

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

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRO-ORGANISMOS  
ASSOCIADOS AO INSETO-PRAGA *DIABROTICA SPECIOSA* NA PRODUÇÃO DE  
POLÍMEROS BIOBASEADOS E BIODEGRADÁVEIS”**

**Bruno Perlatti\***

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

**Orientador: Moacir Rossi Forim**

**\* bolsista CAPES**

**São Carlos - SP**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P447a      Perlatti, Bruno  
            Avaliação do potencial biotecnológico de micro-organismos associados ao inseto-praga diabrotica speciosa na produção de polímeros biobaseados e biodegradáveis / Bruno Perlatti. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
            185 p.

            Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

            1. Biopolímero. 2. Bactérias. 3. Polihidroxialcanoato. 4. Exopolissacarídeo. 5. Caracterização química. I. Título.

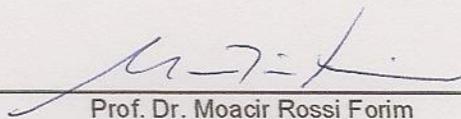


---

Folha de Aprovação

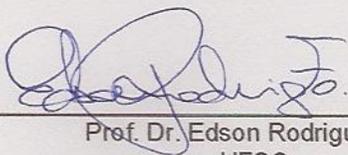
---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Bruno Perlatti, realizada em 24/06/2016:



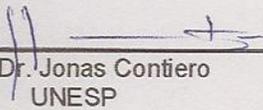
---

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim  
UFSCar



---

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho  
UFSCar



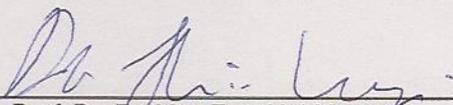
---

Prof. Dr. Jonas Contiero  
UNESP



---

Prof. Dr. João Batista Fernandes  
UFSCar



---

Prof. Dr. Rodrigo Facchini Magnani  
FUNDECITRUS

Aos meus pais, Luiz e Cleusa;  
Aos meus irmãos, Priscilla e Fabio,  
e respectivas famílias;  
À minha esposa Jakelline.

*"In the fields of observation chance  
favors only the prepared mind."*

Louis Pasteur 1822-1895

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar aqui meus sinceros agradecimentos a algumas pessoas que tornaram esta jornada árdua possível de ser completada:

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, pela orientação e amizade durante toda a minha jornada no Programa de Pós-Graduação em Química.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio, pela coorientação e pelos experimentos de NMR, aos quais também devo o agradecimento ao restante do Laboratório de Ressonância Nuclear, em especial a Luciana Vizotto pelo tempo dedicado aos experimentos.

Aos Profs. Drs. João Batista Fernandes, Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Paulo César Vieira e Vânia Gomes Zuin, pelo auxílio e pela infraestrutura compartilhada durante o tempo que estive no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e membros do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos (LaBioMMi) em especial o Prof. Dr. Douglas Ferreira, pelas análises de MALDI-TOF e excelentes discussões sobre química, ecologia e filosofia.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce Helena Ferreira de Souza por ceder o espaço do Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural para a realização dos experimentos de biologia molecular, os quais não seriam realizados de maneira eficiente sem o suporte do M. Sc. Evandro Luiz Prieto.

À Coordenação de Pós-Graduação, ao Programa de Excelência Acadêmica e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Proex – CAPES) pela bolsa e pelos prêmios concedidos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Prof. Dr. Tiago Venâncio e Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pelas contribuições e conselhos dados no exame de qualificação e durante o seminário final.

A todos os professores da Área de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pelo excelente conteúdo e seriedade das disciplinas.

A todos os colegas do Laboratório de Produtos Naturais pelo apoio não só profissional como também pessoal.

Aos alunos do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, que durante esses anos contribuíram para um ambiente muito saudável e rico em discussões intrigantes e inteligentes.

Aos funcionários, colegas e amigos do Departamento de Química e da Secretária de Pós-Graduação do DQ/UFSCar.

Aos meus familiares, por todos os seus atos que acabam por fornecer a segurança necessária para perseverar no caminho que escolhi.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2-Man - 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil manitol  
2,4-Glc - 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3,6-di-O-metil glucitol  
2,6-Man - 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil manitol  
3-Fuc - 1,3,5-tri-O-acetil-2,4-di-O-metil-6 fucitol  
3-HBMe - (*R*)-3-hidroxi-butanoato de metila  
3-HPMe - (*R*)-3-hidroxi-pentanoato de metila  
AA - Acetato de Alditol  
Ara - Arabinose  
BLAST - Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico  
BST - Teste de ponto bacteriano  
CCRC - Centro de Pesquisas em Carboidratos Complexos  
CDW - Massa Seca Celular  
CN - Caldo Nutriente  
COSY - Espectroscopia de Correlação  
CP/MAS - Polarização cruzada/giro em ângulo mágico  
Da - Dalton  
dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfato  
ELSD - Detector de Espalhamento de Luz Evaporativo  
EPS - Exopolissacarídeo  
ESI - *Electrospray ionization*  
FAME - Éster Metílico de Ácido Graxo  
FP - Primer Frontal  
FTIR - Infravermelho com Transformada de Fourier  
Fuc - Fucose  
Gal - Galactose  
GC - Cromatografia Gasosa  
Glc - Glicose  
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
HSQC - Correlação Heteronuclear de Quantum Simples  
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada  
*m/z* - Razão massa/carga

MALDI-TOF - Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz - Analisador por tempo de voo

Man - Manose

MM - Massa Molar

M3 - Meio mineral mínimo

MS - Espectrometria de Massas

MSP - Espectro Principal Unificado

NA - Nutriente-Ágar

NCBI - Centro Nacional de Informação Biotecnológica

NMR - Ressonância Magnética Nuclear

NOESY - Espectroscopia de efeito nuclear Overhouser

NR - Meio de cultura com Vermelho de Nilo

PBAT - poli(butileno-adipato-tereftalato)

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PHA - Polihidroxialcanoato

PHB - Polihidroxibutirato

PHBV - Poli(hidroxibutirato-co-valerato)

PMF - perfil de massas protéico

rDNA - DNA ribossomal

Rha - Ramnose

RP - Primer Reverso

SCFA - Ácidos Graxos de cadeia curta

SEC - Cromatografia por Exclusão de Tamanho

*t*-Xyl - 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil xilitol

*t*-Man - 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil manitol

T.R. - Tempo de retenção

TFA - Ácido Trifluoroacético

TIC - Cromatograma de Íons Totais

TMSP-*d4* - ácido 3-trimetilsililpropiónico-*d4*

TOCSY - Espectroscopia de correlação total

UV/Vis - Ultravioleta/Visível

Xyl - Xilose

$\alpha$ -CHCA -  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Principais classes de polímeros comercializados atualmente e suas principais aplicações. Adaptado de (Roddy 2013; Koushal <i>et al.</i> , 2014). .....	5
Tabela 1.2. Recomendação da IUPAC sobre terminologias relacionadas a polímeros e suas aplicações (Vert <i>et al.</i> , 2012) .....	8
Tabela 1.3. Polímeros produzidos por micro-organismos. Adaptado de Rehm, 2010	17
Tabela 4.1. Reagentes e Condições da reação de PCR. ....	38
Tabela 4.2. Códigos usados para descrever cada isolado bacteriano usado neste trabalho.....	40
Tabela 4.3. Pontuações obtidas para cada isolado na classificação pelo software Bruker MALDI Biotyper. ....	44
Tabela 4.4. Resultados obtidos pelo sequenciamento parcial do gene 16S rDNA e comparação com banco de dados de NCBI usando a ferramenta BLAST. ....	48
Tabela 4.5. Continuação dos resultados obtidos pelo sequenciamento parcial do gene 16S rDNA e comparação com banco de dados de NCBI usando a ferramenta BLAST. ....	49
Tabela 4.6. Comparativo de identificações dos micro-organismos pelos métodos de MALDI-TOF MS e gene 16S rDNA.....	54
Tabela 4.7. Continuação do comparativo de identificações dos micro-organismos pelos métodos de MALDI-TOF MS e gene 16S rDNA.....	54
Tabela 4.8. Resumo dos gêneros identificados e sua classificação taxonômica.....	59
Tabela 5.1. Parâmetros de temperatura do forno da coluna para o método de análise do produto de metanólise de PHA por GC-MS.....	77
Tabela 5.2. Classificação qualitativa do acúmulo de PHA pelos isolados, avaliados pelo teste de Vermelho do Nilo.....	80
Tabela 5.3. Isolados bacterianos selecionados para a avaliação quantitativa em experimentos de produção de PHA.....	81
Tabela 5.4. Avaliação quantitativa da produção de massa celular e polímero pelos isolados selecionados .....	82
Tabela 5.5. Valores quantitativos para a produção de PHA usando fontes de carbono alternativas por <i>Aurantimonas</i> sp. e <i>Delftia</i> sp. ....	87
Tabela 5.6. Composição monomérica relativa dos PHAs obtidos de <i>Aurantimonas</i> sp. e <i>Delftia</i> sp., cultivadas com diferentes fontes de carbono.....	90
Tabela 6.1. Parâmetros de temperatura do forno da coluna para o método de análise do produto de AA e PMAA por GC-MS. ....	114
Tabela 6.2. Resumo dos resultados do teste de triagem de cepas para produção de EPS .....	117
Tabela 6.3. Continuação do resumo dos resultados do teste de triagem de cepas para produção de EPS .....	118

Tabela 6.4. Continuação do resumo dos resultados do teste de triagem de cepas para produção de EPS .....	119
Tabela 6.5. Isolados selecionados para avaliação quantitativa e caracterização do EPS .....	121
Tabela 6.6. Resumo dos resultados quantitativos para a produção de EPS pelos isolados selecionados .....	121
Tabela 6.7. Frequências vibracionais observadas nos espectros de FTIR dos EPS obtidos dos isolados bacterianos.....	123
Tabela 6.8. Padrões de dextrana usados na construção da curva de calibração e estatísticas de regressão polinomial de terceira ordem para os padrões de dextrana.	128
Tabela 6.9. Tempos de retenção dos derivados de AA de padrões de monossacarídeos .....	132
Tabela 6.10. Identidade dos sinais identificados no cromatograma do derivado de PMAA do EPS produzido por <i>Acidovorax</i> sp. ....	136
Tabela 6.11. Identificação da composição monomérica do EPS produzido por <i>Luteibacter</i> sp. ....	145
Tabela 6.12. Valores de deslocamento químico para os hidrogênios anoméricos (H <sub>1</sub> ) dos resíduos A-F do EPS de <i>Luteibacter</i> sp.....	148
Tabela 6.13. Valores de deslocamento químico para os hidrogênios ligados ao carbono 2 (H <sub>2</sub> ) dos resíduos A-F do EPS de <i>Luteibacter</i> sp.....	150
Tabela 6.14. Atribuição parcial dos deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C dos monossacarídeos constituintes do EPS de <i>Luteibacter</i> sp. ....	154

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Principais plásticos comercializados, suas principais aplicações e suas fatias de mercado em 2015 (PLASTICSEUROPE, 2015). PS-E: PS expandido; PE-HD, PE-MD: PEAD; PE-LD, PE-LLD: PEBD.....	4
FIGURA 1.2 -Tipos de polímeros produzidos industrialmente. Adaptado de PHILP, 2013. ....	9
FIGURA 1.3 - Esquema de biodegradação de polímeros no ambiente. Adaptado de LUCKACHAN e PILLAI, 2011.....	10
FIGURA 1.4 - Capacidade global de produção de bioplásticos em 2014 por tipo de material. Adaptado de EUROPEAN BIOPLASTICS, 2016a. <sup>1</sup> Contém blendas de amido resistentes, Bio-PC, Bio-TPE, Bio-PUR (exceto termorrígidos). <sup>2</sup> Conteúdo biobaseados de até 30%. <sup>3</sup> Contém PCL, PBS e PBAT baseados em recursos fósseis. <sup>4</sup> Folhas de celulose hidratadas compostáveis. <sup>5</sup> Celulose esterificada biodegradável.....	12
FIGURA 1.5 - Capacidade global de produção de bioplásticos, produção consolidada até 2015 e estimativas até 2019. Adaptado de EUROPEAN BIOPLASTICS, 2016b. ....	12
FIGURA 1.6 - Ilustração dos processos produtivos na cadeia polimérica com relação a matéria-prima e o destino após uso (VILAPLANA <i>et al.</i> , 2010). ....	14
FIGURA 1.7 - Comunidades microbianas relacionadas a diversos ambientes (LEY <i>et al.</i> , 2006).....	19
FIGURA 1.8 - Ilustração de associações possíveis entre insetos e micro-organismos. Adaptado de HANSEL e MORAN, 2014. ....	20
FIGURA 4.1 - Representação esquemática do funcionamento da técnica de MALDI-TOF MS e exemplo de espectro de massas obtido (Adaptado de CROXATTO <i>et al.</i> , 2012) .....	34
FIGURA 4.2 - Placas de meio de cultivo NA ilustrando alguns isolados obtidos de <i>D. speciosa</i> . ....	39
FIGURA 4.3 - Espectros de massa (2-20kDa) para algumas bactérias selecionadas. a) <i>Serratia marcescens</i> (DsA.N005); b) <i>Acinetobacter pittii</i> (DsA.N006); c) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (DsA.N007); d) <i>Pseudomonas mosseli</i> (DsA.N008) e) Identificação não confiável (DsA.N009); f) <i>Pseudomonas chlororaphis</i> (DsA.N010) e g) <i>Enterobacter cloacae</i> (DsA.N011).....	41
FIGURA 4.4 - Classificação dos resultados de identificação dos isolados por MALDI-TOF de acordo com os níveis taxonômicos. N.I. - Não identificado. ....	43
FIGURA 4.5 - Resumo dos resultados de identificação dos micro-organismos isolados de <i>D. speciosa</i> por MALDI-TOF MS.....	43
FIGURA 4.6 - Quantificação de ácido nucléico em microespectrofotômetro BioSpec-nano. ....	45
FIGURA 4.7 - Gel de agarose 1% (m/m) mostrando a eficiência das reações de PCR para os micro-organismos isolados.....	46

FIGURA 4.8 - Exemplos de trechos dos eletroferogramas obtidos depois do sequenciamento de DNA das amostras. a) DsF.N003 ( <i>Luteibacter</i> sp.); b) DsF.N014 ( <i>Pseudomonas monteilii</i> ); c) DsF.N020 ( <i>Serratia marcescens</i> ); d) DsA.N006 ( <i>Acinetobacter</i> sp.) .....	46
FIGURA 4.9 - Espectros de massas obtidos para as cepas que não apresentaram nenhuma identificação.....	51
FIGURA 4.10 - Comparação das metodologias de identificação de micro-organismos por sequenciamento do gene 16S rDNA e perfil proteômico por MALDI-TOF MS...	53
FIGURA 4.11 - Árvores de classificação taxonômicas para os isolados. A) Árvore filogenética derivada dos dados de 16S rDNA; e B) Árvore filoproteômica derivada dos dados de MALDI-TOF MS .....	57
FIGURA 4.12 - Comparação entre os gêneros microbianos observados em insetos do gênero <i>Diabrotica</i> . Gêneros sublinhados no texto e marcados nos gráficos indicam um microbioma central relacionado ao gênero. (SCHALK <i>et al.</i> , 1987; TRAN e MARRONE, 1988; CHU <i>et al.</i> , 2013).....	61
Figura 5.1 - Micrografia de células microbianas de <i>Cupriavidus necator</i> DSM 545 contendo variáveis concentração de grânulos de PHA (KOLLER <i>et al.</i> , 2011).....	66
FIGURA 5.2 - Estruturas químicas das principais classes dos polihidroxicanoatos. 67	
FIGURA 5.3 - Possíveis rotas biossintéticas descritas para assimilação de diferentes substratos na síntese de PHA. As letras A-M representam os possíveis substratos iniciais passíveis de serem usados para biossíntese de PHAs. Setas cheias indicam rotas enzimáticas conhecidas; setas pontilhadas representam rotas biossintéticas putativas. 3-H2MB-CoA - 3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA; 3-H4MV-CoA - 3-hydroxy-4-methylvaleryl-CoA; 3-HV-CoA - 3-hydroxyvaleryl-CoA; 3-H2MV-CoA - 3-hydroxy-2-methylvaleryl-CoA; 4-HB-CoA - 4-hydroxybutyryl-CoA; 3-HB-CoA - 3-hydroxybutyryl-CoA; (R)-3-HA-CoA - (R)-3-hydroxyacyl-CoA; 4,5-HA-CoA - 4,5-hydroxyacyl-CoA). Adaptado de Tan <i>et al.</i> , 2014. ....	68
FIGURA 5.4 - Visão geral da cadeia de processos associados aos polihidroxicanoatos. A) Representação esquemática da polimerização enzimática em cadeia. B) Representação esquemática de um grânulo de PHA com suas proteínas associadas. C) Formas $\alpha$ - e $\beta$ - do polímero (apenas o $\beta$ é encontrada naturalmente). D) Estrutura semicristalina do polímero. E) Imagem de microscopia de força atômica de um filme de PHBV. F) Produtos plásticos produzidos passíveis de serem produzidos com o material obtido. (Adaptado de LAYCOCK <i>et al.</i> , 2014)...	70
FIGURA 5.5 - Principais polímeros da classe dos PHAs e suas aplicações mais promissoras. Adaptado de ISIKGOR e BECER, 2015.....	72
FIGURA 5.6 - Esquema da reação de metanólise de PHA sob condições ácidas .....	77
FIGURA 5.7 - Tipos de fluorescência observada para os isolados no teste com o corante Vermelho do Nilo em placa de Petri. ....	79
FIGURA 5.8 - Cromatogramas obtidos após metanólise das células. A) Cromatograma de íons totais (TIC). B) Ampliação da região entre 4,0 e 7,0 min, com destaque para os sinais dos compostos 3-HBMe (T.R. 4,26min) e 3-HPMe (T.R. 6,12 min).....	83
FIGURA 5.9 - Espectro de massas e propostas de fragmentações para as moléculas: A) 3-HBMe, e; B) 3-HPMe .....	85

FIGURA 5.10 - Cromatogramas obtidos após metanólise das células dos isolados de <i>Aurantimonas</i> sp. e <i>Delftia</i> sp. cultivadas em diferentes fontes de carbono (Glicose, Glicerol, fração leve e pesada do bio-óleo de Eucalipto). A) Cromatograma de íons totais (TIC). B) Ampliação da região entre 4,0 e 7,0 min, com destaque para os sinais dos compostos 3-HBMe (T.R. 4,26min) e 3-HPMe (T.R. 6,12 min).....	89
FIGURA 5.11 - Espectro de FTIR do copolímero de PBHV obtido de <i>Delftia</i> sp.....	91
FIGURA 5.12 - Espectro de $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, 27°C) do copolímero de PBHV obtido de <i>Delftia</i> sp. com glicose como fonte de carbono. ....	92
FIGURA 5.13 - a) Estrutura química do polímero PHB indicando os hidrogênios não equivalentes. b) Acoplamentos entre os hidrogênios da cadeia principal. c) Conformação entre os carbonos 2 e 3 de acordo com as constantes de acoplamento observadas.....	93
FIGURA 6.1 - A) Projeções de Fischer das formas acíclicas da série D- das aldoses de 3 a 6 carbonos. B) Diferentes epímeros possíveis para o fechamento do anel glicosídico na molécula de D-glicose (BERTOZZI e RABUKA, 2009).....	97
FIGURA 6.2 - Estrutura de alguns exopolissacarídeos a) Pululana; b) Celulose bacteriana; c) dextrana; d) Ácido hialurônico; e) Goma xantana.....	98
FIGURA 6.3 - Padrão de fragmentação por GC-MS para derivados de acetato de alditol de monossacarídeos. A) Hexoses; B) Pentoses; C) 6-Desoxihexoses.....	100
FIGURA 6.4 - Fragmentação observada para a molécula 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil hexose. ....	101
FIGURA 6.5 - Monossacarídeos comumente encontrados em diferentes classes de bactérias. Adaptado de HERGET <i>et al.</i> , 2008.....	104
FIGURA 6.6 - Correlação entre as propriedades dos polissacarídeos com suas principais áreas de aplicação. Adaptado de FREITAS <i>et al.</i> , 2011. Alg, Alginato bacteriano; Curd, Curdlana; FPol, FucoPol; Gell, Goma Gellana ; GPol, GalactoPol; Hyall, Hialuronana; Lev, levan; Scn, Succinoglicana; Xant, Goma Xantana. ....	105
FIGURA 6.7 - Cultivo de células bacterianas para obtenção de EPS. ....	107
FIGURA 6.8 - Fluxograma dos processos de derivatização dos polissacarídeos para obtenção dos derivados de AA.....	111
FIGURA 6.9 - Fluxograma dos processos de derivatização dos polissacarídeos para obtenção dos derivados de PMAA. ....	113
FIGURA 6.10 - Exemplos de fenótipos observados pelo teste de ponto bacteriano (BST). A) EPS-; B) Compacto; C) Cremoso; D) Líquido.....	115
FIGURA 6.11 - Imagens de alguns dos isolados durante o teste de ponto bacteriano (BST) para triagem de cepas produtoras de EPS. ....	115
FIGURA 6.12 - Avaliação dos resultados obtidos no teste de ponto bacteriano (BST) A) Variação do diâmetro de colônia por número de isolado B) Variação de acordo com o fenótipo observado .....	116
FIGURA 6.13 - Tipos de EPS obtidos para os isolados selecionados .....	122
FIGURA 6.14 - Espectro de $^{13}\text{C}$ CP/MAS NMR para o EPS isolado de <i>Aurantimonas</i> sp.....	125

FIGURA 6.15 - Espectro de $^{13}\text{C}$ NMR em estado sólido após hidratação do EPS isolado de <i>Aurantimonas</i> sp. ....	125
FIGURA 6.16 - A) Cromatograma obtido para os padrões de dextrana; B) Curva de calibração de tempo de retenção x Log MM para os padrões de dextrana, e ajuste polinomial de terceira ordem .....	128
FIGURA 6.17 - Cromatograma de SEC-UV-ELSD para o EPS produzido pela cepa DsF.N008 ( <i>Acidovorax</i> sp.).....	129
FIGURA 6.18 - A) MALDI-TOF MS do EPS produzido por <i>Acidovorax</i> sp. B) Fragmentação com perda da unidade de anidroxose, 162 Da. ....	130
FIGURA 6.19 - Cromatograma obtido para os derivados de AA do EPS produzido por <i>Acidovorax</i> sp. A) Padrões derivatizados de monossacarídeos; B) Cromatograma da EPS produzido por <i>Acidovorax</i> sp.; C) Ampliação do cromatograma em B). As condições instrumentais estão descritas na seção 6.2.2.5.1.....	131
FIGURA 6.20 - Cromatograma obtido para os derivados de PMAA do EPS produzido por <i>Acidovorax</i> sp. A) visão geral do cromatograma. B) Ampliação da região entre 15 e 30 minutos do cromatograma, com destaque aos compostos de interesse referente aos derivados de PMAA, numerados de 1 a 6. ....	133
FIGURA 6.21 - Espectros de massas para os sinais 1-6 destacados no cromatograma de derivados de PMAA do EPS de <i>Acidovorax</i> sp. . A) Sinal 1, T.R. 17,069 min; B) Sinal 2, 17,208 min; C) Sinal 3, T.R. 20,861 min; D) Sinal 4, T.R. 21,947 min; E) Sinal 5, 22,047 min; F) Sinal 6, T.R. 26,072 min .....	134
FIGURA 6.22 - Íons observados para as classes de derivados de PMAA observados no cromatograma dos derivados de PMAA do EPS de <i>Acidovorax</i> sp.. A) 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil hexose; B) 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil hexose; C) 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil hexose; D) 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil hexose .....	135
FIGURA 6.23 - Proposta de estrutura do EPS produzido por <i>Acidovorax</i> sp.....	137
FIGURA 6.24 - Cromatograma de SEC-UV-ELSD para o EPS produzido pela bactéria <i>Luteibacter</i> sp. A) Detecção por ELSD; B) Detecção por UV (280 nm).....	139
FIGURA 6.25 - Cromatograma dos derivados de AA para o EPS produzido por <i>Luteibacter</i> sp. a) Padrões analíticos (em ordem de eluição: Eri, Rha, Fuc, Ara, Xyl, Man, Gal, Glc); b) Cromatograma obtido para a amostra derivatizadas de <i>Luteibacter</i> sp.; c) Ampliação no eixo x do espectro apresentando em b). *Indicam sinais referentes a compostos possivelmente derivados de monossacarídeos que não correlacionam com os padrões avaliados. ....	140
FIGURA 6.26 - Cromatograma obtido para os produtos de PMAA do EPS de <i>Luteibacter</i> sp.....	141
FIGURA 6.27 - Espectros de massas para os sinais dos derivados de PMAA do EPS de <i>Luteibacter</i> sp.. A) Sinal 1, T.R. = 14,870 min; B) Sinal 2, T.R. = 15,682 min; C) Sinal 3, T.R. = 17.041 min; D) Sinal 4, T.R. = 20.849 min; E) Sinal 5, T.R. = 24.858 min; F) Sinal 6, T.R. = 26,065 min .....	142
FIGURA 6.28 - Perfil de fragmentação para as moléculas observadas no cromatograma de derivados de PMAA do EPS de <i>Luteibacter</i> sp. A) 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil xilitol (Sinal 1, T.R = 14,870 min); B) 1,3,5-tri-O-acetil-2,4-di-O-metil-6 fucitol (Sinal 2, T.R. = 15,682 min); c) 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil hexose	

(Sinal 3, T.R. = 17.041 min); d) 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil hexose (Sinal 4, T.R. = 20.849 min); e) 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3,6-di-O-metil hexose (Sinal 5, T.R. = 24.858 min); f) 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil hexose (Sinal 6, T.R. = 26,065 min). .....	143
FIGURA 6.29 - Possíveis combinações para a estrutura do monômero do EPS de <i>Luteibacter</i> sp. de acordo com os derivados de PMAA observados por GC-MS. t: Monossacarídeo terminal; 1: Monossacarídeo com 1 ramificação; 2: Monossacarídeo com 2 ramificações.....	145
FIGURA 6.30 - Espectro de $^1\text{H}$ NMR (400MHz, 70°C, D <sub>2</sub> O) para o EPS de <i>Luteibacter</i> sp.....	146
FIGURA 6.31 - Espectro de $^1\text{H}$ NMR para o EPS de <i>Luteibacter</i> sp. A) 400 MHz, 70°C, D <sub>2</sub> O; B) 600 MHz, 80°C, D <sub>2</sub> O, sobrenadante.....	147
FIGURA 6.32 - Experimento de COSY (400MHz, 70°C, D <sub>2</sub> O) para o EPS de <i>Luteibacter</i> sp. A) Visão geral do espectro; B) Ampliação da região dos hidrogênios $\alpha$ -anoméricos entre $\delta$ 4,7 e 5,5, mostrando a interação H <sub>1</sub> -H <sub>2</sub> para os resíduos A - E do monômero do EPS. C) Ampliação da região entre $\delta$ 3,2 e 4,6, mostrando a correlação de todos os sinais dos hidrogênios do resíduo F. D) Ampliação da região entre $\delta$ 1 a 4, mostrando a interação dos sinais H <sub>4</sub> , H <sub>5</sub> e H <sub>6</sub> do resíduo de fucose. ....	149
FIGURA 6.33 - Experimento de TOCSY (400 MHz, 70°C, D <sub>2</sub> O) para o EPS de <i>Luteibacter</i> sp. A) Visão geral do espectro; B) Visão ampliada da região dos prótons anoméricos e do anel glicosídico.....	151
FIGURA 6.34 - Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HQSC (600 MHz, 80°C, D <sub>2</sub> O) do EPS de <i>Luteibacter</i> sp. A) Visão geral do espectro; B) Ampliação da região entre $\delta$ 4,4 e 5,4 mostrando as correlações C <sub>1</sub> /H <sub>1</sub> dos hidrogênios anoméricos nos resíduos A-F; C) Ampliação da região entre $\delta$ 3,3 e 4,3 mostrando as designações de algumas correlações C/H de átomos dos anéis glicosídicos dos resíduos de monossacarídeos A-F do EPS de <i>Luteibacter</i> sp. ....	153
FIGURA 6.35 - Experimento de NOESY (400MHz, 70°C, D <sub>2</sub> O) para o EPS de <i>Luteibacter</i> sp.. As correlações sublinhadas correspondem a interações entre hidrogênios de dois monossacarídeos diferentes.....	155
FIGURA 6.36 - Trissacarídeo constituído de Xylp- $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4-Glcp- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-Fucp- $\alpha$ -1 $\rightarrow$ identificado como parte constituinte do EPs de <i>Luteibacter</i> sp. As setas indicam as correlações observadas por NOESY.....	156
FIGURA 6.37 - Propostas de estrutura do monômero constituinte do EPS de <i>Luteibacter</i> sp. ....	157

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS AO INSETO-PRAGA *DIABROTICA SPECIOSA* NA PRODUÇÃO DE POLÍMEROS BIOBASEADOS E BIODEGRADÁVEIS

O desenvolvimento tecnológico e a pressão de mercado fizeram com que os polímeros se tornassem materiais estruturais amplamente utilizados em uma grande variedade de aplicações, sendo manufaturados a partir de uma ampla gama de monômeros. Entretanto, estes materiais geralmente apresentam algumas desvantagens do ponto de vista ambiental, pois os polímeros mais utilizados são produzidos com matérias-primas não renováveis e geram grandes volumes de resíduos não biodegradáveis. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento sustentável de novos materiais biobaseados e biodegradáveis. O uso de micro-organismos para a obtenção deste tipo de polímero é uma realidade bastante promissora. Todavia, para a produção viável em escala industrial é necessário superar barreiras econômicas, através do uso de cepas com boa assimilação de substratos de baixo custo, proporcionando uma alta produtividade. Assim, este trabalho teve por objetivo o isolamento e identificação de bactérias associadas ao inseto *Diabrotica speciosa*, bem como a avaliação da capacidade microbiana de produção de biopolímeros. O inseto apresentou uma grande diversidade em sua microbiota, mostrando ser este um nicho subexplorado e com enorme potencial para a investigação de novas espécies e/ou isolados. Com o propósito de encontrar isolados eficientes na produção de duas classes de biopolímeros, polihidroxicanoatos (PHAs) e exopolissacarídeos (EPS), foram obtidos 73 isolados bacterianos do inseto praga *Diabrotica speciosa*. Todas as cepas foram identificadas em nível de gênero pelo uso de técnicas genéticas, através do sequenciamento de 16S rDNA parcial e por análises proteômicas, avaliando-se o perfil proteico obtido via MALDI-TOF MS. Ambas as técnicas de identificação apresentaram 100% de convergência entre os resultados. Foram encontrados no total 17 gêneros de bactérias, que foram submetidas a ensaios qualitativos de triagem para identificação de isolados produtores de PHAs pelo método do corante vermelho de Nilo, bem como para EPS pelo método do teste de ponto bacteriano. Isolados promissores em ambos os ensaios foram selecionados para estudos quantitativos e caracterização estrutural dos polímeros obtidos. As análises quantitativas para a produção de PHA corroboraram satisfatoriamente com os resultados qualitativos, com destaque para as bactérias do gênero *Aurantimonas* e *Delftia* que apresentaram alta capacidade de

produção de PHA, com rendimentos de 50 e 90% de polímero em massa seca, respectivamente, sendo ambas as cepas capazes de utilizar substratos como glicose, acetato e glicerol. Análises por GC-MS realizadas após metanólise do polímero indicaram que *Aurantimonas* sp. produziu majoritariamente homopolímero de polihidroxibutirato (PHB), enquanto *Delftia* sp. foi capaz de produzir um copolímero contendo monômeros do tipo butirato e valerato (PHBV), contendo até 10% em massa de valerato. Com relação à produção de EPS, a triagem indicou que os isolados se mostraram capazes de produzir polímeros em quantidade variáveis, com uma grande e complexa variação estrutural. Isolados dos gêneros *Acidovorax*, *Aurantimonas* e *Luteibacter* foram selecionados para avaliação quantitativa da produção de EPS e caracterização estrutural do biopolímero. Após análises por NMR, MALDI-TOF, SEC-UV-ELSD e GC-MS, o gênero *Luteibacter* produziu um polímero altamente complexo contendo manose, glicose, fucose e xilose, o gênero *Acidovorax* produziu um EPS do tipo glucomanana altamente ramificado;= e o gênero *Aurantimonas* foi capaz de produzir até 2 g.L<sup>-1</sup> de um EPS insolúvel em água. Deste modo, foi possível concluir que a microbiota de *D. speciosa* se apresentou extremamente rica em isolados microbianos viáveis para estudos exploratórios no contexto biotecnológico de produção de biopolímeros. Os isolados investigados apresentaram características promissoras para serem futuramente avaliadas em escalas maiores (fermentadores), especialmente a bactéria *Aurantimonas* sp., que foi capaz de produzir tanto PHBV, quanto EPS.

Palavras-chave: Biopolímero, Bactérias, Polihidroxialcanoato, Exopolissacarídeo, MALDI-TOF MS, 16s rDNA, Caracterização química, Cromatografia, Técnicas espectrométricas e espectroscópicas.

## EVALUATION OF THE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH THE PEST INSECT *DIABROTICA SPECIOSA* ON BIOBASED AND BIODEGRADABLE POLYMER PRODUCTION

Technological development and market pressure turned polymers into widely used structural materials for several different applications, being manufactured by a wide range of monomers. However, traditional polymers usually show some drawbacks regarding environmental aspects, as most used polymers are produced with non-renewable feedstock and generate huge amounts of non-biodegradable residues. Therefore it is imperative the sustainable development of new bio-based and biodegradable polymeric materials. The use of microorganisms for obtaining biopolymers is a very promising reality. However, in order to achieve viable production in industrial scale it is necessary to overcome economic barriers, by using microbes with good assimilation of low-cost substrates and high biopolymer yields. As such, the objective of this work was the isolation and identification of bacteria associated with the insect *Diabrotica speciosa*, as well as the evaluation microbial capacity of biopolymer production. The insect presented great microbial diversity, identified as an underexplored niche with tremendous biotechnological potential for the investigation of novel species and/or strains. In an attempt to find bacterial isolates effective on the production of two classes of biopolymers, polyhydroxyalkanoates (PHA) and exopolysaccharides (EPS), it was obtained 73 strains of bacteria associated with *Diabrotica speciosa*. These bacteria were identified at genus level by genetic techniques using 16S rDNA sequencing and by proteomic techniques using MALDI-TOF MS. Both characterization methods yielded 100% convergence on results. It was found 17 different bacterial genera, which were submitted to qualitative screening assays in order to identify strains producing PHA using Nile Red dye method, as well as for EPS by using the bacterial spot test. Promising strains on both assays were selected for further quantitative studies and structural characterization of the obtained biopolymers. Quantitative analyses for PHA production corroborated satisfactorily with qualitative results, especially to bacteria from genera *Aurantimonas* and *Delftia* which demonstrated high PHA production capacity with 50 and 90% polymer yield on dry mass, both strains being strains able to use substrates such as glucose, acetate and glycerol. GC-MS analyses indicated that *Aurantimonas* sp. produced mostly a homopolymer of polyhydroxybutyrate (PHB), while *Delftia* sp. was able to produce a copolymer having

butyrate and valerate (PHBV), with up to 10% (w/w) of valerate. Regarding EPS production, the screening showed that the isolates were able to produce polymers in variable amounts, with vast and complex structural variations. Strains from genera *Acidovorax*, *Aurantimonas* and *Luteibacter* were further selected for quantitative analysis of EPS production and analytical characterization of the obtained biopolymer. After analyses using NMR, MALDI-TOF, SEC-UV-ELSD and GC-MS, bacteria from genus *Luteibacter* produced a highly complex polymer rich in mannose, glucose, fucose and xylose; genus *Acidovorax* produced a glucomannan-type EPS with a high degree of branching; and genus *Aurantimonas* was able to produce up to 2 g.L<sup>-1</sup> of a water insoluble EPS. In face of these results, it was possible to conclude that *D. speciosa* microbiota showed to be extremely rich in bacterial species viable for exploratory studies with biotechnological context of biopolymer production. Investigated strains showed promising characteristics to be further evaluated in larger scale (fermenters), especially the bacteria *Aurantimonas* sp., able to produce PHBV and EPS.

Keywords: Biopolymer, Bacteria, Polyhydroxyalkanoate, Exopolysaccharide, MALDI-TOF MS, 16s rDNA, Chemical characterization, Chromatography, Spectrometric and spectroscopic techniques

# SUMÁRIO

<b>1 - Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 - Polímeros e plásticos .....	2
1.2 - Problemas associados aos polímeros convencionais.....	6
1.3 - Soluções ambientalmente corretas para os polímeros tradicionais.....	8
1.4 - Aplicação biotecnológica de bactérias, com ênfase em biopolímeros.....	15
1.5 - Bactérias do trato gastrointestinal como fonte de cepas com potencial biotecnológico .....	20
<b>2 - Objetivos .....</b>	<b>23</b>
2.1 - Objetivo Geral .....	23
2.2 - Objetivos Específicos.....	23
<b>3 - Materiais e Infraestrutura Gerais .....</b>	<b>25</b>
3.1 - Reagentes e Solventes .....	25
3.2 - Instrumentação .....	26
<b>4 - Identificação molecular e espectrométrica de bactérias associadas ao trato digestivo do inseto-praga <i>Diabrotica speciosa</i></b>	<b>31</b>
4.1 - Introdução .....	32
4.2 - Procedimentos Experimentais.....	36
4.2.1 - Identificação de micro-organismos associados a <i>D. speciosa</i> por MALDI-TOF MS .....	36
4.2.2 - Identificação dos micro-organismos associados a <i>D. speciosa</i> por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA .....	37
4.3 - Resultados e Discussão.....	38
4.4 - Conclusões .....	62
<b>5 - Avaliação do potencial de bactérias isoladas de <i>D. speciosa</i> para produção de polihidroxialcanoatos (PHA).</b>	<b>65</b>
5.1 - Introdução .....	66
5.2 - Experimental .....	73
5.2.1 - Métodos microbiológicos para obtenção de polihidroxialcanoatos.....	73
5.2.1.1 - Triagem Qualitativa da produção de PHA.....	73
5.2.1.2 - Avaliação quantitativa da produção de PHA por cepas selecionadas.....	74
5.2.2 - Caracterização dos polihidroxialcanoatos obtidos.....	75
5.2.2.1 - Avaliação Quantitativa da produção de PHA.....	75
5.2.2.2 - FTIR.....	76
5.2.2.3 - NMR .....	76
5.2.2.4 - GC-MS .....	76
5.3 - Resultados e Discussão.....	78
5.3.1 - Avaliação Qualitativa de acúmulo de PHA usando o corante Vermelho do Nilo.....	78

5.3.2 - Avaliação Quantitativa da Produção de PHA por isolados selecionados.....	80
5.3.3 - Avaliação da produção de PHA usando fontes alternativas de carbono.....	87
5.3.4 - Caracterização do copolímero PHBV obtido por <i>Delftia</i> sp. ....	91
<b>5.4 - Conclusões .....</b>	<b>94</b>
<b>6 - Avaliação do potencial de bactérias isoladas de <i>D. speciosa</i> para produção de exopolissacarídeos (EPS). .....</b>	<b>95</b>
<b>6.1 - Introdução .....</b>	<b>96</b>
<b>6.2 - Experimental .....</b>	<b>106</b>
6.2.1 - Métodos microbiológicos para obtenção de exopolissacarídeos .....	106
6.2.1.1 - Avaliação qualitativa da produção de EPS .....	106
6.2.1.2 - Avaliação quantitativa e isolamento de EPS .....	107
6.2.2 - Caracterização analítica dos exopolissacarídeos.....	108
6.2.2.1 - FTIR.....	108
6.2.2.2 - SEC-UV-ELSD .....	108
6.2.2.3 - MALDI-TOF MS.....	109
6.2.2.4 - NMR .....	109
6.2.2.5 - GC-MS .....	110
6.2.2.5.1 - Obtenção dos derivados de acetato de alditol (AA).....	110
6.2.2.5.2 - Obtenção dos derivados de acetato de alditol parcialmente metilados (PMAA).....	111
6.2.2.5.3 - Análise Instrumental.....	113
<b>6.3 - Resultados e Discussão.....</b>	<b>114</b>
6.3.1 - Triagem Qualitativa de isolados bacterianos de <i>D. speciosa</i> frente sua produção de exopolissacarídeo (BST) .....	114
6.3.2 - Avaliação quantitativa da produção de EPS por isolados selecionados .....	120
6.3.3 - Caracterização Estrutural dos EPS obtidos .....	123
6.3.4 - Elucidação estrutural do EPS produzido pela cepa DsA.N042 ( <i>Aurantimonas</i> sp.).....	124
6.3.5 - Elucidação estrutural do EPS produzido por DsF.N008 ( <i>Acidovorax</i> sp.).....	127
6.3.6 - Elucidação estrutural do EPS produzido por DsF.N003 ( <i>Luteibacter</i> sp.).....	138
<b>6.4 - Conclusões .....</b>	<b>158</b>
<b>7 - Conclusões e Perspectivas Futuras.....</b>	<b>161</b>
<b>8 - Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>163</b>
<b>9 - Apêncides.....</b>	<b>181</b>

## 1 - Introdução

A revolução industrial foi responsável pelo progresso em diversas áreas da ciência, muitas vezes atrelada a descoberta de novos materiais e suas aplicações no desenvolvimento de produtos obtidos em grande escala e que facilitam o estilo de vida moderno (DE VRIES, 1994).

Entre as pesquisas que mais se esperavam resultados, estavam os estudos relacionados ao desenvolvimento de novos materiais que pudessem substituir matérias-primas provenientes de fontes naturais, geralmente limitados geograficamente e em volume, devido ao aumento vertiginoso da capacidade de produção de bens de consumo (WRIGLEY, 1962). Como exemplo, o risco de extinção de elefantes africanos no século XIX, causado pela extração desenfreada de marfim, resultou em uma busca por novos materiais, culminando em 1869 com a descoberta, caracterização e aplicação do celuloide por John Wesley Hyatt, um material polimérico derivado da celulose com adição de cânfora. Apesar de não ser eficiente na produção especificamente de peças de marfim, o qual foi o motivador das pesquisas, essa matriz de celulose e cânfora apresentou propriedades tão interessantes por si só que começou a ser explorados em outras áreas de aplicação, sendo este evento considerado como o despertar da era dos plásticos (WAGNER *et al.*, 2014a).

Ainda no século XIX, o petróleo começou a despontar como um dos mais importantes insumos para a indústria do plástico, devido a sua relativa abundância e facilidade de obtenção, aliado a um crescente banco de moléculas úteis, capazes de serem obtidas através de simples processos físico-químicos como destilação, craqueamento e fracionamento (MERDRIGNAC E ESPINAT, 2007). O petróleo foi uma das principais “descobertas” da história industrial, onde apesar das controvérsias, gera um enorme portfólio de produtos e substratos diretamente envolvidos na produção de diversos compostos de grande importância comercial, tais como solventes, combustíveis, ceras, compostos aromáticos e moléculas apolares, sendo empregados em processos de produção de fármacos, pesticidas e plásticos, etc.

## 1.1 - Polímeros e plásticos

A estrutura básica da organização da matéria inicia com átomos e a associação destes em moléculas, que confere estabilidade ao conjunto por estarem conectadas entre si, compartilhando interações que tornam o conjunto de átomos menos energético e, portanto mais estável do que cada átomo separado. A natureza utiliza-se da junção de uma enorme quantidade de moléculas de baixa massa molar para a produção de moléculas grandes e complexas, geralmente utilizadas como componentes estruturais, sendo a base da existência de todos os organismos biológicos (NAKA, 2014). Qualquer organismo vivo está aparelhado de uma ampla diversidade de materiais poliméricos, tais como proteínas e enzimas (conjunto de aminoácidos), ácidos nucléicos (conjunto de nucleotídeos) e polissacarídeos (conjunto de monossacarídeos), entre outros. Estas macroestruturas estão envolvidas em praticamente todas as principais funções celulares como capacidade estrutural, desenvolvimento da célula, armazenamento de informações genéticas e autorreplicação (LEE *et al.*, 2005). É nítido que a junção de pequenas moléculas para a formação de uma grande estrutura resulta em grandes mudanças com relação à estabilidade estrutural e comportamento químico. A estes compostos de alta massa molecular derivados de uma sequência de pequenas moléculas, designa-se o nome de polímero. Esta palavra, com etimologia grega (*poli-*, "muitas" + *-meros*, "parte"), remete a um material composto de muitas partes, sendo a parte irreduzível, que compõe a estrutura repetidamente, denominado analogamente de monômero (*mono-* "uma" + *-meros*, "partes") (COTTERILL, 2008).

Polímeros naturais são usados desde a antiguidade pelos humanos para diversas aplicações na alimentação, roupas e moradia, tais como goma-laca, algodão, couro, látex, etc. (GEBELEIN, 1991). O avanço no conhecimento dos materiais permitiu que o ser humano produzisse materiais semissintéticos derivados de fontes naturais como borracha, celulose e colágeno, que possuíam melhores propriedades, inclusive alguns sendo explorados comercialmente. O primeiro material polimérico semissintético comercializado de maneira abrangente foi o Parkesine, desenvolvido em 1855 por Alexander Parkes, composto de nitrocelulose e precursor do celuloide (PAINTER e COLEMAN, 2009).

De maneira semelhante, o desenvolvimento da ciência química e de materiais levou ao conhecimento de que diversos compostos que possuíam estruturas que permitiam a síntese de materiais poliméricos. Devido à infinidade de moléculas capazes de serem utilizadas como precursores na síntese de polímeros, obteve-se também uma enorme quantidade de produtos apresentando variadas propriedades. Não há dúvida que dentre as classes de polímeros obtidos, alguns se destacavam por apresentar formas sólidas estáveis a temperatura ambiente, além de excelentes propriedades químicas, térmicas e/ou mecânicas, com alta maleabilidade quando aquecidos ao ponto de se moldar esses materiais e obter peças rígidas (KLEIN, 2011). A este tipo de material, foi dado o nome de plásticos, nomenclatura oriunda da sua enorme plasticidade, especialmente quando aquecido a determinadas temperaturas. O primeiro plástico totalmente sintético produzido em escala comercial foi o Bakelite, descoberto em 1907 por Leo H. Baekeland através da adição de formaldeído e fenol e subsequente condensação dos monômeros obtidos (CRESPY *et al.*, 2008).

A reação de polimerização, característica de cada sistema, transforma os monômeros em polímeros com diferentes propriedades de acordo com parâmetros como tamanho molecular, polidispersidade e proporção de monômeros, sendo a principal aplicação destes polímeros o seu processamento em produtos plásticos finais. Os plásticos são encontrados virtualmente em todos os ambientes que envolvem a atuação do ser humano, sendo utilizados na agricultura, medicina, transporte, encanamentos, instalação elétrica e hidráulica, embalagens, manufatura de bens domésticos e eletrônicos, móveis, entre muitos outros (SIDDIQUI e PANDEY, 2013). Existem centenas de polímeros plásticos, sendo quase em sua totalidade derivados do nafta, a fração mais leve oriunda da destilação fracionada do petróleo. Estima-se que somente em 2013 foram produzidos cerca de 300 milhões de toneladas de plástico, com aumento para 311 milhões de toneladas em 2014 (PLASTICS EUROPE, 2015), com o mercado global atual gerando cifras próximas a 600 bilhões de dólares (WORLDWATCH INSTITUTE, 2015). Entretanto, das centenas de materiais possíveis de serem produzidos, apenas alguns deles são responsáveis pela grande maioria da fatia de mercado, sendo considerados como polímeros commodities (Figura 1.1). Os principais polímeros produzidos atualmente, bem como as suas principais aplicações encontram-se descritos na Tabela 1.1.

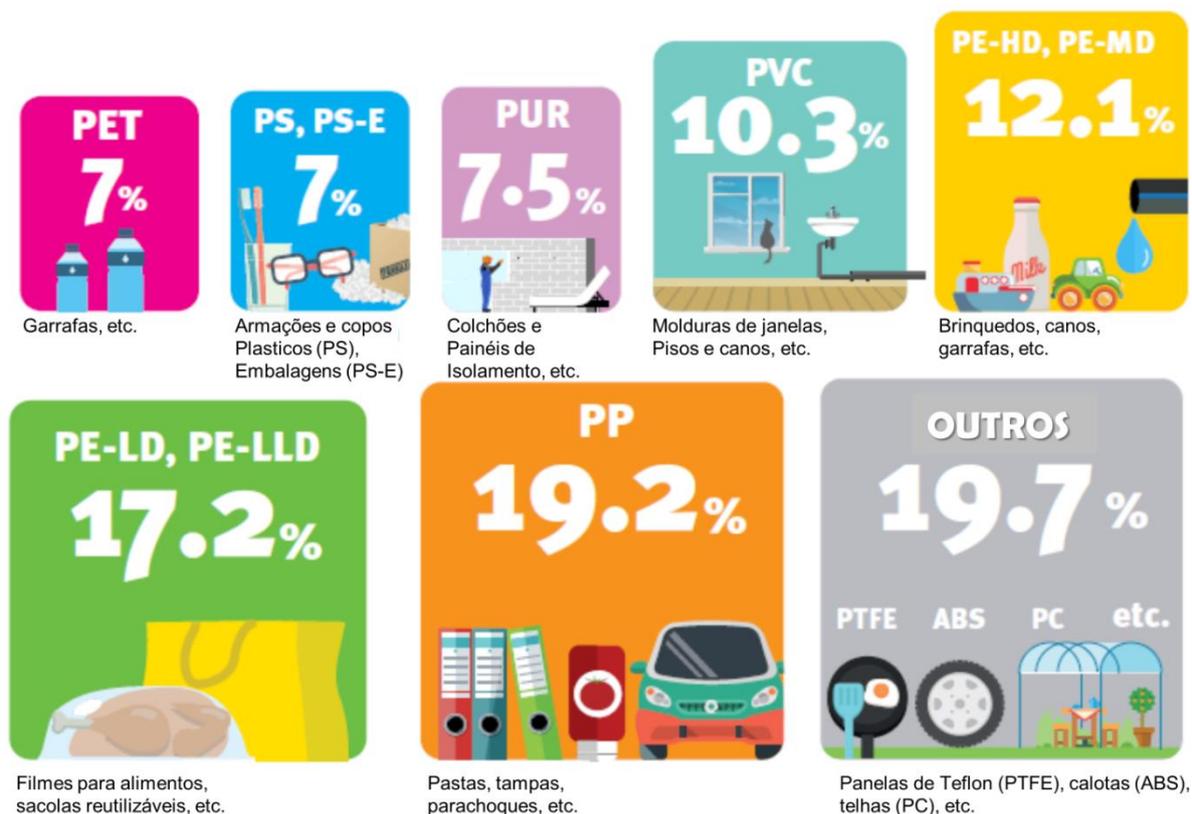
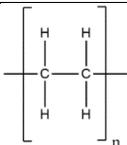
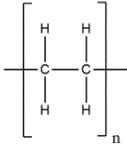
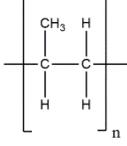
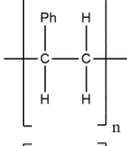
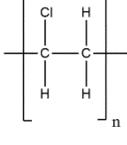
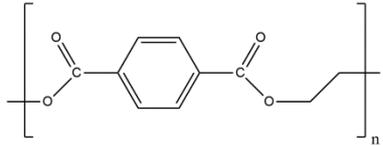
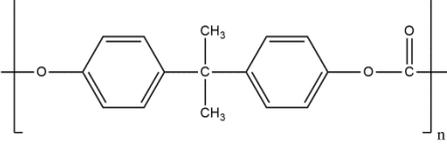
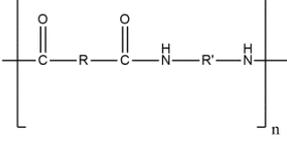
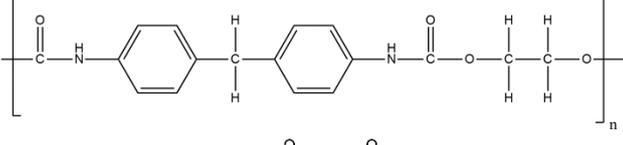
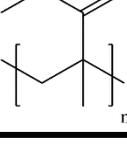


FIGURA 1.1 - Principais plásticos comercializados, suas principais aplicações e suas fatias de mercado em 2015 (PLASTICSEUROPE, 2015). PS-E: PS expandido; PE-HD, PE-MD: PEAD; PE-LD, PE-LLD: PEBD.

Os polímeros tão logo foram descobertos e desenvolvidos ocuparam uma importante fatia do mercado, pois são fáceis de serem trabalhados e, conseqüentemente, produzir itens em larga escala. Além disto, seus produtos apresentam características sempre desejadas em materiais estruturais, como seguros, higiênicos, inertes, quimicamente resistentes, leves, duráveis, passível de esterilização, grande resistência a impacto e a contaminação por micro-organismos, além de ser moldável de acordo com as características físico-químicas desejadas (SIDDIQUI e PANDAY, 2013; KUMAR *et al.*, 2014). Mas mesmo com toda essa variedade de uso e sua enorme produção mundial, estes materiais trazem consigo problemas inerentes a todas essas vantagens descritas, principalmente relacionadas às suas características de resistência e durabilidade.

TABELA 1.1 - Principais classes de polímeros comercializados atualmente e suas principais aplicações. Adaptado de (RODDY 2013; KOUSHAL *et al.*, 2014).

Polímero	Formula Molecular	Principais Aplicações
Polietileno de Alta Densidade(PEAD)		Embalagens (shampoo, produtos químicos, etc.)
Polietileno de Baixa Densidade (PEBD)		Sacolas e filmes plásticos
Polipropileno (PP)		Fibras, filamentos,
Poliestireno (PS)		Embalagens diversas
Poli (cloreto de vinila) (PVC)		Canos, molduras, insulação térmica
Polietileno tereftalato (PET)		Garrafas de água e bebidas carbonatadas
Polycarbonato (PC)		Componentes elétricos e materiais estruturais
Poliamidas (Nylon)		Tecidos para roupas e carpetes
Poliuretano (PUR)		Adesivos e resinas
Polimetilmetacrilato (PMMA)		Substituto ao vidro em diversas aplicações

## 1.2 - Problemas associados aos polímeros convencionais

A grande maioria dos polímeros existentes, principalmente os materiais de maior consumo no mercado, atualmente baseiam-se em monômeros derivados da indústria petroquímica. Entretanto, a utilização em excesso deste tipo de recurso leva a desequilíbrios graves na biogeoquímica ambiental e na ecologia, levando a problemas de dimensões mundiais, como exploração de recursos fósseis e produção de grande quantidade de resíduos não biodegradáveis (BROWNE *et al.*, 2015).

O uso contemporâneo de recursos fósseis para a produção de polímeros acarreta no desenvolvimento de problemas associados ao acúmulo de resíduos de carbono e outros gases que acentuam o efeito estufa, que levam inevitavelmente ao aquecimento global. Este problema advém da junção da sua alta pegada de carbono durante seu ciclo produtivo, somado ao fato destes materiais serem utilizados durante um curto espaço de tempo, sendo posteriormente descartados ou incinerados, ambas as situações causando impactos ao ambiente devido à sua enorme recalcitrância (OECD 2013; RODDY, 2013). Sendo assim, o carbono lentamente acumulado durante milhões de anos está sendo novamente inserido no ambiente, na forma de materiais recalcitrantes e nocivos como resíduos plásticos e CO<sub>2</sub>.

Não há uma maneira totalmente segura de dispor de plásticos convencionais e seus resíduos pré- e pós-produção, tornando-os um grave problema durante toda a cadeia produtiva, desde a fabricação, uso e descarte. A natureza físico-química dos plásticos acaba sendo o motivo pelo qual estes não são degradados na natureza. As cadeias poliméricas dos materiais tradicionais são muito longas e bem empacotadas para serem afetadas por processos naturais ou biológicos, persistindo no ambiente por muito tempo após a utilização do material (KOUSHAL *et al.*, 2014).

Duas alternativas são aceitas no presente momento para uma “correta” disposição de resíduos plásticos. A reciclagem, apontada como uma solução para algumas classes, porém, não apresenta alta eficiência, pois estimativas indicam que apenas cerca de 7% do montante possível está sendo reciclado (BAGHERIASL, 2012),

sendo este montante muito dependente de políticas de incentivo, restrita apenas a países com elevado potencial de desenvolvimento. A incineração de plástico se apresenta como uma alternativa viável ao menos do ponto de vista energético, já que o poder calorífico do material se assemelha ao de outros produtos derivados do petróleo (BRAUNEGG *et al.*, 2004), contudo, não se pode desconsiderar a entrada de CO<sub>2</sub> fixado a milhares de anos artificialmente no ciclo de carbono natural, provocando um desequilíbrio ambiental, além de outros possíveis contaminantes tóxicos derivados da estrutura química dos diversos polímeros utilizados atualmente. Além disso, durante a produção e disposição destes materiais podem ser produzidos xenobióticos de alto impacto ambiental, conhecidos como poluentes orgânicos persistentes (POPs), que recebem este nome justamente por serem extremamente recalcitrantes e tóxicos, como cloreto de vinila, dioxinas e furanos policlorados (PCDF/PCDD), ftalatos, bisfenol-A, etc. (KOUSHAL *et al.*, 2014).

Outro ponto a ser considerado se refere a existência de uma quantidade cada vez maior de microplásticos, fragmentos minúsculos de materiais semi-degradados, que apresentam desdobramentos sobre ecossistemas aquáticos como, por exemplo, o marinho. Pedacos milimétricos são constantemente confundidos com presas e ingeridos acidentalmente por vertebrados como peixes, aves, répteis e mamíferos, resultando em obstrução e mau funcionamento do sistema digestivo, eventualmente levando esses animais a morte (GREGORY, 2009; WAGNER *et al.*, 2014b). Resíduos microscópicos por sua vez, podem atuar como acumuladores tróficos, carregando contaminantes antropogênicos e microbiológicos a habitats não naturais, difundindo contaminantes em velocidade superiores as convencionais e aumentando o impacto ambiental causado por estes materiais (ROCHMAN *et al.*, 2013; ZETTLER *et al.*, 2013).

Por estes motivos, há a necessidade de repensar o rumo do desenvolvimento, alternando para estratégias que independam de recursos fósseis e que minimizem o impacto ambiental gerado pela produção destes materiais não naturais. Esta mudança passa pela descoberta e desenvolvimento de novos materiais e/ou tecnologias para manufatura-los bem como por uma mudança cultural com conscientização de diversos segmentos industriais para a implementação de produtos e políticas que se baseiem em recursos renováveis e ciclos naturais fechados.

### 1.3 - Soluções ambientalmente corretas para os polímeros tradicionais

Tecnologias recentes têm sido direcionadas para a produção de materiais poliméricos menos agressivos ao meio ambiente. Hoje em dia o mercado de polímeros encontra uma situação de pleno crescimento, impulsionado pelas evoluções no mercado de “bioplásticos”. Todavia esta terminologia é um tanto quanto subjetiva, podendo ser interpretada muitas vezes de forma ambígua, sendo atrelada a duas classes de materiais com características distintas sendo, *i*) polímeros biodegradáveis; e *ii*) polímeros biobaseados (TOKIWA *et al.*, 2009). Para garantir uma utilização correta destes termos, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) publicou uma recomendação de terminologias para a área, sendo as mais importantes destacadas na Tabela 1.2 (VERT *et al.*, 2012).

TABELA 1.2 - Recomendação da IUPAC sobre terminologias relacionadas a polímeros e suas aplicações (VERT *et al.*, 2012)

Termo	Significado
Macromolécula	Molécula de alta massa molar feita com múltiplas repetições de pequenas moléculas
Biomacromolécula	Macromoléculas produzidas por organismos vivos
Polímero	Substância composta de macromoléculas
Biopolímero	Substância composta de biomacromoléculas
Biopolímero Sintético	Cópia de um biopolímero, feita pelo homem por rotas abióticas
Polímero Artificial	Polímero feito pelo homem que não seja um biopolímero
Biomassa	Sistemas vivos e coleções de substâncias orgânicas produzidas por sistemas vivos, exploráveis como materiais aplicados
Polímero Biobaseado	Composto ou derivado, total ou em parte, de produtos biotecnológicos derivados de biomassa
Bioplástico	Polímero biobaseado que pode ser moldado em alguma parte do processo
Polímero Biodegradável	Polímero que pode ser degradado pela ação do ambiente, como ar, luz, calor ou micro-organismos

A Figura 1.2 ilustra as diferenças encontradas entre cada tipo de polímero, e seus principais representantes dentre os materiais conhecidos atualmente.

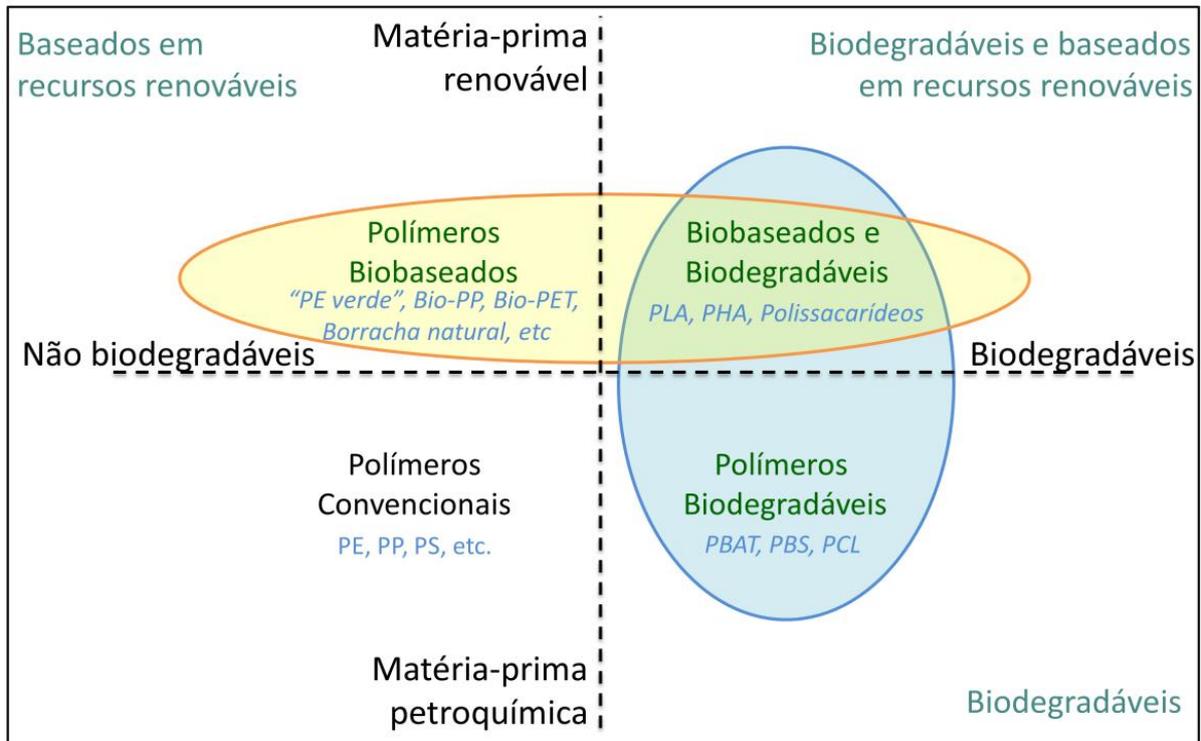


FIGURA 1.2 -Tipos de polímeros produzidos industrialmente. Adaptado de PHILP, 2013.

Os polímeros biodegradáveis podem ser produzidos a partir de monômeros derivados da indústria petroquímica, porém, apresentam uma estrutura passível de biodegradação, que pode ocorrer de maneira abiótica através da exposição à luz, umidade, vento e calor, bem como por rotas bióticas por ação de enzimas e micro-organismos, ou ambas. Esses materiais possuem uma estrutura química que permite uma rápida assimilação do material pelo meio ambiente, minimizando o impacto causado pelo descarte de plásticos. Quando exposto a agentes físicos e/ou comunidades microbianas de um determinado ambiente como, por exemplo, solo, lodo ou água, polímeros biodegradáveis e biopolímeros são biotransformados, podendo ser completamente mineralizados a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e outros compostos. Enzimas secretadas extracelularmente e/ou fenômenos como luz, calor e umidade atacam o esqueleto químico dos polímeros, levando a produtos de

degradação de baixa massa molecular, que podem ser assimilados por células microbianas para serem usadas como fonte de carbono e energia (Figura 1.3) (REHM, 2010). Uma distinção importante de se fazer é que um polímero biodegradável é degradável, enquanto que um polímero degradável não é necessariamente biodegradável (VERT *et al.*, 2012). Pode-se correlacionar a capacidade de biodegradação com a existência de certos grupos funcionais de maior labilidade frente a hidrólise, e sendo assim, de uma maneira geral poliésteres, poliamidas, poliuretanas, polianidridos, poliacetais e polímero com substituintes polares podem ser susceptíveis a processos de degradação, em diferentes faixas de tempo (LUCKACHAN e PILLAI, 2011).

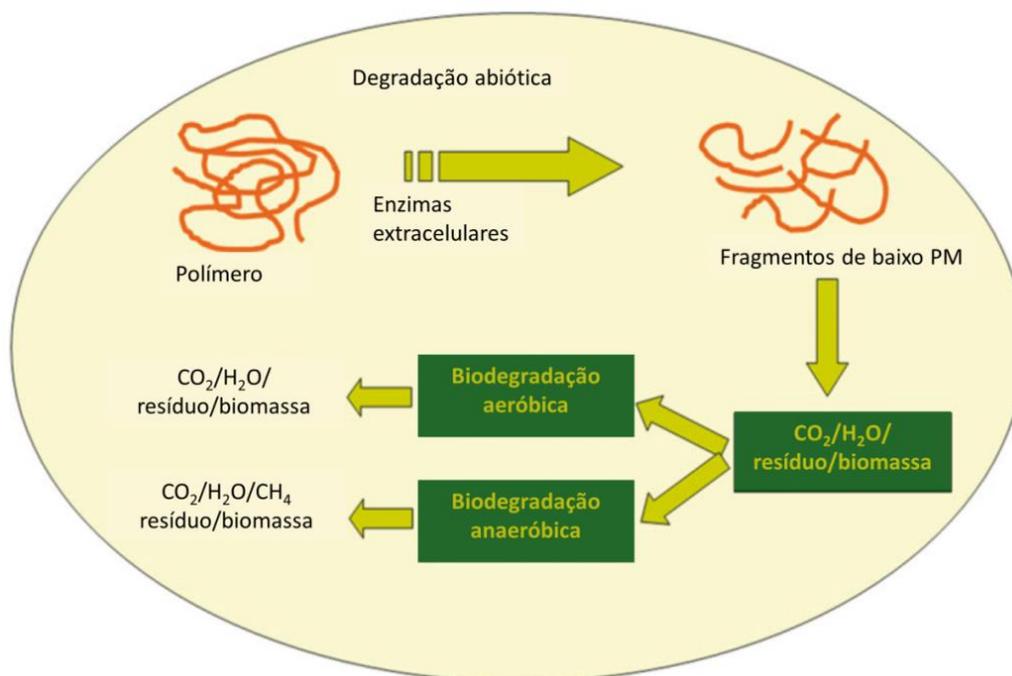


FIGURA 1.3 - Esquema de biodegradação de polímeros no ambiente. Adaptado de LUCKACHAN e PILLAI, 2011.

Os polímeros biodegradáveis ainda não apresentam grande penetração nos mercados mais tradicionais, porém tiveram grande aceitação na área de materiais descartáveis. Dentre os polímeros biodegradáveis oriundos de recursos não-renováveis de maior destaque podem ser citados a poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), poli-succinato de Butileno (PBS), poli-succinato de etileno (PES), poli (butileno-adipato-tereftalato) (PBAT), entre outros (VROMAN e TIGHZERT, 2009).

Os polímeros biobaseados são aqueles que apresentam estrutura química similar aos compostos derivados de petróleo, porém a matéria-prima utilizada para a fabricação deste material é total ou parcialmente proveniente de fontes renováveis, sendo o principal substrato a biomassa derivada de resíduos agroindustriais (BABU *et al.* 2013). A biomassa oferece uma fonte de carbono proveniente da biosfera como uma alternativa para o carbono fossilizado. Qualquer material biológico que cresça e esteja disponível pode ser classificado como biomassa, incluindo plantações, árvores, subprodutos animais e humanos, resíduos industriais e qualquer outro material biológico com capacidade de ser reabastecido em um curto espaço de tempo (RODDY, 2013). Este material passa por uma ou mais etapas de transformação para a obtenção de pequenas “moléculas de plataforma”, que podem ser inseridas em processos industriais existentes sem necessidade de modificação da rota (PERLATTI *et al.*, 2014). O uso deste substrato como fonte de matéria-prima em teoria reduz a pegada de carbono e a emissão de gases nocivos, quando se considera que o material vegetal utilizado para obtenção do material de partida utilizou parte destes componentes, especialmente CO<sub>2</sub>, para seu desenvolvimento enquanto viva (MÜLHAUPT, 2013; SHELDON, 2014). Apesar de o mercado apresentar atualmente capacidades similares em utilização para ambas as classes (Figura 1.4), vários fatores estão levando a um desenvolvimento rápido da indústria de biobaseados no mundo.

Todavia, desde o início da segunda década do Século XXI se observa uma mudança de paradigma, onde a pesquisa e desenvolvimento estão mudando de novos polímeros biodegradáveis para obtenção de produtos de partida oriundos de matéria-prima renovável (Figura 1.5), mas que produzam polímeros de estrutura química idêntica aos convencionais, o que se torna conveniente visto não ser necessária modificações em linhas de produção e conhecimento de aplicação. Além disso, uma combinação de benefícios ambientais, econômicos e sociais atrelados ao uso de matéria-prima renovável não derivada de petróleo são utilizados como propaganda, especialmente numa época pós-crise onde alternativas aos métodos tradicionais foram definidos como rota de escape (OECD, 2013).

### Produção global de bioplásticos - 2014

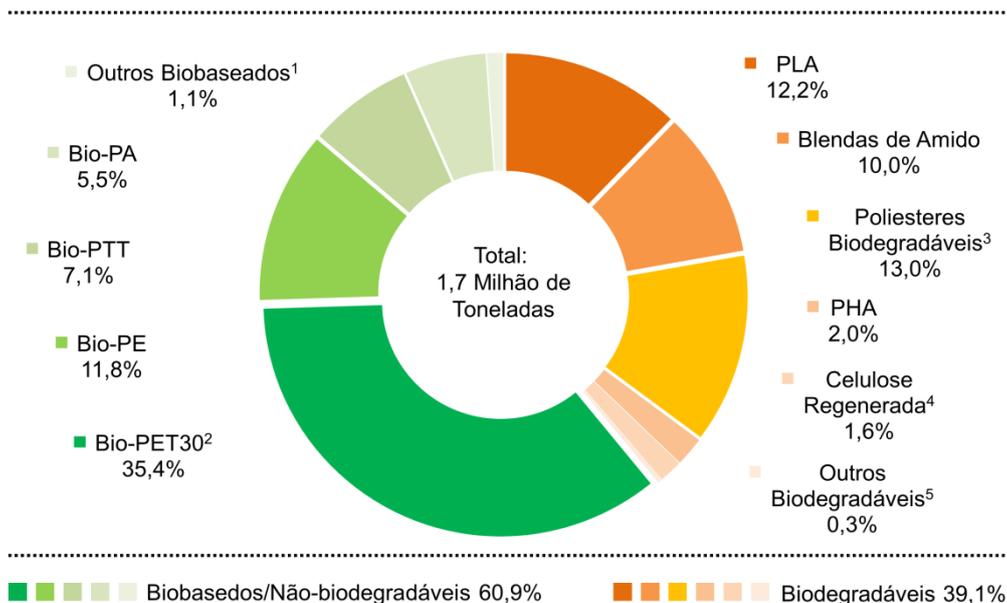


FIGURA 1.4 - Capacidade global de produção de bioplásticos em 2014 por tipo de material. Adaptado de EUROPEAN BIOPLASTICS, 2016a. <sup>1</sup>Contém blendas de amido resistentes, Bio-PC, Bio-TPE, Bio-PUR (exceto termorrígidos). <sup>2</sup>Conteúdo biobaseados de até 30%. <sup>3</sup>Contém PCL, PBS e PBAT baseados em recursos fósseis. <sup>4</sup>Folhas de celulose hidratadas compostáveis. <sup>5</sup>Celulose esterificada biodegradável

### Capacidade global de produção de bioplásticos

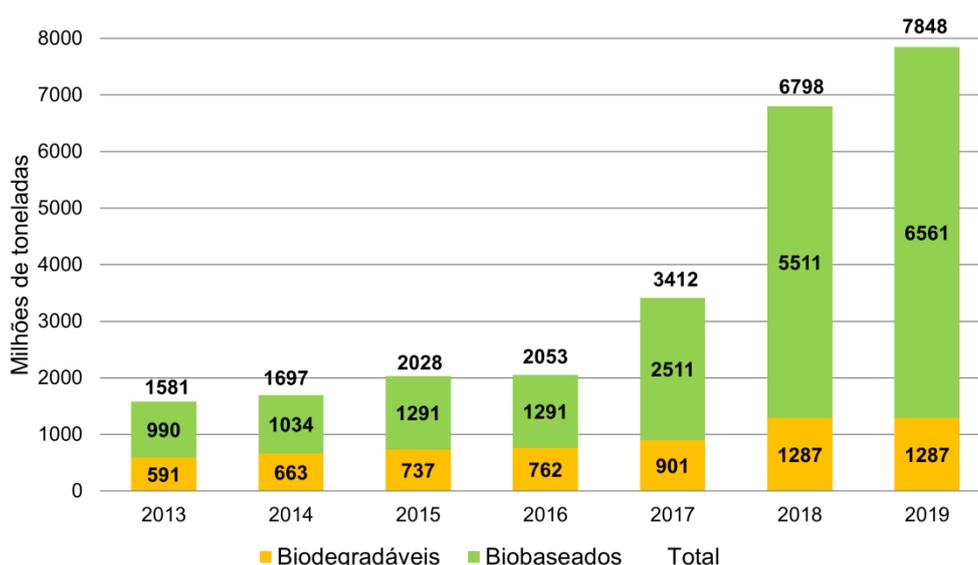


FIGURA 1.5 - Capacidade global de produção de bioplásticos, produção consolidada até 2015 e estimativas até 2019. Adaptado de EUROPEAN BIOPLASTICS, 2016b.

Entretanto, é importante salientar que uma vez produzido o polímero “verde”, eles apresentam os mesmos problemas relacionados com os polímeros petroquímicos convencionais no que tange a geração de resíduos e outros problemas ambientais já descritos. A própria definição de “biobaseado” (*bio-based*) da IUPAC ressalta que “um polímero biobaseado ou dispositivo polimérico não é necessariamente ambientalmente amigável, nem biocompatível, nem biodegradável, especialmente se possuir estrutura que remeta a polímeros baseados em petroquímicos” (VERT *et al.*, 2012).

O mercado de polímeros biobaseados apresenta diversos exemplos de sucesso recente, sendo a sua vasta maioria baseada em precursores derivados do etanol, como a produção de Bio-PE, Bio-PP e Bio-PET por empresas como Dow, Braskem e Solvay, através de uma rota que utiliza a molécula de etanol para formação dos precursores sintéticos (etileno, propileno e etileno glicol, respectivamente) para produção dos polímeros (PERLATTI *et al.*, 2014). Um dos grandes momentos de estímulo deste recente mercado se deu por conta do desenvolvimento de rotas para produção de Bio-PET pela Coca-Cola em 2009, com aceitação instantânea pelo mercado (REN *et al.*, 2015). O caso de Bio-PET é emblemático, pois por ser um heteropolímero, contendo 32% em massa de etileno glicol e 68% em massa de ácido tereftálico. Durante os primeiros anos era comercializado como sendo um material que continha até 30% Bio-PET, sendo que esta designação pode levar a compreensões erradas, uma vez que não existia esta porcentagem de um material completamente biobaseado, e sim 30% de componentes químico oriundos da biomassa no polímero. Durante os últimos anos muitos esforços foram direcionados para obtenção de rotas renováveis para a produção sustentável do outro monômero e, numa parceria entre Coca-Cola e a empresa Virent, o bio ácido tereftálico (Bio-PTA) foi obtido de biomassa através da oxidação de *p*-xileno obtido de biomassa, possibilitando em 2015 a primeira demonstração em escala industrial de garrafas PET 100% biobaseado (PANG *et al.*, 2016).

Apesar de ambos os polímeros, biobaseados e biodegradáveis, possuírem novos atributos que os tornam melhores de um ponto de vista ambiental quando comparados aos tradicionais polímeros baseados em matéria-prima proveniente da indústria petroquímica, ainda sim apresentam algum problema

ambiental associado ao seu desenvolvimento e aplicação. Por este prisma, a existência de polímeros que apresentem ao mesmo tempo as características de biobaseado e biodegradável consiste na melhor alternativa para um material de menor impacto ambiental, tanto para sua produção quanto para sua disposição. A Figura 1.6 ilustra todo o ciclo da cadeia produtiva das classes de polímeros, diferenciando a rota dos não renováveis e o ciclo dos materiais renováveis.

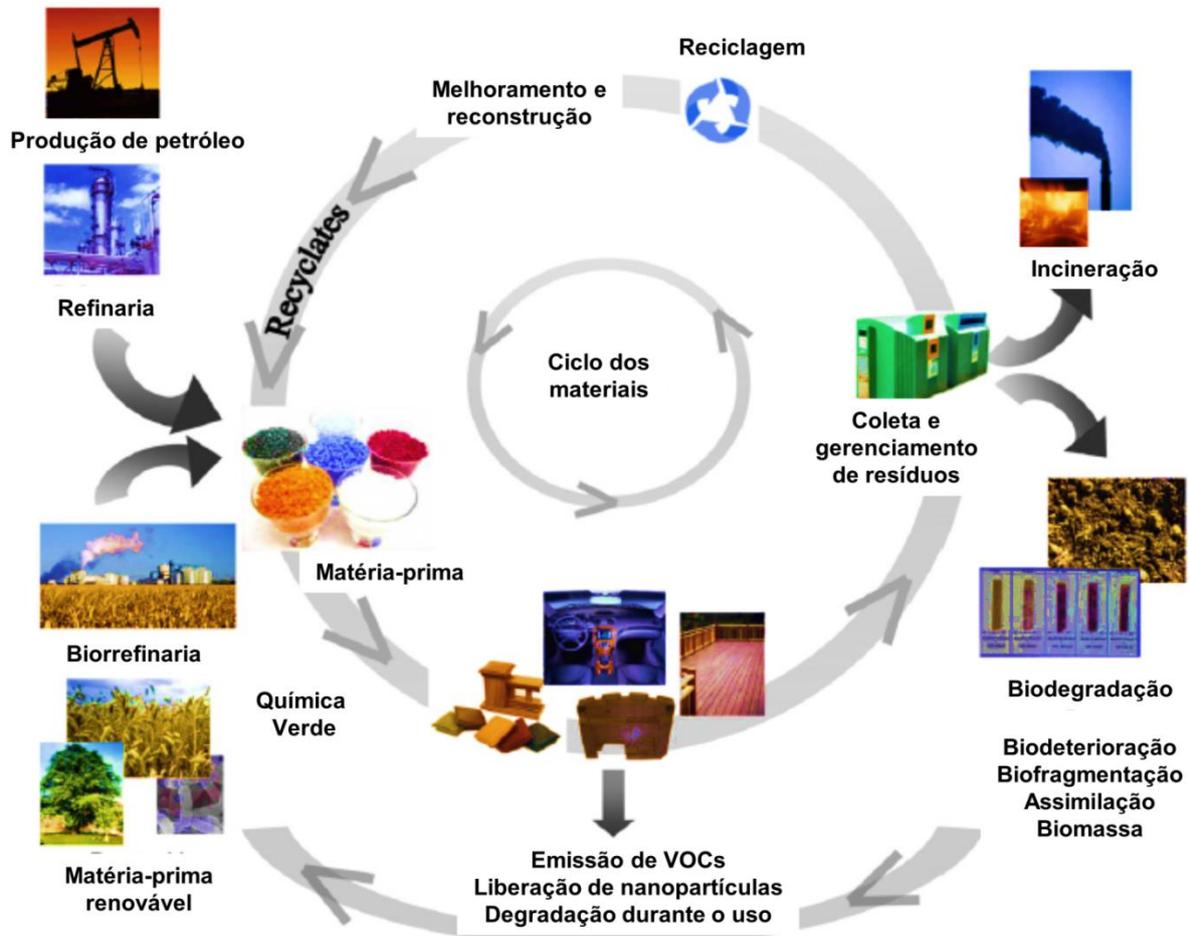


FIGURA 1.6 - Ilustração dos processos produtivos na cadeia polimérica com relação a matéria-prima e o destino após uso (VILAPLANA *et al.*, 2010).

Embora a produção de polímeros ao mesmo tempo biobaseados e biodegradáveis seja de grande importância para minimizar de melhor forma os impactos ao meio-ambiente pré- e pós-utilização, fatores comerciais como o alto custo de produção e beneficiamento dos polímeros desta classe, e a necessidade de criação de novos mercados devido às novas estruturas químicas presentes fazem

com que a indústria se torne reticente a busca por novas tecnologias (ELVERS *et al.*, 2016). Sendo assim, existe uma necessidade de aumento da competitividade no processo produtivo destes materiais, bem como a criação de demanda de mercado para estes novos polímeros, impulsionando a descoberta de tecnologias e metodologias que permitam a exploração destes compostos em escala comercial de maneira competitiva. Para tanto, diversas estratégias podem ser efetivamente desenvolvidas.

Dentre os possíveis caminhos presentes atualmente que apresentam relativo *know-how* e a possibilidade de rápido escalonamento para atender uma crescente demanda de mercado de biopolímeros, uma fonte que chama a atenção pela versatilidade e capacidade de obtenção de uma ampla gama de produtos, e que vem se destacando por resultados extremamente positivos é a utilização de micro-organismos, entre eles bactérias (REHM, 2010). O uso de bactérias chama a atenção por sua capacidade de serem cultivadas em biorreatores em processos biotecnológicos (*batch* ou *on-line*) para a obtenção de biopolímeros e polímeros biodegradáveis podendo ser competitivos, do ponto de vista de aplicação e de produção, quando comparados às opções atuais de mercado.

#### **1.4 - Aplicação biotecnológica de bactérias, com ênfase em biopolímeros**

O ser humano utiliza-se de processos biotecnológicos como fermentação desde aproximadamente 7.000 a.C., na produção de alimentos como pão e cerveja, considerada essencial no desenvolvimento da raça humana. As primeiras tentativas de explicar sua fenomenologia foram baseadas no engenhoso conceito de geração espontânea elaborado por Aristóteles que persistiu por mais de 2.000 anos (BEM-MENAHEM, 2009).

O pensamento racional acerca da existência de micro-organismos envolvidos no processo iniciou-se em 1665 pelas primeiras observações obtidas através de avanços no desenvolvimento de microscópios, sobretudo por Antonie Van Leeuwenhoek e Robert Hooke (GEST, 2004). Porém, foi apenas no século XIX que Louis Pasteur demonstrou de maneira inequívoca a existência de seres

microscópicos responsáveis pela transformação química e biológica dos materiais frescos (BOURDICHON *et al.*, 2012). Até a primeira guerra mundial, apenas o etanol era produzido em escala comercial, contudo a partir do começo do século XX, tecnologias relacionadas à produção microbiana de biomoléculas como enzimas, antibióticos, metabólitos, polímeros, etc., foram se desenvolvendo consideravelmente (CHOJNACKA, 2009). Atualmente, micro-organismos são utilizados para produção de uma ampla variedade de produtos de interesse comercial tais como pesticidas, fertilizantes, aditivos alimentares, fármacos, combustíveis e, em especial biopolímeros. Estas aplicações permitiram um grande desenvolvimento no mercado global, sendo estimado em 250 bilhões de dólares em 2013 (ÖNER, 2013).

Na natureza, os biopolímeros são componentes do processo de desenvolvimento dos micro-organismos. Apresentam papéis importantes na manutenção da viabilidade celular pelo acúmulo de nutrientes, pela proteção a certos fatores abióticos e no reconhecimento intra- e interespecífico (ÖNER, 2013). A primeira descoberta, isolamento e caracterização química confiável de um polímero bacteriano foi feita em meados do século XIX, quando Louis Pasteur identificou a dextrana como sendo um produto de origem microbiana em vinho (PASTEUR, 1861). Desde então, diversos polímeros de origem microbiana têm sido amplamente estudados, alguns até com aplicações comerciais e produção em escala industrial. A tabela 1.3 apresenta alguns dos polímeros microbianos.

Por serem de origem natural e oriundo de organismos vivos, estes biopolímeros tendem a ser também biodegradáveis, pois apresentam anabolismo e catabolismo naturalmente mediado por suas próprias rotas enzimáticas, tornando-os alternativas interessantes para materiais utilizados em grande escala e/ou em aplicações descartáveis. Ademais, polímeros microbianos são constituídos de moléculas naturais não tóxicas consideradas inerentemente biocompatíveis, qualidade esta que permitiu aplicações destes polímeros como armação ou matriz para engenharia de tecidos, curativos ou para dispositivos de liberação seletiva e controlada de fármacos (TANAKA *et al.*, 2015). Alguns destes polímeros são gradativamente degradados *in vivo*, tornando-os bem adequados para aplicações de entrega de fármacos e reposição de tecidos.

TABELA 1.3 - Polímeros produzidos por micro-organismos. Adaptado de REHM, 2010

Classe/Polímero	Estrutura Primária	Componentes	Produtores	Aplicações industriais
<b>Poliamidas</b>				
Cianoficina	Heteropolímero constituído de dipeptídeos	Aspartato e arginina	Cianobactéria, <i>Acinetobacter</i> spp. e <i>Desulfitobacterium</i> spp.	Dispersante e amolecedor de água
Poli- $\gamma$ -glutamato	Homopolímero	Glutamato	<i>Bacillus</i> spp., <i>Fusobacterium nucleatum</i> , e <i>Natrialba aegyptiaca</i>	Substituto de poliacrilato, espessante, umectante e cosmético
<b>Polianidrido</b>				
Polifosfato	Homopolímero	Fosfato	Bactéria e Archaea	Intensificador de sabor
<b>Poliéster</b>				
Polihidroxi-alcanoatos	Heteropolímero	( <i>R</i> )-3-hidroxiácidos	Bactéria e Archaea	Bioplástico, biomaterial p/ aplicações médicas
<b>Polissacarídeos</b>				
Alginato	Heteropolímero $\beta$ -(1,4)-ligado	Ácido Manurônico e Ácido Gulorônico	Algas, <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Azotobacter</i> spp.	Biomaterial para engenharia de tecido e entrega controlada de fármacos
Curdiana	Homopolímero $\beta$ -(1,3)-ligado	Glicose	<i>Agrobacterium</i> spp., <i>Rhizobium</i> spp. e <i>Cellulomonas</i> spp.	Aditivo de comida como espessante, estabilizante ou gelificador
Ácido Hialurônico	Heteropolímero $\beta$ -(1,4)-ligado	Ác. Glucorônico e N-acetil Glucosamina	<i>Streptococcus</i> spp. e <i>Pasteurella multocida</i>	Cosméticos, reparo de tecidos humanos e entrega de fármacos

Quando se faz a comparação entre polímeros microbianos e polímeros não renováveis baseados em petróleo, o custo de produção se torna um parâmetro crucial. Os custos de produção podem ser atrelados ao valor da matéria-prima, ao rendimento do polímero relativo à quantidade de fonte de carbono fornecida, assim como as etapas subsequentes do processamento como diversos processos de separação de biomassa e purificação do polímero, que são delineadas pela aplicação final do produto (RHEM, 2010). Entretanto, biopolímeros derivados de recursos naturais apresentam vantagens competitivas devido a sua produção sustentável usando recursos renováveis, sua biodegradabilidade, e muitas vezes, a sua biocompatibilidade.

Dentre algumas soluções para aumentar a viabilidade do processo e produção de biopolímeros, uma das mais promissoras é a redução do custo da matéria prima, com o uso de uma ampla diversidade de materiais considerados resíduo ou subproduto de processos já estabelecidos, que podem ser elencados a condição de matéria-prima renovável para a produção destes produtos finais se inserido dentro do processo. A grande maioria destes subprodutos é derivada diretamente da agricultura ou de processos industriais resultantes do beneficiamento destes produtos agrícolas (SOLAIMAN *et al.* 2006).

Outro ponto a ser considerado é a utilização de organismos que possuam alta eficiência na conversão destes substratos em produtos de interesse biotecnológico. É comum encontrar a produção de um ou mais tipos de biopolímeros em qualquer espécie bacteriana estudada, porém apenas alguns poucos organismos apresentam uma capacidade metabólica para produção em volume economicamente viável. Sabe-se que as bactérias são os seres com mais ampla distribuição geográfica e populacional, sendo onipresentes em nosso planeta e virtualmente encontradas em todos os ambientes. Num trabalho publicado por WHITMAN *et al.* (2015), os autores descrevem que existem cerca de 12.000 espécies bacterianas identificadas. Contudo, SCHOLSS e HANDELSMAN (2004) estimam que o número de espécies existentes possa ser superior a um milhão, o que indica que uma grande quantidade de micro-organismos ainda estão fora do alcance de exploração biotecnológica.

Esta grande diversidade de procariotos pode ser muito bem constatada tanto qualitativa quanto quantitativamente quando se avalia as comunidades

microbianas presentes nos mais variados ambientes. A este coletivo de micro-organismos relacionados a um local dá-se o nome de microbioma (DILLON e DILLON, 2004). Pode-se observar uma grande variação no microbioma entre os diferentes locais em praticamente todo local, como ilustra a Figura 1.7.

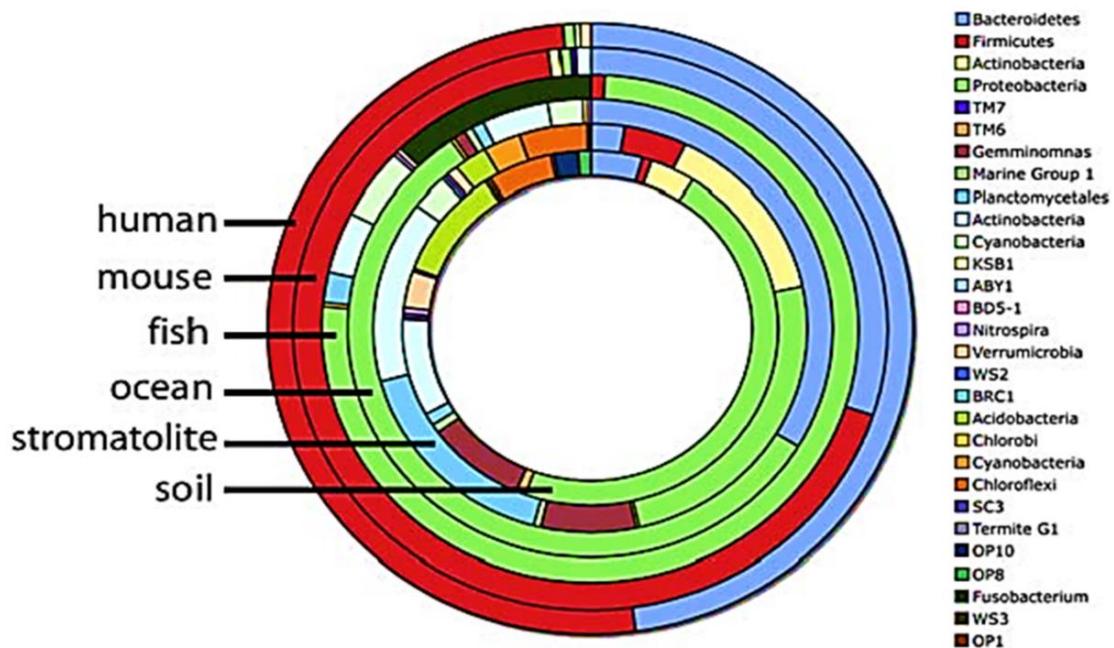


FIGURA 1.7 - Comunidades microbianas relacionadas a diversos ambientes (LEY *et al.*, 2006).

A pequena porcentagem de bactérias descritas e a riqueza encontrada nos mais diversos ambientes incentivam a exploração de novos locais, que podem nos levar ao isolamento de cepas de espécies conhecidas com excelente potencial, bem como novas espécies de organismos que inclusive sejam capazes de produzir novos materiais. Um ambiente que apresenta uma grande diversidade, bem como uma infinidade de indivíduos para serem avaliados, são os micro-organismos associados a animais superiores, tais como bactérias associadas ao trato digestivo de insetos.

## 1.5 - Bactérias do trato gastrointestinal como fonte de cepas com potencial biotecnológico

Simbiontes microbianos são onipresentes na natureza, apresentando um impacto significativo no desenrolar do desenvolvimento, evolução e diversidade dos seres eucariotos (RUBY *et al.*, 2004). Dentre as relações existentes, podem existir micro-organismos que desencadeiam efeitos danosos ou mesmo letais ao hospedeiro, conhecido como patógenos, relações onde o hospedeiro atua de forma inerte, como no caso de comensais, e relações onde existe um benefício mútuo para ambos, conhecida como mutualismo (DILLON e DILLON, 2004; HOSOKAWA *et al.*, 2006). Dentre todas as formas de interações interespecíficas, uma das mais elusivas e coesivas é a relação entre um hospedeiro superior e bactérias que habitam o interior de seu corpo. Essa relação tem sido muito estudada nos últimos anos, especialmente quando relacionada à microbiota humana e as doenças causadas por seu desequilíbrio (ENGEL e MORAN, 2013).

Os insetos, de maneira similar, são hospedeiros de diversas espécies de bactérias, que possuem diversas funções metabólicas importantes. A Figura 1.8 ilustra onde são encontrados os diversos tipos de simbiontes microbianos em insetos.

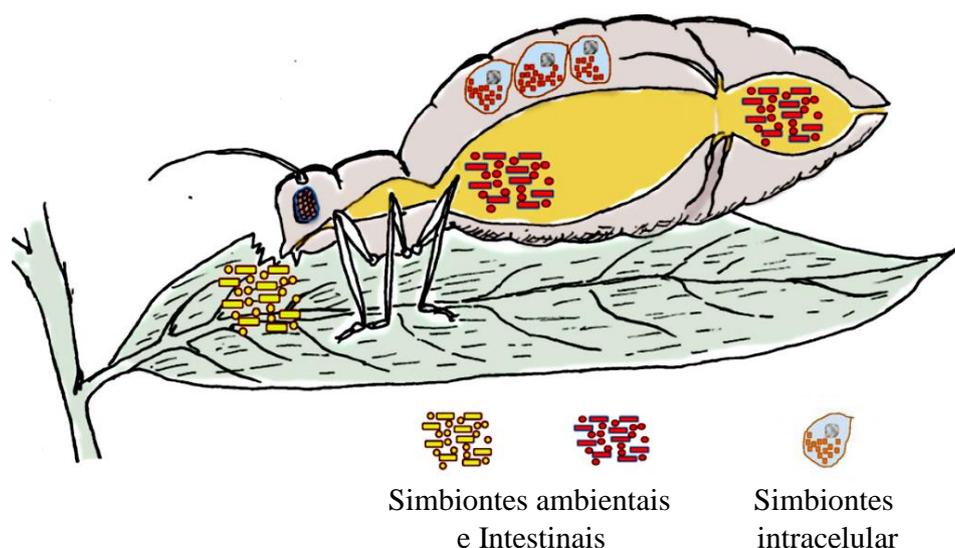


FIGURA 1.8 - Ilustração de associações possíveis entre insetos e micro-organismos. Adaptado de HANSEL e MORAN, 2014.

Existem associações entre insetos e micro-organismos muito bem estabelecidas, que envolvem transmissão vertical de cepas altamente correlacionadas com o hospedeiro que habitam células específicas (bacteriócitos), muitos que inclusive já passaram por redução genômica perdendo a sua capacidade de existir sem a presença do hospedeiro (AKMAN *et al.*, 2002; BAUMANN *et al.*, 2005; SABBRE *et al.*, 2012). Entretanto, o trato gastrointestinal de insetos tem sido descrito como uma das maiores fontes inexploradas de diversidade microbiana. Este ambiente transiente é o lar de inúmeras bactérias, que variam de comensais adquiridos por hábitos como alimentação, até cepas de presença constante e que estão envolvidas diretamente em processos biológicos relacionados a saúde e sobrevivência do inseto hospedeiro (KIKUCHI, 2009). Nestes casos, apesar de ocorrer alguma variação de espécie devido à influência do ambiente externo, a microbiota intestinal para os insetos é composta de uma comunidade central de acordo com o filotipo, o qual a identidade é determinada pelo hospedeiro e as condições ambientais (TANG *et al.*, 2012; PERNICE *et al.*, 2014).

RYU *et al.* (2008) demonstraram a importância de uma flora padrão estabilizada para o correto desenvolvimento e manutenção da saúde em *D. melanogaster*, sendo a capacidade dos micro-organismos de prover nutrientes essenciais a insetos que sobrevivem de fontes de alimentos restritas em algum tipo de nutriente especial, como no caso de dietas baseadas em seiva de plantas, sangue de vertebrados e material vegetal, o principal tipo de associação estudada (DOUGLAS, 1998; BOURTZIS e MILLER, 2003; MORAN, 2003; MACDONALD *et al.*, 2011). Ademais, diversos outros exemplos de associações fortuitas podem ser destacadas nas habilidades de insetos, adquiridas através de seus simbioses intestinais como, por exemplo, de tolerância a alta temperatura (MONTLLOR *et al.*, 2002), competência como vetores de transmissão (WEISS e AKSOY, 2011), especificidade e/ou abrangência de hábitos alimentares (LEONARDO e MUIRU, 2003; TSUCHIDA *et al.*, 2004; CHU *et al.*, 2013), produção de metabólitos de comunicação intra- e interespecífica (DILLON *et al.*, 2002; LEROY *et al.*, 2011), preferência de reprodução (SHARON *et al.*, 2010, 2011), resistência a vespas parasitoides (OLIVER *et al.*, 2005), fungos patogênicos (SCARBOROUGH *et al.*, 2005) e de produzir pequenas moléculas que suprimem patógenos ambientais, entre outras. Estes exemplos representam um vasto reservatório subexplorado de classes de compostos com atividade biológica (RAMADHAR *et al.*, 2014), mostrando que estes tipos de interação, após conhecida e

entendida, podem ser utilizadas como ponto de partida para manipulação dos insetos bem como na exploração de novas classes de substâncias.

Além das interações naturais descritas anteriormente, muitos insetos considerados insetos-praga por causarem extensivos danos a plantações comerciais apresentam simbiontes bacterianos aprimorados para auxiliar o inseto a driblar defesas naturais das plantas contra herbivoria, além de métodos antropogênicos de controle como rotação de cultura, inseticidas e plantas transgênicas (DOUGLAS, 2007; BRODERICK *et al.*, 2009; HERNANDÉS-MARTINÉZ *et al.*, 2010; KIKUCHI *et al.*, 2012; XIA *et al.*, 2013; GASSMANN *et al.*, 2014). CHU *et al.* (2013) mostraram que uma das piores pragas do milho em colheitas americanas, *Diabrotica virgifera*, não só foi capaz de usar bactérias intestinais para aperfeiçoar sua sobrevivência, como também foi capaz de recrutar novas cepas para lhe conferir a capacidade de adaptação a métodos de controle empregados pelo ser humano. Em apenas poucos anos, o inseto foi capaz de alterar até um terço de seu microbioma, se tornando resistente a rotação de culturas com soja, método até então considerado eficaz no manejo da praga (CHU *et al.*, 2013). Em outro exemplo, CEJA-NAVARRO *et al.* (2014) mostraram que o inseto *Hypothenemus hampei*, praga de plantações de café presentes em todo o globo foi capaz de driblar a defesa natural da planta através da detoxificação da cafeína, possuindo um núcleo microbiano permanente, independente do continente no qual foi coletado, porém, também possui uma variação de micro-organismos devido aos efeitos locais. Além disso, a capacidade microbiana do promover a detoxificação do composto oriundo do sistema de defesa vegetal se mostrou correlacionada com a intensidade de colonização por uma espécie de *Pseudomonas*, que também apresentou capacidade de biodegradação de cafeína *in vitro*. Para comprovar a simbiose entre os organismos, insetos tratados com antibióticos apresentaram maior susceptibilidade ao metabólito secundário da planta e, ao serem reinoculados com isolados bacterianos, os insetos adquiriram novamente sua habilidade de detoxificação (CEJA-NAVARRO *et al.*, 2014).

Estes exemplos claramente ilustram a diversidade metabólica e de espécies que podem ser observadas neste ambiente relativamente pouco explorado, porém que se apresenta como uma grande alternativa para a prospecção de novos organismos com potencial biotecnológico.

## 2 - Objetivos

### 2.1 - Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo principal a identificação dos micro-organismos associados ao inseto-praga *D. speciosa*, e a avaliação do potencial destes isolados como produtores de biopolímeros.

### 2.2 - Objetivos Específicos

- a) Identificação dos micro-organismos isolados de *D. speciosa*, utilizando técnicas genômicas de sequenciamento da região 16S rDNA e proteômica por MALDI-TOF MS.
- b) Investigação da classificação das espécies de micro-organismos pelas técnicas de identificação.
- c) Avaliação qualitativa da capacidade de produção de polihidroxialcanoatos pelos micro-organismos isolados utilizando o método fluorescente com corante Vermelho do Nilo.
- d) Avaliação quantitativa da produção de PHA pelos micro-organismos mais promissores selecionados na etapa qualitativa e caracterização analítica da composição monomérica de PHAs de interesse obtidos, por GC-MS, FTIR e NMR.
- e) Avaliação qualitativa da capacidade de produção de exopolissacarídeos pelos micro-organismos isolados utilizando o método do teste de ponto bacteriano.
- f) Avaliação quantitativa da produção de EPS pelos micro-organismos mais promissores selecionados na etapa qualitativa e caracterização estrutural do polímero por FTIR, SEC-UV-ELSD, GC-MS, MALDI-TOF MS e NMR.



### 3 - Materiais e Infraestrutura Gerais

#### 3.1 - Reagentes e Solventes

Água ultrapura ( $0,05 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) foi produzida *in loco* através de um sistema Master System 2000 da empresa Gehaka (São Paulo, SP, Brasil).

Acetona HPLC, acetonitrila LC-MS, ácido acético, clorofórmio HPLC, dimetilsulfóxido HPLC (DMSO), etanol HPLC, hexano HPLC, metanol HPLC e xileno foram adquiridos da marca J.T. Baker (Avantor, Center Valley, PA, EUA). Solventes grau PA foram obtidos por destilação previamente à utilização.

Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico ( $\alpha$ -CHCA), ácido D-galacturônico, ácido D-glucorônico, ácido etilenodiamino tetra-acético sal dissódico ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), ácido trifluoroacético (TFA), agarose, borodeutereto de sódio ( $\text{NaBD}_4$ ), borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), brometo de etídio, cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), cloreto de potássio (KCl), cloridrato de D-glucosamina, D-galactose, D-glicose, D-manose, D-xilose, iodometano ( $\text{CH}_3\text{I}$ ), L-arabinose, L-fucose, L-ramnose, mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), *N*-acetil-D-glucosamina, piridina ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ), preto do Sudão B, safranina, sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), *Taq* DNA polimerase, tris(hidroximetil) aminometano (Tris) e vermelho de Nilo foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), anidrido acético ( $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ), brometo de potássio (KBr), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), cloreto de sódio (NaCl), fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato dissódico heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) foram adquiridos na Synth (Diadema, São Paulo, Brasil).

*Orange DNA Loading Dye* e *O'Gene Ruler 1Kb* foram comprados da empresa Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA)

O kit para extração de DNA *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*, e o kit para purificação de produtos de PCR *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* foram fornecidos pela empresa Promega, (Madison, WI, EUA).

Os meios de cultura “Nutriente-Ágar” (NA) e “Caldo Nutriente (CN)” bem como extrato de carne, extrato de levedura e peptona G foram adquiridos da empresa Hi-Media (Mumbai, Índia) e utilizados conforme descrição do fornecedor.

### **3.2 - Instrumentação**

#### **a) Laboratório de Microbiologia**

Os experimentos de microbiologia foram realizados no Laboratório de Bioensaios, parte integrante do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar. O laboratório conta com balança analítica de dupla escala AUW-220D Shimadzu, Quioto, Japão), autoclave vertical 30L (Prismatec, Itu, SP, Brasil), câmara de fluxo laminar Bioseg 09 (VECO, Campinas, SP, Brasil), incubadora para B.O.D. 411/FPD 86 (Nova Ética, Vargem Grande do Sul, SP, Brasil), incubadora com agitador orbital com controle de temperatura e fotoperíodo, e capacidade para 16 frascos de até 500 mL (Nova Ética) e freezer vertical -80°C MDF-U56VC (Sanyo, Osaka, Japão). Todas as manipulações de micro-organismos foram realizadas dentro de fluxo laminar previamente esterilizado com solução aquosa de etanol 70% (v/v) e radiação UVB. Todos os meios de cultura foram feitos pela mistura dos componentes e esterilização por autoclave, por 20 minutos a 121 °C. Todos os cultivos foram realizados a 28°C em ausência de luz, na tentativa de mimetizar condições de temperatura e luminosidade do ambiente de onde as bactérias foram isoladas.

#### **b) Espectrofotômetro de Microvolume**

Para a quantificação do DNA extraído, foi usado um espectrofotômetro UV/Vis de microvolume modelo BioSpec-nano (Shimadzu, Quioto, Japão). A leitura foi conduzida de 200 a 400 nm, utilizando-se 2 µL de solução.

#### **c) Termociclador**

Para a realização das reações em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizado um termociclador Bio-Rad T100 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

d) Eletroforese em gel

Para a realização das corridas de eletroforese, foi utilizada uma cuba horizontal Digel DGH14, 14x14cm, com uma fonte Kasvi K33-300V (Curitiba, PR, Brasil)

e) Eletroforese Capilar para sequenciamento de DNA

O serviço de sequenciamento dos fragmentos produzidos pela reação de PCR dos isolados bacterianos foi realizado junto ao Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e células-tronco (CEGH-CEL), ligado ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). Para o sequenciamento, foi utilizado um equipamento de Eletroforese Capilar Applied Biosystems 3730 DNA Analyser, (ABSciex, Framingham, MA, EUA), com colunas capilares POP7, e para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* com marcadores fluorescentes para cada nucleotídeo.

f) Softwares e banco de dados para tratamento de dados de bioinformática

Para o tratamento dos dados gerados pelo sequenciamento foram utilizados os seguintes softwares: 1) Para a avaliação da qualidade e da sequência de nucleotídeos de DNA dos fragmentos de PCR, obtidas por sequenciamento, foi utilizado o software BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA; <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>); 2) Para a identificação das bactérias foi feita pela comparação da sequência obtida com a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - EUA) através do uso do algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>); 3) Para alinhamento das sequências e construção do dendrograma, utilizou-se o software ClustalX v. 2.1 (Conway Institute University College Dublin, Dublin, Irlanda; <http://www.clustal.org/clustal2>); 4) Para visualização e edição da árvore filogenética, foi utilizado o software FigTree v. 1.4.2 (Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology Group, Universidade de Edinburgo, Edinburgo, Escócia; <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

g) Centrífuga

Todo o desenvolvimento do trabalho foi realizado utilizando uma centrífuga Eppendorf 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com rotores FA-45-30-11 (Rotação Máxima: 20817 x g) F-34-6-38 (Rotação Máxima: 18500 x g) e A-4-81 (Rotação Máxima: 3220 x g), com capacidade para tubos de 2 mL, tubos plásticos de 15 mL ou 50 mL, e frascos de 500mL respectivamente.

h) Liofilizador

Para a secagem de amostras aquosas foi utilizado um liofilizador E-C Modulyo (E-C Apparatus Inc. EUA, atualmente Thermo Fisher, Carlsbad, CA, EUA) com 8 saídas, onde podem ser encaixados balões de fundo redondo ou então adaptadores para frascos de vidro de 500 mL.

i) Secagem de amostra e reações de derivatização

Para secagem de amostras orgânicas e também para a realização de reações de derivatização foi utilizado um bloco de aquecimento Techne DriBlock DB-3A (Bibby Scientific Ltd., Stone, Staffordshire, Reino Unido), com suporte para 36 tubos de ensaio de 13 mm e secagem por fluxo de ar comprimido ou nitrogênio (2 psi).

j) Espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser assistida por matriz acoplada a um analisador por tempo de voo (MALDI-TOF MS)

Os experimentos de MALDI-TOF MS foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos (LaBioMMi), e o Prof. Dr. Douglas Ferreira. O equipamento usado foi um Bruker AutoFlex (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha), usando um laser de nitrogênio (355nm) em uma frequência de 1 kHz, sendo os espectros adquiridos e manipulados utilizando-se o pacote de *software* FlexControl v 3.3 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha), no modo automático de aquisição de dados.

k) Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um IR Prestige-21 (Shimadzu, Quioto, Japão) com a avaliação no modo de transmitância em uma faixa de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com o acúmulo de 32 varreduras por amostra. Antes de cada análise foi realizada uma análise da atmosfera (branco) para ajuste do espectro obtido. Para o tratamento de dados foi utilizado o *software* IR Solution (Shimadzu).

l) Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

As análises de GC-MS foram realizadas em um cromatógrafo modelo QP 2010 Plus hifenado a um analisador de massas triplo quadrupolo TQ-8030 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Para injeção automática foi usado um amostrador automático AOC 5000 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Como gás de arraste utilizou-se hélio 5.0 (99.9995%) (White Martins, São Carlos, SP, Brasil). Os dados foram avaliados pelo uso da suíte do *software* GCMS Solution (Shimadzu, Kyoto, Japão).

m) Cromatografia de Exclusão de Tamanho com detecção por ultravioleta e espalhamento de luz evaporativo (SEC-UV-ELSD)

As análises de Cromatografia por Exclusão de Tamanho foram realizadas em um sistema Shimadzu 10A (Shimadzu, Quioto, Japão) composto por duas bombas LC-10AT, uma válvula de baixa pressão FCV-10ALvp, um *degasser* DGU-14A, um forno de coluna CTO-10A, auto mostrador SIL-10ADvp, detector de UV/Vis SPD-10 fixado em comprimentos de onda de 260 e 280 nm, e um detector de espalhamento de luz (ELSD; *Evaporative Light Scattering Detector*) Alltech 3300 (Grace, Columbia, MD, EUA). A coluna utilizada foi uma TSKgel GMPWxl (7.8 mm x 30 cm, 13  $\mu\text{m}$ ) (Tosoh Biosciences, King of Prussia, PA, EUA) com uma pré coluna (6 mm x 4 cm, 12  $\mu\text{m}$ ) de mesma fase estacionária e temperatura de forno de 37°C.

n) Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

Para as análises de NMR em líquido, foram utilizados equipamentos da Bruker sendo um Bruker Avance III com magneto de 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio) (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Alemanha) e um Bruker Avance III com magneto Ultrashield Plus de 14,1 Tesla (600 MHz para frequência do hidrogênio). Para as análises de amostras em estado sólido foi utilizado um

equipamento Bruker Avance III com magneto de 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio) equipado com uma sonda de 4 mm para experimentos usando a polarização cruzada e rotação segundo o ângulo mágico, (CP/MAS - *Cross Polarization/ Magic Angle Spinning*) para amostras sólidas. Para tratamento dos dados, foi utilizado o *software* TopSpin 3.0 (Bruker).

#### **4 - Identificação molecular e espectrométrica de bactérias associadas ao trato digestivo do inseto-praga *Diabrotica speciosa***

## 4.1 - Introdução

*Diabrotica* é um gênero de besouro da família Chrysomelidae, que comporta diversas pragas agrônomicas na Europa e nas Américas, com destaque para as espécies *D. virgifera*, *D. undecimpunctata*, *D. balteata* e *D. speciosa*. Estima-se que apenas nos Estados Unidos, as *Diabrotica* spp. sejam responsáveis por perdas anuais superiores a US\$ 1 bilhão apenas em plantações de milho (GRAY *et al.*, 2009). A *D. speciosa* é a espécie predominante do gênero *Diabrotica* na América do Sul (ÁVILA e SANTANA, 2013), se alimentado principalmente de raízes e tubérculos na fase larval, estando entre as principais pragas de culturas como batata, trigo, milho e outros cereais (VIANA, 2010). Quando adulta apresenta uma alta polifagia, sendo capaz de atacar mais de 300 plantas hospedeiras de mais de 50 famílias, incluindo diversas plantações de interesse econômico como feijão, cana-de-açúcar, batata, trigo e milho (EBEN e MONTEROS, 2013; WALSH *et al.*, 2013). Dentre os insetos do gênero, existem descrições de micro-organismos associados para todas as outras espécies economicamente importantes, *D. undecimpunctata*, (TRAN e MARRONE, 1988), *D. barberi* (PRISCHMANN *et al.*, 2008), *D. balteata* (SCHALK *et al.*, 1987; PRISCHMANN *et al.*, 2008) e *D. virgifera* (PRISCHMANN *et al.*, 2008; CHU *et al.*, 2013), onde nesta última a sua microbiota é responsável por conferir resistência a métodos de controle. Entretanto ainda não existe na literatura relatos sobre a microbiota de *D. speciosa*. Estas características as tornam um alvo interessante para a exploração de sua microbiota, visto que suas características de plasticidade geográfica e adaptação alimentar podem ter relação com sua diversidade e atividade microbiana.

Diversos são os métodos para se realizar a identificação de micro-organismos isolados, sendo os métodos mais utilizados a avaliação fenotípica, através da comparação de características da formação da colônia como indicativo para classificação; através de coletâneas compreendendo descrições detalhadas (WHITMAN *et al.*, 2012); uso de kits bioquímicos que indicam a capacidade do organismos de utilizar uma série de substratos, bem como reações específicas que indicam qualitativamente a presença ou ausência de sistema enzimáticos (TRUU *et al.*, 1999) ou, mais recentemente, por técnicas genômicas, que envolvem o sequenciamento de uma ou mais regiões do código genético, entre outros. Estas

técnicas são capazes de produzir resultados altamente confiáveis, porém nem sempre são eficientes para a caracterização de isolados derivados de fontes ambientais (AWONG-TAYLOR *et al.*, 2008).

Não obstante, apesar da confiança e precisão dos métodos atualmente disponíveis para a identificação bacteriana, o uso do perfil de massas protéico (PMF; *Protein Mass Fingerprint*) obtido através do uso de espectrometria de massas por ionização por dessorção a laser assistida por matriz acoplada a analisador por tempo de voo (MALDI-TOF MS) tem se tornado um método robusto e confiável para identificação e classificação de micro-organismos (ROSSELLÓ-MÓRA, 2012).

A espectrometria de massas é uma técnica que permite a medição da razão massa/carga ( $m/z$ ) de moléculas através de processos de ionização e migração de cargas em ambientes controlados. Diversos tipos de fontes de ionização e analisadores foram desenvolvidos desde o começo do desenvolvimento da técnica, no começo do século XIX. Porém, devido ao arranjo experimental dos instrumentos, a grande maioria de suas aplicações estava voltada para a área química (SINGHAL *et al.*, 2015). Entretanto, com o desenvolvimento de tecnologias de ionização branda como *electrospray* (ESI) e MALDI, houve um grande aumento nas possibilidades de análises, incluindo a aplicação da técnica para moléculas biológicas como proteínas e células inteiras.

As amostras celulares são preparadas para a ionização pela mistura ou recobrimento com uma solução de um composto orgânico eficiente na absorção de energia, chamado de matriz, sendo utilizadas geralmente moléculas orgânicas de baixa massa molecular contendo grupos ácidos e sistemas conjugados, como derivados de ácidos cinâmico e benzoico (HARVEY, 2015). Ao secar, a amostra em contato com a solução também cristaliza, resultando num sólido que pode ser ionizado pela ação de um laser. A ionização e dessorção provocada pelo laser geram íons na matriz que transferem suas cargas para as moléculas, que são então acelerados através de um potencial fixo, sendo separados no espaço através de sua  $m/z$ . Em analisadores de TOF, a  $m/z$  é medida pela determinação do tempo que cada íon leva para atravessar o tubo de voo e alcançar o detector. Baseado na informação obtida pelo TOF, um espectro característico de PMF é gerado. A identificação dos micro-organismos por MALDI-TOF MS é feita pela comparação do espectro gerado com um banco de dados construídos com espécies já identificadas

por outros métodos. Para a identificação, geralmente é utilizado uma extensão de  $m/z$  de 2-20 kDa, contendo principalmente proteínas ribossomais, as quais que representam 60-70% da massa seca de uma célula bacteriana neste intervalo de massa. (MURRAY, 2012). A Figura 4.1 exemplifica o processo de geração e detecção dos íons, bem como um espectro comumente esperado após uma análise.

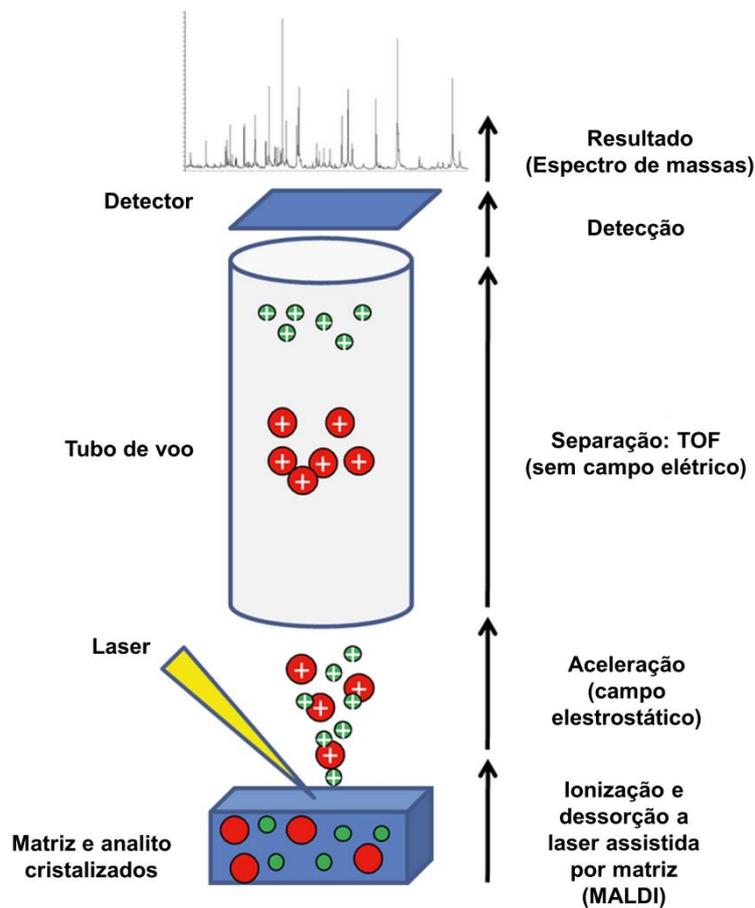


FIGURA 4.1 - Representação esquemática do funcionamento da técnica de MALDI-TOF MS e exemplo de espectro de massas obtido (Adaptado de CROXATTO *et al.*, 2012)

De fato, a técnica de MALDI-TOF MS é capaz de fornecer resultados em nível de subespécie microbiana em diversos nichos, que incluem controle de qualidade de alimentos, ecologia química, estudos de microbiomas, identificação de patógenos, etc. (FERREIRA *et al.*, 2011; KERN *et al.*, 2014; LAU *et al.*, 2014; SAMB-BA *et al.*, 2014). Além disso, as análises por MALDI-TOF MS fornecem resultados em

poucas horas, contrastando com a necessidade de várias horas, ou mesmo dias, para a identificação através de técnicas genéticas convencionais, sendo que os custos associados com as análises espectrométricas podem ser de apenas um quinto do preço das análises de sequenciamento (SENG *et al.*, 2009, 2010; BISWAS e ROLAIN, 2013).

Além de auxiliar na identificação das espécies, as técnicas de caracterização permitem agrupar os organismos de acordo com as similaridades. As sequências de nucleotídeos da região do gene 16S rDNA são muito utilizadas para identificação pois possuem regiões extremamente conservadas que indicam uma possível relação evolutiva entre as espécies, bem como regiões hiper-variáveis que fornecem poder de discriminação suficiente para se realizar a distinção de espécies dentro de um gênero (JANDA e ABBOTT, 2007). Estas sequências também são utilizadas para obter informações relacionadas a classificação taxonômica através de dados filogenéticos. A similaridade entre as sequências pode ser usada para se construir uma árvore filogenética que indica a relação evolutiva entre os organismos avaliados.

Da mesma forma, a combinação de análises de MALDI-TOF MS com técnicas de agrupamento dos resultados de classificação microbiana permite uma classificação taxonômica similar à filogenia, obtida por técnicas genéticas como sequenciamento da região 16S rDNA. Entretanto, como o MALDI-TOF produz uma coleção de perfis proteômicos ao invés de sequências de regiões conservadas do DNA (como no sequenciamento), diferentes conjuntos de agrupamento podem ocorrer. Esta relação filoproteômica (CONWAY *et al.*, 2001) em particular pode gerar novas compreensões das similaridades existentes entre organismos relacionadas a sua função ecológica e atividades (ecotipos), ao contrário de relações evolucionárias, além de conhecimento sobre possíveis transferências de gene horizontais e classificação polifásica de micro-organismos (KÄMPFER e GLAESER, 2012; OBERBECKMANN *et al.*, 2011).

Portanto, para se obter mais informações sobre o microbioma de *D. speciosa* e identificar os isolados que serão avaliados frente ao seu potencial biotecnológico, essa etapa do trabalho teve por objetivo realizar a identificação dos micro-organismos isolados de *D. speciosa* usando MALDI-TOF MS e sequenciamento parcial do gene 16S rDNA.

## 4.2 - Procedimentos Experimentais

### 4.2.1 - Identificação de micro-organismos associados a *D. speciosa* por MALDI-TOF MS

Para a realização do experimento de identificação dos micro-organismos associados ao inseto *D. speciosa* pela utilização da impressão digital espectrométrica das cepas isoladas pela análise por MALDI-TOF, culturas axênicas preservadas a -80°C em solução aquosa contendo 25% (v/v) de glicerol, obtidas durante o isolamento em duas épocas distintas, pelos alunos de mestrado do Laboratório de Produtos Naturais Fabiana Aparecida Marques em 2012 (MARQUES, 2012) e Anderson Luigi Luiz em 2013 (LUIZ, 2013) foram reativadas em meio NA e incubadas em estufa BOD em ausência de luz a 28°C. Após a confirmação de crescimento vigoroso, uma colônia foi transferida com alça de platina estéril para duas novas placas de meio NA utilizando-se o método de esfregaço por esgotamento e cultivada por mais 24 h nas mesmas condições. Após o crescimento, em cada placa quatro colônias foram selecionadas e transferidas com o auxílio de um palito de dente estéril para uma placa *MTP 384-well ground steel TF* (Bruker Daltonics GmbH, Germany). Cada colônia foi analisada em triplicata, resultando num total de 24 esfregaços por cepa (2 placas de Petri cultivadas, 4 colônias de cada placa, em triplicata; 2 x 4 x 3). As amostras foram então recobertas com 1,5 µL de matriz que consiste em uma solução 20 mg.mL<sup>-1</sup> de ácido-α-ciano-4-hidroxicinâmico (α-CHCA) em acetonitrila / solução aquosa de ácido trifluoroacético 0.1% (1:1 v/v).

Os espectros foram obtidos na faixa entre 2-20 kDa. Pulsos de 250 tiros foram disparados em posições aleatórias dentro de cada poço. Os espectros para cada poço foram gerados a partir do acúmulo de 1500 disparos apresentando intensidade e resolução satisfatórias. Após a obtenção dos espectros de cada poço para cada isolado, os mesmos foram utilizados para criação de um Espectro Principal Unificado (MSP) através do software MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha) usando um algoritmo padrão para correção de linha de base, suavização e normalização. No total, para cada isolado o MSP foi construído a partir de 3,6 x 10<sup>4</sup> espectros de massas, representando a soma dos 1500 tiros de

cada poço para os 24 poços. Os arquivos de MSP foram utilizados na comparação com a base de dados do próprio *software* para identificação das espécies e também para a construção da árvore filoproteômica.

#### 4.2.2 - Identificação dos micro-organismos associados a *D. speciosa* por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA

Para a identificação dos micro-organismos por técnicas moleculares, culturas axênicas preservada a -80°C em solução aquosa contendo 25% (v/v) glicerol foram reativadas em meio NA e incubadas em estufa BOD. Após a confirmação de crescimento vigoroso, uma colônia foi transferida com alça de platina estéril para meio CN, e cultivada por mais 16 h sob as mesmas condições. Após o crescimento, o meio de cultura foi centrifugado (12.860 x g, 20°C, 10 min) para a retirada das células, e o sobrenadante descartado.

A extração do DNA genômico bacteriano foi feita utilizando-se o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit*, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Após a obtenção do DNA e sua rehidratação, o mesmo foi quantificado por espectrometria e então diluído para a concentração de 25 ng.µL<sup>-1</sup>, utilizada para a montagem da reação de PCR. A reação de PCR foi realizada adicionando uma mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), enzima TAq DNA Polymerase, tampão Tris-HCl 20 mM pH 8.3 com 100 mM KCl, MgCl<sub>2</sub> (10 mM), e água estéril livre de nucleases e os *primers* frontal (*Forward Primer*, FP) e reverso (*Reverse Primer*, RP). Para a reação, os primers utilizados foram os descritos por WEISBURG *et al.* (1991) 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1525r (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'), considerados universais e eficientes na amplificação de DNA de origem bacteriana. Os reagentes e suas concentrações, bem como os parâmetros reacionais utilizados no termociclador estão dispostos na Tabela 4.1.

Após a amplificação do fragmento de DNA, a reação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). Para tanto, 4 µL da reação foram misturados com 1 µL do corante *Orange Dye* e aplicados em poços na cuba de eletroforese. A voltagem para a separação das bandas na eletroforese foi de 90 V e o tampão condutor utilizado foi o Tris-acetato-EDTA com pH 8,0. A confirmação da

reação de amplificação foi realizada pela aplicação do corante brometo de etídio por visualização em transiluminador, os produtos das reações foram purificados com o uso do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* seguindo o seu protocolo. Os produtos de PCR purificados foram quantificados novamente e enviados para o sequenciamento dos DNAs. As sequências obtidas foram analisadas pelo software BioEdit, e as sequências de pares de bases obtidas comparadas ao banco de dados do NCBI através do algoritmo BLAST.

TABELA 4.1 - Reagentes e Condições da reação de PCR.

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

Para a construção da árvore filogenética, todas as sequências foram alinhadas com o *software* ClustalX usando o método heurístico de alinhamento múltiplo de sequências (MSA; *Multiple Sequence Alignment*) usando o agrupamento de vizinhos (NJ; *Neighbor-Joining*). Após a construção, a árvore foi visualizada e editada com o auxílio do *software* FigTree.

### 4.3 - Resultados e Discussão

Para que se possa fazer com segurança a manipulação e o uso de micro-organismos, é imprescindível que se conheça o tipo de bactéria que será usada no trabalho. Em etapas prévias de isolamento de micro-organismos associados a larvas e adultos de *D. speciosa*, foram obtidos 73 isolados bacterianos,

mantidos sob preservação criogênica. Alguns dos isolados estão expostos na Figura 4.2.

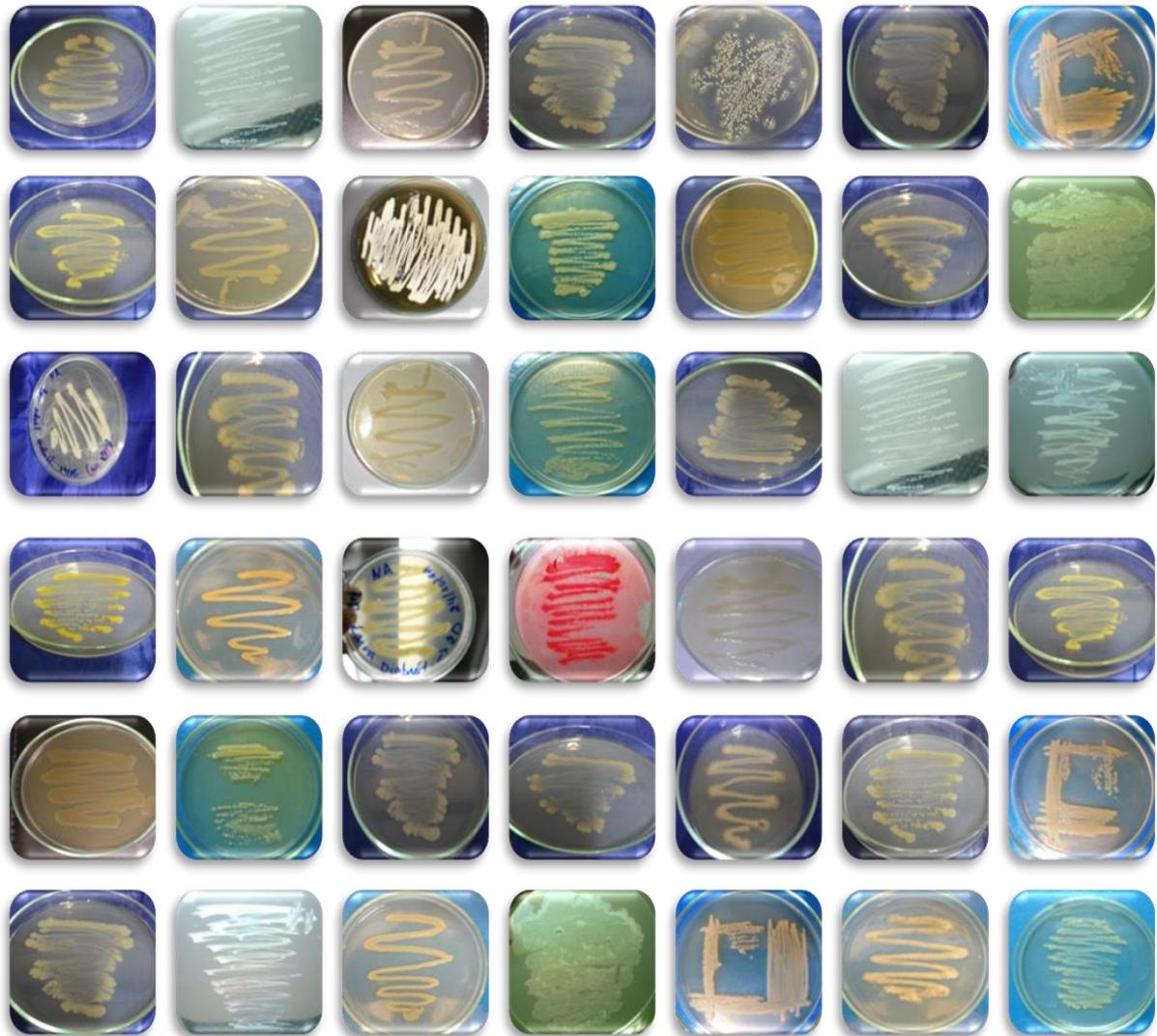


FIGURA 4.2 - Placas de meio de cultivo NA ilustrando alguns isolados obtidos de *D. speciosa*.

Identificações iniciais dos micro-organismos realizadas previamente a este trabalho apontaram uma grande diversidade de gêneros microbianos (MARQUES 2012; LUIZ, 2013). A Tabela 4.2 resume os isolados obtidos pelo grupo de produtos naturais do DQ/UFSCar e as codificações utilizadas durante o trabalho.

TABELA 4.2 - Códigos usados para descrever cada isolado bacteriano usado neste trabalho.

Número	Código antigo	Novo Código	Número	Código antigo	Novo Código
1	T1 C1	DsA.N001	38	T11.3 ND	DsA.N038
2	T1 T1	DsA.N002	39	T11.3 NF	DsA.N039
3	T2 B1	DsA.N003	40	T11.5 NA	DsA.N040
4	T2 C1	DsA.N004	41	T13.5 N1	DsA.N041
5	T2 NA	DsA.N005	42	T13.5 NF1	DsA.N042
6	T5 C1	DsA.N006	43	T17.5 N1	DsA.N043
7	T7.1 N1	DsA.N007	44	T17.5 N2	DsA.N044
8	T7.1 N2	DsA.N008	45	T17.5 N3	DsA.N045
9	T7.1 N4	DsA.N009	46	T21.1 B1	DsA.N046
10	T7.5 N2	DsA.N010	47	T21.1 N1	DsA.N047
11	T8.5 N1	DsA.N011	48	T21.1 N2	DsA.N048
12	T2 T1	DsA.N012	49	T21.1 N3	DsA.N049
13	T2 T2	DsA.N013	50	T21.1 N4	DsA.N050
14	T3 B1	DsA.N014	51	T21.1 N5	DsA.N051
15	T3 NA	DsA.N015	52	T21.5 DNX	DsA.N052
16	T3 NA2	DsA.N016	53	T21.5 N1	DsA.N053
17	T4 NA	DsA.N017	54	1A	DsF.N001
18	T5 B1	DsA.N018	55	1B	DsF.N002
19	T5 N1	DsA.N019	56	1D	DsF.N003
20	T5 TSA	DsA.N020	57	1F	DsF.N004
21	T7.1 B1	DsA.N021	58	1G	DsF.N005
22	T7.1 B2	DsA.N022	59	1H	DsF.N006
23	T7.1 N3	DsA.N023	60	2A	DsF.N007
24	T7.5 N1	DsA.N024	61	2B	DsF.N008
25	T7.5 N3	DsA.N025	62	2C	DsF.N009
26	T8.5 B1	DsA.N026	63	2D	DsF.N010
27	T9.1 N1	DsA.N027	64	2E	DsF.N011
28	T9.1N2	DsA.N028	65	2F	DsF.N012
29	T10.1 B1	DsA.N029	66	2G	DsF.N013
30	T10.1 N1	DsA.N030	67	2H	DsF.N014
31	T10.5 B1	DsA.N031	68	3A	DsF.N015
32	T10.5 N1	DsA.N032	69	3D	DsF.N016
33	T11.0 NF1	DsA.N033	70	3F	DsF.N017
34	T11.0 NF2	DsA.N034	71	3G	DsF.N018
35	T11.1 BF	DsA.N035	72	4F	DsF.N019
36	T11.1 ND	DsA.N036	73	5F	DsF.N020
37	T11.1 NF	DsA.N037			

Para o desenvolvimento dos trabalhos voltados a caracterização de produtos microbianos, o conhecimento do isolado a ser trabalhado se faz de grande valia na previsão da capacidade metabólica e de mecanismos de segurança necessários para a correta manipulação. Para dar início ao trabalho de identificação, primeiramente foram feitas as análises de identificação microbiana por MALDI-TOF MS. Após as etapas de crescimento microbiano e montagem do experimento, os espectros de massas foram adquiridos. A Figura 4.3 mostra exemplos de espectros de massas obtidos para algumas bactérias selecionadas.

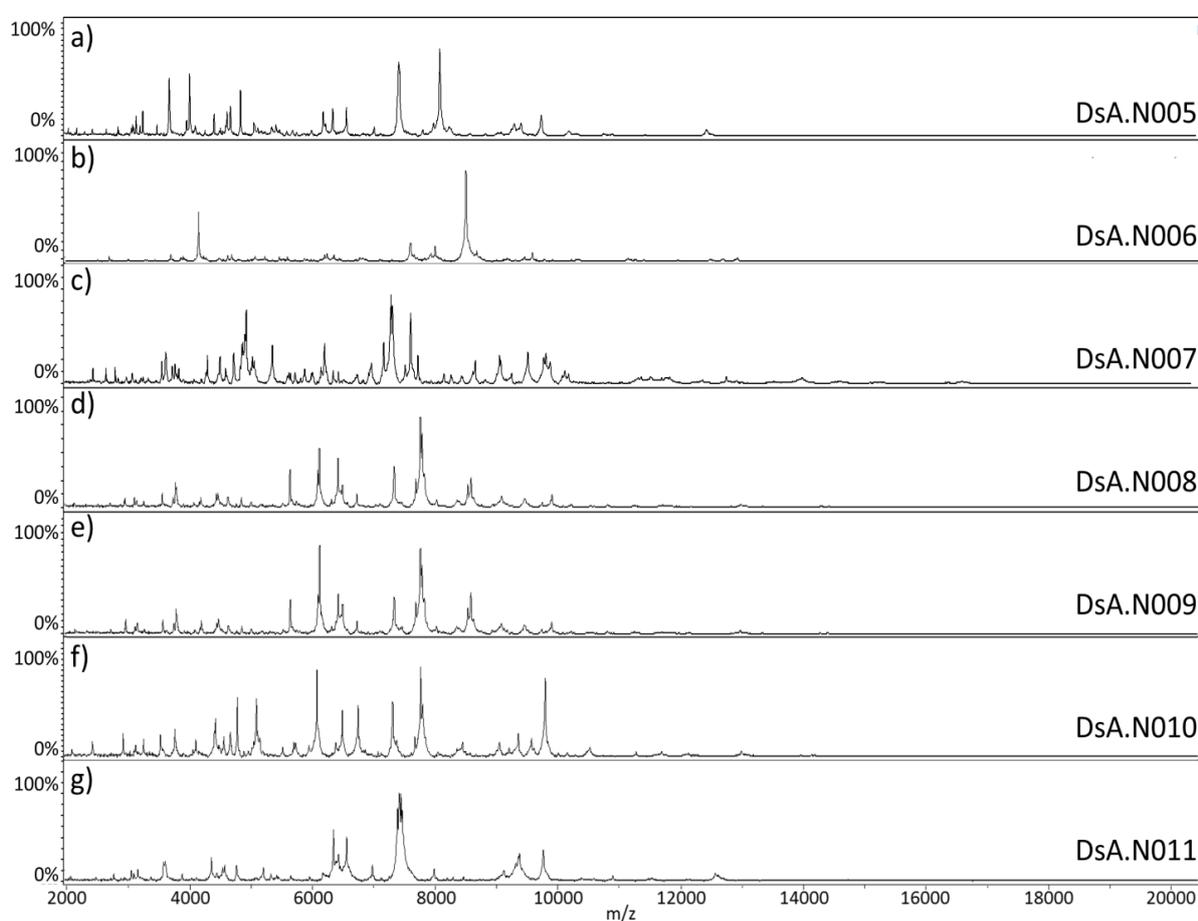


FIGURA 4.3 - Espectros de massa (2-20kDa) para algumas bactérias selecionadas. a) *Serratia marcescens* (DsA.N005); b) *Acinetobacter pittii* (DsA.N006); c) *Stenotrophomonas maltophilia* (DsA.N007); d) *Pseudomonas mosselli* (DsA.N008) e) Identificação não confiável (DsA.N009); f) *Pseudomonas chlororaphis* (DsA.N010) e g) *Enterobacter cloacae* (DsA.N011)

Como mostra a Figura 4.3, há uma grande variabilidade na resposta instrumental para cada isolado, apresentando espectros com sinais característicos em massas específicas para cada cepa. Podem ser observados sinais considerados candidatos a marcadores moleculares de gênero, como por exemplo os sinais próximos a  $m/z$  3800, 6000, 7200 e 7600, em alta intensidade, na Figura 4.3 d) e 4.3 f), referentes a duas espécies de *Pseudomonas*, e ausentes nos demais. Pode-se também notar a semelhança entre os espectros nas Figuras 4.3 d) e 4.3 e), todavia quando aplicados ao conjunto de dados gerados (MSP) para ambos os isolados, o primeiro não obteve uma identificação confiável enquanto o segundo foi identificado com confiança de gênero como *Pseudomonas mosselii*. Estes exemplos ilustram a sensibilidade dos resultados gerados por este tipo de técnica e o poder de discriminação.

De fato, após a coleta dos dados e geração do MSP, a comparação feita no *software* Biotyper fornece um resultado na forma de pontos, que variam de 0,000 a 3,000. Estes valores representam o grau de similaridade entre o MSP gerado e os espectros do banco de dados. Como recomendação do fabricante, podem ser considerados quatro níveis de resultados: 1) entre 0,000 e 1,699 são considerados como uma identificação não confiável; 2) entre 1,700 e 1,999 são considerados como identificações em nível de gênero; 3) entre 2,000 e 2,299 são considerados como identificação confiável em nível de gênero, e provável em nível de espécie; 4) valores acima de 2,300 são considerados como identificações corretas até nível de subespécie (cepa). Após comparação do MSP de cada isolado com o banco de dados Biotyper do equipamento, sendo possível identificar os isolados conforme descritos na Tabela 4.3.

De acordo com os resultados, 90% dos isolados foram caracterizados com relação ao gênero, e somente sete isolados não apresentaram resultados confiáveis por MALDI-TOF MS. Destes, três (DsA.N009, DsA.N023 e DsA.N029) produziram uma resposta com valores próximos ao limite mínimo, e por isso sua identificação de maior valor foi considerada, enquanto os outros quatro (DsA.N014, DsA.N042, DsF.N003 e DsF.N008) não apresentaram nenhum tipo de resultado confiável, não sendo submetidos a tentativa de atribuição. A Figura 4.4 abaixo resume os níveis de classificação obtidos por MALDI-TOF MS para os isolados.

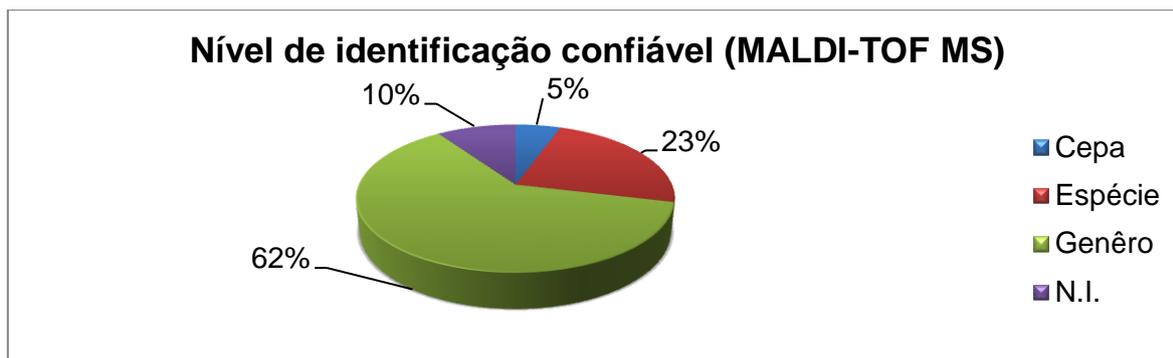


FIGURA 4.4 - Classificação dos resultados de identificação dos isolados por MALDI-TOF de acordo com os níveis taxonômicos. N.I. - Não identificado.

Vale ressaltar que a metodologia padrão de análise indicada pela Bruker envolve uma etapa prévia de extração das proteínas para melhorar a sensibilidade da técnica, porém resultados satisfatórios foram obtidos através de análise de células intactas transferidas do meio para a placa de amostragem, possibilitando uma maior versatilidade e maior quantidade de amostras. A Figura 4.5 mostra o resumo dos resultados de identificação obtidos por MALDI-TOF MS.

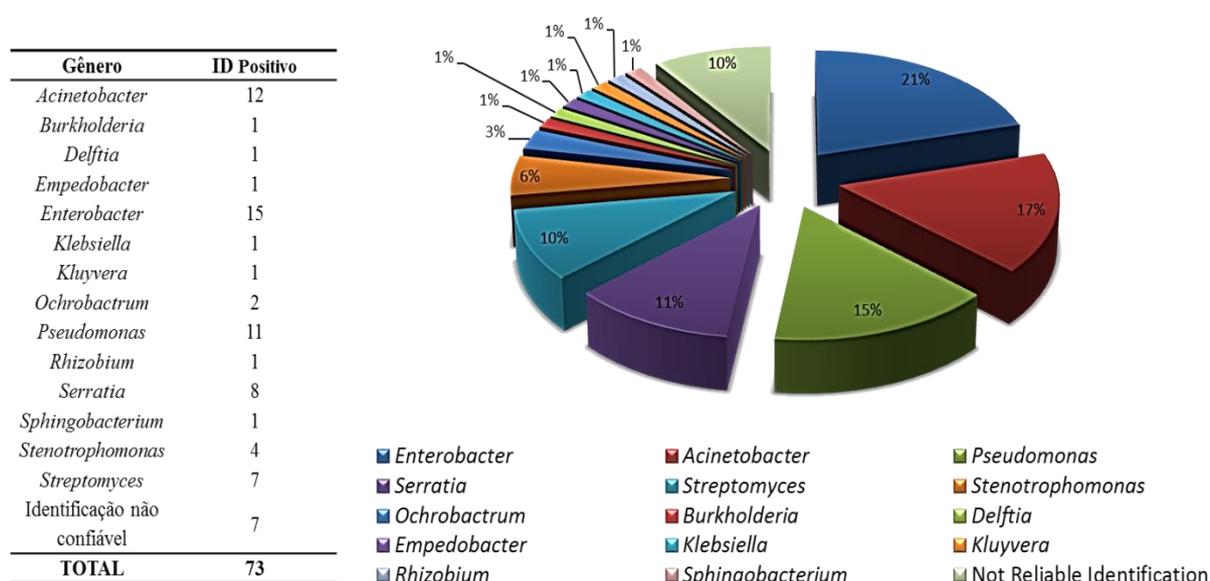


FIGURA 4.5 - Resumo dos resultados de identificação dos micro-organismos isolados de *D. speciosa* por MALDI-TOF MS.

TABELA 4.3 - Pontuações obtidas para cada isolado na classificação pelo software Bruker MALDI Biotyper.

Número	Código	Melhor resultado Biotyper	Pontos
1	DsA.N001	<i>Acinetobacter baylii</i>	1,830
2	DsA.N002	<i>Acinetobacter junii</i>	1,994
3	DsA.N003	<i>Serratia marcescens</i>	2,019
4	DsA.N004	<i>Serratia marcescens</i>	2,036
5	DsA.N005	<i>Serratia marcescens</i>	2,059
6	DsA.N006	<i>Acinetobacter pittii</i>	1,704
7	DsA.N007	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,817
8	DsA.N008	<i>Pseudomonas mosselii</i>	1,746
9	<b>DsA.N009</b>	<b><i>Pseudomonas mosselii*</i></b>	<b>1,623</b>
10	DsA.N010	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1,906
11	DsA.N011	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,933
12	DsA.N012	<i>Serratia marcescens</i>	2,398
13	DsA.N013	<i>Serratia marcescens</i>	1,946
14	<b>DsA.N014</b>	<b>Identificação não confiável</b>	<b>1,235</b>
15	DsA.N015	<i>Streptomyces griseus</i>	1,777
16	DsA.N016	<i>Streptomyces griseus</i>	1,747
17	DsA.N017	<i>Streptomyces badius</i>	1,783
18	DsA.N018	<i>Ochrobactrum galinifaciens</i>	2,167
19	DsA.N019	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2,326
20	DsA.N020	<i>Streptomyces griseus</i>	2,037
21	DsA.N021	<i>Pseudomonas mosselii</i>	1,787
22	DsA.N022	<i>Pseudomonas mosselii</i>	1,786
23	<b>DsA.N023</b>	<b><i>Pseudomonas mosselii*</i></b>	<b>1,668</b>
24	DsA.N024	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,075
25	DsA.N025	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	2,107
26	DsA.N026	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,878
27	DsA.N027	<i>Streptomyces badius</i>	1,977
28	DsA.N028	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,709
29	<b>DsA.N029</b>	<b><i>Ochrobactrum grignonense*</i></b>	<b>1,694</b>
30	DsA.N030	<i>Streptomyces griseus</i>	1,844
31	DsA.N031	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,879
32	DsA.N032	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,981
33	DsA.N033	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,408
34	DsA.N034	<i>Serratia marcescens</i>	2,077
35	DsA.N035	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,943
36	DsA.N036	<i>Acinetobacter junii</i>	1,766
37	DsA.N037	<i>Acinetobacter junii</i>	1,731
38	DsA.N038	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,866
39	DsA.N039	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,793
40	DsA.N040	<i>Streptomyces badius</i>	1,821
41	DsA.N041	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,852
42	<b>DsA.N042</b>	<b>Identificação não confiável</b>	<b>1,154</b>
43	DsA.N043	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1,771
44	DsA.N044	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,827
45	DsA.N045	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,989
46	DsA.N046	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,125
47	DsA.N047	<i>Acinetobacter junii</i>	1,707
48	DsA.N048	<i>Acinetobacter junii</i>	1,781
49	DsA.N049	<i>Delftia acidovorans</i>	1,829
50	DsA.N050	<i>Acinetobacter junii</i>	1,766
51	DsA.N051	<i>Acinetobacter junii</i>	1,766
52	DsA.N052	<i>Pseudomonas sp.</i>	1,800
53	DsA.N053	<i>Pseudomonas sp.</i>	1,931
54	DsF.N001	<i>Pseudomonas putida</i>	2,045
55	DsF.N002	<i>Empedobacter brevis</i>	1,718
56	<b>DsF.N003</b>	<b>Identificação não confiável</b>	<b>1,359</b>
57	DsF.N004	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,982
58	DsF.N005	<i>Pseudomonas monteilii</i>	1,827
59	DsF.N006	<i>Pseudomonas monteilii</i>	2,085
60	DsF.N007	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,193
61	<b>DsF.N008</b>	<b>Identificação não confiável</b>	<b>1,402</b>
62	DsF.N009	<i>Serratia marcescens</i>	2,089
63	DsF.N010	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,436
64	DsF.N011	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,123
65	DsF.N012	<i>Enterobacter asburiae</i>	2,080
66	DsF.N013	<i>Burkholderia gladioli</i>	1,788
67	DsF.N014	<i>Pseudomonas monteilii</i>	1,983
68	DsF.N015	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,830
69	DsF.N016	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2,136
70	DsF.N017	<i>Pseudomonas monteilii</i>	1,983
71	DsF.N018	<i>Enterobacter asburiae</i>	1,912
72	DsF.N019	<i>Kluyvera intermedia</i>	1,704
73	DsF.N020	<i>Serratia marcescens</i>	2,191

\* Indica a melhor identificação, mesmo abaixo do score mínimo (1,700).

Para confirmar os resultados obtidos por MALDI-TOF MS, bem como realizar a identificação dos isolados que não produziram resultados confiáveis, 51 dos 73 isolados foram submetidos às etapas de extração, amplificação, purificação e sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. As extrações do gene 16S rDNA procederam de maneira eficiente, resultado em quantidade de fitas de DNA suficientes para sua amplificação, conforme exemplo da resposta instrumental ilustrada pela quantificação espectrofotométrica no BioSpec-nano na Figura 4.6.

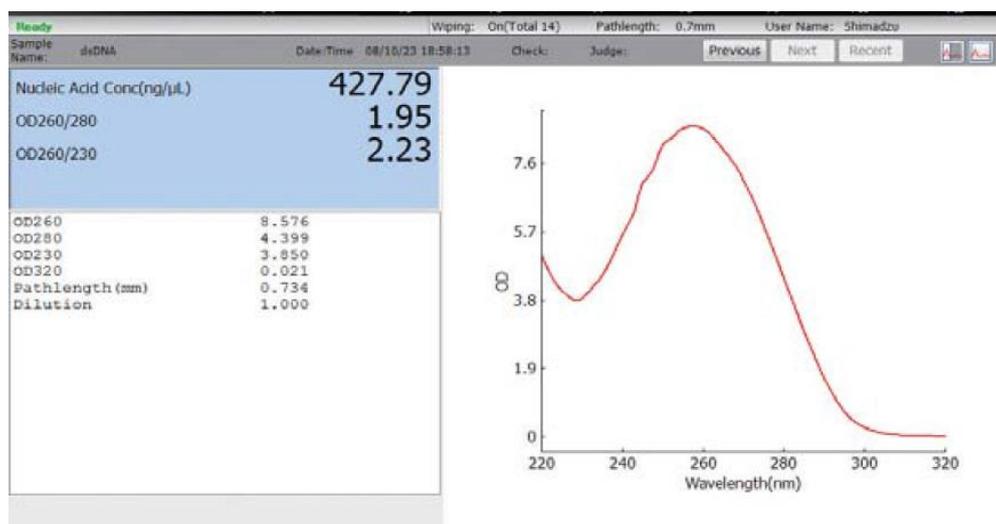


FIGURA 4.6 - Quantificação de ácido nucléico em microespectrofotômetro BioSpec-nano.

A reação de PCR foi realizada em volumes de 25  $\mu$ L com sucesso, e a confirmação dos fragmentos do gene 16S rDNA de cerca de 1500 pares de base, alvos da reação em cadeia da polimerase, foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), pela aplicação de uma alíquota de 2  $\mu$ L. A Figura 4.7 mostra um exemplo de um gel visualizado com iluminação UV (245 nm).

Após a amplificação, as amostras foram individualmente purificadas diretamente do volume restante da reação, ou então percorridas em eletroforese e extraídas das bandas de separação do gel, em casos onde foram observados problemas relacionados com a qualidade e pureza dos produtos de PCR após purificação diretamente do meio reacional. Independentemente do método, ambos podem ser purificados pelo uso do mesmo kit, com pequenas modificações descritas pelo fabricante.

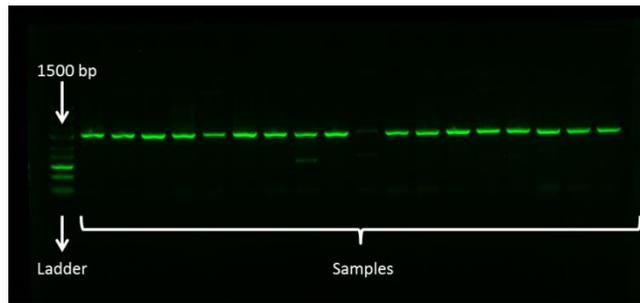


FIGURA 4.7 - Gel de agarose 1% (m/m) mostrando a eficiência das reações de PCR para os micro-organismos isolados.

Após a obtenção do *amplicon* purificado, os mesmos foram novamente quantificados por microespectrofotometria, diluídos para uma concentração de 10 ng.mL<sup>-1</sup> e enviados para o sequenciamento. Foram obtidos os eletroferogramas correspondentes a cada amostra, com tamanho e qualidade de sequencias variáveis, de acordo com a qualidade das amostras e da reação de sequenciamento realizadas. A Figura 4.8 mostra alguns exemplos de eletroferogramas obtidos.

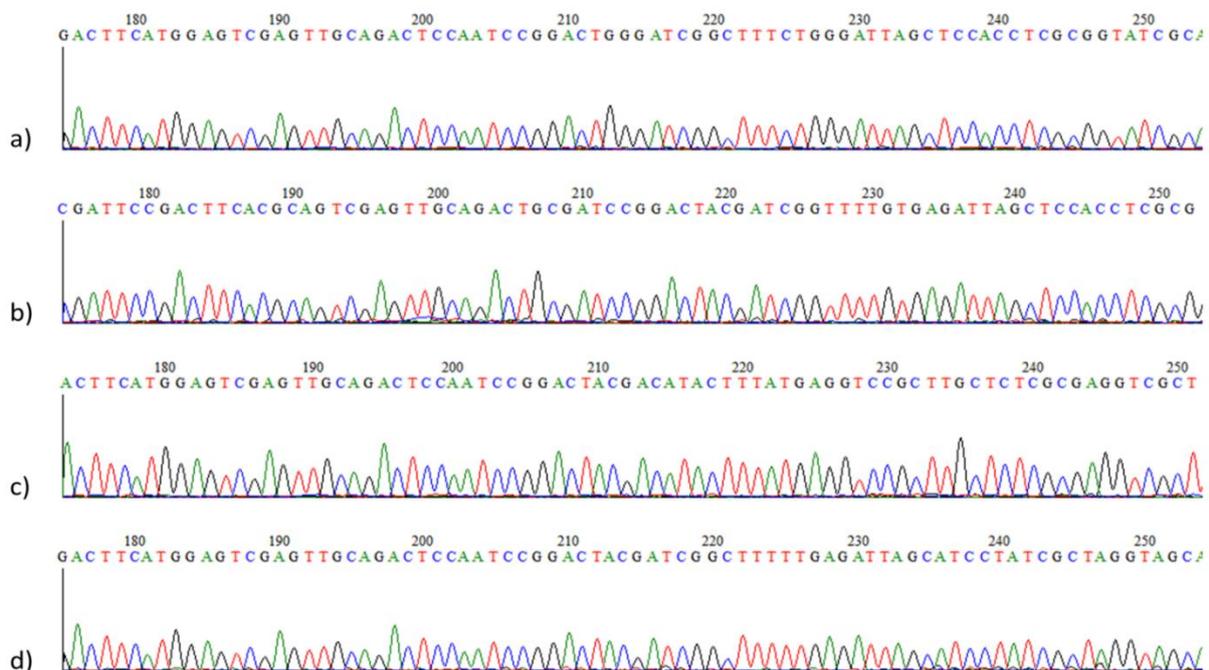


FIGURA 4.8 - Exemplos de trechos dos eletroferogramas obtidos depois do sequenciamento de DNA das amostras. a) DsF.N003 (*Luteibacter* sp.); b) DsF.N014 (*Pseudomonas monteilii*); c) DsF.N020 (*Serratia marcescens*); d) DsA.N006 (*Acinetobacter* sp.)

Obeve-se sequências parciais do gene 16S rDNA para 51 isolados. Apesar de o equipamento produzir uma sequência de até 1000 pares de base, cada sequência foi individualmente analisada no *software* Bioedit para remoção de sequências de baixa qualidade, definição de ambiguidades de pares de base e exclusão de regiões contendo impurezas. No total, foram utilizados trechos entre 300-700 pares de bases para a identificação dos micro-organismos a partir da comparação com o banco de dados do NCBI usando a ferramenta BLAST para alinhamento de sequências. As Tabela 4.4 e 4.5 apresentam todos os resultados obtidos para os sequenciamento, bem como o tamanho da sequência de pares de base utilizados, a porcentagem de uso da sequência para comparação no banco de dados (cobertura) e a porcentagem de correlação (identidade) e o número de acesso do Genbank da sequência com maior homologia. Todas as sequências parciais do gene 16S rDNA obtidas para os isolados utilizadas neste trabalho foram depositadas na coleção de anotações pública GenBank, com os números de acesso KP036890-KP036896 e KT189446-KT189489.

Todos os isolados que tiveram seu DNA sequenciado apresentaram alto índice de identidade (>95%) quando comparado ao banco de dados BLAST, exceto a cepa DsA.N007. Mesmo assim, esta cepa ainda apresentou um valor igual a 91%. Os sequenciamentos foram realizados apenas no sentido *forward* do fragmento, logo não foi possível montar todo o fragmento 16S, resultando numa identificação com vários resultados com alto índice de identidade para mais de uma espécie do gênero, mas sempre com alto grau de confiabilidade com relação à identificação do gênero. Nestes casos, optou-se por manter apenas a identificação em nível de gênero, mantendo a espécie como desconhecida (sp.).

Através do agrupamento dos dados de identificação das duas metodologias, foi possível identificar o gênero de todos os 73 isolados obtidos. Dentre os sete resultados não confiáveis obtidos na identificação por MALDI-TOF MS, os três que tinham produzido valores próximos ao limite mínimo (DsA.N009, DsA.N023 e DsA.N029) se mostraram corretos quando comparados a identificação produzida pelo sequenciamento genético, indicando que a técnica de MALDI-TOF MS possui uma margem de segurança, onde mesmo para identificações próximas ao limite mínimo de 1,700, ou mesmo abaixo, ainda podem acabar se mostrando corretas.

TABELA 4.4 - Resultados obtidos pelo sequenciamento parcial do gene 16S rDNA e comparação com banco de dados de NCBI usando a ferramenta BLAST.

Nº	Código	Pares de Base	Melhor Acerto (Gênero)	% Cobertura	% Identidade	Nº acesso Melhor Acerto
1	DsA.N002	635	<i>Acinetobacter</i> sp.	100	99	JX195717.1
2	DsA.N003	429	<i>Serratia</i> sp.	100	99	AB934375.1
3	DsA.N004	417	<i>Serratia</i> sp.	100	98	AB934375.1
4	DsA.N005	545	<i>Serratia</i> sp.	100	99	EF672647.1
5	DsA.N006	653	<i>Acinetobacter</i> sp.	100	99	KJ567117.2
6	DsA.N007	498	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	98	91	KM287528
7	DsA.N008	500	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	95	LN847264.1
8	DsA.N009	499	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	99	LN847264.1
9	DsA.N010	501	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	99	HQ600988
10	DsA.N011	502	<i>Enterobacter cloacae</i>	98	99	CP010384.1
11	DsA.N013	427	<i>Serratia</i> sp.	100	98	AB934375.1
12	DsA.N014	422	<i>Streptomyces</i> sp.	100	99	AB686269.1
13	DsA.N019	475	<i>Ochrobactrum</i> sp.	100	97	FJ598438.1
14	DsA.N021	547	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	99	FJ529815.1
15	DsA.N022	491	<i>Pseudomonas mosselli</i>	100	99	JX985752.1
16	DsA.N023	425	<i>Pseudomonas mosselli</i>	99	98	JX985752.1
17	DsA.N024	620	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	99	KJ631601.1
18	DsA.N028	620	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	99	JF330157.1
19	DsA.N029	404	<i>Ochrobactrum</i> sp.	100	99	JN256921.1
20	DsA.N031	436	<i>Enterobacter</i> sp.	100	98	EU430755.1
21	DsA.N033	432	<i>Acinetobacter</i> sp.	100	99	KJ567117.2
22	DsA.N036	629	<i>Acinetobacter</i> sp.	100	99	GQ360067.1
23	DsA.N037	709	<i>Acinetobacter</i> sp.	100	100	GQ360067.1
24	DsA.N042	554	<i>Aurantimonas</i> sp.	98	99	KF836050.1
25	DsA.N043	550	<i>Rhizobium</i> sp.	99	99	KF202646.1
26	DsA.N045	339	<i>Enterobacter</i> sp.	100	99	HM150755.1

TABELA 4.5 - *continuação*. Resultados obtidos pelo sequenciamento parcial do gene 16S rDNA e comparação com banco de dados de NCBI usando a ferramenta BLAST.

Nº	Código	Pares de Base	Melhor Acerto (Gênero)	% Cobertura	% Identidade	Nº acesso Melhor Acerto
27	DsA.N046	571	<i>Klebsiella oxytoca</i>	100	98	KC593550.1
28	DsA.N047	661	<i>Acinetobacter</i> sp.	100	99	GU564358.1
29	DsA.N048	560	<i>Acinetobacter</i> sp.	100	100	GU564358.1
30	DsA.N049	510	<i>Delftia</i> sp.	100	99	KP207610.1
31	DsA.N050	705	<i>Acinetobacter</i> sp.	100	99	GU564358.1
32	DsA.N051	489	<i>Acinetobacter</i> sp.	100	99	GU564358.1
33	DsA.N052	581	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	99	KF013207.1
34	DsA.N053	578	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	99	KF013207.1
35	DsF.N001	500	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	98	KP986948.1
36	DsF.N002	443	<i>Empedobacter brevis</i>	100	99	LC050176.1
37	DsF.N003	528	<i>Luteibacter</i> sp.	100	98	KC841445.1
38	DsF.N004	452	<i>Enterobacter</i> sp.	100	96	KM253094.1
39	DsF.N005	498	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	98	KR063184.1
40	DsF.N006	488	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	99	KM021254.1
41	DsF.N008	501	<i>Acidovorax</i> sp.	100	99	JX005908.1
42	DsF.N010	410	<i>Enterobacter</i> sp.	99	99	KJ561247.2
43	DsF.N011	592	<i>Enterobacter</i> sp.	99	99	JN194193.1
44	DsF.N012	413	<i>Enterobacter</i> sp.	100	99	KM226159.1
45	DsF.N013	505	<i>Burkholderia gladioli</i>	100	99	CP009323.1
46	DsF.N014	690	<i>Pseudomonas monteilii</i>	100	100	KJ819568.1
47	DsF.N015	536	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	99	HQ634934.1
48	DsF.N016	570	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	100	100	KJ532116.1
49	DsF.N017	502	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	99	KR063184.1
50	DsF.N019	389	<i>Kluyvera</i> sp.	100	98	KJ879982.1
51	DsF.N020	638	<i>Serratia marcescens</i>	100	100	KP993209.1

Entre as quatro cepas que não apresentaram nenhum tipo de resultado confiável por MALDI-TOF MS, a caracterização por 16S rDNA indicou como melhores acertos os gêneros *Luteibacter* (DsF.N003), *Acidovorax* (DsF.N008), *Streptomyces* (DsA.N014) e *Aurantimonas* (DsA.N042). Observando o banco de dados do *software* MALDI Biotyper usado para fazer a identificação dos dados de MALDI-TOF MS, verifica-se a existência de algumas espécies descritas para cada um dos gêneros. Porém, como descrito anteriormente, o equipamento produz resultados altamente específicos para cada espécie, não sendo necessariamente produzido espectros com semelhança suficiente para espécies de mesmo gênero a ponto de gerar resultado confiáveis na classificação de espécies que não estão no banco de dados. Para avaliar esta possibilidade, foi novamente realizada a comparação das sequências para os quatro isolados usando o BLAST, selecionando os resultados de maior similaridade.

Para o isolado DsF.N003, as maiores similaridades são com alguns isolados não identificados de *Luteibacter* sp. além de resultados condizentes com a espécie *Luteibacter rhizovicinus*. Esta espécie existe no banco de dados MALDI Biotyper, porém o resultado de identificação não apresentou alta pontuação para esta espécie, mesmo sendo repetido algumas vezes, logo acredita-se tratar de uma espécie que não está no banco de dados ou mesmo uma nova espécie do gênero.

Da mesma forma, o isolado DsF.N008 apresenta como maior homologia uma identificação para uma espécie descrita como *Acidovorax wohlfarthii* (Número de Acesso Genbank: KC178583.1). Embora esta espécie possua uma entrada no banco de dados do NCBI e ser descrita em algumas publicações que utilizaram métodos de metagenômica para identificação de espécies presente em comunidades microbianas (OPELT e BERG, 2004; DAVIDSON e STAHL, 2006; GAO *et al.*, 2014; STANINSKA *et al.*, 2015), não existe ainda uma publicação científica válida descrevendo esta espécie, logo esta nomenclatura ainda não é válida e não se pode atribuir um nome científico válido.

A espécie DsA.N014 produziu resultados para espécies de *Streptomyces thermosacchari* e *Streptomyces coeruleus*, além de *Streptomyces* sp. Como ambas as espécies não possuem entradas no banco de dados do MALDI Biotyper, acredita-se que realmente a falta de identificação foi consequência da falta de espectros comparativos no banco de dados.

Já para a espécie DsA.N042, a identificação por 16S rDNA indicou como uma provável espécie do gênero *Aurantimonas* sp., mas também produziu resultados com uma porcentagem um pouco mais baixa para a bactéria *Aureimonas altamirensis*. Este organismo foi inicialmente identificado como *Aurantimonas altamirensis* (JURADO *et al.*, 2006), porém alguns anos mais tarde foi reclassificado como *Aureimonas altamirensis*. O banco de dados do MALDI não possui nenhuma bactéria do gênero *Aurantimonas*, entretanto possui a espécie *Aureimonas altamirensis* em sua biblioteca. Como a identificação não apresentou alta correlação com *A. altamirensis*, acredita-se que se trata de alguma outra espécie com alta homologia do gene 16S rDNA. Desta forma, considerou-se o resultado de maior similaridade, e o isolado foi classificado como *Aurantimonas* sp.

A Figura 4.9 apresenta um exemplo do espectro de massas obtido para cada um dos isolados que não produziram resultados confiáveis. Eles podem ser adicionados ao banco de dados existente, contribuindo para o aumento da capacidade de identificação pela técnica uma vez que elas forem devidamente identificadas por metodologias paralelas.

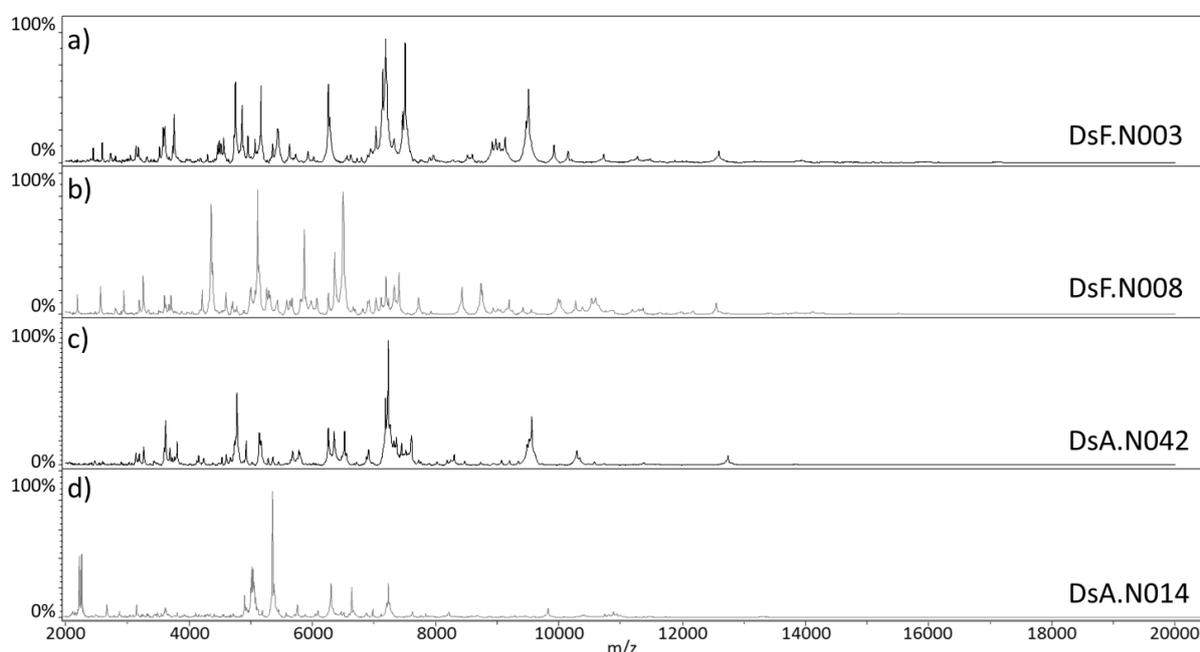


FIGURA 4.9 - Espectros de massas obtidos para as cepas que não apresentaram nenhuma identificação

Através dos resultados apresentados se pode concluir que ambas as técnicas foram eficientes na caracterização de isolados bacterianos, desde que existam em banco de dados informações que possam ser usadas como parâmetros de comparação. Entretanto, além dos resultados obtidos, outros fatores também devem ser considerados na hora de definir a utilidade e aplicabilidade de cada técnica para o desenvolvimento de um protocolo de identificação de organismos, especialmente quando se faz necessária uma alta demanda (*High Throughput*). A Figura 4.10 exemplifica a comparação entre o fluxograma de trabalho das duas técnicas selecionadas.

É nítido ao observar o esquema de trabalho que entre ambas as técnicas de identificação, o fluxo de trabalho para as análises de MALDI-TOF apresenta um menor número de etapas, além de envolverem etapas mais simples de serem executadas e o uso de reagentes mais acessíveis. De fato, a popularização do uso desta metodologia por MALDI leva a comparação entre os dois protocolos. Embora o sequenciamento do 16S rDNA ser utilizado nas últimas décadas como referência na identificação de bactérias, corroborando com a observação feita durante o desenvolvimento deste trabalho, existe uma constatação de que MALDI-TOF MS promove resultados de qualidade similar ou até superior do que a identificação tradicional por métodos bioquímicos ou moleculares, especialmente quando se faz necessária a classificação de diversas cepas ou serotipos dentro de uma espécie, com um menor consumo de tempo e recursos financeiros.

O custo de uma análise de identificação microbiana por MALDI representou o equivalente a um quinto do custo total de uma identificação por sequenciamento genético, sendo esta discrepância observada por outros autores (SENG *et al.*, 2009, 2010, EL-BOURI *et al.*, 2012; BISWAS e ROLAIN, 2013). Não apenas o custo operacional foi menor para as análises por MALDI, mas também o tempo de execução foi quantificado em 20% do necessário para análises genéticas tradicionais. As Tabela 4.6 e 4.7 apresentam um comparativo dos resultados das identificações realizadas pelas duas técnicas.

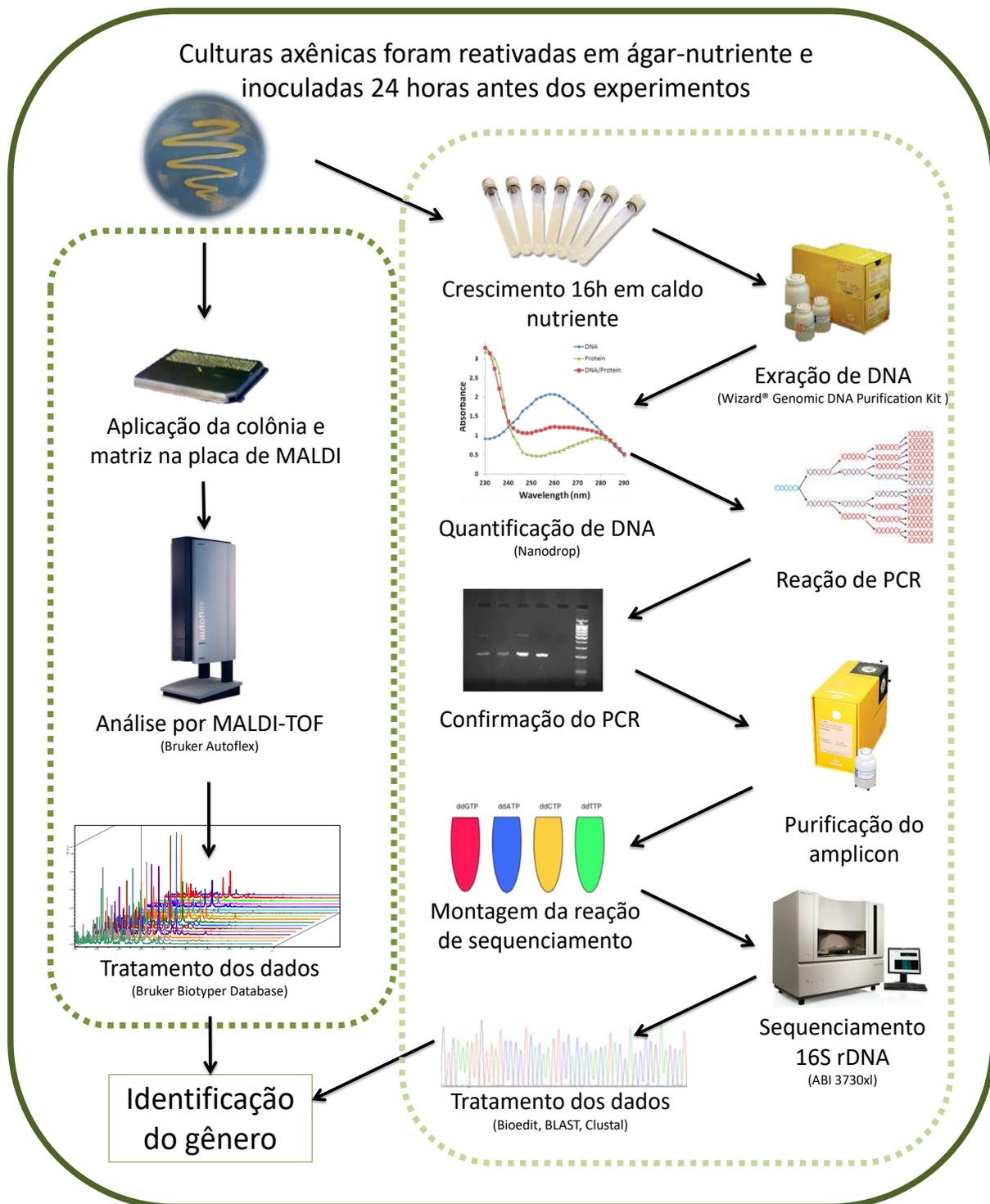


FIGURA 4.10 - Comparação das metodologias de identificação de micro-organismos por sequenciamento do gene 16S rDNA e perfil proteômico por MALDI-TOF MS.

TABELA 4.6 - Comparativo de identificações dos micro-organismos pelos métodos de MALDI-TOF MS e gene 16S rDNA.

<b>Número</b>	<b>Código</b>	<b>16S rDNA</b>	<b>MALDI-TOF MS</b>
1	DsF.N015	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
2	DsA.N051	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter junii</i>
3	DsA.N036	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter junii</i>
4	DsA.N002	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter junii</i>
5	DsA.N047	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter junii</i>
6	DsA.N050	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter junii</i>
7	DsA.N048	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter junii</i>
8	DsA.N037	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter junii</i>
9	DsA.N033	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter pittii</i>
10	DsA.N024	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter pittii</i>
11	DsA.N006	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter pittii</i>
12	DsA.N001	N.A.	<i>Acinetobacter baylii</i>
13	DsF.N013	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>
14	DsA.N049	<i>Delftia</i> sp.	<i>Delftia acidovorans</i>
15	DsF.N002	<i>Empedobacter brevis</i>	<i>Empedobacter brevis</i>
16	DsF.N012	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter asburiae</i>
17	DsF.N018	N.A.	<i>Enterobacter asburiae</i>
18	DsF.N004	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
19	DsA.N031	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
20	DsA.N045	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
21	DsF.N010	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
22	DsA.N011	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
23	DsF.N011	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
24	DsA.N026	N.A.	<i>Enterobacter cloacae</i>
25	DsA.N032	N.A.	<i>Enterobacter cloacae</i>
26	DsA.N035	N.A.	<i>Enterobacter cloacae</i>
27	DsA.N038	N.A.	<i>Enterobacter cloacae</i>
28	DsA.N039	N.A.	<i>Enterobacter cloacae</i>
29	DsA.N044	N.A.	<i>Enterobacter cloacae</i>
30	DsF.N007	N.A.	<i>Enterobacter cloacae</i>
31	DsA.N046	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
32	DsF.N019	<i>Kluyvera</i> sp.	<i>Kluyvera intermedia</i>
33	DsF.N003	<i>Luteibacter</i> sp.	Not reliable identification
34	DsA.N014	<i>Streptomyces</i> sp.	Not reliable identification
35	DsF.N008	<i>Acidovorax</i> sp.	Not reliable identification
36	DsA.N042	<i>Aurantimonas</i> sp.	Not reliable identification
37	DsA.N018	N.A.	<i>Ochrobactrum galinifaciens</i>
38	DsA.N029	<i>Ochrobactrum</i> sp.	<i>Ochrobactrum griggonense</i>
39	DsA.N019	<i>Ochrobactrum</i> sp.	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
40	DsA.N010	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
41	DsF.N005	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas monteilii</i>
42	DsF.N006	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas monteilii</i>

N.A. Não aplicado para este isolado.

TABELA 4.7 - Continuação do comparativo de identificações dos micro-organismos pelos métodos de MALDI-TOF MS e gene 16S rDNA.

<b>Número</b>	<b>Código</b>	<b>16S rDNA</b>	<b>MALDI-TOF MS</b>
43	DsF.N017	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas monteilii</i>
44	DsF.N014	<i>Pseudomonas monteilii</i>	<i>Pseudomonas monteilii</i>
45	DsA.N008	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas mosselii</i>
46	DsA.N023	<i>Pseudomonas mosselii</i>	<i>Pseudomonas mosselii</i>
47	DsA.N022	<i>Pseudomonas mosselii</i>	<i>Pseudomonas mosselii</i>
48	DsA.N009	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas mosselii</i>
49	DsA.N021	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas mosselii</i>
50	DsF.N001	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
51	DsA.N053	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
52	DsA.N052	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
53	DsA.N043	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium radiobacter</i>
54	DsA.N005	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia marcescens</i>
55	DsF.N020	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
56	DsA.N004	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia marcescens</i>
57	DsA.N013	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia marcescens</i>
58	DsA.N003	<i>Serratia</i> sp.	<i>Serratia marcescens</i>
59	DsA.N012	N.A.	<i>Serratia marcescens</i>
60	DsA.N034	N.A.	<i>Serratia marcescens</i>
61	DsF.N009	N.A.	<i>Serratia marcescens</i>
62	DsA.N025	N.A.	<i>Sphingobacterium multivorum</i>
63	DsA.N007	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
64	DsA.N028	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
65	DsF.N016	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
66	DsA.N041	N.A.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
67	DsA.N017	N.A.	<i>Streptomyces badius</i>
68	DsA.N027	N.A.	<i>Streptomyces badius</i>
69	DsA.N040	N.A.	<i>Streptomyces badius</i>
70	DsA.N015	N.A.	<i>Streptomyces griseus</i>
71	DsA.N016	N.A.	<i>Streptomyces griseus</i>
72	DsA.N020	N.A.	<i>Streptomyces griseus</i>
73	DsA.N030	N.A.	<i>Streptomyces griseus</i>

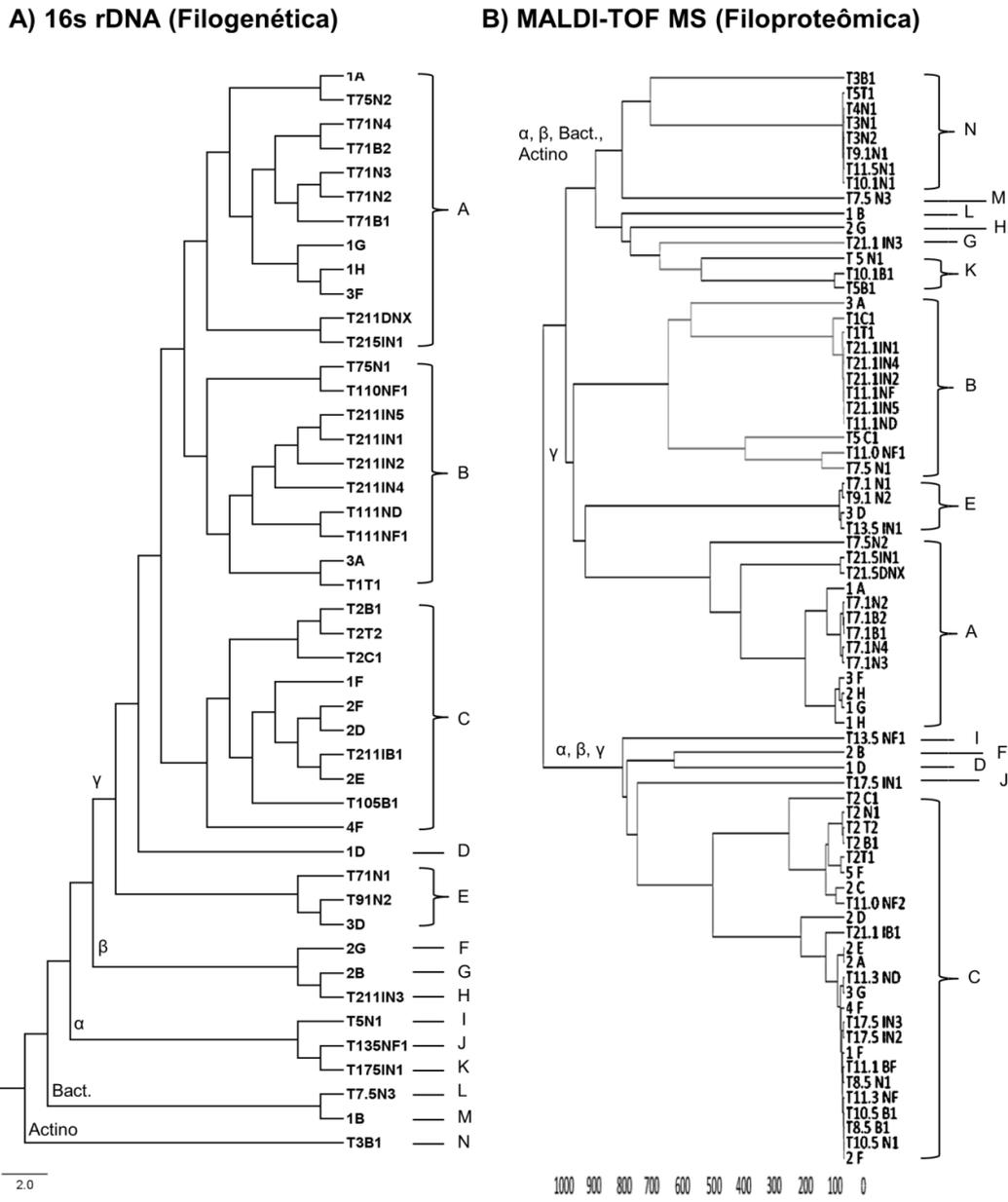
N.A. Não aplicado para este isolado.

Através dos resultados obtidos para a identificação dos micro-organismos por MALDI e sequenciamento, se pode observar que houve 100% de convergência na identificação bacteriana em nível de gênero, confirmando a eficiência do uso de MALDI-TOF MS para identificação de espécies bacterianas, mesmo para espécies obtidas de microbiomas pouco explorados. Cabe ressaltar também que a técnica espectrométrica, além das vantagens já descritas com relação a economia de tempo e custo, gerou resultados com maior precisão, sendo

possível a discriminação de alguns isolados até o nível de subespécie, o que não foi possível pela análises genética realizada. Para alcançar tal precisão, seria necessário o sequenciamento completo do gene 16S rDNA e possivelmente o sequenciamento de outras regiões para se obter o mesmo resultado. Os dados genéticos e espectrométricos obtidos foram utilizados para construção das árvores filogenética e filoproteômica respectivamente. Ambas as árvores construídas estão representadas na Figura 4.11.

Comparando ambos os métodos de identificação foi possível observar que os agrupamentos entre espécies de mesmo gênero foram idênticos para ambas composições, havendo inclusive a mesma incapacidade de se separar com precisão espécies pertencentes a gêneros diferentes da ordem Enterobacteriaceae, sendo necessário o agrupamento de todos em um mesmo cluster. Este fenômeno já é descrito na literatura, sendo necessário o sequenciamento de outras regiões para alcançar uma melhor distinção entre as espécies dessa ordem (PARADIS *et al.*, 2005; JANDA e ABBOTT, 2007). Para todos os outros gêneros houve o agrupamento sem ambiguidades. Todavia, uma tendência interessante quando se compara os níveis mais distantes de agrupamento pode ser notada. Enquanto a árvore filogenética apresenta sua composição totalmente de acordo com as classificações taxonômicas evolutivas descritas para bactérias, o mesmo padrão não pode ser observado na árvore filoproteômica. As similaridades e discrepâncias encontradas entre os padrões de agrupamento dos métodos genético e proteômico estão de acordo com outras observações relatadas na literatura (DIECKMANN *et al.*, 2005; BÖHME *et al.*, 2010, 2011, 2013), onde se observa que os resultados de MALDI-TOF podem condizer ou não com a taxonomia filogenética, porém essa discrepância não necessariamente significa erros operacionais ou de interpretação, uma vez que apesar de ambas as técnicas fornecerem resultados de identificação confiáveis, as matrizes de dados utilizadas para a caracterização são completamente diferentes. A taxonomia filogenética envolve a utilização de uma sequencia de 1500 pares de bases que codifica um RNA ribossomal, parte integrante de uma das unidades do ribossomo, para se inferir a classificação das espécies, sendo este gene considerado eficiente por apresentar ao mesmo tempo regiões extremamente conservadas e outras hiper-variáveis, e por isso apresenta um viés evolutivo (JANDA e ABBOTT, 2007). Por outro lado, o experimento de MALDI-TOF MS fornece uma

impressão digital de uma janela de tamanho molecular do proteoma, esse sendo considerado como uma representação funcional da genômica como um todo.



- |           |                                |           |                            |           |                                |
|-----------|--------------------------------|-----------|----------------------------|-----------|--------------------------------|
| <b>A)</b> | <b><i>Pseudomonas</i></b>      | <b>F)</b> | <b><i>Acidovorax</i></b>   | <b>K)</b> | <b><i>Ochrobactrum</i></b>     |
| <b>B)</b> | <b><i>Acinetobacter</i></b>    | <b>G)</b> | <b><i>Delftia</i></b>      | <b>L)</b> | <b><i>Empedobacter</i></b>     |
| <b>C)</b> | <b>Enterobacteriaceae</b>      | <b>H)</b> | <b><i>Burkholderia</i></b> | <b>M)</b> | <b><i>Sphingobacterium</i></b> |
| <b>D)</b> | <b><i>Luteibacter</i></b>      | <b>I)</b> | <b><i>Aurantimonas</i></b> | <b>N)</b> | <b><i>Streptomyces</i></b>     |
| <b>E)</b> | <b><i>Stenotrophomonas</i></b> | <b>J)</b> | <b><i>Rhizobium</i></b>    |           |                                |

FIGURA 4.11 - Árvores de classificação taxonômicas para os isolados. A) Árvore filogenética derivada dos dados de 16S rDNA; e B) Árvore filoproteômica derivada dos dados de MALDI-TOF MS

Desta forma, dois pontos devem ser levados em consideração. Primeiro, que a quantidade de informação obtida por MALDI-TOF é muito mais abrangente e espécie-específica, visto que se avalia um conjunto de proteínas previamente expressadas por uma coleção de genes ao invés de um trecho de um gene de uma ribonucleoproteína. E segundo, o fato de que ao avaliar o perfil de proteínas, leva-se em consideração a capacidade bem descrita de micro-organismos adquirirem genes de outras espécies por mecanismos de transmissão horizontal de material genético (SYVANEN, 2012). Desta forma, os experimentos de MALDI-TOF podem indicar micro-organismos que não possuem relação evolutiva próxima mas produzem proteínas similares, e caso essa afirmação seja verdadeira pode-se considerar que o agrupamento observado indica não uma proximidade evolutiva, mas sim uma proximidade funcional.

Os isolados obtidos são todos de gêneros Gram (-), com exceção dos isolados de *Streptomyces*, Gram (+). Dentre os gêneros mais abundantes encontrados, a maioria pertencem ao filo proteobacteria e a classe  $\gamma$ -proteobacteria. A tabela 4.8 apresenta um resumo das classificações taxonômicas dos isolados obtidos do inseto *D. speciosa*.

Com relação às interações ecológicas e microbiota de insetos do gênero *Diabrotica*, este estudo está entre os que apontam uma maior diversidade de micro-organismos associados. Considerando a composição e distribuição das espécies bacterianas, vários dos gêneros microbianos já foram encontrados e descritos em associação com o gênero *Diabrotica*. SCHALK *et al.* (1987) exploraram a microbiota de *D. balteata* mantida em condições de campo e de laboratório. No total, os autores obtiveram 83 isolados de 17 gêneros, sendo alguns deles também encontrados em associação a *D. speciosa*, tais como *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Serratia*. TRAN e MARRONE (1988) avaliaram a microbiota de *D. undecimpunctata* cultivada tanto em solo quanto em dietas artificiais, encontrando uma predominância de *E. cloacae*, bem como espécies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Acinetobacter*. Em outro estudo de campo envolvendo algumas espécies de *Diabrotica* (*D. virgifera*, *D. barberi* e *D. undecimpunctata*), PRISCHMANN *et al.* (2008) também identificaram diversos gêneros em comum, como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pseudomonas* e espécies de *Serratia* com e sem produção de pigmento.

TABELA 4.8 - Resumo dos gêneros identificados e sua classificação taxonômica.

<b>Filo</b>	<b>Classe</b>	<b>Ordem</b>	<b>Familia</b>	<b>Gênero</b>	<b>Nº isolados</b>
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	8
Bacteroidetes	Flavobacteria	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Empedobacter</i>	1
Bacteroidetes	Sphingobacteria	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Sphingobacterium</i>	1
Proteobacteria	$\alpha$ - Proteobacteria	<i>Rhizobiales</i>	<i>Aurantimonadaceae</i>	<i>Aurantimonas</i>	1
Proteobacteria	$\alpha$ - Proteobacteria	<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>	1
Proteobacteria	$\alpha$ - Proteobacteria	<i>Rhizobiales</i>	<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	3
Proteobacteria	$\beta$ - Proteobacteria	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax</i>	1
Proteobacteria	$\beta$ - Proteobacteria	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	1
Proteobacteria	$\beta$ - Proteobacteria	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i>	1
Proteobacteria	$\gamma$ - Proteobacteria	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Luteibacter</i>	1
Proteobacteria	$\gamma$ - Proteobacteria	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	4
Proteobacteria	$\gamma$ - Proteobacteria	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i>	1
Proteobacteria	$\gamma$ - Proteobacteria	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Kluyvera</i>	1
Proteobacteria	$\gamma$ - Proteobacteria	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia</i>	8
Proteobacteria	$\gamma$ - Proteobacteria	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	15
Proteobacteria	$\gamma$ - Proteobacteria	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	12
Proteobacteria	$\gamma$ - Proteobacteria	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	13
<b>Total</b>					<b>73</b>

CHU *et al.* (2013) utilizaram técnicas de metagenômica para avaliar todos os organismos presentes do trato gastrointestinal de *D. virgifera* selvagens e resistentes a soja. Mais da metade do microbioma era constituído de espécies do gênero *Enterobacter*, *Serratia* e *Pseudomonas*, além de níveis mais baixos de *Klebsiella*, *Stenotrophomonas* e *Kluyvera*. Nas variedades resistentes, não foram observados espécies de *Kluyvera* e *Serratia*, além de ser nítido um decréscimo de *Enterobacter*. Entretanto, os autores observaram um aumento em bactérias dos gêneros *Klebsiella* e *Stenotrophomonas*, além do aparecimento de novas espécies, com o maior aumento relacionado à *Acinetobacter* e uma espécie diferente de *Pseudomonas*.

Cabe ressaltar que o trabalho realizado por CHU *et al.* (2013) foi realizado de maneira *non-targeted*, ou seja, utilizando métodos não específicos de amplificação e tecnologias de sequenciamento de última geração para a avaliação metagenômica total da comunidade, permitindo a avaliação do material genético microbiano do organismos sem a necessidade de etapas prévias de isolamento o que, em teoria, permite a observação de micro-organismos considerados não-cultiváveis. Mesmo assim, os resultados produzidos por CHU *et al.*, (2013) se assemelham quali e quantitativamente aos obtidos nos trabalhos que envolveram isolamento e posterior identificação dos micro-organismos em associação com insetos do gênero *Diabrotica*. A similaridade entre os resultados indica que para estudos de microbiota podem ser realizados também através do isolamento, permitindo não apenas uma avaliação abrangente da microbiota, mas também obter cepas microbianas que podem ser usadas em diversos ensaios futuros, sendo indicado que uma boa porcentagem dos organismos presentes foi de fato caracterizada. A Figura 4.12 mostra a relação entre a distribuição dos gêneros bacterianos observados para os insetos do gênero *Diabrotica* já descritos na literatura.

Observando os micro-organismos associados aos insetos do gênero *Diabrotica*, pode-se observar a existência de uma comunidade microbiana central presente em todos os insetos do gênero. Bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Stenotrophomonas* foram encontradas em todos os gêneros, a exceção de *Stenotrophomonas* em *D. balteata*, sendo importante ressaltar que este gênero já foi classificado como *Pseudomonas*

(CONLY e SHAFRAN, 1996), sendo movido de gênero posteriormente a publicação do trabalho de SCHALK *et al.* (1987), indicando uma alta homologia entre os micro-organismos mais abundantes e o gênero *Diabrotica*.

Apesar de alguns relatos presentes na literatura para micro-organismos associados a insetos de gênero *Diabrotica*, este trabalho, até onde sabemos, é o primeiro relato de estudos de microbiota associada a *D. speciosa*. O inseto apresentou uma expressiva quantidade de micro-organismos associados, que pode estar relacionado com sua alta polifagia.

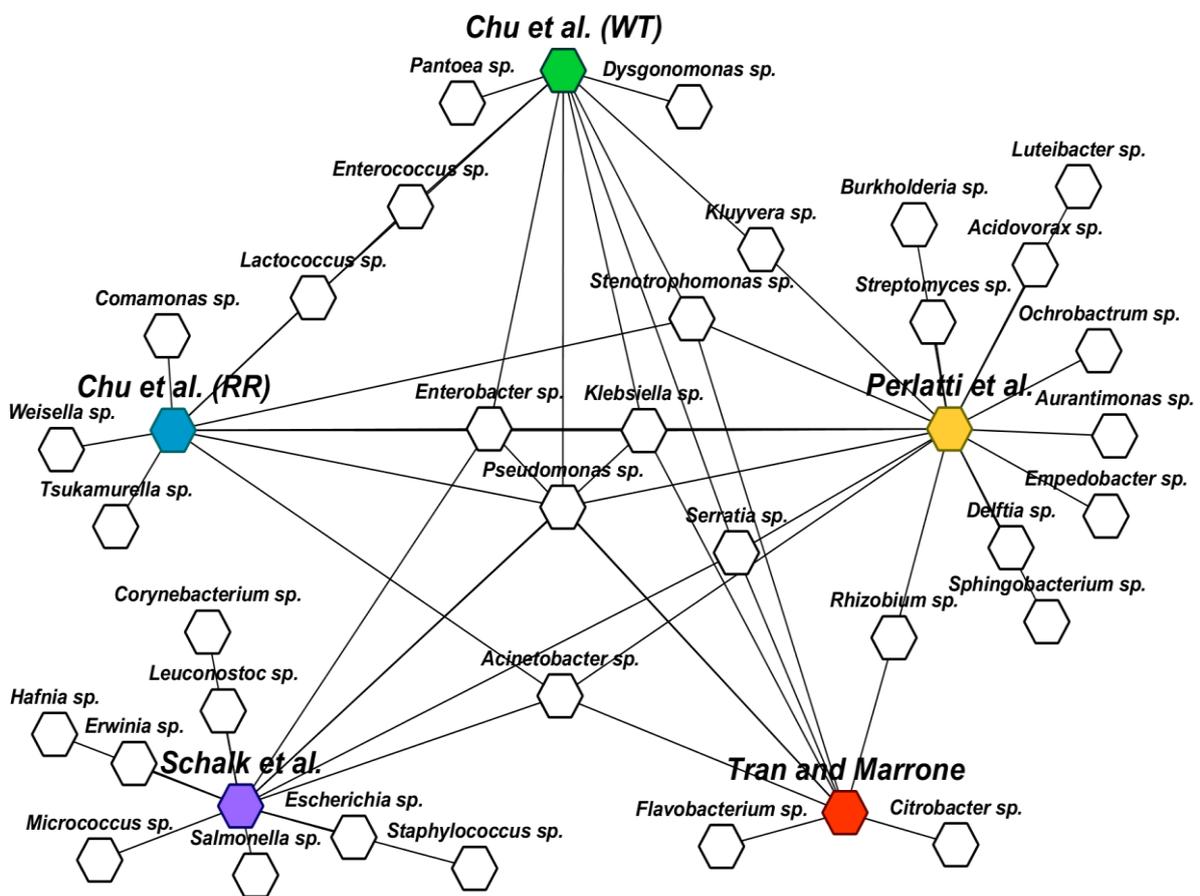


FIGURA 4.12 - Comparação entre os gêneros microbianos observados em insetos do gênero *Diabrotica*. Gêneros sublinhados no texto e marcados nos gráficos indicam um microbioma central relacionado ao gênero. (SCHALK *et al.*, 1987; TRAN e MARRONE, 1988; CHU *et al.*, 2013).

Sabe-se que *D. virgifera* utiliza seus simbiontes intestinais para suprimir defesas de plantas e aumentar as moléculas que atuam como pistas químicas (*cues*) para forrageamento (BARR *et al.*, 2010), uma vez que a sua

atividade é mantida mesmo após remoção de simbioses intracelulares como *Wolbachia* (ROBERT *et al.*, 2013), indicando que os efeitos são relacionados a simbioses intestinais e não intracelulares. Ademais, provou-se que a ação dos simbioses intestinais é responsável por tornar a *D. virgifera* mais resistente a deterrência causada pela alimentação em soja (CHU *et al.*, 2013). Estes exemplos ilustram a correlação entre a diversidade da microbiota intestinal e a capacidade de expansão da hábitos alimentares e resistência a métodos de controle como a rotação de culturas. Os insetos neste trabalho foram alimentados com brotos jovens de milho enquanto larvas, e folhas de feijão enquanto adultos, onde ambos possuem associações com alguns dos gêneros isolados neste trabalho como *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Luteibacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas* e *Streptomyces* (ZINNIEL *et al.*, 2002; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2010; JONHSTON-MONJE e RAIZADA, 2011), que representam mais da metade dos isolados, sendo que podem ter sido obtidos tanto por transmissão direta via alimentação quanto por transferência vertical através do ovo.

Dos isolados mais abundantes observados neste trabalho, apenas o gênero *Streptomyces* se mostrou presente em *D. speciosa*, porém ausente nos demais insetos do gênero. Vale ressaltar que tem sido crescente o número de relatos de associações entre insetos da ordem Coleoptera que utilizam cepas de *Streptomyces* para proteger ovos e fontes de alimentos das larvas de infestações patogênicas, incluindo a espécie *S. thermosacchari*, que apresenta alta homologia genética com um dos isolados obtidos (KALTENPOTH, 2009; HULCR *et al.*, 2011; SEIPKE *et al.*, 2012; RAMADHAR *et al.*, 2014). Esta interação pode levar a novos conhecimentos sobre a associação direta (além do microbioma intestinal) relacionados a hábitos alimentares de *D. speciosa*. Além do mais, até onde sabemos este trabalho mostra pela primeira vez na literatura a associação de bactérias do gênero *Sphingobacterium* e *Streptomyces* com insetos do gênero *Diabrotica*.

#### **4.4 - Conclusões**

Um total de 73 cepas bacterianas foram isoladas e identificadas, sendo 69 identificados por MALDI-TOF MS, e 51 por sequenciamento do gene 16S rDNA. Todos os organismos foram identificados pelo menos em nível de gênero por uma ou ambas as técnicas usadas. No total, foram identificados 17 gêneros, sendo em

sua grande maioria  $\gamma$ -Proteobacteria, com predomínio das ordens Pseudomonadales e Enterobacteriales, com um terço dos isolados cada. O inseto *D. speciosa* apresentou uma grande variação na constituição de seu microbioma, apresentando uma das microbiotas com maior número de espécies quando comparado com outros insetos do mesmo gênero. Ainda comparando os resultados obtidos com o descrito na literatura referente ao gênero, um microbioma central a todas as espécies do gênero pode ser identificado. As duas metodologias se mostraram eficientes na caracterização dos micro-organismos, sendo que a técnica de MALDI-TOF MS se mostrou vantajosa em diversos aspectos como custo, rapidez e acurácia nos resultados. As técnicas moleculares e espectrométricas mostraram completa concordância nas classificações, porém as análises de agrupamento revelaram padrões de agrupamento taxonômicos distintos.



**5 - Avaliação do potencial de bactérias isoladas de *D. speciosa* para produção de polihidroxicanoatos (PHA).**

## 5.1 - Introdução

Polihidroxicanoatos (PHA) são poliésteres biodegradáveis acumulados intracelularmente por diversos micro-organismos, principalmente em bactérias, como reserva de carbono, em resposta a um desbalanço nutricional envolvendo excesso de carbono e limitação de crescimento devido a falta de outros nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (ANDERSON e DAWES, 1990). A ocorrência de PHA em células microbianas foi descrita pela primeira vez em 1888 por Beijerinck, e estudado de maneira sistemática por Lemoigne a partir de 1923 (LAYCOCK *et al.*, 2014). Porém, sua aplicação como material estrutural para utilização em escala comercial como um possível substituto aos polímeros petroquímicos não foi explorada até o começo do século XIX. A Figura 5.1 apresenta uma micrografia de uma célula de *Cupriavidus necator* DSM 545 com acúmulo intracelular de PHA (grânulos mais claros).

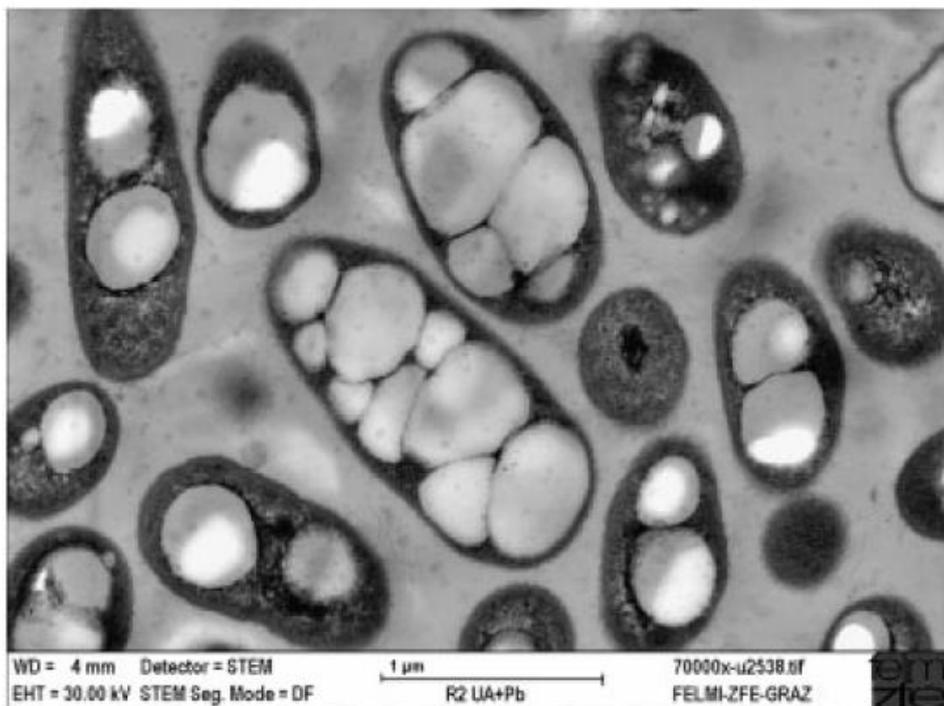
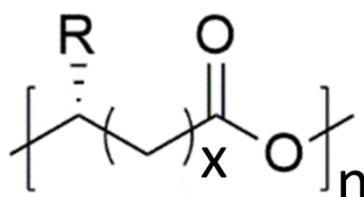


Figura 5.1 - Micrografia de células microbianas de *Cupriavidus necator* DSM 545 contendo variáveis concentração de grânulos de PHA (KOLLER *et al.*, 2011).

Os PHAs podem ser classificados pelo tamanho da cadeia lateral de seus monômeros. A classe de polímeros mais extensivamente estudada, por ser de maior abundância e produzidas por uma ampla gama de organismos produtores, são os PHAs de cadeia curta (*scl*-PHA; *short-chain length*-PHA). Os PHAs são polímeros contendo monômeros que possuem entre três e cinco átomos de carbono, sendo o polihidroxibutirato (PHB) o mais estudado dentre os possíveis polímeros. A segunda classe são os PHAs de cadeia média (*mcl*-PHA; *medium-chain length*-PHA), onde seus monômeros podem conter entre seis e quatorze átomos de carbono e produzidos apenas por algumas pseudomonadas com condições e substratos específicos (TAN *et al.*, 2014). A massa molecular do polímero pode variar de acordo com o organismo, do cultivo e do processamento do material, e pode variar de algumas centenas a alguns milhões de Da (BUGNICOURT *et al.*, 2014). A Figura 5.2 apresenta a estrutura básica dos polihidroxicanoatos.



	n	R	Nome
scl-PHA	1	Hidrogênio	Poli 3-hidroxipropionato (PHP)
	1	Metil	Poli 3-hidroxibutirato (PHB)
	1	Etil	Poli 3-hidroxivalerato (PHV)
mcl-PHA	1	Propil	Poli 3-hidroxihexanoato (PHHx)
	1	Nonil	Poli 3-hidroxidedacanoato
	2	Hidrogênio	Poli 4-hidroxibutirato
	3	Hidrogênio	Poli 5-hidroxivalerato

FIGURA 5.2 - Estruturas químicas das principais classes dos polihidroxicanoatos.

A produção e acúmulo de PHAs estão intimamente ligados à regulação extensiva por agregados de genes biossintéticos. A biossíntese de *scl*-PHA apresenta uma enorme versatilidade, como exemplifica a Figura 5.3.

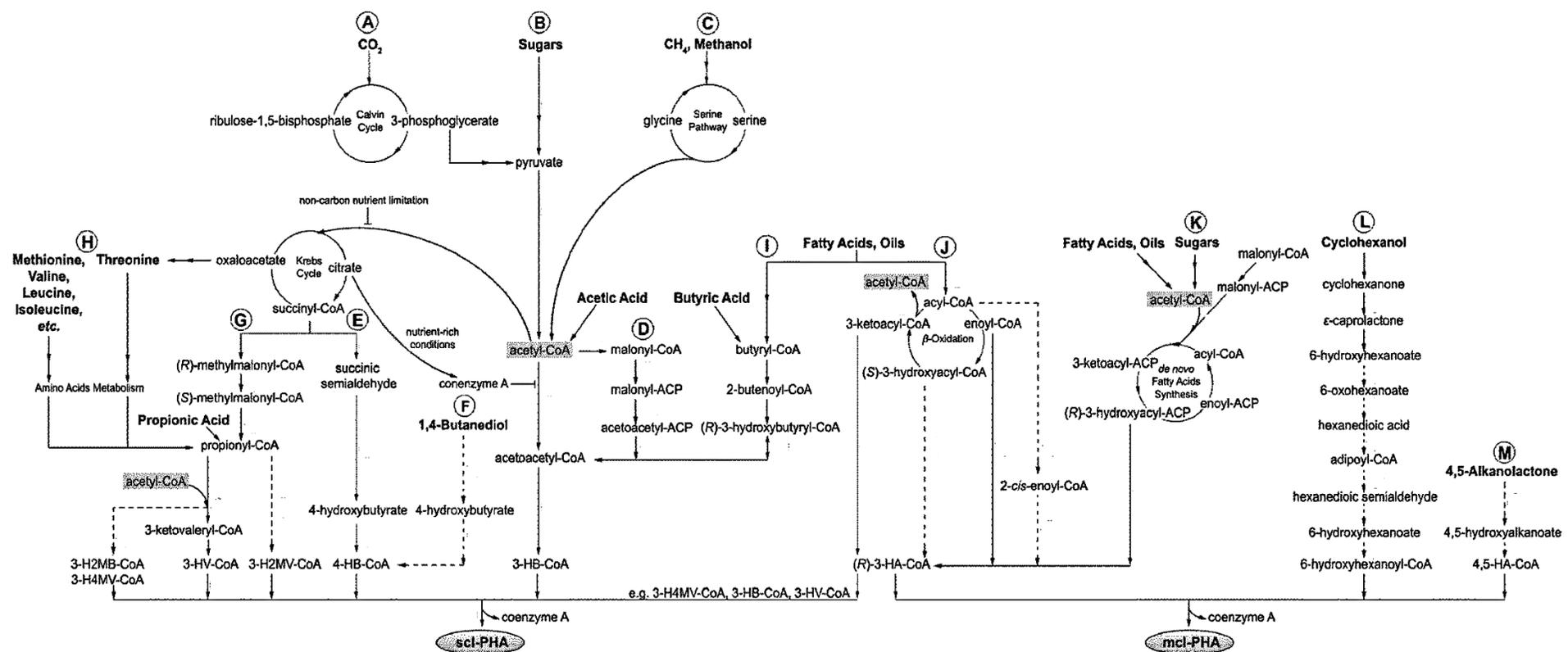


FIGURA 5.3 - Possíveis rotas biossintéticas descritas para assimilação de diferentes substratos na síntese de PHA. As letras A-M representam os possíveis substratos iniciais passíveis de serem usados para biossíntese de PHAs. Setas cheias indicam rotas enzimáticas conhecidas; setas pontilhadas representam rotas biossintéticas putativas. 3-H2MB-CoA - 3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA; 3-H4MV-CoA - 3-hydroxy-4-methylvaleryl-CoA; 3-HV-CoA - 3-hydroxyvaleryl-CoA; 3-H2MV-CoA - 3-hydroxy-2-methylvaleryl-CoA; 4-HB-CoA - 4-hydroxybutyryl-CoA; 3-HB-CoA - 3-hydroxybutyryl-CoA; (R)-3-HA-CoA - (R)-3-hydroxyacyl-CoA; 4,5-HA-CoA - 4,5-hydroxyacyl-CoA). Adaptado de Tan *et al.*, 2014.

A rota mais utilizada por organismos aeróbios, através da metabolização de açúcares (Rota B, figura 5.3), envolve a condensação de dois monômeros do precursor acetil-CoA (podendo ser propionil-CoA no caso de incorporação de valerato) pela enzima acetoacetil-CoA tiolase (PhaA), com subsequente redução (*R*)-estereoespecífica catalisada por uma acetoacetil-CoA redutase (ou 3-cetoacil-CoA redutase) (Pha B), formando o precursor (*R*)-3-hidroxi-butiril-CoA, que é subsequentemente polimerizado pela enzima PHA sintase (PhaC) (RHEM, 2010). Para a síntese de polímeros de cadeia média, outras enzimas estão envolvidas no processo, mantendo sempre a estereoespecificidade devido aos precursores e enzimas envolvidas (MITTENDORF *et al.*, 1998; MADISON e HUSIMAN, 1999). PHAs são depositados como inclusões intracelulares com um núcleo amorfo e hidrofóbico de PHA cercado de proteínas envolvidas no metabolismo desta classe de composto. Em certo sentido, o grânulo atua como uma “organela”, regulando o processo de produção e degradação pela atividade biossintética da enzima PHA sintase e atividade tiolítica das enzimas PHA depolimerase (LU *et al.*, 2009). Devido a esta grande plasticidade biossintética, há a possibilidade de se obter diversos tipos de monômeros pela adição de precursores adequados, bem como o uso de uma ampla diversidade de fontes de carbono. Além dos diversos homopolímeros produzidos, diversos organismos são capazes de produzir heteropolímeros contendo em sua estrutura dois ou mais tipos de monômeros. Sendo assim, de uma maneira geral os PHAs são termoplásticos que podem variar substancialmente em sua composição e suas propriedades químicas e mecânicas de acordo com sua composição e tamanho molecular. Mais de 150 polímeros já foram identificados, resultando em uma enorme diversidade de materiais com diferentes propriedades de acordo com sua composição (VERLINDEN *et al.*, 2007). A Figura 5.4 ilustra toda a cadeia produtiva dos polihidroxicanoatos, ilustrando a multidisciplinariedade envolvida para o entendimento do processo, iniciando-se na parte biológica pelo conhecimento da rota biossintética, passando pela caracterização química e mecânica, essencial para o entendimento das características do material, o que permite propor aplicações de mercado.

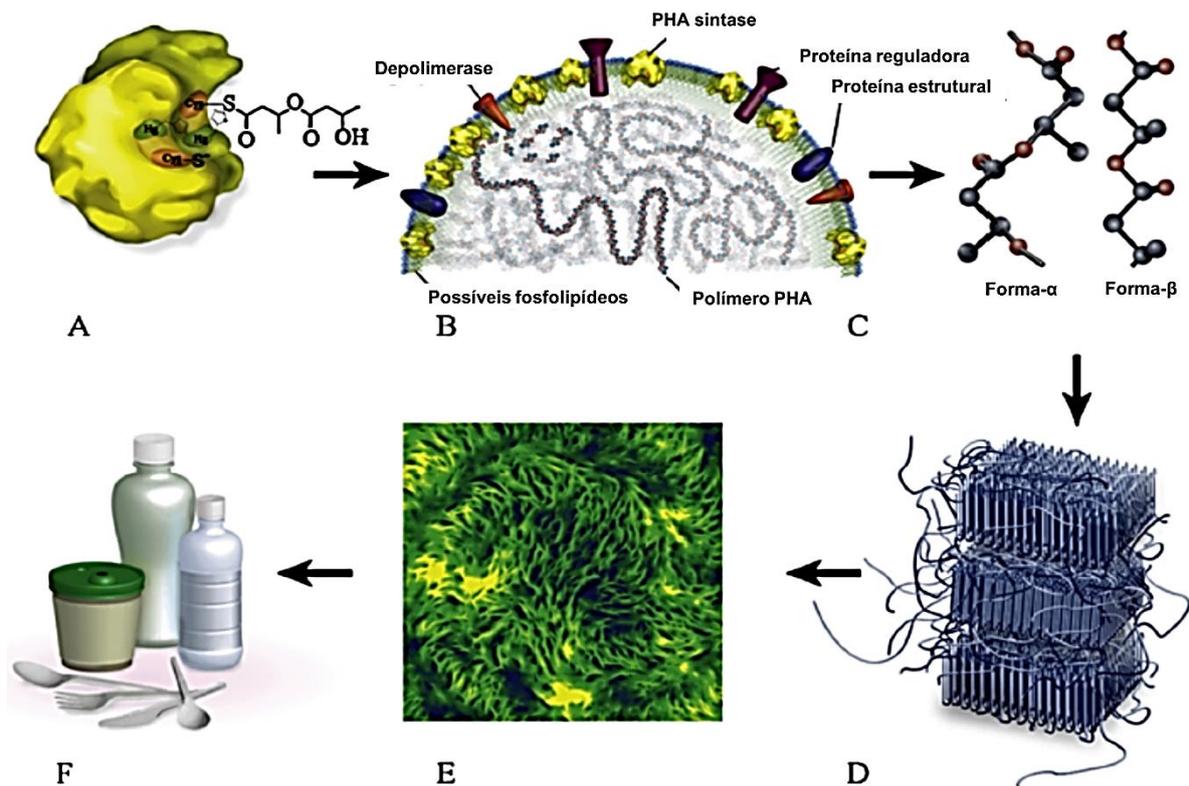


FIGURA 5.4 - Visão geral da cadeia de processos associados aos polihidroxicanoatos. A) Representação esquemática da polimerização enzimática em cadeia. B) Representação esquemática de um grânulo de PHA com suas proteínas associadas. C) Formas  $\alpha$ - e  $\beta$ - do polímero (apenas a  $\beta$  é encontrada naturalmente). D) Estrutura semicristalina do polímero. E) Imagem de microscopia de força atômica de um filme de PHBV. F) Produtos plásticos produzidos possíveis de serem produzidos com o material obtido. (Adaptado de LAYCOCK *et al.*, 2014).

A literatura descreve diversos exemplos de acúmulo de PHA a partir de uma ampla diversidade de bactérias cultivadas em meios não balanceados, sendo mais de 300 espécies, de 80 gêneros já descritos (CHODAK, 2008; KOLLER *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2014). Um grande número de gêneros são descritos na literatura como capazes de produzir *scf*-PHA, sob várias condições e com diferentes rendimentos. A vasta maioria é capaz de produzir apenas PHB com condições e substratos comuns, sendo necessário o fornecimento de precursores específicos para se alcançar novos polímeros. Mesmo assim, a produção não ocorre em quantidades suficientes para que haja uma exploração comercial. Entretanto, um número limitado de cepas microbianas é capazes de produção de PHA em altíssima

quantidade, com rendimentos superiores a 90% de sua massa seca, e outras também são capazes de introduzir naturalmente alguns outros monômeros, principalmente valerato (CHODAK, 2008).

As propriedades dos polímeros são descritas de acordo com a estrutura química do material, sendo a composição monomérica e o tamanho molecular/ polidispersidade os mais importantes. Do ponto de vista de aplicação industrial, a produção de PHB é considerada controversa. O polímero é produzido utilizando-se fontes renováveis, sendo completamente biodegradável e biocompatível, altamente hidrofóbico e termoplástico, com alta cristalinidade, alto ponto de fusão, boa resistência a solventes orgânicos e excelente força mecânica, apresentando características similares ao polipropileno (SUDESH *et al.*, 2000; PHILIP *et al.*, 2007). Apesar de todas estas propriedades, a aplicação industrial deste polímero é limitada a aplicações pontuais, devido principalmente a suas características mecânicas como sua grande fragilidade, baixa deformação, alta degradação térmica e conseqüente dificuldades no processamento quando utilizados equipamentos atuais de tecnologia para termoplásticos (BUGNICOURT *et al.*, 2014). Porém, o custo ainda é apontado como o principal fator que inibe a entrada deste material em aplicações em larga escala.

Por outro lado, seu copolímero com valerato (PHBV) é muito mais aceitável comercialmente, apresentando uma melhora em sua dureza em troca de uma ligeira perda de força e módulo. Por apresentar estas melhoras significativas, é considerado como um promissor substituto aos plásticos utilizados hoje em dia. Entretanto, a produção de PHBV necessita de tecnologias e precursores que elevam ainda mais o custo da produção (CHODAK, 2008). Outros monômeros também possuem promissoras aplicações. A Figura 5.5 descreve os PHAs de maior interesse e suas possíveis aplicações.

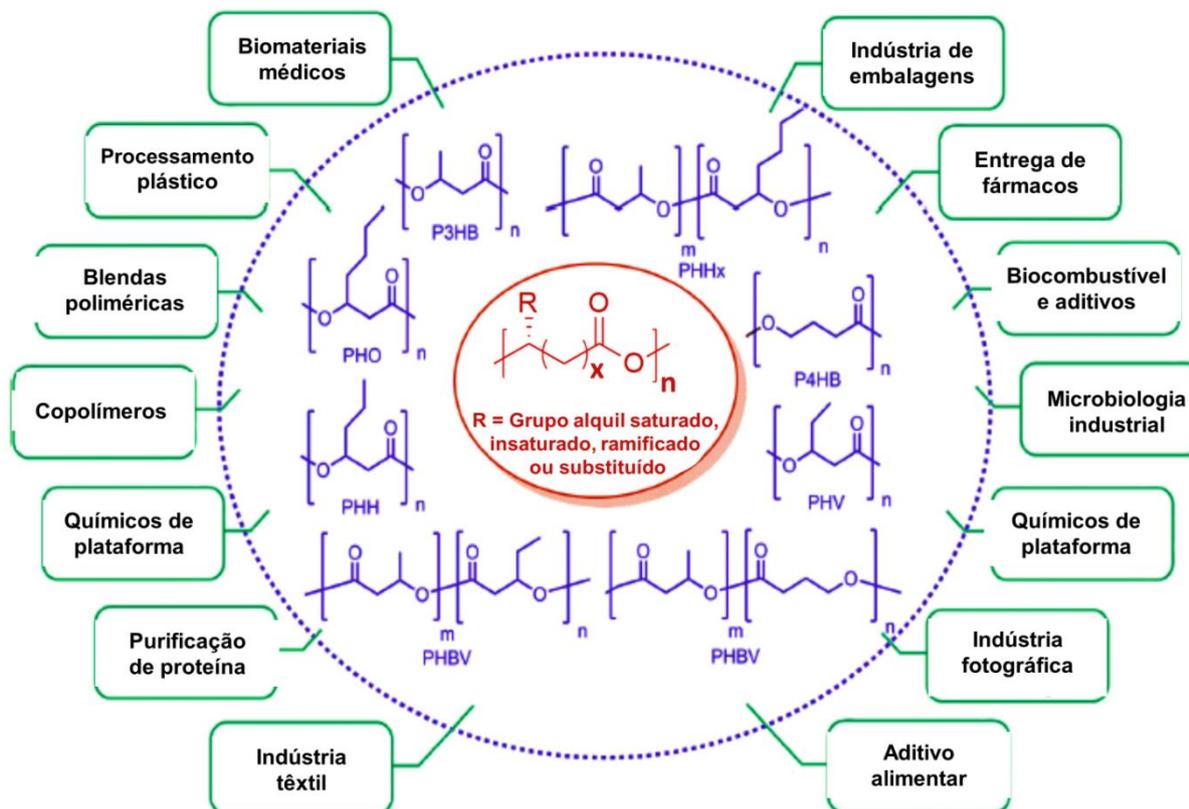


FIGURA 5.5 - Principais polímeros da classe dos PHAs e suas aplicações mais promissoras. Adaptado de ISIKGOR e BECER, 2015

Apesar da grande disponibilidade de bactérias, o PHA comercialmente encontrado é produzido de maneira economicamente viável por apenas algumas bactérias. Entretanto, estas espécies ainda apresentam alguns problemas como baixas temperaturas de cultivo e longos períodos de crescimento, além de rotas biossintéticas endógenas para degradação concomitante de PHA. Idealmente, estes problemas relacionados aos micro-organismos utilizados precisam ser superados enquanto se mantém a alta produção de polímero. Estes problemas, aliado ao pouco conhecimento da variedade microbiana, tornam a busca por novas cepas produtoras um importante objetivo de investigação.

Além do problema de escolha do micro-organismo, a produção competitiva do polímero em escala esbarra em outro problema. Os custos da produção de bioplásticos giram em torno de 5-10 vezes o custo de produção de polímeros derivados de petroquímicos, sendo a viabilidade econômica da produção industrial de PHA determinada em grande parte (até 50% do custo de produção) pelo custo do substrato (TAN *et al.*, 2014). Uma vantagem da produção de PHA está

na grande versatilidade metabólica devido às diversas rotas biossintéticas existentes para incorporação de substratos na produção de PHA, o que permite que uma ampla gama de compostos orgânicos possam ser usados como substrato para o acúmulo de polímero, tornando-se um alvo em potencial para promover o beneficiamento de subprodutos agroindustriais ou outras fontes de carbono subutilizadas (BAGHERIASL 2012). O uso, portanto, de materiais de baixo custo como subprodutos industriais, elencando-os a condição de matéria-prima de partida para a produção de biopolímeros constitui uma alternativa viável para produção economicamente eficiente.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar, dentre os isolados bacterianos obtidos de *D. speciosa*, aqueles que possuem capacidade de produção de polihidroxialcanoatos em grande quantidade e com uso de fontes alternativas de carbono.

## **5.2 - Experimental**

### **5.2.1 - Métodos microbiológicos para obtenção de polihidroxialcanoatos**

#### **5.2.1.1 - Triagem Qualitativa da produção de PHA**

A avaliação qualitativa da capacidade de acumulação de PHA em células bacterianas isoladas de *D. speciosa*, os micro-organismos foram cultivados diretamente em meio de cultura sólido contendo em sua composição vermelho do Nilo, um corante lipofílico fluorescente que interage com os grânulos intracelulares de PHA permitindo a sua visualização diretamente na placa, seguindo uma metodologia proposta por BERLANGA *et al.* (2006), com modificações. Inicialmente os isolados foram reativados em meio de cultura NA até crescimento vigoroso, sendo posteriormente transferidos, com o uso de uma alça de platina estéril, para placas de Petri com meio de cultura sólido definido, denominado NR, contendo em sua composição 10.0 g.L<sup>-1</sup> de dextrose, 1.0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de corante vermelho do Nilo e 17.0 g.L<sup>-1</sup> de ágar. As bactérias foram cultivadas em

estufa BOD por até dez dias. Para avaliação, as bactérias foram submetidas à iluminação com uma lâmpada de comprimento de onda de 245 nm, e a intensidade da fluorescência produzida pelos acúmulos intracelulares de PHA ranqueados qualitativamente. As cepas foram classificadas em não-fluorescente (-); baixa fluorescência (+); e alta fluorescência (++) .

#### **5.2.1.2 - Avaliação quantitativa da produção de PHA por cepas selecionadas**

Os micro-organismos selecionados na etapa 5.2.1.1 foram cultivados em meio líquido para a avaliação quantitativa de produção de PHA a caracterização química do polímero obtido. Para este experimento foi realizado um cultivo em batelada de um estágio, onde o meio de cultivo utilizado para crescimento e acúmulo de polímero foi o mesmo. Para tanto, as cepas foram reativadas em meio NA e cultivadas por pelo menos 48 h até observação de crescimento vigoroso e a formação de colônias axênicas. Posteriormente, uma dessas colônias foi transferida com uma alça de platina estéril para um tubo de vidro contendo 5 mL de meio de cultura CN, mantido sob cultivo por 16 h e agitação de 160 rpm. Após o período indicado o inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio de cultivo líquido preparado com 10,0 g.L<sup>-1</sup> de dextrose, 5,0 g.L<sup>-1</sup> de acetato de sódio e 0,1 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, e mantido nas mesmas condições de cultivo por mais 72 h.

Para a avaliação da produção de PHAs usando fontes de carbono alternativas, foi utilizado o método de cultivo em batelada em dois estágios, onde foram usadas diferentes composições de meio de cultura para as etapas de: i) crescimento celular em meio CN e ii) acumulação de polímero em um meio de cultura mineral mínimo (M3) contendo em sua composição: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,0 g.L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,0 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup>, com a adição de cada fonte de carbono para cada experimento distinto em uma concentração de 15,0 g.L<sup>-1</sup>. Como fontes de carbono, foram investigados glicose, glicerol, e frações leve e pesada (denominadas Extrato Ácido e Bio-Óleo respectivamente) obtidas da pirólise rápida de biomassa de *Eucalyptus* spp., material este fornecido pela empresa Suzano Papel e Celulose. Este material pirolenhoso apresenta características similares ao descrito por CHANG *et al.*, (2013) e AMUTIO *et al.*, (2015), com alto teor de carbono e

oxigênio devido a formação de diversos compostos oxigenados como cetonas, ácidos, furanos e fenólicos, e um baixo teor de nitrogênio e fósforo. Para o crescimento celular (i), uma colônia obtida após crescimento da cepa em NA foi transferida para 5 mL de meio de cultura CN. Após 16 h de cultivo sob agitação de 160 rpm, as células foram removidas de meio por centrifugação em tubos estéreis (4630 x g, 28°C, 10 min), lavadas com água, ressuspensas em 1mL de meio de cultura e transferidas para um erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio M3 (ii). O cultivo foi mantido sobre agitação de 160 rpm e 28°C por mais 48 h.

## 5.2.2 - Caracterização dos polihidroxicanoatos obtidos

Diversas metodologias analíticas foram utilizadas com o objetivo de observar a formação do biopolímeros e permitir a caracterização da produção de PHA pelas cepas selecionadas.

### 5.2.2.1 - Avaliação Quantitativa da produção de PHA

Para avaliação da quantidade de material e da estrutura química do PHA produzido, as células foram removidas por centrifugação do meio de cultura (12860 x g, 20°C, 10 min), lavadas com água deionizada e liofilizadas. Após completa secagem o peso em massa seca (CDW; *Cell Dry Weight*) foi avaliado e as células submetidas a dois processos diferentes de extração do PHA. Para a extração do polímero uma massa conhecida de células foi transferida para um tubo de ensaio com tampa de rosca, suspensos em clorofórmio e mantidas a uma temperatura de 70°C por 72 h. Após a extração a suspensão foi filtrada, e o polímero precipitado pela adição de hexano numa proporção final de 9:1 hexano:clorofórmio (v/v). O polímero foi recuperado por centrifugação (12860 x g, 0°C, 10 minutos). Após secagem do solvente residual o polímero foi novamente solubilizado em clorofórmio sendo novamente precipitado pela adição de metanol numa proporção final de 9:1 metanol:clorofórmio (v/v). Após outra etapa de centrifugação e secagem, a massa de polímero obtida foi utilizada para o cálculo da porcentagem de polímero por massa celular (rendimento %).

#### **5.2.2.2 - FTIR**

Para análise por FTIR, 1 mg do polímero obtido foi inicialmente macerado juntamente com 99 mg de KBr anidro. Após homogeneização a mistura foi submetida a pressão de 10 kPa por 5 min em prensa com suporte para a formação de uma pastilha.

#### **5.2.2.3 - NMR**

Para a análise por NMR, 5 mg do polímero foi dissolvido em 0,7 mL de  $\text{CDCl}_3$  e transferidos para tubos de 5 mm. As amostras foram submetidas aos experimentos de  $^1\text{H}$  NMR a 27°C no equipamento de 400 MHz.

#### **5.2.2.4 - GC-MS**

Para a identificação dos monômeros presentes nos polímeros obtidos, as amostras foram submetidas a reação de derivatização para obtenção de moléculas compatíveis com a análise pela técnica de GC-MS. A reação de metanólise foi realizada tanto com o polímero extraído quanto com a própria massa celular. Assim, foi transferido 1 mg de polímero extraído ou 10 mg de massa celular seca (quando disponível) para um tubo de ensaio com tampa de rosca, sendo então adicionados 2 mL de uma solução de ácido sulfúrico:metanol (85:15 v/v) e 2 mL de clorofórmio. Esta mistura foi mantida com o vaso selado, sob aquecimento por 100°C por 100 min. Após este período a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e as fases separadas pela adição de 2 mL de água deionizada. O tubo foi centrifugado brevemente (515 x g, 20°C, 1 min) para quebra da emulsão formada e a fase orgânica removida e acondicionada em um vial para análises por GC-MS. A reação de metanólise está representada na Figura 5.6.

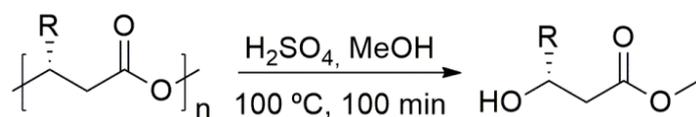


FIGURA 5.6 - Esquema da reação de metanólise de PHA sob condições ácidas

Para a análise do produto da reação por GC-MS, foi utilizada uma coluna Rtx-5 MS 30,00 m, 0,25 mm id, 0,20  $\mu\text{m}$  de recobrimento (Restek, Bellefonte, PA, EUA). As temperaturas do injetor, interface e fonte de íons foram ajustadas para 250°C, 280°C e 250°C respectivamente. A injeção foi realizada no modo *split*, com proporção de 1:30. A velocidade linear foi mantida constante, a 40,6  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . O programa de temperatura do forno da coluna utilizado está descrito na Tabela 5.1.

TABELA 5.1 - Parâmetros de temperatura do forno da coluna para o método de análise do produto de metanólise de PHA por GC-MS.

Temperatura (°C)	Taxa (°C.min <sup>-1</sup> )	Tempo De Espera (min)
70		3
250	12	0
280	10	1

O tempo total de corrida foi de 22,0 min. O detector de massas foi programado para registrar os espectros no modo *fullscan* no intervalo de massas de 40-400  $m/z$  a partir de 3,5 min, com o corte do solvente programado para 3,0 min. Após as corridas, os compostos foram identificados através de comparação com padrões comerciais, banco de dados e pela área de cada sinal obtida pela integração do sinal analítico.

## 5.3 - Resultados e Discussão

### 5.3.1 - Avaliação qualitativa de acúmulo de PHA usando o corante Vermelho do Nilo

Todos os micro-organismos corretamente isolados de *D. speciosa* e identificados foram submetidos a identificação qualitativa e quantitativa da capacidade de produzir a classe de poliéster intracelular conhecida como polihidroxialcanoatos. Um levantamento bibliográfico prévio (CHODAK, 2008; KOLLER *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2014) indicou que diversos dos isolados apresentam potencial para o acúmulo destes polímeros.

O corante Vermelho do Nilo quando diretamente incorporado no meio de cultura apresenta alta fluorescência quando solubilizado em meio apolar como grânulos de PHA, e nenhuma em meio aquoso. Ademais, o corante é prontamente deslocado para inclusões intracelulares, indicando através da emissão de coloração alaranjada a presença de grânulos lipofílicos (SPIEKERMANN *et al.*, 1999). Após o tempo de crescimento, as placas de cultivo foram visualizadas por transiluminação com uma lâmpada UV de 315 nm, para a visualização da inclusão de polímero, que apresenta uma cor alaranjada quando irradiada. Foram definidos arbitrariamente três níveis de coloração, relacionadas com a intensidade da cor alaranjada observada. Para cepas que não apresentaram mudança na coloração, foram definidas como Não Fluorescente (-). Para isolados com uma sutil mudança de cor, foram definidos como Pouco Fluorescente (+), e isolados com intensa coloração alaranjada mediante irradiação UV foram definidos como Muito Fluorescente (++). A Figura 5.7 apresenta um exemplo de cada classificação.

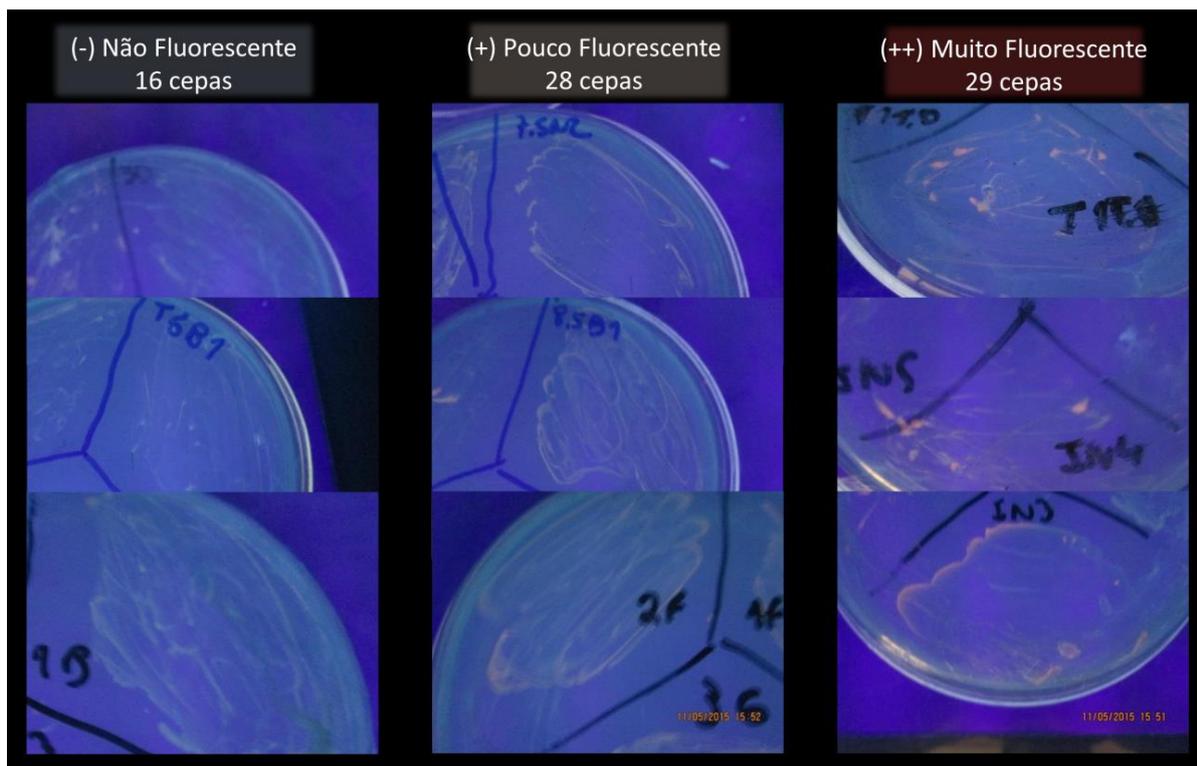


FIGURA 5.7 - Tipos de fluorescência observada para os isolados no teste com o corante Vermelho do Nilo em placa de Petri.

Os isolados foram avaliados a cada 48 h, até um total de dez dias de cultivo. Foi constatado crescimento celular de todas as espécies, em quantidades variáveis. Dos 73 isolados testados, 16 deles não apresentaram nenhuma fluorescência durante toda a duração do experimento, 28 apresentaram uma ligeira mudança de coloração ao longo de tempo, apresentando uma ligeira coloração alaranjada, e outros 29 isolados apresentaram uma intensa coloração quando iluminados com lâmpada UV por transiluminação. Alguns, inclusive, foram tão eficientes em promover o acúmulo do corante nos grânulos que era possível observar a formação de coloração mesmo na ausência de irradiação UV. A Tabela 5.2 apresenta um resumo dos resultados para cada isolado.

Como pode ser observado na tabela 5.2, os resultados variaram bastante entre as bactérias testadas, porém sempre similares para as bactérias identificadas como sendo da mesma espécie, indicando uma robustez no resultado obtido pelo método proposto. Entretanto, espécies próximas dentro do gênero *Pseudomonas* produziram resultados diferentes, evidenciando a característica de acumular o polímero como algo intrínseco de cada espécie. Outro ponto a ser

destacado é que dentre todos os isolados, apenas as bactérias dos gêneros *Empedobacter*, *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas* e *Streptomyces* não apresentaram nenhuma evidência de acúmulo de PHAs, sendo todos os outros treze gêneros capazes de promover algum acúmulo. Alguns dos gêneros observados produzindo PHA são descritos na literatura como produtores de PHA, como *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (CHODAK, 2008; KOLLER *et al.*, 2010; MATIAS e RODRIGUES, 2011; TAN *et al.*, 2014), enquanto as bactérias do gênero *Aurantimonas*, *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Luteibacter*, *Serratia* e *Sphingobacterium* apresentam poucos ou nenhum relato (TAMBOLI *et al.*, 2010; NAHEED *et al.*, 2012; BALOGUN *et al.*, 2013; ARAVIND e SANGEETHA, 2014; ARUMUGAM *et al.*, 2014). Uma lista detalhada da classificação de cada espécie pode ser encontrada no Apêndice 1.

TABELA 5.2 - Classificação qualitativa do acúmulo de PHA pelos isolados, avaliados pelo teste de Vermelho do Nilo.

<b>(-) Não Fluorescente</b>	<b>(+) Pouco Fluorescente</b>	<b>(++) Muito Fluorescente</b>
<i>Empedobacter</i> (1)	<i>Acidovorax</i> (1)	<i>Acinetobacter</i> (12)
<i>Ochrobactrum</i> (3)	<i>Burkholderia</i> * (1)	<i>Aurantimonas</i> (1)
<i>Stenotrophomonas</i> (4)	<i>Enterobacter</i> (15)	<i>Delftia</i> (1)
<i>Streptomyces</i> (8)	<i>Kluyvera</i> (1)	<i>Klebsiella</i> (1)
	<i>Pseudomonas</i> (7)	<i>Luteibacter</i> (1)
	<i>Rhizobium</i> (1)	<i>Pseudomonas</i> (6)
	<i>Serratia</i> * (1)	<i>Serratia</i> (7)
	<i>Sphingobacterium</i> (1)	

\* Indica a impossibilidade de avaliação por interferência de compostos fluorescentes e/ou pigmentados produzidos pela bactéria.

### 5.3.2 - Avaliação Quantitativa da Produção de PHA por isolados selecionados

Para confirmar a utilidade do teste qualitativo de identificação de bactérias produtoras de PHAs, oito isolados foram selecionados para avaliação quantitativa em meio líquido. As cepas selecionadas estão descritas na Tabela 5.3.

TABELA 5.3 - Isolados bacterianos selecionados para a avaliação quantitativa em experimentos de produção de PHA.

Isolados selecionados	
<i>Aurantimonas</i> sp. (DsA.N042) (++)	<i>Kluyvera</i> sp. (DsF.N019) (+)
<i>Burkholderia</i> sp. (DsF.N013) (+)	<i>Ochrobactrum intermedium</i> (DsA.N019) (-)
<i>Delftia</i> sp. (DsA.N049) (++)	<i>Serratia marcescens</i> (DsA.N004) (++)
<i>Empedobacter brevis</i> (DsF.N002) (-)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (DsA.N028) (-)

Foram selecionados isolados de todos os grupos observados no ensaio quantitativo (-, + e ++), com o objetivo de determinar a eficiência do método com corante Vermelho do Nilo. Após o cultivo das cepas e a realização dos processos de extração e purificação, foi avaliado o peso em massa seca das células microbianas, bem como do polímero extraído. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 5.4.

Pode se observar na Tabela 5.4 uma enorme variação tanto para peso em massa seca como para porcentagem de acumulação de PHA. De maneira geral os isolados apresentaram baixa produção de células quando cultivadas em apenas um estágio, pois o inóculo foi adicionado diretamente em um meio desbalanceado, pobre em nutrientes essenciais. Esta condição de stress é importante para a ativação do metabolismo de acúmulo de PHA intracelular em células microbianas, todavia pode acarretar na diminuição da capacidade do micro-organismo se desenvolver. Apenas o gênero *Delftia* não demonstrou problemas em se desenvolver e apresentou produção celular elevada em relação às demais.

Com relação ao acúmulo de PHA, os resultados foram relativamente compatíveis com os apresentados pelo teste qualitativo, mostrando que o teste foi útil na rápida identificação de potenciais cepas isoladas na produção de PHA. A única exceção foi a bactéria *Serratia marcescens*, que não apresentou alta produção de PHA apesar de apresentar alta fluorescência no teste qualitativo. Esta espécie não é descrita como um micro-organismo produtor de PHA em revisões que classificam os micro-organismos produtores (CHODAK, 2008; KOLLER *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2014). Esse resultado obtido para *S. marcescens* pode ser resultado da interação e acúmulo do corante causado por outras moléculas apolares produzidas em alta quantidade que não o PHA (TAN *et al.*, 2014), ou então uma mudança de metabolismo provocada pelas diferentes condições de crescimento fez com que o

acúmulo de PHA observado nos teste qualitativo em meio sólido não fosse reproduzido durante o cultivo em meio líquido nas condições avaliadas neste trabalho. Vale destacar o grande acúmulo de PHA pelos isolados de *Aurantimonas* e *Delftia*, produzindo cerca de 50% e 90% do peso em massa seca de PHA respectivamente, mesmo quando inoculada diretamente em meio pobre de nutrientes.

TABELA 5.4 - Avaliação quantitativa da produção de massa celular e polímero pelos isolados selecionados

Organismo	Peso em massa seca (g.L <sup>-1</sup> )	PHA (% da massa seca)	Vermelho do Nilo
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,27 ± 0,12	2,0 ± 0,4 %	-
<i>Empedobacter brevis</i>	0,10 ± 0,08	5,0 ± 1,2 %	-
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	0,20 ± 0,10	5,9 ± 2,1 %	-
<i>Serratia marcescens</i>	0,07 ± 0,05	8,2 ± 4,3 %	++
<i>Kluyvera</i> sp.	0,14 ± 0,02	10,4 ± 3,0 %	+
<i>Burkholderia</i> sp.	0,03 ± 0,01	12,2 ± 4,9 %	+
<i>Aurantimonas</i> sp.	0,02 ± 0,01	50,0 ± 9,7 %	++
<i>Delftia</i> sp.	0,49 ± 0,10	89,8 ± 5,3 %	++

Após a obtenção dos materiais secos e a avaliação da produção celular e de polímero, foi realizada a metanólise para identificação da composição dos monômeros em cada isolado. Foi realizada a metanólise direto das células secas, para avaliação da capacidade de aplicação da técnica mesmo sem a necessidade de extração do polímero. Após a reação concomitante de extração e derivatização ocorrida nas condições experimentais, foi feita a injeção da fração orgânica para análise por GC-MS. Nesses ensaios espera-se observar os derivados metilados dos monômeros componentes de PHAs de cadeia curta. Polímeros contendo (*R*)-3-hidroxi-butirato devem conter a molécula (*R*)-3-hidroxi-butanoato de metila (3-HBMe). Por sua vez, polímeros contendo (*R*)-3-hidroxi-valerato deve também apresentar a molécula (*R*)-3-hidroxi-pentanoato de metila (3-HPMe) respectivamente (Figura 5.6). Os cromatogramas obtidos estão na Figura 5.8.

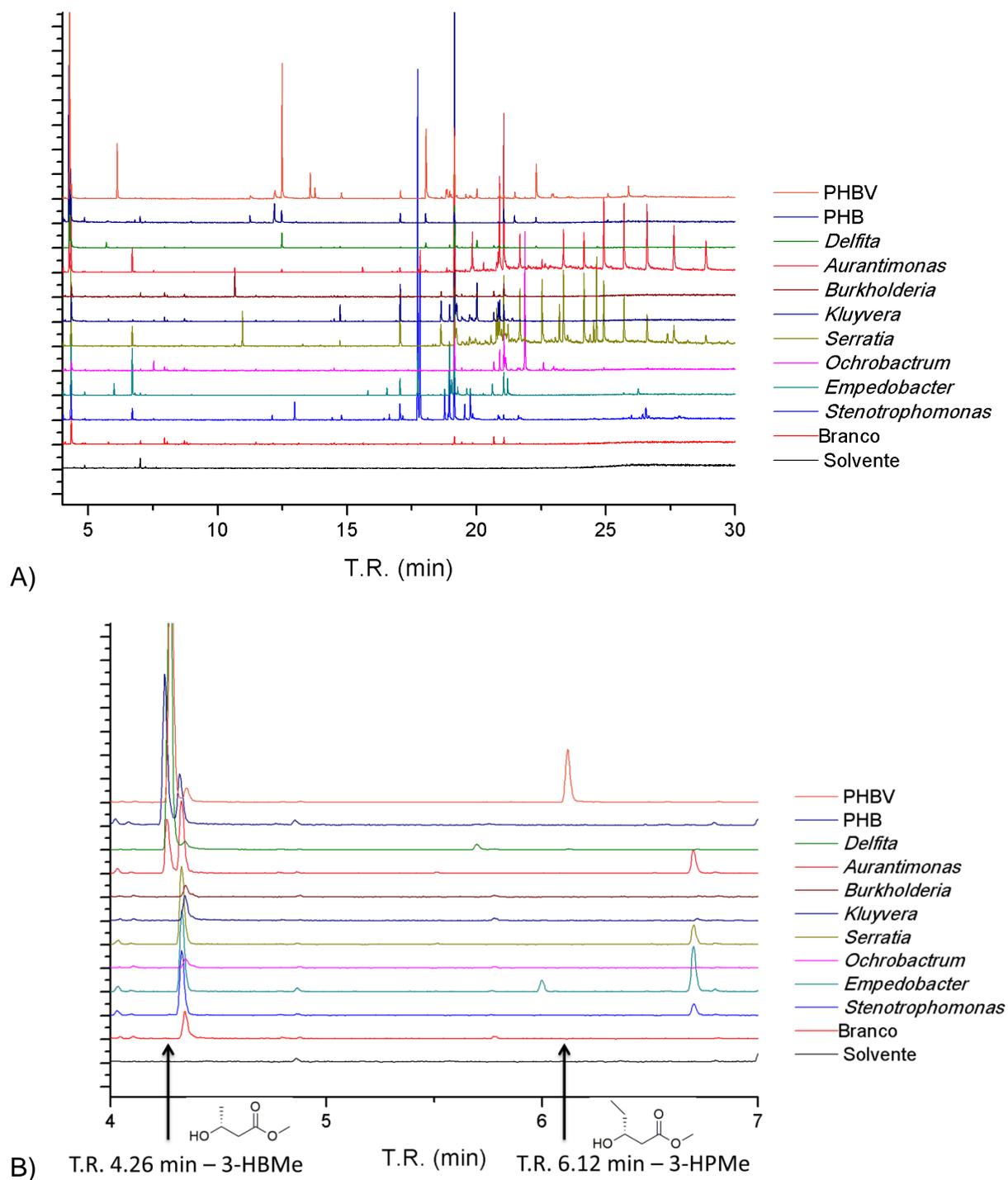


FIGURA 5.8 - Cromatogramas obtidos após metanólise das células. A) Cromatograma de íons totais (TIC). B) Ampliação da região entre 4,0 e 7,0 min, com destaque para os sinais dos compostos 3-HBMe (T.R. 4,26min) e 3-HPMe (T.R. 6,12 min)

O cromatograma de íons totais mostra a presença de uma grande quantidade de compostos. Os produtos 3-HBMe e 3-HPMe podem ser observados com tempos de retenção de 4,26 e 6,12 min respectivamente. Para facilitar a identificação dos compostos, foi utilizado dois controles positivos de polímeros com

composição conhecida contendo 100% PHB ou uma blenda de PHBV contendo aproximadamente 90% butirato / 10% valerato, que também foram submetidos a derivatização por metanólise. Também foi realizada a derivatização sem a presença de células, bem como a injeção apenas do solvente orgânico usado na etapa de extração como controles negativos para avaliar possíveis interferentes. A

Figura 5.9 apresenta as fragmentações observadas para as moléculas 3-HBMe e 3-HPMe, bem como as propostas de mecanismos de fragmentação que levam aos principais íons observados.

Para ambas moléculas, podem ser observadas perdas por mecanismos tradicionais, como por clivagem  $\alpha$  e rearranjo de McLafferty. Outros íons não descritos podem ser confirmados a partir de perdas secundárias, como por exemplo o íon  $m/z$  71 que é descrito na literatura como sendo derivado da perda de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , 32 Da) do íon de  $m/z$  103 (DE RIJK *et al.*, 2005). O solvente apresentou poucos interferentes na região de eluição dos compostos de interesse, entre 4,0 e 7,0 minutos, não prejudicando a interpretação da análise. A avaliação do branco da reação mostrou a presença de um sinal intenso com tempo de retenção em 4,35 minutos, bem próximo à janela de observação do monômero 3-HBMe. Este sinal foi identificado através do banco de dados como sendo a molécula dimetil sulfato, produzida pela reação paralela de metoxilação da molécula de ácido sulfúrico por metanol. Avaliando-se os cromatogramas de todos os isolados, somente foi possível identificar a presença do monômero 3-HBMe para os gêneros *Aurantimonas* e *Delftia*. Para todos os outros isolados, não foi possível se identificar a presença de moléculas que fossem de alguma maneira relacionada a monômeros de polihidroxicanoatos. Esses resultados de GC-MS são condizentes aos ensaios qualitativos nas amostras de *Aurantimonas* e *Delftia*, e novamente reforça a observação da capacidade de produção destes isolados.

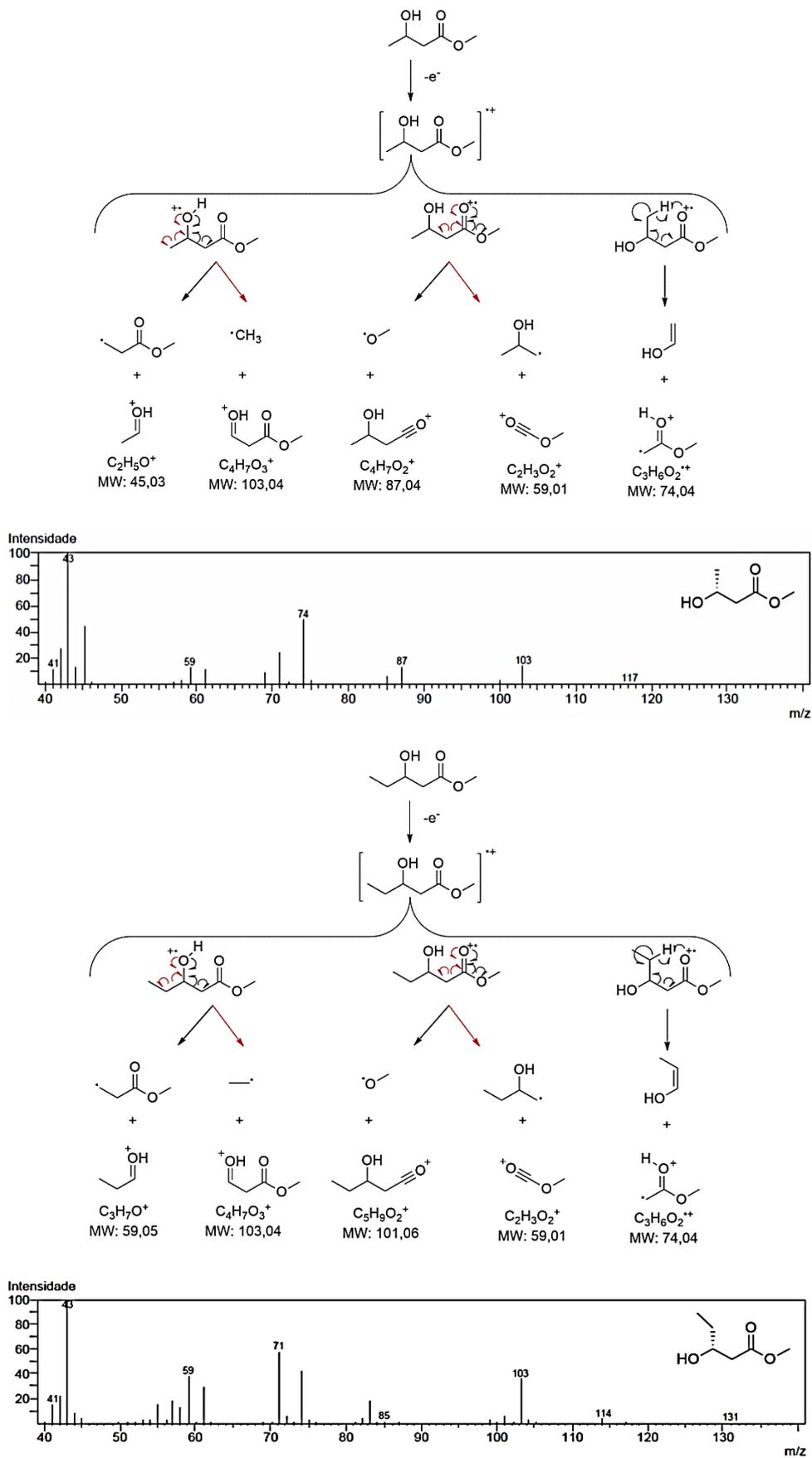


FIGURA 5.9 - Espectro de massas e propostas de fragmentações para as moléculas:  
A) 3-HBMe, e; B) 3-HPMe

Os cromatogramas apresentaram outros sinais, derivados de outros componentes celulares e reações paralelas. Além dos monômeros 3-HBMe e 3-HPMe, pode ser observado o produto da reação paralela de desidratação do 3-HBMe, 2-butenato de metila, o éster metílico do ácido crotônico, com T.R. 11,27 min. A existência do produto em pequena quantidade indica uma condição favorável à reação de metoxilação. Também foi possível identificar algumas classes de compostos derivados dos micro-organismos, sendo identificados os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME; *Fatty Acid Methyl Esters*) provavelmente originário de paredes celulares microbianas, especialmente de lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas. Estas moléculas estão presentes em abundância e são comumente utilizadas como marcadores moleculares de espécie, uma vez que as variações qualitativas e quantitativas destes compostos são particulares de cada espécie bacteriana, sendo inclusive possível realizar a identificação de micro-organismos de maneira similar às técnicas moleculares e espectrométricas (LU e HARRINGTON, 2010). Entre 11,2 e 22,6 min, foi observada a presença de diversos FAMEs, variando entre oito a vinte dois átomos de carbono em sua estrutura lipídica. Dentre os FAMEs foram observadas diversas estruturas como saturados, insaturados, ramificados, hidroxilados e epoxidados. Além disso, também foram encontrados alguns compostos aromáticos, como dimetil benzaldeído (T.R. 10,60 min) e 2,6-dimetoxi-*p*-benzoquinona (T.R. 15,43 min). Outra classe de sinais característicos identificados foi ésteres metílicos de ácidos orgânicos de cadeia curta (SCFA; *short-chain fatty acids*), sendo encontrados os derivados metilados do ácido pirúvico (T.R. 6,02 min), ácido levulínico (T.R. 6,70 min), ácido succínico (T.R. 7,50 min) e ácido adípico (T.R. 10,95 min). Estas pequenas moléculas são consideradas grandes promissoras como blocos de construção químicos derivados de fontes renováveis, também conhecidos como químicos de plataforma (PERLATTI *et al.*, 2014) e fortalecem a hipótese da exploração de micro-organismos de biomas subexplorados como bactérias do trato digestivo de insetos na identificação de novas cepas para uso em processos biotecnológicos.

Esses resultados deixam em evidência que as cepas de *Aurantimonas* e *Delftia* são espécies microbianas com potencial para produção de biopolímeros. Além disso, ficou evidente a compatibilidade e exatidão entre os testes quali e quantitativos, indicando que o método de triagem usando Vermelho de Nilo pode ser considerado eficiente para selecionar cepas promissoras na produção de PHA. Com

base nesses resultados, as cepas de *Aurantimonas* sp. e *Delftia* sp. foram selecionados para testes posteriores.

### 5.3.3 - Avaliação da produção de PHA usando fontes alternativas de carbono

Com o propósito de se avaliar a possibilidade do uso de diferentes fontes de carbono na produção e acúmulo de PHAs por micro-organismos. As cepas *Aurantimonas* sp. e *Delftia* sp., foram selecionadas visto serem as espécies que resultaram na maior produção de polímero observada nos experimentos quantitativos de determinação de porcentagem de PHA em massa seca. Nesta etapa do trabalho, os experimentos foram realizados através do cultivo em dois estágios através da transferência das células bacterianas do meio CN para o meio M3. De imediato, pode-se perceber uma alta quantidade de células presentes após o término do experimento pelo alto valor de peso em massa seca obtido, principalmente para a espécie *Aurantimonas* sp., que tinha sido muito prejudicada com o crescimento em apenas um estágio. Os processos de obtenção de massa seca e polímero foram realizados, e os valores obtidos estão descritos na Tabela 5.5.

TABELA 5.5 - Valores quantitativos para a produção de PHA usando fontes de carbono alternativas por *Aurantimonas* sp. e *Delftia* sp.

Organismo	Substrato	Peso em massa seca (g.L <sup>-1</sup> )	% PHA
<i>Delftia</i>	Glicose + Acetato *	0,49 ± 0,10	89,8 ± 5,3%
	Glicose	0,69 ± 0,14	86,4 ± 7,4%
	Glicerol	0,71 ± 0,10	81,2 ± 8,2%
	Extrato Ácido	0,79 ± 0,17	5,8 ± 3,2%
	Bio-óleo	0,74 ± 0,15	6,1 ± 2,2%
<i>Aurantimonas</i>	Glicose + Acetato *	0,02 ± 0,01	50,0 ± 9,7%
	Glicose	0,97 ± 0,14	54,9 ± 4,1%
	Glicerol	0,45 ± 0,12	53,5 ± 3,5%
	Extrato Ácido	0,75 ± 0,08	5,2 ± 1,3%
	Bio-óleo	0,83 ± 0,06	5,3 ± 3,2%

\* Experimento realizado em cultivo de um estágio (Seção 5.3.2)

Pelos valores dispostos na Tabela 5.5, pode-se concluir que o crescimento em dois estágios foi muito eficiente na produção de massa celular quando comparado ao cultivo em etapa única, pelo aumento no peso em massa seca observado, com as duas cepas apresentando capacidades similares de crescimento nos quatro meios de cultura avaliados. O acúmulo de PHA foi detectado nos cultivos onde foi utilizado apenas glicose ou glicerol como fonte de carbono, porém nos meios de cultivo contendo como fonte de carbono as frações de pirólise de eucalipto, extrato ácido e bio-óleo, não foram observados acúmulo de PHA em quantidades apreciáveis. Estes resultados indicam que independente da composição complexa das frações de bio-óleo, não são encontrados compostos em concentrações que inibam o crescimento microbiano. Todavia, estes meios não favorecem a produção de PHAs, muito provavelmente por não promover as condições nutricionais necessárias para estimulação do metabolismo de acumulação de biopolímero.

Após a obtenção dos produtos, foram realizados os procedimentos de metanólise das amostras, através da derivatização, novamente realizando o procedimento diretamente na célula bacteriana, sem isolamento prévio do biopolímero. Os cromatogramas obtidos para as frações orgânicas obtidas após o processo de derivatização estão dispostos na Figura 5.10.

Além dos controles positivos e negativos (branco e solvente respectivamente) utilizados nos experimentos quantitativos iniciais, fez-se também a metanólise das duas frações de pirólise (Extrato Ácido e Bio-óleo) utilizadas como fontes de carbono, para identificar possíveis interferentes presentes na matriz. As duas frações apresentam certa complexidade, especialmente a fração mais pesada bio-óleo, apresentando uma série de compostos, principalmente oxigenados (KUMAR *et al.*, 2010), porém nenhum deles prejudica a identificação dos monômeros. Pode-se observar nitidamente a produção de monômeros de PHA nos cromatogramas, com destaque para a produção de co-polímero de PHBV nos cultivos de *Aurantimonas* com glicerol, e de *Delftia* com glicose e glicerol. Os sinais dos monômeros 3-HBMe (R.T. 4,28 min) e 3-HPMe (T.R. = 6,12 min) foram integrados para obter-se uma proporção relativa da presença de cada monômero na comparação com todos os cromatogramas. Os valores estão dispostos na Tabela 5.6.

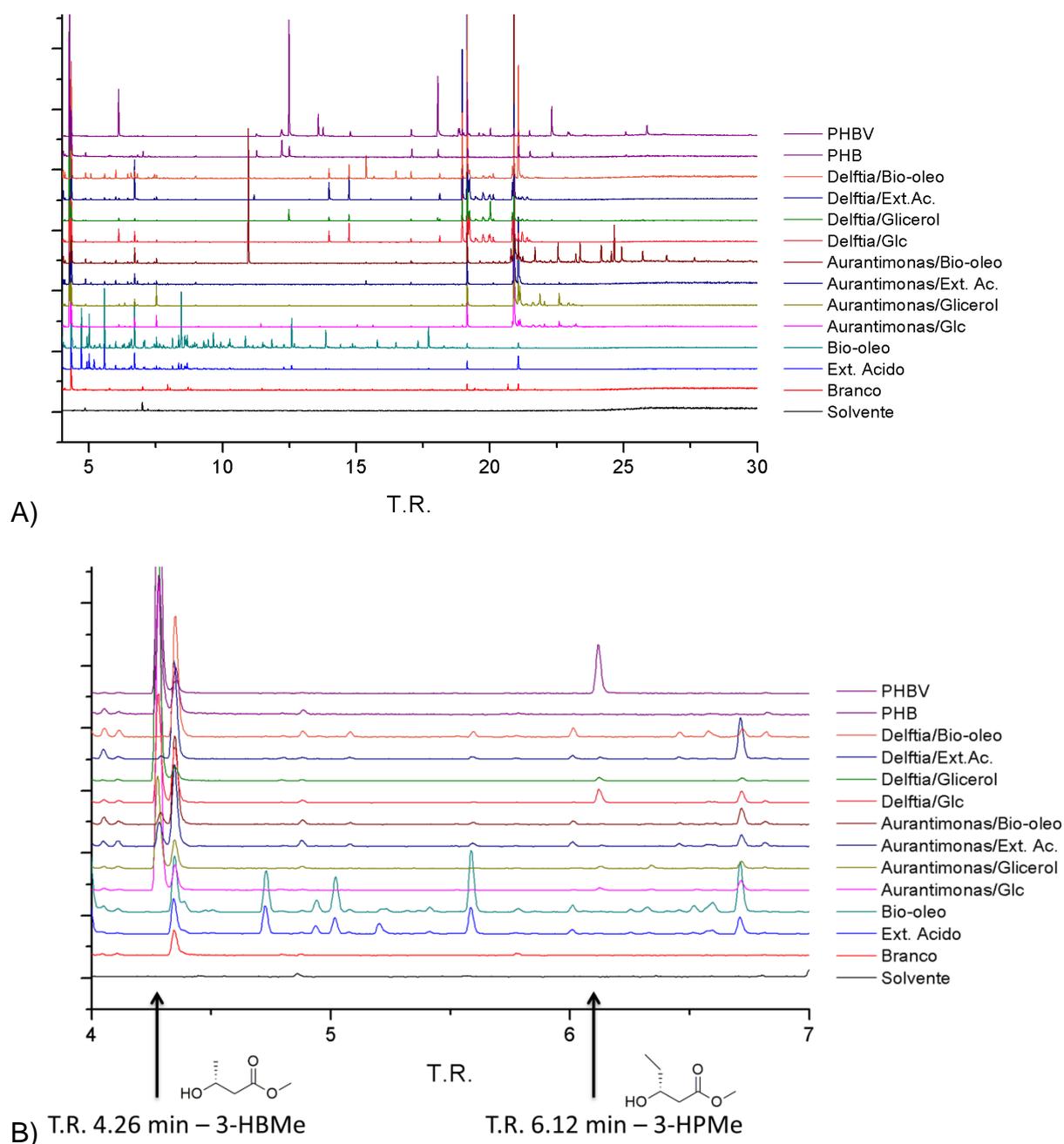


FIGURA 5.10 - Cromatogramas obtidos após metanólise das células dos isolados de *Aurantimonas* sp. e *Delftia* sp. cultivadas em diferentes fontes de carbono (Glicose, Glicerol, fração leve e pesada do bio-óleo de Eucalipto). A) Cromatograma de íons totais (TIC). B) Ampliação da região entre 4,0 e 7,0 min, com destaque para os sinais dos compostos 3-HBMe (T.R. 4,26min) e 3-HPMe (T.R. 6,12 min).

TABELA 5.6 - Composição monomérica relativa dos PHAs obtidos de *Aurantimonas* sp. e *Delftia* sp., cultivadas com diferentes fontes de carbono.

Organismo	Substrato	% 3-HBMe	% 3-HPMe
<i>Delftia</i>	Glicose + Acetato *	99,62%	0,38%
	Glicose	90,00%	10,00%
	Glicerol	97,52%	2,48%
	Extrato Ácido	< LOD	< LOD
	Bio-óleo	< LOD	< LOD
<i>Aurantimonas</i>	Glicose + Acetato *	99,86%	0,14%
	Glicose	99,22%	0,78%
	Glicerol	95,91%	4,09%
	Extrato Ácido	< LOD	< LOD
	Bio-óleo	98,69%	1,31%

\* Experimento realizado em cultivo de um estágio

O cultivo dos micro-organismos na ausência de acetato permitiu o acúmulo de outro monômero além de PHB. Foi verificada a presença de 3-HPMe em diferentes proporções, de 0 até 10%, indicando a produção do copolímero PHBV. *Aurantimonas* sp. foi capaz de acumular entre 0,1 e 4,1% de 3-HPMe, sendo capaz de produzir uma pequena quantidade de PHA utilizando bio-óleo, porém com os maiores valores de copolímero sendo observados na presença de glicerol como fonte de carbono. Por sua vez, *Delftia* sp. produziu porcentagem semelhante de valerato na composição do biopolímero na presença de glicerol, porém quando a glicose foi utilizada como única fonte de carbono, produziu um copolímero de PHBV com presença de aproximadamente 10-12% de valerato em sua composição. Este resultado corrobora com dados prévios da literatura que indicam a capacidade de uma espécie do gênero *Delftia*, *D. acidovorans*, de produzir copolímeros de PHBV em diferentes fontes de carbono (LOO e SUDESH, 2007). A cepa de *Delftia* sp. utilizada neste estudo obteve como identificação de maior score por MALDI-TOF a espécie *D. acidovorans*, porém com score inferior ao necessário para confirmar a espécie.

### 5.3.4 - Caracterização do copolímero PHBV obtido por *Delftia* sp.

Para se obter informações mais detalhadas e confirmar a estrutura do PHBV obtido por *Delftia* sp. utilizando glicose como fonte de carbono, foram realizados experimentos de FTIR e  $^1\text{H}$  NMR do biopolímero. A Figura 5.9 apresenta o espectro de FTIR obtido por pastilha de KBr

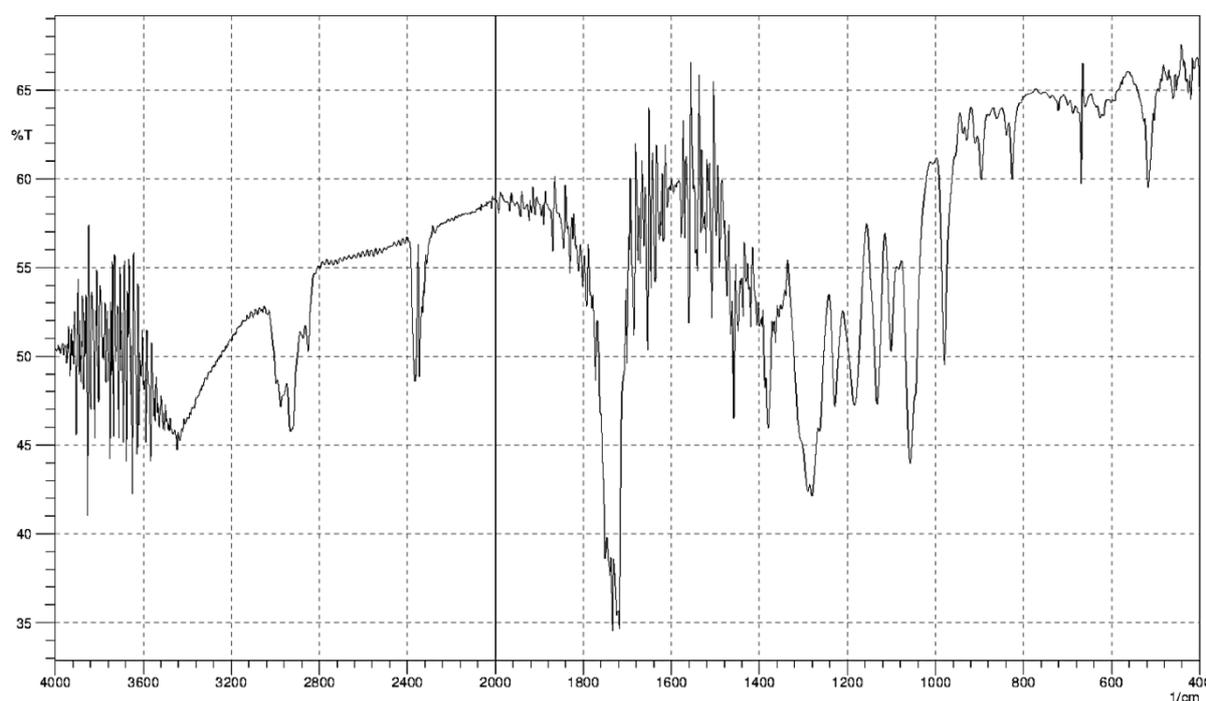


FIGURA 5.11 - Espectro de FTIR do copolímero de PBHV obtido de *Delftia* sp.

O espectro de FTIR para o copolímero apresenta as bandas características associadas a este tipo de estrutura (SINDHU *et al.*, 2011), como o sinal em  $3000\text{ cm}^{-1}$  representando o estiramento da ligação C-H  $\text{sp}^3$  presentes no esqueleto do polímero, bem como uma banda mais intensa em  $1760\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação C=O do éster presente, e a banda  $1280\text{ cm}^{-1}$  correspondente a ligação C-O também da função éster.

Realizou-se também a caracterização do PHBV de *Delftia* sp. através da técnica de  $^1\text{H}$  NMR, utilizada para avaliação da composição estrutural. A Figura 5.12 mostra o espectro obtido.

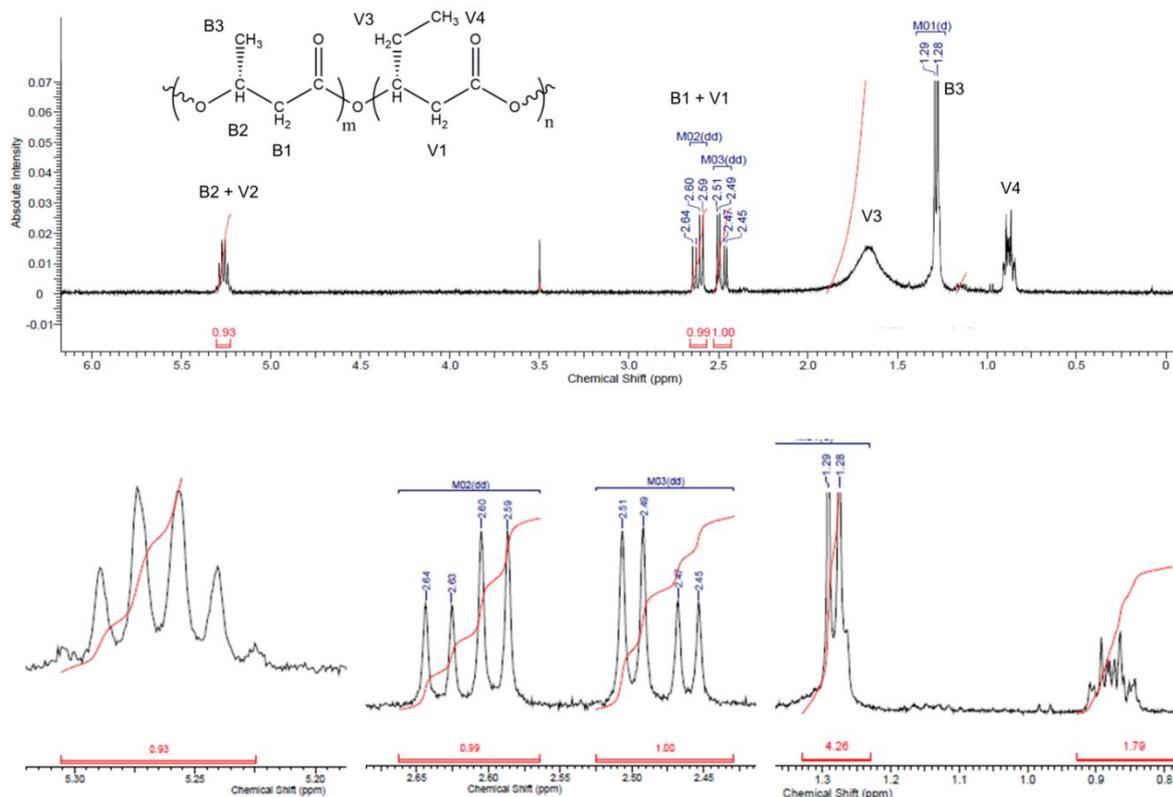


FIGURA 5.12 - Espectro de  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $27^\circ\text{C}$ ) do copolímero de PBHV obtido de *Delftia* sp. com glicose como fonte de carbono.

No espectro de  $^1\text{H}$  NMR se pode observar os sinais característicos para o polímero PHBV (ZAKARIA *et al.*, 2008). Para cada hidrogênio ou conjunto de hidrogênios equivalentes foi designado um símbolo, B1-B3 para o monômero de 3-hidroxi-butirato e V1-V4 para o monômero de 3-hidroxi-pentanoato, descritos na estrutura da Figura 5.12. Um multipletto desblindado em  $\delta$  5,26 (1H, *m* - B2/V2) corresponde aos hidrogênios do grupo metino  $\beta$ -carboxila. A metila da unidade de 3-hidroxi-butirato produz um dubleto em  $\delta$  1,28 ppm (*d*,  $J = 6,4$  Hz - B3), enquanto a metila da unidade de 3-hidroxi-valerato produz um multipletto de alta complexidade em  $\delta$  0,88 (*m* - V4). O grupo metileno do valerato apresenta um sinal em  $\delta$  1,50 (sl - V3) com complexa multiplicidade referente ao acoplamento dos hidrogênios metínico e metílico próximos, que apresentou grande alargamento.

Há a presença de um sinal em  $\delta$  2,55, referente ao hidrogênio metínico da estrutura do PHBV (B1/V1) atribuído rotineiramente na literatura como um dubleto de quadrupletos (SHALIN *et al.*, 2014; GARCIA-GONZALEZ *et al.*, 2015). Todavia, a avaliação da estrutura química da molécula indica que a disposição de outros

átomos de hidrogênio não levaria ao aparecimento deste tipo de multiplicidade neste sinal, e ao observar as constantes de acoplamento percebe-se que não são todas equivalentes, logo uma análise mais aprofundada deste sinal foi realizada.

Se considerarmos os dois hidrogênios metilênicos adjacentes a carboxila diastereotópicos e não equivalentes magneticamente, apresentando ambos um perfil de duplo dubleto, pode-se considerar a existência de dois sinais,  $H_b$  em  $\delta$  2.48 (1H, *dd*,  $J = 15,4; 5,9$  Hz) e  $H_c$  em  $\delta$  2,61 (1H, *dd*,  $J = 15,4, 7,3$  Hz), apresentando um padrão de acoplamento de spins entre eles o hidrogênio metínico como um sistema de spins do tipo ABX segundo a notação de Pople (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). Como o polímero apresenta uma configuração estereoespecífica e uma alta massa molecular, a estrutura pode ser considerada rígida, estando os hidrogênios sob influência de ambientes químicos diferentes apresentando diferentes ângulos entre as ligações, como ilustrado na Figura 5.13. Estes dois efeitos fazem com que os hidrogênios apresentem diferenças tanto no deslocamento como nas constantes de acoplamento. Observando os acoplamentos, a constante de  $J = 15,4$  Hz em ambos os duplo dubletos indicam um acoplamento  $^2J_{H,H}$  entre os dois hidrogênios geminais. A partir daí, os acoplamentos vicinais *gauche* ( $J_g$ ) entre  $H_a$  e  $H_b$  e *trans* ( $J_t$ ) entre  $H_a$  e  $H_c$  seguem as correlações entre os seus ângulos diedros (MINCH, 1994). Os valores teóricos de acoplamento indicam um ângulo próximo de  $31^\circ$  para  $H_b$  e  $153^\circ$  para  $H_c$ , indicando uma conformação próxima a *anti* entre o carbono carboxílico e o oxigênio ligado ao carbono  $\beta$ , o que torna a molécula menos impedida estericamente (Figura 5.13), e corroborando com dados teóricos da literatura (SASANUMA e KATSUMATA, 2013).

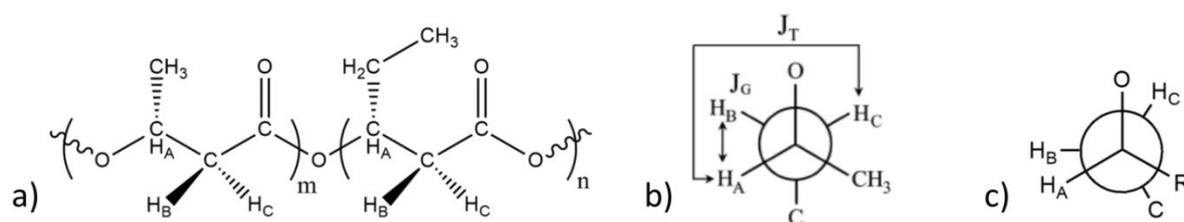


FIGURA 5.13 - a) Estrutura química do polímero PHB indicando os hidrogênios não equivalentes. b) Acoplamentos entre os hidrogênios da cadeia principal. c) Conformação entre os carbonos 2 e 3 de acordo com as constantes de acoplamento observadas.

## 5.4 - Conclusões

Os resultados obtidos com estes experimentos mostraram que o experimento qualitativo utilizando Vermelho do Nilo foi útil na identificação de potenciais isolados capazes de uma alta produção de PHA, apresentando boa correlação com os estudos quantitativos. O cultivo em um estágio se mostrou com potencial para o cultivo de cepas específicas, porém observou-se uma alta influência na capacidade de desenvolvimento da maioria dos isolados testados, não permitindo o acúmulo de uma grande quantidade de células. Em compensação, o cultivo em batelada de dois estágios permitiu um melhor desenvolvimento celular, levando a maiores índices de biomassa, sem perda na produtividade relativa de PHA. Dentre as bactérias avaliadas quantitativamente, as cepas *Aurantimonas* sp. e *Delftia* sp. apresentam as melhores taxas de acúmulo, com até 60 e 90% de volume em massa seca respectivamente. A bactéria *Aurantimonas* sp. produziu o homopolímero PHB, enquanto que *Delftia* sp. foi capaz de produzir o copolímero PHBV, com concentrações de até 12% de valerato em sua composição, sendo este biopolímero caracterizado por GC-MS, FTIR e <sup>1</sup>H NMR. A utilização de substratos simples como glicose e glicerol para a produção de PHBV, principalmente no caso da produção de PHBV com valores próximos a 10% de valerato mostram-se promissoras para a exploração em futuros processos, visto que neste estudo obteve-se um polímero com grandes interesses comerciais, em uma boa quantidade, com substrato de baixo custo, sem a realização de nenhuma etapa de otimização.

**6 - Avaliação do potencial de bactérias isoladas de *D. speciosa* para produção de exopolissacarídeos (EPS).**

## 6.1 - Introdução

Os polissacarídeos (PS) são polímeros de carboidratos e seus derivados, muito disseminados na natureza. São polímeros naturais, não-tóxicos e biodegradáveis, compostos de unidades de monossacarídeos, sendo de uma forma geral encontrados em todos os organismos. Atuam na superfície da grande maioria das células participando de papéis importantes em vários mecanismos biológicos como resposta imune, adesão, infecção, transdução de sinal e reconhecimento de epítopes, além de serem componentes majoritários de estruturas de sustentação celular e armazenamento de energia na maioria de suas células, como celulose, amido, glicogênio, entre muitos outros (HERGET *et al.*, 2008).

Os polissacarídeos apresentam uma enorme diversidade em sua composição monomérica e estrutural, sendo reconhecido entre os materiais biológicos de maior complexidade química. Inicialmente, deve-se considerar a grande quantidade de blocos de construção disponíveis, ou monossacarídeos. Eles podem variar em classe de compostos tal como aldoses, cetoses, aminoaçúcares, ácidos urônicos, 6-desoxiaçúcares, ácidos siálicos, etc., em número de carbonos entre trioses, tetroses, pentoses, hexoses, heptoses, etc., estereosseletividade de centros estereogênicos, tamanho de anel quando cíclico, geralmente como furanose ou piranose, e a configuração do centro anomérico ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) (BERTOZZI e RABUKA, 2009). A Figura 6.1 ilustra a série de D-aldoses contendo entre três e seis átomos de carbono, e as variações que o monossacarídeo D-glucose pode obter.

Além da grande diversidade de blocos monoméricos de construção, existem muitas maneiras desses monossacarídeos se conectarem entre si. A junção destas moléculas leva a formação de oligo e polissacarídeos de grande complexidade, podendo apresentar variações na sequência linear dos monômeros, na posição de ligação de dois resíduos, nas posições de ramificação e na existência de grupos auxiliares substituintes como acetil, piruvil, sulfatos, lactil, etc. (BLACKWOOD e CHAPLIN, 2006).

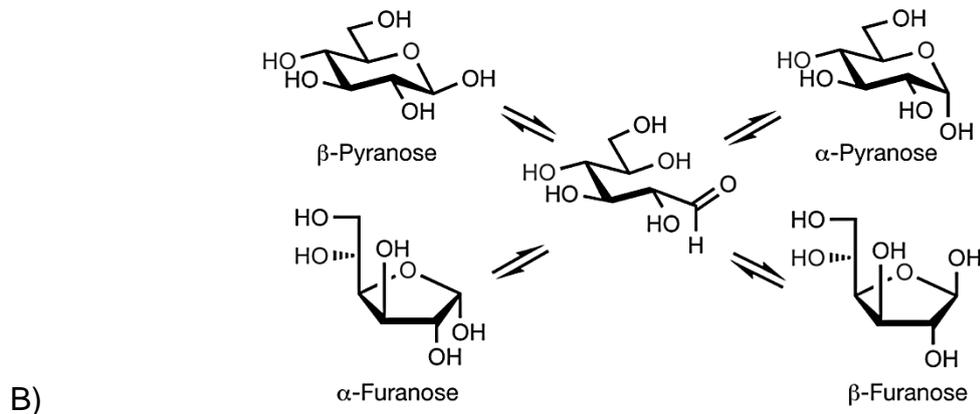
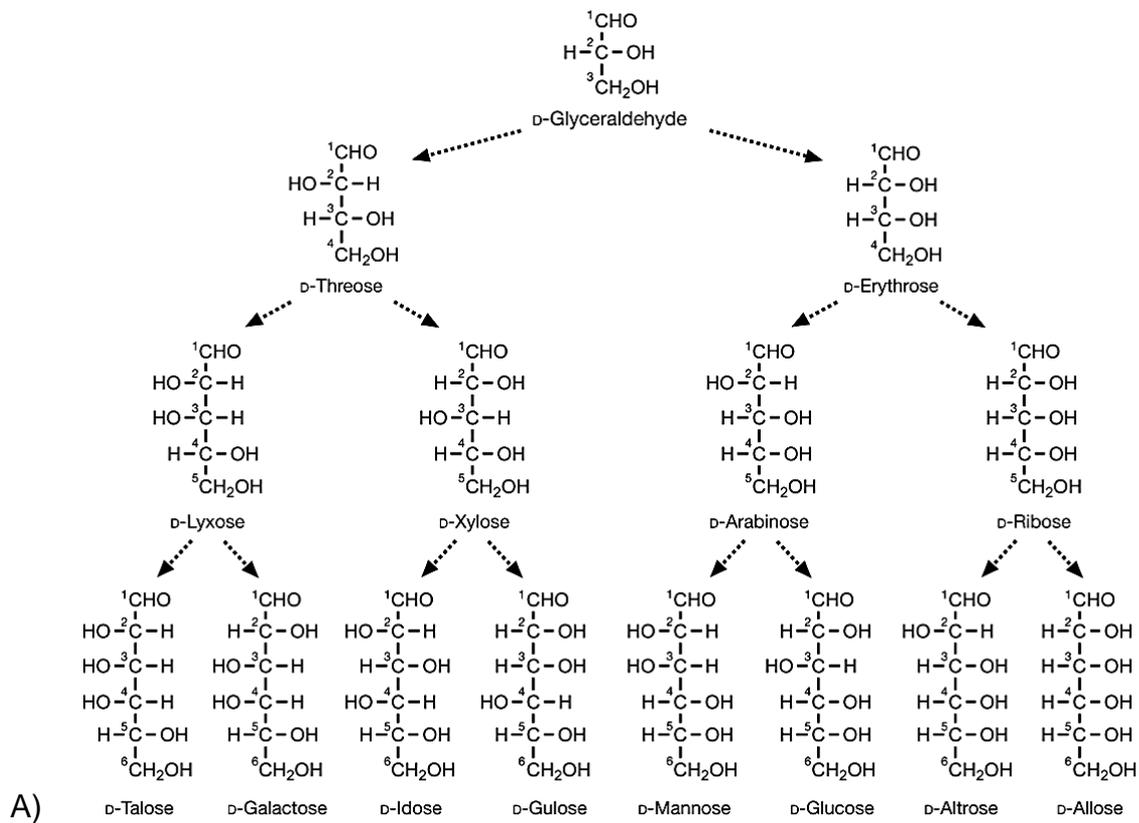


FIGURA 6.1 - A) Projeções de Fischer das formas acíclicas da série D- das aldoses de 3 a 6 carbonos. B) Diferentes epímeros possíveis para o fechamento do anel glicosídico na molécula de D-glucose (BERTOZZI e RABUKA, 2009).

De acordo com a sua composição monomérica, os polímeros podem ser classificados como homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. Homopolissacarídeos apresentam um único tipo de monossacarídeo que podem formar cadeias lineares, p. ex. pululana e celulose bacteriana, ou cadeias ramificadas como dextrana, todos derivados de glicose. Por sua vez, os heteropolissacarídeos são compostos de dois ou mais diferentes tipos de

monossacarídeos, geralmente presentes em sequências ordenadas de oligossacarídeos contendo de dois a oito resíduos. São exemplos de heteropolissacarídeo o ácido hialurônico, composto de ácido glucurônico e N-acetilglicosamina, e a goma xantana, composta de glicose, manose e ácido glucurônico. A Figura 6.2 ilustra alguns homo e heteropolissacarídeos.

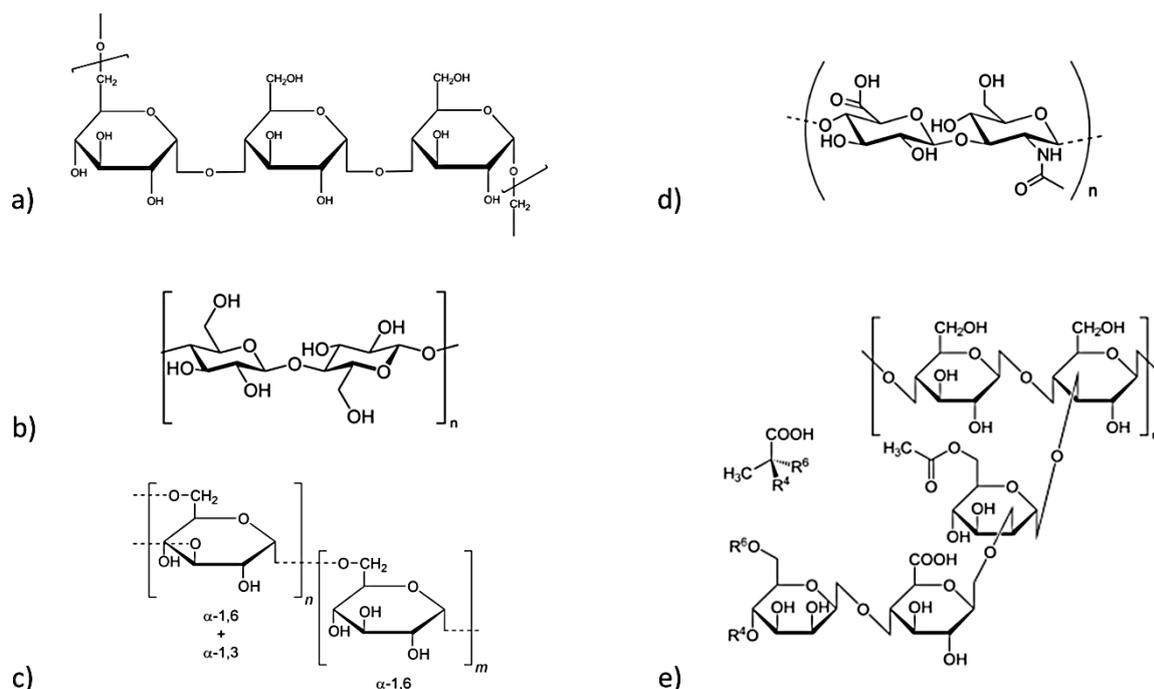


FIGURA 6.2 - Estrutura de alguns exopolissacarídeos a) Pululana; b) Celulose bacteriana; c) dextrana; d) Ácido hialurônico; e) Goma xantana.

Devido a todas estas possíveis configurações, o número de isômeros possíveis em estruturas de carboidratos é extremamente elevado. Se considerarmos um hexassacarídeo, o número possível de combinações é calculado em torno de  $1,05 \times 10^{12}$  diferentes polissacarídeos, muitas ordens de magnitude maior do que a mesma quantidade de combinações de aminoácidos em um peptídeo ( $\sim 10^6$ ) ou de nucleosídeos em um ácido nucleico ( $4 \times 10^3$ ) (LAINE, 1994).

Devido a enorme variação estrutural, diversas técnicas analíticas são utilizadas para a caracterização de polissacarídeos, sendo comumente avaliado o tamanho de polímero, a composição e o tipo de ligação entre os monômeros. A avaliação do tamanho molecular e a polidispersidade do material pode ser avaliada

por aferições indireta, como a avaliação da viscosidade da solução, ou então por Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC) (EREMEEVA, 2003). A avaliação dos monômeros pode ser feita por cromatografia líquida ou gasosa, após a hidrólise do material em seus monossacarídeos constituintes e derivatizações, se necessário. Apesar de serem materiais mais adequados para análise em líquido, este tipo de análise se torna dificultada pela necessidade de instrumentação específica e falta de capacidade de discriminação do tipo de ligação glicosídica.

Por outro lado, diversas metodologias de derivatização bem estabelecidas na literatura tornam a análise por GC-MS uma importante ferramenta na identificação dos monômeros e tipos de ligação nos polissacarídeos (PETTOLINO *et al.*, 2008; RUIZ-MATUTE *et al.*, 2011). A derivatização de monômeros em acetato de alditol (AA) permite a análise dos monossacarídeos constituintes de acordo com sua classe, pela geração de sinais de relação massa/carga específicos de acordo com a estrutura molecular, contudo não permite a distinção entre monossacarídeos de mesmas classes por não apresentar diferenciação entre as posições específicas das hidroxilas. Mesmo assim, o tempo de retenção de padrões derivatizados numa análise cromatográfica permite a classificação. A Figura 6.3 apresenta os principais íons formados para as hexoses glicose, manose e galactose, as pentoses arabinose e xilose e as 6-desoxihexoses ramnose e fucose.

A reação de AA permite uma avaliação rápida da composição monomérica do polissacarídeo, porém não apresenta nenhuma capacidade de discernimento sobre a estrutura do monômero ou polímero em si. Para tanto, utiliza-se uma segunda metodologia de derivatização, conhecida como acetato de alditol parcialmente metilados (PMAA; *Partially Methylated Alditol Acetate*). A principal diferença desse método está na metilação seletiva das hidroxilas livres previamente a etapa de hidrólise, e após a redução e acetilação gera-se uma biblioteca de compostos com variações nas posições metiladas e acetiladas das hidroxilas de cada monossacarídeo, representando as posições livres e envolvidas em ligações glicosídicas respectivamente. A reação de derivatização de PMAA dos polissacarídeos acaba por produzir uma grande quantidade de compostos, conforme cada monossacarídeo presente, e também de cada tipo de ligação glicosídica existente dentro da estrutura biopolimérica (BJÖRNDAL *et al.*, 1967).

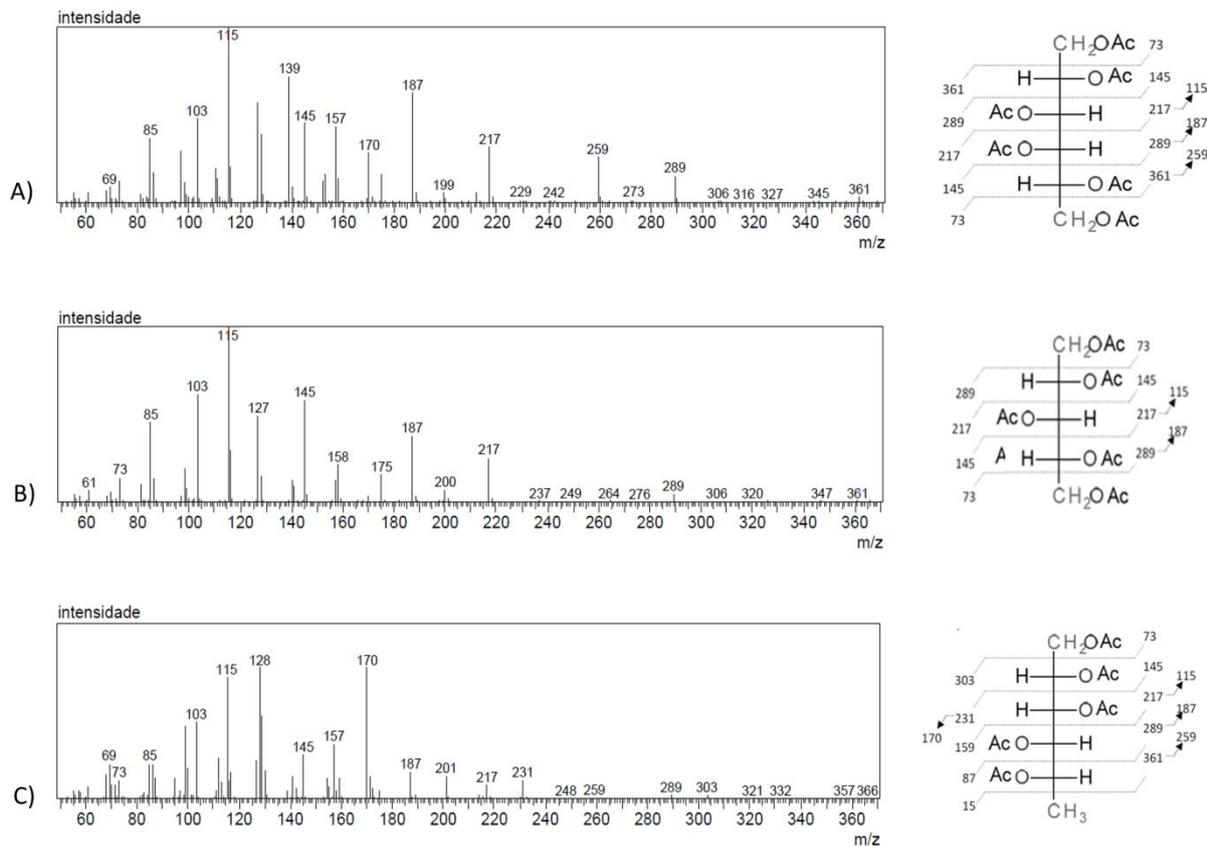


FIGURA 6.3 - Padrão de fragmentação por GC-MS para derivados de acetato de alditol de monossacarídeos. A) Hexoses; B) Pentoses; C) 6-Desoxihexoses

Um dos grandes obstáculos para a análise dos polissacarídeos é a obtenção de padrões analíticos, devido a dificuldade na síntese de todos os possíveis produtos. Desse modo, a caracterização geralmente é feita pelo perfil da fragmentação obtido por espectrometria de massas, bem como a comparação com bancos de dados disponíveis na literatura. Visto que as moléculas geradas apresentam perfis de fragmentação constante e indicativa da presença de grupos funcionais em cada estrutura. Os perfis de fragmentação são obtidos de acordo com regras que governam a formação dos principais íons observados dentro do espectrômetro.

Em análises por espectrometria de massas com ionização por impacto eletrônico (EI), o íon molecular geralmente não é observado, e em todos os derivados o fragmento do íon acílio é o mais intenso ( $\text{CH}_3\text{CO}^+$ ,  $m/z$  43). A localização da carga nas moléculas pode ocorrer entre os diversos átomos de oxigênio presentes na estrutura. A formação dos íons primários comumente ocorre

pela quebra da ligação no carbono  $\alpha$  ao cátion radical formado, onde a intensidade do sinal reflete a estabilização do cátion, sendo mais estáveis nos íons onde a localização de carga se dá em um carbono metoxilado (-OMe) quando comparado ao carbono acetilado (OAc), pois a metila estabiliza a carga por aumento de densidade de carga no carbono ligado ao heteroátomo, enquanto o grupo acetil desestabiliza o cátion por retirada de densidade eletrônica da carboxila. Desta maneira, no caso da ligação estar entre duas metoxilas, ambos os íons podem ser formados. Por outro lado, em caso de ambos os substituintes, um em cada átomo, o íon observado será com a carga na metoxila, e no caso da ligação estar entre dois oxigênios acetilados não haverá a formação de íons em quantidades apreciáveis. Como a derivatização de PMAA insere um átomo de deutério no carbono que contém a carbonila (C-1) tornando a molécula assimétrica, íons com uma unidade de  $m/z$  de diferença podem ser observados, sendo íons de  $m/z$  pares portadores do carbono um contendo o deutério, e íons de  $m/z$  ímpares não possuindo esta porção. A partir dos íons primários pode ser observada a formação de diversos outros íons secundários, formados pela perda principalmente de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ; 32 Da), ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; 60 Da), formaldeído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ; 30 Da) e ceteno ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ; 42 Da). As fragmentações produzidas por diferentes hexoses, pentoses, desoxihexoses e outros açúcares podem ser encontradas na literatura (PETTOLINO *et al.*, 2008; SASSAKI e SOUZA, 2013). A Figura 6.4 apresenta a fragmentação da molécula do tipo 1,5-diacetil-2,3,4,6-tetrametil hexose para exemplificação dos fragmentos observados.

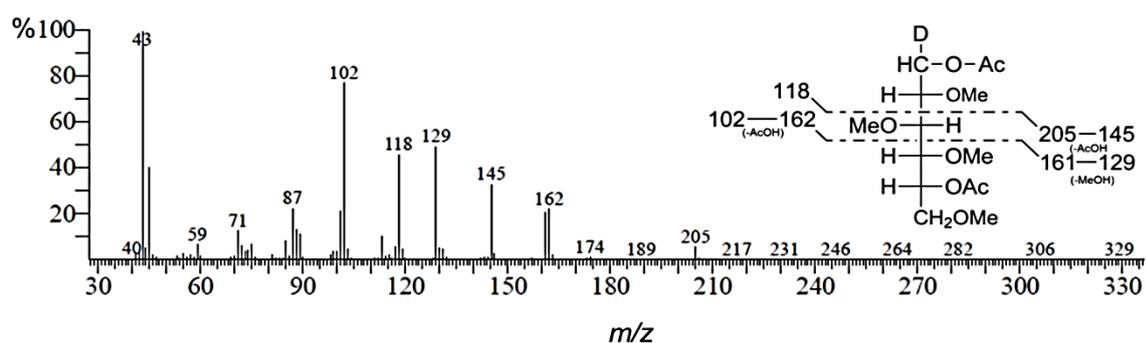


FIGURA 6.4 - Fragmentação observada para a molécula 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil hexose.

Os polissacarídeos são comumente extraídos de biomassas como algas e plantas superiores, ou então recuperadas de caldos de fermentação de culturas bacterianas ou fúngicas. Para um sistema de produção sustentável e economicamente viável em escala industrial, processos de fermentação microbianos são desejáveis, pois possibilita a produção rápida e eficiente em condições completamente controladas, sendo possível obter resultados em poucos dias, em comparação a semanas ou até meses necessários para obter resultados com plantas que ainda podem ser afetadas por variações geográficas e sazonais. Além do mais, a fermentação não depende de radiação solar como plantas e algas, e permite a utilização de uma ampla gama de substratos orgânicos como fonte de carbono (ÖNER, 2013).

Com a evolução da pesquisa em glicobiologia e as possibilidades de produção em fermentadores, o uso de ferramentas analíticas modernas capazes de ajudar a superar essa grande barreira na parte de identificação e caracterização estrutural dos polissacarídeos microbianos vêm recebendo grande atenção. Entre as moléculas encontradas em micro-organismos e que contém açúcares como componentes de parte ou toda a sua estrutura, as mais estudadas são os peptidoglicanos e os lipopolissacarídeos, conjugados de polissacarídeos importantes em diversos processos intracelulares como construção da parede celular e fatores de virulência (SUTHERLAND, 2002) e os polissacarídeos microbianos, polímeros de alta massa molecular feito de carboidratos. Os polissacarídeos microbianos podem ser divididos em polissacarídeos capsulares secretados (CPS) que formam uma discreta camada superficial associada com as superfícies das células, ou exopolissacarídeos (EPS) que estavam fracamente conectados com as superfícies celulares e fazem parte da matriz extracelular de comunidades bacterianas atuando como mucos solúveis aumentando substancialmente a viscosidade (ÖNER, 2013). Os EPSs, termo cunhado por Ian W. Sutherland (1972) são produzidos largamente por procariotos, sendo principalmente encontrados em bactérias gram-negativas, porém, menos frequentemente, em eucariotos como microalgas, leveduras e fungos filamentosos (SERRATO, 2008).

Os EPS tem importantes funções biológicas nas bactérias. A estrutura tridimensional formada pela interação das moléculas dos exopolissacarídeos atua na sinalização molecular, em processos de simbiose e mutualismo com outros

organismos, além de participarem ativamente no mecanismo de “*quorum sensing*” e como componente principal na formação de biofilme (FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2010). O biofilme é a matriz de sobrevivência de diversas comunidades bacterianas, podendo ser composto de uma combinação de células de micro-organismos, além de produtos extracelulares e outros detritos, sendo os EPS produzidos pelas bactérias o responsável por conferir a estrutura tridimensional (SUTHERLAND, 2001). O biofilme apresenta um papel importante no desenvolvimento bacteriano, com funções na evasão e tolerância contra agentes antibacterianos, manutenção da umidade e replicação, e sua estrutura exata varia de acordo com o ambiente na qual se desenvolve (VUONG *et al.*, 2004). Além do mais, o entendimento da formação dos polissacarídeos pode beneficiar áreas como a medicina. *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cenocepacia* são as principais causas de infecções pulmonares em pacientes imunodeficientes, e as infecções estão geralmente associadas à presença de um exopolissacarídeo hidrofílico conhecido como alginato (BYLUND *et al.*, 2006). ABRAHAM *et al.* (2009) observaram uma grande mudança na composição do EPS formado por *Staphylococcus aureus* quando submetido a tratamentos de esterilização físicos e químicos, o que é um indício que as metodologias de assepsia estão diretamente relacionadas com a transformação e degradação do biofilme bacteriano.

Bactérias produtoras de polímeros com estruturas inéditas e propriedades inovadoras vêm sendo isoladas em ambientes atípicos (LE COSTAOUËC *et al.*, 2012). Esta procura por diferentes exopolissacarídeos se torna de extrema importância, visto que sua produção é dependente do ambiente no qual os micro-organismos se encontram. Um bom exemplo é a produção de um EPS do tipo hialurano, pela bactéria *Vibrio diabolicus*, isolada de um verme extremófilo encontrado em fontes hidrotermais. O hialurano, também conhecido como ácido hialurônico, é um dos principais componentes da pele humana, envolvido em diversas funções como reparação da pele e ossos, hidrodinâmica e proliferação celular e processos de inflamação (SENNI *et al.*, 2011) chegando a custar US\$ 100.000,00 por Kg (BOERIU *et al.*, 2013). A Figura 6.5 ilustra os principais monossacarídeos encontrados em diferentes classes de bactérias, e sua comparação com biopolímeros de glicanas humanas.

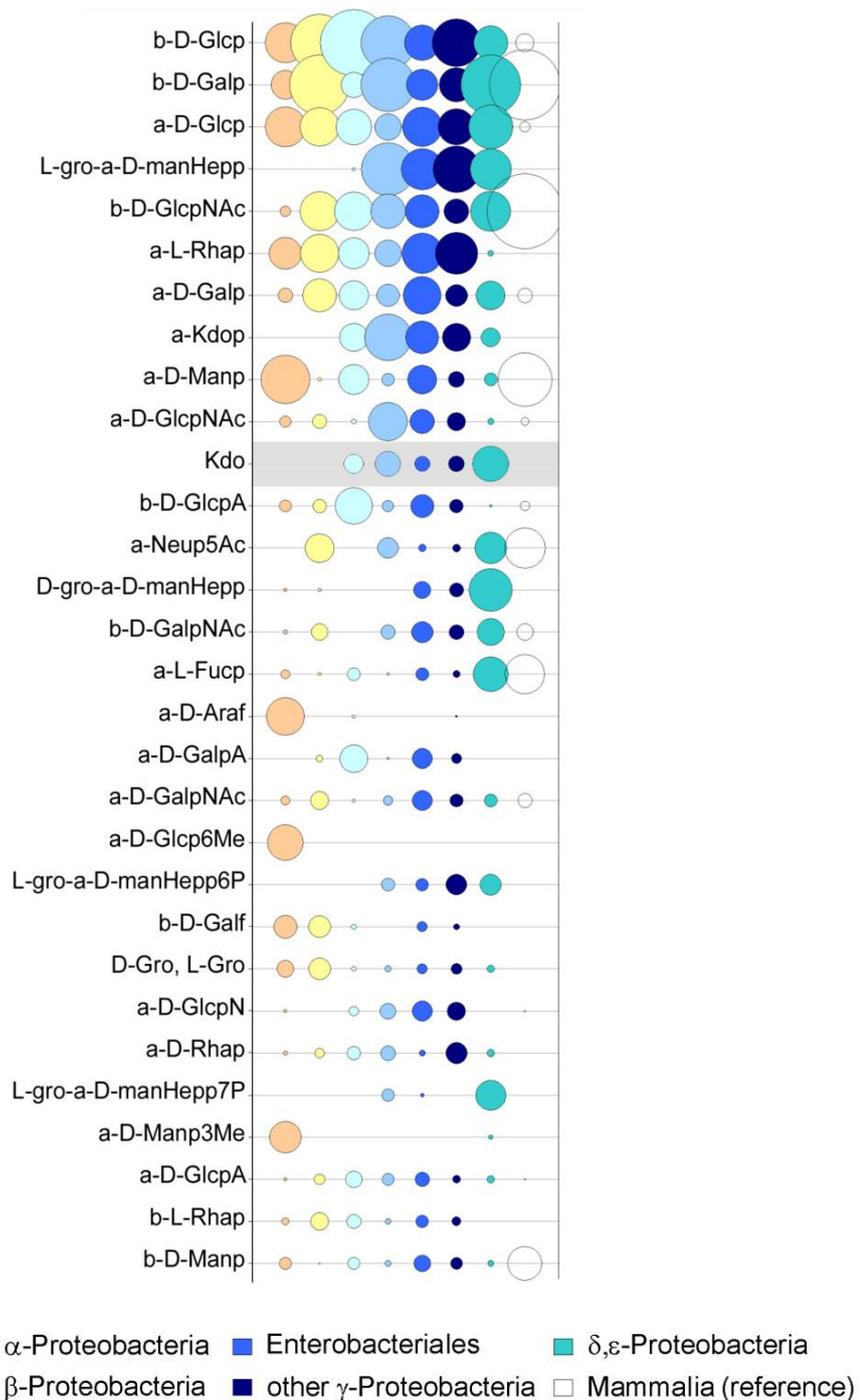


FIGURA 6.5 - Monossacarídeos comumente encontrados em diferentes classes de bactérias. Adaptado de HERGET *et al.*, 2008

Além do interesse no estudo das funções biológicas que esta classe de compostos pode mediar, os EPS apresentam muita utilidade para aplicações tecnológicas. Pesquisas visando aplicação industrial, de modo geral, estão concentradas nos polissacarídeos microbianos extracelulares, pois apresentam um

processo de extração e purificação simplificado, além de possibilitarem uma produtividade mais elevada e aumento de escala.

Além do interesse de utilização em áreas como saúde e bionanotecnologia, os polissacarídeos podem ser usados como, emulsificantes, floculantes, absorventes estabilizantes, bioadesivos, probióticos e agente de gelificação para alimentos, cosméticos, fármacos e petroquímicos, etc. (FREITAS *et al.*, 2011; DONOT *et al.*, 2012). A maioria das aplicações dos EPS estão relacionadas ao seu comportamento em meio aquoso. Suas características físicas e químicas como a capacidade de retenção de água, comportamento de polieletrólito, estrutura molecular e a possibilidade de modificação química permitem seus usos em diversas aplicações (DUMITRIU, 2004). A Figura 6.6 ilustra a correlação entre as propriedades mais relevantes dos polissacarídeos com suas principais áreas de aplicação.

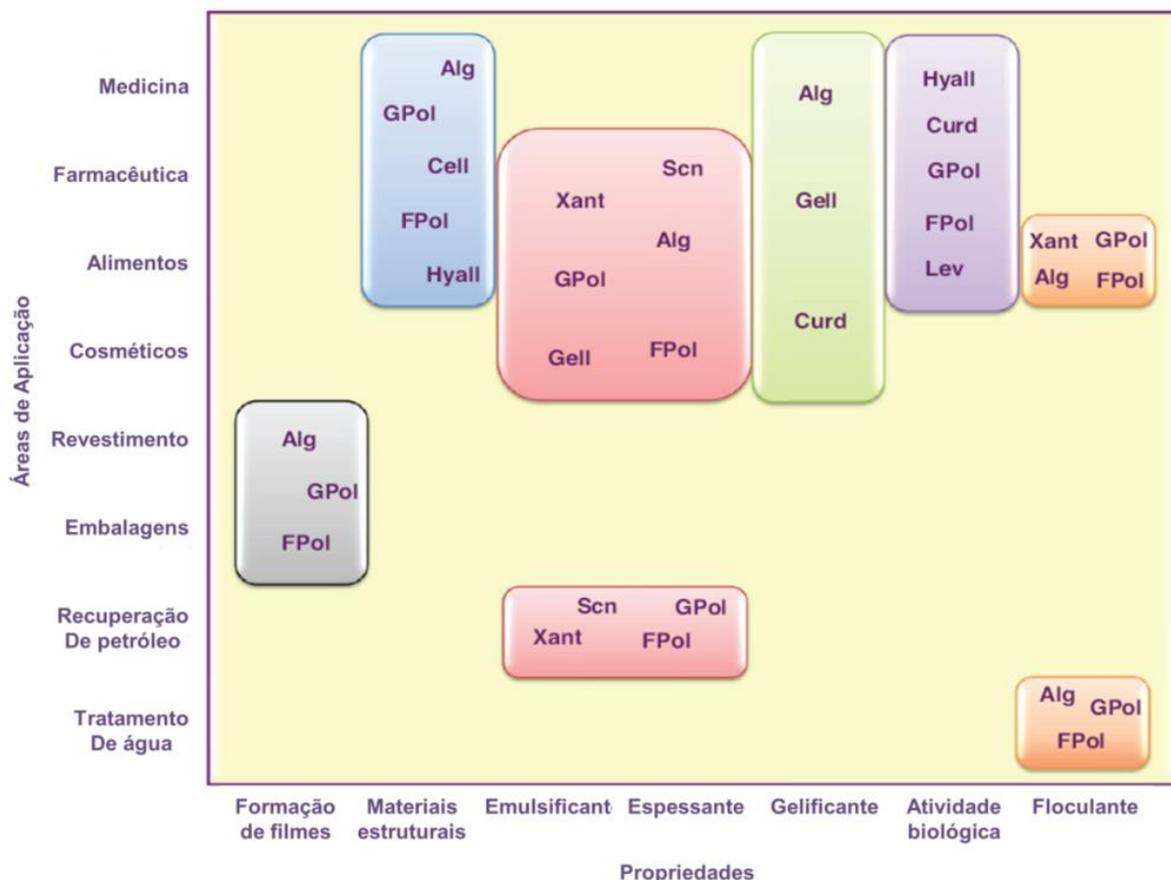


FIGURA 6.6 - Correlação entre as propriedades dos polissacarídeos com suas principais áreas de aplicação. Adaptado de FREITAS *et al.*, 2011. Alg, Alginato bacteriano; Curd, Curdlana; FPol, FucoPol; Gell, Goma Gellana ; GPol, GalactoPol; Hyall, Hialuronana; Lev, levan; Scn, Succinoglicana; Xant, Goma Xantana.

Apesar do potencial de produção e demanda de mercado, os EPS bacterianos ainda representam uma pequena fração do mercado global de polímeros, principalmente por conta de seu custo de produção (ROCA *et al.*, 2015). Além de gerar uma matéria prima de alto valor agregado, o processo de produção através da fermentação bacteriana pode ser beneficiado pelo uso de certos tipos de resíduos industriais como substrato para o crescimento microbiano, devido à alta quantidade de açúcares presente, sendo uma boa alternativa para a resolução simultânea de dois problemas, a diminuição da quantidade de resíduos industriais e a economia no processo de produção pelo uso de matéria-prima de baixo valor agregado (NERY *et al.*, 2008). No entanto, para aperfeiçoar o processo de produção e torna-lo viável é de extrema importância a obtenção de micro-organismos capazes de produzir compostos de alto valor agregado e em grandes quantidades, além do desenvolvimento de processos mais econômicos que visam à redução de custos com relação à composição dos meios de cultura e tempo de cultivo.

## **6.2 - Experimental**

### **6.2.1 - Métodos microbiológicos para obtenção de exopolissacarídeos**

#### **6.2.1.1 - Avaliação qualitativa da produção de EPS**

Para iniciar a avaliação da produção de EPS pelas cepas isoladas de *D. speciosa*, foi selecionado o teste de ponto bacteriano (BST; *Bacterial Spot Test*), com o intuito de observar o vigor do crescimento e a morfologia das colônias, na busca por características como viscosidade e forma, indícios capacidade de produção de EPS por colônias (BOUNAIX *et al.*, 2009; MALANG *et al.*, 2015). Para a realização dos experimentos, uma colônia de uma cultura bacteriana reativada em meio NA foi transferida com alça de platina estéril para um tubo de ensaio com tampa de rosca contendo 5 mL de meio CN. Após crescimento por 16 h, as células foram centrifugadas em tubo estéril (12.860 x g, 20°C, 10 min) e o meio de cultura descartado. As células foram lavadas com 2 mL de água estéril, e após a dissolução da pastilha de células a suspensão foi centrifugada (12.860 x g, 20°C, 10 min). Após

remoção da água foi novamente adicionado 2 mL de água, e após a homogeneização das células um volume de 20  $\mu\text{L}$  desta suspensão foi cuidadosamente transferida, com o auxílio de uma pipeta, para uma placa com meio de cultura NA enriquecido com 20  $\text{g.L}^{-1}$  de glicose. Após 48 h, foram avaliados parâmetros como ausência ou presença de muco, além de diâmetro e fenótipo da colônia.

#### 6.2.1.2 - Avaliação quantitativa e isolamento de EPS

Micro-organismos selecionados na etapa anterior foram selecionados para avaliação quantitativa da produção e isolamento e caracterização do EPS. Para o cultivo em meio líquido, as bactérias foram cultivadas em meio NA, e após crescimento uma colônia foi transferida com uma alça de platina estéril para um tubo de vidro com tampa contendo 5 mL de meio de cultura CN, mantido sob agitação de 160 rpm em incubadora orbital por 16 h. Após este tempo o inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio específico composto por 7,5  $\text{g.L}^{-1}$  de dextrose, 7,5  $\text{g.L}^{-1}$  de glicerol, 5  $\text{g.L}^{-1}$  de peptona e 3  $\text{g.L}^{-1}$  de extrato de carne, cultivado por 72 h sob as mesmas condições. Para cada micro-organismo foram utilizados quatro erlenmeyers com 250 mL de meio, totalizando 1 L de meio de cultura. A Figura 6.7 ilustra o processo de cultivo dos micro-organismos.



FIGURA 6.7 - Cultivo de células bacterianas para obtenção de EPS.

Ao final do cultivo as células foram removidas por centrifugação (12860 x g, 20°C, 15 min), e o EPS foi precipitado pela adição de 3 volumes de etanol a 4°C e posterior resfriamento da solução a -15°C por 16 h. O precipitado foi coletado por centrifugação (12860 x g, -5°C, 15 min), solubilizado em água e ácido trifluoroacético foi adicionado até obter-se uma solução aquosa de ácido trifluoroacético 30% (v/v), para precipitação de proteínas. Esta solução foi armazenada a 5°C por 1 h, seguido de centrifugação (12860 x g, 5°C, 30 min). O sobrenadante foi submetido novamente ao processo de purificação por precipitação com etanol sendo o sobrenadante descartado. O EPS obtido foi dissolvido em um pequeno volume de água ultrapura, congelado em N<sub>2</sub> líquido e liofilizado. Após secagem a massa obtida foi registrada e o EPS submetido à caracterização.

## 6.2.2 - Caracterização analítica dos exopolissacarídeos

Os EPS obtidos na etapa anterior foram caracterizados, para identificar os componentes do polímero bem como a sequência de ligações e o tamanho molecular da cadeia polimérica.

### 6.2.2.1 - FTIR

Os espectros de FTIR foram obtidos por pastilha. As amostras foram preparadas macerando 1 mg de EPS com 99 mg de KBr anidro e produção de pastilha por prensa a 10 KPa por 5 min, sendo a amostra avaliada no modo transmitância, com 32 *scans* com varredura entre a faixa de 4000-400 cm<sup>-1</sup>.

### 6.2.2.2 - SEC-UV-ELSD

Para as análises de Cromatografia por exclusão de tamanho com detecção por ultravioleta e espalhamento de luz evaporativo, tanto para a solubilização das amostras e dos padrões quanto para a composição da fase móvel

foi utilizada uma solução 20 mM de acetato de amônio, sendo injetado 30  $\mu\text{L}$  de amostra e eluído com vazão de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 6.2.2.3 - MALDI-TOF MS

Para os experimentos de MALDI-TOF MS, as amostras de EPS (10 mg) foram solubilizadas em 1 mL de água ultrapura, e após completa solubilização, 1  $\mu\text{L}$  da solução de EPS foi gotejada em placa MTP 384-*well ground steel* TF (Bruker Daltonics GmbH, Germany), e a placa deixada em capela para secagem. Após completa secagem da gota, foi depositado em cima do resíduo sólido 1,5  $\mu\text{L}$  de matriz que consiste em uma solução 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácido- $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico ( $\alpha$ -CHCA) em acetonitrila / solução aquosa de ácido trifluoroacético 0,1% (1:1 v/v). Após evaporação do solvente a análise foi realizada, percorrendo janelas de faixa de massas entre 1.000 e 100.000 Da.

### 6.2.2.4 - NMR

As análises de EPS por NMR foram realizadas em temperaturas de 27, 50 e 80°C, pois a variação de temperatura permite o deslocamento do sinal da água, que pode encobrir algum sinal da molécula (GOTTLIEB *et al*, 1997). As amostras foram preparadas diluindo até 10 mg de EPS em 0,7 mL, com posterior filtração em algodão e transferência da solução para um tubo de 5 mm. Como referência foi utilizado o sinal de ácido 3-(trimetilsilil) propiônico-*d*4 (TMSP-*d*4) (0,00 Hz). Para permitir uma correta atribuição estrutural, foram realizados experimentos 1D e 2D tais como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, TOCSY, HSQC e NOESY. Análises de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido foram feitas no modo CP/MAS.

Para as análises de NMR de amostra insolúveis, foram realizados experimentos em estado sólido, realizadas no modo de polarização cruzada com rotação no ângulo mágico (CP/MAS; *Cross Polarization - Magic Angle Spinning*). Para o preparo da amostras, aproximadamente 50 mg de sólido foi acondicionado em rotor de 4 mm específico para este tipo de análise.

### 6.2.2.5 - GC-MS

Para a determinação dos monossacarídeos e identificação das ligações glicosídicas por cromatografia gasosa, as amostras foram submetidas a uma série de reações de derivatização em pote único. A obtenção dos monômeros na forma de acetato de alditol (AA) foi utilizada nos ensaios de avaliação da composição monomérica, e a derivatização para obtenção de acetato de alditol parcialmente metilado (PMAA) da análise glicosídica.

#### 6.2.2.5.1 - Obtenção dos derivados de acetato de alditol (AA)

Para obtenção dos derivados de acetato de alditol para cada EPS, em um tubo de ensaio com tampa de rosca e vedação de teflon foi adicionado 1,0 mg de EPS e 1,0 mL de solução aquosa de TFA 2,0 mol. L<sup>-1</sup>, mantidos por 2 h a 121°C em bloco de aquecimento. Após este período, a tampa foi removida e o solvente evaporado com passagem de fluxo de N<sub>2</sub> pela amostra. Para favorecer a evaporação e eliminar o ácido, 200 µL de isopropanol foram adicionados, e após secagem novamente 200 µL de isopropanol foram adicionados e removidos. Após completa secagem, foi adicionado 1,0 mL de uma solução recém-preparada de NaBH<sub>4</sub> 2,6 x 10<sup>-4</sup> mol. L<sup>-1</sup>, preparada logo antes do uso, pela adição de 100,0 mg de NaBH<sub>4</sub> em 10 mL de uma solução 1,0 mol. L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH, mantendo a reação a temperatura ambiente por 16 h. Depois término da reação, a solução foi neutralizada pela adição de ácido acético em gotas até o término da formação de bolhas. A partir do momento que não foi mais notada a formação de bolhas, a solução foi evaporada com o auxílio de um fluxo de N<sub>2</sub>. Após secagem quase completa, 500 µL de uma solução ácido acético:metanol (1:9 v/v) foi adicionada e novamente o solvente removido com auxílio de fluxo de N<sub>2</sub>. O procedimento foi repetido, e após nova secagem sob fluxo de N<sub>2</sub>, 1,0 mL de metanol foi adicionado e evaporado sob fluxo de N<sub>2</sub>, sendo o procedimento repetido por mais uma vez. Após completa neutralização e secagem do solvente, foram adicionados 250 µL de anidrido acético e 230 µL de piridina, sendo o frasco novamente selado e mantido a 50°C por 20 min. Após este período, a reação foi resfriada a temperatura ambiente e 1,0 mL de isopropanol foi adicionado, para facilitar a remoção dos reagentes voláteis. A

solução foi evaporada em fluxo de N<sub>2</sub>. Após secagem, 250 µL de isopropanol foram novamente adicionados e evaporados até secagem. Posteriormente, 250 µL uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 mol. L<sup>-1</sup> foram adicionados e os produtos acetilados extraídos pela adição de 2,0 mL de clorofórmio, com agitação branda em vortex por 30 s, sendo em seguida submetidos a centrifugação branda (515 x g, 20°C, 1 min) para quebra de emulsão. A fase orgânica foi removida e lavada por duas vezes com 1,0 mL de água. O solvente orgânico foi separado e removido sobre evaporação até quase a totalidade, ajustando o volume para 250 µL com clorofórmio. Finalmente, as amostras foram acondicionadas em *inserts* para frascos de GC-MS.

A Figura 6.8 apresenta um fluxograma das etapas reacionais para obtenção dos derivados de AA.

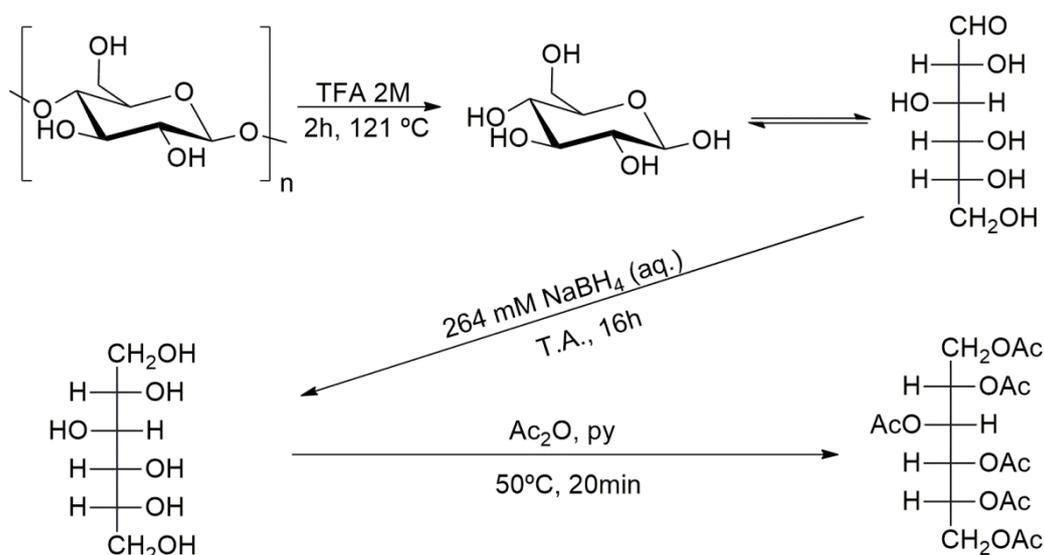


FIGURA 6.8 - Fluxograma dos processos de derivatização dos polissacarídeos para obtenção dos derivados de AA.

#### 6.2.2.5.2 - Obtenção dos derivados de acetato de alditol parcialmente metilados (PMAA)

Para as reações de derivatização para obtenção do PMAA de cada EPS, primeiramente foi realizada uma etapa de metilação. O método de per-O-

metilação empregado foi derivado do método proposto por CIUCANU e KEREK (1984), com a utilização de uma base preparada previamente.

Para o preparo da base, foi feita uma solução 12,5 mol. L<sup>-1</sup> de NaOH em água, diluindo 5 g de NaOH em 10 mL de água ultrapura em um balão volumétrico, com cuidado pois a dissolução é bastante exotérmica. Um volume de 100 µL desta solução foi transferida para um tubo de vidro, com posterior adição de 200 µL de metanol e 4 mL de DMSO, ambos anidros. Após agitação vigorosa em vortex e centrifugação, obteve-se uma pasta ao fundo do frasco, e um sólido branco flutuando na parte superior do líquido. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o líquido e o sólido branco foram removidos, restando apenas a pasta translúcida. A esta pasta novamente foi adicionado 4 mL de DMSO e o procedimento repetido outras quatro vezes, até observar a pasta adquirir uma coloração quase transparente. Neste momento, 1 mL de DMSO anidro foi adicionado e novamente agitado, estando a base pronta para o uso. Recomenda-se o uso da base imediatamente após o preparo, e sempre se utilizar bases recém-preparadas.

Para as reações de PMAA, 1 mg de EPS e 500 µL de DMSO foram adicionados a um tubo de ensaio com tampa de rosca e vedação, e a mistura mantida sob agitação até completa dissolução, empregando leve aquecimento se necessário. Após este período, 500 µL de base foram adicionados e a reação foi mantida a temperatura ambiente, selada e com agitação por 20 min. Após esse período, 100 µL de iodometano foram adicionados, e a reação mantida sob agitação por mais 10 minutos. O processo de adição de base e iodometano foram realizados por mais duas vezes. Após 20 min da última adição de iodometano, o frasco foi aberto, e com o auxílio de uma pipeta de Pasteur foi borbulhado nitrogênio levemente ao fundo do frasco, até a solução passar de uma cor branca turva para incolor, indicando a remoção do excesso de CH<sub>3</sub>I. Logo em seguida, 2 mL de diclorometano foi adicionado e o tubo agitado em vortex por 30 segundos e centrifugado (12860 x g, 5°C, 30 min), com posterior remoção da fase aquosa. A fase orgânica foi lavada com 2 mL de água ultrapura duas vezes, e a fase orgânica resultante transferida para um novo tubo de ensaio e seca. Deste ponto em diante, as reações de hidrólise, redução a acetilação foram as mesmas que foram descritas para a formação dos acetatos de alditóis descrito na seção 6.2.2.5.1, com uma única alteração. Ao invés de usar NABH<sub>4</sub>, foi utilizado NABD<sub>4</sub>, com o intuito de promover a

redução com a adição de um deutério ao invés de hidrogênio no carbono carbonílico, permitindo a marcação do carbono reduzido, permitindo uma maior discriminação dos produtos formados.

A Figura 6.9 apresenta um fluxograma das etapas reacionais para obtenção dos derivados de PMAA.

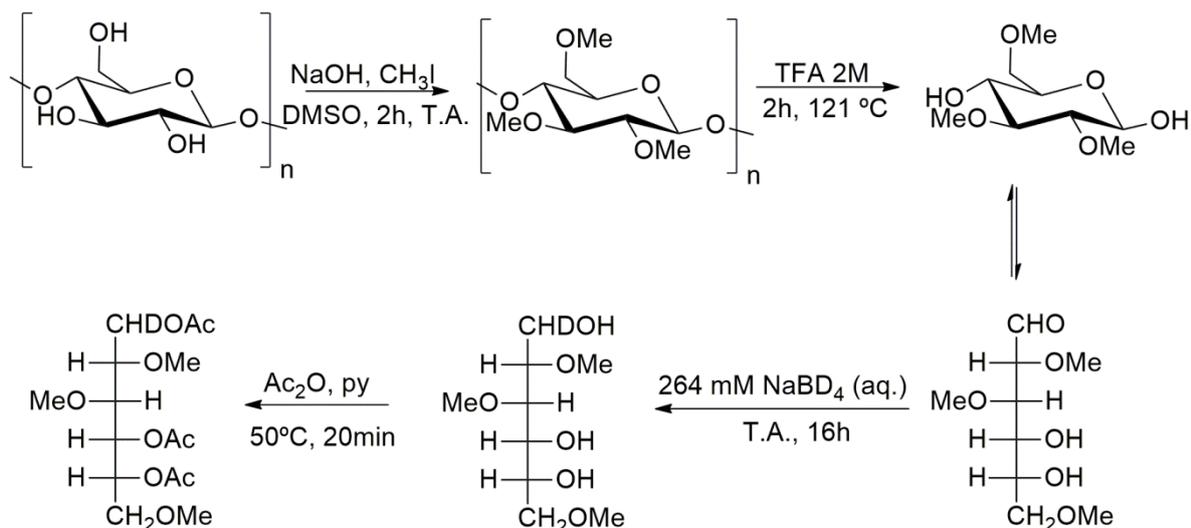


FIGURA 6.9 - Fluxograma dos processos de derivatização dos polissacarídeos para obtenção dos derivados de PMAA.

#### 6.2.2.5.3 - Análise Instrumental

Para a análise dos produtos obtidos pelas reações de derivatização descritas nas seções 6.2.2.5.1 e 6.2.2.5.2 por GC-MS, foi utilizada uma coluna Rtx-2330 (30,00 m, 0,25 mm id, 0,10  $\mu\text{m}$ ) (Restek, Bellefonte, PA, EUA). As temperaturas do injetor, interface e fonte de íons foram ajustadas para  $250^\circ\text{C}$ ,  $240^\circ\text{C}$  e  $250^\circ\text{C}$  respectivamente. A injeção foi realizada no modo *split*, com proporção de 1:10. O programa de temperatura do forno da coluna está descrito na Tabela 6.1.

O tempo total de corrida foi de 47,5 min, com velocidade linear constante de  $39,7\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . O detector de massas foi programado para adquirir os espectros no modo *fullscan* no intervalo de massas entre 40-400  $m/z$ . Os cromatogramas foram registrados a partir de 2,5 minutos, com o corte do solvente

programado para 2,0 min. Os compostos foram identificados através de comparação com padrões comerciais ou banco de dados NIST 11 (*National Institute of Standards and Technology* - EUA).

TABELA 6.1 - Parâmetros de temperatura do forno da coluna para o método de análise do produto de AA e PMAA por GC-MS.

Temperatura (°C)	Taxa de aquecimento (°C. min <sup>-1</sup> )	Tempo De Espera (min)
80		2
170	30	5
240	4	20

### 6.3 - Resultados e Discussão

A capacidade de produção de EPS por micro-organismos isolados de *D. speciosa* foi inicialmente avaliada através de um teste qualitativo, para observar fenótipos que permitam a seleção de colônias de cepas bacterianas como potenciais produtores de EPS dentre de isolados testados.

#### 6.3.1 - Triagem Qualitativa de isolados bacterianos de *D. speciosa* frente sua produção de exopolissacarídeo (BST)

Para a avaliação do crescimento e produção de exopolissacarídeos dos 73 cepas bacterianas isoladas de *D. speciosa*, foi realizado o teste da gota foi adotado. Os cultivos microbianos foram executados por um período de 48 h após a inoculação da gota contendo a suspensão de células. Para a avaliação da produção de EPS, foram avaliados dois parâmetros: i) Diâmetro da colônia formada e ii) Classificação de acordo com o fenótipo da colônia, sendo possíveis quatro fenótipos; A) onde não ocorre a produção de grandes formações extracelulares (EPS-); B) colônias produtoras de muco compactos; C) cremosos ou D) líquidos (BOUNAIX *et al.*, 2009). A Figura 6.10 exemplifica cada fenótipo observável.

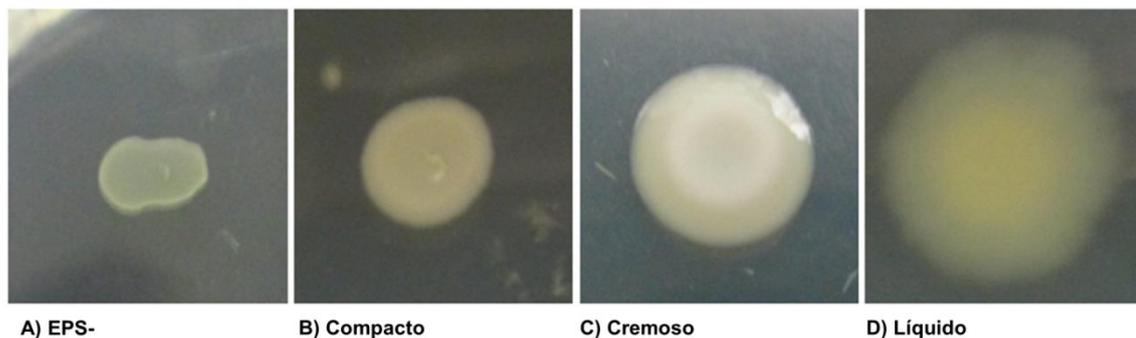


FIGURA 6.10 - Exemplos de fenótipos observados pelo teste de ponto bacteriano (BST). A) EPS-; B) Compacto; C) Cremoso; D) Líquido

Todos os 73 isolados foram submetidos ao teste de ponto bacteriano. A Figura 6.11 ilustra algumas cepas bacterianas isoladas de *D. speciosa* durante a avaliação da triagem, com destaque para os tipos de fenótipos usados na classificação.

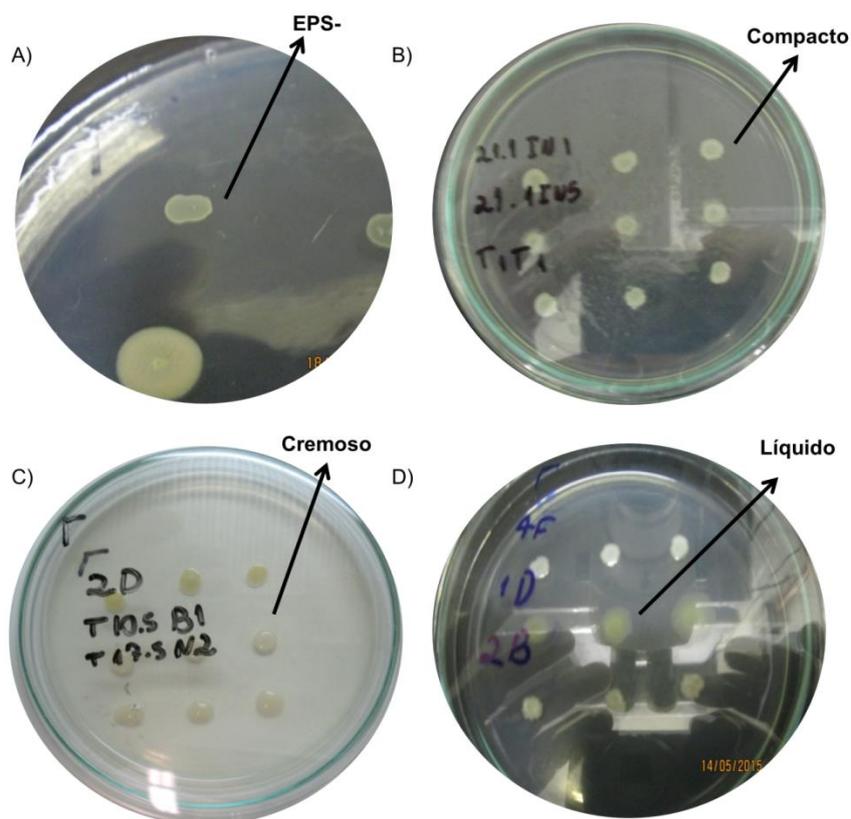


FIGURA 6.11 - Imagens de alguns dos isolados durante o teste de ponto bacteriano (BST) para triagem de cepas produtoras de EPS.

Nos ensaios de triagem qualitativa pela técnica de BST, foram observadas variações nas formas e intensidade de crescimento dos organismos durante o experimento. Foram observados crescimentos que variaram de 2 a 20 cm após 48 h de cultivo, bem como as quatro classificações de fenótipos, mostrando uma grande variação de colonização das cepas isoladas. As Tabela 6.2, 6.3 e 6.4 descrevem todos os resultados de coloração, diâmetro e fenótipos observados para todos os 73 isolados de *D. speciosa*, e a Figura 6.12 apresenta uma análise descritiva dos valores de diâmetro e dos tipos de fenótipos observados para todos os isolados.

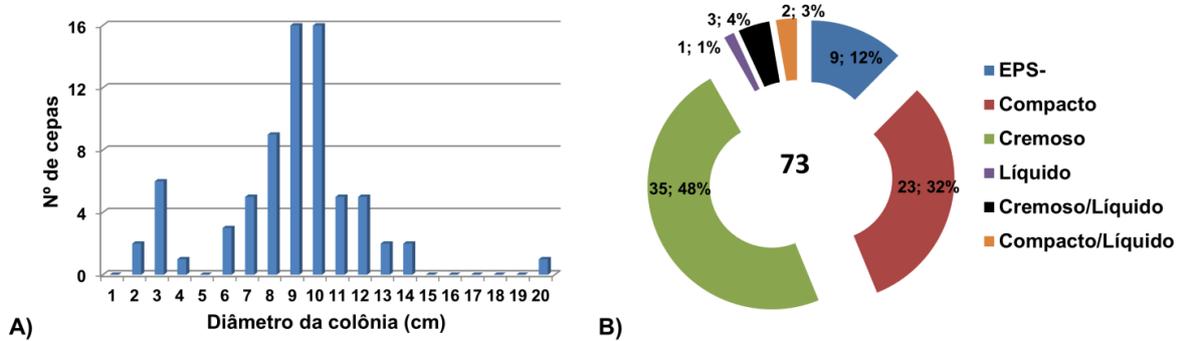


FIGURA 6.12 - Avaliação dos resultados obtidos no teste de ponto bacteriano (BST)  
 A) Variação do diâmetro de colônia por número de isolado B) Variação de acordo com o fenótipo observado

O diâmetro das colônias bacterianas após 48 h de crescimento apresentou uma distribuição centrada em valores médios, com maiores crescimentos entre 6 e 14 cm, e uma média centrada em um crescimento de 8,8 cm. Com base nos resultados descritivos apresentado nas Tabela 6.2, 6.3 e 6.4, foi observada uma relação entre as duas variáveis observadas, o fenótipo e o diâmetro da colônia, sendo verificando que o aumento no diâmetro segue a relação EPS- < Compacto < Creoso < Líquido. Os valores observados com baixo crescimento (2-4 cm) são referentes às espécies que produziram fenótipos do tipo EPS-, enquanto que o isolado que produziu um crescimento de 20 cm apresentou fenótipo líquido. O fenótipo creoso foi o mais observado, seguido do fenótipo compacto, como mostra a figura 6.12. B).

TABELA 6.2 - Resumo dos resultados do teste de triagem de cepas para produção de EPS

Nº	Código <sup>a</sup>	Identidade <sup>b</sup>	Cor da colônia	Fenótipo	Diâmetro da colônia (cm)
1	DsA.N015	<i>Streptomyces griseus</i>	Branca	EPS -	2
2	DsA.N017	<i>Streptomyces badius</i>	Branca	EPS -	2
3	DsA.N030	<i>Streptomyces griseus</i>	Branca	EPS -	3
4	DsA.N040	<i>Streptomyces badius</i>	Branca	EPS -	3
5	DsA.N014	<i>Streptomyces</i> sp.	Branca	EPS -	3
6	DsA.N016	<i>Streptomyces griseus</i>	Branca	EPS -	3
7	DsA.N020	<i>Streptomyces griseus</i>	Branca	EPS -	3
8	DsA.N027	<i>Streptomyces badius</i>	Branca	EPS -	3
9	DsA.N025	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	Creme	EPS -	4
10	DsA.N037	<i>Acinetobacter junii</i>	Branca	Compacto	6
11	DsA.N047	<i>Acinetobacter junii</i>	Branca	Compacto	6
12	DsA.N049	<i>Delftia acidovorans</i>	Branca	Compacto	6
13	DsF.N014	<i>Pseudomonas monteillii</i>	Amarela	Compacto	7
14	DsF.N017	<i>Pseudomonas monteillii</i>	Amarela	Compacto	7
15	DsA.N002	<i>Acinetobacter junii</i>	Branca	Compacto	7
16	DsA.N042	<i>Aurantimonas</i> sp.	Amarela	Compacto	7
17	DsA.N048	<i>Acinetobacter junii</i>	Branca	Compacto	7
18	DsF.N004	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	8
19	DsF.N005	<i>Pseudomonas monteillii</i>	Amarela	Compacto	8
20	DsF.N006	<i>Pseudomonas monteillii</i>	Amarela	Compacto	8
21	DsF.N010	<i>Enterobacter cloacae</i>	Amarela	Compacto	8
22	DsF.N013	<i>Burkholderia gladioli</i>	Branca	Creoso	8
23	DsF.N015	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Creme	Compacto	8
24	DsF.N016	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Amarela	Compacto	8
25	DsA.N001	<i>Acinetobacter baylii</i>	Creme	Creoso	8
26	DsA.N036	<i>Acinetobacter junii</i>	Branca	Compacto	8
27	DsF.N002	<i>Empedobacter brevis</i>	Amarela	Creoso	9

<sup>a</sup> Código do isolamento (Tabela 4.2). <sup>b</sup> Identidade obtida de acordo com as identificações realizadas por 16S rDNA e MALDI-TOF MS.

TABELA 6.3 - Continuação do resumo dos resultados do teste de triagem de cepas para produção de EPS

Nº	Código <sup>a</sup>	Identidade <sup>b</sup>	Cor da colônia	Fenótipo	Diâmetro da colônia (cm)
28	DsF.N007	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	9
29	DsF.N009	<i>Serratia marcescens</i>	Crema	Creoso	9
30	DsF.N019	<i>Kluyvera intermedia</i>	Branca	Compacto	9
31	DsA.N029	<i>Ochrobactrum grignonense</i>	Branca	Creoso	9
32	DsA.N031	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	9
33	DsA.N041	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Amarela	Compacto	9
34	DsA.N018	<i>Ochrobactrum galinifaciens</i>	Branca	Creoso	9
35	DsA.N006	<i>Acinetobacter pittii</i>	Crema	Creoso	9
36	DsA.N019	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	Branca	Creoso	9
37	DsA.N007	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Amarela	Compacto	9
38	DsA.N008	<i>Pseudomonas mosselii</i>	Branca	Compacto	9
39	DsA.N023	<i>Pseudomonas mosselii</i>	Branca	Compacto	9
40	DsA.N024	<i>Acinetobacter pittii</i>	Crema	Creoso	9
41	DsA.N011	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	9
42	DsA.N028	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Amarela	Compacto	9
43	DsF.N008	<i>Acidovorax</i> sp.	Amarela	Creoso	10
44	DsF.N011	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	10
45	DsF.N012	<i>Enterobacter asburiae</i>	Crema	Creoso	10
46	DsF.N018	<i>Enterobacter asburiae</i>	Crema	Creoso	10
47	DsF.N020	<i>Serratia marcescens</i>	Branca	Creoso	10
48	DsA.N033	<i>Acinetobacter pittii</i>	Crema	Creoso	10
49	DsA.N034	<i>Serratia marcescens</i>	Vermelha	Creoso	10
50	DsA.N043	<i>Rhizobium radiobacter</i>	Crema	Creoso	10
51	DsA.N045	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	10
52	DsA.N003	<i>Serratia marcescens</i>	Branca	Creoso	10
53	DsA.N013	<i>Serratia marcescens</i>	Branca	Creoso	10
54	DsA.N021	<i>Pseudomonas mosselii</i>	Branca	Compacto	10

<sup>a</sup> Código do isolamento (Tabela 4.2). <sup>b</sup> Identidade obtida de acordo com as identificações realizadas por 16S rDNA e MALDI-TOF MS.

TABELA 6.4 - Continuação do resumo dos resultados do teste de triagem de cepas para produção de EPS

Nº	Código <sup>a</sup>	Identidade <sup>b</sup>	Cor da colônia	Fenótipo	Diâmetro da colônia (cm)
55	DsA.N022	<i>Pseudomonas mosselii</i>	Branca	Compacto	10
56	DsA.N009	<i>Pseudomonas mosselii</i>	Branca	Compacto	10
57	DsA.N010	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Rosa claro	Creoso	10
58	DsA.N026	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	10
59	DsA.N035	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	11
60	DsA.N039	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	11
61	DsA.N044	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	11
62	DsA.N005	<i>Serratia marcescens</i>	Branca	Creoso	11
63	DsA.N012	<i>Serratia marcescens</i>	Branca	Creoso	11
64	DsF.N001	<i>Pseudomonas putida</i>	Branca	Creoso/Líquido	12
65	DsA.N038	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	12
66	DsA.N004	<i>Serratia marcescens</i>	Branca	Creoso	12
67	DsA.N050	<i>Acinetobacter junii</i>	Branca	Compacto/Líquido	12
68	DsA.N052	<i>Pseudomonas</i> sp.	Branca	Creoso/ Líquido	12
69	DsA.N046	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Branca	Creoso	13
70	DsA.N051	<i>Acinetobacter junii</i>	Branca	Compacto/Líquido	13
71	DsA.N032	<i>Enterobacter cloacae</i>	Branca	Creoso	14
72	DsA.N053	<i>Pseudomonas</i> sp.	Branca	Creoso/Líquido	14
73	DsF.N003	<i>Luteibacter</i> sp.	Amarela	Líquido	20

<sup>a</sup> Código do isolamento (Tabela 4.2). <sup>b</sup> Identidade obtida de acordo com as identificações realizadas por 16S rDNA e MALDI-TOF MS.

A maioria das cepas de mesma espécie produziram resultados similares, porém para alguns dos isolados, foi observado um crescimento com características de dois diferentes fenótipos, e para estas cepas foi realizada a classificação em ambos os fenótipos, fenômeno também observado por outros autores (MALANG *et al.*, 2015). A variação do fenótipo ficou ainda mais evidente em casos como, o isolado DsA.N034 de *Serratia marcescens*, o único entre os isolados do gênero *Serratia* (8 no total) com o metabolismo de produção do pigmento prodigiosina ativo (WILLIAMSON *et al.*, 2006), resultando em uma coloração vermelha bem característica (Figura 6.11), e também o isolado de *Enterobacter cloacae* DsF.N010, que produziu um fenótipo amarelado e com fenótipo compacto, diferente das demais cepas da mesma espécie que produziram colônias brancas e com grande produção de muco. TORRES-RODRIGUES *et al.* (2014) também observaram isolados de mesma espécie de *Leuconostoc kimchii* produzindo fenótipos variados, com influência direta na característica do EPS obtido. Variações mais sutis entre espécies de mesmo gênero também foram notadas nos gêneros com maiores representantes, como em *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, onde fenótipos, cores e diâmetros diferentes podem ser observados. Esses resultados atestam a importância de se explorar todos os isolados de uma mesma espécie, visto que o fenótipo da colônia pode ser bem diferente e conseqüentemente apresentarem variada capacidade de produção. Com a identificação das bactérias, é possível avaliar a extensão dos dados descritos para os gêneros obtidos com relação a sua capacidade de produção de EPS.

### 6.3.2 - Avaliação quantitativa da produção de EPS por isolados selecionados

A partir dos resultados obtidos no teste de triagem, bem como a avaliação das informações presentes na literatura, foram selecionados 5 isolados para uma avaliação quantitativa da produção de EPS. REDDY *et al.* (1996) identificaram uma relação entre a presença de muco na colônia e a produção de EPS, porém a literatura não indica uma clara relação entre os fenótipos (BOUNAIX *et al.*, 2009; TORRES-RODRIGUEZ *et al.*, 2014; MALANG *et al.*, 2015). Foram escolhidas cepas bacterianas de todos os fenótipos encontrados e com diâmetros diferentes,

priorizando gêneros com pouca ou nenhuma descrição de espécies produtoras de EPS. Essa escolha foi feita para avaliar se algum dos fenótipos está associado a produção de EPS, e também se o diâmetro pode ser um indicativo do acúmulo do biopolímero, além de permitir a obtenção de EPS ainda não descritos na literatura. Os isolados selecionados estão descritos na Tabela 6.5.

TABELA 6.5 - Isolados selecionados para avaliação quantitativa e caracterização do EPS

<b>Código</b>	<b>Identidade</b>	<b>Cor</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>
DsA.N042	<i>Aurantimonas</i> sp.	Amarela	Compacto	7
DsF.N013	<i>Burkholderia gladioli</i>	Branca	Creoso	8
DsF.N008	<i>Acidovorax</i> sp.	Amarela	Creoso	10
DsA.N053	<i>Pseudomonas</i> sp.	Branca	Creoso/Líquido	14
DsF.N003	<i>Luteibacter</i> sp.	Amarela	Líquido	20

Após realizar os processos de cultivo, extração e purificação definidos na seção 6.2.1.2, foi obtida a quantidade em massa seca de EPS para cada isolado bacteriano. Os rendimentos estão dispostos na Tabela 6.6

TABELA 6.6 - Resumo dos resultados quantitativos para a produção de EPS pelos isolados selecionados

<b>Isolado</b>	<b>Massa (g EPS .L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>
<i>Burkholderia gladioli</i>	0,028	Creoso	8
<i>Acidovorax</i> sp.	0,040	Creoso	10
<i>Luteibacter</i> sp.	0,060	Líquido	20
<i>Pseudomonas</i> sp.	0,120	Creoso/Líquido	14
<i>Aurantimonas</i> sp.	1,502	Compacto	7

Ao analisar os resultados de massa seca de EPS obtidos dispostos na Tabela 6.6, não se pode observar uma relação direta entre os parâmetros observados, fenótipo e diâmetro, com a quantidade de produção de EPS. Imagens da aparência final de cada EPS obtido estão ilustradas na Figura 6.13.



FIGURA 6.13 - Tipos de EPS obtidos para os isolados selecionados

Foi obtido um tipo de EPS com características semelhante para os isolados DsF.N003 (*Luteibacter* sp.), DsF.N008 (*Acidovorax* sp.) e DsF.N013 (*Burkholderia* sp.), de coloração branca, rigidez e aparência de poliestireno expandido, coincidentemente também conhecido pela sigla EPS. Os três isolados produziram uma baixa quantidade de EPS, apresentando o diâmetro da colônia no teste de triagem e a quantidade de EPS que cada isolado produziu em meio líquido similares e baixas. Um segundo tipo de EPS foi produzido pelo isolado DsA.N053 (*Pseudomonas* sp.), de coloração amarelada, sendo um material extremamente solúvel em água. O material também apresentou alta característica higroscópica, absorvendo grande quantidade de umidade do ar em pouco tempo após a remoção da amostra de dentro do equipamento de liofilização, sendo obtido na forma de gel. O EPS produzido pelo isolado DsA.N042 (*Aurantimonas* sp.) apresentou uma coloração creme, sendo completamente insolúvel em água. Esse material, ao contato com a água, apresenta retenção da mesma e aumento de volume, porém sem aparente solubilização. Esta é uma propriedade incomum em polissacarídeos microbianos, visto que em sua grande maioria são extremamente solúveis. Entretanto, a literatura indica que existem estruturas com maior quantidade de ligações glicosídicas de tipo  $\beta$  em EPS microbianos que podem conferir esta propriedade ao material, como por exemplo, em curdlanas,  $\beta$ -1,3-glucanas lineares ou ramificadas, ou mesmo celulose bacteriana ( $\beta$ -1,4-glucana) (MCINTOSH *et al.*, 2005).

Nesses ensaios foi observada uma tendência entre a relação do teste de triagem e a quantidade de EPS produzido nos isolados DsF.N003, DsF.N008, DsF.N013 e DsA.N053, aparentemente o isolado que produziu a maior quantidade

de EPS foi a cepa DsA.N042, que produziu um fenótipo compacto e com menor diâmetro de colônia. Assim, vale a pena destacar que: i) O teste de ponto auxilia na identificação de cepas produtoras de EPS das que não são capazes de produzir muco (EPS-), entretanto não foi observada uma relação direta entre diâmetro e fenótipo com a quantidade de polímero observado, ii) O tempo de avaliação do teste qualitativo pode não ter sido a otimizada, visto que alguns isolados, inclusive o DsA.N042, apresentou um crescimento mais lento porém ainda presente mesmo após as 48 horas do teste e iii) a possibilidade deste tipo de polissacarídeo ser expresso apenas em meio líquido, visto que bactérias podem produzir mais de um tipo de EPS de acordo com situações ou fenótipos específicos (FRANKLIN *et al.*, 2011).

### 6.3.3 - Caracterização Estrutural dos EPS obtidos

Uma vez obtidos os exopolissacarídeos purificados e secos, iniciou-se a exploração de técnicas analíticas na tentativa de desvendar o maior número possível de informações sobre a estrutura química dos materiais obtidos.

Inicialmente, os EPS foram submetidos a análises de FTIR, para busca de informações referentes a grupos funcionais, uma vez que os açúcares possuem uma estrutura química muito diversa. O apêndice 2 traz os espectros obtidos, e as principais frequências observadas estão na tabela 6.7.

TABELA 6.7 - Frequências vibracionais observadas nos espectros de FTIR dos EPS obtidos dos isolados bacterianos.

v (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibração
3600-3200 (F)	Estiramento simétrico O-H c/ ligação de hidrogênio
2950-2900 (f)	Estiramento C-H sp <sup>3</sup>
1590-1660 (m)	Estiramento do anel de galactose e manose
1200-1000 (F)	Estiramento C-O

Os espectros de FTIR mostram uma grande similaridade entre as amostras, indicando a existência de um núcleo comum a todos, no caso os monossacarídeos. Uma banda muito intensa e alargada na região entre 3600-3200  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento da ligação O-H das hidroxilas presentes. As bandas de baixa intensidade na região de 2950-2900  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas com os estiramentos simétricos das ligações C-H em carbono  $\text{sp}^3$  (FREITAS *et al.*, 2009). Uma banda intensa na região de 1650  $\text{cm}^{-1}$  observada em todos os espectros e apresenta duas possíveis atribuições. Primeiramente, pode ser atribuída a um grupo funcional amida, proveniente de um amino açúcar acetilado ou ligações peptídicas de aminoácidos substituintes ou proteínas contaminantes, entretanto a ausência das bandas de confirmação características em torno de 1550  $\text{cm}^{-1}$  e 1400  $\text{cm}^{-1}$  permitiu descartar esta possibilidade. Outra vibração que pode contribuir para o aparecimento da banda está na absorção C-C de açúcares na sua forma cíclica como os observados em galactose e manose, observadas em 1641 e 1657  $\text{cm}^{-1}$  (WANG e SOMASUNDARAN, 2007; KAVITA *et al.*, 2011). Finalmente, uma conjunção de bandas sobrepostas de alta intensidade na região de 1150-1000  $\text{cm}^{-1}$  pode ser relacionada a vibrações como estiramento assimétrico C-O-C e estiramento C-O-H de álcoois secundários, característicos para polissacarídeo (BOTELHO *et al.*, 2014). Todos estes sinais indicam que o material obtido de fato possui polissacarídeos como constituinte principal.

Após a caracterização inicial por FTIR, os EPS das bactérias DsA.N042 (*Aurantimonas* sp.), DsF.N008 (*Acidovorax* sp.) e DsF.N003 (*Luteibacter* sp.) foram selecionadas para a caracterização estrutural do polímero e tentativa de elucidação estrutural.

#### 6.3.4 - Elucidação estrutural do EPS produzido pela cepa DsA.N042 (*Aurantimonas* sp.)

O polissacarídeo produzido pela bactéria isolada do inseto *D. speciosa*, *Aurantimonas* sp., apresentou baixa solubilidade em água e em outros solventes como solução aquosa de NaOH (0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ), solução aquosa de ácido acético (0,1 mol.  $\text{L}^{-1}$ ), etanol, acetona, acetato de etila e clorofórmio. Sendo assim, o EPS foi

analisado no estado sólido por  $^{13}\text{C}$  NMR de alta resolução usando a técnica de HR-MAS, como mostra a Figura 6.14.

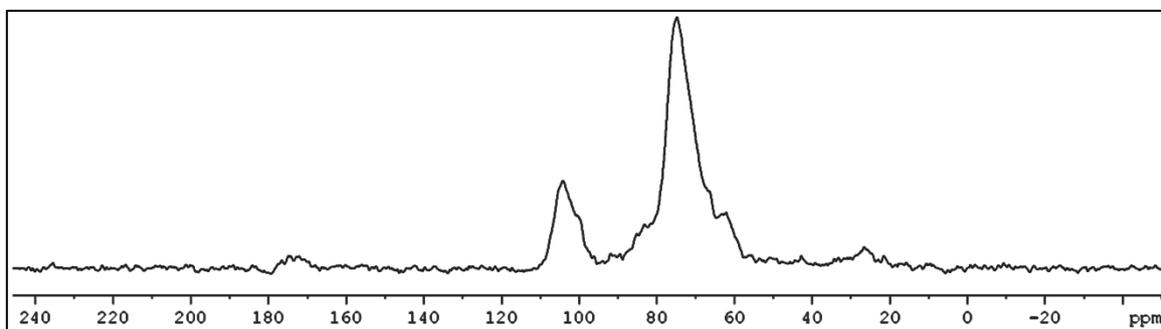


FIGURA 6.14 - Espectro de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR para o EPS isolado de *Aurantimonas* sp.

A primeira análise indicou a presença de sinais de carboidratos como o componente principal da amostra, porém a largura do sinal não permitiu uma avaliação posterior. Uma segunda análise foi realizada adicionando algumas gotas de água deuterada a amostra, uma vez que a hidratação de materiais amorfos resulta em uma melhor definição dos sinais por permitir uma estrutura mais ordenada das cadeias poliméricas (SAITO *et al.*, 1989; FRIČOVÁ e KOVAL'AKOVÁ, 2013). A Figura 6.15 apresenta o espectro de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR obtido desta forma.

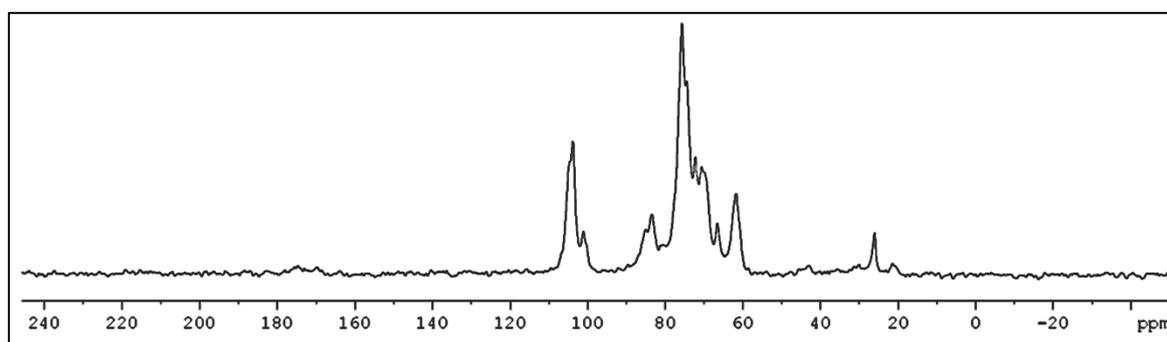


FIGURA 6.15 - Espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR em estado sólido após hidratação do EPS isolado de *Aurantimonas* sp.

O espectro de  $^{13}\text{C}$  NMR em estado sólido com a hidratação da amostra confirma que a amostra é constituída carboidratos, e não apresenta sinais em regiões conhecidas para outros biopolímeros como proteínas e ácido nucleicos. Os sinais observados indicam a presença predominante de açúcares neutros, como pentoses ou hexoses, pois pela ausência de sinais na região de 15-20 ppm o EPS não apresenta desoxiaçúcares, e os sinais de baixa intensidade em 25ppm e próximo a 170 ppm dão indícios da presença, em baixa quantidade, de monômeros acetilados. Os sinais na região de 100 ppm, referentes aos carbonos anoméricos indicam a presença de mais que uma unidade de monossacarídeo. Geralmente, anômeros  $\alpha$  apresentam deslocamento inferior, entre  $\delta$  97-101, enquanto anômeros  $\beta$  apresentam deslocamento na faixa de  $\delta$  103-106 (BUBB, 2003). Deste modo, pela maior intensidade dos sinais próximo a 105 ppm, a maior parte da cadeia se apresenta com ligações glicosídicas na forma  $\beta$ .

Alguns EPS produzidos por bactérias e com características similares ao EPS obtido de *Aurantimonas* sp. são bastante descritos na literatura. A celulose, uma  $\beta$ -1,4-glucana obtida comercialmente de árvores e um dos biopolímeros mais abundantes da superfície do planeta, também pode ser produzido por micro-organismos. *Gluconacetobacter xylinus* e *Rhizobium radiobacter* (anteriormente conhecida como *Agrobacterium tumefaciens*) são conhecidas como produtoras de microfibrilas de celulose, material com características distintas do material obtido de plantas devido a uma menor quantidade de contaminantes, e facilidade de isolamento e purificação (KESHK, 2014). Outra classe de glucana conhecida e produzida por micro-organismo é a curdlana, uma  $\beta$ -1,3-glucana observada em culturas de bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Cellulomonas* e *Sinorhizobium*. Esse biopolímero é utilizado como espessante e gelificante na indústria por suas propriedades de formação de géis de estruturas variadas, conforme a temperatura de aquecimento (ZHANG *et al.*, 2012). De maneira similar, as galactanas são polímeros formados por galactose, através de ligações  $\beta$ -1,4. Esses materiais são mais conhecidos como componentes estruturais de plantas, porém existem alguns relatos de espécies de bactérias que produzem galactana, como *Bifidobacteria catenulatum* (DELATTRE *et al.*, 2011), *Methylobacterium* sp. (VERHOEF *et al.*, 2003), *Lactococcus lactis* subspecies cremoris H414 e *Lactococcus lactis* subsp. cremoris B891 (VAN CASTEREN *et al.*, 2000).

A família Aurantimonadaceae, com destaque para os gêneros *Aurantimonas* e *Aureimonas* foram apenas recentemente descritos, sendo o primeiro registro na literatura feito por DENNER *et al.* (2003), contam um baixo número de representantes, sendo assim escasso o volume de informação com relação a produção de EPS por suas espécies. Esta família pertence a ordem Rhizobiales, possuindo certa proximidade filogenética com a família Rhizobiaceae que contém diversos exemplos de espécies produtoras de  $\beta$ -glucanas insolúveis (ABE *et al.*, 2015; BREEDVELD e MILLER, 1994; ESTRELLA *et al.*, 2000; MCINTOSH *et al.*, 2005; NAIR *et al.*; 2016), reforçando a possibilidade da estrutura explorada.

### 6.3.5 - Elucidação estrutural do EPS produzido por DsF.N008 (*Acidovorax* sp.)

Para a análise do EPS produzido por *Acidovorax* sp., primeiramente, foi realizada uma análise de SEC-UV-ELSD para avaliação do tamanho do polímero. Para conseguir avaliar aproximadamente a massa molar do polímero, foi construída uma curva de calibração com padrões de dextranas lineares com 12, 25, 81, 270, 670 e 1100 kDa. A Figura 6.16 apresenta um cromatograma obtido para os padrões de dextrana bem como a regressão polinomial de terceira ordem utilizada para o ajuste dos pontos e obtenção da curva de calibração.

Os padrões apresentaram eluição crescente de acordo com a diminuição da massa molar, como pode ser observado na Figura 6.16. A Tabela 6.8 traz os dados cromatográficos tabulados, bem como a equação polinomial de terceira ordem realizado para ajuste da curva analítica.

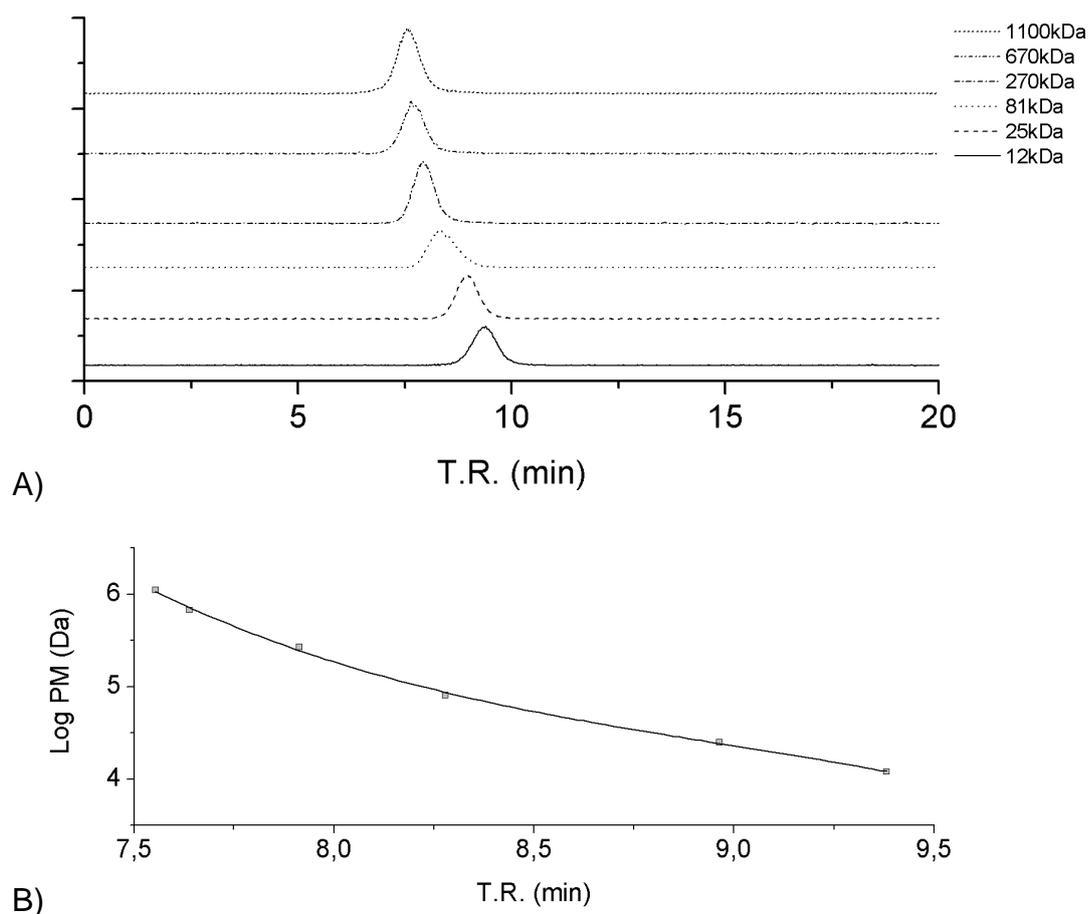


FIGURA 6.16 - A) Cromatograma obtido para os padrões de dextrana; B) Curva de calibração de tempo de retenção x Log MM para os padrões de dextrana, e ajuste polinomial de terceira ordem

TABELA 6.8 - Padrões de dextrana usados na construção da curva de calibração e estatísticas de regressão polinomial de terceira ordem para os padrões de dextrana.

Massa Molar (Da)	T.R. <sup>a</sup>	Log MM <sup>b</sup>	Erro % <sup>c</sup>
1100000	7,553	6,041	2,566
670000	7,639	5,826	-7,322
270000	7,913	5,431	9,431
81000	8,278	4,908	-7,772
25000	8,964	4,398	3,015
12000	9,382	4,079	-1,021

Ajuste da curva - Regressão polinomial de terceira ordem

$$\log MM = (-0,2337415x^3) + (1,388335x^2) - (3,433678x) + 7,544206; x = (T.R. - 7,000)$$

<sup>a</sup> T.R. - Tempo de retenção; <sup>b</sup> - MM - Massa Molar; <sup>c</sup> - Erro percentual do ponto da curva

O ajuste da regressão polinomial de terceira ordem obtida pelo gráfico de tempo de retenção x log MM apresentou um coeficiente de correlação de  $R^2 = 0.99865$ , indicando um bom ajuste entre os pontos usados no modelo de regressão polinomial. Através desta regressão, foi possível a avaliação do MM do EPS produzido, através de seu tempo de retenção, obtendo-se  $MM = 66.522$  Da, ou 66,5 KDa. O cromatograma produzido pela amostra de EPS da bactéria *Acidovorax* sp. esta representado na Figura 6.17.

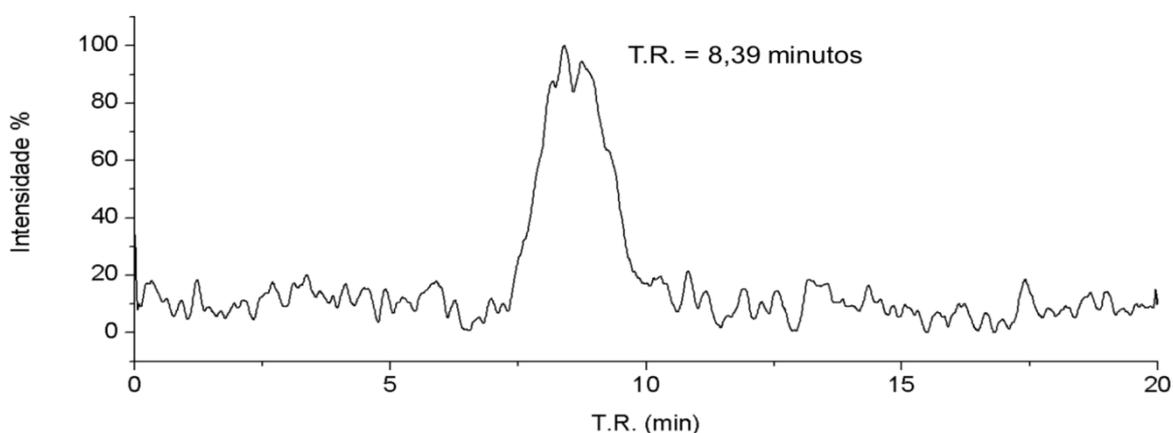


FIGURA 6.17 - Cromatograma de SEC-UV-ELSD para o EPS produzido pela cepa DsF.N008 (*Acidovorax* sp).

A análise do mesmo EPS por MALDI-TOF MS é ilustrada na Figura 6.18. O espectro de massas do EPS apresenta um padrão de íons com intervalos de unidades de  $m/z$  de 162 Da referente a unidades de anidroxoses ( $C_6H_{10}O_5$ ), condizente com uma estrutura composta predominantemente por hexoses (Al *et al.*, 2015; GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2016).

Os fragmentos observados por MALDI representam repetitivas de monômeros de hexoses, porém não foi observado sinais de  $m/z$  similares a massa molar obtida por SEC-UV-ELSD. Este fato pode ter ocorrido pela necessidade de maior otimização nas condições experimentais de análise, especialmente na avaliação da matriz usada, uma vez que o composto selecionado pode influenciar muito na capacidade de ionização, sendo os polissacarídeos de alta massa molecular compostos químicos que necessitam de grande energia para ionização (HUNG *et al.*, 2012). Mesmo assim, através da observação de  $m/z$  relacionados a

fragmentos menores foi possível confirmar que o esqueleto da estrutura é composto por hexoses.

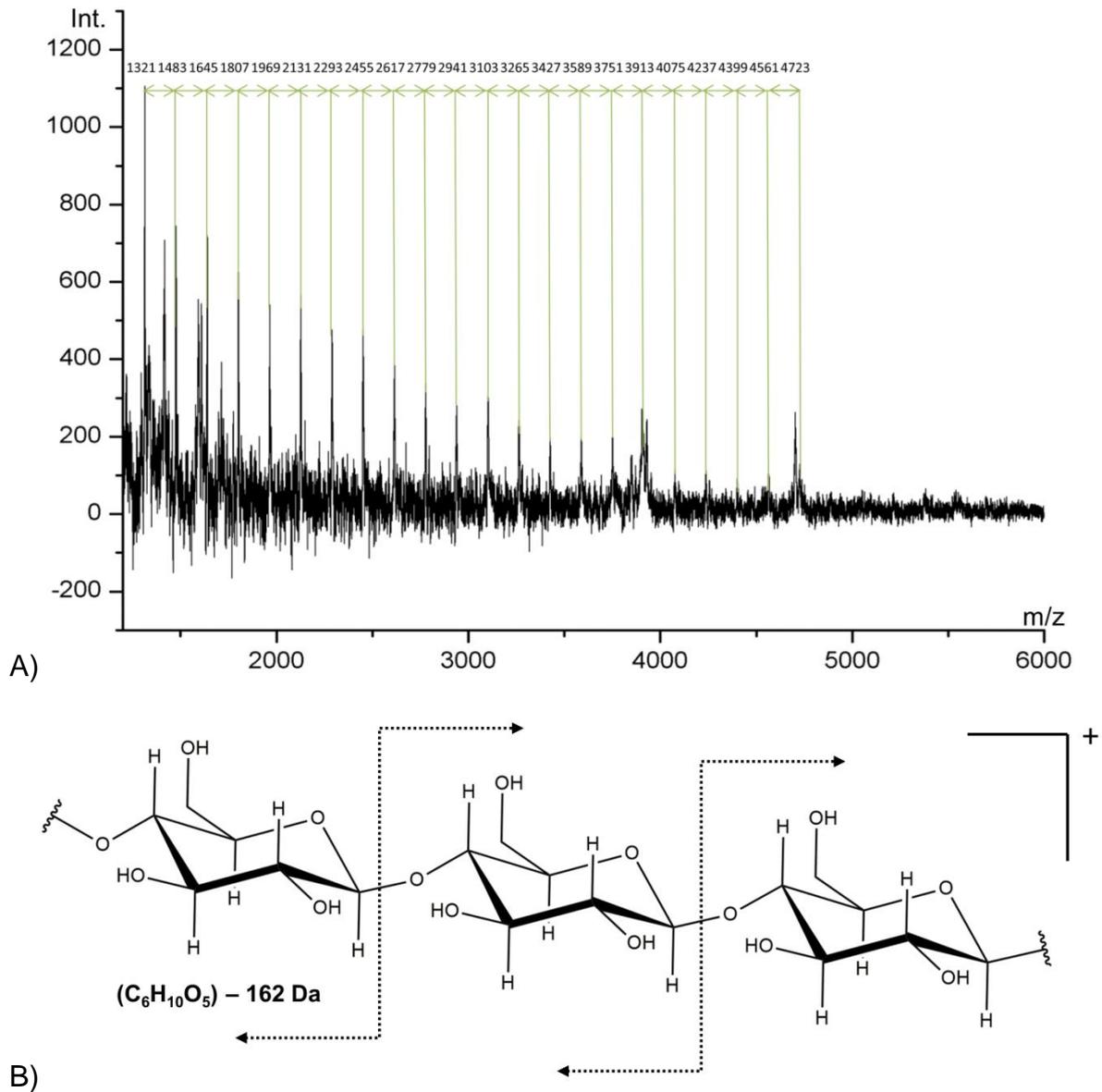


FIGURA 6.18 - A) MALDI-TOF MS do EPS produzido por *Acidovorax* sp. B) Fragmentação com perda da unidade de anidrohexose, 162 Da.

Na sequência a elucidação estrutural do polímero produzido se deu pela análise mais detalhada do cromatograma de GC-MS dos derivados de acetato de alditol (AA) do EPS. A Figura 6.19 apresenta o cromatograma obtido.

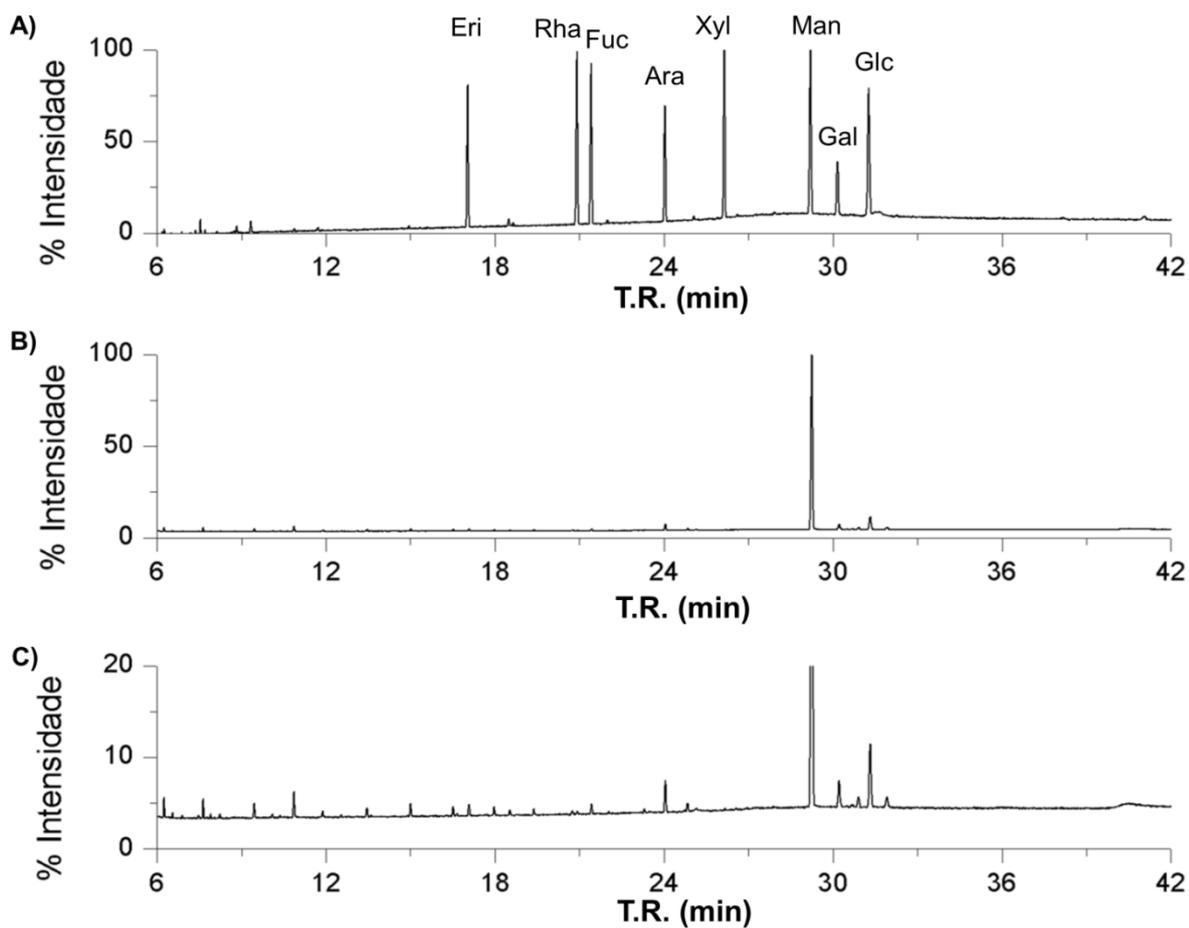


FIGURA 6.19 - Cromatograma obtido para os derivados de AA do EPS produzido por *Acidovorax* sp. A) Padrões derivatizados de monossacarídeos; B) Cromatograma da EPS produzido por *Acidovorax* sp.; C) Ampliação do cromatograma em B). As condições instrumentais estão descritas na seção 6.2.2.5.1.

O cromatograma dos derivados de alditol acetato dos padrões de monossacarídeos eritrose, ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose e glicose permitiu a identificação dos tempos de retenção de cada um dos monossacarídeos utilizados como referência. Esses tempos de retenção serão utilizados como marcadores para identificação monomérica em amostras de EPS. A TABELA 6.9 apresenta os tempos de retenção observados para os derivados de AA dos monossacarídeos.

TABELA 6.9 - Tempos de retenção dos derivados de AA de padrões de monossacarídeos

Monossacarídeo <sup>a</sup>	Tempo de Retenção
Eritrose	17,035
Ramnose	20,905
Fucose	21,415
Arabinose	24,035
Xilose	26,145
Manose	29,200
Galactose	30,160
Glicose	31,270

<sup>a</sup> O tempo de retenção é referente ao derivado de acetato de alditol do monossacarídeo.

Através da avaliação do cromatograma dos derivados de AA do EPS de *Acidovorax* sp. e comparação com os tempos de retenção produzidos pelos padrões, pode-se atribuir uma composição majoritária de manose (T.R. = 29,200 min), além de sinais de baixa intensidade para glicose (T.R. = 31,270 min), e traços de fucose (T.R. = 21,415 min), arabinose (T.R. = 24,035 min) e galactose (T.R. = 30,160 min) (Figura 6.19 C)).

Após a confirmação dos principais monômeros presente no EPS, foi realizada a análise dos derivados de PMAA, para identificar as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos. O cromatograma referente a esta análise está disposto na Figura 6.20.

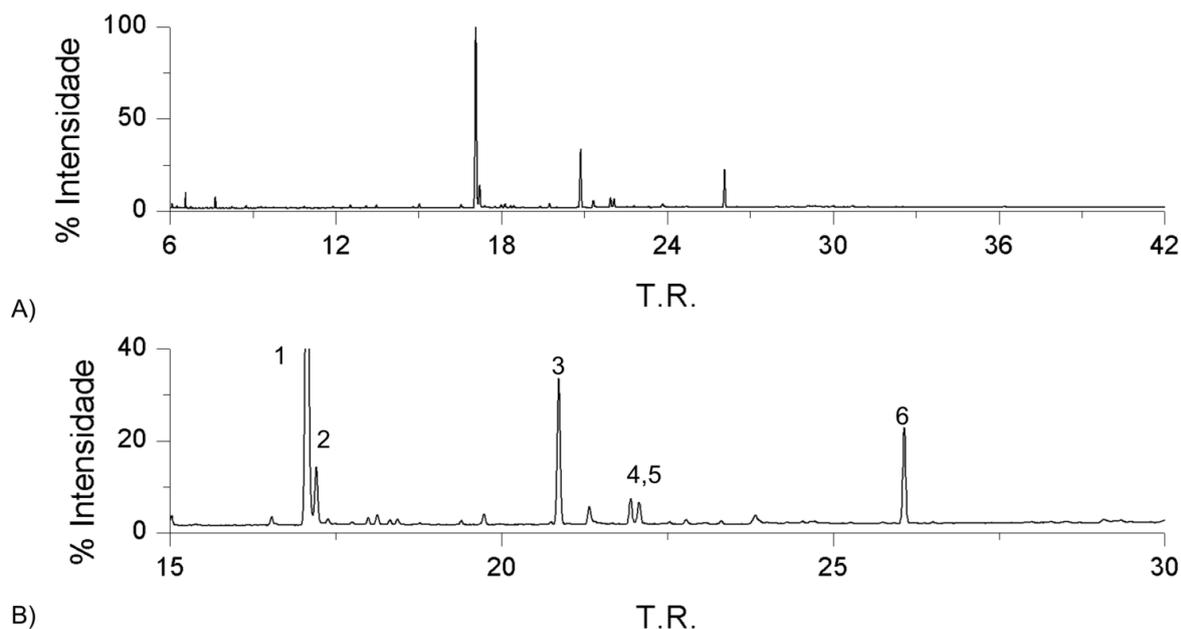


FIGURA 6.20 - Cromatograma obtido para os derivados de PMAA do EPS produzido por *Acidovorax* sp. A) visão geral do cromatograma. B) Ampliação da região entre 15 e 30 minutos do cromatograma, com destaque aos compostos de interesse referente aos derivados de PMAA, numerados de 1 a 6.

Foi observada no cromatograma a presença de um sinal majoritário de T.R. 17,059 min, além de outros de menor intensidade. Dentre os sinais analíticos observados no cromatograma, os que apresentaram fragmentação condizente com os esperados para derivados de PMAA de monossacarídeos quando comparados a bancos de dados do software do fornecedor do equipamento de GC-MS (NIST 11); publicado por SASSAKI *et al.*, (2013); e fornecido pelo CCRC (*Complex Carbohydrate Research Center*; <https://www.ccrcc.edu/specdb/ms/pmaa/pframe.html>) foram numerados de 1-6 de acordo com sua ordem de eluição no cromatograma, como mostra a Figura 6.20 B). Os espectros de massas obtidos para cada um dos sinais destacados estão dispostos na Figura 6.21.

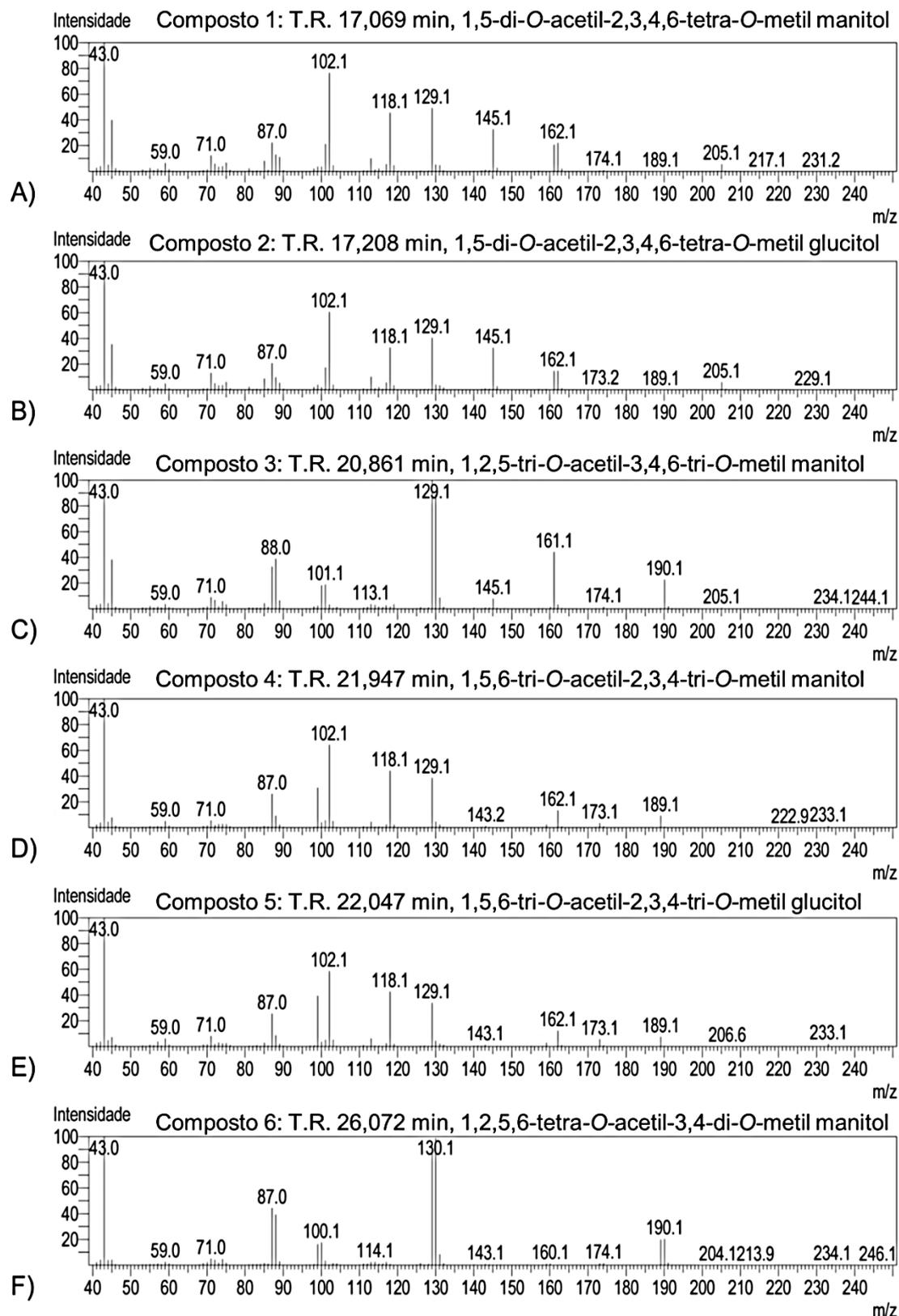


FIGURA 6.21 - Espectros de massas para os sinais 1-6 destacados no cromatograma de derivados de PMAA do EPS de *Acidovorax* sp. . A) Sinal 1, T.R. 17,069 min; B) Sinal 2, 17,208 min; C) Sinal 3, T.R. 20,861 min; D) Sinal 4, T.R. 21,947 min; E) Sinal 5, 22,047 min; F) Sinal 6, T.R. 26,072 min

De acordo com os íons observados nos espectros de massas de cada sinal analítico numerado, foram identificadas as quais classes de derivados de PMAA cada pertence. As fragmentações e os íons usados para determinar a identidade estrutural de cada tipo de derivado de PMAA, como descrito na seção 6.1, estão representadas na Figura 6.22.

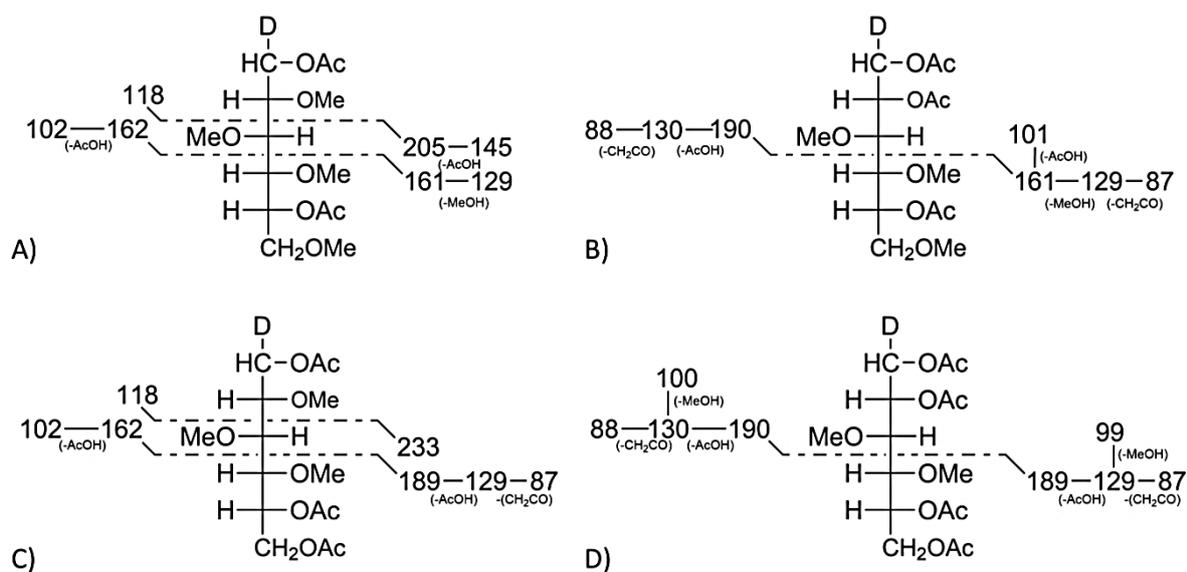


FIGURA 6.22 - Íons observados para as classes de derivados de PMAA observados no cromatograma dos derivados de PMAA do EPS de *Acidovorax* sp.. A) 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil hexose; B) 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil hexose; C) 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil hexose; D) 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil hexose

Entre os principais sinais, foram identificados apenas compostos referentes a derivados parcialmente metilados de hexoses. Os sinais com tempos de retenção de 17,069 e 17,208 (Sinais 1 e 2), sendo o primeiro muito mais intenso, foram identificados como moléculas de 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil hexose (hexose terminal) através principalmente da observação dos íons ( $m/z$  102, 118, 129, 145, 161, 162, 205). A observação destes dois sinais com boa resolução mostra o potencial da técnica de derivatização de PMAA, capaz de promover separação cromatográfica de epímeros como manose e glicose, de mesma composição molecular. O sinal em T.R. = 20,861 min (sinal 3), o segundo de maior intensidade foi descrito como referente a molécula 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil

hexose (hexose com ligação glicosídica na posição 2), identificado pelos íons ( $m/z$  87, 88, 101, 129, 130, 161, 190). Os sinais com T.R. = 21,947 e 22,047 min (Sinais 4 e 5 respectivamente), de menor intensidade entre os derivados de PMAA identificados, foram atribuídos a estruturas da classe das 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil hexoses pela observação dos íons ( $m/z$  87, 102, 118, 129, 162, 189, 233; hexose ligada na posição 6), e o sinal 6, com T.R. = 26,072 min foi identificado como a molécula de 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil hexose (hexose disubstituída nas posições 2 e 6), caracterizados pela presença de grande simetria no espectro de massas e observação dos íons ( $m/z$  87, 88, 99, 100, 129, 130, 189, 190).

Devido a grande quantidade de manose observada nos derivados de AA, sabe-se que a grande parte dos compostos será derivada deste monossacarídeo. Além disso, a migração de derivados de hexoses terminais e de hexoses substituídas na posição 6 segue a ordem de manose e depois glicose, como observado por outros autores (BIERMANN e MCGINNINS, 1988; CCRC; NIST 11; SASSAKI *et al*, 2013; STENUTZ, 2016). Sendo assim, pela avaliação dos tempos de retenção, perfil de fragmentação, comparação com os dados de derivados de AA e com banco de dados, pode-se atribuir a identidade de cada sinal conforme descrito na Tabela 6.10.

TABELA 6.10 - Identidade dos sinais identificados no cromatograma do derivado de PMAA do EPS produzido por *Acidovorax* sp.

Sinal	T.R.	Monômero	Sigla
1	17,069	1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil manitol	t-Man
2	17,208	1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil glucitol	t-Glc
3	20,861	1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil manitol	2-Man
4	21,947	1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil manitol	6-Man
5	22,047	1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil glucitol	6-Glc
6	26,072	1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil manitol	2,6-Man

Além dos monômeros identificados para o EPS isolado de *Acidovorax* sp., outros sinais apresentam fragmentações similares as produzidas pelos derivados de monossacarídeos convencionais, porém não apresentam alta similaridade com nenhum dos perfis de fragmentação de PMAA explorados, sendo

provavelmente produtos de reações paralelas, ou apresentam baixa intensidade e a qualidade de seu espectro de massa não foi suficiente para comparação com os espectros.

Uma vez identificados os monossacarídeos majoritários presentes no EPS isolado do cultivo de *Acidovorax* sp., foi iniciada a avaliação do padrão de ligações glicosídicas obtidas pela análises dos derivados de PMAA. De acordo com a intensidade dos sinais do cromatograma na figura 6.20 e correlação com a identificação dos sinais, é possível observar a existência de uma grande quantidade de hexoses terminais, principalmente manose, seguido de derivados apresentando ligações glicosídicas na posição 2 e de monômeros disubstituídos nas posições 2 e 6 e em menor quantidade dois monômeros substituídos na posição 6. De acordo com os resultados obtidos, propõe-se uma estrutura contendo um núcleo de manose conectado por ligações glicosídicas  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 2, apresentando ramificações na posição 6 de alguns dos monômeros da cadeia principal, sendo estes substituídos por monossacarídeos terminais de glicose ou manose, ou então em menor proporção por dissacarídeos do tipo  $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -Man-(1 $\rightarrow$  ou  $\alpha$ -Glc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -Glc-(1 $\rightarrow$ , não sendo possível determinar a quantidade de cada (Figura 6.23).

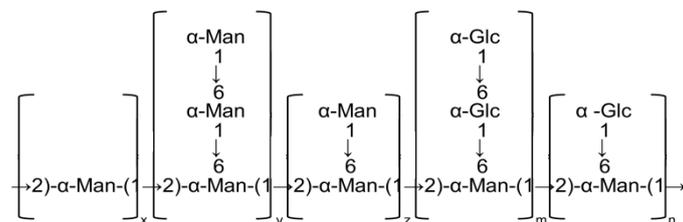


FIGURA 6.23 - Proposta de estrutura do EPS produzido por *Acidovorax* sp.

Polissacarídeos contendo manose como único açúcar são conhecidos como mananas, podendo ser chamada também de glucomananas, galactomananas ou mesmo glucogalactomananas quando estes possuem também resíduos de glicose, galactose ou ambos, respectivamente, sendo estes encontradas de maneira ubíqua na natureza. A glucomanana é o componente principal da hemicelulose de coníferas e minoritário em madeira de lei, mas também pode ser encontrada em diversos outros tecidos celulares de plantas e algas, na forma de um polímero linear de  $\beta$ -(1,4)-manose (LOEWUS e TANNER, 2012). Em fungos,  $\alpha$ -(1,6) mananas ramificadas na

posições 2 e 3 como componentes estruturais das paredes celulares (YIDIZ e ONER, 2014).

Apesar de serem comuns em eucariotos, os relatos de produção de mananas por procariotos são escassos, embora já tenham sido observadas em culturas de *Bacillus polymyxa* (MURPHY *et al.*, 1956), *Brevibacillus thermoruber* (RADCHENKOVA *et al.*, 2011), *Edwardsiella tarda* (GUO *et al.*, 2010), *Pseudoalteromonas* sp. SM20310 (LIU *et al.*, 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (CARSON e EAGON, 1964), *Pseudomonas mutabilis* (KUZMA *et al.*, 2012), *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* (CORSARO *et al.*, 2001) e *Thermococcus litoralis* (RINKER e KELLY, 1996).

Com relação ao gênero *Acidovorax*, a literatura apresenta apenas um trabalho de caracterização de exopolissacarídeos produzidos pelo gênero (HEIJSTRA, 2010), sendo o EPS produzido por uma espécie diferente do gênero, *A. temperans*, diferente do polímero aqui descrito.

#### 6.3.6 - Elucidação estrutural do EPS produzido por DsF.N003 (*Luteibacter* sp.)

A cepa de *Luteibacter* sp. isolada de *D. speciosa* foi cultivada meio líquido, e seu EPS foi obtido com rendimento de 60 mg. L<sup>-1</sup>. Esse EPS foi caracterizado usando diversas técnicas espectrométricas e espectroscópicas, tais como SEC-UV-ELSD, GC-MS e NMR.

Inicialmente, sua massa molar foi avaliada por SEC-UV-ELSD. A Figura 6.24 ilustra o cromatograma obtido.

Através da análise realizada por SEC-UV-ELSD se pode observar a presença de dois sinais no cromatograma obtido pelo detector de ELSD, com tempos de retenção de 7,821 e 9,147 min. Para confirmação da natureza do polímero, foi utilizado também o monitoramento da eluição com um detector de UV, em comprimentos de onda de 254 e 280 nm. Entre os biopolímeros encontrados na matriz extracelular, além dos exopolissacarídeos, podem ser encontradas proteínas e ácidos nucleicos extracelulares, igualmente importantes para interação entre os micro-organismos (DIAZ *et al.*, 2013; OKSHEVSKY e MEYER, 2015). Tanto proteínas

quanto ácidos nucléicos possuem cromóforos que produzem sinais nestes comprimentos de onda, enquanto polissacarídeos em geral não apresentam resposta analítica de intensidade significativa em detectores de UV, sendo uma maneira de diferenciar polissacarídeos dos outros dois biopolímeros (FENG *et al.*, 2010).

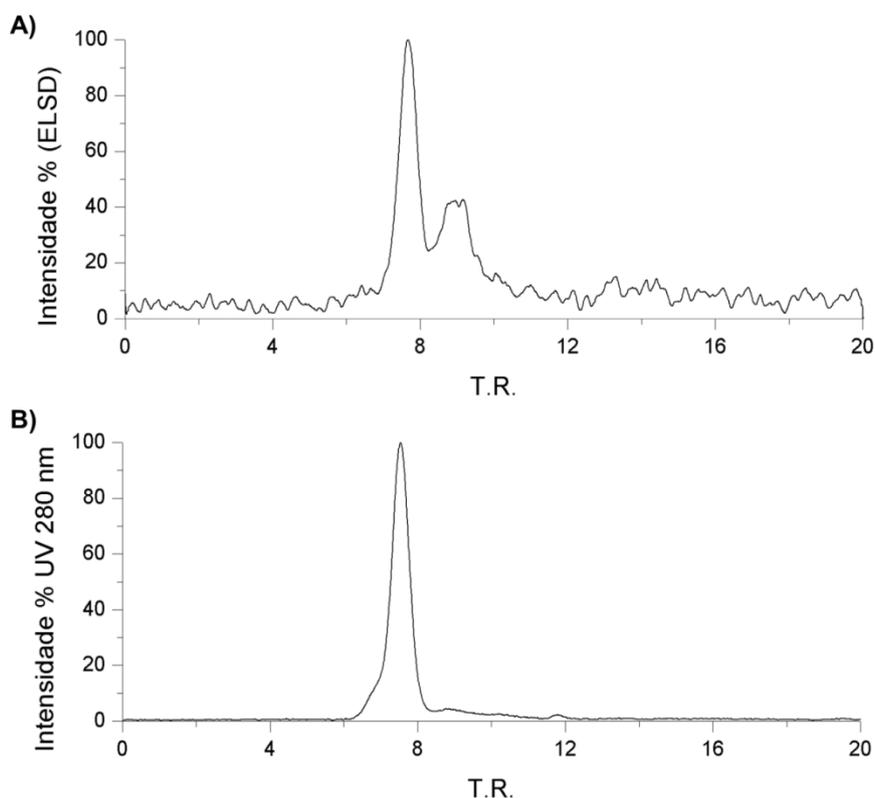


FIGURA 6.24 - Cromatograma de SEC-UV-ELSD para o EPS produzido pela bactéria *Luteibacter* sp. A) Detecção por ELSD; B) Detecção por UV (280 nm)

Sendo assim, é possível a discriminação dentre polissacarídeos e outros polímeros de acordo com a intensidade dos sinais em ambos os detectores. Na Figura 6.24 observa-se claramente a primeira banda, mais intensa (T.R. 7,821 min), produzindo sinais analíticos em ambos os detectores, e a segunda banda (T.R. 9,147 min) sendo observada principalmente no detector de ELSD. Sendo assim, pode-se atribuir a primeira banda como não sendo um polissacarídeo microbiano. Todavia, a banda em 9,147 minutos pode ser considerada como candidata a um polissacarídeo, pela diferença de resposta analítica. Em comparação com a curva de calibração de terceira ordem obtida com padrões de dextranas (Figura 6.16), a

massa molar da segunda banda observada no cromatograma de SEC-UV-ELSD e atribuída ao EPS de *Luteibacter* sp. foi calculada em MM = 18.111 Da, ou 18,1k Da.

A avaliação da composição monomérica do EPS de *Luteibacter* sp., iniciou-se através da derivatização do polissacarídeo para obtenção dos derivados de acetato de alditol (AA), e posterior análise por GC-MS. O cromatograma dos derivados de AA dos padrões de monossacarídeos e do EPS de *Luteibacter* sp. obtido estão ilustrados na Figura 6.25.

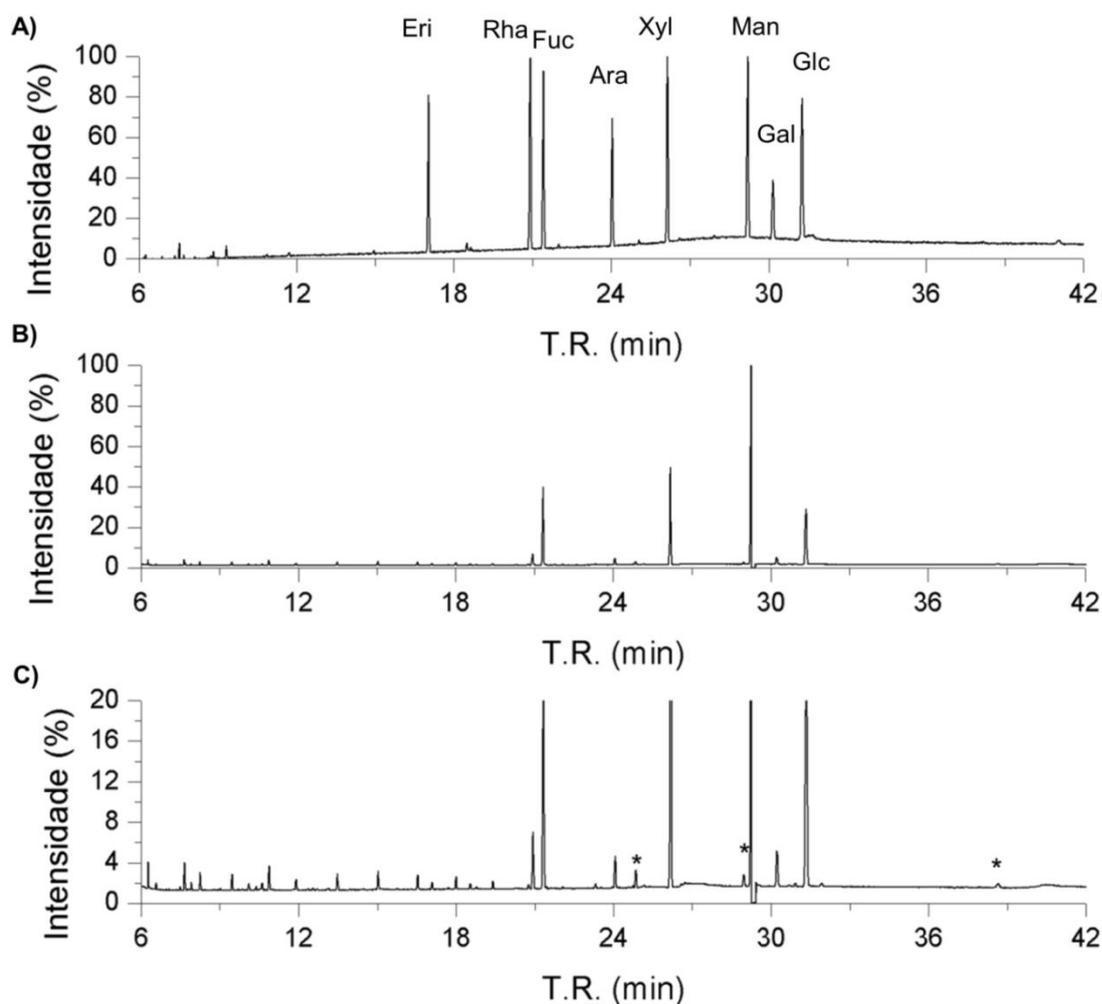


FIGURA 6.25 - Cromatograma dos derivados de AA para o EPS produzido por *Luteibacter* sp. a) Padrões analíticos (em ordem de eluição: Eri, Rha, Fuc, Ara, Xyl, Man, Gal, Glc); b) Cromatograma obtido para a amostra derivatizadas de *Luteibacter* sp.; c) Ampliação no eixo x do espectro apresentando em b). \*Indicam sinais referentes a compostos possivelmente derivados de monossacarídeos que não correlacionam com os padrões avaliados.

O EPS produzido por *Luteibacter* sp. apresentou alta complexidade sendo observado na análise de AA a presença, de todos os padrões analíticos presentes no controle, exceto a eritrose. Nessa análise, pode ser observada a presença de manose como sinal majoritário (T.R. = 29,200 min), seguido de sinais de intensidade intermediária para os derivados de fucose (T.R. = 21,415 min), xilose (T.R. = 26,145 min) e glicose (T.R. = 31,270 min), e a presença de sinais em quantidade de traços referentes a ramnose (T.R. = 20,905 min), arabinose (T.R. = 24,035 min) e galactose (T.R. = 30,160 min).

Para um melhor entendimento da composição monomérica do EPs de *Luteibacter* sp. e realização da análise de ligações, foi produzido o derivado de PMAA, e os produtos analisados por GC-MS. O cromatograma da análise encontra-se ilustrado na Figura 6.26.

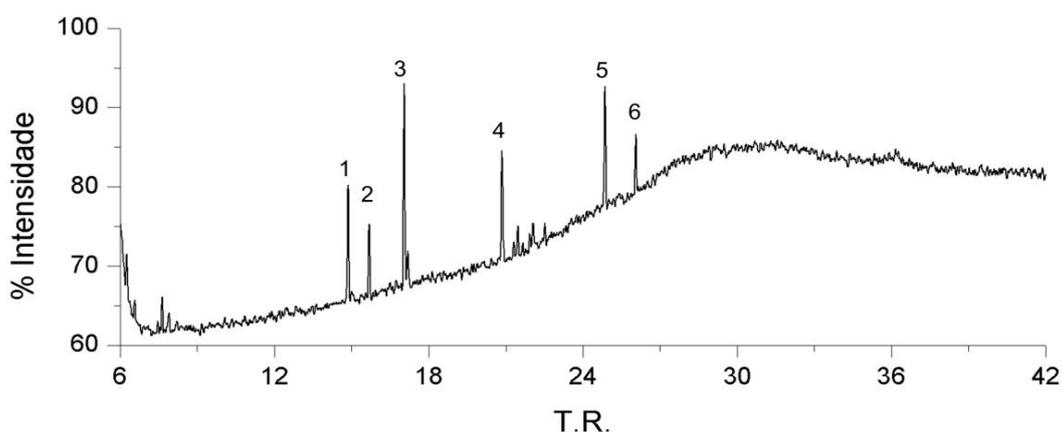


FIGURA 6.26 - Cromatograma obtido para os produtos de PMAA do EPS de *Luteibacter* sp.

No cromatograma dos produtos de reação de derivatização de PMAA do EPS de *Luteibacter* sp. podem ser observados 6 sinais mais intensos, numerados de acordo com a ordem de eluição. Os espectros de massas correspondentes aos 6 compostos identificados como majoritários estão dispostos na Figura 6.27

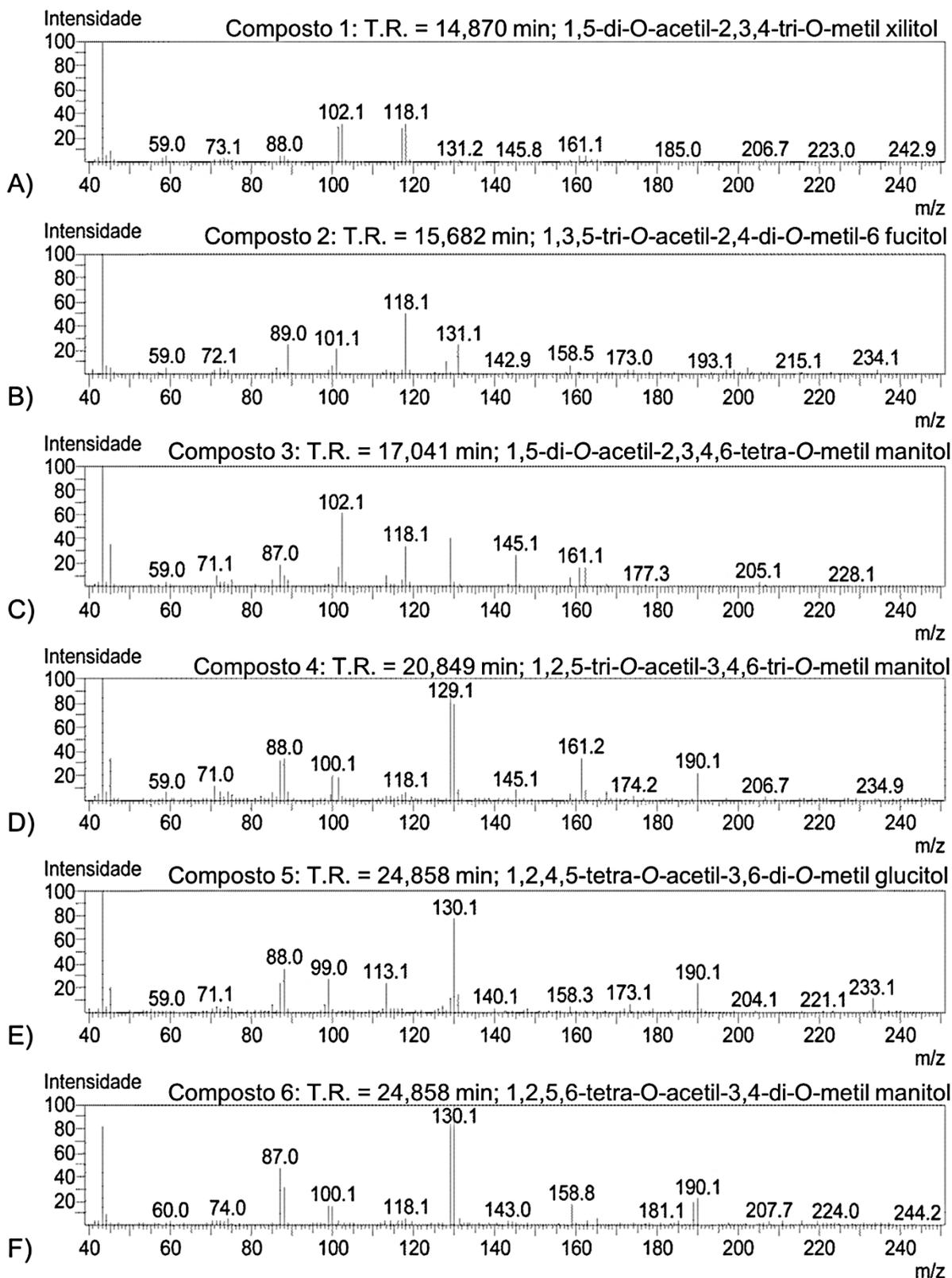


FIGURA 6.27 - Espectros de massas para os sinais dos derivados de PMAA do EPS de *Luteibacter* sp.. A) Sinal 1, T.R. = 14,870 min; B) Sinal 2, T.R. = 15,682 min; C) Sinal 3, T.R. = 17,041 min; D) Sinal 4, T.R. = 20,849 min; E) Sinal 5, T.R. = 24,858 min; F) Sinal 6, T.R. = 26,065 min

A maior complexidade observada nos derivados de PMAA também se refletiu na observação de moléculas com perfis variados de fragmentação. A identificação dos derivados de PMAA foi realizada pela comparação dos espectros de massa obtidos com banco de dados do GC-MS (NIST 11), publicado por SASSAKI *et al.*, (2013) e fornecido pelo CCRC (*Complex Carbohydrate Research Center*, <https://www.ccrcc.edu/specdb/ms/pmaa/pframe.html>), sendo identificados de acordo com os perfis de fragmentação ilustrados na FIGURA 6.28.

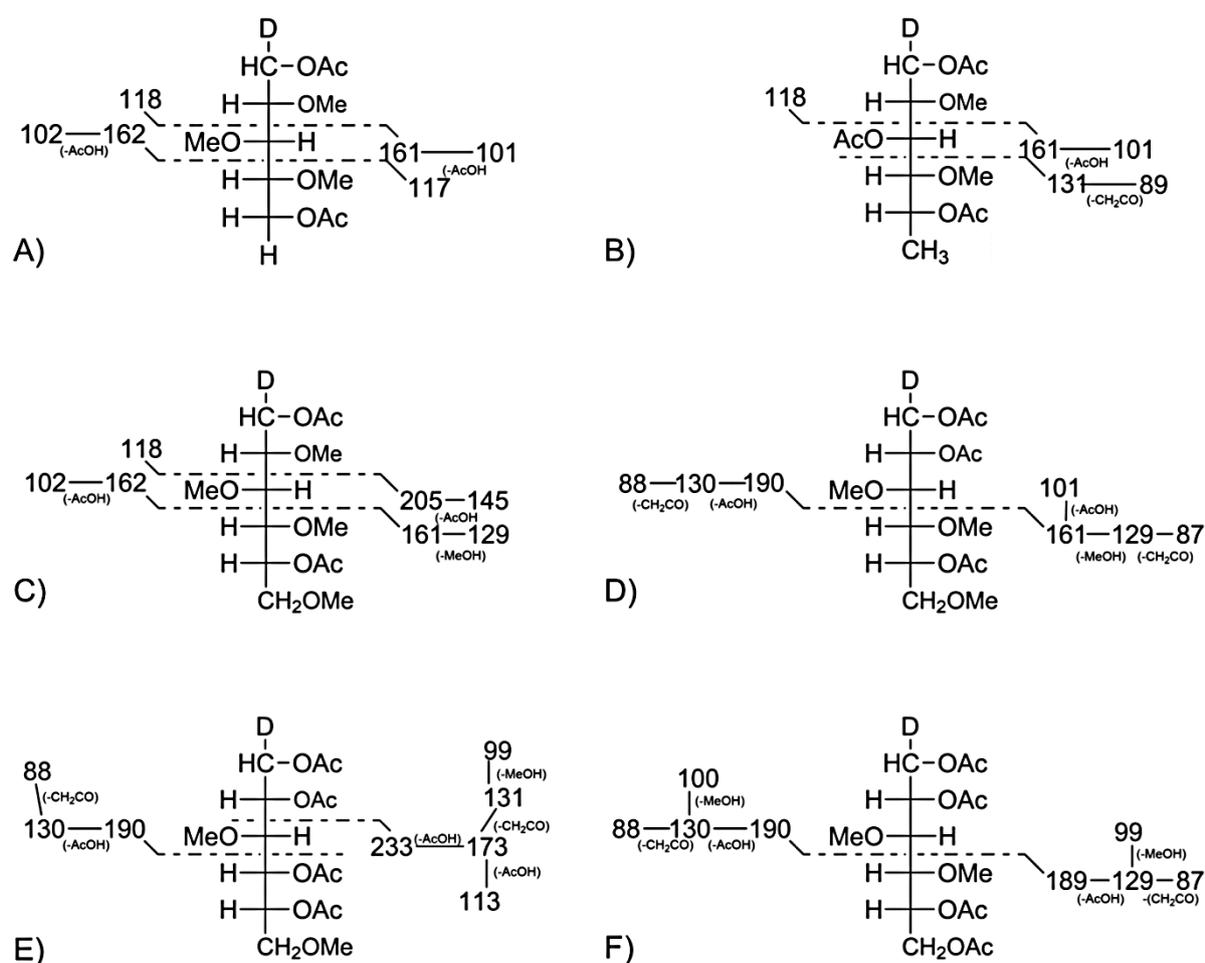


FIGURA 6.28 - Perfil de fragmentação para as moléculas observadas no cromatograma de derivados de PMAA do EPS de *Luteibacter* sp. A) 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil xilitol (Sinal 1, T.R = 14,870 min); B) 1,3,5-tri-O-acetil-2,4-di-O-metil-6 fucitol (Sinal 2, T.R. = 15,682 min); c) 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil hexose (Sinal 3, T.R. = 17.041 min); d) 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil hexose (Sinal 4, T.R. = 20.849 min); e) 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3,6-di-O-metil hexose (Sinal 5, T.R. = 24.858 min); f) 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil hexose (Sinal 6, T.R. + 26,065 min).

O primeiro sinal, com T.R. = 14,870 min, foi atribuído como uma molécula de 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metilpentose, apresentando em seu espectro de massas íons  $m/z$  101, 102, 117, 118, 161 e 162. Como o 1,2,3,4,5-penta-O-acetil-xilitol foi observado entre os derivados de AA e este foi o único derivado de pentose observado, atribui-se este sinal a molécula de 1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-xilitol. O sinal 2 apresentou perfil de fragmentação com íons  $m/z$  89, 101, 118, 131 e 161, com tempo de retenção e perfil de fragmentação condizente com uma molécula de 1,3,5-tri-O-acetil-2,4-di-O-metil-6-desoxihexose. De maneira similar ao sinal anterior, apenas o 6-desoxiaçúcar fucose foi observado no cromatograma de acetato de alditol, sendo o sinal 2 atribuído á molécula 1,3,5-tri-O-acetil-2,4-di-O-metil-6-fucitol. Os outros quatro sinais observados foram identificados como derivados de hexoses, sendo atribuídos a moléculas de 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil hexose (sinal 3, T.R. = 17,041 min,  $m/z$  102, 118, 129, 145, 161, 162, 205), 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil hexose (sinal 4, T.R. 20,849 min,  $m/z$  87, 88, 101, 129, 130, 189, 190), 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3,6-di-O-metil hexose (sinal 5, T.R. 24,858 min,  $m/z$  88, 99, 113, 130, 131, 173, 190, 233) e 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil hexose (sinal 6, T.R. = 26,065 min,  $m/z$  87, 88, 99, 100, 129, 130, 189, 190).

De acordo com os perfis de fragmentação, tempo de eluição, composição monomérica observadas nos cromatogramas de AA, e comparação com bancos de dados da literatura, os sinais de hexoses foram identificadas como sendo 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil manitol, 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil manitol, 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3,6-di-O-metil glucitol e 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil manitol respectivamente. A Tabela 6.11 apresenta um resumo da composição do EPS produzido por *Luteibacter* sp.

A composição dos monômeros obtida pela identificação dos sinais cromatográficos observados por GC-MS aponta uma estrutura de EPS ramificada, pela presença de dois açúcares terminais (t-Xyl e t-Man), dois açúcares contendo uma ramificação (3-Fuc e 2-Man), e dois açúcares contendo duas ramificações (2,4-Glc e 2,6-Man). Dessa forma, pode ser proposta algumas composições destes seis monossacarídeos como o monômero do EPS. A estrutura pode conter de dois a quatro monômeros em sua cadeia polimérica principal e duas ramificações, podendo ser constituídas por mono ou dissacarídeos. A Figura 6.29 ilustra as possíveis combinações entre os monossacarídeos que podem ser construídas a partir dos dados de GC-MS.

TABELA 6.11 - Identificação da composição monomérica do EPS produzido por *Luteibacter* sp.

Sinal	T.R.	Monômero	Sigla
1	14,870	1,5-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil xilitol	t-Xyl
2	15,682	1,3,5-tri-O-acetil-2,4-di-O-metil-6 fucitol	3-Fuc
3	17,041	1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil manitol	t-Man
4	20,849	1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil manitol	2-Man
5	24,858	1,2,4,5-tetra-O-acetil-3,6-di-O-metil glucitol	2,4-Glc
6	26,072	1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil manitol	2,6-Man

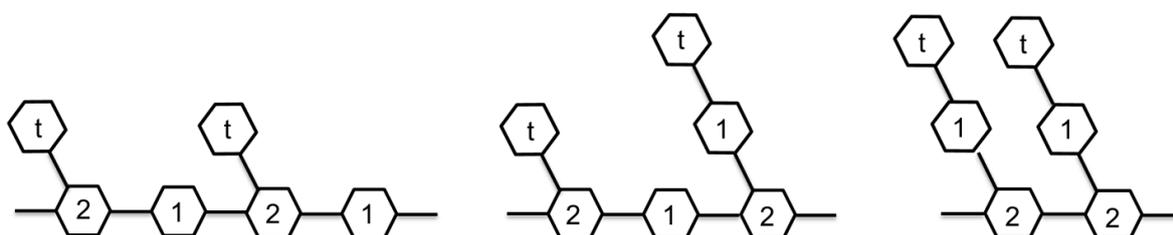


FIGURA 6.29 - Possíveis combinações para a estrutura do monômero do EPS de *Luteibacter* sp. de acordo com os derivados de PMAA observados por GC-MS. t: Monossacarídeo terminal; 1: Monossacarídeo com 1 ramificação; 2: Monossacarídeo com 2 ramificações

Com o propósito de complementar a identificação estrutural do EPS isolado de *Luteibacter* sp., foi realizada uma série de experimentos de NMR para a avaliação da composição estrutural do EPS. A análise do espectro de  $^1\text{H}$  NMR na Figura 6.30.

O espectro apresenta sinais característicos de carboidratos, com sinais que reforçam os dados observados por GC-MS, além de apresentar outros que aprimoram a caracterização. O sinal em  $\delta$  1,24 é característico de metilas de açúcares reduzidos como fucose (CESCUTTI *et al.*, 1998; ALE *et al.*, 2011), reforçando observado por GC-MS. É importante destacar a presença de um sinal em  $\delta$  2,18, geralmente relacionados com grupos metilas presentes em açúcares O- ou N-acetilados (CAMPESTRINI *et al.*, 2013). Estes sinais não foram observados durante as análises por GC-MS, pois possuem estrutura similar aos derivados completa e/ou parcialmente acetilados de AA e PMAA. Este sinal pode apresentar intensidade

variável, uma vez que o polissacarídeo pode ser apenas parcialmente acetilado (DERTLI *et al.*, 2013).

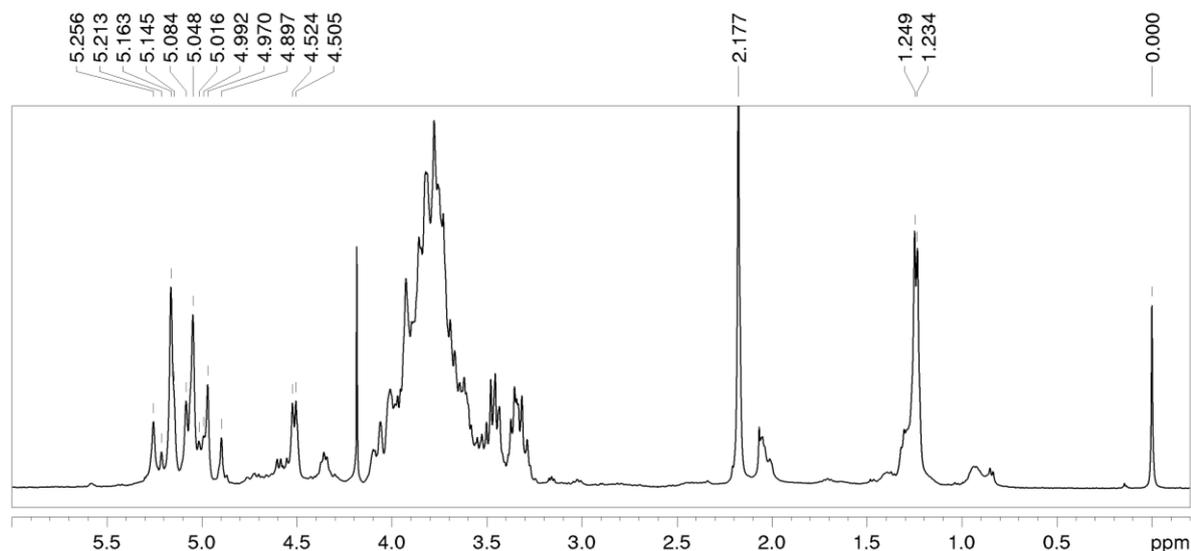


FIGURA 6.30 - Espectro de  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 70°C,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para o EPS de *Luteibacter* sp.

A região entre  $\delta$  3,0 e 4,2 apresenta um elevado número de sinais sobrepostos, referentes majoritariamente aos hidrogênios presentes nos carbonos do anel glicosídico. A região entre  $\delta$  4,5 e 5,4 se destaca pela presença de hidrogênios anoméricos, indicando a presença e a quantidade de monossacarídeos. Uma primeira observação a ser realizada é a diferenciação entre as ligações glicosídicas  $\alpha$  e  $\beta$ . Devido a ângulos diedros diferentes, a ligação glicosídica exerce influência direta no deslocamento químico e na constante de acoplamento  $^3\text{J}(\text{H}_1\text{-H}_2)$ . Anômeros  $\beta$  tendem a ter menores deslocamentos químicos e constantes de acoplamento maiores do que anômeros  $\alpha$  (DUUS *et al.*, 2000). A análise dos sinais dos hidrogênios anoméricos indicou, conforme os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento  $^3\text{J}(\text{H}_1\text{-H}_2)$ , uma única ligação glicosídica na configuração  $\beta$  ( $\delta$  4,51,  $d$ ;  $J = 7,6$  Hz), e as outras por ligações  $\alpha$ , identificadas pelos sinais entre  $\delta$  4,9 - 5,3 e constantes de acoplamentos pequenas, a ponto de não apresentarem resolução suficiente para o cálculo.

Pode-se observar até 12 sinais na região dos hidrogênios anoméricos no espectro de  $^1\text{H}$  NMR, número de monossacarídeos maior que o esperado,

levando em consideração os resultados obtidos por GC-MS. Inicialmente houve a suspeita de contaminação da amostra, contudo após a realização dos experimentos se observou um precipitado formado no fundo do tubo de ressonância. Foi realizada a transferência do sobrenadante para um novo tubo, e a amostra foi submetida novamente ao experimento de  $^1\text{H}$  NMR em um instrumento com maior resolução (600 MHz). A Figura 6.31 apresenta a comparação da região de 4,4 a 5,5 ppm entre os espectros de  $^1\text{H}$  NMR obtido para o EPS de *Luteibacter* sp..

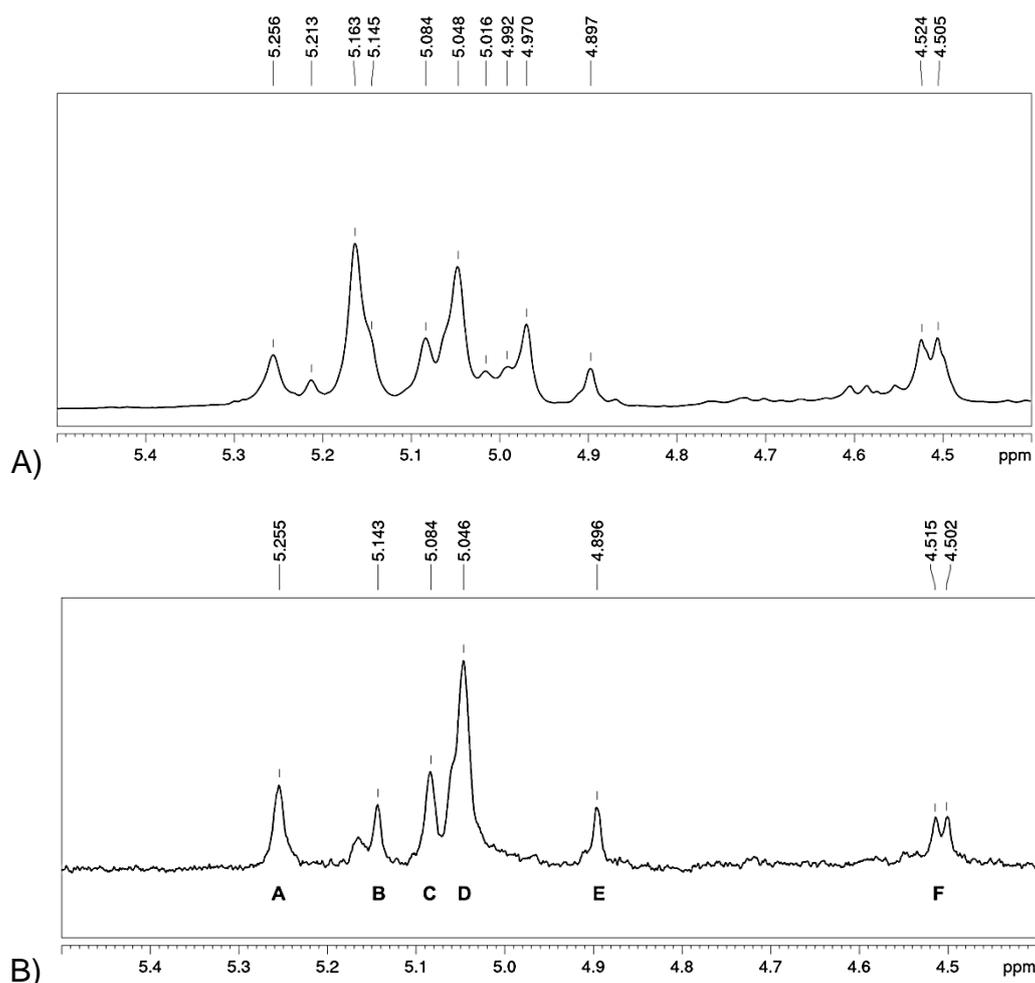


FIGURA 6.31 - Espectro de  $^1\text{H}$  NMR para o EPS de *Luteibacter* sp. A) 400 MHz, 70°C, D<sub>2</sub>O; B) 600 MHz, 80°C, D<sub>2</sub>O, sobrenadante.

Comparando os espectros de  $^1\text{H}$  NMR obtidos antes e após a transferência da amostra, pode se perceber o desaparecimento de alguns sinais, melhorando a observação dos sinais referentes aos hidrogênios anoméricos do EPS de *Luteibacter* sp.. A impureza removida poderia estar relacionada com outro

biopolímero de menor solubilidade presente na amostra, ou então produtos de hidrólise decorrente de altas temperaturas durante o tempo de realização dos experimentos. Comparando-se os dois espectros, os seis sinais observados em ambos os espectros foram identificados com possivelmente oriundos de hidrogênios anoméricos do EPS, e foram identificados de A a F de acordo com sua ordem decrescente de deslocamento químico. A TABELA 6.12 apresenta a relação dos deslocamentos de cada hidrogênio anomérico dos resíduos.

TABELA 6.12 - Valores de deslocamento químico para os hidrogênios anoméricos ( $H_1$ ) dos resíduos A-F do EPS de *Luteibacter* sp.

Resíduo	Deslocamento Químico $H_1$ (ppm)
A	5,26
B	5,15
C	5,09
D	5,05
E	4,90
F	4,52

Para uma maior compreensão da relação entre os sinais pertencentes a cada monossacarídeo, foram realizados experimentos de correlação. A Figura 6.32 mostra o espectro de COSY da amostra de EPS de *Luteibacter* sp..

O experimento de COSY fornece uma primeira avaliação da relação entre os hidrogênios vizinhos, permitindo a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados ao carbono 2 de cada resíduo através de suas correlações com os respectivos hidrogênios anoméricos (Figura 6.32 B). Os valores obtidos estão dispostos na TABELA 6.13.

A Figura 6.32 C) evidencia as correlações observadas para o sistema de prótons do resíduo F, iniciada pela correlação entre o hidrogênio anomérico  $H_{F1}$  em  $\delta$  4,52 e o hidrogênio  $H_{F2}$  em  $\delta$  3,34. Podem ser observadas as outras correlações entre  $H_{F2}$  e  $H_{F3}$  ( $H_{F3}$ ,  $\delta$  3,95),  $H_{F3}$  e  $H_{F4}$  ( $H_{F4}$ ,  $\delta$  3,66) e  $H_{F4}$  e  $H_{F5}$  ( $\delta$  3,46). O resíduo F apresentou um numero maior de correlações possíveis de identificação no espectro, devido ao acoplamento escalar entre seus prótons promoverem

correlações de alta intensidade e por estarem em regiões relativamente afastadas da parte mais densamente povoada por sinais dos anéis (Figura 6.32 C).

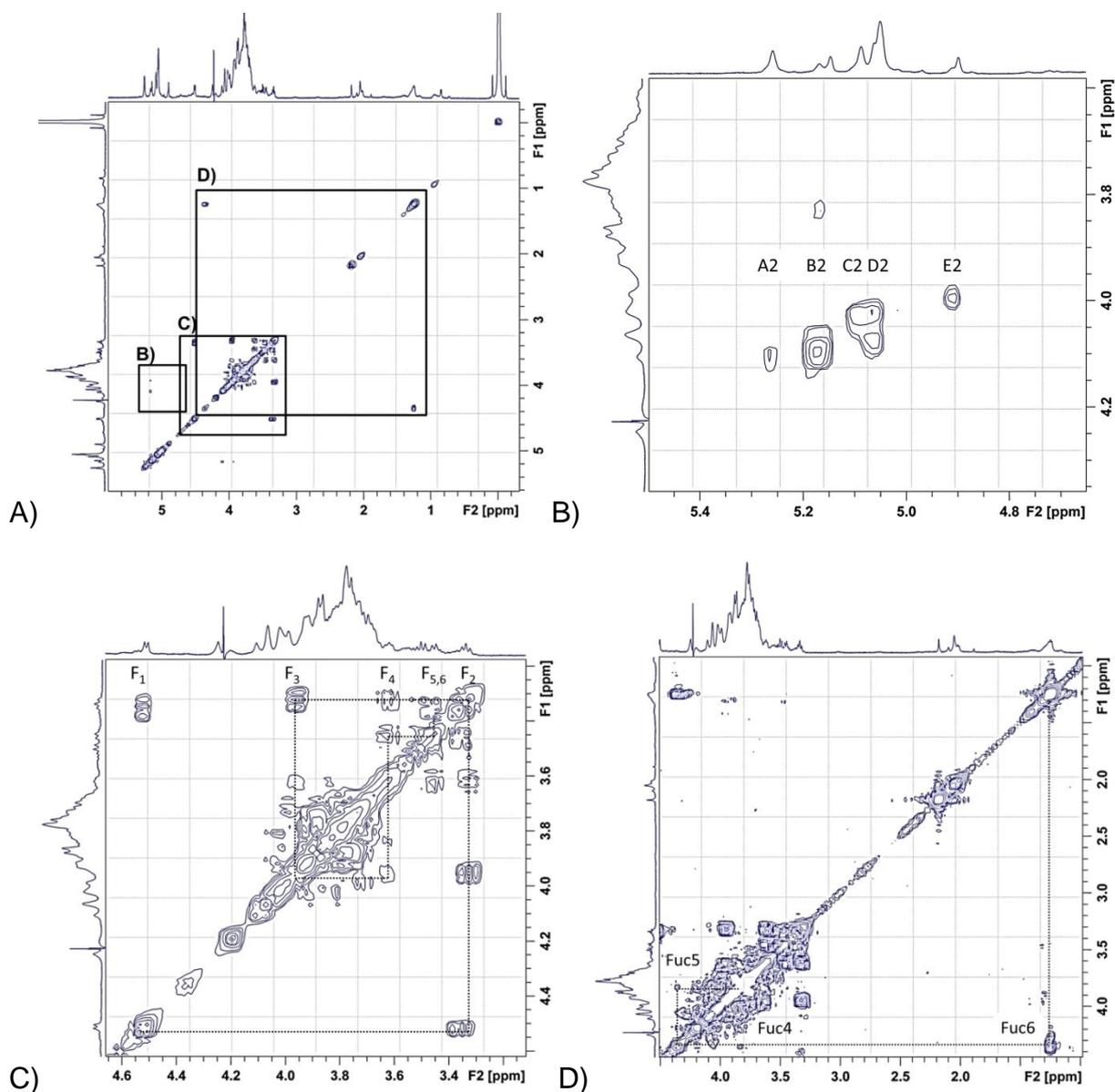


FIGURA 6.32 - Experimento de COSY (400MHz, 70°C, D<sub>2</sub>O) para o EPS de *Luteibacter* sp. A) Visão geral do espectro; B) Ampliação da região dos hidrogênios  $\alpha$ -anoméricos entre  $\delta$  4,7 e 5,5, mostrando a interação H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> para os resíduos A - E do monômero do EPS. C) Ampliação da região entre  $\delta$  3,2 e 4,6, mostrando a correlação de todos os sinais dos hidrogênios do resíduo F. D) Ampliação da região entre  $\delta$  1 a 4, mostrando a interação dos sinais H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub> e H<sub>6</sub> do resíduo de fucose.

TABELA 6.13 - Valores de deslocamento químico para os hidrogênios ligados ao carbono 2 (H<sub>2</sub>) dos resíduos A-F do EPS de *Luteibacter* sp. e a correlação com o deslocamento do hidrogênio ligado ao carbono 1 (H<sub>1</sub>).

Resíduo	Deslocamento Químico H <sub>2</sub> , ppm	Deslocamento Químico H <sub>1</sub> (ppm)
A	4,11	5,26
B	4,09	5,15
C	4,05	5,09
D	4,02	5,05
E	3,99	4,90
F	3,34	4,52

Pode ser observada também a correlação entre H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub> e H<sub>5</sub>-H<sub>6</sub> do resíduo de fucose, uma vez que a correlação de H<sub>5</sub> e H<sub>6</sub> também aparece em região destacada (Figura 6.32 D). Foram observados os valores de  $\delta$  3,83 para o hidrogênio H<sub>4</sub>, e  $\delta$  4,30 para o H<sub>5</sub>.

O sinal em  $\delta$  2,18 não apresenta correlação com nenhum outro sistema de hidrogênios, reforçando a ideia de este sinal ser referente a um grupo O-acetil.

Para incrementar a avaliação dos sistemas de *spins* presentes na amostra, foi realizado o experimento de TOCSY. Através do experimento de TOCSY pode se constatar diversos conjuntos de sinais dispostos no espectro, sendo cada linha ou coluna indicativa em um sistema de hidrogênios de um monossacarídeo, que podem apresentar variações na quantidade de sinais observados, relacionadas com a constante de acoplamento entre cada um dos hidrogênios que compõem o sistema de *spins*. que por sua vez apresentam comportamento regido pelos ângulos diedros como descrito pela correlação de Karplus (KARPLUS, 1959). Esta variação pode ser utilizada para discriminar entre conformações *manno*, *galacto* ou *gluco*, pois enquanto a  $\beta$ -glicose apresenta excelente resolução por possuir os hidrogênios todos em axial, a manose, sendo o epímero em C<sub>2</sub> da glicose, apresenta baixos <sup>3</sup>J(H-H) entre H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub> tanto na forma  $\alpha$  quanto  $\beta$ , prejudicando a observação de sinais posteriores. A  $\alpha$ -galactose (epímero de C<sub>4</sub> da glicose) e a fucose, também denominada 6-desoxi-galactose, apresentam comportamento intermediário do tipo *galacto*, com observação do sistema de spins até H<sub>4</sub> (GHEYSEN *et al.*, 2008). O

espectro de TOCSY obtido para o EPS de *Luteibacter* sp. está ilustrado na Figura 6.33.

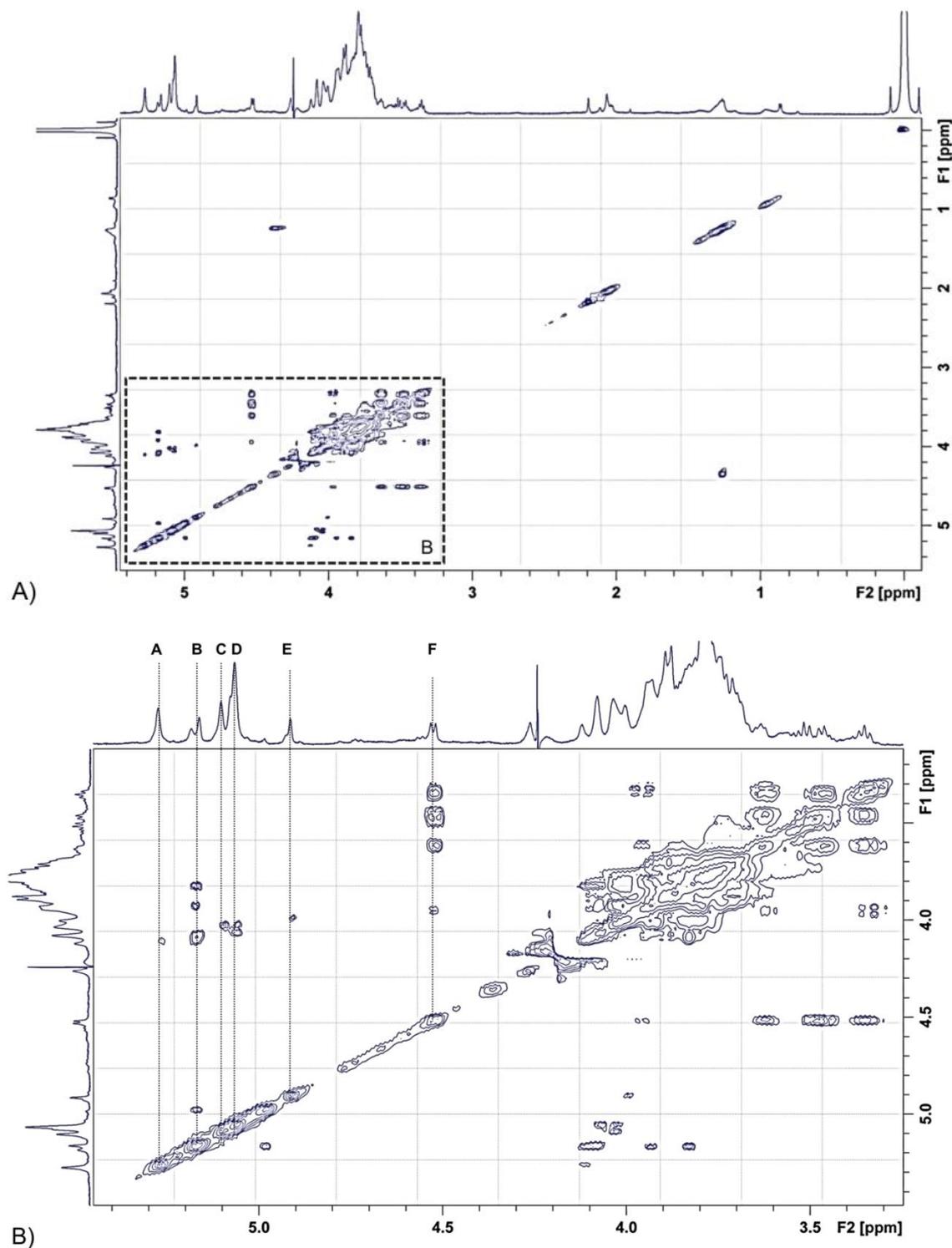


FIGURA 6.33 - Experimento de TOCSY (400 MHz, 70°C, D<sub>2</sub>O) para o EPS de *Luteibacter* sp. A) Visão geral do espectro; B) Visão ampliada da região dos prótons anoméricos e do anel glicosídico.

No experimento de TOCSY para o EPS de *Luteibacter* sp., o tempo de relaxamento foi definido em 100 ms, suficiente para o completo relaxamento do sistema e transferência total da magnetização relacionada com os acoplamentos escalares entre os hidrogênios. Observa-se a presença de uma quantidade de sinais diferentes em cada sistema de spin, com apenas um sinal de correlação para os sistemas A em  $\delta$  4,11; para C em  $\delta$  4,05 e E em  $\delta$  3,99, duas correlações para o sistema D em  $\delta$  4,02, três para o sistema B em  $\delta$  4,09,  $\delta$  3,93 e  $\delta$  3,83 e quatro para o sistema F, com os mesmos deslocamentos observados no experimento de COSY.

O sinal em  $\delta$  3,83 observado para o resíduo B no experimento de TOCSY apresenta o mesmo deslocamento químico observado para o hidrogênio H<sub>4</sub> do resíduo de fucose observado no experimento de COSY. Unindo as duas informações, define-se o resíduo B como sendo o monossacarídeo fucose. De acordo com os monossacarídeos identificados por GC-MS (3 manoses, 1 xilose, 1 fucose e 1 glicose) e as observações de diferentes sistemas de spins no experimento de TOCSY de acordo com a conformação, designou-se o resíduo A, C e E como manose, e o resíduo F como glicose, sendo finalmente o resíduo D designado como xilose. A pequena correlação entre dois hidrogênios na região dos H anoméricos, em 4,97 e 5,16 ppm foi atribuída a relação de prótons de interferentes presentes na amostra.

Para uma avaliação mais profunda da estrutura, foi feito um experimento de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, permitindo observar o acoplamento entre hidrogênios e carbonos diretamente ligados. O espectro de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC obtido para o EPS de *Luteibacter* sp. está ilustrado na Figura 6.34.

O espectro de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC apresenta deslocamentos químicos que corroboram com os resultados anteriores, além de apresentar novas informações. Os prótons da metila acoplam com sinais de <sup>13</sup>C em  $\delta$  18,5. De maneira similar os hidrogênios do grupo acetil acoplam com carbonos na região de  $\delta$  23,4 (Figura 6.34 A)). Utilizando os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios anoméricos e do esqueleto dos anéis glicosídicos obtidos pelos experimentos de <sup>1</sup>H, COSY e TOCSY, foram atribuídas as correlações entre os prótons e seus carbonos correspondentes (Figura 6.34 B) e C)). Através dos dados obtidos pelos experimentos de correlação realizados, podem ser atribuídos os deslocamentos de alguns dos átomos do EPS, dispostos na Tabela 6.14.

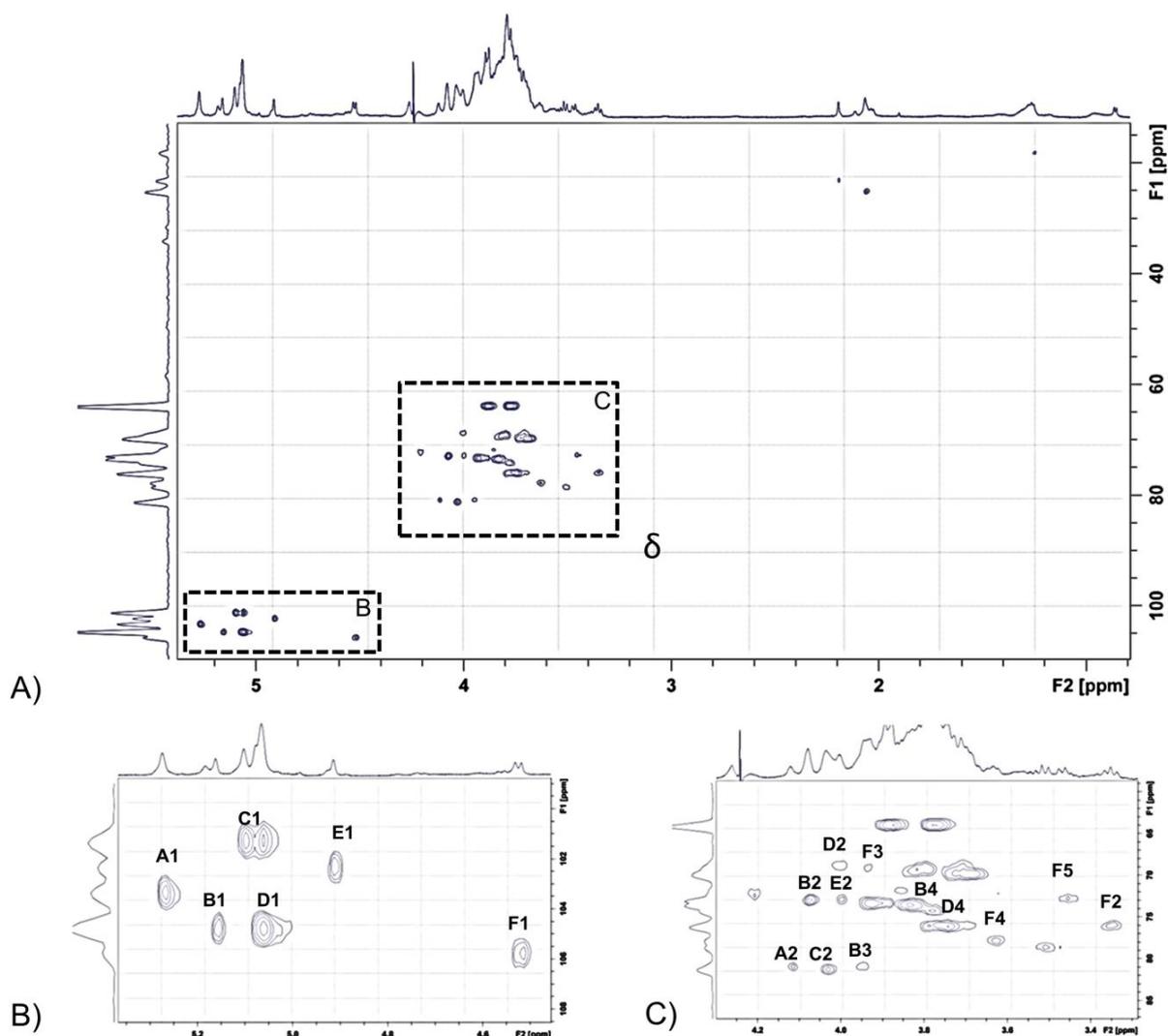


FIGURA 6.34 - Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC (600 MHz, 80°C,  $\text{D}_2\text{O}$ ) do EPS de *Luteibacter* sp. A) Visão geral do espectro; B) Ampliação da região entre  $\delta$  4,4 e 5,4 mostrando as correlações  $\text{C}_1/\text{H}_1$  dos hidrogênios anoméricos nos resíduos A-F; C) Ampliação da região entre  $\delta$  3,3 e 4,3 mostrando as designações de algumas correlações C/H de átomos dos anéis glicosídicos dos resíduos de monossacarídeos A-F do EPS de *Luteibacter* sp.

Com a identificação dos monossacarídeos de cada resíduo, foi realizado o experimento de NOESY na tentativa de identificar as conexões. O espectro de NOESY permite observar as interações de hidrogênios próximos espacialmente, sendo possível inferir as ligações glicosídicas entre os resíduos de monossacarídeos a partir das correlações entre o hidrogênio anomérico de um anel,

sempre adjacente a ligações glicosídicas, e hidrogênios do anel glicosídico de outros resíduos.

TABELA 6.14 - Atribuição parcial dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos monossacarídeos constituintes do EPS de *Luteibacter* sp.

Resíduo	Átomo	1	2	3	4	5	6/6'
A	H	5,26	4,11	-	-	-	-
Man	C	102,5	80,1	-	-	-	-
B	H	5,15	4,09	3,93	3,83	4,30	1,24
3-Fuc	C	103,9	72,3	80,2	72,8	70,4	18,1
C	H	5,09	4,05	-	-	-	-
Man	C	100,4	80,6	-	-	-	-
D	H	5,05	4,02	-	-	-	-
t-Xyl	C	104,0	68,2	-	-	-	-
E	H	4,90	3,99	-	-	-	-
Man	C	101,4	72,1	-	-	-	-
F	H	4,52	3,34	3,95	3,66	3,46	-
2,4-Glc	C	104,9	75,3	62,2	77,0	72,0	-

O espectro de NOESY para o EPS de *Luteibacter* sp. está ilustrado na Figura 6.35. Na figura, as relações espaciais observadas foram anotadas, sendo que as correlações envolvidas em ligações glicosídicas entre dois resíduos apresentam um traço para destaca-las.

Dentre as diversas correlações espaciais observadas, quatro sinais foram identificados como interações entre os glicosídeos.

O resíduo A, identificado como manose, apresentou correlação entre seu hidrogênio anomérico e seu hidrogênio ligado ao carbono 2 ( $\text{H}_{\text{A}2}$ ) de maneira similar ao observado no experimento de COSY. Além desta correlação intraglicosídica, apresentou correlação com o hidrogênio ligado ao carbono 2 do resíduo C ( $\text{H}_{\text{C}2}$ ), outra manose, indicando uma conexão do tipo  $\alpha \text{A}1 \rightarrow \text{C}2$  entre os dois resíduos. Devido a esta conexão, o resíduo C não pode ser um substituinte de manose terminal, uma vez que ele apresenta uma ligação no carbono 2.

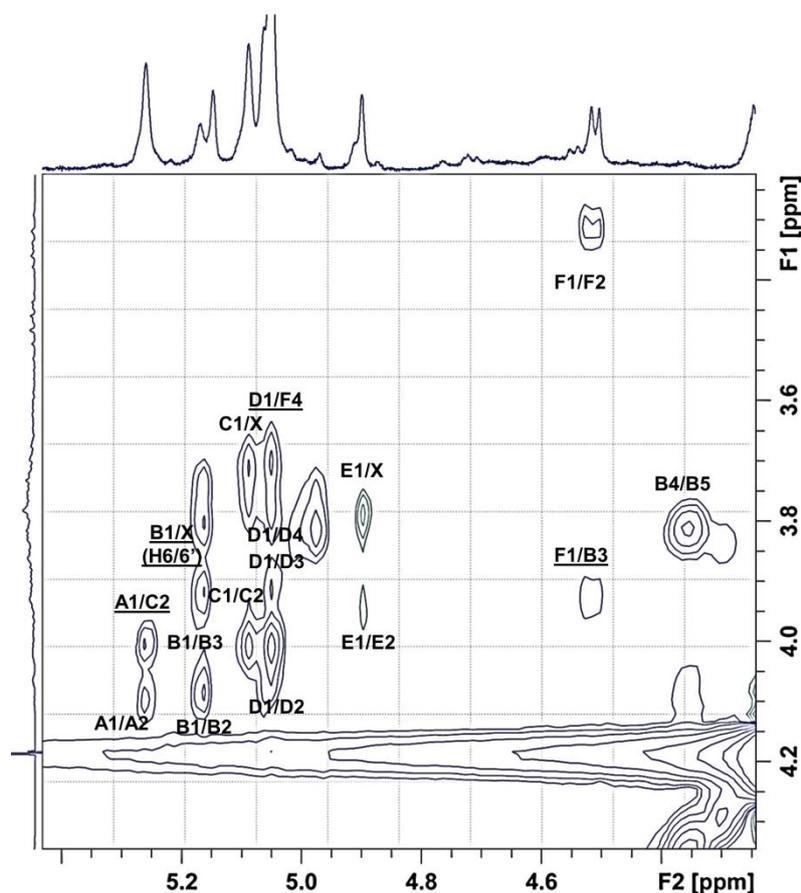


FIGURA 6.35 - Experimento de NOESY (400MHz, 70°C, D<sub>2</sub>O) para o EPS de *Luteibacter* sp.. As correlações sublinhadas correspondem a interações entre hidrogênios de dois monossacarídeos diferentes

O resíduo B, caracterizado como 3-Fuc, apresenta correlações entre seu hidrogênio anomérico (H<sub>B1</sub>) e os hidrogênios dos carbonos 2 e 3 (H<sub>B2</sub> e H<sub>B3</sub>), bem como uma correlação com dois sinais que apresentam forma e deslocamentos condizentes com uma interação com hidrogênios 6 e 6' de uma hexose, numa ligação do tipo  $\alpha$  B1  $\rightarrow$  6.

O resíduo F, previamente caracterizado como sendo o resíduo  $\beta$ -2,4-Glc, apresentou correlação entre seu hidrogênio anomérico (H<sub>F1</sub>) e o hidrogênio ligado ao carbono vizinho (H<sub>F2</sub>), bem como uma correlação com o hidrogênio ligado ao carbono 3 do resíduo B (H<sub>B3</sub>), indicando uma conexão do tipo  $\beta$ -F1  $\rightarrow$  B3. Os resultados de GC-MS dos derivados de PMAA indicam que o único monossacarídeo dentre os resíduos encontrados que apresenta ligação glicosídica no carbono 3 era o resíduo de 3-Fuc, reforçando a identificação do resíduo B como 3-Fuc.

O hidrogênio anomérico do resíduo D ( $H_{D1}$ ), por sua vez, apresenta uma relação com o hidrogênio ligado ao carbono 4 do resíduo F ( $H_{F4}$ ), indicando uma conexão do tipo  $\alpha$ -D1 $\rightarrow$ F4, novamente corroborando com os dados de GC-MS dos derivados de PMAA, que mostram uma glicose substituída nesta posição. O resíduo D foi identificado previamente como sendo uma xilose terminal, confirmando a ramificação existente neste monossacarídeo.

O resíduo D (t-Xyl) está ligado através da ligação glicosídica entre seu carbono anomérico e o carbono 4 do resíduo F (2,4 Glc) por meio de uma ligação 1 $\rightarrow$ 4. O resíduo F por sua vez encontra-se ligado por sua ligação glicosídica do carbono anomérico ao carbono 3 do resíduo B (3-Fuc) através de uma ligação 1 $\rightarrow$ 3, constituindo um trissacarídeo apresentando os resíduos de glicose, fucose e xilose como mostra a figura, restando os três resíduos de manose para serem atribuídos.

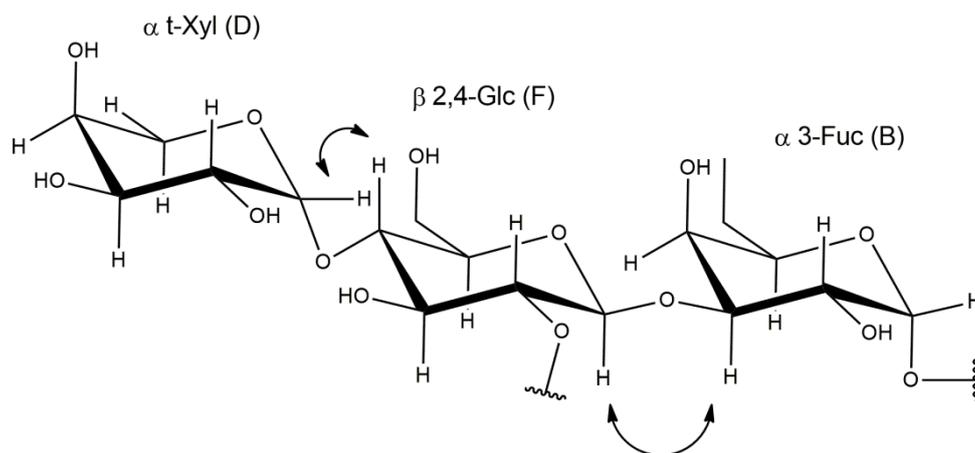


FIGURA 6.36 - Trissacarídeo constituído de  $Xylp-\alpha-1\rightarrow4-Glcp-\beta-1\rightarrow3-Fucp-\alpha-1\rightarrow$  identificado como parte constituinte do EPs de *Luteibacter* sp. As setas indicam as correlações observadas por NOESY.

Com a definição das ligações glicosídicas entre os três primeiros resíduos, prosseguiu-se com a atribuição dos três resíduos de manose A, C e E, sendo que de acordo com os resultados de GC-MS dos derivados de PMAA, os resíduos se dividem entre t-Man, 2-Man e 2,6-Man.

Ao observar os três resíduos A, C e E, percebe-se que dois deles apresentam ligações glicosídicas em seu carbono 2, podendo esta característica ser

utilizada para discriminar os resíduos. É bem descrito na literatura que carbonos envolvidos em ligações glicosídicas tendem a ter um deslocamento de seu sinal para regiões desblindadas (LEMOINE *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2009, LIU *et al.*, 2013), e observando os deslocamentos atribuídos aos C<sub>2</sub> dos resíduos A, C e E, claramente pode se observar que os carbonos dos resíduos A e C apresentam deslocamento mais desblindado (80,1 e 80,6 ppm respectivamente) do que o carbono do resíduo E (72,1 ppm), sendo então designado o resíduo E como sendo uma manose terminal (t-Man), único dos três resíduos a não possuir ligação glicosídica no C<sub>2</sub>. A conexão entre os resíduos A e C ocorre na forma A1→2C.

De acordo com o experimento de NOESY, o resíduo B está conectado através de uma ligação α-1→6, sendo o resíduo 2,6-Man o único dentre os três resíduos de manose capaz de realizar esta conexão, levando este resíduo a estar diretamente ligado ao resíduo de fucose.

Juntando todas as informações do experimento de NOESY com as obtidas pelos outros experimentos de NMR e GC-MS, chega-se a duas prováveis estruturas para a composição do monômero do EPS. Como não foi possível atribuir os deslocamentos dos hidrogênios metilênicos das manoses, não pode se afirmar se a ligação glicosídica entre o resíduo de fucose e a posição 6 da manose ocorre no resíduo A ou C. A Figura 6.37 ilustra as possíveis estruturas para o monômero.

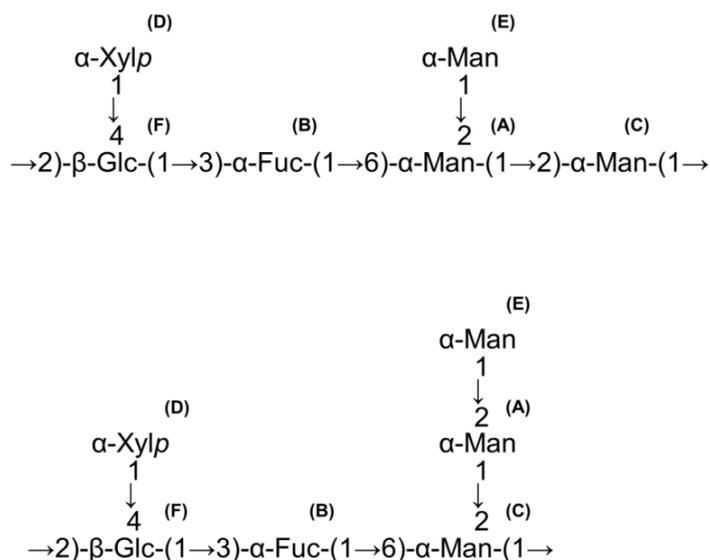


FIGURA 6.37 - Propostas de estrutura do monômero constituinte do EPS de *Luteibacter* sp.

Apesar de não ser possível a observação da correlação da conexão  $\alpha$ -1C $\rightarrow$  2F dos resíduos C e F, a conexão entre eles satisfaria a proposta de componentes do monômero atribuída por GC-MS e NMR. Dessa maneira, apesar de não ser possível a completa atribuição de todos os deslocamentos de cada átomo e de todas as conexões glicosídicas, foi possível propor um esqueleto com as informações obtidas.

A posição do grupo O-acetil também não pode ser definida com precisão, pois a principal ferramenta utilizada para esta avaliação se baseia na comparação dos deslocamentos dos carbonos para identificar quais apresentam variações quando confrontados com dados conhecidos de estruturas nativas. Para tanto, seria necessário a completo desígnio de todos os sinais.

O gênero *Luteibacter* apresenta uma história recente, sendo descrito pela primeira vez em 2005, e até o presente momento possui três espécies validas descritas (JOHANSEN *et al.*, 2005). Entretanto, nenhum registro de caracterização de EPS para estas espécies foi encontrado sendo, até onde sabemos, o primeiro relato de caracterização de um EPS produzido por um isolado deste gênero. Com relação à estrutura observada, uma busca no banco de dados “*Bacterial Carbohydrate Structure Database*” (<http://csdb.glycoscience.ru/bacterial/index.html>) não forneceu nenhuma estrutura similar, reforçando o ineditismo da estrutura observada.

## 6.4 - Conclusões

A microbiota encontrada em associação ao inseto *D. speciosa* apresentou uma boa capacidade de produção de EPS. O teste qualitativo de ponto permitiu a observação da morfologia das colônias de cada isolado, sendo possível notar grande diferença na forma e na quantidade de material extracelular produzido. O teste permitiu a classificação dos isolados de uma maneira qualitativa. Entre os organismos selecionados para a avaliação da produção de EPS em meio líquido, uma grande variação na produtividade e nas características físicas e químicas do EPS foram observados, sendo o EPS produzido por *Aurantimonas* sp. o que apresentou melhor rendimento, de 1,5 g.L<sup>-1</sup>. A caracterização dos materiais obtidos por técnicas como SEC-UV-ELSD, GC-MS e NMR permitiu a elucidação estrutural. A

caracterização estrutural do EPS insolúvel de *Aurantimonas* sp. indicou uma composição predominantemente de  $\beta$ -glucanas. O EPS de *Acidovorax* sp. apresentou uma composição similar a manoglucana (ou glucomanana) de 66,5 kDa. O EPS de *Luteibacter* sp. apresentou a maior complexidade, sendo um EPS ramificado de 18,1 kDa composto por seis monossacarídeos de quatro tipos diferentes, com destaque para presença de fucose, um açúcar relativamente raro em EPS microbianos.



## 7 - Conclusões e Perspectivas

A compreensão da existência e da importância das associações entre seres superiores e micro-organismos é uma área de que apesar de ainda incipiente se demonstra cada vez mais importante para se compreender diversos comportamentos e funcionalidades de ambos, bem como expandir a diversidade microbiana conhecida.

A possibilidade de exploração da microbiota de *D. speciosa* permitem diversas oportunidades. Os isolados obtidos através de técnicas de cultivo foram caracterizados utilizando-se tanto técnicas genômicas tradicionais como modernas técnicas espectrométricas, obtendo-se resultados robustos e similares por ambas, com 100% de convergências entre as identificações, sendo identificados 17 gêneros diferentes. Uma comparação com a literatura indicou uma correlação entre estes o microbioma de *D. speciosa* e outros insetos do gênero *Diabrotica*. Relatos mostram que estes insetos, utilizam estas associações para obter vantagens ecológicas, logo com a identificação de quais bactérias compõem a microbiota deste inseto-praga conhecido por devastar diversos cultivos de importância econômica, novas estratégias mais eficientes e menos impactantes para seu controle populacional através de manipulações nesta relação ecológica poderão começar a ser exploradas.

Outros tipos de oportunidades, mais profundamente exploradas neste trabalho, estão na avaliação destes micro-organismos como promissores na produção de moléculas de alto valor agregado. Este trabalho mostrou que este microbioma é uma fonte interessante de organismos, sendo possível a obtenção de uma ampla gama de gêneros, alguns já conhecidos e eficientes na produção de diversas classes de compostos, bem como diversos gêneros de pouca exploração, que apresentaram capacidade de produção de biopolímeros com composição e propriedades importantes. Devido ao grande número de isolados, metodologias de triagem propostas foram satisfatórias na capacidade de ranquear os isolados na tentativa de aumentar a chance de alcançar bons resultados de maneira eficiente. Os organismos foram capazes de produzir biopolímeros em quantidades e características diferentes, sendo alguns deles como *Aurantimonas* sp. e *Delftia* sp. eficientes tanto na capacidade de utilização de diferentes substratos quanto na

quantidade de material e eficiência de acumulação. Do ponto de vista biotecnológico, *Delftia* sp. apresentou um grande potencial, visto que foi capaz de produzir o copolímero PHBV em alta quantidade e eficiência, utilizando apenas substratos de baixo custo. Este fato apresenta-se como uma vantagem competitiva visto que a maioria dos organismos produtores deste tipo de material necessita da suplementação de substratos específicos para a produção, inviabilizando economicamente o processo. Na produção de exopolissacarídeos, as técnicas de análise utilizadas permitiram a identificação de diversos aspectos da composição química dos polímeros, sendo possível a caracterização de boa parte das estruturas. Foram obtidos EPS inéditos produzido pelos isolados *Acidovorax* sp. e *Luteibacter* sp. com diferentes composições. O gênero *Aurantimonas* sp. apresentou um EPS interessante, insolúvel em água e com alto rendimento, podendo esta espécie ainda ser considerada para a produção concomitante dos dois biopolímeros explorados.

De maneira geral, o trabalho realizado apresentou uma grande interface entre diversas áreas do conhecimento, como Química Orgânica, Química de Produtos Naturais, Microbiologia, Biologia Molecular, Ecologia Química e Biotecnologia, sendo utilizadas ferramentas e conhecimentos de maneira integrada, que contribuíram para o aumento do conhecimento ecológico da espécie *Diabrotica speciosa* e do gênero *Diabrotica*, através da identificação de sua microbiota associada, ao passo que mostrou a viabilidade de exploração da microbiota de insetos como um vasto reservatório de micro-organismos, um nicho relativamente pouco explorado, que possam ter diversas aplicações biotecnológicas, como a produção de biopolímeros como PHA e EPS.

## 8 - Referencias Bibliográficas

- ABE, K.; NAKAJIMA, M.; KITAOKA, M.; TOYOIZUMI, H.; TAKAHASHI, Y.; SUGIMOTO, N.; NAKAI, H. & TAGUCHI, H. "Large-scale preparation of 1,2- $\beta$ -glucan using 1,2- $\beta$ -oligoglucan phosphorylase." *J. Appl. Glycosci.* **62** : 47, 2015.
- ABRAHAM, M.; VENTER, P.; LUES, J.; IVANOV, I. & DE SMIDT, O. "The exopolysaccharide (EPS) ultra-structure of *Staphylococcus aureus*: changes occurring in EPS resulting from exposure to physical and chemical food preservation practices in South Africa". *Ann. Microbiol.*, **59**(3): 499-503, 2009.
- AHMED, H. Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization. Boca Raton, CRC Press, 2004. p. 120.
- AI, X. X.; LIAG, J. R.; GAO, Y. H.; LO, S. C. L.; LEE, F. W. F.; CHEN, C. P.; LUO, C. S. & DU, C. "MALDI-TOF MS analysis of the extracellular polysaccharides released by the diatom *Thalassiosira pseudonana* under various nutrient conditions." *J. Appl. Phycol.* **27** : 673, 2015.
- AKMAN, L.; YAMASHITA, A.; WATANABE, H.; OSHIMA, K.; SHIBA, T.; HATTORI, M. & AKSOY, S. "Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*". *Nat. Genet.*, **32** : 402, 2002.
- ALE, M. T.; MARUYAMA, H.; TAMAUCHI, H.; MIKKELSEN, J. D. & MEYER, A. S. " Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro." *Mar. Drugs*, **9** (12): 2605, 2011.
- AMUTIO, M.; LOPES, G.; ALVAREZ, J.; OLAZAR, M. & BILBAO, J. "Fast pyrolysis of eucalyptus waste in a conical spouted bed reactor". *Bioresour. Technol.*, **194** : 225, 2015.
- ANDERSON, A. J. & DAWES, E. A. "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates". *Microbiol. Rev.*, **54** : 450, 1990.
- ARAVIND, J. & SANGEETHA, H. S. "A study on effect of mutagenic agents on polyhydroxyalkanoates (pha) production". *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.*, **3** (5): 384, 2014.
- ARUMUGAM, A.; SANDHYA, M. & PONNUSAMI, V. "Biohydrogen and polyhydroxyalkanoate co-production by *Enterobacter aerogenes* and *Rhodobacter sphaeroides* from *Calophyllum inophyllum* oil cake". *Bioresour. Technol.*, **164** : 170, 2014.
- ÁVILA, C. J. & SANTANA, A. G. "*Diabrotica speciosa*: an important soil pest in South America". IN: Potential Invasive Pests of Agricultural Crops. PEÑA, J. E. (Ed.). Wallingford, CABI, 2013. p. 75.
- AWONG-TAYLOR, J.; CRAVEN, K. S.; GRIFFITHS, L.; BASS, C. & MUSCARELLA, M. "Comparison of biochemical and molecular methods for the identification of bacterial isolates associated with failed loggerhead sea turtle eggs". *J. Appl. Microbiol.*, **104** (5): 1244, 2008.
- BABU, R. P.; O'CONNOR, K. & SEERAM, K. "Current progress on bio-based polymers and their future trends". *Prog. Biomat.*, **2** : 8, 2013.

- BAGHERIASL, S. Development and Characterisation of Polyhydroxybutyrate from Selected Bacterial Species. Birmingham, School of Metallurgy and Materials - University of Birmingham, 2012. Tese de Doutorado, 191 p.
- BALOGUN, S. A.; OSUNDE, J. E.; SHITTU, O. B. & LASISI, A. A. "Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and biosurfactants by *Serratia rubidaea*". *Sci. Res. Ann.*, **5** (1): 45, 2013.
- BARR, K. L.; HEARNE, L. B.; BRIESACHER, S.; CLARK, T. L. & DAVIS, G. E. "Microbial symbionts in insects influence down-regulation of defense genes in maize". *PLoS ONE*, **5** (6): e11339, 2010.
- BAUMANN, P. "Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects". *Annu. Rev. Microbiol.*, **59** : 155, 2005.
- BEN-MENACHEM, A. "Abstraction and unification". IN: Historical Encyclopedia of Natural and Mathematical Sciences. BEN-MENACHEM, A. (Ed.). Springer-Verlag, Heidelberg, 2009. P. 1733-2800.
- BERLANGA, M.; MONTERO, M. T.; HERNÁNDEZ-BORRELL, J. & GUERRERO, R. "Rapid spectrofluorometric screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats". *Int. Microbiol.*, **9** : 95, 2006.
- BERTOZZI, C. R. & RABUKA, D. "Structural basis of glycan diversity". IN: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D.; FREEZE, H. H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C. R.; HART, G. W. & ETZLER, M. E. (Eds.). *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/> Acessado em 08/02/2016
- BIERMANN, C. J. & MCGINNIS, G. D. *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. Boca Raton, CRC Press, 1988.
- BISWAS, S. & ROLAIN, J. M. "Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture". *J. Microbiol. Meth.*, **92** : 14, 2013.
- BJÖRNDAL, H.; LINDBERG, B. & SVENSSON, S. "Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates". *Carbohydr. Res.* **5** (4): 433, 1967.
- BLACKWOOD, A. D. & CHAPLIN, M. F. "Disaccharide, oligosaccharide and polysaccharide analysis". IN: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. MEYERS, R. A. (Ed.). New York, Wiley, 2006.
- BOERIU, C. G.; SPRINGER, J.; KOOY, F. K.; VAN DEN BROEK, L. A. M. & EGGINK, G. "Production methods for hyaluronan". *Int. J. Carbohydr. Chem.*, Article ID 624967, 14 pages, 2013.
- BÖHME, K.; FERNÁNDEZ-NO, I. C.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; GALLARDO, J. M.; CALO-MATA, P. & CAÑAS, B. "Species differentiation of seafood spoilage and pathogenic Gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting". *J. Proteome Res.*, **9** (6): 3169, 2010.
- BÖHME, K.; FERNÁNDEZ-NO, I. C.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; GALLARDO, J. M.; CAÑAS, B. & CALO-MATA, P. "Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting". *Electrophoresis*, **32** : 2951, 2011.
- BÖHME, K.; FERNÁNDEZ-NO, I. C.; PAZOS, M.; GALLARDO, J. M.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; CAÑAS, B. & CALO-MATA, P. "Identification and classification

- of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting". *Electrophoresis*, **34** : 877, 2013.
- BOTELHO, P. S.; MACIEL, M. I. S.; BUENO, L. A.; MARQUES, M. F. F.; MARQUES, D N. & SILVA, T. M. S. "Characterisation of a new exopolysaccharide obtained from of fermented kefir grains in soymilk". *Carbohydr. Polym.* **107** : 1, 2014.
- BOUNAIX, M. -S.; GABRIEL, V.; MOREL, S.; ROBERT, H.; RABIER, P.; REMAUD-SIMEON, M.; GABRIEL, B. & FONTAGNE-FAUCHER, C. "Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria". *J. Agr. Food Chem.*, **57** : 10889, 2009.
- BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELI, I. B.; PRAJAPATI, J. P.; SETO, Y.; SCHURE, E. T.; VAN BOVEN, A.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S. & HANSEN, E. B. "Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use". *Int. J. Food Microbiol.*, **154** : 87, 2012.
- BOURTZIS, K. & MILLER, T. A. *Insect Symbiosis*. Boca Raton, CRC Press, 2003
- BRAUNEGG, G.; BONA, R. & KOLLER, M. "Sustainable polymer production". *Polym. Plast. Technol. Eng.*, **43** : 1779, 2004.
- BREEDVELD, M. W. & MILLER, K. J. "Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae." *Microbiol Rev.* **58** (2): 145, 1994.
- BRODERICK, N.; ROBINSON, C.; MCMAHON, M. D.; HOLT, J.; HANDELSMAN, J. & RAFFA, K. F. "Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera". *BMC Biol.*, **7** (1):11, 2009.
- BROWNE, M. A.; UNDERWOOD, A. J.; CHAPMAN, M. G.; WILLIAMS, R.; THOMPSON, R. C. & VAN FRANKEK, J. A. "Linking effects of anthropogenic debris to ecological impacts". *Proc. R. Soc. B.*, **282** : 2014, 2015.
- BUBB, W. "NMR Spectroscopy in the study of carbohydrates: characterizing the structural complexity". *Concept. Magn. Reson. A*, **19A** (1): 1, 2003
- BUGNICOURT, E.; CINELLI, P.; LAZZERI, A. & ALVAREZ, V. "Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging". *Express Polym. Lett.*, **8** (11): 791, 2014.
- BYLUND, J.; BURGESS, L. A.; CESCUTTI, P.; ERNST, R. K. & SPEERT, D. P. "Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species". *J. Biol. Chem.* **281** (5): 2526, 2006.
- CAMPESTRINI, L. H.; SILVEIRA, J. L. M.; DUARTE, M. E. R.; KOOP, H. S. & NOSEDA, M. D. "NMR and rheological study of Aloe barbadensis partially acetylated glucomannan." *Carbohydr. Polym.* **94** : 511, 2013.
- CARSON K. J. & EAGON, R. G. "Cellular disintegration with concomitant release of slime and production of extracellular mannan by *Pseudomonas aeruginosa*: two separate phenomena". *Can. J. Microbiol.* **10** (3): 467, 1964.
- CEJA-NAVARRO, J. A.; NGUYEN, N. H.; KARAOZ, U.; GROSS, S. R.; HERMAN, D. J.; ANDERSEN, G. L.; BRUNS, T. D.; PETT-RIDGE, J.; BLACKWELL, M. & BRODIE, E. L. "Compartmentalized microbial composition, oxygen gradients and nitrogen fixation in the gut of *Odontotaenius disjunctus*". *ISME J.*, **8** (1): 6, 2014.

- CESCUTTI, P.; TOFFANIN, R.; FETT, W. F.; OSMAN, S. F.; POLLESELLO, P. & PAOLETTI, S. "Structural investigation of the exopolysaccharide produced by *Pseudomonas flavescens* strain B62 degradation by a fungal cellulase and isolation of the oligosaccharide repeating unit." *Eur. J. Biochem.* **251** : 971, 1998.
- CHANG, S.; ZHAO, Z.; ZHENG, A.; LI, X.; WANG, X.; HUANG, Z.; HE, F. & LI, H. "Effect of hydrothermal pretreatment on properties of bio-oil produced from fast pyrolysis of eucalyptus wood in a fluidized bed reactor". *Bioresource Technol.*, **138** : 321, 2013.
- CHODAK, I. "Polyhydroxyalkanoates: origin, properties and applications". IN: *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. BELGACEM, M., GANDINI, A. (Eds.). Amsterdam, Elsevier, 2008.
- CHOJNACKA, K. "Fermentation products" IN: *Chemical Engineering and Chemical Process Technology*. POHORECKI, R.; BRIDGWATER, J.; MOLZAHN, M.; GANI, R. (Eds.). Paris, Eolss Publishers, 2009.
- CHU, C. C.; SPENCER, J. L.; CURZI, M. J.; ZAVALA, J. A. & SEUFFERHELD, M. J. "Gut bacteria facilitate adaptation to crop rotation in the western corn rootworm". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110** (29): 11917, 2013.
- CIUCANU, I. & KEREK, F.; "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates". *Carbohydr. Res.*, **131** : 209, 1984.
- CONLY, J. M. & SHAFRAN, S. D.; "Pseudo-, Xantho-, and now *Stenotrophomonas maltophilia*: new kid on the block." *Can. J. Infect. Dis.*, **7** (2): 99, 1996.
- CONWAY, G. C.; SMOLE, S. C.; SARRACINO, D. A.; ARBEIT, R. D. & LEOPOLD, P. E. "Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry". *J. Mol. Microb. Biotech.*, **3**(1): 103, 2001.
- CORSARO, M. M.; EVIDENTE, A.; LANZETTA, R.; LAVERMICOCCA, P. & MOLINARO, A. "Structural determination of the phytotoxic mannan exopolysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*". *Carbohydr. Res.*, **330** (2): 271, 2001.
- COTTERILL, R. *The Material World*, 2<sup>nd</sup> Edition. Cambridge, Cambridge University Press. 2008, p.301.
- CRESPY, D.; BOZONNET, M. & MEIER, M. "100 Years of bakelite, the material of a 1000 uses". *Angew. Chem. Int. Edit.*, **47** : 3322, 2008.
- CROXATTO, A.; PROD'HOM, G. & GREUB, G. "Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology." *FEMS Microbiol. Rev.* **36** : 380, 2012.
- DAVIDSON, S. K. & STAHL, D. A.; "Transmission of nephridial bacteria of the earthworm *Eisenia fetida*". *Appl. Environ. Microb.*, **72** (1): 769, 2006.
- DELATTRE, C.; FENORADOSOA, T. A. & MICHAUD, P. "Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides". *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **54** (6): 1075, 2011.
- DERTL, E.; COLQUHOUN, I. J.; GUNNING, A. P.; BONGAERTS, R. J.; LE GALL, G.; BONEV, B. B.; MAYER, M. J. & NARBAD, A. "Structure and Biosynthesis of Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785\*". *J. Biol. Chem.*, **288** (44): 31938, 2013.

- DE RIJK, T. C., van de Meer, P., Eggink, G., Weusthuis, R. A. Methods for Analysis of Poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) Composition. *Biopolymers Online*. 3b., 2005. DOI: 10.1002/3527600035.bpol3b01
- DE VRIES, J. "The Industrial Revolution and the Industrious Revolution." *J. Econ. Hist.*, **54** : 249, 1994.
- DIAZ, J. M.; HANSEL, C. M.; VOELKER, B. M.; MENDES, C. M.; ANDEER, P. F. & ZHANG, T." Widespread Production of Extracellular Superoxide by Heterotrophic Bacteria." *Science*, **340** (6137): 1223, 2013.
- DIECKMANN, R.; GRAEBER, I.; KAESLER, I.; SZEWZYK, U. & VON DÖHREN, H. "Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS)". *Appl. Microbiol. Biot.*, **67** : 539, 2005.
- DILLON, R. J. & DILLON, V. M.; "The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions". *Annu. Rev. Entomol.*, **49** : 71, 2004.
- DILLON, R. J.; VENNARD, C. T. & CHARNLEY, A. K. "A note: gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone". *J. Appl. Microbiol.*, **92** : 759, 2002.
- DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C. & SCHORR-GALINDO, S. "Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction". *Carbohydr. Polym.* **87** : 951, 2012.
- DOUGLAS, A. E. "Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*". *Annu. Rev. Entomol.*, **43** : 17, 1998.
- DOUGLAS, A. E. "Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control". *Trends Biotechnol.*, **25** (8): 338, 2007.
- DUMITRIU, S. *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*. Boca Raton, CRC Press, 2004.
- DUUS, J. Ø.; GOTFREDSEN, C. H. & BOCK, K. "Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern Methods and Limitations." *Chem. Rev.*, **100** : 4589, 2000.
- EBEN, A. & MONTEROS, A. E. "Tempo and mode of evolutionary radiation in Diabroticina beetles (genera *Acalymma*, *Cerotoma*, and *Diabrotica*)". *ZooKeys*, **332** : 207, 2013.
- ELVERS, D.; SONG, C. H.; STEINBÜCHEL, A.; LEKER, J. "Technology trends in biodegradable polymers: evidence from patent analysis." *Pol. Rev.*, 2016. DOI:10.1080/15583724.2015.1125918
- EL-BOURI, K.; JOHNSTON, S.; REES, E.; THOMAS, I.; BOME-MANNATHOKO, N.; JONES, C.; REID, M.; BEN-ISMAEIL, B.; DAVIES, A. P.; HARRIS, L. G. & MACK, D. "Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications". *Br. J. Biomed. Sci.*, **69** (2): 47, 2012.
- ENGEL, P. & MORAN, N. A.; "The gut microbiota of insects – diversity in structure and function". *FEMS Microbiol. Rev.* **37** : 699, 2013.
- EREMEEVA, T. "Size-exclusion chromatography of enzymatically treated cellulose and related polysaccharides: a review". *J. Biochem. Biophys. Met.*, **56** : 253, 2003.

- ESTRELLA, M. J.; PFEFFER, P. E.; BROUILLETTE, J. N.; UGALDE, R. A. & IANNINO, N. I. "Biosynthesis and structure of cell associated glucans in the slow growing *Rhizobium loti* strain NZP 2309." *Symbiosis (Rehovot)* **29** (3): 173, 2000.
- EUROPEAN BIOPLASTICS, 2016a. Capacidade global de produção de bioplásticos por tipo. <http://en.european-bioplastics.org/market/market-development/production-capacity/>. Acessado em 29/01/16.
- EUROPEAN BIOPLASTICS, 2016b. Capacidade global de produção de bioplásticos. <http://en.european-bioplastics.org/market/>. Acessado em 29/01/16.
- FENG, L.; JIA, X. B.; SHI, F. & CHEN, Y. "Identification of two polysaccharides from *Prunella vulgaris* L. and evaluation on their anti-lung adenocarcinoma activity." *Molecules*, **15** : 5093, 2010.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ALMEIDA, J. P. S.; PASSOS, S. R.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK N. G. & XAVIER, G. R. "Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu" *Pesq. Agropec. Bras.*, **45** (12): 1465, 2010.
- FERREIRA, L.; SÁNCHEZ-JUANES, F.; GARCÍA-FRAILE, P.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M. & VELÁZQUEZ, E. "MALDI-TOF "Mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae". *PLoS ONE*, **6** (5): e20223, 2011.
- FRANKLIN, M. J.; NIVENS, D. E.; WEADGE, J. T. & HOWELL, P. L. "Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl". *Front. Microbiol.* **22** (2): 167, 2011.
- FREITAS, F.; ALVEAS, V.D.; PAIS, J.; COSTA, N.; OLIVEIRA, C.; MAFRA, L.; HILLIOU, L.; OLIVIERA, R. & REIS, M. A. M. "Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol". *Bioresour. Technol.* **100** : 859, 2009.
- FREITAS, F.; ALVES, V. D. & REIS, M. A. M. "Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications". *Trend Biotechnol.* **29** : 388, 2011.
- FRIČOVÁ, O. & KOVAL'AKOVÁ, M. Solid-State <sup>13</sup>C CP/MAS NMR Spectroscopy as a Tool for Detection of (1→3, 1→6)-β-D-Glucan in Products Prepared from *Pleurotus ostreatus*". *ISRN Anal. Chem.*, 248164, 2013.
- GAO, D- W.; WEN, Z- D.; LI, B. & LIANG, H. "Microbial community structure characteristics associated membrane fouling in A/O-MBR system". *Bioresour. Technol.*, **154** : 87, 2014.
- GARCIA-GONZALEZ, L.; MOZUMDER, S. I.; DUBREUIL, M.; VOLCKE, E. & WEVER, H. "Sustainable autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB) from CO<sub>2</sub> using a two-stage cultivation system". *Catal. Today*, **257**: 237, 2015.
- GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; CLIFTON, E. H.; DUNBAR, M. W.; HOFFMANN, A. M.; INGBER, D. A. & KEWESHAN, R. S. "Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111** (14): 5141, 2014.

- GEBELEIN, C. G.; "New and traditional polymers from biotechnology". IN: Biotechnology and Polymers. Gebelein, C. G. (Ed.). Nova York, Springer US, 1991, p. 1-9.
- GEST, H. "The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antonie van Leeuwenhoek, fellows of The Royal Society". Londres, Notes Rec. Roy. Soc., **58** (2): 187, 2004.
- GHEYSEN, K.; MIHAI, C.; CONRATH, K. & MARTINS, J. C. "Rapid identification of common hexapyranose monosaccharide units by a simple TOCSY matching approach". Chemistry, **14** (29): 8869, 2008.
- GONZALEZ-GIL, G.; THOMAS, L.; EMWAS, A. H.; LENS, P. N. L. & SAIKALY, P. E. "NMR and MALDI-TOF MS based characterization of exopolysaccharides in anaerobic microbial aggregates from full-scale reactors". Scientific Reports **5**, 14316, 2015.
- GOTTLIEB, H.E.; KOTLYAR, V. & NUDELMAN, A. "NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities". J. Org. Chem., **62** : 7512, 1997.
- GRAY, M. E.; SAPPINGTON, T. W.; MILLER, N. J.; MOESER, J. & BOHN, M. O. "Adaptation and invasiveness of western corn rootworm: intensifying research on a worsening pest". Annu. Rev. Entomol., **54** : 303, 2009.
- GREGORY, M. R. "Environmental implications of plastic debris in marine settings entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitchhiking and alien invasions". Philos. Tr. R. Soc. S-A, **364** : 2013, 2009.
- HANSEN, A. K. & MORAN, N. A. "The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects". Mol. Ecol., **23** : 1473, 2014.
- HARVEY, D. J. " Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: an update for 2009–2010". Mass Spectrometr. Rev., **34**(3): 268, 2015.
- HEIJSTRA, B. D. Extracellular polymers of *Acidovorax temperans*. Auckland, The University of Auckland, 2010. Tese de Doutorado, 171 p.
- HERGET, S.; TOUKACH, P. V.; RANZINGER, R.; HULL W. E.; KNIREL Y. A. & VON DER LIETH C. W. "Statistical analysis of the Bacterial Carbohydrate Structure Data Base (BCSDB): Characteristics and diversity of bacterial carbohydrates in comparison with mammalian glycans". BMC Struct. Biol., **8** : 35, 2008.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; NASERI, B.; NAVARRO-CERRILLO, G.; ESCRICHE, B., FERRÉ, J., & HERRERO, S. "Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*". Environ. Microbiol., **12** (10): 2730, 2010.
- HOSOKAWA, T.; KIKUCHI, Y.; NIKOH, N.; SHIMADA, M. & FUKATSU, T. "Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria". PLoS Biol., **4** (10): e337, 2006.
- HULCR, J.; ADAMS, A. S.; RAFFA, K.; HOFSTETTER, R. W.; KLEPZIG, K. D. & CURRIE, C. R. "Presence and diversity of *Streptomyces in dendroctonus* and sympatric bark beetle galleries across north America". Microb. Ecol., **61** : 759, 2011.

- ISIKGOR, F. H. & BECER, C. R. "Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers". *Polym. Chem.*, **6** : 4497, 2015.
- JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. "16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls". *J. Clin. Microbiol.*, **45** (9): 2761, 2007.
- JOHANSEN, J. E.; BINNERUP, S. J.; KROER, N. & MØLBAK, L. "*Luteibacter rhizovicinus* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.)." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55** : 2285, 2005.
- JOHNSTON-MONJE, D. & RAIZADA, M. N. "Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology". *PLoS ONE*, **6** (6): e20396, 2011.
- JURADO, V.; GONZALEZ, J. M.; LAIZ, L. & SAIZ-JIMENEZ, C. "*Aurantimonas altamirensis* sp. nov., a member of the order Rhizobiales isolated from Altamira Cave". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56** (11): 2583, 2006.
- KALTENPOTH, M. "Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects?". *Trends. Microbiol.*, **17** (12): 529, 2009.
- KÄMPFER, P. & GLAESER, S. P. "Prokaryotic taxonomy in the sequencing era – the polyphasic approach revisited". *Environ. Microbiol.*, **14** (2): 291, 2012.
- KARPLUS, M. "Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments". *J. Chem. Phys.* **30** : 11, 1959.
- KAVITA, K.; MISHRA, A. & JHA, B. "Isolation and physico-chemical characterisation of extracellular polymeric substances produced by the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*". *Biofouling*, **27** :(3), 309, 2011.
- KERN, C. C.; VOGEL, R. F. & BEHR, J. "Differentiation of *Lactobacillus brevis* strains using matrix-assisted- laser-desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometry with respect to their beer spoilage potential". *Food Microbiol.*, **40** : 18, 2014.
- KESHK, S. M. A. S. "Bacterial cellulose production and its industrial applications" *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, **4** : 2, 2014.
- KIKUCHI, Y. "Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability". *Microbes Environ.*, **24**(3): 195, 2009.
- KIKUCHI, Y.; HAYATSU, M.; HOSOKAWA, T.; NAGAYAMA, A.; TAGO, K. & FUKATSU, T. "Symbiont-mediated insecticide resistance". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109** (22): 8618, 2012.
- KLEIN, R. "Material properties of plastics" IN: *Laser Welding of Plastics: Materials, Processes and Industrial Applications*. KLEIN, R. (Ed.). Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha. p. 251.
- KOLLER, M.; SALERNO, A.; DIAS, M.; REITERER, A. & BRAUNEGG, G. "Modern biotechnological polymer synthesis: a review". *Food Technol. Biotechnol.*, **48** (3): 255, 2010.

- KOLLER, M.; GASSER, I.; SCHMID, F. & BERG, G. "Linking ecology with economy: insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms". *Eng. Life Sci.*, **11** (3): 222, 2011.
- KOUSHAL, V.; SHARMA, R.; SHARMA, R. & SHARMA, V. "Plastics: issues challenges and remediation". *Int. J. Waste Resour.*, **4** : 1, 2014.
- KUMAR, G.; PANDA, A. K.; SINGH, R. K. "Optimization of process for the production of bio-oil from eucalyptus wood". *J. Fuel Chem. Technol.*, **38** : 162, 2010.
- KUMAR, Y.; SHUKLA, P.; SINGH, P.; PRABHAKARAN, P. P. & TANWAR, V. K. "Bio-plastics: a perfect tool for eco-friendly food packaging: a review". *J. Food Prod. Develop. Packag.*, **1**: 1, 2014.
- KUZMA, M.; CLARCK, B.; EDWARDS, J.; TYLINGO, R.; SAMASZKO, J. & MADAJ, J. "Structure and properties of the exopolysaccharides produced by *Pseudomonas mutabilis* T6 and *P. mutabilis* ATCC 31014". *Carbohydr. Res.*, **348** : 84, 2012.
- LAINE, R. A. "A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields  $1.05 \times 10^{12}$  structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems". *Glycobiology*, **4** (6): 759, 1994.
- LAU, S. K. P.; TANG, B. S. F.; TENG, J. L. L.; CHAN, T. M.; CURREEM, S. O. T.; FAN, R. Y. Y.; NG, R. H. Y.; CHAN, J. F. W.; YUEN, K. Y. & WOO, P. C. Y. "Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of clinically significant bacteria that are difficult to identify in clinical laboratories". *J. Clin. Pathol.*, **67** : 361, 2014.
- LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A. & LANT, P. "The chemo-mechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates". *Prog. Polym. Sci.*, **39** : 397, 2014.
- LE COSTAOUËC, T.; CÉRANTOLA, S.; ROPARTZ, D.; RATISKOL, J.; SINQUIN, C.; COLLIEC-JOUAULT, S. & BOISSET, C. "Structural data on a bacterial exopolysaccharide produced by a deep-sea *Alteromonas macleodii* strain". *Carbohydr. Polym.*, **90** (1): 49, 2012.
- LEE, S. Y.; PARK, S. J.; PARK, J. P.; LEE, Y. & LEE, S. H. "Economic aspects of biopolymer production". *Biopolymers Online*, 10, 2005.
- LEMOINE, J.; CHIRAT, F.; WIERUSZESKI, J.-M.; STRECKER, G.; FAVRE, N. & NEESER, J.-R. "Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12". *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** (9): 3512, 1997.
- LEONARDO, T. E. & MUIRU, G. T. "Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations". *Proc. Biol. Sci.*, **2** : 209, 2003.
- LEROY, P. D.; SABRI, A.; HEUSKIN, S.; THONART, P.; LOGNAY, G.; VERHEGGEN, F. J.; FRANCIS, F.; BROSTAU, Y.; FELTON, G. W. & HAUBRUGE, E. "Microorganisms from aphid honeydew attract and enhance the efficacy of natural enemies". *Nat. Commun.*, **2** : 348, 2011.
- LEY, R. E.; PETERSON, D. A. & GORDON, J. I. "Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine". *Cell*, **124** : 837, 2006.

- LIU, D.; LIAO, N.; YE, X.; HU, Y.; WU, D.; GUO, X.; ZHONG, J.; WU, J. & CHEN, S. "Isolation and structural characterization of a novel antioxidant mannoglucan from a marine bubble snail, *Bullacta exarata* (Philippi)". *Mar. Drugs* **11** : 4464, 2013.
- LOO, C. Y. & SUDESH, K. "Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*". *Int. J. Biol. Macromol.*, **40** (5): 466, 2007.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ROGEL, M. A.; ORMENO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, J. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. "*Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov.". *Syst. Appl. Microbiol.*, **33** : 322, 2010.
- LOEWUS, F. A. & TUNNER, W. *Plant Carbohydrates I: Intracellular Carbohydrates*. Springer, New York, 2012
- LU, J.; TAPPEL, R. C. & NOMURA, C. T. "Mini-review: biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates)". *J. Macromol. Sci. - Pol. Rev.*, **49** : 226, 2009.
- LU, Y. & HARRINGTON, P. B. "Classification of bacteria by simultaneous methylation-solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis of fatty acid methyl esters." *Anal. Bioanal. Chem.*, **397** (7): 2959, 2010.
- LUCKACHAN, G. E. & PILLAI, C. K. S. "Biodegradable polymers- a review on recent trends and emerging perspectives". *J. Polym. Environ.*, **19** : 637, 2011.
- LUIZ, A. L. *Investigação do potencial antimicrobiano de plantas do cerrado no controle de micro-organismos simbiótico de insetos praga*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2014. Dissertação de Mestrado, 121 p.
- MACDONALD, S. J.; THOMAS, G. H. & DOUGLAS, A. E. "Genetic and metabolic determinants of nutritional phenotype in an insect-bacterial symbiosis". *Mol. Ecol.*, **20** : 2073, 2011.
- MADISON, L. L. & HUISMAN, G. W. "Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic". *Microbiol. Mol. Biol. R.* **63** (1): 21, 1999.
- MALANG, S. K.; MAINA, N. H.; SCHWAB, C.; TENKANEN, M. & LACROIX, C. "Characterization of exopolysaccharide and rpy capsular polysaccharide formation by *Weissella*". *Food Microbiol.*, **46** : 418, 2015.
- MARQUES, F. A. *Investigação do potencial antimicrobiano de *Casearia sylvestris* sobre microrganismo endossimbionte de *Diabrotica speciosa**. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2013. Dissertação de Mestrado, 158 p.
- MATIAS, F. & RODRIGUES, M. F. A. "New PHA products using unrelated carbon sources". *Braz. J. Microbiol.*, **42** : 1354, 2011.
- MCINTOSH M.; STONE, B. A. & STANISICH, V. A. Curdlan and other bacterial (1→3)-β-D-glucans. *Appl Microbiol Biotechnol* **68** (2): 163, 2005.
- MERDRIGNAC, I. & ESPINAT, D. "Physicochemical characterization of petroleum fractions: the state of the art". *Oil Gas Sci. Technol.*, **62** (1): 7, 2007.

- MINCH, M. J. "Orientational dependence of vicinal proton-proton NMR coupling constants: The Karplus relationship". *Concept Magnetic Res.*, **6** (1): 41, 1994.
- MITTENDORF, V.; ROBERTSON, E. J.; LEECH, R. M.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. & POIRIER, Y. "Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95** : 13397, 1998.
- MONTLLOR, C. B.; MAXMEN, A. & PURCELL, A. H. "Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphid *Acyrtosiphon pisum* under heat stress". *Ecol. Entomol*, **27** : 189, 2002.
- MORAN, N. A.; PLAGUE, G. R.; SANDSTRÖM, J. P. & WILCOX, J. L. "A genomic perspective on nutrient provisioning by bacterial symbionts of insects". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100 suppl. 2** : 14543, 2003.
- MÜLHAUPT, R. "Green polymer chemistry and bio-based plastics: dreams and reality". *Macromol. Chem. Phys.***214** : 159, 2013.
- MURPHY D.; BISHOP, C. T. & ADAMS, G. A. "A mannan produced by *Bacillus polymyxa*". *Can. J. Biochem. Physiol.*, **34** (6): 1271, 1956.
- MURRAY, P. R. "What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry. a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology". *J. Mol. Diagn.*, **14** : 419, 2012.
- NAHEED, N.; JAMIL, N.; HASNAIN, S. & ABBAS, G. "Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Enterobacter sp.* SEL2 and *Enterobacteriaceae bacterium sp.* PFW1 using sugar cane molasses as media." *Afr. J. Biotechnol.*, **11** (16): 3321, 2012.
- NAIR, A. V.; GUMMADI, S. N. & DOBLE, M. "Process optimization and kinetic modelling of cyclic (1  $\rightarrow$  3, 1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -glucans production from *Bradyrhizobium japonicum* MTCC120". *J. Biotechnol.* **226** : 35, 2016.
- NAKA, K. "Monomers, oligomers, polymers, and macromolecules (overview). in: *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*". Kobayashi, S. & Müllen, K. (Eds.) Heidelberg, Springer Verlag, 2015.
- NERY, T.B.R.; BRANDÃO, L.V.; ESPERIDIÃO, M.C.A. & DRUZIAN, J.I. "Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade". *Quim. Nova*, **31** (8): 1937, 2008.
- OBERBECKMANN, S.; WICHELS, A.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M.; RAFFELBERG, S. & GERDTS G. "A polyphasic approach for the differentiation of environmental *Vibrio* isolates from temperate waters". *FEMS Microbiol. Ecol.*, **75** : 145, 2011.
- OECD. "Policies for Bioplastics in the Context of a Bioeconomy", OECD Science, Technology and Industry Policy Papers, No. 10, OECD Publishing, Paris, 2013. DOI: 10.1787/5k3xpf9rrw6d-en
- OKSHEVSKY, M. & MEYER, R. L. "The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms." *Critical Rev. Microbiol.* **41** (3): 341, 2015.
- OLIVER, K. M.; MORAN, N. A. & HUNTER, M. S. "Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** : 12795, 2005.

- ÖNER, E. T. "Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass". IN: Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries Fang, Z. (Ed.), Berlin, Springer Verlag, 2013.
- OPELT, K. & BERG, G. "Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the baltic sea". Appl. Environ. Microbiol., **70** (11): 6569, 2004.
- PAINTER, P. C. & COLEMAN, M. M. "Essentials of polymer science and engineering". Lancaster, Destech Publications Inc., 2009. p. 21.
- PANG, J.; ZHENG, M.; SUN, R.; WANG, A.; WANG, X. & ZHANG, Z. "Synthesis of ethylene glycol and terephthalic acid from biomass for producing PET". Green Chem., **18** : 342, 2016.
- PARADIS, S.; BOISSINOT, M.; PAQUETTE, N.; BÉLANGER, S. D.; MARTEL, E. A.; BOUDREAU, D. K.; PICARD, F. J.; OUELETTE, M.; ROY, P. H. & BERGERON, M. G. "Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase b-subunit". Int. J. Syst. Evol. Micr., **55** : 2013, 2005.
- PASTEUR, L. "On the viscous fermentation and the butyrous fermentation". Bull. Soc. Chim. Paris, **11** : 30, 1861.
- PERLATTI, B.; ZUIN, V. G. & FORIM, M. R. "Green chemistry, sustainable agriculture and processing systems: a Brazilian overview." Chem. Biol. Technol. Agr., **1** : 5, 2014.
- PERNICE, M.; SIMPSON, S. J. & PONTON, F. "Towards an integrated understanding of gut microbiota using insects as model systems". J. Insect. Physiol., **69** : 12, 2014.
- PETTOLINO, F. A.; WALSH, C.; FINCHER, G. B. & BACIC, A. "Determining the polysaccharide composition of plant cell walls". Nat. Protoc., **7** (9):1590, 2012.
- PHILIP, S.; KESHAVARZ, T. & ROY, I. "Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications". J. Chem. Technol. Biotechnol., **82** : 233, 2007.
- PHILP, J. C.; BARTSEV, A.; RITCHIE, R. J.; BAUCHER, M-A. & GUY, K. "Bioplastics science from a policy vantage point". New Biotechnol., **30** (6): 632, 2013.
- PlasticsEurope. 2015. Plastics - the Facts 2015.  
<http://www.plasticseurope.org/Document/plastics---the-facts-2015.aspx>  
 (Acessado 18/01/16)
- PRISCHMANN, D. A.; LEHMAN, R. M. & CHRISTIE, A. A. "Characterization of bacteria isolated from maize roots: Emphasis on *Serratia* and infestation with corn rootworms (Chrysomelidae: *Diabrotica*)". Appl. Soil. Ecol., **40** : 417, 2008.
- RADCHENKOVA, N.; TOMOVA, A. & KAMBOUROVA, M. "Biosynthesis of an exopolysaccharide produced by *Brevibacillus thermoruber* 438". Biotechnol. Biotec. Eq., **25** (4): 77, 2011.
- RAMADHAR, T. R.; BEEMELMANNS, C.; CURRIE, C. R. & CLARDY, J. "Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery". J. Antibiot., **4** (67): 53, 2014.

- REHM, B. H. A. "Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications". *Nat. Rev. Microbiol.*, **8** : 578, 2010.
- REN, H.; QIAO, F.; SHI, Y.; KNUTZEN, M. W.; WANG, Z.; DU, H. & ZHANG, H. "PlantBottle™ Packaging program is continuing its journey to pursue bio-mono-ethylene glycol using agricultural waste". *J. Renew. Sust. Energ.* **7** : 041510, 2015.
- RINKER K. D. & KELLY, R. M. "Growth physiology of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: development of a sulfur-free defined medium, characterization of an exopolysaccharide, and evidence of biofilm formation". *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (12): 4478, 1996.
- ROBERT, C. A. M.; FRANK, D. L.; LEACH, K. A.; TURLINGS, T. C. J.; HIBBARD, B. E. & ERB, M. "Direct and indirect plant defenses are not suppressed by endosymbionts of a specialist root herbivore". *J. Chem. Ecol.*, **39** : 507, 2013.
- ROCA, C.; ALVES, V. D.; FREITAS, F. & REIS, M. A. M. "Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications". *Front. Microbiol.* **6** : 288, 2015.
- ROCHMAN, C. M.; HOH, E.; HENTSCHEL, B. T. & KAYE, S. "Long term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: implications for plastic marine debris". *Environ. Sci. Technol.*, **47** : 1646, 2013.
- RODDY, D. J. "Biomass in a petrochemical world." *Interface Focus* **3** : 20120038, 2013.
- ROSSELLÓ-MÓRA, R. "Towards a taxonomy of bacteria and archaea based on interactive and cumulative data repositories". *Environ. Microbiol.*, **14** (2): 318, 2012.
- RUBY, E.; HENDERSON, B. & MCFALL-NGAI, M. "We get by with a little help from our (little) friends". *Science*, **303** : 1305, 2004.
- RUIZ-MATUTE, A. I.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, S.; SANZ, ML. & MARTÍNEZ-CASTRO, I. "Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses". *J. Chrom. B*, **879** : 1226, 2011.
- RYU, J. H.; KIM, S. H.; LEE, H. Y.; BAI, J. Y.; NAM, Y. D.; BAE, J. W.; LEE, D. G.; SHIN, S. C.; HA, E. M. & LEE, W. J. "Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*". *Science*, **319** : 777, 2008.
- SABREE, Z. L.; HUANG, C. Y.; ARAKAWA, G.; TOKUDA, G.; LO, N.; WATANABE, H. & MORAN, N. A. "Genome shrinkage and loss of nutrient-providing potential in the obligate symbiont of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*". *Appl. Environ. Microbiol.* **78** (1): 204, 2012.
- SAMB-BA, B.; MAZENOT, C.; GASSAMA-SOW, A.; DUBOURG, G.; RICHET, H.; HUGON, P.; LAGIER, J. C.; RAOULT, D. & FENOLL F. "MALDI-TOF identification of the human gut microbiome in people with and without diarrhea in Senegal". *PLoS ONE*, **9** (5): e87419, 2014.
- SAITO, H.; YOKOI, M. & YOSHIOKA, Y. "Effect of hydration on conformational change or stabilization of (1 → 3)- $\beta$ -D-glucans of various chain lengths in the solid state as studied by high-resolution solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy," *Macromolecules*, **22**(10): 3892, 1989.

- SASANUMA, Y. & KATSUMATA, S. "Elucidation of conformational characteristics and configurational properties of poly((R)-3-hydroxybutyrate) by ab initio statistical mechanics". *Polym. J.*, **45** : 727, 2013.
- SCARBOROUGH, C. L.; FERRARI, J. & GODFRAY, H. C. "Aphid protected from pathogen by endosymbiont". *Science*, **310** : 1781, 2005.
- SCHALK, J. M.; PETERSON, J. K. & HAMALLE, R. J. "The abdominal flora of the banded cucumber beetle (*Diabrotica balteata* LeConte)". *J. Agric. Entomol.*, **4** (4): 333, 1987.
- SCHOLSS, P. D. & HANDELSMAN, J. "Status of the microbial census". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68** (4): 686, 2004.
- SEIPKE, R. F.; KALTENPOTH, M. & HUTCHINGS, M. I. "*Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme?" *FEMS Microbiol. Rev.*, **36**: 862, 2012.
- SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA, B.; Fournier, P. E.; ROLAIN, J. M. & RAOULT, D. "Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry". *Clin. Infect. Dis.*, **49** : 543, 2009.
- SENG, P.; ROLAIN, J. M.; FOURNIER, P. E.; LA SCOLA, B.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. "MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology". *Future Microbiol.*, **5** (11): 1733, 2010.
- SENNI, K.; PEREIRA, J.; GUENICHE, F.; DELBARRE-LADRAT, C.; SINQUIN, C.; RATISKOL, J.; GODEAU, G.; FISCHER, A.-M.; HELLEY, D. & COLLIEC-JOUAULT, S. "Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering". *Mar. Drugs*, **9** : 1664, 2011.
- SERRATO, R.V. Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas. Curitiba, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – Universidade Federal do Paraná, 2008. Tese de Doutorado, 143p.
- SHALIN, T.; SINDHU, R.; BINOD, P.; SOCCOL, C. R. & PANDEY, A. "Mixed cultures fermentation for the production of poly-  $\beta$ - hydroxybutyrate". *Braz. Arch. Biol. Techn.*, **57** (5): 644, 2014.
- SHARON, G.; SEGAL, D.; RINGO, J. M.; HEFETZ, A.; ZILBER-ROSENBERG, I. & ROSENBERG, E. "Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** : 20051, 2010.
- SHARON, G.; SEGAL, D.; ZILBER-ROSENBERG, I. & ROSENBERG, E. "Symbiotic bacteria are responsible for diet-induced mating preference in *Drosophila melanogaster*, providing support for the hologenome concept of evolution". *Gut Microbes*, **2** : 190, 2011.
- SHELDON, R. A. "Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art". *Green Chem.*, **16** : 950, 2014.
- SIDDIQUI, J. & PANDEY, G. A. "Review of plastic waste management strategies". *Int. Res. J. Environ. Sci.*, **2** (12): 84, 2013.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. & KIEMLE, D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7<sup>a</sup> ed. Hoboken, John Wiley & Sons, 2005. p.164.

- SINDHU, R.; AMMU, B.; BINOD, P.; DEEPTHI, S. K.; RAMACHANDRAN, K. B.; SOCCOL, C. R. & PANDEY, A. "Production and Characterization of poly-3 hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers". *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **54**(4): 783, 2011.
- SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K. & VIRDI, J. S. "MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis". *Front. Microbiol.* **6** : 791, 2015.
- SOLAIMAN, D. K.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A. & MARMER, W. N. "Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly (hydroxyalkanoates)". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71** (6): 783, 2006.
- SPIEKERMANN, P.; BERND, H. A.; REHM, R. K.; BAUMEISTER, D. & STEINBUCHER, A. "A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds". *Arch. Microbiol.*, **171** : 73, 1999.
- STANINSKA, J.; SZCZEPANIAK, Z.; STANINSKI, K.; CZARNY, J.; PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; NOWAK, J.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, Ł. & CYPLIK, P. "High voltage electrochemiluminescence (ECL) as a new method for detection of PAH During Screening for PAH-degrading microbial consortia". *Water Air Soil Poll.*, **226** : 270, 2015.
- STENUTZ, R. A Practical Guide to the Methylation Analysis of Carbohydrates. <http://www.stenutz.eu/yellow/>. Acesso em 04/06/2016.
- SUDESH, K.; ABE, H. & DOI, Y. "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters". *Progr. Polym. Sci.*, **25** : 1503, 2000.
- SUTHERLAND, I. W. "Bacterial exopolysaccharides". *Adv. Microbial Phys.*, **8** : 143–213, 1972.
- SUTHERLAND, I. W. "Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework". *Microbiology*, **147** : 3–9, 2001.
- SUTHERLAND, I. W. "Polysaccharides from microorganisms, plants and animals". IN: *Biopolymers Vol. 5, Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes*. VANDAMME, E. J. (Ed.). Weinheim, Wiley, 2002, pp.1–19.
- SYVANEN, M. "Evolutionary implications of horizontal gene transfer". *Annu. Rev. Genet.*, **46** : 341, 2012.
- TAMBOLI, D. P.; KAGALKAR, A. N.; JADHAV, M. U.; JADHAV, J. P. & GOVINDWAR, S. P. "Production of polyhydroxyhexadecanoic acid by using waste biomass of *Sphingobacterium sp.* ATM generated after degradation of textile dye Direct Red 5B". *Bioresource Technol.*, **101** (7): 2421, 2010.
- TAN G-Y. T.; CHEN, C-L.; LI, L.; GE, L.; WANG, L.; RAZAAD, I. M. N.; LI, Y.; ZHAO, L.; MO, Y. & WANG, J.-Y. "Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review". *Polymers*, **6** : 706, 2014.
- TANAKA, M.; SATO, K.; KITAKAMI, E.; KOBAYASHI, S.; HOSHIBA, T. & FUKUSHIMA, K. "Design of biocompatible and biodegradable polymers based on intermediate water concept". *Polym. J.*, **47** : 114, 2015.

- TANG, X.; FREITAK, D.; VOGEL, H.; PING, L.; SHAO, Y.; CORDERO, E. A.; ANDERSEN, G.; WESTERMANN, M.; HECKEL, D. G. & BOLAND, W. "Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous lepidopteran larvae". PLoS ONE, **7** (7): e36978, 2012.
- TOKIWA Y.; CALABIA, B. P.; UGWU, C. U. & AIBA, S. "Biodegradability of Plastics". Int. J. Mol. Sci., **10** (9): 3722, 2009.
- TORRES-RODRÍGUEZ, I.; RODRÍGUEZ-ALEGRÍA, M. E.; MIRANDA-MOLINA, A.; GILES-GÓMEZ, M.; MORALES, R. C.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; BOLÍVAR, F. & ESCALANTE, A. "Screening and characterization of extracelular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchi* isolated from traditional fermented pulque beverage". Springer Plus, **3** : 583, 2014.
- TRAN, M. T. & MARRONE, P. G. "Bacteria isolated from southern corn rootworms, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae), reared on artificial diet and corn". Environ. Entomol., **17** (5): 832, 1988.
- TRUU, J.; TALPSEP, E.; HEINARU, E.; STOTTMEISTER, U.; WAND, H. & HEINARU, A. "Comparison of API 20NE and Biolog GN identification systems assessed by techniques of multivariate analyses". J. Microbiol. Meth., **36** (3):193, 1999.
- TSUCHIDA, T.; KOGA, R. & FUKATSU, T. "Host plant specialization governed by facultative symbiont". Science, **303** : 1989, 2004.
- VAN CASTEREN, W. H.; EIMERMANN, M.; VAN DEN BROEK, L. A.; VINCKEN, J. P.; SCHOLS, H. A. & VORAGEN, A. G. "Purification and characterisation of a beta-galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris B39 and B891. Carbohydr. Res., **329** (1): 75, 2000.
- VERLINDEN, R. A.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAMS, C. D. & RADECKA I. "Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates". J. Appl. Microbiol., **102** (6): 1437, 2007.
- VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K. -H.; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO, M. & SCHUÉ, F. "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)". \*Pure Appl. Chem., **84** (2): 377, 2012.
- VIANA, P. A. (2010) "Manejo de *Diabrotica speciosa* na cultura do milho". Embrapa Circular Técnica 141. [http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2010/circular/Circ\\_141.pdf](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2010/circular/Circ_141.pdf). Acessado em 02/02/2016
- VILAPLANA, F.; STRÖMBERG, E. & KARLSSON, S. "Environmental and resource aspects of sustainable biocomposites". Polym. Degrad. Stabil., **95** : 2147, 2010.
- VROMAN, I. & TIGHZERT, L. "Biodegradable polymers". Materials, **2** : 307, 2009.
- VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J.M.; YAO, Y.; FISCHER, E.R.; DELEO, F.R. & OTTO, M.A "Crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence". J. Biol. Chem., **279** (52): 54881, 2004.
- WAGNER, M.; ENGWALL, M. & HOLLERT, H. Editorial: (Micro)Plastics and the environment. Environ. Sci. Europe, **26** : 16, 2014a

- WAGNER, M.; SCHERER, C.; ALVAREZ-MUÑOZ, C.; BRENNHOLT, N.; BOURRAIN, X.; BUCHINGER, S.; FRIES, E.; GROBOIS, C.; KLASMEIER, J.; MARTI, T.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; URBATZKA, R.; VETHAAK, A. D.; WINTHER-NIELSEN, M. & REIFFERSCHIED, G. "Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know". *Environ. Sci. Europe*, **26** :12, 2014b.
- WALSH, G. C.; SACCO, J. & MATTIOLI, F. "Voltinism of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera:Chrysomelidae) in Argentina: latitudinal clines and implications for damage anticipation". *Pest Manag. Sci.*, **69** : 1272, 2013.
- WANG, J. & SOMASUNDARAN, P. "Study of galactomannose interaction with solids using AFM, IR and allied techniques." *J. Colloid Interf. Sci.* **309** : 373, 2007.
- WEI, Y.-H.; CHEN, W.-C.; HUANG, C.-K.; WU, H.-S.; SUN, Y.-M.; LO, C.-W. & JANARTHANAN, O.-M. "Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains". *Int. J. Mol. Sci.*, **12** : 252, 2011.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A. & LANE, D. J. "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". *J. Bacteriol.*, **173** : 697, 1991.
- WEISS, B. & AKSOY, S. "Microbiome influences on insect host vector competence". *Trends Parasitol.*, **27** (11): 515, 2011.
- WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H. -J.; TRUJILLO, M. E.; LUDWIG, W.; SUZUKI, K. -I.. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 5, parts A and B, Nova York, Springer-Verlag, 2012.
- WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H.-J.; TRUJILLO, M.E.; LUDWIG, W. & SUZUKI, K.-I. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 5, parts A and B, Nova York, Springer-Verlag, 2012.
- WHITMAN, W. B.; WOYKE, T.; HANS-PETER KLENK, H. P.; ZHOU, Y.; LILBURN, T. G.; BECK, B. J.; DE VOS, P.; VANDAMME, P.; EISEN, J. A.; GARRITY, G.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES N. C. "Genomic encyclopedia of bacterial and archaeal type strains, phase iii: the genomes of soil and plant-associated and newly described type strains". *Stand Genomic Sci.*, **10** : 26 ,2015.
- WORLDWATCH INSTITUTE, 2015. Global Plastic Production Rises, Recycling Lags [http://vitalsigns.worldwatch.org/sites/default/files/vital\\_signs\\_trend\\_plastic\\_full\\_pdf.pdf](http://vitalsigns.worldwatch.org/sites/default/files/vital_signs_trend_plastic_full_pdf.pdf). Acessado em 11/05/2016
- WRIGLEY, E. A. "The supply of raw materials in the industrial revolution." *Econ. Hist. Rev.*, **15** : 1, 1962.
- XIA, X.; ZHENG, D.; ZHONG, H. QIN, B.; GURR, G. M.; VASSEUR, L.; LIN, H.; BAI, J.; HE, W. & YOU, M. "DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance". *PLoS ONE*, **8**(7): e68852, 2013.
- YANG, Y.; YE, L.; ZHANG, J.; LIU, Y. & TANG, Q. "Structural analysis of a bioactive polysaccharide, PISP1, from the medicinal mushroom *Phellinus igniarius*". *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73** (1),134, 2009.
- YILDIZ, S. Y. & ONER, E. T. "Mannan as a promising bioactive material for drug nanocarrier systems". IN: *Nanotechnology and Nanomaterials » "Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. Sezer, A. D. (Ed.). Rijeka, InTech, 2014.

- YU, L.; XU, S.; DENG, C.; LI, H.; YANG, Q.; XU, Z. & CHEN, J. "Preparation and partial structural characterization of the exopolysaccharide from *Bacillus mucilaginosus* SM-01." *Carbohydr. Polym.* **146** : 217, 2016.
- ZAKARIA, M. R.; ABD-AZIZ, S.; ARIFFIN, H.; RAHMAN, N. A.; YEE, P. L & HASSAN, M. A. "*Comamonas* sp. EB172 isolated from digester treating palm oil mill effluent as potential polyhydroxyalkanoate (PHA) producer". *Afr. J. Biotechnol.* **7** (22): 4118, 2008.
- ZETTLER, E. R.; MINCER, T. J. & AMARAL-ZETTLER, L. A. "Life in the "Plastisphere": microbial communities on plastic marine debris". *Environ. Sci. Technol.*, **47** : 7137, 2013.
- ZHANG, X. B.; LIN, C. C. & ZHANG, H. T. "Recent advances in curdlan biosynthesis, biotechnological production, and applications". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93** : 525, 2012.
- ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; & VIDAVER A. K. "Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants". *Appl. Environ. Microb.*, **68** (5): 2198, 2002.

## 9 - Apêndice

Apêndice 1. Resumo dos resultados obtidos com o teste de Vermelho de Nilo para avaliação qualitativa da produção de PHA pelos isolados obtidos

Número	Código	Identidade	Fluorescência
1	DsF.N015	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	++
2	DsA.N002	<i>Acinetobacter junii</i>	++
3	DsA.N036	<i>Acinetobacter junii</i>	++
4	DsA.N037	<i>Acinetobacter junii</i>	++
5	DsA.N047	<i>Acinetobacter junii</i>	++
6	DsA.N048	<i>Acinetobacter junii</i>	++
7	DsA.N050	<i>Acinetobacter junii</i>	++
8	DsA.N051	<i>Acinetobacter junii</i>	++
9	DsA.N006	<i>Acinetobacter pittii</i>	++
10	DsA.N024	<i>Acinetobacter pittii</i>	++
11	DsA.N033	<i>Acinetobacter pittii</i>	++
12	DsA.N001	<i>Acinetobacter baylyi</i>	++
13	DsF.N013	<i>Burkholderia gladioli</i>	++
14	DsA.N049	<i>Delftia acidovorans</i>	++
15	DsF.N002	<i>Empedobacter brevis</i>	-
16	DsF.N012	<i>Enterobacter asburiae</i>	+
17	DsF.N018	<i>Enterobacter asburiae</i>	+
18	DsA.N011	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
19	DsA.N026	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
20	DsA.N031	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
21	DsA.N032	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
22	DsA.N035	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
23	DsA.N038	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
24	DsA.N039	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
25	DsA.N044	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
26	DsA.N045	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
27	DsF.N004	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
28	DsF.N007	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
29	DsF.N010	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
30	DsF.N011	<i>Enterobacter cloacae</i>	+
31	DsA.N046	<i>Klebsiella oxytoca</i>	++
32	DsF.N019	<i>Kluyvera intermedia</i>	+
33	DsA.N014	<b>Not reliable identification</b>	-
34	DsF.N003	<b>Not reliable identification</b>	+
35	DsF.N008	<b>Not reliable identification</b>	+
36	DsA.N042	<b>Not reliable identification</b>	++
37	DsA.N018	<i>Ochrobactrum galinifaciens</i>	-
38	DsA.N029	<i>Ochrobactrum griggonense</i>	-
39	DsA.N019	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	-
40	DsA.N010	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	+
41	DsF.N005	<i>Pseudomonas monteilii</i>	+

<b>Número</b>	<b>Código</b>	<b>Identidade</b>	<b>Fluorescência</b>
42	DsF.N006	<i>Pseudomonas monteilii</i>	+
43	DsF.N014	<i>Pseudomonas monteilii</i>	+
44	DsF.N017	<i>Pseudomonas monteilii</i>	+
45	DsA.N008	<i>Pseudomonas mosselii</i>	++
46	DsA.N009	<i>Pseudomonas mosselii</i>	++
47	DsA.N021	<i>Pseudomonas mosselii</i>	++
48	DsA.N022	<i>Pseudomonas mosselii</i>	++
49	DsA.N023	<i>Pseudomonas mosselii</i>	++
50	DsF.N001	<i>Pseudomonas putida</i>	++
51	DsA.N052	<i>Pseudomonas</i> sp.	+
52	DsA.N053	<i>Pseudomonas</i> sp.	+
53	DsA.N043	<i>Rhizobium radiobacter</i>	+
54	DsA.N005	<i>Serratia marcescens</i>	++
55	DsF.N020	<i>Serratia marcescens</i>	++
56	DsA.N034	<i>Serratia marcescens</i>	+
57	DsA.N003	<i>Serratia marcescens</i>	++
58	DsA.N004	<i>Serratia marcescens</i>	++
59	DsA.N012	<i>Serratia marcescens</i>	++
60	DsA.N013	<i>Serratia marcescens</i>	++
61	DsF.N009	<i>Serratia marcescens</i>	++
62	DsA.N025	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	+
63	DsA.N007	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
64	DsA.N028	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
65	DsA.N041	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
66	DsF.N016	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
67	DsA.N017	<i>Streptomyces badius</i>	-
68	DsA.N027	<i>Streptomyces badius</i>	-
69	DsA.N040	<i>Streptomyces badius</i>	-
70	DsA.N015	<i>Streptomyces griseus</i>	-
71	DsA.N016	<i>Streptomyces griseus</i>	-
72	DsA.N020	<i>Streptomyces griseus</i>	-
73	DsA.N030	<i>Streptomyces griseus</i>	-

Apêndice 2. Espectros de FTIR para os EPS obtidos neste trabalho. A) DsF.N003 (*Luteibacter* sp.); B) DsF.N008 (*Acidovorax* sp.); C) DsF.N013 (*Burkholderia* sp.); D) DsA.N042 (*Aurantimonas* sp.); E) DsA.N053 (*Pseudomonas* sp.)

