar que houve diferença tanto no crescimento celular quanto na composição dos PHAs

apenas mudando a composição dos meios de cultivo. Com base nos valores da Tabela 4.6 é possível observar que as condições que utilizaram meio complexo foram as que resultaram em maiores valores de crescimento celular e maior variação da composição monomérica. Pode-se observar, por exemplo, que só em meio LB foi observado um valor de massa celular de 1,52 g/L e foram identificados os monômeros de cadeia média 3-HO (39,50%) e 3-HD (60,50%). Esse comportamento observado no cultivo de *Delftia* sp. em meio LB sugere a possibilidade dessa cepa possuir metabolismo tipo II em relação à fase de acúmulo do polímero, também observada na espécie produtora de PHA *Ralstonia solanacearum* (ALVES et al., 2019). De acordo com MACAGNAN et al. (2017), em bactérias desse tipo pode ser observado acúmulo de PHA nas células que ainda estão em fase de crescimento, sem que haja necessariamente restrição de nutrientes.

O metabolismo do glicerol envolve a formação de piruvato e posteriormente do acetil-CoA, precursor da síntese de PHB, e por isso, pode ser utilizado como substrato para a produção desses biopolímeros (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). Em estudo anterior do grupo de pesquisa, realizado por DENADAE (2018) utilizando *Delftia* sp. em meio salino e glicerol como única fonte de carbono e energia, foi obtido um valor de massa seca de 1,88 g/L e identificado um único monômero, o 3-HB. Ao ser adicionada a mesma quantidade de glicerol em meio LB o crescimento de aumentou mais de 1,5 vezes. Além disso, a adição dessa fonte de carbono permitiu a identificação de quatro monômeros: 3-HB (85,30%) e 3-HV (2,80%), além de 3-HO (4,10%) e 3-HD (7,80%), presentes apenas quando em meio LB, sendo 3-HB produzido em maior fração. Isso indica que a bactéria *Delftia* sp. foi capaz de produzir um copolímero *scl-co-mcl* PHA na presença de glicerol em meio complexo. Caso similar foi reportado no trabalho realizado por RAZAIF-MAZINAH et al. (2017), que avaliaram o efeito do glicerol como única fonte de carbono e energia na fração molar dos monômeros produzidos por *Delftia tsuruhatensis* BET002. Os autores

identificaram os monômeros 3-HB (82,4%) e 3-HV (12,3%), 3-HO (1,7%) e 3-HD (3,5%), com frações molares muito similares às encontradas nesse trabalho. Ao observar a Figura 4.9 também é possível notar o sinal do 3-HB muito intenso, o que pode indicar um grande potencial de produção do polímero nessa condição. O estudo feito por VERLINDEN et al. (2011) reportou que *Cupriavidus necator* atingiu maior massa celular seca e maior concentração de PHB em meio TSB (alto nitrogênio) do que em BSM (baixo nitrogênio) após a adição de substrato. Aparentemente, a adição de glicerol no meio complexo foi responsável por desviar a produção de 3-HO e 3-HD para 3-HV e majoritariamente para 3-HB.

Com relação à produção de PHAs utilizando óleo vegetal como substrato, foram observados crescimento celular e produção de PHAs contendo os monômeros 3-HB, 3-HO e 3-HD por *Delftia* sp. quando em meio complexo. Além disso, essa condição apresentou o maior valor de crescimento celular dentre todas as condições estudadas para *Delftia* sp. (2,88 g/L). Diante desses resultados é possível supor que a adição de óleo vegetal ao meio de cultura complexo tenha favorecido o crescimento e a produção do monômero 3-HB. Utilizando-se esse mesmo substrato em meio salino, observa-se um baixo crescimento celular (0,37 g/L) e não foi detectada a presença de monômeros, indicando que esse meio não favoreceu a produção de PHAs, possivelmente porque não foi capaz de promover as condições nutritivas necessárias para estimular o metabolismo de acumulação de biopolímero.

O experimento que utilizou lignina em meio complexo mostrou um valor de massa seca muito inferior quando comparado às demais condições, inclusive ao controle (0,26 g/L). A presença da lignina no meio de cultivo pode ter inibido o crescimento microbiano. Além disso, os monômeros detectados (3-HO e 3-HD) foram os mesmos e nas mesmas proporções presentes no meio controle, sugerindo que a produção monomérica observada teve relação com o meio LB e não devido à presença da lignina como substrato. Para essa condição foi realizado o estudo em meio salino, entretanto não foi observado crescimento

celular. A lignina é um resíduo da indústria de papel amplamente produzido de estrutura altamente complexa. Na natureza, a lignina inicialmente é degradada por enzimas como lignina peroxidases, manganês peroxidases e lacases secretadas por fungos de podridão branca e marrom (MASAI; KATAYAMA; FUKUDA, 2007) e a degradação da lignina produz derivados como ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinapínico, que podem ser metabolizados por várias cepas bacterianas como *Pandoraea* sp. (KUMAR et al., 2017) e *Pseudomonas* spp. (TOMIZAWA et al., 2014; WANG et al., 2018), por exemplo. Um estudo realizado por KUMAR et al. (2017), reportou que os resultados obtidos para biomassa e acúmulo de PHA em *Pandoraea* sp. diminuíram quanto maior a complexidade da estrutura dos intermediários da lignina, levando à conclusão de que a lignina precisa ser despolimerizada antes de ser utilizada de forma eficiente pelos microrganismos.

Para os estudos envolvendo diferente relação C/N para *Delftia* sp., foi possível observar que quanto menor essa relação mais favorável se mostrou o crescimento celular e acúmulo e diversidade da composição monomérica desses polímeros. Comportamento contrário foi observado no estudo realizado por LIU et al. (2019) que identificou o acúmulo do PHA poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) em *Rhodospirillum rubrum*, em meio de cultivo salino e frutose como fonte de carbono, contendo a fração de 46,5% do monômero 3-HV. Já no estudo realizado por JIN; NIKOLAU (2012) utilizando a mesma espécie bacteriana em meio RRNCO, que usa como fonte de carbono acetato de sódio em pequena quantidade, extrato de levedura e NH<sub>4</sub>Cl, foi obtido o mesmo PHA com conteúdo do monômero 3-HV de 0,7%. Portanto, as fontes de carbono e a relação C/N podem ser fatores importantes que afetam o conteúdo de PHA.

O soro de leite é uma fonte de nutrientes complexa e que apresenta diversos componentes que trazem impactos positivos para ser utilizado como substrato para a produção de PHA. O soro é composto por açúcares (lactose,

glicose, galactose), que podem ser utilizados pela bactéria como fonte de carbono, proteínas solúveis, que podem servir como fontes de carbono complexas e de nitrogênio, além de sais e pequenos componentes (como aminoácidos e vitaminas) que podem servir de suporte para o desenvolvimento celular (OBRUCA et al., 2011). Com base nos resultados da Tabela 4.6, o cultivo realizado em soro de leite apresentou um valor de massa seca celular de 0,17 g/L. Apesar de ser um valor relativamente baixo comparado às outras condições, a análise visual do sinal do monômero 3-HB produzido indica que essa condição poderia ser uma forte candidata a obter altos valores de rendimento polimérico (massa PHA/massa seca celular \* 100), ou seja, com a otimização de alguns parâmetros de cultivo nessa condição um grande acúmulo intracelular de polímero pode ser alcançado.

Diversas pesquisas reportam sobre a produção de PHAs que compreendem monômeros com unidades de cadeia curta e de cadeia média (GUMEL; ANNUAR; HEIDELBERG, 2012; PINZÓN, 2015; RAZAIF-MAZINAH et al., 2017). A combinação de monômeros PHA-*scl* e PHA-*mcl* no polímero aumenta consideravelmente a flexibilidade e a qualidade do material quando comparado ao polímero composto exclusivamente de PHA-*scl*, que é um material relativamente rígido e quebradiço (SUDESH; ABE; DOI, 2000). Comportamentos como esses sugerem que apesar de algumas enzimas PhaC sintases de classe I aparentemente terem mais afinidade com monômeros de cadeia curta, também são capazes de incorporar monômeros de cadeia média.

Os cromatogramas obtidos para cada condição em *Aureimonas* sp. são apresentados na Figura 4.11.

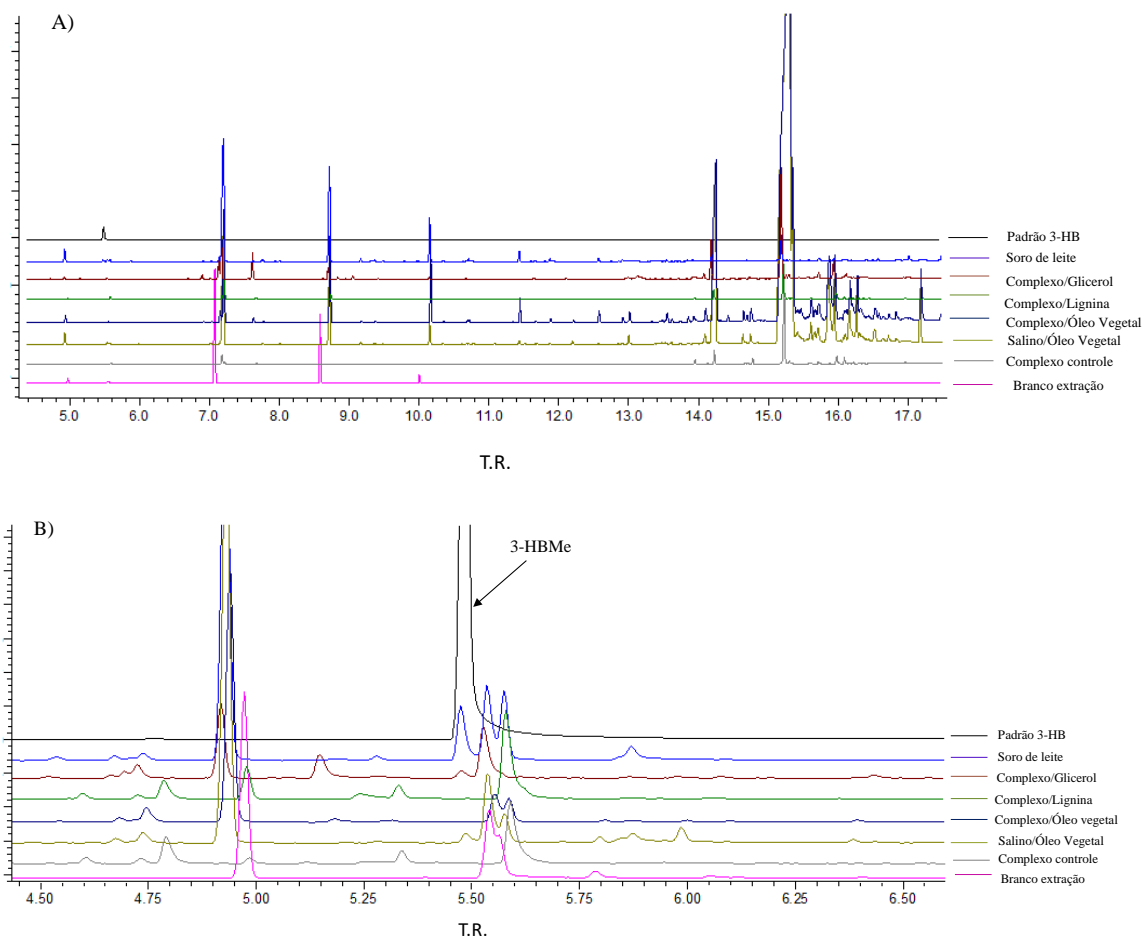


FIGURA 4.11 - Cromatogramas obtidos após metanólise das células de *Aureimonas* sp. cultivadas nos meios avaliados. A) Cromatograma de íons totais (TIC); B) Ampliação da região entre 4,5 e 6,75 min, com destaque para o sinal do monômero metilado 3-HBMe (T.R. 5,49min).

Para *Aureimonas* sp. apenas o monômero 3-HB foi identificado. O sinal do monômero foi integrado para se obter uma proporção relativa (mol %) da presença da molécula em cada condição estudada. Os resultados obtidos para cada condição de massa seca celular e a composição monomérica dos PHAs produzidos, caracterizados por GC-MS, são apresentados na Tabela 4.7.

TABELA 4.7 – Valores de massa seca celular e composição monomérica dos PHAs produzidos por *Aureimonas* sp. cultivada em diferentes meios de cultivo. As células foram cultivadas em 100 mL de cada meio de cultivo acrescidas dos substratos mencionados na Tabela 3.4, durante 72 h à 28°C.

Composição PHA (mol %)					
Cepa/ Substrato	Massa seca celular (g/L)	3-HB (C4)	3-HV (C5)	3-HO (C8)	3-HD (C10)
Soro de Leite	0,34 a ± 0,01	100	ND	ND	ND
<i>Meio Complexo</i>					
Meio controle	1,89 b ± 0,00	ND	ND	ND	ND
Glicerol	2,74 c ± 0,04	100	ND	ND	ND
Óleo vegetal	3,13 d ± 0,01	ND	ND	ND	ND
Lignina	0,25 a ± 0,00	ND	ND	ND	ND
<i>Meio salino</i>					
Controle	0,08 a ± 0,00	ND	ND	ND	ND
Óleo vegetal	0,34 a ± 0,00	100	ND	ND	ND

Os resultados correspondem às médias dos experimentos em triplicata. A composição dos PHAs foi determinada por GC-MS através da identificação dos monômeros metilados.

ND: não detectado. Resultados dos testes acompanhados de mesma letra não possuem diferença estatística significativa. Teste Scott-Knott com 95% de significância.

Os resultados referentes à bactéria *Aureimonas* sp. mostram que apesar da produção de PHA pela cepa, a variedade monomérica e as condições em que é produzido são muito menores quando comparadas a *Delftia* sp. Apenas três condições permitiram a identificação do monômero 3-HB: soro de leite, glicerol em meio complexo e óleo vegetal em meio salino.

Das diferentes fontes de carbono avaliadas em meio complexo, apesar dos elevados valores de crescimentos celular, apenas na condição com glicerol foi identificado um pequeno sinal do monômero. O valor de massa celular obtido foi de 2,74 g/L e foi observada a presença apenas do monômero 3-HB. O estudo feito por DENADAE (2018) realizando o cultivo de *Aureimonas* sp. em meio salino com a adição de glicerol obteve um valor de massa seca de 0,44 g/L e a identificação do monômero 3-HB. A condição usando soro de leite apresentou

um valor de massa seca de 0,34 g/L e da mesma forma observada em *Delftia* sp. para essa condição, a análise visual do sinal do monômero 3-HB produzido indica que essa condição poderia ser uma forte candidata a obter altos valores de rendimento polimérico.

Outra condição que evidenciou a produção de biopolímero foi a que utilizou óleo vegetal como única fonte de carbono em meio salino. Para essa condição foi obtido um valor de massa seca de 0,34 g/L e foi identificado um sinal para a molécula de 3-HBMe. Diante desses resultados é muito provável que o metabolismo dessa bactéria seja capaz de desviar intermediários da oxidação de ácidos graxos para a síntese de PHAs e que esses valores observados possam ser melhorados para essas condições em estudos futuros. Em contrapartida, a utilização do mesmo substrato em meio complexo induziu o crescimento celular que obteve o valor máximo de 3,13 g/L, entretanto não foi observado acúmulo de PHA nessa condição. Durante o crescimento bacteriano normal, a 3-cetotiolase (PhaA) será inibida pela coenzima-A livre que sai do ciclo de Krebs, mas quando a entrada de acetil-CoA no ciclo de Krebs é restrita (durante a limitação de nutrientes que não sejam fonte de carbono), o excesso de acetil-CoA é canalizado para a biossíntese de PHB (VERLINDEN et al., 2007) (Figura 4.12). Provavelmente, para essa bactéria, os componentes do meio complexo responsáveis pelo desenvolvimento celular ainda estavam presentes no meio e não houve esgotamento e desbalanço nutricional suficiente que induzisse a produção de PHA.



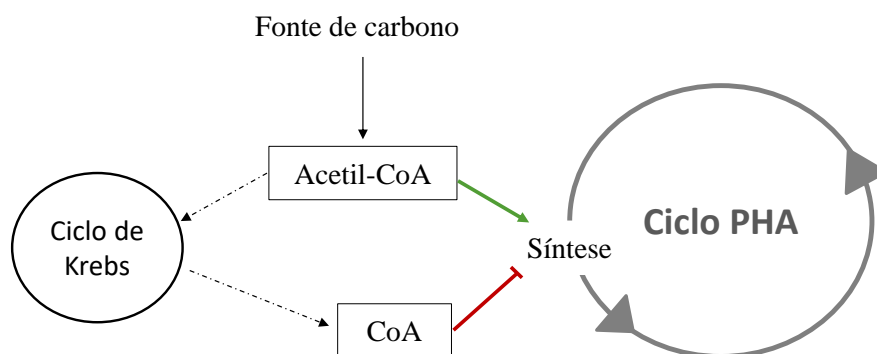


FIGURA 4.12 - Diagrama esquemático da regulação do metabolismo dos PHAs. Adaptado de VELÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2020.

Dados os diferentes comportamentos observados quando comparada a produção de PHA, tanto com relação ao uso de diferentes substratos empregados, quanto à diferente composição monomérica produzida, é notável que as duas cepas estudadas apresentam diferentes rotas biossintéticas envolvidas, o que pode estar relacionado com a diferença da composição e organização do genoma das duas bactérias.

Desse modo, apesar das cepas terem sido capazes de produzir PHA utilizando óleo vegetal como substrato, não é possível afirmar se esse precursor de PHA é produto de uma reação catalisada por uma hidratase, pela atividade da epimerase do complexo  $\beta$ -oxidação ou por uma 3-cetoacil-CoA redutase específica.

### 4.3 Desenvolvimento e validação do método de análise por GC-MS para análises quantitativas

Em termos de método de análise de PHAs, a cromatografia gasosa se mostra como método padrão para a identificação e quantificação dessas moléculas, mostrando alta precisão e reprodutibilidade. Para esse tipo de análise, é necessário o desenvolvimento de um método altamente sensível para a quantificação dos PHAs (KHOK et al., 2020). Desse modo, o método por GC-MS

se mostra como uma abordagem rápida e precisa para identificar os monômeros de PHAs e sua composição dentro das células (HUANG et al., 2018).

O método desenvolvido por DENADAE (2018) em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa foi tomado como base para a análise dos monômeros em investigação. Modificações foram realizadas para que o método se enquadrasse ao uso pretendido nesse estudo.

O cromatograma obtido utilizando-se o método analítico desenvolvido, em modo *full scan*, para a análise dos monômeros metilados estudados 3-metilhidroxibutirato e 3-metilhidroxivalerato e o padrão interno, pode ser observado na Figura 4.13.

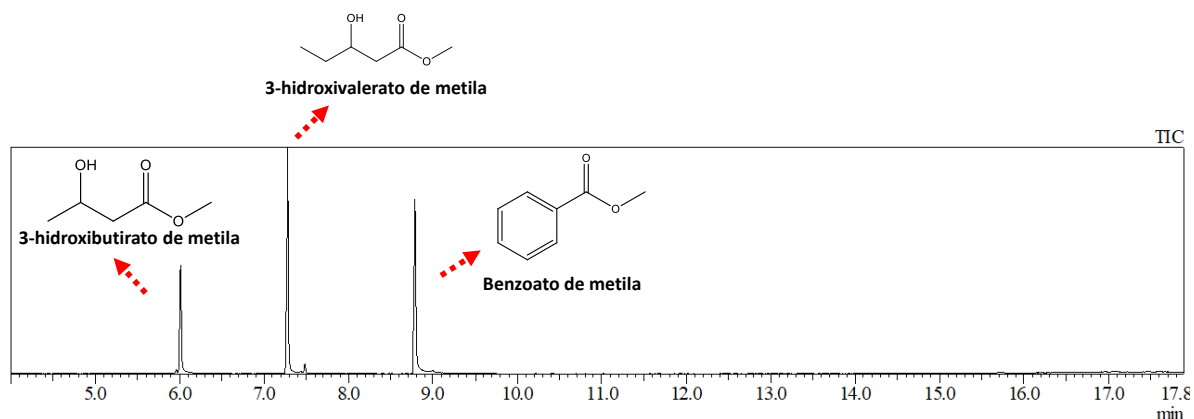


FIGURA 4.13 – Cromatograma obtido da solução padrão dos compostos estudados em clorofórmio ( $T_{R.} = 6,00$  min – 3-hidroxibutirato de metila;  $T_{R.} = 7,28$  min – 3-hidroxivalerato de metila;  $T_{R.} = 8,78$  min – Benzoato de metila). As condições de análise são apresentadas nas Tabelas 3.5 e 3.6.

Para provar a confiabilidade do método analítico desenvolvido e a aplicação satisfatória de seus parâmetros na análise de monômeros de PHAs, foram investigados parâmetros como seletividade, linearidade, efeito de matriz, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

### 4.3.1 Seletividade

A seletividade é a primeira etapa no desenvolvimento e validação de um método analítico e consiste na capacidade do método de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em estudo na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa (RIBANI et al., 2004). Para essa avaliação, foi utilizado o extrato da bactéria *Delftia* sp. em meio LB como matriz, em que não foi identificada a presença do monômero 3-HB, em um primeiro momento.

Não foi observado o sinal do monômero para o experimento em meio LB nas análises qualitativas, utilizando-se o método analítico com um *split* mais alto e modo de varredura total de íons. Entretanto, ao ser utilizado o método analítico em modo SIM, que é mais sensível e seletivo, pôde-se observar uma pequena quantidade do analito formada (Figura 4.14A). Se tratando de um extrato bacteriano, pode-se esperar uma grande quantidade de compostos celulares que possam interferir nas análises quantitativas, então foi importante explorar uma forma de obter essa matriz isenta do analito. Sendo assim, a secagem do solvente do extrato (clorofórmio), seguida da ressuspensão com o mesmo solvente se mostrou como uma maneira eficiente de manter a composição da matriz e a ausência do analito (Figura 4.14B).

As Figuras 4.14C e D mostram exemplos dos resultados de seletividade após o processo de secagem do solvente, tanto para amostra do extrato de *Aureimonas* sp. quanto para o extrato de *Delftia* sp. Observa-se que a região dos picos referente ao analito 3-HB não sofreu nenhuma interferência por meio de possíveis compostos produzidos pelas bactérias, possibilitando assim, uma quantificação mais assertiva das amostras.

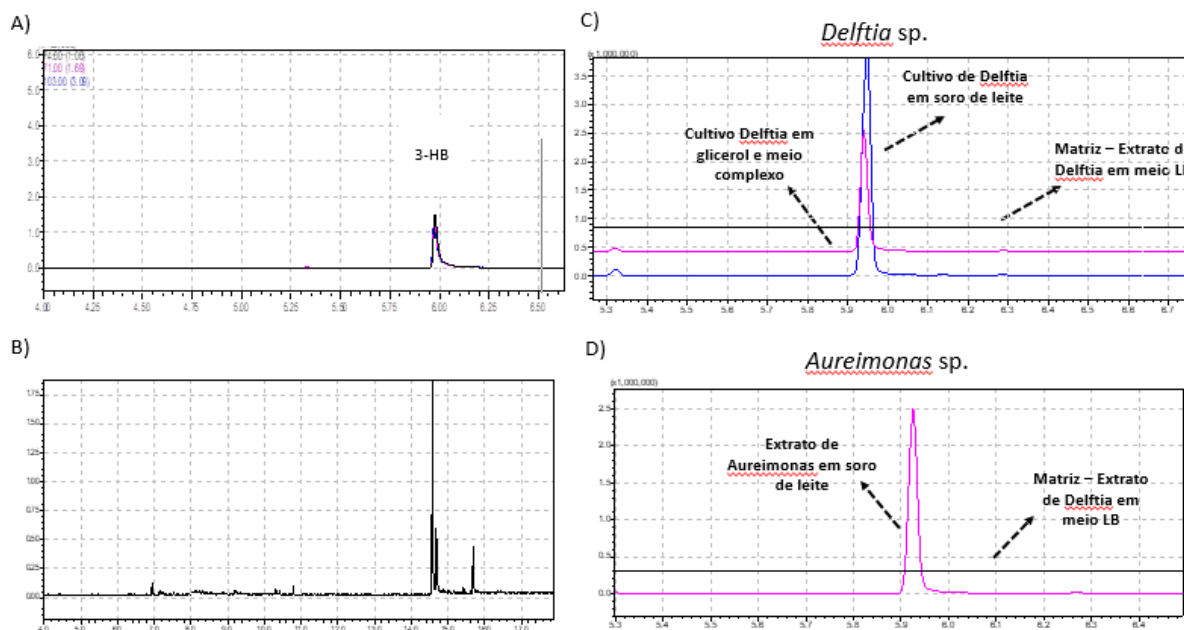


FIGURA 4.14 – Seletividade do método analítico desenvolvido. A) cromatograma do extrato de *Delftia* sp. antes do processo de secagem do solvente; B) cromatograma do extrato após o processo de secagem, utilizado como matriz; C) exemplos de cromatogramas comparando a seletividade do método desenvolvido para *Delftia* sp.; D) exemplos de cromatogramas comparando a seletividade do método desenvolvido para *Aureimonas* sp.

### 4.3.2 Linearidade e efeito de matriz

Foi construída uma curva de calibração para o analito de interesse, a fim de avaliar a linearidade do método desenvolvido. A curva de calibração é referente ao modelo matemático capaz de estabelecer uma relação entre a resposta instrumental (área do pico cromatográfico) e a concentração do analito (CASSIANO et al., 2009). Além disso, para evitar imprecisão do método de padronização externa, devido a possíveis variações de temperatura, vazão de gás, variações no autoinjeter, etc. durante as análises, a curva de calibração foi construída utilizando-se o composto benzoato de metila como padrão interno. Usar o padrão interno é uma maneira de corrigir erros aleatórios durante as

análises, de modo que a quantificação é feita por meio da razão do sinal do analito e o sinal do padrão interno (RIBANI et al., 2004).

A Figura 4.15 mostra as curvas de calibração obtidas, construídas em solvente puro e em matriz.

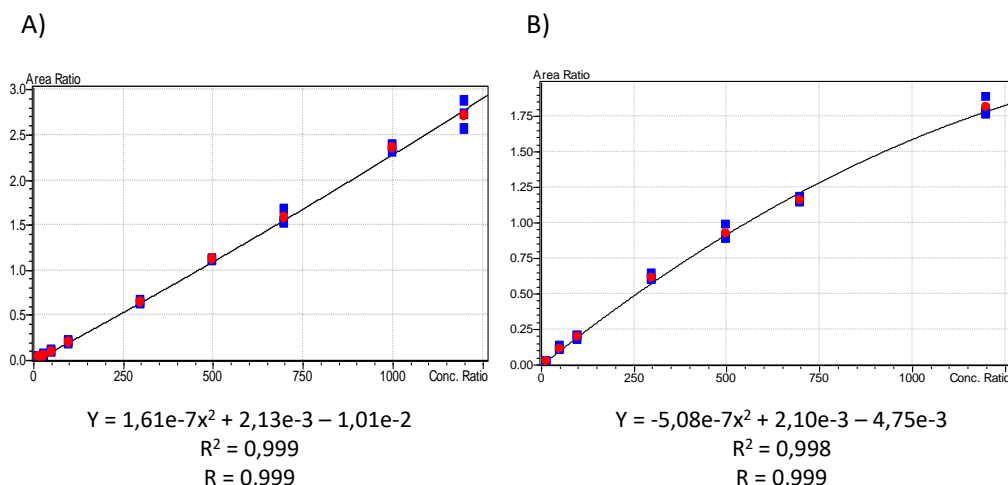


FIGURA 4.15 - Curvas de calibração referentes ao monômero 3-HB. A) em solvente puro (clorofórmio); B) em matriz (extrato do meio de cultivo LB para *Delftia* sp. isento do analito).

Muitas vezes a falta de precisão de um método cromatográfico pode estar relacionado ao efeito de matriz (PINHO et al., 2009). Desse modo foi utilizado o método de superposição de matriz, que se refere à construção de uma curva de calibração através da adição do padrão do analito em diferentes concentrações à uma matriz similar à da amostra, mas que seja isenta do composto de interesse (RIBANI et al., 2004).

Para as duas curvas obtidas ajustou-se um modelo quadrático, uma vez que o modelo linear previamente empregado para o conjunto de dados obtido não apresentou boa correlação e dispersão dos resíduos. Esse ajuste pode ser necessário quando são usados determinados detectores, como a espectrometria de massas, por exemplo. Além disso, foi atribuído peso de  $1/A$ , um método que aplica uma regressão ponderada, tendo como finalidade dar maior importância para os resultados com baixa variância e menor importância para resultados com

alta variância (CASSIANO et al., 2009). De fato, o ajuste para um modelo quadrático mostrou resultados satisfatórios, como valores de  $r$  e  $r^2$  de 0,999 para a curva em solvente e 0,998 e 0,999 para a curva na matriz, representando valores satisfatórios já que a ANVISA (2017) recomenda valores de  $r$  e  $r^2$  de 0,990 e 0,980, respectivamente.

Em um modelo quadrático, também conhecido como equação de segundo grau, o coeficiente angular estabelece a concavidade da parábola. Através da comparação das duas curvas e suas respectivas equações de regressão, pode ser observado que a curva construída em solvente puro apresentou um valor do coeficiente a positivo, indicando a concavidade para cima; já a curva em matriz apresentou um valor de a negativo, demonstrando a concavidade para baixo. Esses valores mostram diferença significativa entre as curvas, indicando que o não uso de matriz para quantificação poderia levar a uma quantificação equivocada. Desse modo, consideramos que houve efeito de matriz e as amostras foram quantificadas pela curva de calibração construída na matriz.

### **4.3.3 Limite de detecção e Limite de quantificação**

Para estimar o limite de operação do equipamento e o início da faixa de trabalho foram determinados os limites de detecção e quantificação. Uma série de diluições sucessivas das amostras foram realizadas contendo o padrão de 3-HB em matriz até que fossem alcançados valores de sinal/ruído próximos a 10 e 3 para LoQ e LoD, respectivamente. Os valores alcançados de LoD e LoQ foram de 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$ .

### **4.3.4 Precisão e Exatidão**

A precisão e exatidão do método foram estimadas por meio das análises de três concentrações distintas, sendo cada concentração injetada como

réplicas autênticas, em quintuplicata. As três concentrações avaliadas correspondem a pontos diferentes das concentrações da curva, sendo eles 18,0; 600 e 900  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados de precisão e exatidão estão dispostos na Tabela 4.8.

TABELA 4.8 - Valores de precisão e exatidão obtidos para o método quantitativo de análise do monômero 3-HB.

Amostra	Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )	Exatidão (%)	Precisão (%)
CQ1_réplica1	18,0	17,6	97,9	6,78
CQ1_réplica2		18,3	101,4	
CQ1_réplica3		15,7	87,1	
CQ1_réplica4		18,0	100,3	
CQ1_réplica5		16,2	89,8	
Média		17,2	95,3	
CQ2_réplica1	600	578	96,4	2,83
CQ2_réplica2		595	99,1	
CQ2_réplica3		558	93,1	
CQ2_réplica4		558	93,0	
CQ2_réplica5		585	97,5	
Média		575	95,8	
CQ3_réplica1	900	922	102	3,31
CQ3_réplica2		887	98,5	
CQ3_réplica3		878	97,6	
CQ3_réplica4		905	101	
CQ3_réplica5		954	106	
Média		909	101	

Os resultados mostrados na Tabela 4.8 sugerem que o método desenvolvido se mostrou preciso e exato. Os valores de exatidão variaram entre 87,1 e 106% e os de precisão, entre 2,83 e 6,78. CASSIANO et al. (2009) reporta que na análise de pequenas moléculas em matrizes biológicas, os valores de precisão e exatidão determinados para cada concentração dos controles de qualidade devem estar no intervalo de 15%, e no caso do LoQ, não deve

ultrapassar 20%. Dessa forma, os resultados obtidos se enquadram nesses limites e se mostram satisfatórios, apesar da complexidade da matriz em estudo.

#### **4.4 Planejamento Fatorial para o estudo de variáveis e seus efeitos**

A otimização de parâmetros experimentais relevantes é, provavelmente, uma das etapas mais críticas de um trabalho científico, principalmente daqueles que têm como objetivo o desenvolvimento de processos tecnológicos aplicáveis em larga escala (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005). O estudo e conhecimento das variáveis envolvidas em um processo biotecnológico de crescimento celular e produção de PHAs se mostra como uma importante estratégia para a otimização de processos em grande escala.

A avaliação das variáveis através de experimentos utilizando “um-fator-de-cada-vez” se mostra como um método adequado para identificar alguns fatores mais importantes e suas faixas operacionais úteis, mas no entanto, esses experimentos raramente avaliam o efeito dos fatores ao mesmo tempo e suas interações, podendo apresentar como respostas valores não ideais (BIGLARI et al., 2018). Desse modo, com base em estudos prévios (DE PAULA et al., 2019; DENADAE, 2018), foi possível estabelecer as variáveis a serem estudadas, bem como a faixa operacional utilizada para o cultivo das cepas bacterianas em estudo (Tabela 3.8 e 3.9).

De acordo com os resultados de triagem, o planejamento foi empregado para avaliar como respostas a quantidade de biomassa (g/L), a concentração do monômero 3-HB (g/L) e o rendimento biopolimérico (%) sob diferentes condições de cultivo. Assim, um planejamento fatorial completo  $2^3$  foi realizado para investigar a influência de parâmetros de condições de cultivo em diferentes meios. Os planejamentos foram realizados em dois níveis com 4 pontos centrais, totalizando 12 experimentos para cada condição. As Tabelas 4.9 e 4.11



apresentam os experimentos propostos pelo planejamento experimental para cada condição e as respectivas respostas (variáveis dependentes) obtidas.

TABELA 4.9 - Matriz do planejamento fatorial contendo as variáveis codificadas e as respostas obtidas para a avaliação de cultivo de *Delftia* sp. em glicerol em meio complexo e/ou soro de leite.

Experimento	Variáveis			Respostas					
	V1	V2	V3	Massa seca celular (g/L)		Concentração 3-HB (g/L)		Rendimento biopolimérico (%)	
				Glicerol	Soro de leite	Glicerol	Soro de leite	Glicerol	Soro de leite
1	-1	-1	-1	0,75	0,31	$2,77 \times 10^{-3}$	$4,66 \times 10^{-3}$	0,37	1,49
2	1	-1	-1	0,00	1,14	0,00	$4,39 \times 10^{-3}$	0,00	0,38
3	-1	1	-1	2,00	0,49	$7,31 \times 10^{-3}$	$1,64 \times 10^{-2}$	0,37	3,36
4	1	1	-1	0,52	1,96	$1,79 \times 10^{-3}$	$1,92 \times 10^{-2}$	0,34	0,98
5	-1	-1	1	2,56	0,56	$3,16 \times 10^{-2}$	$4,24 \times 10^{-3}$	1,23	0,76
6	1	-1	1	0,94	2,60	$2,77 \times 10^{-3}$	$1,30 \times 10^{-1}$	0,29	4,98
7	-1	1	1	4,05	0,36	0,00	$4,83 \times 10^{-3}$	0,00	1,35
8	1	1	1	4,30	2,39	$1,19 \times 10^{-1}$	$3,00 \times 10^{-2}$	2,77	1,26
9	0	0	0	2,36	1,56	$6,71 \times 10^{-2}$	$9,74 \times 10^{-2}$	2,85	6,26
10	0	0	0	2,47	1,85	$6,64 \times 10^{-2}$	$1,65 \times 10^{-1}$	2,69	8,94
11	0	0	0	2,88	1,89	$6,92 \times 10^{-2}$	$8,98 \times 10^{-2}$	2,40	4,74
12	0	0	0	2,40	1,76	$7,81 \times 10^{-2}$	$9,41 \times 10^{-2}$	3,26	5,34

VI: concentração de substrato (% v/v); V2: tempo (h); V3: agitação (rpm); -1: nível inferior, 0: ponto central, 1: nível superior das variáveis.

Nesses estudos, pode-se observar uma alta variabilidade entre as respostas para os estudos nos dois meios de cultivo para *Delftia* sp., mostrando que as variáveis dependentes foram influenciadas pela variação dos fatores estudados. Os resultados obtidos para massa seca, concentração de PHB e rendimento biopolimérico utilizando-se o glicerol em meio complexo, variaram de 0,00 à 4,30 g/L, 0,00 à  $1,19 \times 10^{-1}$  g/L e 0,00 à 3,26%, respectivamente. Os resultados de massa seca celular foram maiores do que os encontrados no trabalho

de RAZAIF-MAZINAH et al. (2017), que observaram crescimento de até 1,8 g/L por *Delftia tsuruhatensis* Bet002 em meio de cultivo com glicerol. Os resultados de rendimento de PHA reportados foram de até 4,5%, muito similares aos observados nesse trabalho.

Já utilizando-se soro de leite como substrato os resultados obtidos variaram de 0,31 à 2,60 g/L,  $4,24 \times 10^{-3}$  à  $1,65 \times 10^{-1}$  g/L e 0,38 à 8,94%, para massa seca, concentração de PHB e rendimento biopolimérico, respectivamente. Resultados similares de massa seca celular foram obtidos por OBRUCA et al. (2011) que obtiveram variações entre 0,75 e 2,99 g/L em um planejamento experimental utilizando meio de cultivo com soro de queijo. Porém maiores variações foram encontradas para os resultados de concentração de PHB (0,01 – 1,06 g/L) e rendimento biopolimérico (1,90 – 35,49%).

Com base nos resultados obtidos, foram calculados os efeitos de cada variável independente. Como foram estudadas três respostas distintas foi necessária a aplicação da função desejabilidade, que consiste em converter as múltiplas respostas em uma única, a partir dos valores de desejabilidade individual ( $d_i$ ). A variável dependente, concentração de PHB, g/L, foi considerada a mais importante em termos de uma futura aplicação, por isso julgou-se interessante a aplicação de peso 2 para o cálculo da desejabilidade individual dessa resposta. Os valores de desejabilidade individual e desejabilidade global obtidos nos experimentos para *Delftia* sp. podem ser observados na Tabela 4.10. Para esses estudos, os resultados desejáveis foram considerados os que apresentaram maiores valores para todas as repostas (massa seca celular, concentração de PHB e rendimento biopolimérico).

TABELA 4.10 - Desejabilidades individuais e globais obtidas para os experimentos usando meio complexo-Glicerol e soro de leite como substratos para *Delftia* sp.

Experimento	Complexo-Glicerol				Soro de leite			
	$d_{i(CDW)}$	$d_{i(3-HB)}$	$d_{i(Rend)}$	D	$d_{i(CDW)}$	$d_{i(3HB)}$	$d_{i(Rend)}$	D
1	0,17	0,00	0,11	0,02	0,00	0,00	0,13	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00
3	0,46	0,00	0,11	0,06	0,08	0,01	0,35	0,05
4	0,12	0,00	0,11	0,01	0,72	0,01	0,07	0,08
5	0,60	0,07	0,38	0,25	0,11	0,00	0,04	0,00
6	0,22	0,00	0,09	0,02	1,00	0,61	0,54	0,69
7	0,94	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,11	0,00
8	1,00	1,00	0,85	0,95	0,91	0,03	0,10	0,13
9	0,55	0,32	0,87	0,53	0,54	0,34	0,69	0,50
10	0,57	0,31	0,83	0,53	0,67	1,00	1,00	0,87
11	0,67	0,34	0,74	0,55	0,69	0,28	0,51	0,46
12	0,56	0,43	1,00	0,62	0,63	0,31	0,58	0,49

$d_{i(CDW)}$  = desejabilidade individual referente à massa seca celular;  $d_{i(3-HB)}$  = desejabilidade individual referente à produção do monômero 3-HB;  $d_{i(Rend)}$  = desejabilidade individual referente ao rendimento biopolimérico; D = desejabilidade global.

Com base nos dados obtidos, pode ser observado que o experimento 8 seria o melhor para otimizar a produção de biopolímeros PHAs utilizando glicerol em meio complexo para *Delftia* sp., com valor de D=0,95. Já para o uso de soro de leite como meio de cultivo, a melhor condição seria a do experimento 6, com valor de D=0,69.

Com base nos valores de desejabilidade global foram construídos os gráficos de efeito, como apresentados na Figura 4.16.

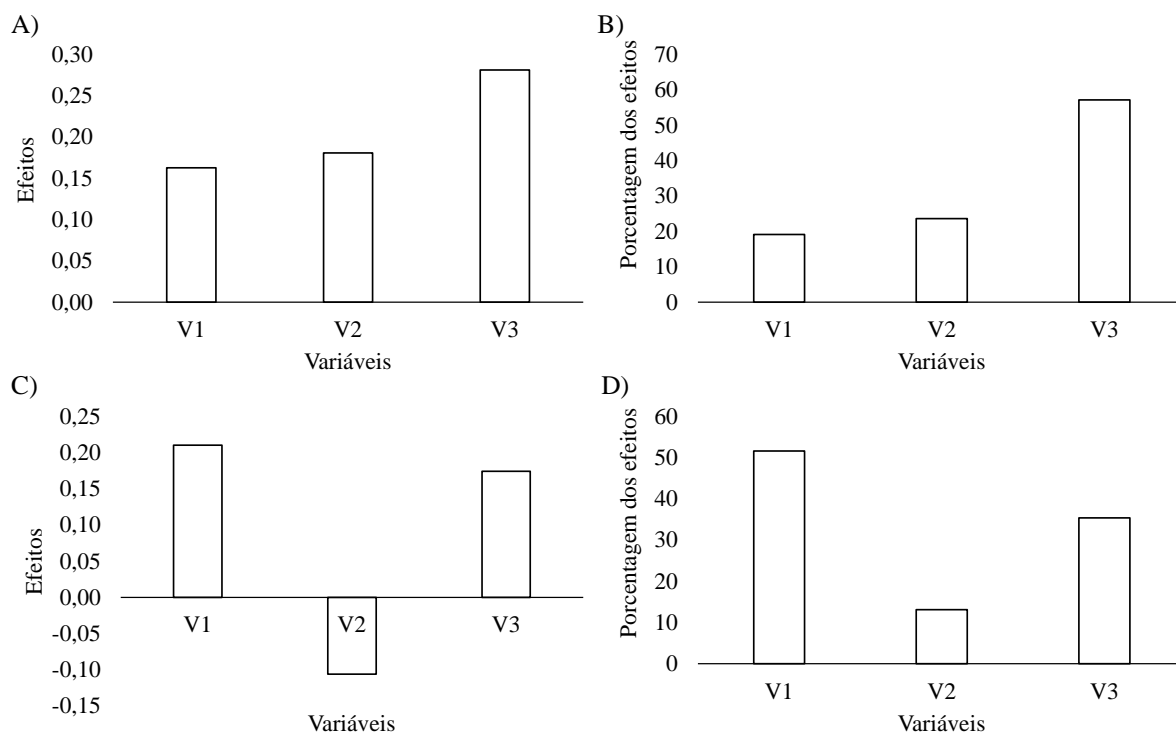


FIGURA 4.16 - Gráficos dos efeitos e porcentagem de cada efeito das variáveis sobre o crescimento celular e acúmulo de PHA em *Delftia* sp. nos meios glicerol em meio complexo (A e B) e soro de leite (C e D). V1: concentração do substrato; V2: tempo de cultivo; V3: agitação.

É possível observar que todas as variáveis tiveram influência significativa sobre o crescimento e produção de biopolímero usando meio complexo e glicerol (% maior que 10). A agitação (V3), foi a que apresentou maior impacto nas respostas, sugerindo que a taxa de aeração desempenha um papel importante no processo de fermentação. O impacto positivo demonstra que o aumento da aeração do sistema foi favorável ao acúmulo de biopolímero. Resultados similares foram obtidos por MUSA et al. (2016) e ZAHARI et al. (2012), em que velocidades de agitação acima de 150 rpm favoreceram o crescimento celular e produção de PHB por *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp. e *Citrobacter* sp.. Em geral, P(3HB) é acumulado sob condições de estresse que levam a uma redução no crescimento celular. O estresse pode ser estimulado na forma de aeração limitada ou nitrogênio limitado, dentre outras

coisas (BIGLARI et al., 2018). Por outro lado, a velocidade de agitação mais lenta pode causar um agregado celular, tornando o meio mais heterogêneo, podendo, eventualmente, causar diminuição no crescimento celular e afetar a produção de PHB (MUSA et al., 2016). A agitação não só fornece a mistura e homogeneização celular, bem como a dispersão de calor no caldo de fermentação, mas também melhor aeração para as células aumentando a taxa de transferência de oxigênio em todo o meio de fermentação (ZAHARI et al., 2012).

Já no caso do uso de soro de leite, os resultados mostram que as variáveis independentes concentração de soro (V1) e taxa de agitação (V3) foram as mais importantes quando comparadas com o tempo de cultivo (V2). O aumento da concentração de substrato e da agitação, levaram a maiores valores de resposta, que por sua vez, contribui para resultados satisfatórios da produção de PHAs. De modo similar, um estudo feito por BIGLARI et al. (2018) identificou essas mesmas variáveis independentes como importantes e positivas. A variável tempo de cultivo (V2) apresentou efeito negativo, ou seja, quanto maior o tempo do experimento, menos favorável foi o crescimento e a produção do polímero. A digestão intracelular do PHA acumulado começa assim que o microrganismo entra no estágio de esgotamento de nutrientes durante o processo de fermentação e para atingir a máxima produção de PHA pelo processo de fermentação, é importante identificar a janela de tempo em que o acúmulo de polímero é maior, que deve ser logo antes do início da utilização do polímero pela célula hospedeira (RAY et al., 2016). É possível propor que, com o passar do tempo do experimento no meio contendo soro de leite, a rota de degradação de PHA de *Delftia* sp. tenha sido estimulada devido ao esgotamento dos nutrientes. A identificação de genes relacionados à rota de degradação desses polímeros para essa bactéria contribui para essa hipótese. Comportamento distinto foi observado no caso do cultivo em meio complexo com glicerol (V2 importante e positiva), provavelmente porque a quantidade de nutrientes presente nesse meio foi maior, em comparação com o

soro de leite, e pode ter demorado mais tempo para se esgotar totalmente a ponto de acionar da rota de degradação do polímero.

Os resultados mostram o impacto do meio de cultivo na produção de PHA pela cepa estudada. Quando em meio complexo, a concentração de fonte de carbono (glicerol) não foi tão impactante no processo quando comparada ao soro de leite, adicionado diretamente em água destilada. Desse modo, todos os nutrientes presentes no meio de cultivo vieram dessa fonte, o que leva a pensar que a lactose, proteínas e gorduras do soro podem ser melhor assimiladas pela cepa *Delftia* sp.

Na Tabela 4.11 pode-se observar os 12 experimentos propostos pelo planejamento experimental e as respostas (variáveis dependentes) correspondentes obtidas para *Aureimonas* sp. utilizando meio de cultivo com soro de leite. Nesse estudo também foi observada uma variabilidade entre as respostas; os resultados obtidos para massa seca, concentração de PHB e rendimento biopolimérico variaram entre 0,14 e 1,94 g/L,  $2,39 \times 10^{-4}$  e  $7,60 \times 10^{-2}$  g/L e 0,09 e 7,18%, respectivamente. Para esse estudo e apesar de apresentar resultados de crescimento e concentração de 3-HB menores quando comparados aos de *Delftia* sp., em nenhuma das condições foram observados crescimento celular e concentração de biopolímero iguais a zero.

TABELA 4.11 - Matriz do planejamento fatorial contendo as variáveis codificadas e as respostas obtidas para a avaliação de cultivo de *Aureimonas* sp. em soro de leite.

Experimento	Variáveis			Respostas		
	V1	V2	V3	Massa seca celular (g/L)	Concentração 3-HB (g/L)	Rendimento biopolimérico (%)
1	-1	-1	-1	0,14	$2,39 \times 10^{-4}$	0,18
2	1	-1	-1	0,50	$4,58 \times 10^{-4}$	0,09
3	-1	1	-1	0,29	$1,00 \times 10^{-3}$	0,43
4	1	1	-1	1,67	$4,00 \times 10^{-3}$	0,22
5	-1	-1	1	0,32	$2,30 \times 10^{-2}$	7,18
6	1	-1	1	1,55	$3,70 \times 10^{-2}$	2,35
7	-1	1	1	0,30	$4,36 \times 10^{-4}$	0,15
8	1	1	1	1,94	$4,40 \times 10^{-2}$	2,25
9	0	0	0	1,26	$6,70 \times 10^{-2}$	5,32
10	0	0	0	1,26	$5,40 \times 10^{-2}$	4,31
11	0	0	0	1,51	$7,60 \times 10^{-2}$	5,05
12	0	0	0	1,22	$5,20 \times 10^{-2}$	4,27

V1: concentração de soro de leite (% v/v); V2: tempo (horas); V3: agitação (rpm); -1: nível inferior, 0: ponto central, 1: nível superior das variáveis.

Os valores de desejabilidade individual e desejabilidade global obtidos nos experimentos em soro de leite para *Aureimonas* sp. são apresentados na Tabela 4.12.

TABELA 4.12 - Desejabilidades individuais e global obtidas para os experimentos usando soro de leite como substrato para *Aureimonas* sp.

Experimento	Soro de leite			
	$d_{i(CDW)}$	$d_{i(3-HB)}$	$d_{i(Rend)}$	D
1	0,00	0,00	0,01	0,00
2	0,20	0,00	0,00	0,00
3	0,09	0,00	0,05	0,01
4	0,85	0,00	0,02	0,03
5	0,10	0,09	1,00	0,21
6	0,78	0,23	0,32	0,39
7	0,09	0,00	0,01	0,00
8	1,00	0,33	0,30	0,46
9	0,62	0,78	0,74	0,71
10	0,62	0,51	0,60	0,57
11	0,76	1,00	0,70	0,81
12	0,60	0,47	0,59	0,55

$d_{i(CDW)}$  = desejabilidade individual referente à massa seca celular;  
 $d_{i(3-HB)}$  = desejabilidade individual referente à produção do monômero 3-HB;  $d_{i(Rend)}$  = desejabilidade individual referente ao rendimento biopolimérico; D = desejabilidade global.

Através dos resultados de desejabilidade apresentados na Tabela 4.12, pode ser observado que os experimentos que utilizam as condições do ponto central demonstraram os melhores resultados para a produção de biopolímeros PHAs utilizando soro de leite como meio de cultivo para *Aureimonas* sp.

Com relação aos efeitos (Figura 4.17), o comportamento observado para *Aureimonas* sp. nos experimentos utilizando-se no meio de cultivo o soro de leite foi muito similar ao de *Deltia* sp., que apresentou efeito negligenciável e negativo para a variável tempo de cultivo (V2). Em contrapartida, as variáveis concentração de soro (V1) e taxa de agitação (V3) foram as mais importantes.

A concentração de substrato é um parâmetro importante que permite o conhecimento da quantidade de fonte de carbono necessária para que esteja em excesso no meio de cultivo e seja suficiente para estimular o desenvolvimento



celular e acúmulo de PHA. O efeito positivo da concentração de soro de leite para todas as condições estudadas indicou crescimento e acúmulo de PHA favoráveis. De fato, a concentração de soro de leite não representa a concentração da fonte de carbono em si, já que diversos componentes, como lactose, glicose, gorduras e proteínas podem compor o soro e exercer essa função na célula. OBRUCA et al. (2011) reporta que a diluição do soro é essencial para o crescimento celular e acúmulo de biopolímero, pois altas concentrações de lactose podem induzir a inibição do crescimento microbiano, portanto é recomendada a diluição desse subproduto para atingir melhor rendimentos de biomassa e PHB. Por se tratar de um meio complexo não se sabe exatamente a composição química e concentração dos nutrientes do soro, então torna-se um desafio a associação do desenvolvimento celular ao acúmulo do polímero em busca de uma melhor resposta. Mesmo assim, as duas cepas estudadas mostraram a capacidade de assimilação direta dessa fonte de nutrientes sem pré-tratamento.

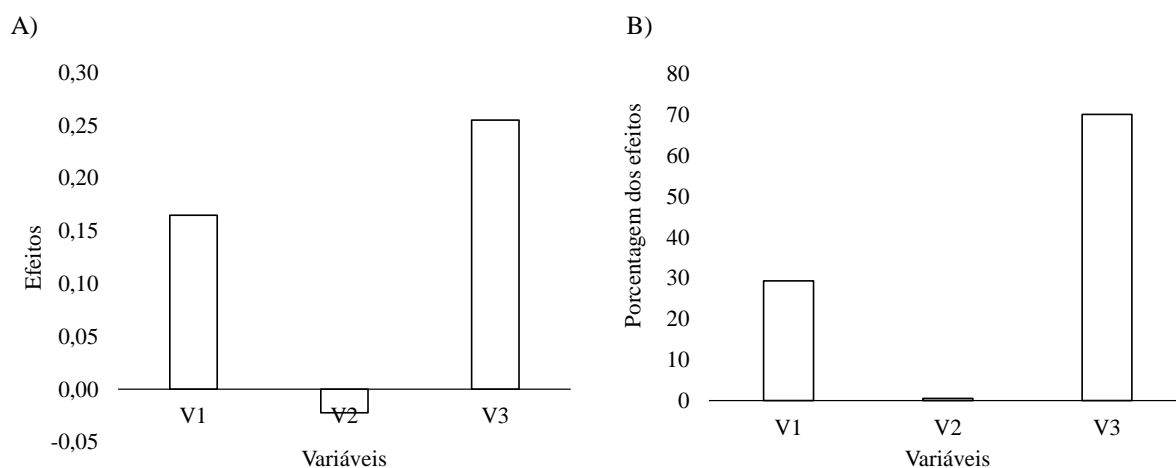


FIGURA 4.17 - Gráficos dos efeitos e porcentagem de cada efeito das variáveis sobre o crescimento celular e acúmulo de PHA em *Aureimonas* sp. no meio de cultivo utilizando soro de leite (A e B). V1: concentração do substrato; V2: tempo de cultivo; V3: agitação.

Comparando-se os valores obtidos para ambos os meios de cultivo nos experimentos avaliados para *Delftia* sp., pode-se observar que, em geral, o crescimento celular foi maior nos meios contendo glicerol. Já a concentração de 3HB e rendimento foram favorecidos nos experimentos que utilizaram o soro de leite (Figura 4.18). Isso mostra que provavelmente o meio complexo com glicerol manteve-se por mais tempo com quantidade de nutriente necessária para a manutenção e desenvolvimento celular, o que pode justificar a menor concentração de polímero, já que o desbalanço nutricional pode não ter sido suficiente para resultar em grande acúmulo. Os experimentos em meio com soro de leite, apesar de ser observado menor crescimento celular, possivelmente o esgotamento de nutrientes, durante o tempo de cultivo avaliado, foi responsável pela maior taxa de acúmulo de polímero nas células.

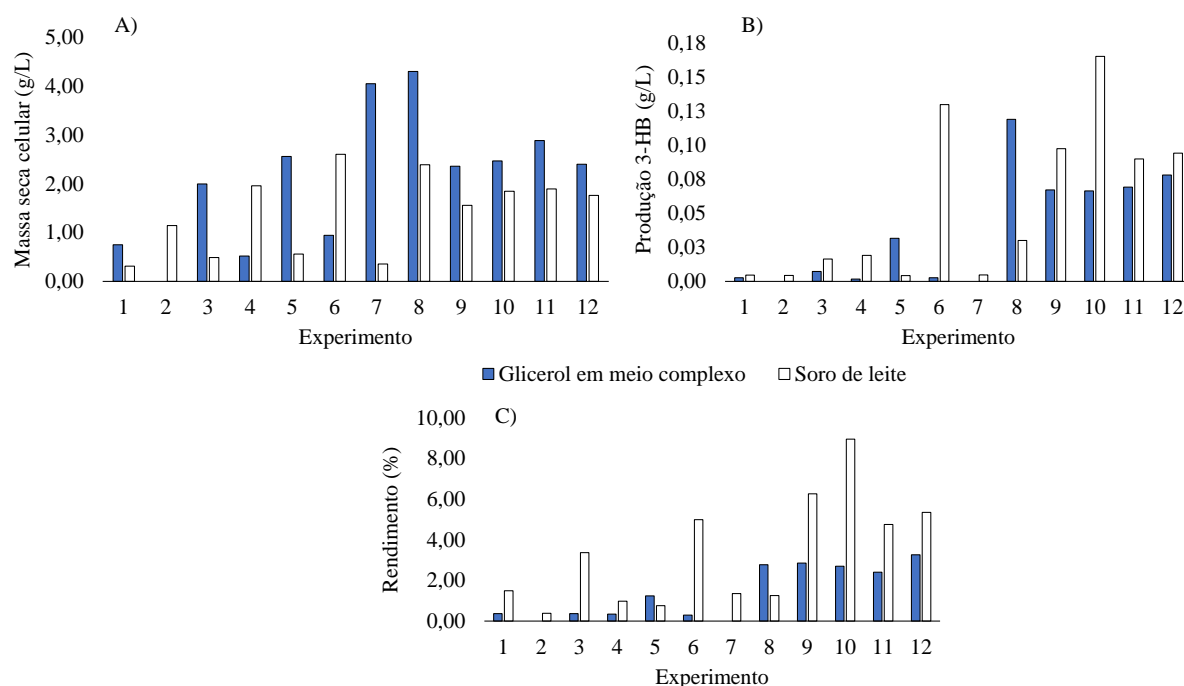


FIGURA 4.18 – Influência do meio de cultivo (glicerol em meio complexo e soro de leite) nas respostas avaliadas para *Delftia* sp. A) massa seca celular; B) concentração de 3HB; C) rendimento biopolimérico. Os experimentos são referentes aos planejamentos fatoriais apresentados na Tabela 4.9.

Comparando-se os resultados de crescimento celular e produção de PHAs entre as duas cepas estudadas utilizando o mesmo meio de cultivo (soro de leite) (Figura 4.19), é possível observar que, de modo geral, *Delftia* sp. apresentou desenvolvimento celular, concentração de 3HB e rendimento polimérico maiores que *Aureimonas* sp., evidenciando que além do meio em que a fermentação ocorre, o maquinário celular de cada cepa se mostra como grande influenciador na produção dos PHAs.

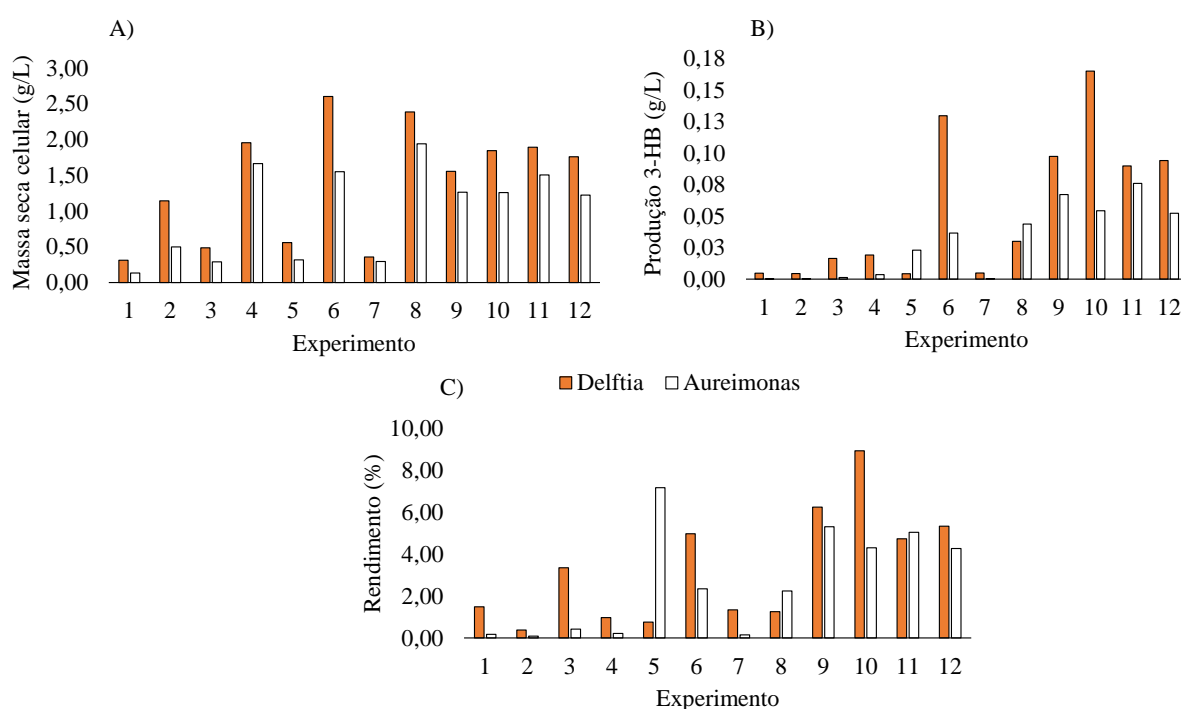


FIGURA 4.19 - Influência da cepa bacteriana (*Delftia* sp. e *Aureimonas* sp.) nas respostas avaliadas em meio de cultivo utilizando soro de leite A) massa seca celular; B) concentração de 3HB; C) rendimento biopolimérico. Os experimentos são referentes aos planejamentos fatoriais apresentados nas Tabelas 4.9 e 4.11.

Desse modo, as melhores condições para o cultivo de *Delftia* sp. em meio complexo e glicerol apresentaram massa seca celular de 4,30 g/L, concentração de 3-HB de 0,121 g/L e rendimento polimérico de 2,77%. Para o cultivo dessa cepa em meio com soro de leite, as melhores condições

apresentaram massa seca celular de 2,60 g/L, concentração de 3-HB de 0,130 g/L e rendimento polimérico de 4,98%. Já para o cultivo de *Aureimonas* sp. em meio com soro de leite, as condições intermediárias do ponto central se mostraram mais satisfatórias, com produção de polímeros variando entre 0,052 e 0,076 g/L. Resultados semelhantes a esses foram reportados por DE PAULA (2012) em que foram realizados planejamentos fatoriais completos para diversas linhagens selvagens de *Pseudomonas aeruginosa*. O maior valor obtido pelo planejamento realizado para o cultivo de *P. aeruginosa* LMI 7a em meio mineral com glicerol foram de 0,133 g/L, 1,33 g/L e 10,02% para produção PHA, massa celular e rendimento polimérico, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de planejamento fatorial para as duas cepas foram realizados os cálculos na tentativa de serem obtidos os modelos de regressão. Com base nos resultados das análises de variância (Apêndice 4) foi observado que para todos os planejamentos realizados os valores de F calculado foram muito menores que os de F tabelado, indicando que as Médias Quadráticas da Regressão e resíduos (MQR e MQR) são estatisticamente iguais, ou seja, a regressão se confunde com o resíduo em todos os casos. A partir das réplicas avaliadas também foi possível calcular a Soma Quadrática do Erro Puro (SQEP) e a Soma Quadrática devido à Falta de Ajuste (SQFaj). O novo teste F que compara MQEP e MQFaj indicou que F calculado foi maior que F tabelado para todos os planejamentos, indicando a incapacidade do modelo de se ajustar aos pontos experimentais. Os valores de  $R^2$  obtidos para os experimentos em meio complexo com glicerol para *Delftia* sp. e em soro de leite para *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp. foram 0,640; 0,361 e 0,249, respectivamente, o que mostra que baixas porcentagens da variação total das respostas poderiam ser explicadas pelos modelos. Segundo LUNDSTEDT et al. (1998) valores de  $R^2$  acima de 0,700 são aceitáveis no caso de dados obtidos de origem biológica. Desse modo, não foi possível propor modelos para os planejamentos realizados.

## 5 CONCLUSÕES

O sequenciamento genômico permitiu a identificação de possíveis genes relacionados à produção de PHAs em *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp., bem como o conhecimento da organização desses genes no genoma de cada uma. No genoma de *Delftia* sp. também foram identificados genes relacionados às rotas de degradação desses polímeros. Os processos biotecnológicos de produção de PHA podem ser ainda mais satisfatórios criando-se estratégias de alimentação adequada, deduzidas com base no conhecimento das vias de biossíntese de PHAs do microrganismo produtor.

Ambas as cepas se mostraram capazes de metabolizar diferentes substratos para a produção de PHAs, sendo *Delftia* sp. capaz de produzir polímeros com diferentes composições monoméricas, abrangendo monômeros 3-HB, 3-HV, 3-HO e 3-HD. Além da diferença obtida com a variação das fontes de carbono, também foram observadas diferenças quando a mesma fonte de carbono foi empregada em meio com mais ou menos fonte de nitrogênio, fortalecendo a ideia de que a concentração de nitrogênio no meio de cultivo, de fato, influencia a produção de PHAs.

O método analítico desenvolvido por GC-MS-SIM foi eficiente para a análise quantitativa do monômero 3-HB, apresentando resultados satisfatórios dos parâmetros de validação.

O planejamento fatorial completo indicou que as variáveis que influenciam significativamente a produção de PHAs foram concentração de glicerol, tempo de cultivo e agitação para o cultivo de *Delftia* sp. utilizando glicerol em meio complexo; e concentração do soro de leite e agitação em soro de leite para as duas cepas. Além disso, *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp. apresentaram comportamento semelhante quando cultivadas em soro de leite, com relação às variáveis.

As cepas estudadas se mostraram capazes de bioconverter fontes de nutrientes alternativas como, por exemplo, subprodutos da indústria alimentícia e de biocombustível em biopolímeros. Entretanto, aumentar a produção de PHAs com matérias-primas de baixo custo e disponíveis é o principal desafio atual para o desenvolvimento de uma produção economicamente competitiva desses materiais. A abordagem mais adotada para “superproduzir” PHAs é a modificação do metabolismo genético de cepas não produtoras, não apenas em termos da produção em si (g PHA/g massa celular) mas também o volume produzido pode ser aumentado várias vezes em comparação com cepas selvagens.

De maneira geral, esse trabalho abrange diversas áreas do conhecimento, como Química Orgânica, Microbiologia, Genética e Biologia Molecular, Ecologia Química, Química Analítica e Quimiometria. De maneira integrada essas áreas contribuíram para aumentar o conhecimento sobre as bactérias *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp., isoladas do inseto *Diabrotica speciosa*, reconhecendo o grande potencial dessas cepas para produção de metabólitos de grande interesse industrial e evidenciando que microbiomas podem ser fontes biotecnológicas a serem exploradas, como o intestino de insetos-pragas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. I.; MACAGNAN, K. L.; PIECHA, C. R.; TORRES, M. M.; PEREZ, I. A.; KESSERLINGH, S. M.; RODRIGUES, R. S.; DE OLIVEIRA, P. D.; MOREIRA, A. S. "Optimization of *Ralstonia solanacearum* cell growth using a central composite rotational design for the P(3HB) production: Effect of agitation and aeration". PLoS ONE, **14** (1): 1–13, 2019.

ANVISA, 2017. Ministério da Saúde (MS) - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. Diário da República Fed. do Bras. 2017, 1–22.

BAUMANN, P. "Biology of Bacteriocyte-Associated Endosymbionts of Plant Sap-Sucking Insects". Annual Review of Microbiology, **59** (1): 155–189, 2005.

BIGLARI, N.; DASHTI, M. G.; ABDESHAHIAN, P.; ORITA, I.; FUKUI, T.; SUDESH, K. "Enhancement of bioplastic polyhydroxybutyrate P(3HB) production from glucose by newly engineered strain *Cupriavidus necator* NSDG-GG using response surface methodology". 3 Biotech, **8** (8): 1–11, 2018.

BOYANDIN, A. N.; PRUDNIKOVA, S. V.; KARPOV, V. A.; IVONIN, V. N.; ĐŌ, N. D.; NGUYỄN, T. H.; LÊ, T. M. H.; FILICHEV, N. L. F.; LEVIN, A. L.; FILIPENKO, M., L.; VOLOVA, T. G.; GITELSON, I. I. "Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils". International Biodeterioration and Biodegradation, **83**: 7–84, 2013.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTTY, R. M. "A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Poly-B-hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass". European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, **6**: 29–37, 1978.

BUGNICOURT, E.; CINELLI, P.; LAZZERI, A.; ALVAREZ, V. "Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging". eXPRESS Polymer Letters, **8** (11): 791–808, 2014.

- CAMPOS, M. I.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; DRUZIAN, J. I. "The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations". *Industrial Crops and Products*, **52**: 338–346, 2014.
- CARDOZO, J. R. G.; MARTÍNEZ, A. L. M.; PÉREZ, M. Y.; LONDOÑO, G. A. C. "Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Native Microorganisms Synthesized from Fatty Waste". *International Journal of Polymer Science*, **2016**: 1-12, 2016.
- CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. "Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices". *Quimica Nova*, **32** (4): 1021–1030, 2009.
- CESPEDES, L. G.; NAHAT, R. A. T. P. S.; MENDONÇA, T. T.; TAVARES, R. R.; FILHO, Edmar R. O.; SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; SÁNCHEZ, R. J.; GOMEZ, J. G. C. "A non-naturally-occurring P(3HB-co-3HAMCL) is produced by recombinant *Pseudomonas* sp. from an unrelated carbon source". *International Journal of Biological Macromolecules*, **114**: 512–519, 2018.
- CHEK, M. F.; KIM, S. Y.; MORI, T.; ARSAD, H.; SAMIAN, M. R.; SUDESH, K.; HAKOSHIMA, T. "Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics". *Scientific Reports*, **7** (1): 1–15, 2017.
- COLL, M.; GUERSHON, M. "Omnivory in terrestrial arthropods: mixing plant and prey diets". *Annual review of entomology*, **47**: 267–297, 2002.
- COSTA, N. R.; LOURENÇO, J.; PEREIRA, Z. L. "Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions". *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **107** (2): 234–244, 2011.
- DA SILVA, G.; MACK, M.; CONTIERO, J. "Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology". *Biotechnology Advances*, **27** (1): 30–39, 2009.
- DE PAULA, F. C. "Polihidroxialcanoatos (PHAs): Bioprospecção de micro-



organismos e produção a partir de glicerol". Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas - Unesp, 2012. Tese de Doutorado, 221 p.

DE PAULA, F. C.; KAKAZU, S.; DE PAULA, C. B. C.; GOMEZ, J. G. C.; CONTIERO, J. "Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated *Pandoraea* sp. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol". Journal of King Saud University, **29** (2): 166–173, 2017.

DE PAULA, F. C.; KAKAZU, S.; DE PAULA, C. B. C.; DE ALMEIDA, A. F.; GOMEZ, J. G. C.; CONTIERO, J. "*Burkholderia glumae* MA13: A newly isolated bacterial strain suitable for polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol". Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, , **20**: 101268, 2019.

DENADAE, B. E. "Avaliação da produção de biopolímeros pelas cepas bacterianas DsA.N042 e DsA.N049 isoladas de *Diabrotica speciosa* usando subprodutos industriais". Programa de pós-graduação em Biotecnologia - UFSCar, 2018. Dissertação de Mestrado, 100 p.

ESHAGHI, A.; SHAHINAS, D.; PATEL, S. N.; KUS, J. V. "First draft genome sequence of *Aureimonas altamirensis*, isolated from patient blood culture". FEMS Microbiology Letters, **362**: (6): 1–4, 2015.

EUROPEAN BIOPLASTICS, 2021. Capacidade global de produção de bioplásticos.

<http://en.european-bioplastics.org/market/>. Acessado em 10/09/22.

FAVARO, L.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S. "Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review". Biofuels, Bioproducts and Biorefining, **13** (1): 208–227, 2019.

FELDHAAR, H; GROSS, R. "Insects as hosts for mutualistic bacteria". International Journal of Medical Microbiology, 299 (1): 1-8, 2009.

FERREIRA, S. L. C.; BURNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. L. "Box-Behnken

design: An alternative for the optimization of analytical methods". *Analytica Chimica Acta*, **597** (2): 179–186, 2007.

FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. "Sequenciando Genomas". IN: *Ciências genômicas: fundamentos e aplicações*. LORETTO, E. L. S. (Ed.). Cubo, São Carlos, 2015. p. 27–64.

FUKUDA, K.; NAGATA, S.; TANIGUCHI, H. "Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading bacteria". *Microbiology Letters*, **208**: 179–185, 2002.

FUKUI, T.; SHIOMI, N.; DOI, Y." Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*". *Journal of Bacteriology*, **180** (3): 667–673, 1998.

GADGIL, B. S. T.; KILLI, N.; RATHNA, G. V. N. "Polyhydroxyalkanoates as biomaterials". *MedChemComm*, **8** (9): 1774–1787, 2017.

GANZORIG, M.; LEE, K. "Complete Genome Sequence of *Aureimonas* sp. Strain OT7, Isolated from Human Skin". *Microbiology Resource Announcements*, **10** (9): 8–9, 2021.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. "Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies". *Nature Reviews Genetics*, **17** (6): 333–351, 2016.

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; HEIDELBERG, T." Effects of carbon substrates on biodegradable polymer composition and stability produced by *Delftia tsuruhatensis* Bet002 isolated from palm oil mill effluent". *Polymer Degradation and Stability*, **97** (8): 1224–1231, 2012.

HALDEN, R. U. "Plastics and health risks". *Annual Review of Public Health*, **31**: 179–194, 2010.

HASSAN, M. A.; BAKHIET, E. K.; ALI, S. G.; HUSSIEN, H. R. "Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus* sp. isolated from Egypt". *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **6** (4): 46–51, 2016.

HIROE, A.; TSUGE, K.; NOMURA, C. T.; ITAYA, M.; TSUGE, T. "Rearrangement of gene order in the phaCAB operon leads to effective production of ultrahigh-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in genetically engineered *Escherichia coli*". Applied and Environmental Microbiology, **78** (9): 3177–3184, 2012.

HIROE, A.; USHIMARU, K.; TSUGE, T. "Characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase derived from *Delftia acidovorans* DS-17 and the influence of PHA production in *Escherichia coli*". Journal of Bioscience and Bioengineering, **115** (6): 633–638, 2013.

HU, T.; CHITNIS, N.; MONOS, D.; DINH, A. "Next-generation sequencing technologies: An overview". Human Immunology, **82** (11): 801–811, 2021.

HUANG, P.; OKOSHI, T.; MIZUNO, S.; HIROE, A.; TSUGE, T. "Gas chromatography-mass spectrometry-based monomer composition analysis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates biosynthesized by *Pseudomonas* spp.". Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, **82**, (9): 1615–1623, 2018.

IWATA, T. "Biodegradable and bio-based polymers: Future prospects of eco-friendly plastics". Angewandte Chemie, **54** (11) 3210–3215, 2015.

JAMIL, N.; AHMED, N.; EDWARDS, D. H. "Characterization of biopolymer produced by *Pseudomonas* sp. CMG607w of marine origin". **109**: 105–109, 2007.

JIN, H.; NIKOLAU, B. J. "Role of genetic redundancy in polyhydroxyalkanoate (PHA) polymerases in PHA biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*". Journal of Bacteriology, **194** (20) :5522–5529, 2012.

KHOK, Y. S.; SUWA, M.; ITO, H.; HUSSIN, M. H.; ISHIDA, Y.; SUDESH, K.; BAIDURAH, S. "Comparison of quantification methods and subsequent characterization of polyhydroxybutyrate film sample utilizing pretreated cane molasses as carbon source". Materials Science and Engineering, **716** (1):, 2020.

KIHARA, T.; HIROE, A.; ISHII-HYAKUTAKE, M.; MIZUNO, K.; TSUGE, T. "*Bacillus cereus*-type polyhydroxyalkanoate biosynthetic gene cluster contains R-specific enoyl-CoA hydratase gene". Bioscience, Biotechnology and

Biochemistry, **81** (8): 1627–1635, 2017.

KOLLER, M.; BONA, R.; CHIellini, E.; FERNANDES, E. G.; HORVAT, P.; KUTSCHERA, C.; HESSE, P.; BRAUNEGG, G. "Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*". Bioresource Technology, **99** (11): 4854–4863, 2008.

KUMAR, M.; SINGHAL, A.; VERMA, P. K.; THAKUR, I. S. "Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoate from Lignin Derivatives by *Pandoraea* sp. ISTKB". ACS Omega, **2** (12): 9156–9163, 2017.

KUMBHAKAR, S.; SINGH, P. K.; VIDYARTHI, A. S. "Screening of root nodule bacteria for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) and the study of parameters influencing the PHA accumulation". African Journal of Biotechnology, **11** (31): 7934–7946, 2012.

LIU, J.; ZHAO, Y.; DIAO, M.; WANG, W.; HUA, W.; WU, S.; CHEN, P.; RUAN, R.; CHENG, Y. "Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Production by *Rhodospirillum rubrum* Using a Two-Step Culture Strategy". Journal of Chemistry, **2019**, 2019.

LÓPEZ-CUELLAR, M. R.; ALBA-FLORES, J.; RODRÍGUEZ, J. N. G.; PÉREZ-GUEVARA, F. "Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source". International Journal of Biological Macromolecules, **48** (1): 74–80, 2011.

LU, J.; TAKAHASHI, A.; UEDA, S. "3-Hydroxybutyrate Oligomer Hydrolase and 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase Participate in Intracellular Polyhydroxybutyrate and Polyhydroxyvalerate Degradation in *Paracoccus denitrificans*". Applied and Environmental Microbiology, **80** (3): 986–993, 2014.

LU, J.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. "Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates)". Polymer Reviews, **49** (3): 226–248, 2009.

LUIZ, A. L. "Investigação do potencial antimicrobiano de plantas do cerrado no controle de micro-organismos simbiótico da *Diabrotica speciosa*". Programa de pós-graduação em Química - UFSCar, 2014. Dissertação de Mestrado, 125 p.

- LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTROM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAM, R. "Experimental design and optimization". *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **42**: 3–40, 1998.
- MA, W.; WANG, J.; LI, Y.; YIN, L.; WANG, X. "Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-produced with l-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum* WM001". *Microbial Cell Factories*, **17** (1): 1–12, 2018.
- MACAGNAN, K. L.; ALVES, M. I.; RODRIGUES, A. Á.; FURLAN, L.; RODRIGUES, R. S.; DE OLIVEIRA, P. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S. "Complete factorial design to adjust pH and sugar concentrations in the inoculum phase of *Ralstonia solanacearum* to optimize P(3HB) production". *PLoS ONE*, **12** (7): 1–13, 2017.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. "Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic". *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*, **63** (1): 21–53, 1999.
- MASAI, E.; KATAYAMA, Y.; FUKUDA, M. "Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **71**, (1): 1–15, 2007.
- MEEKS, D.; HOTTLE, T.; BILEC, M. M.; LANDIS, A. E. "Compostable biopolymer use in the real world: Stakeholder interviews to better understand the motivations and realities of use and disposal in the US". *Resources, Conservation and Recycling*, **105**: 134–142, 2015.
- MEKONNEN, T.; MUSSONE, P.; KHALIL, H.; BRESSLER, D. "Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications". *Journal of Materials Chemistry A*, **1** (43): 13379–13398, 2013.
- MORAN, N. A. "Symbiosis". *Current Biology*, **16** (20) 866–871, 2006.
- MOREL, M. A.; IRIARTE, A.; JARA, E.; MUSTO, H.; CASTRO-SOWINSKI, S. "Revealing the biotechnological potential of *Delftia* sp. JD2 by a genomic approach". *AIMS Bioengineering*, **3** (2): 156–175, 2016.
- MUSA, H.; BOLANLE, B. B.; KASIM, F. H.; ARBAIN, D. "Screening and

production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by bacterial strains isolated from rhizosphere soil of groundnut plants". *Sains Malaysiana*, **45** (10): 1469–1476, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre, Artmed, 2014. p. 327.

NIKEL, P. I.; DE ALMEIDA, A.; MELILLO, E. C.; GALVAGNO, M. A.; PETTINARI, M. J. "New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products". *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (6): 3949–3954, 2006.

OBRUCA, S.; MAROVA, I.; MELUSOVA, S.; MRAVCOVA, L. "Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037". *Annals of Microbiology*, **61** (4): 947–953, 2011.

OJHA, N.; DAS, N. "A Statistical approach to optimize the production of Polyhydroxyalkanoates from *Wickerhamomyces anomalus* VIT-NN01 using Response Surface Methodology". *International Journal of Biological Macromolecules*, **107** (November): 2157–2170, 2018.

ÖNER, E. T. "Microbial Production of Extracellular Polysaccharides from Biomass ". *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries*, 35-56, 2013.

ONG, S. Y.; CHE, J. Y.; SUDESH, K. "Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review". *Journal of Siberian Federal University - Biology*, **10** (2): 211–225, 2017.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. "Por que otimização multivariada?" *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, **10** (2): 106–110, 2005.

PEREZ, M. A. F. "Validação de métodos analíticos: como fazer? Por que ela é importante?". *Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens*, 22 (3), 2010.

PERLATTI, B. "Avaliação do potencial biotecnológico de micro-organismos associados ao inseto-praga *Diabrotica speciosa* na produção de polímeros biobaseados e biodegradáveis" Programa de pós-graduação em Química -

UFSCar, 2016. Tese de Doutorado, 185 p.

PlasticsEurope. 2019. Plastics - the Facts 2019.

<http://www.plasticseurope.org/Document/plastics---the-facts-2019.aspx>  
(Acessado 07/08/20).

PlasticsEurope. 2021. Plastics - the Facts 2021.

<http://www.plasticseurope.org/Document/plastics---the-facts-2021.aspx>  
(Acessado 10/09/22).

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. "Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa". *Química Nova*, **32** (4): 987–995, 2009.

PINZÓN, D. C. T. "Caracterização do gene PHA sintase de bactérias isoladas a partir de amostras de solo". Programa de pós-graduação em Microbiologia - USP, 2015. Dissertação de Mestrado, 129 p.

RAO, A.; HAQUE, S.; EL-ENSHASY, H. A.; SINGH, V.; MISHRA, B. N. "RSM–GA based optimization of bacterial PHA production and In Silico modulation of citrate synthase for enhancing PHA production". *Biomolecules*, **9** (12), 2019.

RAY, S.; PRAJAPATI, V.; PATEL, K.; TRIVEDI, U. "Optimization and characterization of PHA from isolate *Pannonibacter phragmitetus* ERC8 using glycerol waste". *International Journal of Biological Macromolecules*, **86**: 741–749, 2016.

RAZAIF-MAZINAH, M. R. M.; ANIS, S. N. S.; HARUN, H. I.; RASHID, K. A.; ANNUAR, M. S. M. "Unusual poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) biosynthesis behavior of *Pseudomonas putida* bet001 and *Delftia tsuruhatensis* bet002 isolated from palm oil mill effluent". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **64** (2): 259–269, 2017.

REHM, B. H. A. "Polyester synthases: Natural catalysts for plastics". *Biochemical Journal*, **376** (1): 15–33, 2003.

REHM, B. H. A. "Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and

- applications". Nature Publishing Group, **8** (8): 578–592, 2010.
- REHM, B. H. A.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. "A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis". Journal of Biological Chemistry, **273** (37): 24044–24051, 1998.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos" Química Nova, **27** (5): 771–780, 2004.
- RIEDEL, S. L.; LU, J.; STAHL, U.; BRIGHAM, C. J. "Lipid and fatty acid metabolism in *Ralstonia eutropha*: Relevance for the biotechnological production of value-added products". Applied Microbiology and Biotechnology, **98** (4): 1469–1483, 2014.
- RODRIGUEZ-PEREZ, S.; SERRANO, A.; PANTIÓN, A. A.; ALONSO-FARIÑAS, B. "Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review". Journal of Environmental Management, **205**: 215–230, 2018.
- SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. "Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil". Química Nova, **30** (7): 1732–1743, 2007.
- SINGH, P.; GOSWAMI, A.; VIDYARTHI, A. S. "Microbial production of polyhydroxyalkanoates : current research and development". **1** (2) 48–63, 2015.
- SRIRANGAN, K.; LIU, X.; TRAN, T. T.; CHARLES, T. C.; MOO-YOUNG, M.; CHOU, C. P. "Engineering of *Escherichia coli* for direct and modulated biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer using unrelated carbon sources". Scientific Reports, **6** (july): 1–11, 2016.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates : biological polyesters". Progress in Polymer Science, **25**: 1503–1555, 2000.
- SUDESH, K.; IWATA, T. "Sustainability of biobased and biodegradable plastics". Clean - Soil, Air, Water, **36**: 5–6, p. 433–442, 2008.



TAN, G. A.; CHEN, C.; LI, L.; GE, L.; W, L.; RAZAAD, I. M. N.; LI, NY.; MO, Y.; WANG, J. "Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review". *Polymers*, **6**: 706–754, 2014.

THOMAS, T.; ELAIN, A.; BAZIRE, A.; BRUZAUD, S. "Complete genome sequence of the halophilic PHA-producing bacterium *Halomonas* sp. SF2003: insights into its biotechnological potential". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **35** (3): 0, 2019.

TIAN, J.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. "Detection of intermediates from the polymerization reaction catalyzed by a D302A mutant of class III polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase". *Biochemistry*, **44**, 1495–1503, 2005.

TOMIZAWA, S.; CHUAH, J. A.; MATSUMOTO, K.; DOI, Y.; NUMATA, K. "Understanding the limitations in the biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) from lignin derivatives". *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, **2** (5): 1106–1113, 2014.

UCHINO, K.; KATSUMATA, Y.; TAKEDA, T.; ARAI, H.; SHIRAKI, M.; SAITO, T. "Purification and molecular cloning of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase from *Paucimonas lemoignei*". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **104** (3): 224–226, 2007.

VENTURA, M. U.; MELLO, E. P.; OLIVEIRA, A. R. M.; SIMONELLI, F.; MARQUES, F. A.; ZARBIN, P. H. G. "Males Are Attracted by Female Traps : A New Perspective for Management of *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) Using Sexual Pheromone". *Neotropical entomology*, **30** (3): 361–364, 2001.

VELÁZQUEZ-SÁNCHEZ, C.; ESPÍN, G.; PEÑA, C.; SEGURA, D. "The Modification of Regulatory Circuits Involved in the Control of Polyhydroxyalkanoates Metabolism to Improve Their Production". *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **8** (386): 1-22, 2020.

VERLINDEN, R. A. J.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAMS, C. D.; RADECKA, I. "Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates".

- Journal of Applied Microbiology, **102** (6): 1437–1449, 2007.
- VERLINDEN, R. A. J.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAMS, C. D.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; RADECKA, I. K. "Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*". AMB Express, **1** (1): 1–8, 2011.
- VIANA, P. A. "Manejo de *Diabrotica speciosa* na Cultura do Milho" Embrapa, Circular Técnica 141, 2010.
- WANG, X.; LIN, L.; DONG, J.; LING, J.; WANG, W.; WANG, H.; ZHANG, Z.; YU, X. "Simultaneous improvements of *Pseudomonas* cell growth and polyhydroxyalkanoate production from a lignin derivative for lignin-consolidated bioprocessing". Applied and Environmental Microbiology, **84** (18): 1–15, 2018.
- WANG, Y.; LIU, S. "Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by *Burkholderia cepacia* from wood extract hydrolysates" AMB Express, **4** (28): 1-10, 2014.
- WERNEGREN, J. J. "Endosymbiosis: Lessons in conflict resolution". PLoS Biology, **2** (3): 307–311, 2004.
- WHITTALL, J.; SUTTON, P. W. Practical methods for biocatalysis and biotransformations 2. 1<sup>a</sup> ed. New Jersey, Wiley, 2012. 388 p.
- YEE, L. N.; CHUAH, J. A.; CHONG, M. L.; PHANG, L. Y.; RAHA, A. R.; SUDESH, K.; HASSAN, M. A. "Molecular characterisation of phaCAB from *Comamonas* sp. EB172 for functional expression in *Escherichia coli* JM109". Microbiological Research, **167** (9):550–557, 2012.
- ZAHARI, M. A. K. M.; ARIFFIN, H.; MOKHTAR, M. N.; SALIHON, J.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A. "Factors affecting poly(3-hydroxybutyrate) production from oil palm frond juice by *Cupriavidus necator* (CCUG52238<sup>T</sup>)". Journal of Biomedicine and Biotechnology, **2012**, 2012.
- ZAIN, N. A. A.; NG, L. M.; FOONG, C. P.; TAI, Y. T.; NANTHINI, J.; SUDESH, K. "Complete Genome Sequence of a Novel Polyhydroxyalkanoate (PHA) Producer, *Jeongeupia* sp. USM3 (JCM 19920) and Characterization of Its PHA Synthases". Current Microbiology, **77** (3): 500–508, 2020.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. *Quimica Nova*, **32** (3): 588–594, 2009.

## 7 APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Comparação entre o alinhamento das sequências de aminoácidos das enzimas PhaC de *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp. obtidos nesse trabalho.

Sequence ID: **Query\_3231** Length: **605** Number of Matches: **1**

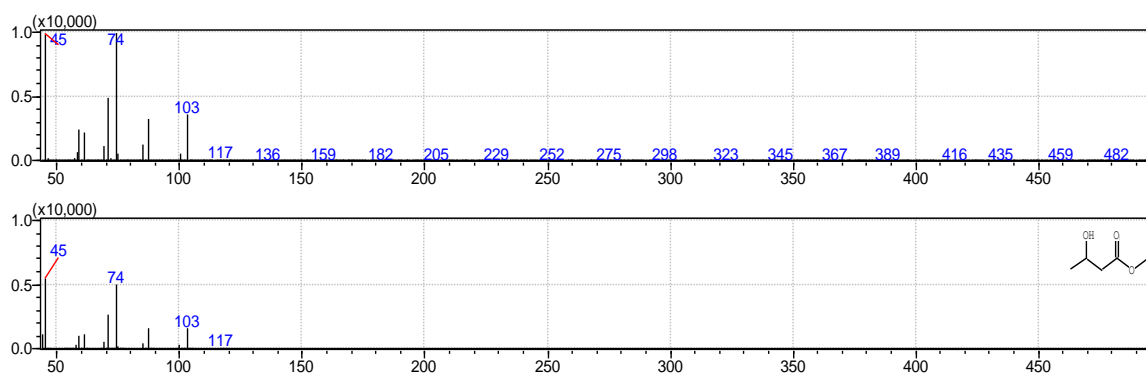
Range 1: 117 to 602 [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Pr](#)

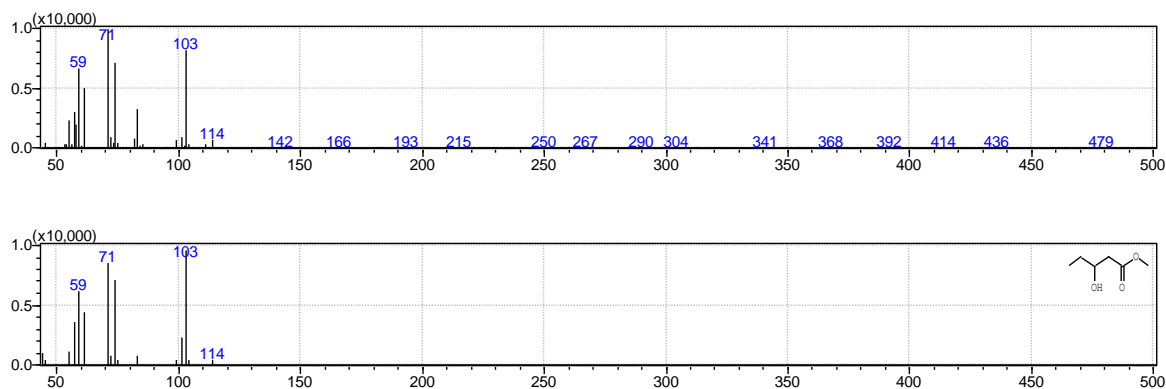
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
382 bits(982)	1e-129	Compositional matrix adjust.	216/530(41%)	284/530(53%)	49/530(9%)
Query 101	DKRFNTQSWADNPLTAATAATYLLNSRMLMGL-AEAVQADEKTRNRVRFVEQWLAAMSP				159
Sbjct 117	DKRFADPEWQKNLFFDFLRQAYLLTARWAQDMVSEAEGLDAGTRQRRARFYVGQILNAISP				176
Query 160	SNFLALNAEAQKKAIETQGESLALGVANLLADMROG---HVSMTDESLFTVGKNVATTE				215
Sbjct 177	SNFVPTNPELYRQTVANGENLVRGMTMFAEDMARGAGTLRLRQTGGDSFSVGGNLALTP				236
Query 216	GAVVFENELFQLIEYKPLTDKVHERPFLMVPPCINKFYILDLPDNLIRYAVSQGHRTF				275
Sbjct 237	GAVVAENDICQIIQYAPKTKTVFKRPLLICPPWINKFYILDLPAGKSFIAWLVEQGHTVF				296
Query 276	VMSWRNPDDSLAHKTWDNYIEDGVLTGIRVAREIAGAEQINVLFQCVGGTMLSTALAVLQ				335
Sbjct 297	VISWVNPTERHADKDWLSYIDEGIVFALDTRKATRQSEVNAMGYCVGGTLLSAAALALLH				356
Query 336	ARHDREHGAAAAPAAKAAAPAKRAAGSRSTARTSTARATAPAGVFPFVASVTLTTFIDFS				395
Sbjct 357	ARGDNR-----IRTATLLATQVDF				376
Query 396	DTGILDVVIDESVVRFREMQMGEGLMKQDLASTFSLRPNDLVWNYVVGNYLKGETPP				455
Sbjct 377	DAGELQVFDERQIAALDTAMAASGTLDDGGHMATAFNLLRSQDLIWPYVVGNYMKGREPP				436
Query 456	PFDLLYWNSDCTNLPGPYAWYLRNLYLENKLVQPGALTVCGERIDMHQLRLPAYIYGSR				515
Sbjct 437	PFDLLYWNSDATRMTRANHLFYLRNRCYLENRLSQ-GRMELDGTVIDMSSVTIPVYSLATK				495
Query 516	EDHIVPVGGSYASTQVLGGDKRFVMGASGHIAGVINPPAKKKRSYWLREDGQLPPTLKEW				575
Sbjct 496	EDHIAPARSVYTALAFGSDVTYVVGSGHIAGVVNPPAKGKYQFWTGPAPDAGTSFADAW				555
Query 576	QAGADEYPGSWWADWSPWLAEHGGKLVAAPKQYQKGREYTAIEPAPGRYV				625
Sbjct 556	AQAADMTPGSWWPHWQGWIEAHAGKRVKA-REPGIGGK--TIEPAPGRYV				602

APÊNDICE 2 – Espectros de massas obtidos para os monômeros de PHA metilados identificados nesse trabalho e do padrão interno utilizado nas análises quantitativas.

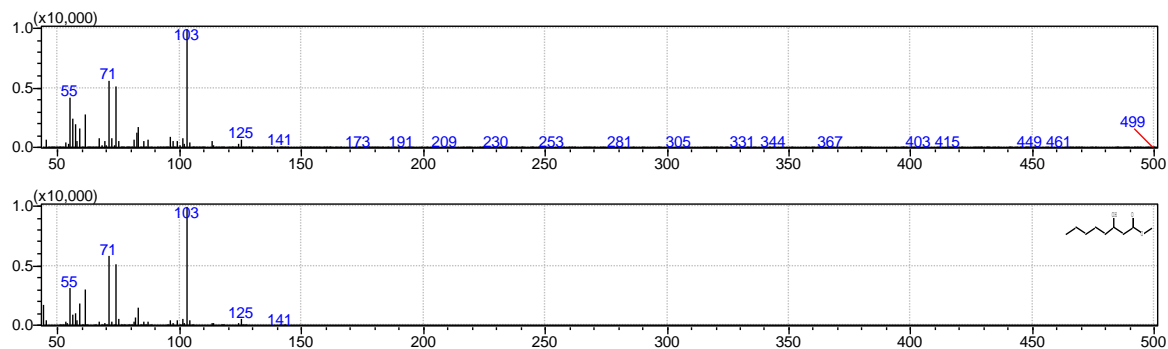
3-hidroxi butirato de metila (T.R. 5,49 minutos).



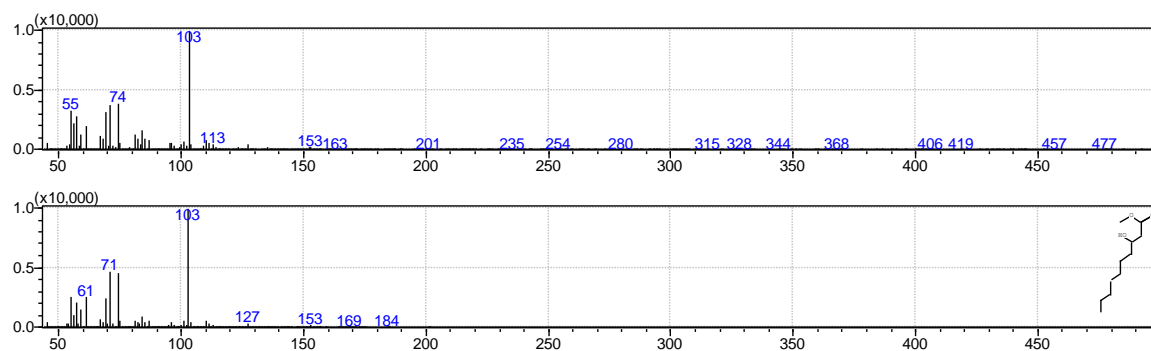
3-hidroxi valerato de metila (T.R. 6,75 minutos).



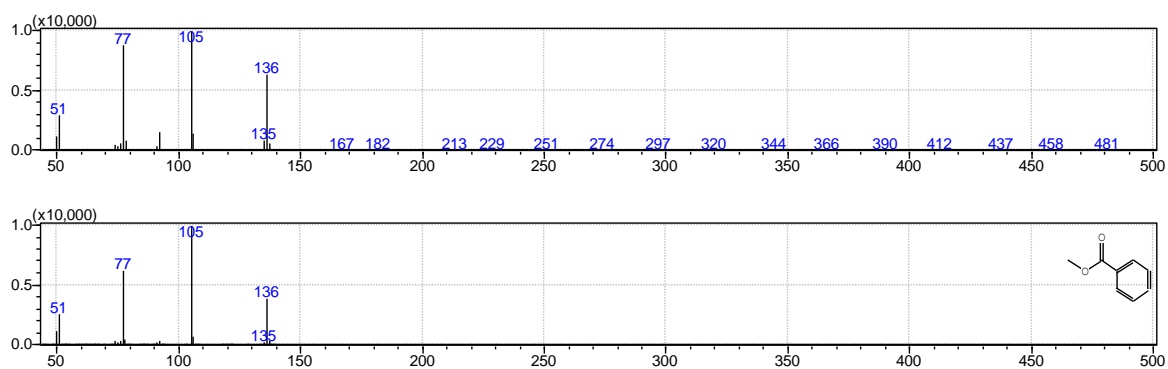
3-hidroxi octanoato de metila (T.R. 9,69 minutos).



3-hidroxidecanoato de metila (T<sub>R</sub>. 11,27 minutos).



Benzoato de metila (Padrão interno) (T<sub>R</sub>. 8,78 minutos).



APÊNDICE 3 – Análise estatística da massa seca celular obtida em diferentes meios de cultivo nos experimentos de triagem.

Software Sisvar 5.6

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

Teste Scott-Knott com 95% de significância.

*Delftia* sp.

Tratamentos: 1: Soro de leite; 2: Meio complexo; 3: Meio complexo com glicerol; 4: Meio complexo com óleo vegetal; 5: Meio complexo com lignina; 6: Meio salino; 7: meio salino com óleo vegetal.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	6	24.313935	4.052322	71.401	0.0000
erro	14	0.794561	0.056754		
Total corrigido	20	25.108496			
CV (%) =	21.94				
Média geral:	1.0857143	Número de observações:	21		

Teste Scott-Knott (1974) para a FV TRATAMENTO

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 0,137543182252437

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	0.055000	a1
1	0.169333	a1
5	0.260000	a1
7	0.368000	a1
2	1.520000	a2
3	2.343000	a3
4	2.884667	a4

*Aureimonas* sp.

Tratamentos: 1: Soro de leite; 2: Meio complexo; 3: Meio complexo com glicerol;  
4: Meio complexo com óleo vegetal; 5: Meio complexo com lignina; 6: Meio salino; 7: meio salino com óleo vegetal.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	6	30.613989	5.102331	202.719	0.0000
erro	14	0.352372	0.025169		
Total corrigido	20	30.966361			
CV (%) =	12.67				
Média geral:	1.2519524	Número de observações:	21		

Teste Scott-Knott (1974) para a FV TRATAMENTO

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3  
Erro padrão: 0,0915959034226396

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	0.078000	a1
5	0.250000	a1
1	0.336333	a1
7	0.339000	a1
2	1.890000	a2
3	2.738667	a3
4	3.131667	a4



APÊNDICE 4 – Análise de variância para as três respostas obtidas nos cultivos de *Delftia* sp. e *Aureimonas* sp. em diferentes meios, utilizando planejamento fatorial completo.

Software Octave 4.2.1

Cultivo de *Delftia* sp. em meio complexo com glicerol.

ANOVA					
	SQ	G.L.	MQ	F cal	F tab
Regressão (SQR)	0,749	7	0,107		
Residual (SQR)	0,421	4	0,105	1,015	6,090
Total (SQT)	1,170	11			
SQEP	0,006	3	0,002		
SQFaj	0,415	1	0,415	207,656	10,130
R <sup>2</sup>	0,640	0,800			

Cultivo de *Delftia* sp. em meio contendo soro de leite.

ANOVA					
	SQ	G.L.	MQ	F cal	F tab
Regressão (SQR)	0,386	7	0,055		
Residual (SQR)	0,685	4	0,171	0,322	6,090
Total (SQT)	1,071	11			
SQEP	0,116	3	0,039		
SQFaj	0,569	1	0,569	14,708	10,130
R <sup>2</sup>	0,361	0,600			

Cultivo de *Aureimonas* sp. em meio contendo soro de leite.

ANOVA					
	SQ	G.L.	MQ	F cal	F tab
Regressão (SQR)	0,257	7	0,037		
Residual (SQR)	0,774	4	0,194	0,190	6,090
Total (SQT)	1,031	11			
SQEP	0,044	3	0,015		
SQFaj	0,730	1	0,730	49,790	10,130
R <sup>2</sup>	0,249	0,499			

SQ = Soma Quadrática; G.L. = Graus de liberdade; MQ = Média quadrática; F cal = valor obtido no teste F; F tab = valor de F tabelado à nível de 95% de

significância;  $SQR$  = Soma quadrática da regressão;  $SQr$  = Soma quadrática dos resíduos;  $SQT$  = Soma quadrática total;  $SQEP$  = Soma Quadrática do erro puro;  $SQFaj$  = Soma quadrática da falta de ajuste.