

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

EDUARDO PEREIRA DE SOUZA

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICRORGANISMOS INTestinaIS DO
COLEÓPTERO *Sphenophorus levis* E SUAS ENZIMAS
COM POTENCIAL PARA BIODEGRADAÇÃO DE
POLIESTIRENO**

SÃO CARLOS - SP

2026

EDUARDO PEREIRA DE SOUZA

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS INTestinaIS DO
COLEÓPTERO *Sphenophorus levis* E SUAS ENZIMAS COM POTENCIAL PARA
BIODEGRADAÇÃO DE POLIESTIRENO

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética
Evolutiva e Biologia Molecular do Centro
de Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal de São Carlos para
obtenção do título de Doutor em Ciências,
Área de concentração: Bioquímica e
Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique da
Silva

São Carlos - SP

2026

Souza, Eduardo Pereira de

Prospecção e caracterização de microrganismos intestinais do coleóptero *Sphenophorus levis* e suas enzimas com potencial para biodegradação de poliestireno / Eduardo Pereira de Souza -- 2026. 119f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Flávio Henrique da Silva

Banca Examinadora: Flávio Henrique da Silva, Andrea Soares da Costa Fuentes, Adilson José da Silva, Milene Ferro, Daniel Scherer de Moura

Bibliografia

1. Biodegradação de plásticos. 2. Microbiota intestinal de insetos. 3. Poliestireno. I. Souza, Eduardo Pereira de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Eduardo Pereira de Souza, realizada em 17/07/2026.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes (UFSCar)

Prof. Dr. Adilson José da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Milene Ferro (UNESP)

Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura (USP)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Pedro e Erika, e ao meu irmão, Pedro Gustavo, por todo o apoio, a confiança e o incentivo. Aos meus avós, por todo o carinho e auxílio, no decorrer da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, pela disposição em ajudar, disponibilizar as melhores oportunidades e esclarecer minhas dúvidas. Agradeço por acreditar no meu potencial, pela confiança e pela paciência.

À Professora Dra. Silvia Helena Prado Bettini, pela disponibilidade para fornecer estrutura e know-how para que pudéssemos realizar e interpretar análises de polímeros. Ao Marcos Vinícius, seu aluno, que sempre esteve à disposição para dar suporte a esse trabalho.

A Profa. Dra. Milene Ferro, pela ajuda na análise dos dados de sequenciamento do genoma.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio de Oliveira pelo auxílio na realização dos ensaios enzimáticos.

A Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes pelo apoio e orientação no Programa de Estágio Supervisionado de Capacitação Docente.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular. À Thais, por sua amizade, por estar a todo momento ao meu lado, para conversas, ajuda e cafés da tarde. Ao Henrique, que me acompanhou durante a realização desse trabalho, sendo um grande amigo e um braço direito no laboratório. À Anne pela parceria e ajuda nas diversas etapas desse trabalho. Ao Yan, por ter processado os dados gerados pelo sequenciamento *metabarcoding*. À Amanda, ao Jesus e aos demais colegas de laboratório pelas conversas, risadas e auxílios diversos.

À Sâmara e à Karina do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pelas conversas, desabafos e conselhos.

Ao Luiz Gustavo por todo o apoio e companhia nas horas boas e difíceis.

Aos amigos e familiares de Botucatu, que, apesar da distância, sempre me incentivaram e me estimularam.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) pelo suporte e pela infraestrutura oferecidos para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de estudo de doutorado (FAPESP – processo nº 2022/04312-6) e pelo Auxílio Regular (FAPESP – processo nº 2023/11974-8).

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob o Código de Financiamento 001.

E a todos que contribuíram para essa pesquisa, direta ou indiretamente.

SÚMULA CURRICULAR

Doutorado em ciências, área de concentração: bioquímica e biologia molecular (em andamento). Programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos. Tese: “Prospecção e caracterização de microrganismos intestinais do coleóptero *Sphenophorus levis* com potencial para biodegradação de poliestireno”. Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva. Projeto FAPESP nº 2022/04312-6.

Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (2022). Programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos. Dissertação: “Cistatinas de Maqui: Produção Recombinante e Inibição de Cisteíno Peptidases”. Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva.

Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia (2019) pela Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, em Botucatu. Trabalho de Conclusão de Curso: “Efeito do fitorregulador BAP no estabelecimento e cultivo *in vitro* de *Enterolobium contortisiliquum*”

Lista de Publicações:

1. **SOUZA, E. P.**; SEBESTYEN-FRANÇA, H.; BASAGLIA, M. V.; WATSON, A.; FERRO, M.; BETTINI, S. H. P.; HENRIQUE-SILVA, F. *Paenibacillus lautus* isolated from the *Sphenophorus levis* gut causes structural and physicochemical changes on polystyrene surface. **Frontiers in Microbiology**, v. 17, p. 1776542, 2026.
2. CARDENAS, G. S.*; **SOUZA, E. P.***; MATUHARA, Y. E.; SANTOS-JÚNIOR, C. D.; FERNANDA-CARLOS, T.; FERRO, M.; BETTINI, S. H. P.; HENRIQUE-SILVA, F. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) as a reservoir of potential polystyrene-degrading fungi. **BMC Microbiology**, v. 26, p. 570, 2026. *Os autores compartilham a primeira autoria.
3. SILVA, L. R.; **SOUZA, E. P.**; MENDES, B. R.; AMANCIO, B. H.; HENRIQUE-SILVA, F.; FARIA, G. Maqui berry cystatin inhibits cathepsin K activity and stimulates osteogenic differentiation of human dental pulp cells. **Journal of Applied Oral Science**, v. 34, p. 1, 2026.
4. CASSIANO, A. F. B.; **SOUZA, E. P.**; COAGUILA-LLERENA, H.; HENRIQUE-SILVA, F.; FARIA, G. Effect of sugarcane cystatin CaneCPI-5 on osteogenic

- differentiation of human dental pulp cells. *Brazilian Dental Journal*, v. 36, p. e23-6174, 2025.
5. PELÁ, V. T.; SILVA, G. C.; BRITO, M. M.; TAIRA, E. A.; FERRARI, C. R.; VENTURA, T. M. O.; THOMASSIAN, L. T. G.; HENRIQUE-SILVA, F.; **SOUZA, E. P.**; CARVALHO, T. S.; FUENTES, A. S. C.; FAN, K.; MARCHETTO, R.; LUSSI, A.; BUZALAF, M. A. R. A new frontier in oral care with proteins and peptide infused in orally disintegrating film to prevent early dental erosion in vivo. **Journal of Dentistry**, v. 163, p. 106129, 2025.
 6. PELÁ, V. T.; SILVA, T. L.; TAIRA, E. A.; SANT'ANA, G. A.; SAKAE, L. O.; LEVY, F. M.; FORLIN, T. S.; **SOUZA, E. P.**; VENTURA, T. M. O.; CARVALHO, T. S.; LUSSI, A.; BUZALAF, M. A. R. Synergistic effect of Maquiberry cystatin, sodium fluoride and stannous chloride for the prevention of initial dental erosion in vitro. **Journal of Applied Oral Science**, v. 33, p. 1, 2025.
 7. BURGOS, B. R.; MORALES, F.; MORALES-VERA, R.; VALDÉS, C.; FAUNDEZ, J. Y.; **SOUZA, E. P.**; HENRIQUE-SILVA, F.; ARENCIBIA, A. D. Microbiological and physicochemical approach in the feeding of superworm (*Zophobas morio*) with petroleum-derived polymer diets. **Microorganisms**, v. 12, p. 2118, 2024.
 8. PELÁ, V. T.; BRITO, M. M.; SILVA, G. C.; TAIRA, E. A.; FERRARI, C. R.; VENTURA, T. M. O.; THOMASSIAN, L. T. G.; HENRIQUE-SILVA, F.; **SOUZA, E. P.**; CARLOS, T. F.; CARVALHO, T. S.; FUENTES, A. S. C.; FAN, K.; MARCHETTO, R.; LUSSI, A.; BUZALAF, M. A. R. Designing mouthwash formulations with innovative molecular components to control initial dental erosion in vivo. **Clinical Oral Investigations**, v. 28, p. 640, 2024.
 9. **SOUZA, E. P.**; FERRO, M.; PELÁ, V. T.; FERNANDA-CARLOS, T.; BORGES, C. G. G.; TAIRA, E. A.; VENTURA, T. M. O.; ARENCIBIA, A. D.; BUZALAF, M. A. R.; HENRIQUE-SILVA, F. Maquiberry cystatins: recombinant expression, characterization, and use to protect tooth dentin and enamel. **Biomedicines**, v. 11, p. 1360, 2023.
 10. FERNANDES, C. J. C.; CASSIANO, A. F. B.; HENRIQUE-SILVA, F.; CIRELLI, J. A.; **SOUZA, E. P.**; COAGUILA-LLERENA, H.; ZAMBUZZI, W. F.; FARIA, G. Recombinant sugarcane cystatin CaneCPI-5 promotes osteogenic differentiation. **Tissue and Cell**, v. 83, p. 102157, 2023.
 11. PELÁ, V. T.; BRITO, L.; TAIRA, E. A.; HENRIQUE-SILVA, F.; PIERETTI, J. C.; SEABRA, A. B.; ALMEIDA BALDINI CARDOSO, C.; **SOUZA, E. P.**; GROISMAN,

- S.; RODRIGUES, M. C.; LUSSI, A.; CARVALHO, T. S.; BUZALAF, M. A. R. Preventive effect of chitosan gel containing CaneCPI-5 against enamel erosive wear in situ. **Clinical Oral Investigations**, v. 26, p. 6511–6519, 2022.
12. FREIRE, M. C. L. C.; NOSKE, G. D.; BITENCOURT, N. V.; SANCHES, P. R. S.; SANTOS-FILHO, N. A.; GAWRILJUK, V. O.; **SOUZA, E. P.**; NOGUEIRA, V. H. R.; GODOY, M. O.; NAKAMURA, A. M.; FERNANDES, R. S.; GODOY, A. S.; JULIANO, M. A.; PERES, B. M.; BARBOSA, C. G.; MORAES, C. B.; FREITAS-JUNIOR, L. H. G.; CILLI, E. M.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. *et al.* Non-toxic dimeric peptides derived from the Bothropstoxin-I are potent SARS-CoV-2 and papain-like protease inhibitors. **Molecules**, v. 26, p. 4896, 2021.
13. CRUCIOL, G. C. D.; MOURA, M. F.; RIBEIRO-JUNIOR, M. R.; EGAWA, V. Y.; **SOUZA, E. P.**; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. First report of groundnut ringspot virus in scarlet eggplant in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 1, p. 1–1, 2018.

RESUMO

O poliestireno (PS) é um polímero de propriedades físicas e químicas versáteis e de baixo custo de produção, utilizado para diversos fins. A sua demanda crescente, aliada à má gestão de seus resíduos, culmina em acúmulo no meio ambiente, desencadeando problemas sociais e ecossistêmicos. Esta questão se agrava, pois o PS é um polímero recalcitrante devido à sua cadeia principal de carbono-carbono (C–C), o que dificulta sua biodegradação na natureza. Estudos têm investigado estratégias para a biodegradação desse polímero. Verificou-se que larvas de determinados insetos são capazes de utilizar o PS como fonte de carbono, fenômeno correlacionado à sua microbiota intestinal. Por essa razão, a larva de *Sphenophorus levis*, previamente observada ingerindo poliestireno expandido (EPS), foi utilizada para a prospecção de microrganismos e de genes-chave no processo de biodegradação do material. Elas foram submetidas à dieta restrita a EPS, e a diversidade microbiana intestinal foi comparada à de larvas alimentadas com dieta artificial. Observou-se que a diversidade foi reduzida e que a presença de seu endossimbionte obrigatório tornou-se mais expressiva. O conteúdo intestinal das larvas foi submetido a enriquecimento em meio mineral, cuja única fonte de carbono eram filmes de PS. Foram isoladas cinco cepas bacterianas dos gêneros: *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Cytobacillus* e *Raoultella*. Estas foram cultivadas por 60 dias em meio sólido, em contato com filmes de PS. A análise por MEV revelou a presença de cavidades, rachaduras e fissuras nos filmes, e o mapeamento de átomos da superfície indicou acúmulo de oxigênio. As análises por FT-IR indicaram que apenas *Paenibacillus* sp. levou à formação de grupos funcionais característicos de oxidação. A cromatografia de permeação em gel indicou que a mesma cepa foi capaz de alterar a massa molar do polímero. A fim de elucidar quais mecanismos poderiam estar envolvidos nesse processo, o genoma total de duas cepas (*Bacillus cereus* e *Paenibacillus lautus*) foi sequenciado no Illumina Nextseq 2000. A anotação identificou proteínas como multicooper oxidases, ring-cleaving dioxygenases, citocromos P450 (CYP) e glutational peroxidases (GPx). A CYP102 de *P. lautus* e as GPxs de ambas as espécies foram clonadas e expressas em *Escherichia coli*. Ambas as GPxs possuem atividade de tiorredoxina peroxidase. Os resultados demonstram o potencial da microbiota intestinal de *S. levis* como fonte de microrganismos e de enzimas para a biodegradação do PS.

Palavras-chave: Bicudo da cana-de-açúcar. Isopor. Oxidorredutases. *Paenibacillus lautus*.

ABSTRACT

Polystyrene (PS) is a polymer with versatile physical and chemical properties and a low production cost, used for various purposes. Its growing demand, combined with poor waste management, leads to accumulation in the environment, triggering social and ecosystem problems. This issue is exacerbated because PS is a recalcitrant polymer due to its carbon–carbon (C–C) main chain, which makes its biodegradation in nature difficult. Studies have investigated strategies for the biodegradation of this polymer. It has been found that larvae of certain insects are capable of using PS as a carbon source, a phenomenon correlated with their gut microbiota. For this reason, the larva of *Sphenophorus levis*, previously observed ingesting expanded polystyrene (EPS), was used to prospect microorganisms and key genes involved in the material's biodegradation process. The larvae were fed a diet restricted to EPS, and their intestinal microbial diversity was compared with that of larvae fed an artificial diet. It was observed that diversity decreased and the presence of its obligatory endosymbiont became more pronounced. The intestinal contents of the larvae were subjected to enrichment in a mineral medium, whose only carbon source was PS films. Five bacterial strains were isolated from the following genera: *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Cytobacillus*, and *Raoultella*. These were cultivated for 60 days on solid medium in contact with PS films. SEM analysis revealed cavities, cracks, and fissures in the films, and surface atom mapping indicated oxygen accumulation. FT-IR analyses indicated that only *Paenibacillus* sp. led to the formation of characteristic oxidation functional groups. Gel permeation chromatography indicated that the same strain was able to alter the polymer's molar mass. To elucidate which mechanisms might be involved in this process, the entire genomes of two strains (*Bacillus cereus* and *Paenibacillus lautus*) were sequenced on the Illumina NextSeq 2000. Annotation identified proteins such as multicopper oxidases, ring-cleaving dioxygenases, cytochromes P450 (CYP), and glutathione peroxidases (GPx). CYP102 from *P. lautus* and the GPxs from both species were cloned and expressed in *Escherichia coli*. Both GPxs have thioredoxin peroxidase activity. The results demonstrate the potential of the intestinal microbiota of *S. levis* as a source of microorganisms and enzymes for PS biodegradation.

Keywords: Oxidoreductases. *Paenibacillus lautus*. Styrofoam. Sugarcane weevil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Panorama dos Plásticos no Mundo em 2024.	22
Figura 2: Estrutura do estireno e do poliestireno.	23
Figura 3: Ciclo de vida do bicudo da cana-de-açúcar.	30
Figura 4: Mosaico de fotografias que mostra a interação entre a larva do bicudo da cana-de-açúcar e o poliestireno expandido.	39
Figura 5: Gráfico do crescimento relativo das larvas alimentadas por 5 dias com as dietas restrita ao poliestireno, convencional e mista.	40
Figura 6: Curvas de rarefação utilizadas para indicar a suficiência amostral. O eixo y mostra o número de espécies distintas em função do número de reads observadas.	42
Figura 7: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) apresentando a distribuição da beta-diversidade com base na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis.	43
Figura 8: Gráfico da abundância relativa a nível de gênero – Comunidade Bacteriana.	43
Figura 9: Curva de Crescimento em LB (densidade óptica em função do tempo), para as diferentes linhagens isoladas do intestino de <i>S. levis</i> após o enriquecimento.	49
Figura 10: Mosaico de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poliestireno do grupo controle, incubados na ausência de microrganismos, após o período experimental.	51
Figura 11: Mosaico de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poliestireno incubados com <i>Bacillus</i> sp., após o período experimental.	51
Figura 12: Mosaico de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poliestireno incubados com <i>Paenibacillus</i> sp., após o período experimental.	52
Figura 13: Mosaico de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poliestireno incubados com <i>Raoultella</i> sp., após o período experimental.	54
Figura 14: Mosaico de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poliestireno incubados com <i>Cytobacillus</i> sp., após o período experimental.	54

Figura 15: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), com mapeamento elementar por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS), evidenciando a distribuição dos átomos de carbono e oxigênio nos filmes de poliestireno (PS) após a ação bacteriana.	55
Figura 16: Ângulo de contato com a água (WCA) dos filmes de poliestireno (PS) após incubação com as bactérias por 60 dias.	56
Figura 17: Espectros gerados por FTIR-ATR dos filmes de PS em contato com <i>Paenibacillus</i> após 60 dias em comparação ao controle.	56
Figura 18: Gráfico gerado por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) para os filmes de poliestireno (PS) em contato com <i>P. lautus</i> durante 60 dias em contraste ao controle.	57
Figura 19: Propostas de vias de biodegradação de poliestireno.	60
Figura 20: Número de sequências classificadas nas três categorias da Ontologia Gênica: Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular no genoma de <i>Bacillus cereus</i>.	70
Figura 21: Número de sequências classificadas nas três categorias da Ontologia Gênica: Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular no genoma de <i>Paenibacillus lautus</i>.	71
Figura 22: Atribuição dos números da Enzyme Commission às enzimas preditas de <i>Bacillus cereus</i>.	72
Figura 23: Atribuição dos números da Enzyme Commission às enzimas preditas de <i>Paenibacillus lautus</i>.	72
Figura 24: Alinhamento das sequências das glutathione peroxidases.	76
Figura 25: Predição da Estrutura Secundária das Glutathione peroxidases oriundas de <i>Paenibacillus lautus</i> e <i>Bacillus cereus</i>.	76
Figura 26: Gel de agarose apresentando os produtos de amplificação das ORFs referentes às glutathione peroxidases (GPx) de <i>Paenibacillus lautus</i> e <i>Bacillus cereus</i>.	77
Figura 27: Gel de agarose para confirmação, por digestão de restrição, da inserção das ORFs das glutathione peroxidases (GPx) de <i>Paenibacillus lautus</i> e <i>Bacillus cereus</i> no vetor pET-28a.	77
Figura 28: Perfil de expressão heteróloga da BcGPx em <i>E. coli</i> Rosetta, apresentado em SDS-PAGE.	77
Figura 29: Perfil de expressão heteróloga da PlGPx em <i>E. coli</i> Rosetta, apresentado em SDS-PAGE.	79

Figura 30: Gráficos da atividade de BcGPx por meio do consumo de GSH em ensaio com DTNB.	80
Figura 31: Gráficos da atividade de PlGPx por meio do consumo de GSH em ensaio com DTNB.	80
Figura 32: Ensaio acoplado de oxidação de NADPH.	81
Figura 33: Avaliação da atividade peroxidásica de PlGpx e BcGpx utilizando peróxido de hidrogênio como substrato por meio do ensaio acoplado de oxidação de NADPH.	82
Figura 34: Alinhamento entre as sequências da GPx4 de Homo sapiens e a PlGPx2.	83
Figura 35: Alinhamento das sequências de GPx de Paenibacillus lautus e de Rhodococcus sp. C2.	84
Figura 36: Representação da estrutura secundária da PlCYP102 predita com o software PSIPRED.	85
Figura 37: Géis de agarose apresentando o produto da amplificação da ORF de PlCyp102 e a confirmação da clonagem por linearização por digestão.	86
Figura 38: Perfil de expressão heteróloga da PlCYP102 em E. coli Rosetta, apresentado em SDS-PAGE.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de reads geradas para 16S.....	41
Tabela 2: Índices de alfa-diversidade (Shannon e Simpson) da comunidade bacteriana em nível de espécie.	44
Tabela 3: Sequências dos primers para amplificar as sequências codificantes de glutational peroxidases.	64
Tabela 4: Estatísticas da montagem dos genomas.	70
Tabela 5: Distribuição das sequências anotadas por categoria nos genomas estudados.	71
Tabela 6: Parâmetros das glutational peroxidases de <i>P. lautus</i> e <i>B. cereus</i>.	78

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANI	identidade de nucleotídeos médios, do inglês average nucleotide identity
ASV	variante da sequência do amplicon do inglês amplicon sequence variant
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C _p	cisteína peroxidática
C _r	cisteína de resolução
cDNA	DNA complementar
CYP	citocromo P450
Cys (C)	cisteína
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico ou reagente de Ellman
EdNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatos
D.O.	densidade ótica
DTT	ditiotreitól
E.C.	Enzyme Commission
EDS	espectroscopia de dispersão de energia, do inglês energy dispersive spectroscopy
EPS	poliestireno expandido, do inglês expanded polystyrene
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
g	grama
Gln (Q)	glutamina
Gly (G)	glicina
GO	ontologia gênica, do inglês gene ontology
GPC	cromatografia de permeação em gel, do inglês gel permeation chromatography.
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione reduzida
h	horas
His (H)	histidina
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry
kDa	quilodalton
kg	quilograma
L	litro
LB	caldo de lisogenia, do inglês Lysogeny Broth
LCFBM	Meio líquido basal livre de carbono, do inglês liquid carbon free basal media
Lys (L)	lisina
M	molar
MCO	oxidase multicobre, do inglês, multicopper oxidase
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	miligrama
min	minuto

mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
ORF	fase aberta de leitura, do inglês <i>open reading frame</i>
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato salino
PCoA	análise de coordenadas principais, do inglês principal coordinate analysis
PCR	reação em cadeia da polimerase, do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Polietileno
pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoelétrico
PS	Poliestireno
RNA	ácido ribonucleico
Rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
S	Segundos
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
U	unidade enzimática
° C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	PANORAMA DOS PLÁSTICOS NO MUNDO.....	21
1.2	BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS.....	22
1.3	POLIESTIRENO: ESTRUTURA, APLICAÇÕES E BIODEGRADAÇÃO	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVOS GERAIS	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
CAPÍTULO 1: INVESTIGAÇÃO DA MICROBIOTA DE <i>SPHENOPHORUS LEVIS</i> QUANTO À SUA CAPACIDADE DE MODIFICAR POLIESTIRENO		27
1	INTRODUÇÃO	28
1.1	BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS C–C POR INSETOS E SUA MICROBIOTA	28
1.2	O BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR	29
2	OBJETIVOS	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	INVESTIGAÇÃO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS DOS INTESTINOS DE LARVAS DE BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR ALIMENTADAS COM POLIESTIRENO	33
3.1.1	Alimentação das larvas	33
3.1.2	Dissecação e extração dos intestinos	33
3.1.3	Construção das bibliotecas e sequenciamento da região V3–V4 do gene 16S rRNA	34
3.1.4	Processamento dos dados de sequenciamento	34
3.2	ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS CANDIDATAS À DEGRADAÇÃO DE POLIESTIRENO	35
3.2.1	Preparo dos filmes de poliestireno	35
3.2.2	Alimentação e dissecação das larvas.....	36
3.2.3	Cultivo em meio restrito.....	36

3.2.4	Identificação das bactérias isoladas	36
3.2.5	Curva de Crescimento.....	37
3.3	CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS CANDIDATAS QUANTO A HABILIDADE DE MODIFICAR O POLIESTIRENO.....	37
3.3.1	Cultivo das bactérias em contato com PS em meio sólido	37
3.3.2	Análise por microscopia eletrônica de varredura dos filmes de poliestireno	37
3.3.3	Análise da composição atômica e grupos funcionais da superfície do filme	38
3.3.4	Análise do Ângulo de Contato	38
3.3.5	Cultivo Individual em Meio Líquido e avaliação da Perda de massa	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DAS LARVAS ALIMENTADAS COM POLIESTIRENO	39
4.2	ANÁLISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL DAS LARVAS.....	41
4.2.1	Análise dos dados do sequenciamento	41
4.2.2	Análise da Diversidade Bacteriana	42
4.3	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS CANDIDATAS À BIODEGRADAÇÃO DE PS.....	46
4.3.1	<i>Bacillus</i> sp.....	46
4.3.2	<i>Paenibacillus</i> sp.....	47
4.3.3	<i>Lysinibacillus</i> sp.	47
4.3.4	<i>Cytobacillus</i> sp.....	48
4.3.5	<i>Raoultella</i> sp.	48
4.4	CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO	48
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS QUANTO À HABILIDADE DE MODIFICAR O POLIESTIRENO	50
CAPÍTULO 2: EXPLORAÇÃO DOS GENOMAS DAS BACTÉRIAS ISOLADAS EM FUNÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CANDIDATAS.....		58
1	INTRODUÇÃO	59
1.1	ASPECTOS MOLECULARES NA BIODEGRADAÇÃO DE POLIESTIRENO..	59
2	OBJETIVOS	61

3	METODOLOGIA.....	62
3.1	SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL.....	62
3.2	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CANDIDATAS	63
3.3	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS	63
3.4	CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CANDIDATAS.....	64
	3.4.1 Glutathione Peroxidase	64
	3.4.2 Citocromo P450 102 (CYP102).....	66
3.5	ENSAIOS DE ATIVIDADE.....	67
	3.5.1 Glutathione Peroxidases	67
3.6	AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DA <i>PLGPX2</i> MODIFICAR O POLIESTIRENO	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1	SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL.....	70
4.2	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CANDIDATAS	73
	4.2.1 Oxidorredutases.....	73
	4.2.2 Hidrolases	75
4.3	GLUTATHIONE PEROXIDASES: CLONAGEM, EXPRESSÃO E ATIVIDADE..	75
	4.3.1 Clonagem e expressão recombinante.....	77
	4.3.2 Avaliação da atividade de GPx.....	79
	4.3.3 Avaliação da habilidade da <i>PLGPx2</i> modificar o poliestireno	84
4.4	CITOCROMO P450 102 (CYP102).....	84
	4.4.1 Clonagem e expressão recombinante.....	86
	CONCLUSÕES.....	88
	BIBLIOGRAFIA	90
	APÊNDICE A - SEQUÊNCIAS DA REGIÃO V3-V4 DAS BACTÉRIAS ISOLADAS	106
	APÊNDICE B - SEQUÊNCIAS DAS ORFS E PROTEÍNAS DE INTERESSE NO	
	CONTEXTO DA BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS – <i>BACILLUS CEREUS</i>.....	108
	APÊNDICE C - SEQUÊNCIAS DAS ORFS E PROTEÍNAS DE INTERESSE NO	
	CONTEXTO DA BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS – <i>PAENIBACILLUS</i>	
	<i>LAUTUS</i>.....	113

APÊNDICE D -SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO.....	118
<i>PlGPx1</i>	118
<i>PlGPx2</i>	118
<i>BcGPx</i>	118
<i>PlCYP102</i>	118

1 INTRODUÇÃO

A iminência da necessidade de remediar a poluição plástica é primordial na construção de um mundo sustentável, dado que não se biodegradam facilmente na natureza. Os plásticos com arcabouço homoatômico (C—C), como o poliestireno, representam um problema ainda maior, pois são extremamente recalcitrantes. No entanto, a exploração da biodiversidade microbiana, como a pertencente às comunidades intestinais de insetos, tem se mostrado uma alternativa promissora dentro desse contexto.

1.1 PANORAMA DOS PLÁSTICOS NO MUNDO

O termo plástico se aplica a uma grande variedade de materiais que, em alguma etapa da manufatura, são capazes de fluir, o que lhes permite ser extrudados, moldados, fundidos, fiados ou aplicados como cobertura. Polímeros sintéticos são tipicamente preparados pela polimerização de monômeros derivados do petróleo e podem ser modificados pela adição de diferentes compostos (Thompson *et al.*, 2009).

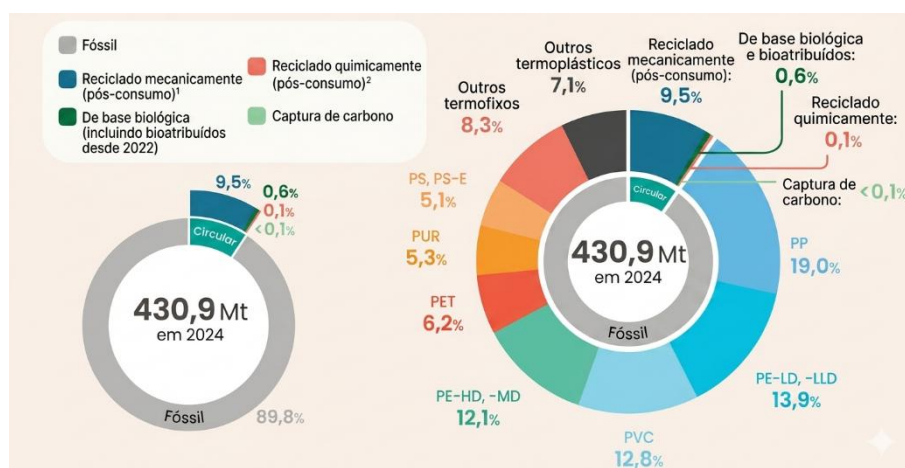
Plásticos são materiais incrivelmente versáteis, baratos, leves, resistentes, duráveis e resistentes à corrosão, além de apresentarem elevada capacidade de isolamento térmico e elétrico. A diversidade dos polímeros e a versatilidade das suas propriedades facilitam a produção de uma vasta gama de produtos plásticos que culminam em avanços tecnológicos, economia de energia e inúmeros outros benefícios sociais (Andrady e Neal, 2009).

Desde a sua inserção no mercado, a produção de plástico sempre esteve crescente, atingindo, em 2024, o patamar de 430 milhões de toneladas de material (Figura 1). Desse montante, destacam-se o polietileno (PE, 26%), o polipropileno (PP, 19%), o policloreto de vinila (PVC, 12,8%), politereftalato de etileno (PET, 6,2%), o poliuretano (PUR, 5,3%) e o poliestireno (PS, 5,1%) (Plastics Europe, 2025).

Estipula-se que, de todo o plástico produzido, 79% não receberam qualquer tipo de tratamento após o descarte, permanecendo em aterros sanitários ou dispersos no meio ambiente (Geyer, Jambeck e Law, 2017). A presença ubíqua dos plásticos abrange diversos ecossistemas, comprometendo a sua homeostase macroscópica e microscópica (Pilapitiya e Ratnayake, 2024). Embora esses polímeros possam sofrer vários tipos de intemperismo natural, como fotodegradação, oxidação térmica, hidrólise, biodegradação e fragmentação, sua degradação é extremamente lenta (Li, P. *et al.*, 2021; Pilapitiya e Ratnayake, 2024; Wang *et al.*, 2021). Assim, sua persistência no meio ambiente gera impactos na flora, na fauna e na saúde humana

(Galloway e Lewis, 2016; Li, P. *et al.*, 2021; Sussarellu *et al.*, 2016). Além dos impactos na paisagem, esses polímeros podem atuar como carreadores de microrganismos, metais pesados e poluentes orgânicos persistentes (Baptista Neto *et al.*, 2019; Massos e Turner, 2017; Rodrigues *et al.*, 2019).

Figura 1: Panorama dos Plásticos no Mundo em 2024. Adaptado de Plastics the Facts 2025 (Plastics Europe, 2025).



1.2 BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS

Diante da urgência de contenção da poluição plástica, a prospecção de estratégias de remediação, como a biodegradação, é indispensável. Biodegradação, de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), corresponde à decomposição de uma substância por meio da ação enzimática, seja *in vivo*, seja *in vitro*. Esta pode ser primária, quando promove alterações na estrutura química que resultam na alteração de propriedades, ou final, que corresponde à oxidação total ou à redução a moléculas simples (IUPAC, 2025).

Quando se trata de plásticos, esse processo geralmente envolve quatro etapas: biodeterioração, biofragmentação, assimilação e mineralização. A biodeterioração corresponde às modificações (mecânicas, físicas e químicas) iniciais que ocorrem na superfície do polímero durante o processo de colonização microbiana (formação do biofilme). Os microrganismos atuam por meio de processos mecânicos, químicos e enzimáticos (Gu, 2003; Lucas *et al.*, 2008). A biofragmentação é o processo de clivagem do polímero em monômeros e oligômeros. Isso é indispensável, pois o polímero possui alto peso molecular, o que tornaria impossível sua passagem pela parede celular e pela membrana plasmática. Esse é um processo enzimático que pode ocorrer por vias oxidativas e/ou hidrolíticas. A assimilação é o processo em que ocorre a integração dos átomos dos fragmentos dos materiais poliméricos dentro das células microbianas. Essa integração fornece aos microrganismos as fontes necessárias de energia,

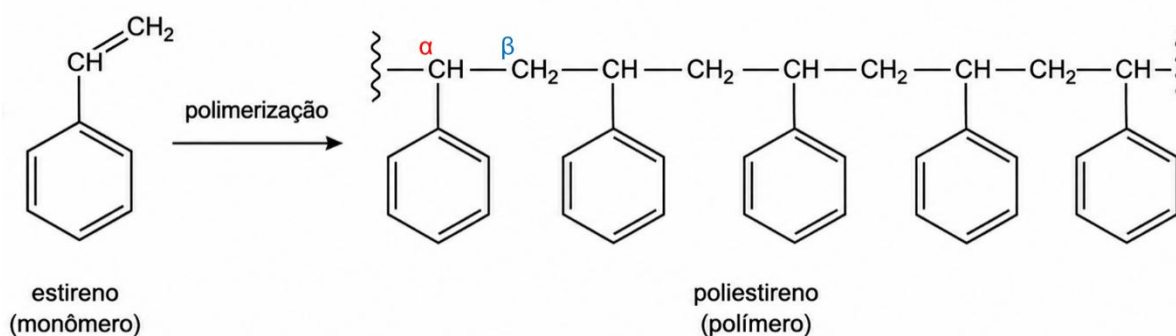
elétrons e elementos (por exemplo, carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre, entre outros) para a formação das estruturas celulares. Essa etapa permite o crescimento e a reprodução, ao mesmo tempo em que consome o substrato (material polimérico) do ambiente. Por fim, a mineralização é o processo pelo qual moléculas simples, como CO_2 , N_2 , CH_4 e H_2O , são liberadas no ambiente (Lucas *et al.*, 2008).

Os plásticos sintéticos podem ser enquadrados em duas categorias de acordo com o seu arcabouço: C—C (PE, PP, PVC e PS) e C—O (PU e PET). Devido à sua estrutura, composta por ligações simples entre carbonos, e à inexistência de quaisquer grupos reativos, os plásticos como o poliestireno (objeto de estudo deste trabalho) representam um desafio maior quanto à biodegradação. Estes são considerados inertes à hidrólise, sendo os processos redox fundamentais para a decomposição de tais polímeros (Krueger, Harms e Schlosser, 2015).

1.3 POLIESTIRENO: ESTRUTURA, APLICAÇÕES E BIODEGRADAÇÃO

O poliestireno é um polímero aromático sintético, com alta massa molar e fórmula $(\text{C}_8\text{H}_8)_n$ (Figura 2), produzido a partir do monômero de estireno (vinilbenzeno). É um material amorfo, com massa molar M_w entre 100.000 e 400.000 g/mol. Baixo peso específico, alta transparência e brilho, ausência de cor, baixo encolhimento e facilidade de fabricação estão entre os seus aspectos mais característicos (Gausepohl e Nießner, 2001).

Figura 2: Estrutura do estireno e do poliestireno. O carbono alfa, ligado ao anel aromático, está destacado em vermelho, e o carbono beta, em azul.



O PS é utilizado em uma ampla gama de aplicações, incluindo embalagens, bens manufaturados, materiais de construção, produtos hospitalares e até mesmo artesanato (Arfin, Mohammad e Yusof, 2015). Esse polímero é geralmente apresentado em quatro categorias: GPPS (General Purpose Polystyrene, ou Poliestireno de Uso Geral), HIPS (High Impact Polystyrene, ou Poliestireno de Alto Impacto), XPS (Extruded Polystyrene, ou Poliestireno Extruído) e EPS (Expanded Polystyrene, ou Poliestireno Expandido) (Singh, Chauhan e Gaur, 2025).

O GPPS é amplamente utilizado quando a transparência, a rigidez e o custo-benefício são prioridades. Devido ao baixo custo e à maleabilidade, é utilizado em produtos de uso único, como utensílios domésticos descartáveis, e na indústria alimentícia. Também são relevantes no contexto de produtos hospitalares, devido ao custo, à pureza e à transparência. São relevantes na produção de eletrônicos devido à sua rigidez e estabilidade dimensional (Singh, Chauhan e Gaur, 2025). HIPS corresponde a um material de duas fases, composto por uma matriz de poliestireno livre e partículas de borracha, que contêm partículas de polibutadieno em escala micrométrica (3-10% da massa total do material) (Giakoumakis *et al.*, 2024). A função do polibutadieno é aumentar as propriedades mecânicas do polímero, promovendo uma maior força de impacto, alongamento na ruptura e tenacidade à fratura (Prasad e Singh, 1997). O HIPS é frequentemente utilizado em materiais de escritório, brinquedos e eletrônicos (Muthukumar, Kandukuri e Chidambaram, 2024). O XPS é uma espuma de poliestireno dura (densidade de 25–50 kg/m³) de célula fechada produzida pelo método de extrusão de espuma (Voith *et al.*, 2022). É comumente utilizado para isolamento térmico de paredes, fundações, lajes e telhados. O EPS (densidade de 10–30 kg/m³) consiste em pequenas partículas esféricas que contêm cerca de 98% de ar. Estas são derivadas da polimerização do estireno seguida da adição de um agente de expansão (Sulong, Mustapa e Rashid, 2019; Voith *et al.*, 2022). Apresenta aplicações muito versáteis, que vão das embalagens e caixas térmicas, a itens da construção civil e de estradas (Ho, Roberts e Lucas, 2018)

Assim como os demais plásticos, o poliestireno é amplamente utilizado devido às suas propriedades mecânicas e ao baixo custo. Devido a isso, esse material tem se acumulado no meio ambiente, causando poluição ambiental, problemas à saúde humana e mudanças ecossistêmicas em função de sua toxicidade e de compostos recalcitrantes (Ho, Roberts e Lucas, 2018). Além disso, a fragmentação desses resíduos gera microplásticos, partículas com diâmetro inferior a 5 mm, que têm emergido como uma preocupação relevante. Em ambientes aquáticos e terrestres, estes foram associados a efeitos tóxicos sobre os animais, incluindo redução da sobrevivência e da reprodução, aumento do estresse oxidativo, disfunções imunológicas e alterações na microbiota. Esse fenômeno pode afetar diretamente as cadeias alimentares (Jin *et al.*, 2018; Toussaint *et al.*, 2019).

Os produtos à base de poliestireno podem ser reciclados; no entanto, a sua grande maioria é destinada aos aterros sanitários. Um dos principais empecilhos ao processo de reciclagem é o custo do transporte, pois o material é leve e volumoso (Ho, Roberts e Lucas, 2018).

O poliestireno é um termoplástico durável, geralmente considerado não-biodegradável. Na realidade, a biodegradação do PS acontece, mas em uma taxa bastante lenta em ambientes naturais, fazendo com que o polímero persista por longos períodos de tempo como um resíduo sólido (Kaplan, Hartenstein e Sutter, 1979). Isso ocorre devido ao caráter hidrofóbico da maioria dos termoplásticos, o que os torna resistentes à hidrólise. A sua composição molecular afeta a hidrofobicidade da superfície, influenciando negativamente a interação com os microrganismos degradadores (Albertsson e Karlsson, 1993). Além disso, a alta massa molecular e a insolubilidade em água dificultam o transporte para a região intracelular (Artham e Doble, 2008). No entanto, os processos biológicos podem iniciar-se de forma extracelular, por meio da secreção de enzimas pelos microrganismos. Como as enzimas são muito grandes para penetrar no polímero, atuam na superfície (Tokiwa *et al.*, 2009). Esses processos podem ser iniciados pela formação de grupos funcionais na cadeia polimérica (Albertsson, Andersson e Karlsson, 1987).

Micro-organismos de diversas origens têm sido explorados para a biodegradação de poliestireno, incluindo aqueles provenientes de ambientes naturais, como solo e oceano (Atiq *et al.*, 2010; Auta, Emenike e Fauziah, 2017; Kim *et al.*, 2021), bem como de ambientes poluídos (Wang *et al.*, 2024; Yuan *et al.*, 2023). Nos últimos dez anos, a microbiota intestinal de insetos capazes de ingerir poliestireno expandido vem ganhando destaque, sendo uma fonte bastante promissora de microrganismos (Jiang *et al.*, 2021b; Yang *et al.*, 2015a).

Nesse contexto, este trabalho coloca como protagonista a microbiota intestinal de larvas de *Sphenophorus levis*, um inseto amplamente estudado por nosso grupo de pesquisa. Este, que, durante coletas em campo, foi observado mastigando, perfurando e formando galerias nos contêineres de poliestireno expandido utilizados para o seu armazenamento e transporte ao laboratório. Ademais, busca-se investigar os componentes moleculares de seus microrganismos selecionados e isolados, incluindo genes e proteínas, a fim de identificar recursos biológicos associados à biodegradação do poliestireno.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Identificar microrganismos da microbiota intestinal de *Sphenophorus levis* com potencial para biodegradar poliestireno e investigar os mecanismos moleculares envolvidos, visando ao desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para sua biorremediação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Compreensão dos efeitos da alimentação de larvas de *S. levis* com poliestireno na performance e na composição da comunidade microbiana.

Isolamento, por meio de enriquecimento em meio mineral com PS como fonte única de carbono, de bactérias candidatas à biodegradação do polímero.

Avaliação do potencial de modificação dos filmes de PS pelas bactérias isoladas.

Investigação e caracterização dos genes candidatos, obtidos por sequenciamento do genoma, ao envolvimento nos processos de modificação do polímero.

CAPÍTULO 1: INVESTIGAÇÃO DA MICROBIOTA DE *Sphenophorus levis* QUANTO À SUA CAPACIDADE DE MODIFICAR POLIESTIRENO

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIODERGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS C–C POR INSETOS E SUA MICROBIOTA

O desafio de solucionar a questão do destino final dos plásticos com arcabouço homoatômico tem atraído a atenção da comunidade científica há anos. (Ho, Roberts e Lucas, 2018; Raddadi e Fava, 2019). Algumas iniciativas tiveram como enfoque o isolamento de micro-organismos de solo e de lodo, como *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. (Mohan *et al.*, 2016), *Comamonas* sp., *Delftia* sp., *Stenotrophomonas* sp. (Peixoto, Silva e Krüger, 2017), *Enterobacter* sp., *Citrobacter sedlakii*, *Alcaligenes* sp. e *Brevundimonas diminuta* (Sekhar *et al.*, 2016). Em contrapartida, nos últimos anos, a comunidade científica tem investido na exploração da microbiota intestinal de insetos capazes de ingerir esses polímeros, particularmente de larvas com aparelhos bucais de mastigação.

Esforços para alavancar as taxas de biodegradação de materiais plásticos revelaram que o ambiente intestinal das larvas de insetos permite uma degradação comparativamente rápida desses materiais. Esse processo foi demonstrado em diversas espécies holometabólicas. Em 2010, foi relatado que larvas de *Zophobas atratus* são capazes de ingerir plásticos (Miao e Zhang, 2010). Em 2014, foram isolados, a partir do intestino das larvas do lepidóptero traça-indiana-da-farinha (*Plodia interpunctella*), os microrganismos *Enterobacter asburiae* YT1 e *Bacillus* sp. YP1 que tiveram caracterizada a capacidade de biodegradar polietileno (Yang *et al.*, 2014). Nesse mesmo período, observou-se que a larva do besouro-da-farinha (*Tenebrio molitor*) é capaz de se alimentar de poliestireno expandido e que havia evidências de biodegradação e mineralização do polímero, decorrentes de alterações nas propriedades físicas e químicas (Yang *et al.*, 2015b). Logo em seguida, a participação dos micro-organismos, como uma linhagem de *Exiguobacterium* sp. YT2, envolvidos nesse processo, foram confirmados (Yang *et al.*, 2015a). Com o passar dos anos, outros insetos foram submetidos a uma dieta baseada em plásticos C–C, e a importância da microbiota continuou a ser evidenciada, o que permitiu o isolamento de microrganismos-chave para o processo. Os estudos de degradação dessa classe de polímeros concentram-se em lepidópteros e coleópteros. O lepidóptero *Galleria mellonella* (traça-da-cera), por exemplo, foi descrito como tendo potencial para degradar tanto o polietileno quanto o poliestireno, processos que estariam intimamente associados a linhagens de *Enterobacter* sp. e *Massilia* sp., respectivamente (Bombelli, Howe e Bertocchini, 2017; Jiang *et al.*, 2021a; Ren *et al.*, 2019). Em estudos com a larva do coleóptero *Plesiophthalmus davidis*, foi realizado um enriquecimento que demonstrou que uma linhagem do gênero *Serratia* estaria associada à decomposição de poliestireno (Woo, Song e Cha, 2020). Pesquisas semelhantes

realizadas com *Zophobas atratus* permitiram não só isolar uma linhagem de *Pseudomonas* spp., como também relatar a atividade de uma serino-hidrolase fundamental para esse processo (Kim *et al.*, 2020). Atualmente, as pesquisas não têm se limitado apenas a coleópteros e lepidópteros, sendo evidente a ação da microbiota de insetos das ordens Blattodea (Li *et al.*, 2024) e Diptera (Filippis, De *et al.*, 2023), por exemplo.

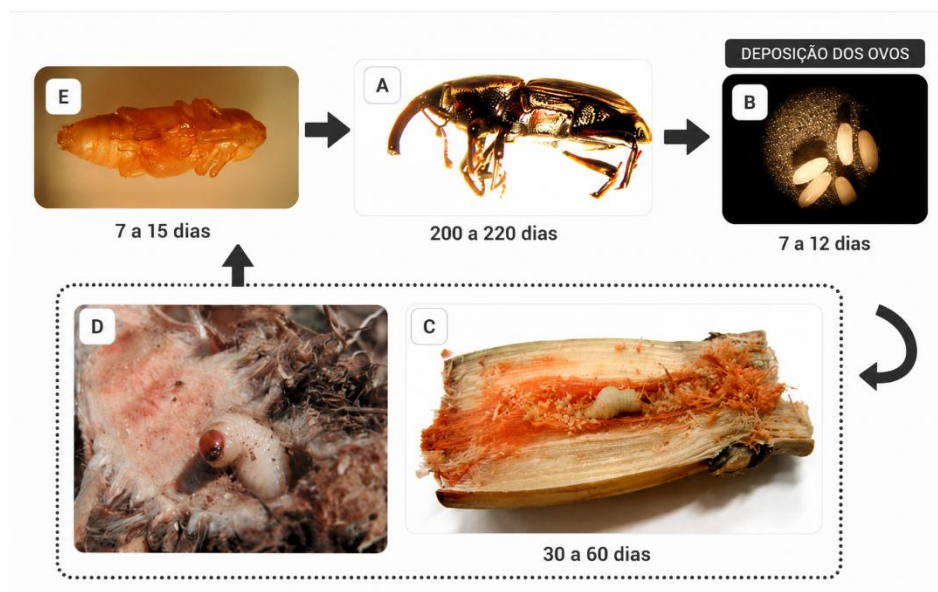
O nosso grupo de pesquisa tem vasta experiência no estudo do coleóptero *Sphenophorus levis*. Durante esse período, muitas coletas em campo foram realizadas e, em algumas delas, larvas desse inseto foram transportadas em contêineres de poliestireno expandido. Porém, algo curioso era recorrente. As larvas eram capazes de perfurar o material, formando galerias, ou até mesmo de escapar do recipiente. Diante da evidência na literatura de que alguns insetos têm potencial biodegradador de poliestireno e de que isso estaria intimamente ligado à sua microbiota, consideramos promissor explorar os componentes do microbioma intestinal das larvas de *S. levis* para fins de biorremediação desse relevante poluente.

1.2 O BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR

O bicudo da cana-de-açúcar (*Sphenophorus levis*, Coleoptera: Curculionidae) foi identificado primeiramente em 1978, na região de Piracicaba-SP, e, a partir de então, passou a ser considerado uma praga relevante para a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), especialmente no estado de São Paulo (Vanin, 1990). A incidência do inseto ultrapassou as fronteiras do estado de São Paulo, sendo descrito também em Santa Catarina, no Paraná (Precetti e Arrigoni, 1990), em Minas Gerais (Girón-Pérez *et al.*, 2009) e no Mato Grosso do Sul. O impacto nas lavouras é bastante significativo, podendo significar a perda de 30 toneladas por hectare ao ano (Almeida, 2005).

Habitante dos solos, o inseto-praga *Sphenophorus levis* danifica as plantas de cana-de-açúcar ao se alimentar de seus rizomas. Seu estágio larval estende-se entre 30 e 60 dias, seguido da fase de pupa entre 7 e 12 dias; os adultos vivem até no máximo 220 dias (Almeida, 2005; Precetti e Arrigoni, 1990). As fêmeas adultas depositam seus ovos no interior do rizoma e dos colmos basais, onde as larvas emergem e começam a se alimentar, formando galerias preenchidas por serragem, excrementos e solo. Essa atividade resulta em problemas no desenvolvimento das plantas, ocasionando sintomas como amarelamento e necrose das folhas e, conseqüentemente, na morte do vegetal, formando manchas amareladas distribuídas pela plantação (Casteliani *et al.*, 2020).

Figura 3: Ciclo de vida do bicudo da cana-de-açúcar. (A) adulto. (B) ovos. (C) e (D) larvas. (E) pupa. Adaptado de Paula, (2012) com modificações gráficas realizadas com ferramentas de inteligência artificial



Um dos maiores impedimentos ao controle efetivo do inseto no campo é o seu habitat. Eles se alojam no interior da cana-de-açúcar, o que torna ineficazes os inseticidas químicos comerciais. Devido a isso, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando há cerca de duas décadas na busca de estratégias de controle do inseto por meio de abordagens biotecnológicas. Foram exploradas proteínas-chave do processo digestivo do inseto, como as catepsinas (cisteíno-proteases), que poderiam ser utilizadas como alvos para o controle da praga. Nesse contexto, foi estudada, de maneira extensiva, a interação de cistatinas (inibidores competitivos do tipo *tight-binding* de cisteíno-proteases) de cana-de-açúcar com as catepsinas de *S. levis* e como esses inibidores afetavam a biologia dos insetos quando ingeridos (seja através de dieta artificial, seja em eventos de cana-de-açúcar geneticamente modificadas) (Fonseca *et al.*, 2012; Shibao *et al.*, 2021; Soares-Costa *et al.*, 2011). Ademais, estratégias utilização de RNA de interferência, utilizando a V-ATPase E como alvo, foram empregadas (Mohan *et al.*, 2021)

A experiência de trabalho com o inseto e o conhecimento de seus genes permitiram observar que esse artrópode poderia ser objeto de estudo para aplicações biotecnológicas. Nesse sentido, proteínas de interesse industrial, como pectinases e invertases, foram identificadas, produzidas em sistema heterólogo e caracterizadas (Evangelista *et al.*, 2014; Peduzzi *et al.*, 2014). Outros estudos foram voltados à compreensão da diversidade microbiana intestinal do inseto em sua fase larval. Foi realizado um panorama de identificação de espécies por meio do sequenciamento Sanger da região 16S dos microrganismos das comunidades intestinais de larvas criadas em laboratório e oriundas do campo. Os microrganismos cultiváveis foram

isolados, identificados e submetidos à avaliação de sua atividade celulolítica, relevante para o nicho ecológico do inseto-praga (Rinke *et al.*, 2011).

2 OBJETIVOS

Este capítulo busca compreender os efeitos da alimentação restrita com poliestireno sobre o desempenho e as comunidades bacterianas intestinais das larvas de *Sphenophorus levis*. Além disso, busca identificar quais microrganismos dessas comunidades teriam, isoladamente, potencial para modificar o poliestireno. Assim, esse capítulo apresenta os seguintes objetivos específicos:

- Avaliação performance das larvas de *Sphenophorus levis* submetidas à dieta baseada em poliestireno;
- Caracterização a diversidade microbiana do intestino das larvas por *metabarcoding* do gene 16S;
- Isolamento e identificação de microrganismos a partir do cultivo do conteúdo intestinal das larvas em meio de cultura no qual a única fonte de carbono é o poliestireno, para enriquecimento;
- Caracterização dos filmes de poliestireno após ação microbiana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INVESTIGAÇÃO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS DOS INTESTINOS DE LARVAS DE BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR ALIMENTADAS COM POLIESTIRENO

3.1.1 Alimentação das larvas

Larvas de *Sphenophorus levis* de 15 dias foram obtidas da empresa Pragas.com (Piracicaba, SP, Brasil; <http://pragas.com.vc/>). As larvas foram mantidas individualmente em placas de Petri sob três condições distintas. Um grupo de larvas foi alimentado apenas com EPS (um bloco de aproximadamente 150 mg para cada indivíduo). A alimentação do segundo grupo consistiu em EPS triturado e dieta artificial convencional (Degaspari *et al.*, 1987), misturados na proporção de 1:20 (m/m). O grupo controle foi mantido em dieta artificial. Os grupos totalizavam 33 larvas.

O cultivo dos insetos foi realizado sob condições controladas de temperatura (26 ± 2 °C), fotoperíodo (12 L:12D) e umidade relativa (55-65%) em câmara Panasonic MLR-352H por 5 dias. O EPS utilizado na alimentação dos insetos foi gentilmente doado pela empresa Mundi-Eps - Indústria e Comércio de Plásticos LTDA (Brodowski, SP, Brasil; <https://www.mundieps.com.br>). De acordo com as informações do fabricante, a densidade do material é de 0,014 g/cm³ e não foram adicionados aditivos ou catalisadores ao polímero.

Antes de submetê-las aos diferentes tratamentos, as larvas, que estavam mantidas em dieta convencional, foram pesadas. Quando submetidas às diferentes dietas, elas foram observadas quanto às alterações em seu crescimento e desenvolvimento e, após 5 dias, o experimento foi encerrado. Nesse momento, houve uma nova pesagem. Foram calculados o crescimento relativo [(massa final - massa inicial) / massa inicial] e a sobrevivência (nº de larvas vivas/nº total de larvas). Além disso, o consumo de EPS foi avaliado.

3.1.2 Dissecação e extração dos intestinos

Ao final do experimento, as larvas foram coletadas e dissecadas conforme descrito anteriormente com modificações (Rinke *et al.*, 2011). Primeiramente, os insetos foram mantidos no gelo por 10 minutos. Sua superfície foi desinfetada por submersão em etanol a 70% (v/v) por 3 minutos e, em seguida, imersa em tampão salino tamponado com fosfato 1X estéril (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). As larvas foram dissecadas em PBS utilizando bisturi para remover as cabeças e pinça para puxar o intestino

para fora da carcaça. Os intestinos foram imediatamente submersos em tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0). Para cada condição experimental, um *pool* de 5 intestinos foi imerso em 300 µL de TE e agitado em vórtex por 5 minutos.

3.1.3 Construção das bibliotecas e sequenciamento da região V3–V4 do gene 16S rRNA

Três pools de 5 larvas para cada uma das condições foram submetidos à extração de DNA total utilizando o kit Nucleospin Soil (Macherey-Nagel). A região V3-V4 do gene 16S foi amplificada com o Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher) e os primers 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG 3' e 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC 3', que contêm adaptadores Illumina. A reação foi iniciada a 95 °C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 98 °C/20 s, 55 °C/30 s e 72 °C/30 s, e finalizada com extensão de 5 minutos a 72 °C. Os amplicons foram purificados com beads magnéticas AM Pure XP (Beckman Coulter) e submetidos a uma nova reação para a adição dos índices, de acordo com o descrito no documento “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation” (Illumina, 2013). O tamanho dos fragmentos foi analisado no Bioanalyzer DNA 1000 (Agilent) e a concentração, no Qubit (Thermo Fisher). Com essas informações, as bibliotecas foram unificadas e normalizadas. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA-FMUSP, São Paulo), onde foram analisadas em um sequenciador NextSeq 2000 utilizando leituras *paired-end* 2 × 300.

3.1.4 Processamento dos dados de sequenciamento

As análises bioinformáticas de microbioma foram feitas utilizando o QIIME 2 2026.1 (Bolyen *et al.*, 2019). Os dados brutos foram demultiplexados e suas qualidades foram visualizadas com o plugin q2-demux (github.com/qiime2/q2-demux). O plugin q2-cut-adapt (Martin, 2011) foi utilizado para remoção dos primers de sequenciamento do rRNA 16S. O processo de *denoising* foi realizado com o plugin q2-dada2 (Callahan *et al.*, 2016) utilizando a qualidade das sequências como base para definir onde truncá-las. As ASVs (*amplicon sequence variant*) geradas pelo *denoising* foram alinhadas com MAFFT (Katoh, 2002) usando o plugin q2-alignment (github.com/qiime2/q2-alignment) e usadas para a construção de uma árvore filogenética com fasttree2 (Price, Dehal e Arkin, 2010) com o plugin q2-phylogeny (github.com/qiime2/q2-phylogeny).

As ASVs geradas foram classificadas taxonomicamente com o plugin q2-feature-classifier contra os bancos de dados SILVA versão 138.2 (SSU Ref NR 99) (Quast *et al.*, 2012).

Foi usado o comando `classify-sklearn` no plugin `q2-feature-classifier` (Bokulich *et al.*, 2018), que classifica as ASVs com base no modelo probabilístico de Naive Bayes. Os bancos de dados utilizados foram baixados, filtrados e treinados conforme o item 3.1.4.1.

O processamento *downstream* desses dados de microbioma foi realizado na linguagem R (v 4.5.1) para análises estatísticas e visualização de dados. Primeiramente, os arquivos resultantes do processamento no QIIME2 foram importados no RStudio usando as bibliotecas `qiime2R` (v 0.99.6) e `phyloseq` (v 1.54.0). As medidas de alfa diversidade para as métricas de Shannon e de Simpson) foram feitas com o pacote `stats` (v 4.5.1). Para a beta-diversidade, a análise PERMANOVA foi realizada com a biblioteca `vegan` (v 2.7-2), baseada na matriz de Bray-Curtis, com 999 permutações. As curvas de rarefação foram geradas com a biblioteca `Racanapa` (v 0.1.0).

Os pacotes `tidyr` (v 1.3.2) e `dplyr` (v 1.2.0) foram usados para filtrar as espécies de baixa abundância, agrupar as sequências por ranking taxonômico (gênero) e calcular as abundâncias relativas. Para visualizar todos estes dados de diversidade, curvas de rarefação e composição da comunidade, foram utilizadas as bibliotecas `ggplot2` (v 4.0.2), `ggpubr` (v 0.6.2), `patchwork` (v 1.3.2), `scales` (v 1.4.0) e `viridis` (v 0.6.5) para gerar gráficos de barras, de dispersão, diagramas de caixa e tabelas.

3.1.4.1 Preparo dos bancos de dados para classificação taxonômica

Os bancos de dados foram baixados, filtrados e treinados usando os plugins `q2-rescript` (Robeson *et al.*, 2021) e `q2-feature-classifier` (Bokulich *et al.*, 2018). O banco de dados SILVA, versão 138.2 (SSU Ref NR 99), foi baixado e as sequências de baixa qualidade (bases ambíguas ou homopolímeros) foram removidas. O banco de dados foi então filtrado com as sequências dos primers de sequenciamento, de modo a manter apenas a região V3-V4 para classificação. O banco de dados foi de-replicado para remover regiões idênticas entre si e, por fim, foi treinado com o modelo probabilístico de Naive Bayes.

3.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS CANDIDATAS À DEGRADAÇÃO DE POLIESTIRENO

3.2.1 Preparo dos filmes de poliestireno

Blocos de EPS (0,014 g/cm³) foram dissolvidos em xileno (0,03 g/mL). Na capela de exaustão, 210 mg do polímero foram dispostos em placas de Petri de vidro de 7 cm de diâmetro, sobre as quais foram adicionados 7 mL de xileno. O conjunto do solvente e do polímero ficou

em capela de exaustão por 3 dias para secagem. Os filmes, com espessura inferior a 80 µm, foram lavados com metanol e com água destilada. As superfícies dos filmes foram desinfetadas com etanol a 70%.

3.2.2 Alimentação e dissecação das larvas.

Larvas de *Sphenophorus levis* foram adquiridas da empresa Pragas.com e alimentadas com poliestireno expandido conforme descrito na seção 3.1.1. A dissecação e a extração dos intestinos foram conduzidas conforme a seção 3.1.2, com a diferença de que os intestinos foram submersos em tampão PBS. Pools de 7 a 10 intestinos foram imersos em 1 mL do tampão e agitados em vórtex por 5 minutos. A fim de separar os tecidos do inseto das bactérias, os tubos com o conteúdo foram submetidos à decantação em gelo por 20 minutos para que o sobrenadante fosse coletado.

3.2.3 Cultivo em meio restrito

O sobrenadante coletado foi inoculado em 100 mL de meio de cultura LCFBM (Liquid Carbon Free Basal Media) contendo 1 g de filmes de poliestireno, cortados com dimensões de aproximadamente 3 mm x 3 mm, em frascos Erlenmeyer de 500 mL. O meio livre de carbono é composto por 0,7 g/L de KH_2PO_4 , 0,7 g/L de K_2HPO_4 , 0,7 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L de NH_4NO_3 , 0,005 g/L de NaCl, 0,002 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,001 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Esse meio de cultura é padrão da American Society for Testing and Materials (ASTM) para a avaliação da resistência de plásticos a bactérias (ASTM G22-76). A cultura foi incubada sob agitação (120 rpm) a 24 °C por 60 dias. Como controle, um frasco sem inóculo foi mantido nas mesmas condições.

Após esse período, o meio e os filmes de PS foram coletados e agitados em vórtex por 5 min para liberação das bactérias. Após diluição seriada, 200 microlitros foram plaqueados em meio LB e incubados a 30 °C. Após a avaliação da morfologia das colônias, as que diferiram entre si foram repicadas em LB ágar.

3.2.4 Identificação das bactérias isoladas

As diferentes cepas isoladas foram repicadas em LB líquido e cultivadas a 30 °C e 200 rpm. O DNA total foi extraído utilizando o kit NucleoSpin Microbial DNA (Macherey-Nagel). O DNA genômico foi amplificado por PCR com primers direcionados à região correspondente ao RNA ribossomal 16S: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg *et al.*, 1991). As reações foram conduzidas em volume final de 25 µL. Foram utilizados 200 µM de cada dNTP (Promega), 0,5 µM de cada

primer e 2,5 U da enzima Taq High Fidelity Pol (Cellco) em tampão apropriado. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti (Applied Biosystems), iniciando com uma temperatura de 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação (1 min – 94 °C, 1 min – 50 °C e 2 min – 72 °C) e terminando com uma extensão final de 7 min a 72 °C. Os *amplicons* foram sequenciados pelo método dideoxi (Sanger, Nicklen e Coulson, 1977), com os primers V3-V4: 314F (5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3') e 805R (5' GACTACHVGGGTATCTAATCC 3').

3.2.5 Curva de Crescimento

As bactérias selecionadas foram cultivadas em meio LB líquido e acompanhadas até atingirem a fase estacionária. Pré-inóculos das bactérias foram cultivados por 16 horas e, em seguida, diluídos em 100 mL de LB na razão 1:100. Os frascos Erlenmeyer foram submetidos a agitação a 200 rpm a 30 °C. O experimento foi conduzido em triplicata. Periodicamente, alíquotas da cultura foram coletadas. A densidade óptica (DO) foi mensurada em um espectrofotômetro a 600 nm até atingir a fase estacionária.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS CANDIDATAS QUANTO A HABILIDADE DE MODIFICAR O POLIESTIRENO

3.3.1 Cultivo das bactérias em contato com PS em meio sólido

As bactérias foram cultivadas em meio LB (200 rpm, 30 °C) até atingirem a fase logarítmica de crescimento. As culturas foram centrifugadas por 7 min a $2700 \times g$ para a obtenção da massa celular. O material foi ressuspensionado em solução salina a 0,85% de NaCl. O processo de centrifugação foi repetido 3 vezes para lavagem do pellet. Por fim, o material ressuspensionado em LCFBM, a densidade óptica (600 nm) foi corrigida para 1,0 e 200 microlitros do conteúdo foram espalhados em meio livre de carbono suplementado com agarose (CFBM sólido).

3.3.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura dos filmes de poliestireno

A fim de verificar a proliferação e a morfologia bacteriana na superfície, o filme de poliestireno foi submetido à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para investigar as modificações estruturais pós-degradação, o filme foi lavado com SDS a 2% por 16 horas para remover os microrganismos. As amostras foram metalizadas com ouro, utilizando uma metalizadora Balzers Sputter Coater SCD 004. A camada condutora depositada tem espessura de 5 nanômetros. Os filmes foram analisados nos microscópios Magellan e TESCAN MIRA do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da UFSCar.

3.3.3 Análise da composição atômica e grupos funcionais da superfície do filme

A fim de avaliar a variação na composição atômica na superfície após os tratamentos, foi estimada a proporção relativa entre o carbono e o oxigênio por mapeamento, por meio de espectroscopia por dispersão de energia (EDS, energy-dispersive spectroscopy), utilizando o TESCAN MIRA (LCE/DEMa). Essa análise permite verificar as modificações na composição atômica na superfície do PS causadas pelas bactérias.

Para estudar os grupos funcionais resultantes da interação da bactéria com o polímero, realizou-se a análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR). Essa técnica avalia, com base no padrão vibracional das ligações moleculares, quais combinações de átomos são representadas. Essa análise foi realizada no equipamento Nicolet 6700 (Thermo Scientific) do Laboratório de Polímeros Biodegradáveis no DEMa.

3.3.4 Análise do Ângulo de Contato

A fim de comparar a hidrofobicidade do filme de PS controle e dos filmes submetidos à ação microbiana, uma análise de ângulo de contato (WCA, Water Contact Angle) foi realizada com o equipamento Attension Theta Flex (Biolin Scientific) a 24 °C. Para comparar os ângulos formados pela gota de água sobre os filmes, utilizou-se o teste t de Welch ($n = 3$).

3.3.5 Cultivo Individual em Meio Líquido e avaliação da Perda de massa

A cepa mais promissora também foi cultivada em meio líquido. As células foram preparadas conforme descrito na seção 3.3.1 e ressuspendido em 45 mL de LCFBM ($OD_{600} = 0,1$). Um filme de 30 × 30 mm e 30 mg foi inserido no meio. Após 60 dias, a massa foi aferida. Para avaliar a mudança no perfil da massa molar do polímero, empregou-se uma análise de cromatografia de permeação em gel (GPC, Gel Permeation Chromatography). O processo foi realizado no sistema Shimadzu Prominence GPC (Kyoto, Japão), equipado com uma pré-coluna Phenogel, 5 μm , e 2 colunas em série: Phenogel, 5 μm , 1×10^6 Å, e 5 μm , 1×10^4 Å (Phenomenex, Torrance, USA). O volume da amostra foi de 50 μL (1 mg mL^{-1}) e a análise foi realizada a 35 °C. Um detector de índice de refração diferencial (Shimadzu RID-10A). A fase móvel foi THF contendo 0,3% de trietilamida, a uma taxa de fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. O sistema foi calibrado com padrões de polimetilmetacrilato (PMMA). (EasyCal, Sigma-Aldrich) ($M_p \sim 800 - 2000000 \text{ g mol}^{-1}$). Todas as massas apresentadas são, portanto, relativas aos padrões de PMMA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DAS LARVAS ALIMENTADAS COM POLIESTIRENO

As larvas de *S. levis* foram submetidas a três alimentações distintas: poliestireno expandido (EPS), dieta convencional e mistura das duas. O desenvolvimento dos insetos foi avaliado diariamente, e observou-se que, ao longo do tempo, as larvas alimentadas exclusivamente com EPS reduziram seu tamanho, provavelmente por estarem consumindo suas reservas (p. ex., corpo gorduroso). Assim, considerando a possibilidade de morte das larvas ao longo do experimento e as dificuldades na extração do intestino, o experimento foi encerrado após 5 dias. As larvas consumindo poliestireno expandido podem ser observadas na Figura 4.

Figura 4: Mosaico de fotografias que mostra a interação entre a larva do bicudo da cana-de-açúcar e o poliestireno expandido.

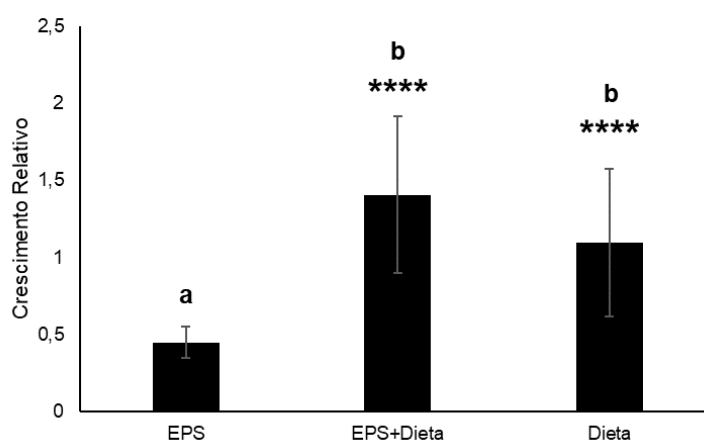


A massa das larvas foi avaliada antes e depois do experimento e o crescimento relativo foi calculado (Figura 5). As larvas alimentadas com EPS apresentaram uma redução drástica de massa (crescimento relativo: $0,449 \pm 0,099$) devido ao consumo de suas reservas. Em contrapartida, nota-se que houve crescimento ou manutenção do tamanho das larvas mantidas em dieta convencional ($1,096 \pm 0,476$) e mista ($1,405 \pm 0,509$) e que estas não diferem estatisticamente. Quanto à taxa de sobrevivência, 88,23% das larvas que consumiram EPS sobreviveram, enquanto 86,36% e 76,00% das tratadas com dieta mista e convencional, respectivamente, permaneceram vivas.

Quando se compara a performance das larvas de *S. levis* consumindo EPS à de outros coleópteros, observa-se um padrão diferente. A maioria dos estudos sobre a biodegradação de plásticos por coleópteros concentra-se na família Tenebrionidae, com destaque para *Tenebrio*

molitor e *Zophobas atratus*. O tempo de criação desses insetos em EPS é muito superior ao observado neste trabalho, ultrapassando 30 dias. Dentro desse período, observou-se uma redução de massa mais sutil, para cerca de 86,2% do peso inicial para *T. molitor* e 87,8 % para *Tenebrio obscurus* (Peng *et al.*, 2019). No caso das *Z. atratus*, a redução é similar, mas a uma taxa mais branda, com uma perda de 51,67% em 30 dias (Jiang *et al.*, 2021b).

Figura 5: Gráfico do crescimento relativo das larvas alimentadas por 5 dias com as dietas restrita ao poliestireno, convencional e mista. As letras a e b representam os grupos com diferença estatística entre si pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os asteriscos indicam o nível de significância da diferença em relação à dieta restrita a EPS.



Quando se compara a criação em laboratório dessas larvas à de *Sphenophorus levis*, nota-se que este último apresenta várias especificações que dificultam e encarecem o processo. A dieta atualmente empregada baseia-se em Degaspari *et al.* (1987), na qual, além de uma fonte celulósica, há suplementação com vitaminas, fonte de aminoácidos (caseína), nutrientes (sais de Wesson), entre outros. Em contrapartida, os insetos da família Tenebrionidae supracitados conseguem crescer e se desenvolver, completando o seu ciclo de vida, com alimentação baseada somente em farelo (*bran*) (Ribeiro, Abelho e Costa, 2018). Assim, alterações abruptas, como a substituição da dieta convencional por um bloco de EPS, parecem ser mais impactantes para o *S. levis* do que para outras espécies. Como nosso interesse é encontrar microrganismos degradadores de PS na cavidade intestinal dos insetos, e não usar o próprio *S. levis* como biorreator na biodegradação do material, não o consideramos um problema.

É importante ressaltar que o fato de as larvas apresentarem decréscimo na massa corpórea com esse tipo de alimentação não significa que o poliestireno não esteja sendo degradado no intestino, nem que não haja assimilação em biomassa. Em experimentos utilizando EPS marcado com carbono-13 na alimentação de *T. molitor*, observou-se que, em 4

dias de alimentação, 20,7% do carbono do material havia sido mineralizado, enquanto somente 0,6% havia sido incorporado à biomassa (Yang *et al.*, 2015b).

Também foi avaliado o consumo de massa de EPS pelas larvas. Observou-se que o consumo médio de EPS das larvas ao longo de 5 dias foi de $6,0 \pm 3,8$ mg. A Figura 4 apresenta o resultado das larvas mantidas em contato com o EPS por 5 dias. Com cerca de um dia de exposição ao EPS, as larvas já iniciaram a mastigação dos blocos do material. Algumas delas apenas roeram a superfície do bloco, enquanto outras formaram galerias, provavelmente para se esconderem da fonte de luz, mimetizando o seu habitat natural no rizoma e na região basal dos colmos de cana-de-açúcar. No entanto, 35,5% das larvas não interagiram com o bloco de EPS. Nota-se que as larvas que não interagiram com o bloco de isopor não foram consideradas nas análises de sobrevivência e de crescimento descritas acima.

4.2 ANÁLISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL DAS LARVAS

4.2.1 Análise dos dados do sequenciamento

O sequenciamento da região V3-V4 da região codificadora do rRNA 16S das três diferentes comunidades bacterianas (intestino de *S. levis* alimentado com dietas: convencional, mista e restrita a EPS) foi realizado e apresentou os parâmetros descritos na Tabela 1. É importante destacar que a baixa qualidade do sequenciamento de uma das réplicas referentes ao intestino de larvas alimentadas com a dieta convencional impossibilitou a inclusão destas nas análises.

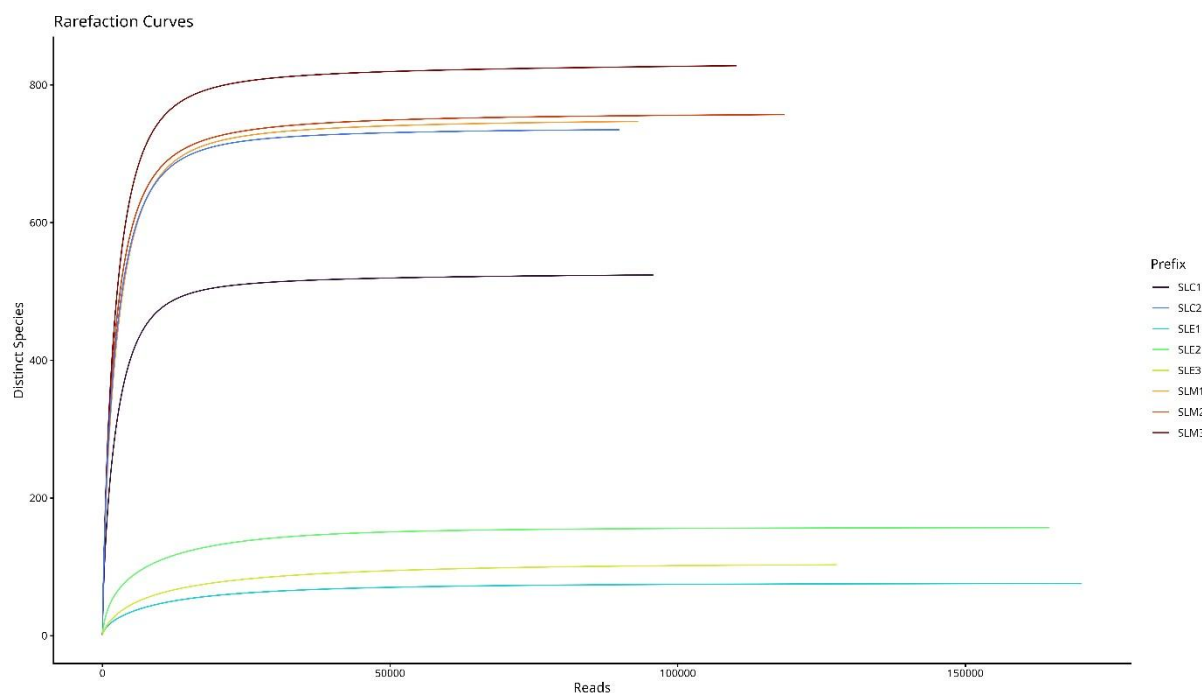
Tabela 1: Número de *reads* geradas para 16S

Sample	Reads	Reads Classified
Dieta convencional	189591	95733/50,49%
	177336	89897/50,69%
	-	-
Dieta mista	175805	93137/52,98%
	218653	118558/54,22%
	210139	110272/52,48%
Dieta restrita (PS)	259529	170229/65,59%
	251610	164547/65,4%
	194557	127608/65,59%

Para uma análise de qualidade, espera-se que as curvas de rarefação (espécies distintas vs. número de reads) (Figura 6) apresentem um achatamento, levando à formação de um platô. Ou seja, a partir de um determinado número de *reads* analisadas, não deve haver incremento de espécies na análise. Isso significa que ocorreu uma amostragem da maior parte da diversidade contida nas bibliotecas, ou seja, uma suficiência amostral adequada. Assim, permitindo uma caracterização mais eficaz da biodiversidade das comunidades e comparações confiáveis entre

os grupos. A ausência de crescimento contínuo nas curvas reduz a probabilidade de subestimação da diversidade e confere robustez às inferências subsequentes.

Figura 6: Curvas de rarefação utilizadas para indicar a suficiência amostral. O eixo y mostra o número de espécies distintas em função do número de *reads* observadas. (SLC) Dieta Convencional. (SLE) Dieta Restrita a EPS. (SLM) Dieta Mista.

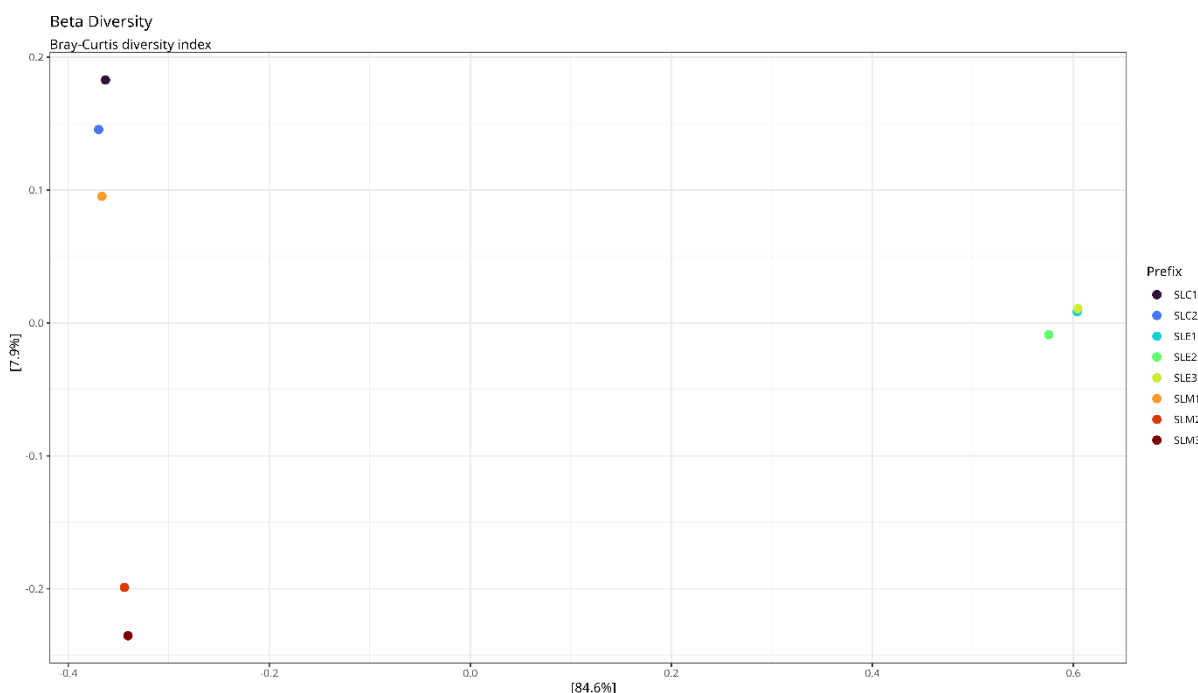


4.2.2 Análise da Diversidade Bacteriana

A utilização de marcadores para identificação de espécies, a partir do sequenciamento associado à abundância dos *reads*, permite estabelecer correlações que permitem inferir sobre a diversidade das amostras. A beta-diversidade estima a similaridade entre populações. A abordagem denominada Dissimilaridade de Bray-Curtis considera tanto o tamanho (abundância geral por amostra) quanto a forma (abundância de cada táxon) das comunidades. Esta análise é apresentada na forma de um gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Figura 7). Nota-se, dessa maneira, que a diversidade das dietas convencional e mista forma clusters independentes, mas não diferem muito entre si. Isso fica evidente quando se observa que a posição no eixo das abcissas é praticamente a mesma e a variação no eixo das ordenadas é bastante reduzida. A partir da similaridade entre as comunidades, pode-se inferir duas situações distintas. Ou os insetos conseguiram selecionar a dieta durante a alimentação mista, desprezando o poliestireno expandido, ou a coalimentação com a dieta tradicional foi suficiente para manter o padrão do microbioma. Por outro lado, quando se comparam as dietas mista e convencional com a restrita a EPS, a distância vetorial é bastante significativa, indicando uma

grande divergência entre as comunidades, o que fica bastante claro nos gráficos de abundância relativa (Figura 8).

Figura 7: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) apresentando a distribuição da beta-diversidade com base na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis. (SLC) Dieta Convencional. (SLE) Dieta Restrita a EPS. (SLM) Dieta Mista.



A alfa-diversidade (Tabela 2) refere-se à diversidade intrínseca e denota a riqueza de espécies em uma comunidade funcional. O índice de Shannon mede a diversidade de uma população, assumindo que todas as espécies estão representadas na amostra e que a amostragem foi aleatória. O índice aumenta quando a riqueza (número de espécies) e a uniformidade aumentam. O índice de Simpson considera o número de táxons e a sua abundância, mas dá mais ênfase às espécies mais abundantes, ou seja, há menor influência de organismos raros. Nota-se que, nas microbiotas associadas às dietas mista e convencional, houve uma maior diversidade intrínseca, o que não ocorreu para aquelas relacionadas à alimentação restrita a EPS.

Há mais de uma década, o nosso grupo de pesquisa já havia publicado a análise da diversidade microbiana de *S. levis* (Rinke *et al.*, 2011). Com uma metodologia baseada em clonagem e sequenciamento dideoxi, foram avaliadas as diferenças entre os microbiomas dos intestinos de larvas criadas em laboratório e de coletadas no campo. O gênero mais abundante em ambas as condições foi o *Candidatus Nardonella* (denominado “*Candidatus*” por não ter sido isolado), assim como nos insetos alimentados com poliestireno. Esse táxon já foi descrito em vários insetos da família Curculionidae, tais como *Rhynchophorus ferrugineus* (Chouaia *et*

al., 2021), *Euscepes postfasciatus* (Kuriwada *et al.*, 2010) e *Metamasius hemipterus* (Palmieri, Pavarini e Sharma, 2022), como um endossimbionte recorrente. Seu genoma é bastante reduzido (cerca de 0,2 Mb), embora codifique os aparatos completos para replicação, transcrição e tradução. Entretanto, carece da maioria dos genes de outras rotas metabólicas, o que indica sua dependência quase completa do hospedeiro. Notavelmente, um conjunto de genes foi mantido nos genomas dos *Nardonella*: os relacionados à rota de síntese da tirosina. Os gorgulhos possuem uma cutícula dura, e esse aminoácido é o principal precursor para a formação desse revestimento. Assim, esse endossimbionte deve ter evoluído de modo a manter uma única função biológica: o fornecimento de tirosina, a fim de sustentar o exoesqueleto altamente esclerotizado do inseto (Anbutsu *et al.*, 2017).

Figura 8: Gráficos da abundância relativa a nível de gênero – Comunidade Bacteriana. (SLC) Dieta Convencional. (SLE) Dieta Restrita a EPS. (SLM) Dieta Mista.

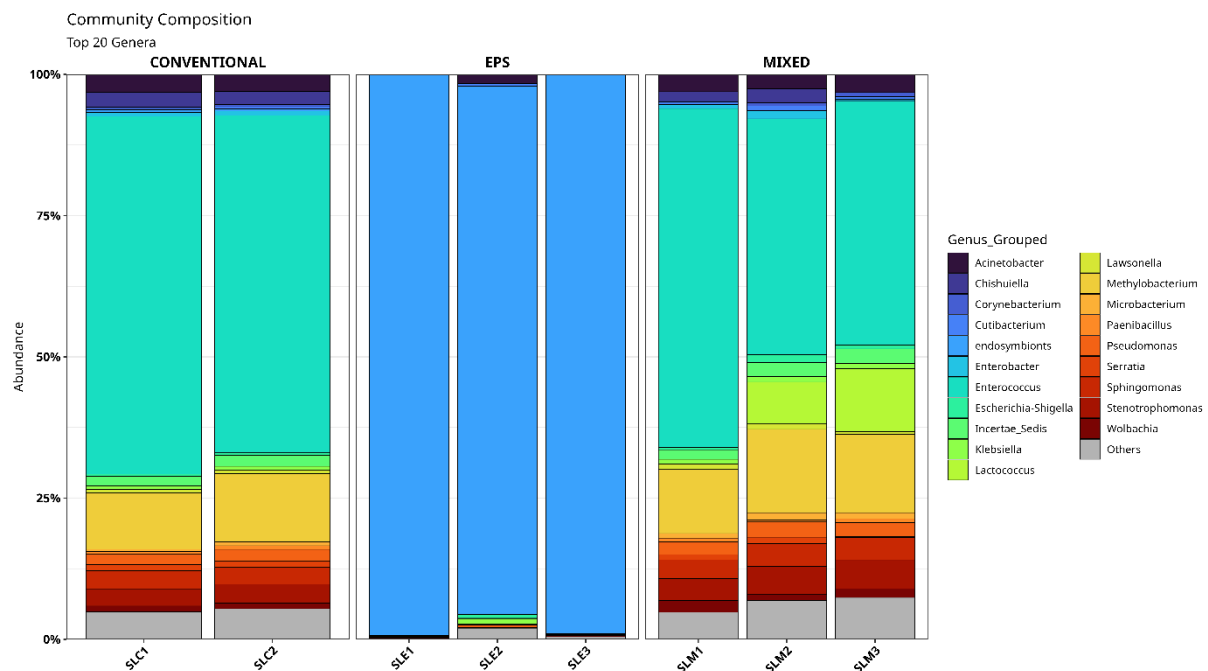


Tabela 2: Índices de alfa-diversidade (Shannon e Simpson) da comunidade bacteriana em nível de espécie.

Amostra	Shannon Index (H)	Simpson Index
Dieta convencional	3,7215	0,8516
	4,4995	0,9137
	-	-
Dieta mista	4,3554	0,8998
	4,6437	0,9420
	4,6056	0,9297
Dieta restrita (PS)	0,2218	0,0581
	0,6192	0,1609
	0,2447	0,0616

Os endossimbiontes *Nardonella* geralmente não são componentes do lúmen intestinal. Na verdade, estão presentes nos bacteriomas localizados na junção entre o intestino anterior e o intestino médio (Anbutsu *et al.*, 2017). Eles estão fisicamente aderidos à parede externa do trato digestório. Portanto, ao remover o intestino para análise, invariavelmente são coletados os bacteriomas e todo o DNA da *Nardonella*. A alimentação com poliestireno resultou em uma super-representação desse táxon nas análises. Isso pode ocorrer devido ao estresse nutricional a que as larvas foram submetidas, reprimindo as bactérias do lúmen intestinal.

Em contrapartida, as dietas mista e convencional apresentam em sua composição o gênero *Enterococcus* como mais predominante, o que foi observado para outros curculionídeos. A microbiota de indivíduos adultos do gorgulho sul-americano da palmeira (*Rhynchophorus palmarum*), tem esse gênero como o mais abundante em sua microbiota intestinal (Calumby *et al.*, 2022), assim como o gorgulho do agave (*Scyphophorus acupunctatus*) quando alimentados em *Agave salmiana* (Salazar-Rivera *et al.*, 2024). Nos estudos com a larva do bicudo-vermelho-das-palmeiras, as análises por metabarcoding indicaram que este seria o segundo gênero bacteriano mais abundante, embora tenha sido o mais recorrente quando o conteúdo intestinal foi cultivado em meio ágar nutriente (Farzane Basavand *et al.*, 2024). Curiosamente, nos trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa, esse gênero não foi encontrado no intestino das larvas de *Sphenophorus levis* (Rinke *et al.*, 2011). Estudos indicam que os *Enterococcus* desempenham um papel importante para o hospedeiro, protegendo-o contra invasões de patógenos e contribuindo para a resistência a inseticidas e toxinas (Grau, Vilcinskis e Joop, 2017; Li, S. *et al.*, 2021; Vilanova *et al.*, 2016).

Quando se comparam as dietas mista e convencional, nota-se um incremento na abundância do gênero *Lactococcus*. O aumento da porcentagem de reads referentes a esse gênero já foi descrito previamente em outros insetos que se alimentaram de poliestireno expandido. Larvas de *Plesiophthalmus davidis* foram submetidas à alimentação com o polímero e a presença de *Lactococcus* se elevou dez vezes (Woo, Song e Cha, 2020). Fenômeno similar foi observado para larvas de *Tenebrio molitor* (Tsochatzis *et al.*, 2021). O gênero também foi correlacionado à alimentação de PS em larvas de *Rhynchophorus ferrugineus*, um curculionídeo como o *S. levis* (Danmek *et al.*, 2025).

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS CANDIDATAS À BIODEGRADAÇÃO DE PS

Após 60 dias de cultivo em LCFBM contendo filmes de poliestireno, observou-se que o meio se tornou turvo-esbranquiçado e que havia biofilme sobre os polímeros. O conteúdo do meio foi espalhado em LB ágar para identificação de colônias com morfologias distintas, com posterior isolamento. Foram isolados cinco micro-organismos, cujos DNA totais foram extraídos e a região V3-V4 sequenciada pelo método de dideoxi. Foram encontrados os gêneros *Bacillus* sp., *Lysinibacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Cytobacillus* sp. e *Raoultella* sp.. As sequências da região V3-V4 de cada uma das cepas isoladas estão disponíveis no APÊNDICE A.

4.3.1 *Bacillus* sp.

Caracterizado por suas células em forma de bastonete, o gênero abrange espécies de características variadas. A sua morfologia pode ser reta ou curvada, estando solitária ou organizada em pares, cadeias ou, ocasionalmente, em longos. A formação de endósporos é característica, mas ocorre apenas um por célula. Essas estruturas são classificadas como bastante resistentes a uma variedade de condições adversas (Logan e Vos, 2015). Linhagens desse mesmo gênero foram previamente isoladas da microbiota intestinal de *S. levis*, tanto de larvas oriundas do campo, como de criadas em laboratório (Rinke *et al.*, 2011).

O gênero *Bacillus* já foi descrito diversas vezes interagindo com o poliestireno e degradando-o. Auta, Emenike e Fauziah (2017) isolaram duas linhagens de *Bacillus* a partir de um manguezal na Malásia Peninsular. *B. cereus* e *B. gottheilii* foram avaliados frente a microplásticos de PS, promovendo reduções de 7,4% e 5,6% na massa, respectivamente. Uma cepa de *B. paralicheniformis*, isolada de uma fossa marítima, foi cultivada com filmes de PS, a partir dos quais foi observada degradação do material. Esta foi comprovada por meio de perda de massa e de métodos espectroscópicos, como FT-IR e NMR (ressonância magnética nuclear). Ademais o genoma do microrganismo foi sequenciado e genes candidatos a atuantes no processo de degradação foram apontados: mono-oxigenase, dioxigenase, peroxidase, esterase e hidrolase (Ganesh Kumar *et al.*, 2021). Por fim, uma linhagem de *Priestia megaterium* (previamente denominada *Bacillus megaterium*) foi isolada do intestino de *Zophobas morio* (Coleoptera) e apresentou-se como um candidato potencial ao processo de despolimerização de PS (Meng *et al.*, 2021).

4.3.2 *Paenibacillus* sp.

Os *Paenibacilli* são organismos Gram-positivos em forma de bastão, com 2 a 5 µm de largura e 0,5 a 0,8 µm de diâmetro. Todas as espécies produzem endósporos com diâmetro maior que o da célula-mãe. Geralmente, suas colônias são pequenas e não pigmentadas e podem apresentar motilidade (Priest, 2015). Geralmente esse gênero é encontrado em amostras clínicas, de água e de solo. Notavelmente, algumas pesquisas demonstraram que essas bactérias estão presentes na rizosfera de plantas de cana-de-açúcar e atuam como agentes fixadores de nitrogênio (Singh *et al.*, 2020). Além disso, já foram descritas como endofíticas importantes no controle de patologias da cana-de-açúcar (Jayakumar, Ramesh Sundar e Viswanathan, 2019). Diante do fato de que a cana-de-açúcar é a principal fonte nutricional do *S. levis*, inclusive em dietas artificiais, o consumo desse material tem levado ao estabelecimento de bactérias no intestino das larvas. Essa observação alinha-se aos dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo. Não foi a primeira vez que uma linhagem de *Paenibacillus* foi isolada de *S. levis*. Rinke *et al.* (2011) obtiveram o microrganismo a partir de larvas criadas em laboratório e caracterizaram sua atividade lignocelulolítica. Além disso, nas análises de metabarcoding (seção 4.2), esse gênero está entre os 20 mais abundantes na microbiota.

O gênero *Paenibacillus* já foi descrito como um agente potencial para a degradação de plásticos. Em 2019, verificou-se que uma linhagem desse gênero, isolada de um aterro sanitário no Brasil, era capaz de degradar sacolas de polietileno. Além do surgimento de grupos funcionais e da cisão de ligações, houve perda de massa. Acredita-se que uma alcana hidrolase (AlkB) estaria relacionada com o processo (Bardají, Furlan e Stehling, 2019). Além disso, uma linhagem isolada de solo marinho foi capaz de degradar polietileno de baixa densidade (LDPE), com expressiva redução de massa (Mallisetty *et al.*, 2023). Uma linhagem de *Paenibacillus urinalis* isolada de solo apresentou indícios de degradação de poliestireno, o que foi comprovado a partir da avaliação de produtos de degradação por HPLC (Atiq *et al.*, 2010).

4.3.3 *Lysinibacillus* sp.

O gênero *Lysinibacillus* sp. consiste em bactérias Gram-positivas e aeróbicas, bastonetes em estrutura, que são capazes de formar endósporos protuberantes localizados terminalmente. Diferem dos outros Bacillaceae pela composição do peptidoglicano da parede celular (L-Lys-D-Asp (A4α)) (Failor *et al.*, 2019). Linhagens desse gênero já foram descritas interagindo com o poliestireno e degradando-o. A partir de amostras de solo de aterro sanitário na China, foi isolada uma cepa de *Lysinibacillus*, que foi testada contra microplásticos de PS. Foram observadas perda de massa e alterações na estrutura física e química, tornando o material mais

hidrofílico e suscetível à quebra (Wang *et al.*, 2024). Recentemente, a microbiota intestinal de outro organismo da família Curculionidae (a mesma do *S. levis*) foi acessada com o objetivo de identificar microrganismos degradadores de PS. Uma linhagem de *Lysinibacillus* sp. foi isolada de *Rhynchophorus phoenicis* e demonstrou potencial para degradar o polímero, comprovado por ensaios de redução de massa e pela avaliação da composição química da superfície por FT-IR (Immanuel e Isaiah, 2024).

4.3.4 *Cytobacillus* sp.

Anteriormente (até 2020), pertencentes ao gênero *Bacillus*, os *Cytobacilli* são caracterizados por sua forma em bastonete, pela parede celular Gram-positiva e pela capacidade de formar endósporos em condições ambientais ou nutricionais adversas. Formam um clado monofilético que os distingue dos demais *Bacilli* filogeneticamente, além de serem caracterizados por 3 CSIs (inserções ou deleções de sequências de assinatura conservadas) (Patel e Gupta, 2020). Organismos do gênero *Cytobacillus* já foram descritos como potenciais degradadores de poliestireno. Fragmentos de EPS de um manguezal na China foram utilizados como fonte de micro-organismos para uma cultura de enriquecimento visando o isolamento daqueles potenciais. Indivíduos do gênero faziam parte do consórcio microbiano, e quando testados frente a um filme de PS, demonstraram alterar o ângulo de contato, as características físico-químicas, além das alterações estruturais de superfície (Liu *et al.*, 2023).

4.3.5 *Raoultella* sp.

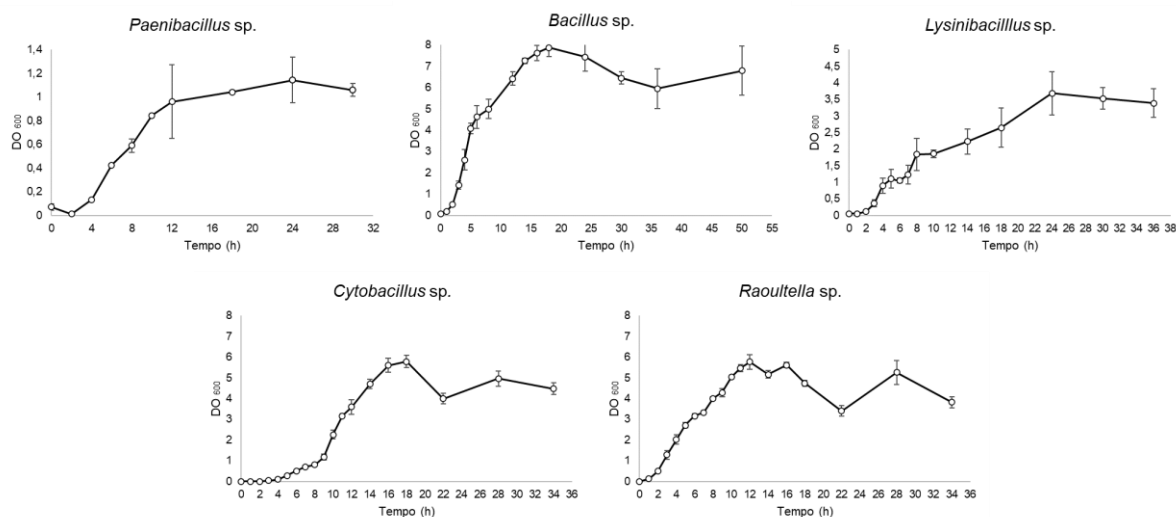
O gênero *Raoultella* (Enterobacteriaceae) agrupa bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos. Esses microrganismos em forma de bastonete não são encapsulados nem possuem mobilidade. Quando cultivadas em meio sólido, crescem formando colônias mucosas devido à síntese de uma cápsula de polissacarídeos (Sękowska, 2017). Nos estudos de Rinke *et al.* (2011), esse gênero correspondeu ao terceiro mais abundante entre as larvas coletadas em campo. Recentemente, uma cepa do gênero *Raoultella* foi isolada a partir de solo contaminado com petróleo. Esta foi testada como agente biodegradador de poliestireno e polietileno, apresentando modificações estruturais e químicas nas superfícies dos filmes, bem como perda de massa. Seu genoma completo foi sequenciado e selecionadas enzimas candidatas relevantes, tais como hidrolases e oxidases (Yuan *et al.*, 2023).

4.4 CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO

Antes de serem submetidas à experimentação quanto à capacidade de interagir com o poliestireno e degradá-lo, foi construída uma curva de crescimento para cada uma delas (Figura

9). Isso foi realizado para determinar a densidade óptica (DO) e o tempo de cultivo necessário para atingir a fase logarítmica de crescimento, etapa em que os microrganismos estariam metabolicamente ativos.

Figura 9: Curva de Crescimento em LB (densidade óptica em função do tempo), para as diferentes linhagens isoladas do intestino de *S. levis* após o enriquecimento.



A fase *lag* de quatro dos microrganismos isolados é bastante curta, não ultrapassando 4 horas. *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Raoultella* apresentaram rápida adaptação ao meio de cultura, o que sugere que o ambiente atendeu satisfatoriamente às exigências nutricionais iniciais e que o inóculo estava em estado metabólico ativo. Em contraste, a linhagem de *Cytobacillus* permaneceu por quase dez horas na fase *lag*, indicando a possibilidade de maior complexidade metabólica ou de indução de sistemas específicos de transporte de nutrientes, anteriores ao início da divisão celular acelerada.

A fase log variou entre as linhagens isoladas. As linhagens de *Bacillus*, *Cytobacillus* e *Raoultella* apresentaram crescimento em patamares de densidade óptica superiores a 6,0, atingindo o platô entre 10 e 15 horas. A cepa de *Lysinibacillus* apresenta uma fase exponencial mais lenta em comparação às demais, demorando cerca de 24 horas para atingir a fase estacionária, com DO₆₀₀ próxima de 4,0. Por fim, a linhagem de *Paenibacillus* apresenta proliferação lenta e limitada, pois atinge o platô com densidade óptica de 1,0 em 12 horas, a menos que a baixa densidade óptica observada decorra de alguma questão morfológica, como a translucidez (células com menor índice de refração espalham menos luz) observada em suas colônias.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS QUANTO À HABILIDADE DE MODIFICAR O POLIESTIRENO

As bactérias foram cultivadas e coletadas na fase logarítmica para plaqueamento em CFBM sólido e recobrimento com filme de PS, para avaliação de sua ação sobre o polímero ao longo de 60 dias. Nenhuma mudança visível a olho nu foi observada nos filmes tratados com *Lysinibacillus* sp., ao contrário dos que tiveram contato com *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Raoultella* sp. e *Cytobacillus* sp.. Nota-se a formação de um provável biofilme que se estende ao longo do polímero, inclusive nas extremidades, como observado em experimentos com *Pseudomonas* sp. e *Exiguobacterium* sp. (Kim *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2015). A linhagem de *Bacillus*, especificamente, apresentou massas celulares pontuais, provavelmente colônias, o que também foi observado em filmes tratados com *Pseudomonas* sp. (Kim *et al.*, 2020).

Os filmes foram submetidos à análise por MEV. A Figura 10 apresenta os filmes controle em diferentes magnificações. Nota-se que sua superfície é homogênea e contínua, caracterizada por topografia lisa, sem deformações e pela ausência de estruturas associadas à atividade biológica. A inexistência de fissuras profundas ou cavidades pronunciadas nesta amostra reforça a hipótese de que as alterações observadas nos tratamentos inoculados decorrem da presença e da atividade dos microrganismos. Em contrapartida, diversas amostras submetidas à incubação com bactérias apresentaram sinais evidentes de colonização microbiana (Figura 11, Figura 12, Figura 13 e Figura 14). Em alguns casos, observou-se a formação de estruturas tridimensionais associadas à matriz extracelular, sugerindo o desenvolvimento de biofilmes sobre o material. A formação de biofilmes constitui um mecanismo amplamente descrito em processos de biodeterioração de polímeros, uma vez que favorece o contato prolongado entre as células microbianas e o substrato e possibilita a concentração local de enzimas e metabólitos capazes de promover modificações na superfície do material. Além da colonização, os filmes registraram uma série de modificações morfológicas. A erosão superficial, na forma de cavidades, rachaduras e fissuras, foi observada com recorrência.

A cepa de *Bacillus* apresentou ampla distribuição na extensão do polímero (Figura 11). Sua ação manifestou-se, em sua maioria, sob a forma de cavidades rasas. Destaca-se a forma como essas bactérias interagem com o filme; provavelmente há liberação de alguma secreção ou até mesmo a formação de estruturas fibrilares que conectam as bactérias à superfície do filme, como indicado por Cucini *et al.* (2022) para *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Klebsiella* isolados de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera) e por Who *et al.* (2020) para *Serratia* sp. isolado de *Plesiophthalmus davidis* (Coleoptera). Nos filmes em que houve contato com

Paenibacillus, observa-se o acúmulo do microrganismo em regiões da superfície e a formação de rachaduras profundas, onde o microrganismo e o material extracelular se acumulam (Figura 12). A estirpe de *Raoultella* isolada também pode ser responsável pela formação de cavidades e interagir de forma diferente com o filme, parecendo enterrar-se nele (Figura 13). Por fim, a linhagem de *Cytobacillus* parece modificar a superfície de forma superficial, por meio de rachaduras, por exemplo (Figura 14). Um perfil semelhante foi observado em filmes tratados com *Massilia* sp. (Jiang et al., 2021a) e *Cellulosimicrobium* sp. (Lin et al., 2024). A cepa de *Lysinibacillus* sp. não apresentou modificações nem proliferação.

Figura 10: Mosaico de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poliestireno do grupo controle, incubados na ausência de microrganismos, após o período experimental.

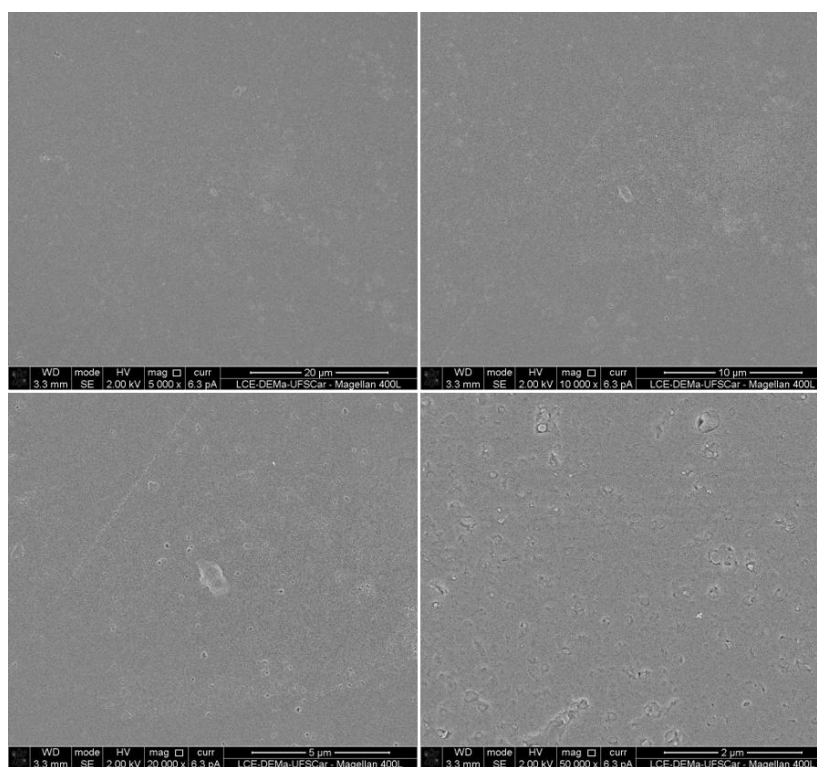


Figura 11: Mosaico de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poliestireno incubados com *Bacillus* sp., após o período experimental.

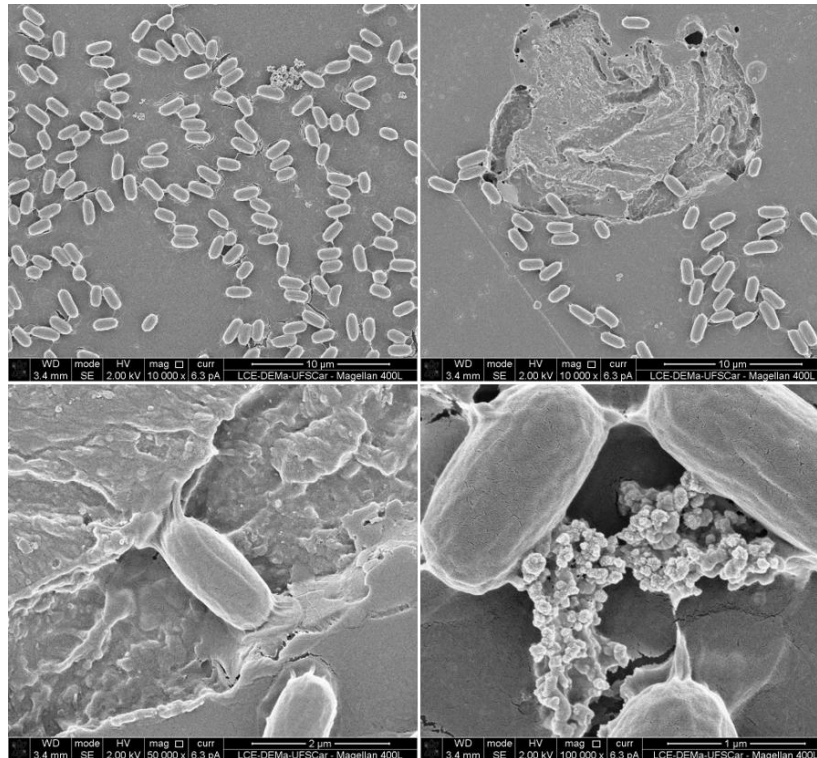


Figura 12: Mosaico de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poliestireno incubados com *Paenibacillus* sp., após o período experimental.

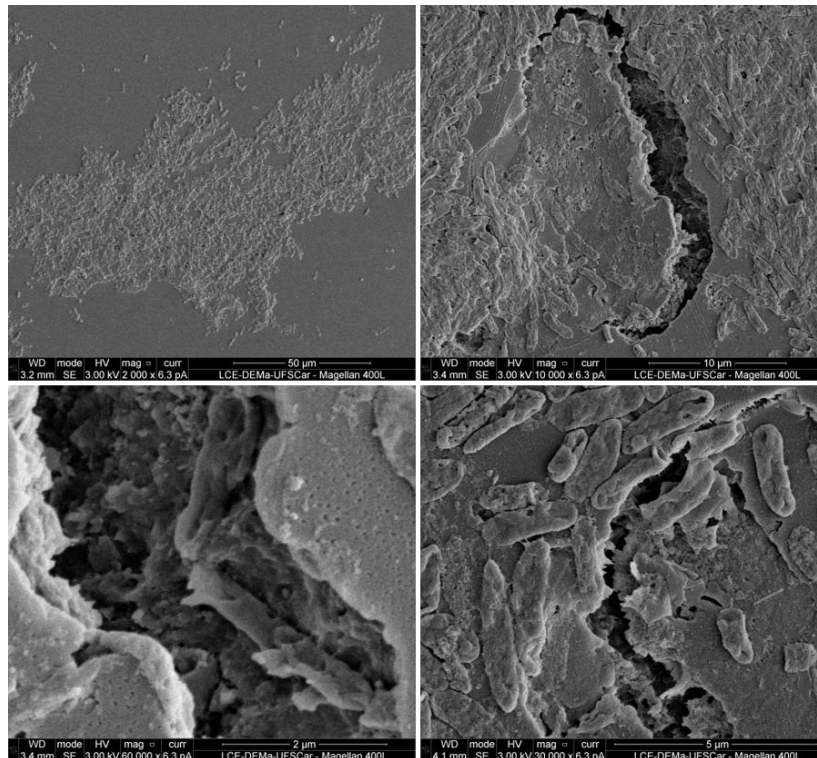


Figura 13: Mosaico de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poliestireno incubados com *Raoultella* sp., após o período experimental.

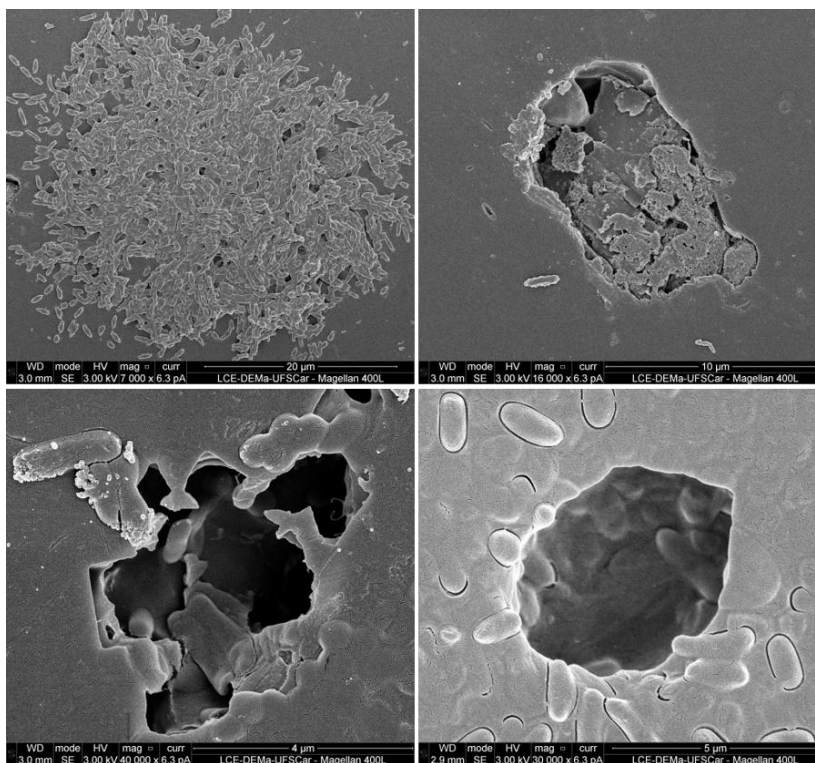
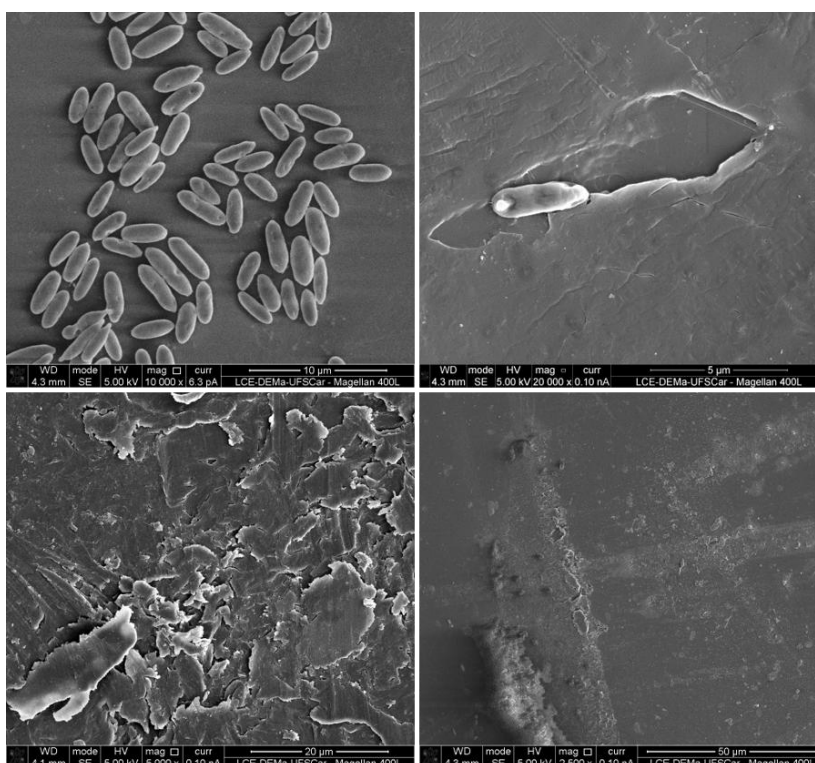


Figura 14: Mosaico de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes de poliestireno incubados com *Cytobacillus* sp., após o período experimental.



A análise por Espectroscopia de Dispersão de Energia apresentada na Figura 15 para *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Raoultella* sp. e *Cytobacillus* sp. permitiu observar uma

mudança na estrutura química da superfície do polímero, especialmente no interior das regiões afetadas pela ação microbiana. Nas regiões não afetadas, observa-se que há praticamente pixels em ciano, que representam o carbono. Como é de se esperar, nessas regiões encontram-se regiões do polímero que não sofreram o processo oxidativo, pois o poliestireno é um material composto apenas por carbono e hidrogênio. Em contraste, nota-se o surgimento e o acúmulo de átomos de oxigênio, representados em amarelo, em oposição aos de carbono. Esse fenômeno provavelmente está associado ao processo oxidativo mediado pelas bactérias, tornando a superfície mais hidrofílica e mais suscetível à depolimerização. Fenômeno similar foi observado em linhagens de *Pseudomonas* sp. e de *Massilia* sp., por exemplo (Jiang et al., 2021a; Kim et al., 2020).

A medida do ângulo de contato indicou que o ângulo observado no controle foi de $95,71^{\circ} \pm 3,31^{\circ}$, enquanto os filmes submetidos a tratamento com *Paenibacillus* sp. e *Bacillus* sp. apresentaram valores de $69,14^{\circ} \pm 9,05^{\circ}$ e $67,31^{\circ} \pm 8,48^{\circ}$, respectivamente, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 16). Isso indica que o contato com as bactérias tornou o filme de PS mais hidrofílico.

A superfície dos filmes foi caracterizada por FTIR-ATR para comparar os grupos funcionais formados após a ação bacteriana (Figura 17). O espectro gerado para *Paenibacillus* sp. permitiu observar uma protuberância na região de 3100 a 3600 cm^{-1} . Essa região é característica do grupamento hidroxila (Silverstein, Webster e Kiemle, 2005). O processo de biodegradação de PS é dividido em duas etapas distintas: é necessária, primeiramente, a oxidação das cadeias C-C do polímero. Estruturas gráficas semelhantes, de mesma magnitude, foram observadas para PS em contato com *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. e *Cellulosimicrobium* sp. (Kang, Kwak e Kim, 2023; Kim et al., 2020; Lin et al., 2024). Na região de 1600–1680 cm^{-1} há uma elevação na curva. Alterações nessa região podem estar associadas a ligações C=C (1600-1680 cm^{-1}) ou C=O (1650-1760 cm^{-1}). Embora houvesse evidência de oxidação observada no EDS e na análise por ângulo de contato, não houve diferença entre os tratamentos com *Bacillus* sp., *Cytobacillus* e *Raoultella* sp. e o controle.

Figura 15: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), com mapeamento elemental por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS), evidenciando a distribuição dos átomos de carbono e oxigênio nos filmes de poliestireno (PS) após a ação bacteriana. À esquerda, as micrografias; à direita, os mapeamentos. (A) *Bacillus* sp. (B) *Paenibacillus*.sp. (C) *Raoultella* sp. (D) *Cytobacillus* sp. Em ciano, o carbono; em amarelo, o oxigênio. Os átomos de oxigênio se concentram nas regiões afetadas.

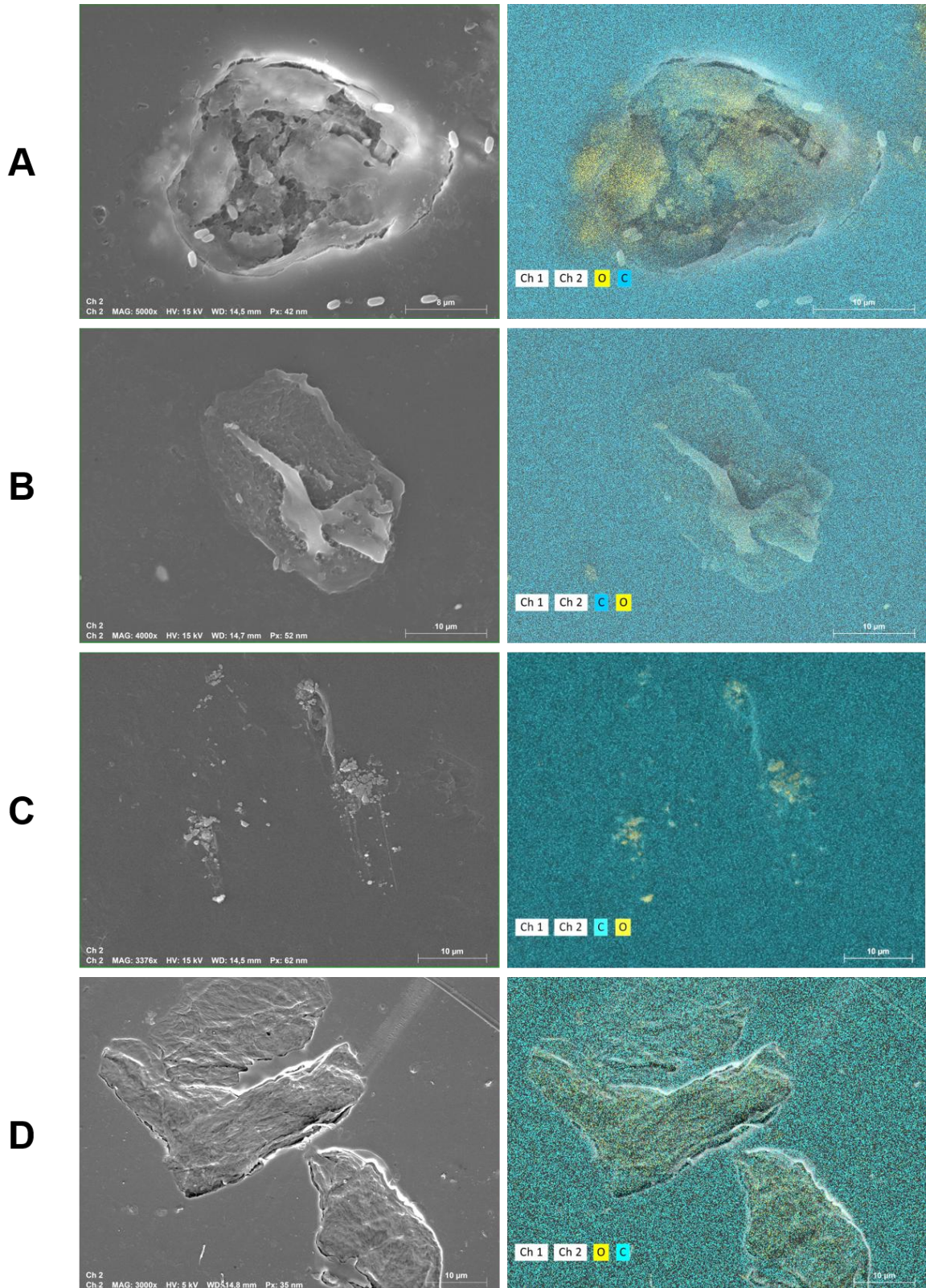


Figura 16: Ângulo de contato com a água (WCA) dos filmes de poliestireno (PS) após incubação com as bactérias por 60 dias. (A) Controle. (B) *Bacillus* sp. (C) *Paenibacillus* sp..

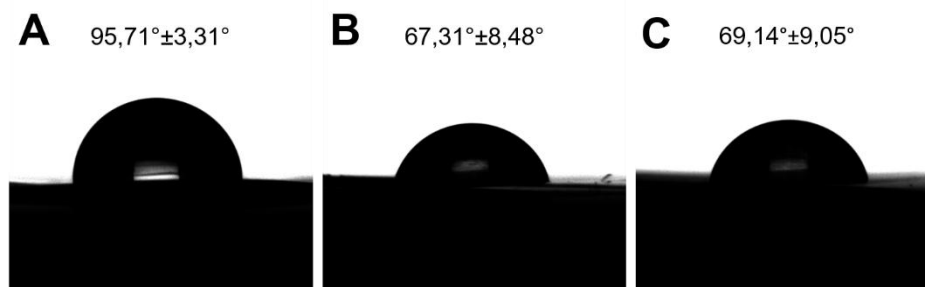
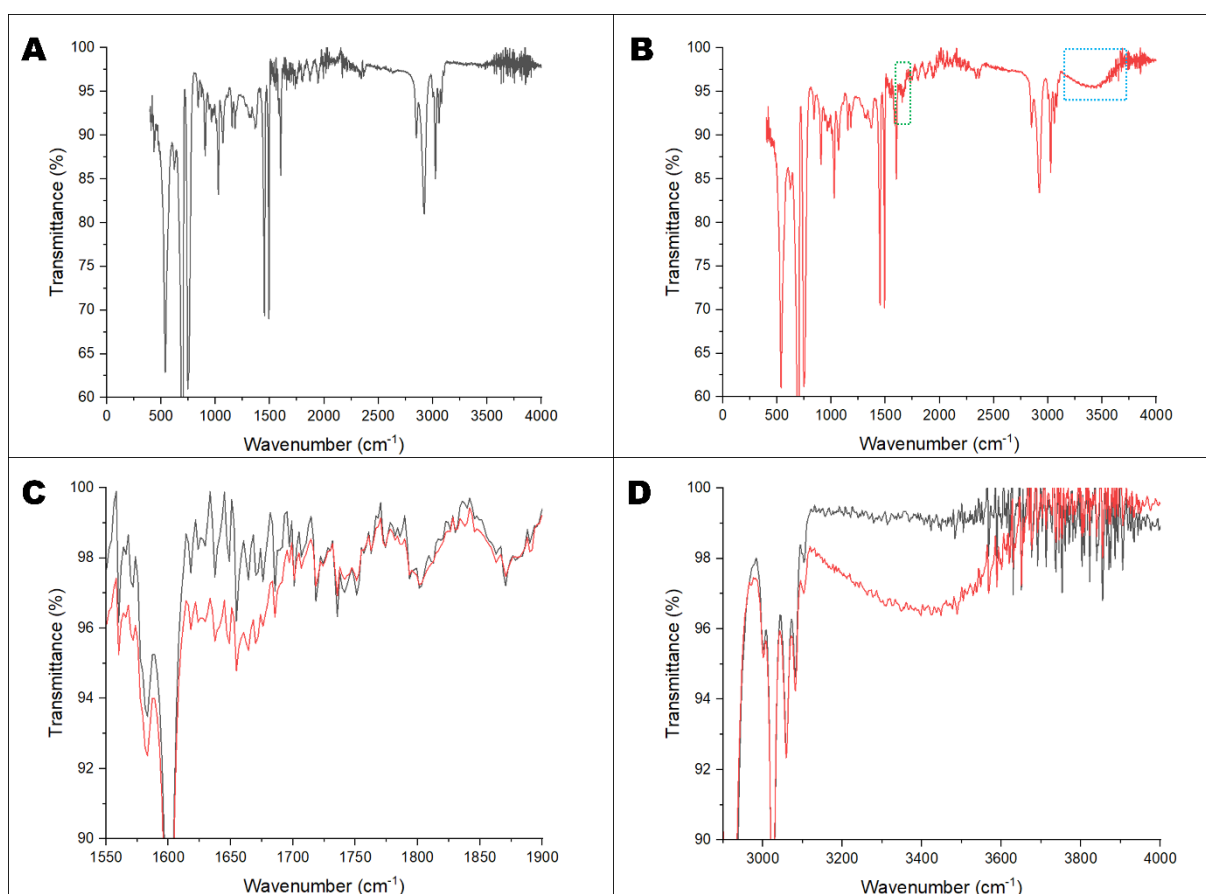


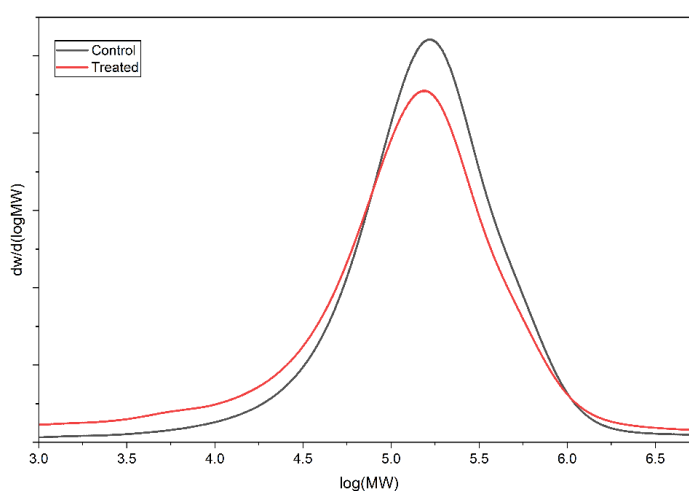
Figura 17: Espectros gerados por FTIR-ATR dos filmes de PS em contato com *Paenibacillus* após 60 dias em comparação ao controle. (A) Em preto, controle. (B) Em vermelho, tratado. A sobreposição da área destacada em verde é ampliada em C, e a em azul é ampliada em D em relação ao controle. (C) Comparação entre o filme controle e o tratado em região característica de ligações C=O ou C=C. (D) Comparação entre o filme controle e o tratado em região característica de hidroxilas.



Como o *Paenibacillus* foi a única estirpe a apresentar resultados positivos no FT-IR, os ensaios de avaliação da redução da massa molecular foram conduzidos apenas com essa estirpe. Os filmes de PS foram incubados em meio líquido contendo bactérias por 60 dias. Uma perda de massa de $3,73 \pm 0,57\%$ em relação ao montante inicial de polímero foi observada. Os mesmos filmes foram investigados com base nas modificações no peso molecular. A Figura 18 apresenta a distribuição de peso molecular no filme de poliestireno, medida por GPC, após 60

dias de contato com a bactéria, em comparação com o controle. A distribuição se desloca para um peso molecular menor, indicando que a degradação da cadeia ocorreu na presença de bactérias, como observado em *Exiguobacterium* sp. (Yang *et al.*, 2015a) e *Acinetobacter* sp. (Wang *et al.*, 2020). É importante ressaltar que as bactérias provavelmente atuaram na superfície dos filmes. Entretanto, para a análise por GPC, todo o filme foi dissolvido na fase móvel, de modo que a grande maioria da massa analisada provém do núcleo, e não da superfície, onde se espera a principal redução da massa molar média decorrente da degradação bacteriana. Desse modo, esperava-se que a mudança na massa molecular média fosse pequena, embora observável.

Figura 18: Gráfico gerado por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) para os filmes de poliestireno (PS) em contato com *P. lautus* durante 60 dias em contraste ao controle. A figura mostra a distribuição de peso molecular de um filme de PS, obtida por GPC, após 60 dias de contato com a bactéria, em comparação com o controle.



CAPÍTULO 2: EXPLORAÇÃO DOS GENOMAS DAS BACTÉRIAS ISOLADAS EM FUNÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CANDIDATAS

1 INTRODUÇÃO

As alterações morfológicas e químicas observadas no poliestireno após a incubação com bactérias isoladas do intestino de *S. levis* indicam a ocorrência de processos biológicos capazes de modificar esse polímero. Diante desses resultados, torna-se relevante investigar os mecanismos moleculares subjacentes a esse fenômeno, com ênfase na identificação de proteínas potencialmente envolvidas na biodegradação do material.

1.1 ASPECTOS MOLECULARES NA BIODEGRADAÇÃO DE POLIESTIRENO

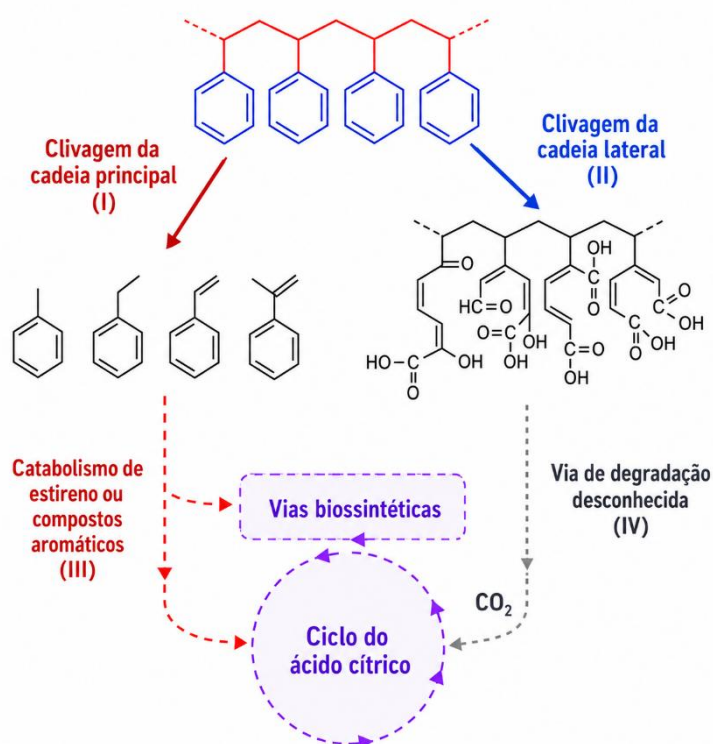
A aderência de microrganismos à superfície do polímero é uma etapa essencial para a biodegradação do PS. À medida que se ligam às superfícies, colonizam a área e formam um biofilme, enquanto secretam proteínas e substâncias poliméricas extracelulares. As enzimas despolimerizadoras são secretadas no ambiente extracelular e, em conjunto com os materiais excretados, medeiam a conversão de substratos hidrofóbicos, formando uma superfície mais hidrofílica. Isso acentua a aderência dos microrganismos e enzimas aos substratos-alvo (Hou e Majumder, 2021; Kim *et al.*, 2020). A partir disso, a decomposição do polímero inicia-se com a quebra das macromoléculas, então insolúveis, em fragmentos menores, que podem ser internalizados e metabolizados. Embora as vias de degradação do poliestireno não estejam claramente elucidadas, propõe-se que possam ocorrer de duas maneiras (Figura 19). De acordo, com a estrutura química do polímero (Figura 2), tanto o carbono beta da cadeia (o carbono da cadeia principal que não está ligado diretamente ao grupo fenil) como o anel aromático podem ser atacados por enzimas resultando em fragmentos menores do polímero.

A clivagem da cadeia principal deve resultar no estireno e em compostos com estruturas análogas a ele; estes devem passar pelo catabolismo do estireno ou dos anéis aromáticos. O PS, com os anéis processados, pode então ser decomposto em hidrocarbonetos de cadeia curta por vias de degradação ainda desconhecidas. Os produtos de qualquer uma dessas vias devem integrar o metabolismo energético microbiano e ser mineralizados em CO₂ pelo ciclo do ácido cítrico (Hou e Majumder, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

Hou e Majumder (2021) analisaram o genoma de uma série de espécies/estirpes destacadas como potenciais no processo de biodegradação de PS e identificaram uma série de enzimas funcionais nessas vias. Dentre todas as enzimas examinadas, alceno hidroxilase, monooxigenase, citocromos P450, hidroxilases de anel aromático e esterases/alpha/beta-hidrolases. As alceno hidroxilases, as monooxigenases e os citocromos P450 atuam principalmente no carbono β da cadeia e desempenham um papel importante na clivagem da

cadeia principal. Elas também podem ser importantes na via de degradação desconhecida (que se inicia na cadeia lateral), junto às hidroxilases de anel aromático, para despolimerizar ainda mais o polímero de PS (poliestireno). Essas, como oxidorredutases, têm maior probabilidade de decompor o PS em comparação com hidrolases, como esterases e alfa/beta-hidrolases. Pelo fato de o polímero não apresentar ligações éster, essas enzimas devem apresentar um papel menos significativo nesse contexto. As esterases, pertencentes às hidrolases (EC 3.1.1), exibem ampla especificidade de substrato em relação a oxoésteres e tioésteres de diversos ácidos graxos (Wei e Zimmermann, 2017). As alfa/beta hidrolases podem atuar como hidrolases, liases, transferases, precursores hormonais ou transportadores, chaperonas ou roteadores de outras proteínas (Lenfant *et al.*, 2013). A presença ubíqua dessas proteínas pode indicar o seu papel na clivagem de ligações éster em compostos pequenos que podem ser formados durante a depolimerização do PS

Figura 19: Propostas de vias de biodegradação de poliestireno. Adaptado de Hou e Majumder (2021), com tradução e modificações gráficas realizadas com ferramentas de inteligência artificial.



2 OBJETIVOS

O presente capítulo busca elucidar quais mecanismos moleculares poderiam estar associados ao processo de modificação da superfície do poliestireno apresentado no Capítulo

1. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram cumpridos:

- Acesso ao genoma de bactérias selecionadas por meio de sequenciamento.
- Identificação genes envolvidos na biodegradação de poliestireno;
- Obtenção das proteínas candidatas potencialmente envolvidas na biodegradação do poliestireno por meio da clonagem e da expressão heteróloga de suas ORFs.
- Determinação da atividade das proteínas candidatas.

3 METODOLOGIA

Conforme descrito no Capítulo 1, foram isoladas 5 estirpes de bactérias oriundas de um enriquecimento do conteúdo intestinal de larvas de *Sphenophorus levis* em um meio mineral cuja única fonte de carbono correspondia a filmes de poliestireno. Dentre essas, as cepas de *Paenibacillus* sp. e *Bacillus* sp. foram exploradas com base em seus genomas totais, a fim de identificar proteínas candidatas ao processo de modificação do poliestireno.

3.1 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL

As cepas de *Paenibacillus* sp. e *Bacillus* sp. foram repicadas em LB líquido e cultivadas a 30 °C e 200 rpm. O DNA total foi extraído utilizando o kit NucleoSpin Microbial DNA (Macherey-Nagel). A qualidade do material foi avaliada por gel de agarose a 1% e a quantidade aferida por fluorimetria com o kit Qubit dsDNA BR Assay (Thermo Fisher). O material foi enviado à empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, SP, Brasil).

As bibliotecas foram construídas com o kit Illumina DNA Prep e quantificadas por PCR quantitativa. O sequenciamento *paired-end* (2×100 pb) do genoma foi realizado em um equipamento Illumina Nextseq 2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA). Os dados obtidos pelo NextSeq 2000 foram analisados na nuvem do BaseSpace pelo programa BCL Convert (fornecido pela Illumina), que realiza o base calling das imagens de sequenciamento, convertendo-as em sequências no formato fastq, com cada base acompanhada de um escore de qualidade Phred (Ewing *et al.*, 1998). A avaliação inicial das leituras brutas do sequenciamento foi realizada com o programa FastQC, versão 0.12.1 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

O pré-processamento e a montagem foram realizados com o pipeline Shovill 1.1.0 (<https://github.com/tseemann/shovill>). O pipeline inclui ferramentas de bioinformática como Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), para remover os adaptadores; Lighter 1.1.3 (Song, Florea e Langmead, 2014) e SPAdes 4.0.0 version (Bankevich *et al.*, 2012) para a montagem dos genomas (draft); BWA 0.7.17 (Li *et al.*, 2009) para o mapeamento das *reads*; e Pilon 1.24 (Walker *et al.*, 2014) para a correção de inacurácias na montagem. *Contigs* menores que 500 bp foram removidos.

A qualidade da montagem foi avaliada com o programa BUSCO versão 5.8.0 (Manni *et al.*, 2021) em relação a Ordem Bacillales. Os conjuntos de genes de avaliação são derivados do banco de dados OrthoDB, versão 10 (Kriventseva *et al.*, 2019), e representam listas de genes ortólogos de cópia única, presentes em todos os representantes de determinados grupos

taxonômicos. Como referência, foram utilizados os conjuntos de ortólogos referentes à ordem Bacillales. Os genomas montados foram classificados taxonomicamente com o pipeline GTDB-Tk versão 2.4.0 (Chaumeil *et al.*, 2022).

Os genomas foram anotados com o Bakta, versão 1.9.4. Bakta é um pipeline de anotação de procariotos que emprega uma diversa gama de programas e bancos de dados, de forma a ser capaz de anotar acuradamente genomas procarióticos de diversas origens taxonômicas (Schwengers *et al.*, 2021). Para caracterizar o genoma das linhagens estudadas, as sequências foram analisadas por ontologia gênica e classificadas de acordo com os Enzyme Commission Numbers na plataforma Omicsbox (BioBam Bioinformatics, 2019).

3.2 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CANDIDATAS

Uma extensa revisão da literatura foi realizada para avaliar quais proteínas seriam promissoras para a modificação do poliestireno, visto que os bancos de dados que agrupam sequências de enzimas degradadoras de plásticos (e.g., PAZy Database) são escassos para esse polímero. Um dos critérios empregados foi selecionar categorias de enzimas previamente descritas como capazes de modificar plásticos de estrutura homoatômica, com ênfase nas oxidases, que desempenham papel primário nesse contexto. Também foram buscadas enzimas com capacidade de oxidar alcanos longos em alusão à massa molecular, à composição, à hidrofobicidade e à recalcitrância do polímero. Levando em conta as possíveis vias de degradação da cadeia lateral, a capacidade de modificar anéis aromáticos também foi considerada.

3.3 ANÁLISE *IN SILICO* DAS PROTEÍNAS SELECIONADAS

Foram selecionadas sequências de glutathione peroxidases e de citocromos P450 102, que foram analisadas *in silico*. A presença de peptídeo-sinal foi avaliada pelo programa SignalP (Almagro Armenteros *et al.*, 2019). As massas moleculares teóricas foram calculadas pelo programa Compute pI/MW (Gasteiger, 2003). A estrutura secundária de cada uma das proteínas foi determinada pelo programa PSIPRED (McGuffin, Bryson e Jones, 2000).

As sequências de aminoácidos das glutathione peroxidases foram alinhadas entre si e em relação à glutathione peroxidase 4 humana (P36969), que é monomérica. Outro alinhamento foi realizado utilizando uma sequência da proteína bacteriana de *Rhodococcus* (WP_003945816.1), confirmada como envolvida na degradação de polietileno. O método Muscle (Edgar, 2004) foi empregado na plataforma Mega 11 (Tamura, Stecher e Kumar, 2021). Os alinhamentos foram efetuados com os parâmetros padrão e formatados com o Esript (Robert e Gouet, 2014).

3.4 CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CANDIDATAS

3.4.1 Glutathione Peroxidase

O DNA genômico das cepas de *Bacillus cereus* e *Paenibacillus lautus* foi utilizado como molde na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com primers específicos (Tabela 3) para sequências de Glutathione Peroxidase (GPx) *BcGPx*, *PlGPx1* e *PlGPx2*, contendo sítios de restrição *NdeI* e *EcoRI*.

Para cada uma das sequências, foi realizada uma PCR em um volume final de 25 µL. Foram utilizados 200 µM de cada dNTP (Promega), tampão Taq High Fidelity Pol Reaction Buffer 1X (Cellco, São Carlos), 0,5 µM de cada *primer*, 2,5 U da enzima Taq High Fidelity Pol (Cellco, São Carlos) e 100 ng de DNA molde. O protocolo de amplificação foi realizado no termociclador Veriti (Applied Biosystems), iniciando com uma temperatura de 95 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação de 30 segundos a 95 °C (desnaturação), 30 segundos a 50 °C (hibridização) e 1 minuto a 72 °C (elongamento), e finalizando com uma extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Tabela 3: Sequências dos primers para amplificar as sequências codificantes de glutathione peroxidases. Os sítios de restrição *NdeI* (CATATG) e *EcoRI* (GAATTC) estão destacados em negrito.

Proteína	Primers
<i>PlGPx1</i>	F: 5' ATAT CATATG ATGTCGATCTATGAATATGA 3' R: 5' ATAT GAATTCTT ACAGCAGCTTCTTGATAT 3'
<i>PlGPx2</i>	F: 5' ATAT CATATG TCAGTTTATGAATATCA 3' R: 5' ATAT GAATTCTT AACCCAGCAGGGATTCAA 3'
<i>BcGPx1</i>	F: 5' ATAT CATATG ATGACAGTTTATGATTTTTC 3' R: 5' ATAT GAATTCTT ATTCTCCAAGCACCTTCT 3'

Os produtos das amplificações foram purificados com o kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) e clonados no vetor de expressão pET-28a (Novagen). Para tal, os amplicons foram clivados com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*, e os fragmentos correspondentes a cada ORF foram isolados em gel e clonados no vetor pET-28a (Novagen), previamente digerido com as mesmas enzimas. As reações de ligação entre os amplicons e os plasmídeos clivados foram realizadas com a enzima T4 DNA ligase (Cellco, São Carlos). Essas foram conduzidas a 16 °C *overnight* e, por choque térmico, foram utilizadas para transformar células de *E. coli* DH5α competentes por CaCl₂. Os clones bacterianos contendo os vetores recombinantes (pET + inserto) foram selecionados em meio LB suplementado com canamicina (25 µg/mL) por 16

horas a 37 °C. Algumas colônias foram então selecionadas e avaliadas por PCR de colônia com os primers T7prom (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') e T7term (5' TAGTTATTGCTCAGCGG 3'), e por clivagem com as enzimas utilizadas na clonagem.

As proteínas recombinantes foram expressas na cepa *E. coli* Rosetta (DE3). Os plasmídeos construídos foram utilizados para a transformação por choque térmico em células quimiocompetentes, que, após a transformação, foram plaqueadas em meio LB ágar com 25 µL/mL de canamicina e cloranfenicol e incubadas em estufa a 37 °C overnight.

Uma das colônias foi repicada em um pré-inóculo de 5 mL de meio LB líquido contendo 25 µL/mL de canamicina e cloranfenicol, mantido por 16 horas a 250 rpm e 37 °C. Após esse período, foi realizada uma diluição 1:100 do pré-inóculo em 500 mL de LB líquido, com 25 µL/mL dos mesmos antibióticos, e a cultura foi mantida nas mesmas condições de temperatura e agitação até atingir a fase logarítmica de crescimento (DO = 0,5 e λ = 600 nm). A produção de proteínas foi induzida pela adição de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) a uma concentração final de 0,4 mM. Alíquotas da cultura foram coletadas em intervalos de 1 hora para análise da expressão por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Após o período de indução, a cultura foi submetida à centrifugação em um Sorvall RC5C Plus, com rotor SLA15000 (4450 rpm; 4 °C; 10 min). O precipitado contendo as bactérias foi ressuspensionado em 50 mL de tampão (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0) por litro de cultura e submetido à sonicação com 8 pulsos de 1 minuto com 20% de potência, a cada 30 segundos, em sonificador Sonic Desmembrator 500 (Fisher Scientific), para lise celular. O lisado foi centrifugado no rotor SS34 do Sorvall RC5C Plus (13000 rpm; 4 °C; 10 min) para separar as frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel foi filtrada a vácuo em filtro de 0,45 µm e a fração insolúvel foi ressuspensionada em tampão de lise (50 mL por litro de cultura). Alíquotas de ambas foram preparadas para análise por SDS-PAGE.

As proteínas foram purificadas a partir das frações solúveis dos sonicados, por cromatografia de afinidade em coluna contendo 5 mL de resina Ni-NTA-agarose (QIAGEN). Inicialmente, cada coluna foi pré-equilibrada com 5 volumes de tampão de lise (25 mL). Uma vez que a fração solúvel passou pela coluna, a resina foi lavada com 3 volumes do tampão (15 mL). Depois disso, as proteínas foram eluídas com 2 volumes (10 mL) desse tampão, contendo concentrações crescentes de imidazol (10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM), e com 3 volumes (15 mL) da fração mais concentrada (250 mM).

As frações purificadas foram dialisadas utilizando membrana SnakeSkin Dialysis Tubing (Thermo Fisher Scientific) de 3500 MWCO contra 2 litros de tampão (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0). Foram realizadas três trocas de tampão de 1 hora. As proteínas foram filtradas em filtro Millex® GV de 22 µm/25 mm (Millipore), quantificadas com o kit Pierce™ BCA Protein Assay e armazenadas a -20 °C.

3.4.2 Citocromo P450 102 (CYP102)

O DNA genômico da cepa *Paenibacillus lautus* foi utilizado como molde para a PCR, com primers específicos (5' AGTTATAGATCTATGACACAAACCAAGGAAGTG 3' e 5' ATATGTCGACTCAACCAGCCCAGACGTCTTTTAC 3') para a sequência do citocromo P450 102 (CYP102), contendo sítios de restrição *Bgl*II e *Sal*I. A reação foi realizada em um volume final de 25 µL com a Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µM de cada *primer* e 100 ng de DNA molde. O protocolo de amplificação foi realizado no termociclador Veriti (Applied Biosystems), iniciando com uma desnaturação inicial a 98 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação: 10 segundos a 98 °C (desnaturação), 30 segundos a 50 °C (hibridização) e 2 minutos a 72 °C (elongamento), e terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. O produto da amplificação foi purificado com o kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Os amplicons foram primeiramente clivados com a enzima *Sal*I (Cellco Biotec) em tampão Orange a 37 °C e purificados em coluna de sílica. Depois, o DNA foi novamente digerido, desta vez com a enzima *Bgl*II Fastdigest (Thermo Fisher) em tampão FastDigest. Os produtos da digestão foram então isolados em gel e clonados no vetor pET-28a (Novagen) previamente digerido com *Sal*I e *Bam*HI (Cellco Biotec). As enzimas *Bgl*II e *Bam*HI produzem extremidades coesivas compatíveis entre si. Como o fragmento de DNA possui um sítio de restrição interno de *Bam*HI, foi necessário adotar essa estratégia. A reação de ligação, a transformação em *E. coli* e o *screening* dos clones recombinantes foram realizados conforme descrito na seção 3.4.1.

A expressão recombinante foi conduzida em *E. coli* Rosetta DE3, de maneira semelhante à descrita na seção 3.4.1, porém com algumas modificações. O crescimento microbiano ocorreu em meio Terrific Broth (12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 4 mL de glicerol e 100 mL de tampão fosfato - 2,31 g de KH₂PO₄ + 12,54 g de K₂HPO₄, para 1 L de meio) a 37 °C e 250 rpm até que atingisse DO₆₀₀ igual a 0,8. Nesse momento, a temperatura foi reduzida para 20 °C. A indução foi mantida por 20 horas.

Após a indução, a cultura foi peletizada no rotor SLA15000 da centrífuga Sorvall RC5C plus (4450 rpm; 4 °C; 10 min). O precipitado contendo as bactérias foi ressuspensionado em 10 mL de tampão de lise por grama de pellet (100 mM KCl, 100 mM tampão fosfato, pH 7,4), com a adição de 0,2 mg/mL de lisozima, 1 mM de DTT e Protease Inhibitor Cocktail Set IV 1:1000 (Calbiochem). A sonicação foi conduzida em sonicador Sonic Desmembrator 500 (Fisher Scientific), com amplitude de 20%: 16 pulsos de 30 s e 16 paradas de 30 s. O lisado foi centrifugado em rotor SS34 do Sorvall RC5C Plus (13000 rpm; 4 °C; 10 min) para separar as frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel foi filtrada a vácuo com filtro de 0,45 µm. A purificação em coluna de níquel foi conduzida conforme descrito na seção 3.4.1.

As frações purificadas foram dialisadas em tubos de diálise de celulose regenerada Fisherbrand (MWCO nominal de 12–14 kDa) contra 1 litro de tampão (glicerol 10%, 100 mM KCl, 100 mM tampão fosfato, pH 7,4). Foram realizadas três trocas de tampão de 1 hora cada. As proteínas foram filtradas em filtro Millex® GV de 22 µm/25 mm (Millipore), quantificadas com o kit Pierce™ BCA Protein Assay e armazenadas a -20 °C em tubos tipo Falcon até o uso.

3.5 ENSAIOS DE ATIVIDADE

3.5.1 Glutathione Peroxidases

3.5.1.1 Avaliação da atividade glutathione peroxidase das GPx

O ensaio de DTNB é um método colorimétrico indireto que se baseia em duas reações acopladas. Primeiramente, a GPx catalisa a redução de um peróxido, consumindo glutathione reduzida (GSH), que é oxidada a glutathione oxidada (GSSG). A quantidade de GSH consumida é proporcional à atividade enzimática.

Para isso, as amostras contendo BcGPx ou PlGPx (25 µM) foram incubadas a 30 °C, em pH 5 ou 7, por, no mínimo, três períodos de incubação (0, 1 e 5 minutos), com a possibilidade de tempos adicionais (10, 15 e 30 minutos) em caso de evidência de reação. Nesse processo, foi utilizado o peróxido de cumeno (CHP) a 150 µM. Esta opção foi selecionada com base na observação de que o CHP apresenta menor reatividade com o GSH isoladamente, evitando, dessa forma, a interferência nos resultados obtidos. Em seguida, o DTNB (200 µM) foi adicionado para reagir com a GSH remanescente (não consumida). Essa reação produz o ânion nitro-2-tiobenzoato (TNB) amarelo, cuja concentração é medida por espectrofotometria a 412 nm. Foram empregadas as seguintes combinações experimentais: GPx + CHP (sem GSH), GSH + CHP e GPx + GSH + CHP.

Uma vez observada a atividade no ensaio com DTNB, foi realizada uma segunda abordagem, utilizando a enzima: o ensaio de oxidação de NADPH. Neste caso, além de GPx e GSH, a glutathione redutase (GR) também é utilizada. O ensaio baseia-se na reação acoplada à GR, garantindo que a GSH consumida pela GPx seja regenerada imediatamente. No ciclo, a GPx catalisa a redução de um peróxido, oxidando GSH. O excesso de GR e de NADPH fornecidos ao meio reduz GSSG, consumindo uma molécula de NADPH nesse processo. A atividade da GPx é, então, medida pelo monitoramento da taxa de consumo de NADPH, realizado em espectrofotômetro a 340 nm.

As reações foram conduzidas a 30 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, contendo EDTA (5 mM) e azida sódica (1 mM). Ao sistema foram adicionados: GPx (25 µM), GSH (50 µM), GR (0,1 U), NADPH (150 µM). As reações foram iniciadas pela adição de hidroperóxido de cumeno (CHP) nas concentrações de 1,5 mM ou 2,5 mM e acompanhadas por 20 minutos.

3.5.1.2 Avaliação da atividade tiorredoxina peroxidase das GPx

O ensaio para avaliar se a enzima de interesse, glutathione peroxidase, utiliza o sistema redutor bacteriano Trx de *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse arranjo experimental, o fluxo de elétrons ocorre em “cascata”, com o NADPH como doador primário. Inicialmente, o NADPH é oxidado a NADP⁺ pela tiorredoxina redutase (TrxR), que utiliza os elétrons transferidos para reduzir a tiorredoxina (Trx). Em seguida, a Trx reduzida atua como doadora direta de elétrons para a GPx, regenerando o sítio catalítico da enzima e permitindo a continuidade de sua atividade sobre o substrato peroxídico.

Para avaliar a utilização do sistema tiorredoxina pelas enzimas estudadas, foram empregados 3 µM de *PlGpx2* ou *BcGpx*, juntamente com 6 µM de Trx e 1 µM de TrxR, em uma mistura reacional contendo tampão HEPES (50 mM, pH 7,4), DTPA (100 µM), azida sódica (1 mM) e NADPH (150 µM). Após a adição de peróxido de hidrogênio (500 µM), a atividade enzimática foi monitorada indiretamente pelo consumo de NADPH ao longo de 5 minutos. Como o NADPH apresenta elevada absorvância a 340 nm, enquanto o NADP⁺ não absorve significativamente nessa região do espectro, a oxidação do cofator pode ser acompanhada espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorvância a 340 nm. Dessa forma, a taxa de consumo de NADPH deve refletir a transferência de elétrons ao longo da cascata redox e constitui uma medida indireta da atividade catalítica da GPx em associação com o sistema tiorredoxina.

3.6 AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DA *P/GPx2* MODIFICAR O POLIESTIRENO

O potencial da enzima *P/GPx2* para degradar o poliestireno foi avaliado conforme descrito para a enzima isolada de *Rhodococcus* sp., quando em contato com filmes de polietileno (Rong *et al.*, 2024). O experimento foi conduzido em um sistema reacional de 4 mL contendo tampão de reação (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0), filme de PS (2 × 1 cm, aproximadamente 20 mg) e GPx (1 mg/mL). O tampão de reação suplementado apenas com o filme de PS foi utilizado como grupo controle. Todos os tratamentos foram incubados a 30 °C por 120 h e realizados em triplicata. Em seguida, os filmes residuais de PS foram recuperados e lavados com água ultrapura (ddH₂O). Após secagem em dessecador com sílica gel, os filmes foram avaliados quanto à presença de grupos funcionais associados à oxidação utilizando a técnica de FT-IR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL

Diante das mudanças observadas na superfície do poliestireno sob a ação de determinadas bactérias isoladas a partir das etapas de enriquecimento, nota-se a relevância de estudar os mecanismos pelos quais isso ocorre. Para tal, prosseguimos com o sequenciamento do genoma completo dos microrganismos, a fim de identificar genes candidatos e traçar possíveis rotas de degradação. Duas cepas foram sequenciadas e classificadas em nível de espécie: *Bacillus cereus* (Genoma de Referência: GCF_000007825.1; ANI: 98.82%) e *Paenibacillus lautus* (Genoma de Referência: GCF_014863545.1; ANI: 96.8%). As métricas dos genomas montados podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4: Estatísticas da montagem dos genomas.

Amostra	Tamanho total	Maior contig	# contigs	N50	L50	auN	%GC
<i>B. cereus</i>	5701041	345930	77	149715	14	160258	34.99
<i>P. lautus</i>	6950071	796201	40	402956	6	412199	51.11

A qualidade do genoma foi analisada com o software BUSCO contra o banco de dados de ortólogos da ordem Bacillales. Para *B. cereus*, 98,9% dos genes estão completos (únicos ou duplicados), 0,9% estão fragmentados e 0,2% estão ausentes. Para *P. lautus*, 98,9% estão completos (únicos ou duplicados), enquanto 0,5% estão fragmentados e 0,6% estão faltantes.

Os genomas foram anotados com o *pipeline* Bakta e a síntese dos resultados obtidos pode ser observada na Tabela 5. Dos 6123 e 6674 genes putativos, 5753 e 6260 correspondem a regiões codificantes de proteínas reconhecidas em *B. cereus* e *P. lautus*, respectivamente. Para melhor compreender essas sequências, elas foram classificadas de acordo com a Ontologia Gênica (Figura 20 e Figura 21) e os números da *Enzyme Commission* (Figura 22 e Figura 23). Aqui, as oxidoredutases e hidrolases têm maior destaque, pois são consideradas relevantes para a biodegradação de plásticos. De acordo com a classificação dos E.C. Numbers, no genoma de *B. cereus*, 372 sequências correspondem a oxidoredutases e 785 a hidrolases; enquanto, dentre as sequências de *P. lautus*, 561 são oxidoredutases e 1241 são hidrolases.

Tabela 5: Distribuição das sequências anotadas por categoria nos genomas estudados. Os dados relacionam o tipo de sequência com o número presente em cada organismo

Classificação	Número de Sequências	
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Paenibacillus lautus</i>
tRNAs	28	44
tmRNAs	1	1
rRNAs	4	3
ncRNAs	15	11
ncRNA regions	104	53
CDSs	5753	6260
Pseudogenes	17	24
Hypotheticals	183	273
sORFs	17	4
oriCs	1	1

Figura 20: Número de sequências classificadas nas três categorias da Ontologia Gênica: Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular no genoma de *Bacillus cereus*.

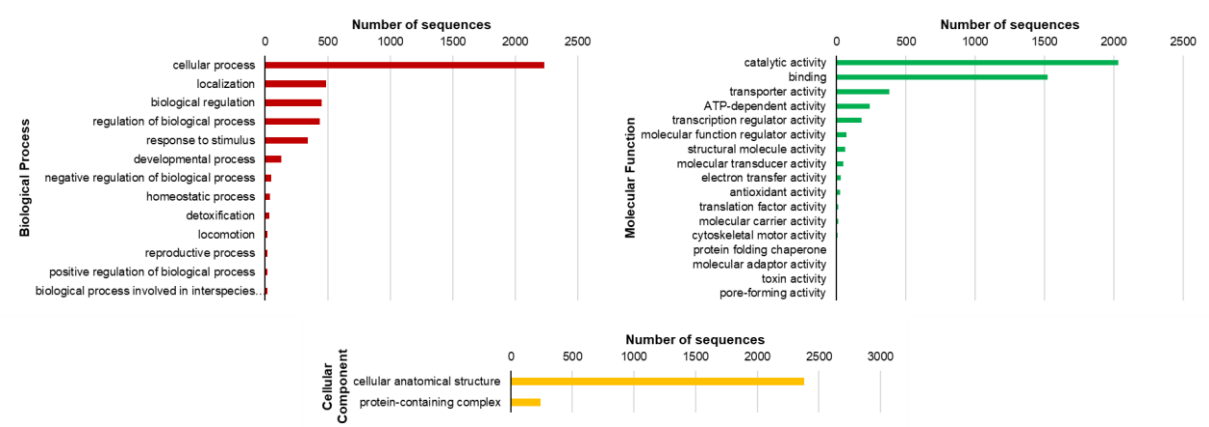


Figura 21: Número de sequências classificadas nas três categorias da Ontologia Gênica: Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular no genoma de *Paenibacillus lautus*.

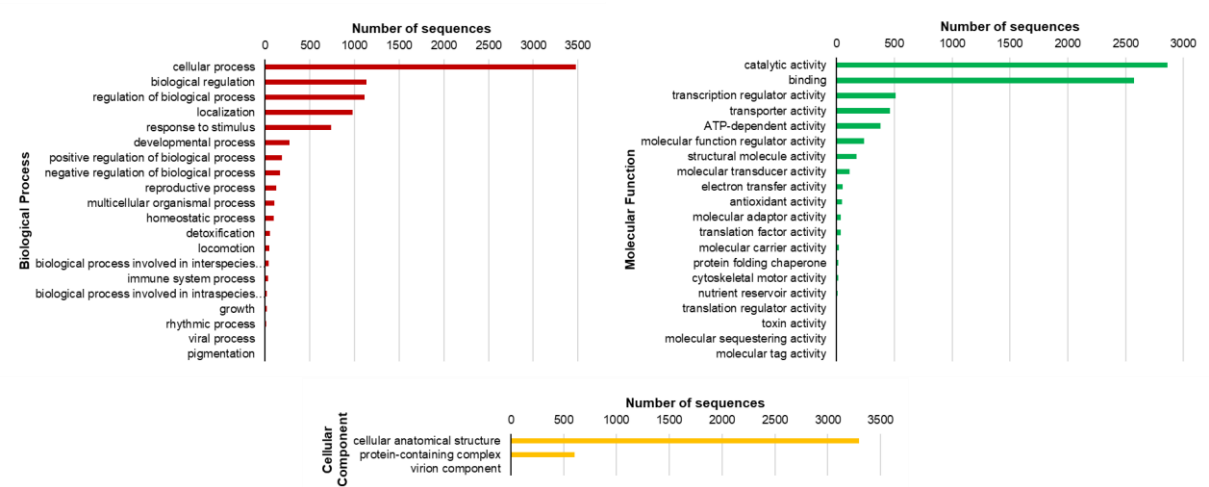


Figura 22: Atribuição dos números da Enzyme Commission às enzimas preditas de *Bacillus cereus*. (A) Classes Principais. (B) Subclasse: Oxidorredutases. (C) Subclasse: Hidrolases.

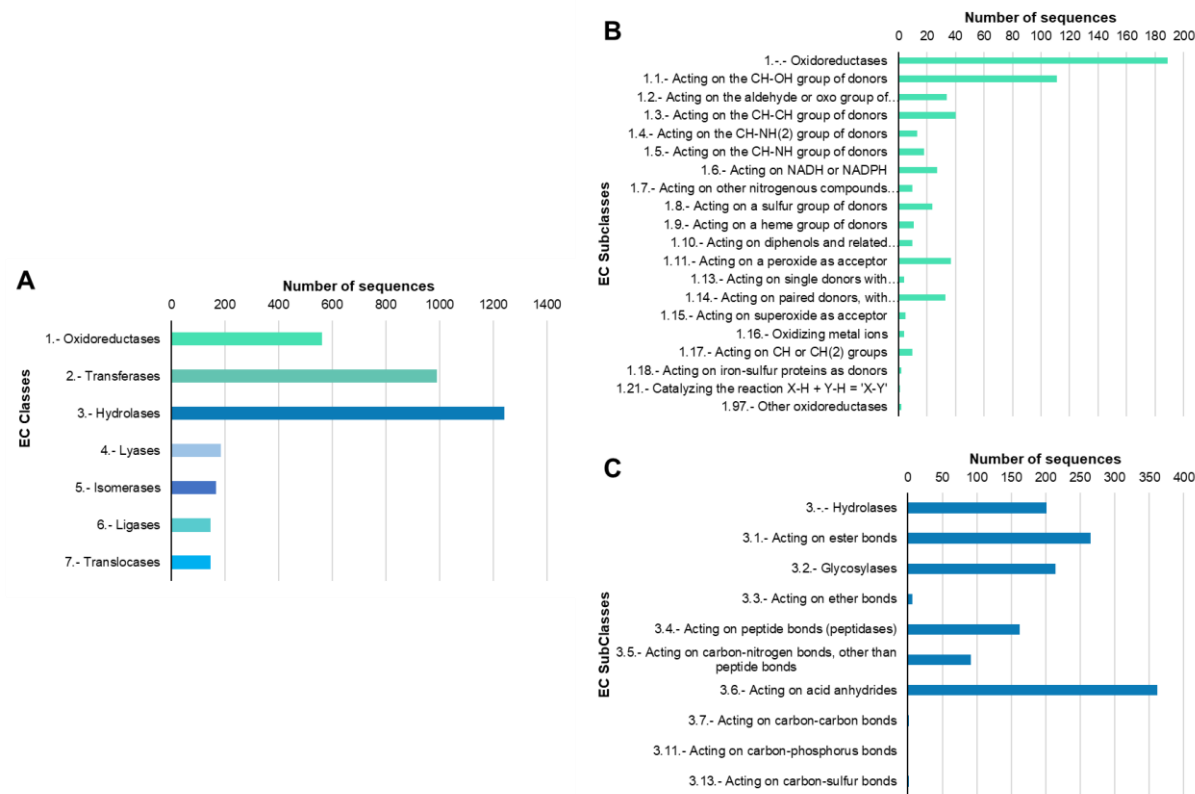
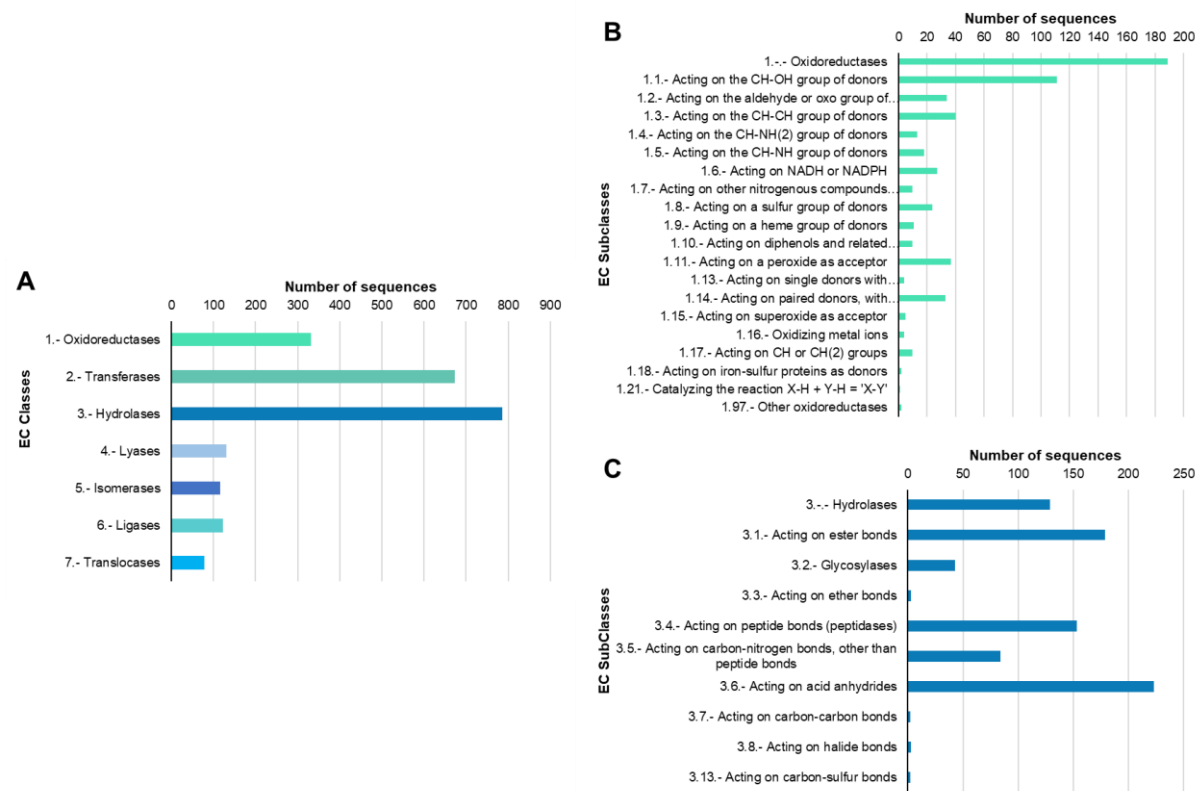


Figura 23: Atribuição dos números da Enzyme Commission às enzimas preditas de *Paenibacillus lautus*. (A) Classes. (B) Subclasse: Oxidorredutases. (C) Subclasse: Hidrolases.



4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CANDIDATAS

4.2.1 Oxidorredutases

Quando os microrganismos aderem ao poliestireno, forma-se um biofilme, o que estimula a ação de proteínas extracelulares e intracelulares. As enzimas interagem com a superfície do polímero, tornando-a mais hidrofílica e mais favorável à adesão microbiana. Polímeros como o PS contêm apenas carbono e hidrogênio em sua estrutura, o que impede o início de um ataque nucleofílico. Assim, o processo de degradação inicia pela oxidação do carbono beta da cadeia principal ou do anel aromático da cadeia lateral (Hou e Majumder, 2021; Kim *et al.*, 2024).

As multi-copper oxidases (MCOs) são enzimas que oxidam uma ampla variedade de substratos utilizando oxigênio como aceptor de elétrons, sem formar espécies reativas de oxigênio. MCOs de procariotos podem apresentar atividade de laccase, mas, devido a diferenças no mecanismo catalítico, não são chamadas como tal. Elas catalisam a oxidação das unidades fenólicas da lignina, gerando radicais fenoxi que iniciam os processos de despolimerização (Gao *et al.*, 2024). Essa classe de enzimas vem sendo utilizada na biodegradação e detoxificação de vários contaminantes ambientais incluindo polímeros sintéticos, como PE, PU e PS (Nikolaivits *et al.*, 2021). Uma estirpe de *Pseudomonas* obtida a partir de um enriquecimento em material lignocelulósico, demonstrou superexpressar uma enzima laccase-like quando em contato com PS, além de demonstrar afinidades com o polímero por *docking* molecular (Qiu *et al.*, 2025). Laccases recombinantes de fungos, como o *Abortiporus biennis*, são capazes de modificar a superfície do material (Zerva *et al.*, 2023). A cepa de *B. cereus* possui 2 genes classificados como MCOs. *P. lautus*, por sua vez, apresenta uma sequência dividida por um stop códon, ou seja, um pseudogene.

Recentemente, um estudo descreveu que a glutathione peroxidase (GPx) de *Rhodococcus* sp. pode estar associada à degradação de polietileno (PE). Esse material, como o poliestireno, é um polímero recalcitrante, composto apenas por carbono e hidrogênio. Na etapa inicial da despolimerização, radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) liberados pela GPx (a partir da NOS *redox bridge*) podem iniciar a oxidação da cadeia carbônica ao abstrair hidrogênios das ligações C–H, gerando radicais livres e intermediários peróxidos. Essas reações promovem a oxidação progressiva do polímero e a formação de hidroperóxidos, que podem ser reduzidos pela GPx a grupos hidroxila. A instabilidade desses intermediários favorece a ruptura da cadeia e a formação de grupos carbonila e carboxila. A proteína estudada no trabalho não apresenta sequências

clássicas associadas à secreção mediada por peptídeos-sinal (Rong *et al.*, 2024). Embora isso não seja discutido no trabalho, existem diversos mecanismos pelos quais proteínas bacterianas podem ser liberadas para o meio extracelular, como as vesículas extracelulares. A cepa de *Bacillus cereus* apresenta uma sequência para essa proteína, enquanto a de *Paenibacillus lautus* apresenta duas.

Associada a diversas funções catalíticas, a superfamília dos citocromos P450 agrupa oxigenases que possuem o heme como grupo prostético (Greule *et al.*, 2018; Nelson, 2018). Embora a hidroxilação de ligação C-H, seja a mais caracterizada de suas funções, os integrantes dessa família ainda podem realizar uma gama de outras reações como a oxidação de anéis aromáticos, epoxidação de alcenos e oxidação de heteroátomos (Greule *et al.*, 2018; Guengerich e Munro, 2013; Zhang e Li, 2017). Devido à variedade de reações oxidativas, as enzimas dessa superfamília são consideradas cruciais quando se trata de biodegradação de polímeros (Yeom, Le e Yun, 2022). A linhagem de *B. cereus* apresenta diferentes citocromos P450: CYP102, CYP107 e CYP134. *P. lautus* apresenta diferentes genes de citocromos P450: CYP102, CYP106 e CYP107. Dentre elas, a CYP102 foi descrita com um potencial interessante quando se trata da degradação de plásticos C-C. Essa enzima é recorrentemente associada à função de oxidação de ácidos graxos de cadeia média. No entanto, alguns trabalhos mostraram que a CYP102 de *Priestia megaterium* (anteriormente *Bacillus megaterium*) possui atividade, ainda que baixa, de hidroxilação de n-alcenos, o que pode ser amplificada com mutações sítio-dirigidas (Feenstra *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2011). Por outro lado, observou-se que a CYP102 nativa de *Bacillus thuringiensis* é o elemento-chave para a modificação do polietileno por oxidação pelo microrganismo. Quando a cepa de *B. thuringiensis* foi cultivada em contato com PE, o transcrito de CYP102 foi suprarregulado, assim como os de CYP106 e CYP107. Além disso análises funcionais confirmaram que ela era crucial para a incorporação de oxigênio (Tarara, Ahuja e Mellies, 2025; Yun *et al.*, 2023). Além disso, o CYP102 desempenha um papel significativo na oxidação do estireno. A enzima de *P. megaterium* produzida de maneira recombinante é capaz de catalizar a epoxidação da molécula *in vitro* (Eiben *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2009). A CYP102 é classicamente uma proteína citosólica, dessa forma, os mecanismos com os quais ela pode atuar sobre polímeros complexos ainda são obscuros e devem ser melhor investigados (Tarara, Ahuja e Mellies, 2025; Yun *et al.*, 2023).

As bactérias isoladas possuem uma coleção de enzimas envolvidas no processamento de compostos aromáticos. Algumas enzimas podem atuar especificamente nas rotas de degradação de PS associadas à cadeia lateral. As hidroxilases de anel aromático devem iniciar

a modificação do polímero em seu grupo fenil e também devem contribuir para a oxidação do estireno e de outros intermediários aromáticos após a decomposição do PS (Hou e Majumder, 2021). As dioxigenases de clivagem de anel (*ring-cleaving dioxygenases*) podem atuar ao adicionar simultaneamente dois átomos de oxigênio ao anel (Fetzner, 2012). Estudos envolvendo a biodegradação de PS por *Exiguobacterium* sp. RIT 594 indicam que o processo pode ser iniciado pela oxidação dos anéis aromáticos por uma *ring-cleaving dioxygenase* (Parthasarathy *et al.*, 2022). *B. cereus* apresenta 2 desses genes, enquanto *P. lautus*, 3.

As sequências das proteínas e das suas respectivas sequências codificantes (CDS) encontram-se presentes no APÊNDICE B e no APÊNDICE C .

4.2.2 Hidrolases

As hidrolases desempenham um papel secundário quando se trata de polímeros como o PS, já que estes possuem um arcabouço composto apenas por carbono e hidrogênio. O ataque nucleofílico por essas enzimas só ocorre mediante oxidação prévia. Kim *et al.* (2020) demonstraram que uma cepa de *Pseudomonas* sp. isolada de *Zophobas atratus* era capaz de oxidar a superfície do polímero, mas que o processo de degradação seria dependente de uma serino-hidrolase. Foi observado que a enzima era regulada positivamente em meio restrito ao polímero como fonte de carbono e, quando havia a presença de um inibidor, a degradação não ocorria. Kang *et al.* (2023) avaliaram o potencial de biodegradação de PS por uma linhagem de *Enterobacter hormaechei* isolada do intestino de *T. molitor*. Uma análise de expressão diferencial revelou a superexpressão de uma hidrolase (gene *ubi*) que estaria associada ao ataque de aril-álcoois (compostos orgânicos que contêm um grupo hidroxila ligado a uma cadeia carbônica associada a um anel aromático) (Kang, Kwak e Kim, 2023).

4.3 GLUTATIONA PEROXIDASES: CLONAGEM, EXPRESSÃO E ATIVIDADE

Foram selecionados 3 exemplares de glutathiona peroxidases (GPx), 2 de *P. lautus* e 1 de *B. cereus*. A Figura 24 apresenta a sequência de aminoácidos de cada proteína alinhada e a Figura 25 ilustra a predição da estrutura secundária de cada uma delas. Nela destacam-se os três motivos característicos e o resíduo de cisteína peroxidática na posição 35 e a cisteína de resolução na posição 81 (Bao *et al.*, 2023). A cisteína peroxidática (C_p) é a cisteína do sítio ativo no N-terminal. Ela atua formando um centro de oxidorredução em tétrade, junto à glicina (também presente no motivo identificado como A), ao triptofano e à asparagina (do motivo identificado como C). Nessa conformação, o ataque nucleofílico pela cisteína peroxidática a peróxidos, gerando ácido sulfênico, é facilitado pela formação de pontes de hidrogênio com a

glicina e o triptofano. Nesse estado, a enzima fica temporariamente inativa. A cisteína de resolução (C_r) entra em ação para salvar a primeira. O seu grupo tiol (SH) ataca o grupo sulfênico da cisteína peroxidática, liberando uma molécula de água e formando uma ponte de dissulfeto ($Cr-S-S-Cr$). Posteriormente, uma proteína externa reduz essa ponte de dissulfeto, tornando a enzima apta a iniciar um novo ciclo.

Figura 24: Alinhamento das sequências das glutatona peroxidases. A, B e C representam os 3 motivos característicos dessa classe de proteínas. O asterisco demarca o residuo de cisteína peroxidástica e o sinal positivo a cisteína de resolução.

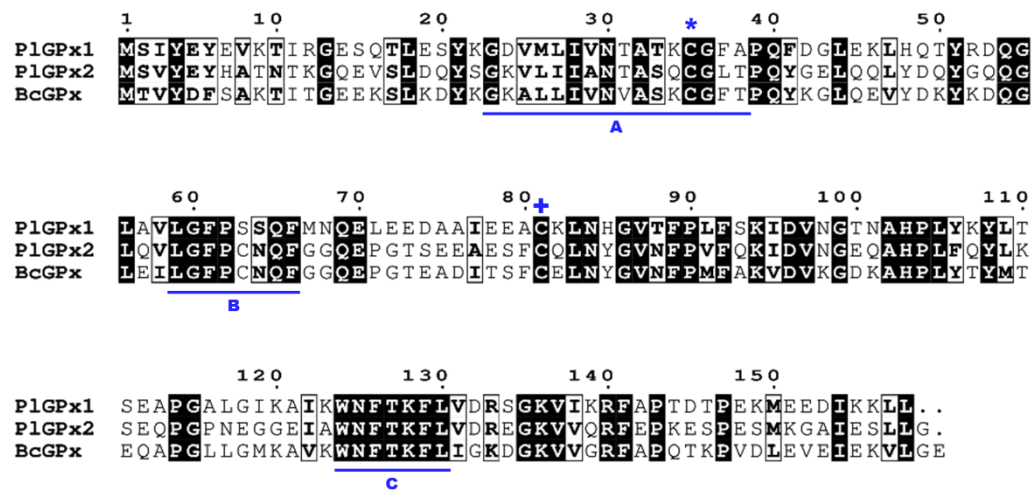
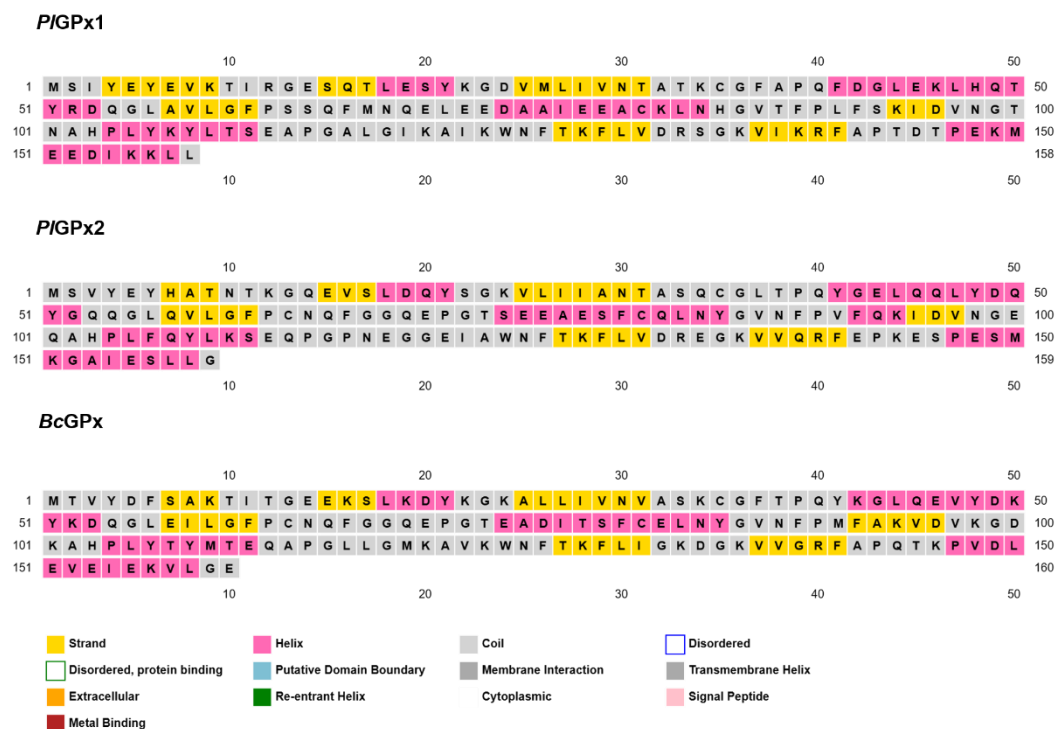


Figura 25: Predição da estrutura secundária das glutatona peroxidases oriundas de *P. laevis* e *B. cereus*.

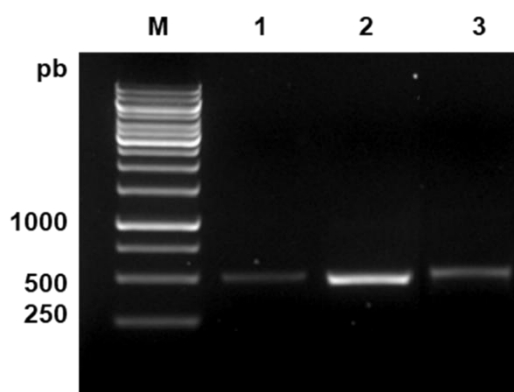


A existência da cisteína peroxidática e da cisteína de resolução, aliada ao fato destas não existirem na forma de dímeros ou tetrâmeros, indica que as glutathiona peroxidases bacterianas são, na verdade, tiorredoxina-dependentes. Essas enzimas atuam como peroxirredoxinas dependentes de tiorredoxinas, ou seja, utilizam esta última como molécula doadora de elétrons (Bao *et al.*, 2023; Toppo *et al.*, 2008).

4.3.1 Clonagem e expressão recombinante

As ORFs de cada uma das glutathiona peroxidases foram amplificadas por PCR e observadas em gel de agarose a 1% (Figura 26), apresentando, assim, o tamanho esperado para cada uma delas, considerando as bases adicionadas pelos primers: *PlGPx1* (497 pb), *PlGPx2* (500 pb) e *BcGPx* (503 pb). Os produtos de PCR purificados foram clivados com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* e ligados ao pET28a digerido com as mesmas nucleases. A clonagem neste vetor foi confirmada por PCR de colônia e por digestão enzimática (Figura 27).

Figura 26: Gel de agarose apresentando os produtos de amplificação das ORFs referentes às glutathiona peroxidases (GPx) de *Paenibacillus lautus* e *Bacillus cereus*. (M) Marcador molecular (GeneRuler 1 kb – Thermo Fisher). (1) *PlGPx1*. (2) *PlGPx2*. (3) *BcGPx*.



As ORFs correspondentes às GPx foram clonadas no vetor pET-28a. Esse plasmídeo permite a clonagem direcional do fragmento em fase com a sequência codificante de seis histidinas (his-tag) nas regiões N- e C-terminais. A sequência de histidina permite a purificação por cromatografia de afinidade e pode ser removida por meio de um sítio de clivagem específico para trombina. Desse modo, as glutathiona-peroxidases foram expressas em fusão com a his-tag na região N-terminal (Tabela 6) (APÊNDICE D).

Figura 27: Gel de agarose para confirmação, por digestão de restrição, da inserção das ORFs das glutathione peroxidases (GPx) de *Paenibacillus lautus* e *Bacillus cereus* no vetor pET-28a. (M) Marcador molecular (GeneRuler 1 kb - Thermo Fisher). (1) *PlGPx1*. (2) *PlGPx2*. (3) *BcGPx*

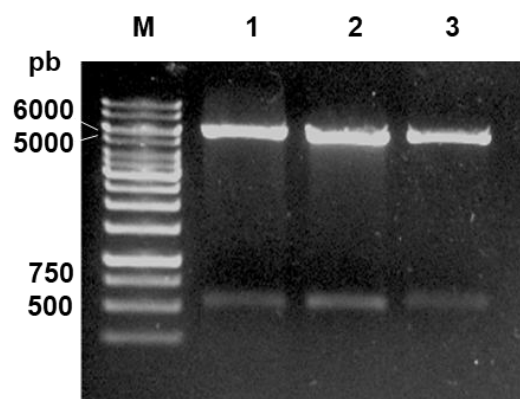


Tabela 6: Parâmetros das glutathione peroxidases de *P. lautus* e *B. cereus*. (a) Proteína nativa. (b) Proteína de fusão.

		Número de aminoácidos	Massa Molecular	pI
<i>PlGPx1</i>	(a)	199	20,08 kDa	6,55
	(b)	178	17,78 kDa	5,66
<i>PlGPx2</i>	(a)	200	19,96 kDa	5,39
	(b)	179	17,67 kDa	4,56
<i>BcGPx</i>	(a)	202	20,08 kDa	5,90
	(b)	181	17,78 kDa	7,09

Os plasmídeos resultantes foram transformados em *E. coli* Rosetta (DE3). A expressão recombinante foi induzida pela adição de IPTG e monitorada de hora em hora. A massa celular foi lisada por meio de sonicação e submetida à centrifugação para separar a fração solúvel. Esta foi purificada em coluna de níquel. A cinética de expressão, juntamente com o conteúdo das frações insolúvel e solúvel e da proteína purificada, pode ser observada por SDS-PAGE na Figura 28 e na Figura 29. Houve sucesso na expressão solúvel das proteínas *PlGPx2* (19,96 kDa) e *BcGPx* (20,08 kDa), embora a maior parte do *BcGPx* produzido tenha se mantido na fração insolúvel, enquanto todo o montante da *PlGPx1* permaneceu na fração insolúvel, mesmo sob condições de baixa temperatura de indução (e.g., 20 °C). O rendimento por litro de cultura de *PlGPx2* e de *BcGPx* foi de 52,49 mg e 14,78 mg, respectivamente.

Figura 28: Perfil de expressão heteróloga da BcGPx em *E. coli* Rosetta, apresentado em SDS-PAGE. (1) Não Induzido. (2) 1 hora após a indução. (3) 2 horas. (4) 3 horas (5) 4 horas. (6) Fração Insolúvel. (7) Fração Solúvel. (8) Proteína Purificada. M: Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad).

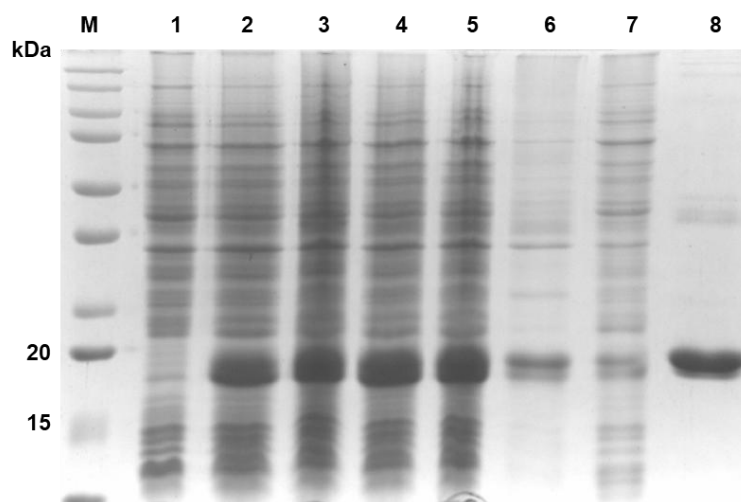
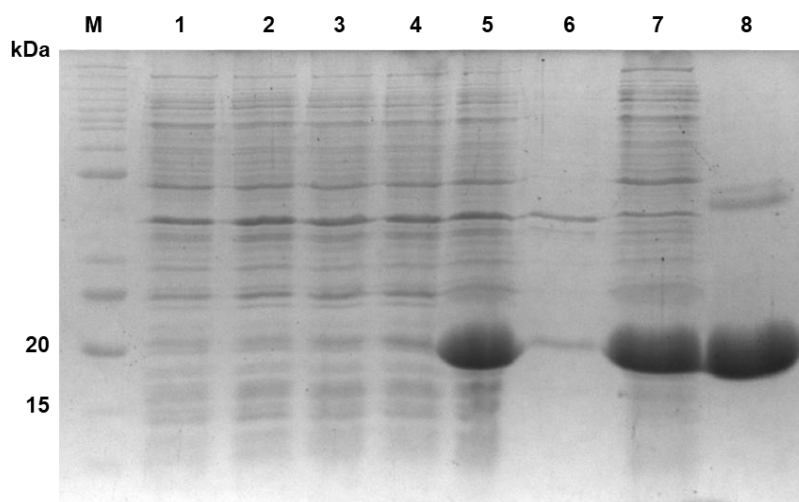


Figura 29: Perfil de expressão heteróloga da PlGPx em *E. coli* Rosetta, apresentado em SDS-PAGE. (1) Não Induzido. (2) 1 hora após a indução. (3) 2 horas. (4) 3 horas (5) 4 horas. (6) Fração Insolúvel. (7) Fração Solúvel. (8) Proteína Purificada. M: BenchMark™ Protein Ladder. (Thermo Fisher).



4.3.2 Avaliação da atividade de GPx

Diante do desconhecimento de que as GPxs bacterianas correspondiam, na verdade, a peroxirredoxinas dependentes de tiorredoxinas, consideramos inicialmente realizar ensaios baseados no sistema glutationa. Posteriormente, a utilização do sistema tiorredoxina foi considerada.

4.3.2.1 Avaliação da atividade glutationa peroxidase das GPx

O ensaio com DTNB permite quantificar a GSH remanescente no sistema reacional, isto é, a fração que não foi consumida durante a reação enzimática. Assim, quanto maior a formação de GSSG, menor a quantidade de GSH disponível para reagir com o DTNB. Consequentemente,

a atividade enzimática é inversamente proporcional à absorbância medida: quanto maior a atividade enzimática, menor a absorbância.

A Figura 30 e a Figura 31 apresentam os resultados dos ensaios de atividade realizados para as *BcGPx* e *PIGPx2* recombinantes, respectivamente. A glutationa peroxidase de *Bacillus cereus* não demonstrou redução da formação de TNB nos diferentes tempos avaliados e em ambas as condições de pH. Em contrapartida, a enzima oriunda de *Paenibacillus lautus* apresentou uma redução crescente da absorbância ao longo do tempo.

Figura 30: Gráficos da atividade de *BcGPx* por meio do consumo de GSH em ensaio com DTNB. Foram testadas três condições: GPx isolada (25 μ M, controle), GSH isolado (50 μ M, padrão) e GPx + GSH (amostra). As misturas foram tratadas com CHP (150 μ M) e incubadas por 0 min (sem incubação), 1 min ou 5 min a 30 °C, seguidas da adição de DTNB (200 μ M). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 412 nm. Os testes foram realizados em duplicata.

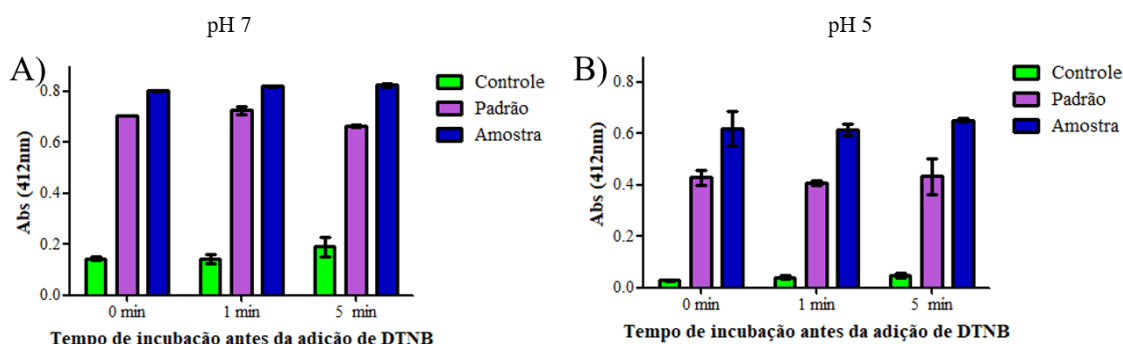
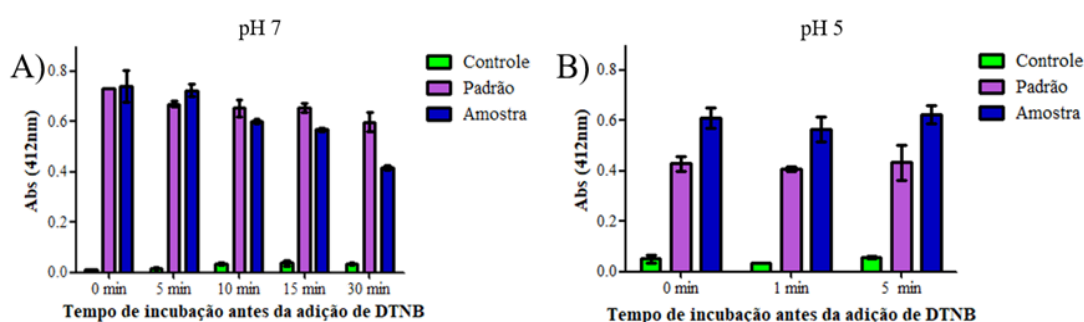


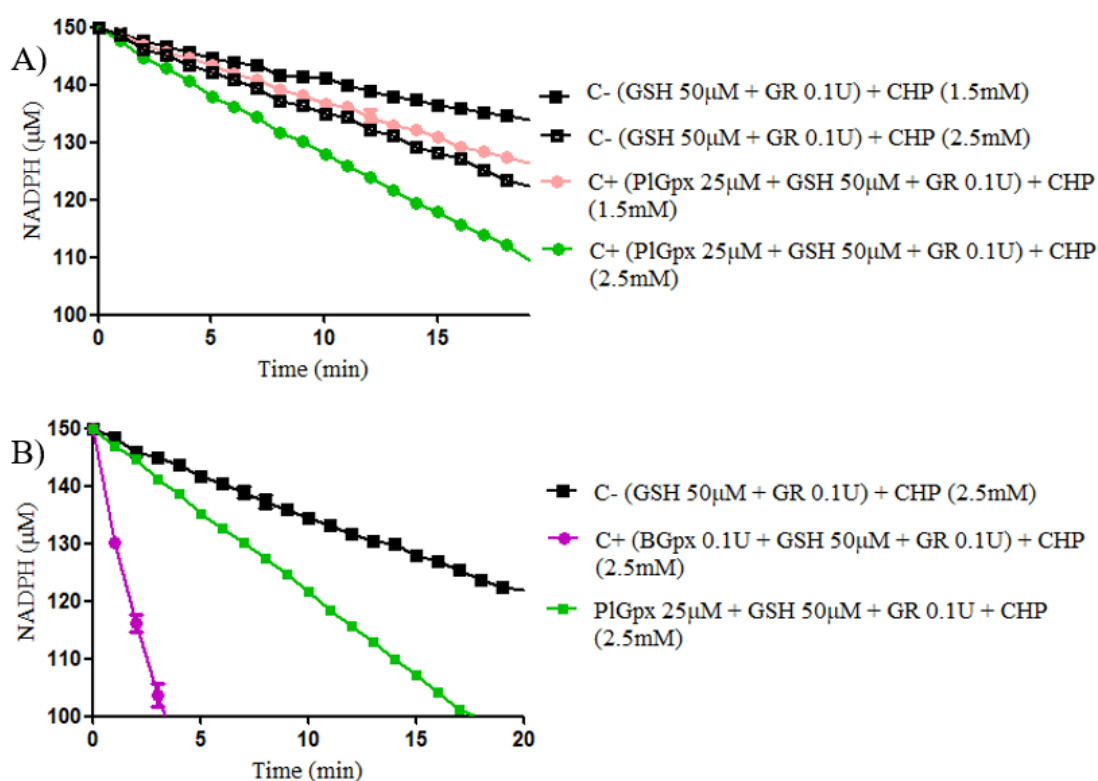
Figura 31: Gráficos da atividade de *PIGPx* por meio do consumo de GSH em ensaio com DTNB. Foram testadas três condições: GPx isolada (25 μ M, controle), GSH isolado (50 μ M, padrão) e GPx + GSH (amostra). As misturas foram tratadas com CHP (150 μ M) e incubadas por diferentes períodos, seguidas pela adição de DTNB (200 μ M). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 412 nm. Os testes foram feitos em duplicata.



Como apenas a glutationa peroxidase de *Paenibacillus lautus* apresentou resultados no ensaio com DTNB, apenas ela foi testada nessa etapa. A Figura 32A apresenta a depleção de NADPH ao longo do tempo. Mesmo havendo redução do NADPH no controle sem a enzima, pois o GSH continua a reagir com o CHP, é evidente que a enzima está ativa e que é possível observar uma diferença no consumo de NADPH na presença de *PIGPx*. Como controle positivo

de atividade, repetimos o ensaio utilizando uma GPx comercial de bovino (0,1 U) e 2,5 mM de CHP (Figura 32 B).

Figura 32: Ensaio acoplado de oxidação de NADPH. (A) PlGPx (25 μ M), GSH (50 μ M), GR (0,1 U), NADPH (150 μ M), tamponado (Tris/HCl 0,1 M, pH 7,4, EDTA 5 mM, azida sódica 1 mM) e acompanhado a 30 °C por 20 minutos. As reações foram iniciadas pela adição de hidroperóxido de cumeno (CHP) nas concentrações de 1,5 mM ou 2,5 mM. (B) Controle positivo de atividade da GPx (GPx bovina comercial 0,1 U) com 2,5 mM de CHP nas mesmas condições reacionais. O consumo de NADPH foi monitorado espectrofotometricamente a 340 nm. Os testes foram feitos em triplicata.



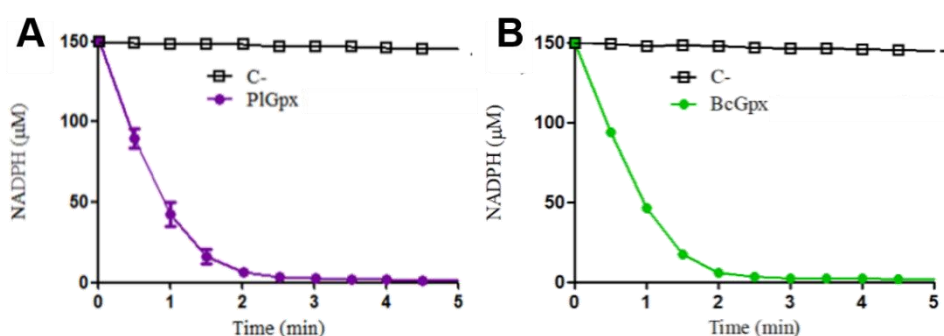
Curiosamente, mesmo sendo classificada como peroxirredoxina, a GPx de *Paenibacillus lautus* apresentou atividade utilizando a glutationa como doadora de elétrons. Isso pode representar uma atividade promíscua como observado para a GPx codificada pelo gene BtuE de *Escherichia coli* (Arenas *et al.*, 2010). Embora a atividade fosse bastante pronunciada quando incubada com tiorredoxina, observaram-se resultados positivos no ensaio com glutationa, ainda que mais sutis. Glutathione peroxidases de *Pseudoalteromonas* ANT506 e de *Rhodococcus* sp., por exemplo, foram testadas somente com glutathione e apresentaram resultados positivos (Rong *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2017).

4.3.2.2 Avaliação da atividade tiorredoxina peroxidase das GPx

A capacidade das GPxs de utilizar o sistema tiorredoxina como fonte de equivalentes redutores foi avaliada por meio de um ensaio acoplado baseado no consumo de NADPH. Nesse sistema, os elétrons provenientes do NADPH são transferidos sequencialmente para a tiorredoxina redutase (TrxR), para a tiorredoxina (Trx) e, por fim, para a glutathiona peroxidase, o que permite a regeneração da enzima durante o ciclo catalítico. Como o NADPH apresenta absorvância característica a 340 nm, enquanto sua forma oxidada (NADP⁺) não absorve significativamente nessa faixa, a atividade da cascata redox pode ser acompanhada pelo monitoramento da diminuição da absorvância ao longo do tempo.

A Figura 33 apresenta os resultados dos ensaios de atividade realizados para as *Pl*GPx2 e *Bc*GPx recombinantes. Ambas promoveram uma rápida diminuição da concentração de NADPH, calculada a partir da absorvância a 340 nm, ao longo dos 2 minutos de monitoramento. Em contraste, o controle negativo, composto por todos os reagentes da mistura reacional, exceto pela proteína de interesse, não apresentou consumo detectável de NADPH. Esses resultados indicam que as enzimas foram capazes de receber elétrons do sistema tiorredoxina de *P. aeruginosa*, promovendo o fluxo de elétrons ao longo da cascata redox TrxR/Trx/GPx. Dessa forma, o consumo de NADPH observado fornece evidências da atividade peroxidásica das enzimas avaliadas e de sua compatibilidade funcional com esse sistema redutor.

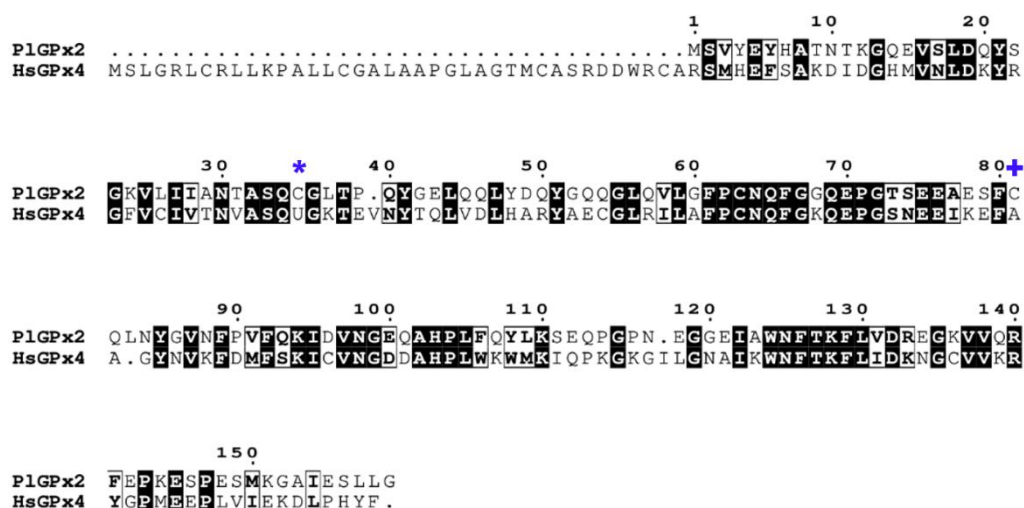
Figura 33: Avaliação da atividade peroxidásica de *Pl*GPx e *Bc*GPx utilizando peróxido de hidrogênio como substrato por meio do ensaio acoplado de oxidação de NADPH. A atividade peroxidásica de *Pl*GPx (A) e *Bc*GPx (B) foi avaliada por meio do ensaio acoplado de oxidação de NADPH, utilizando 500 μ M de H₂O₂. Condições experimentais: *Pl*GPx ou *Bc*GPx (3 μ M), Trx (6 μ M), TrxR (1 μ M), NADPH (150 μ M), HEPES (50 mM, pH 7,4), DTPA (100 μ M) e azida sódica (1 mM). As reações foram iniciadas pela adição de H₂O₂ e a oxidação do NADPH em NADP foi monitorada espectrofotometricamente (λ = 340 nm) a 37 °C durante 5 minutos.



A utilização do sistema tiorredoxina pelas enzimas oriundas de *P. lautus* e *B. cereus* corrobora o que vem sendo discutido a respeito da função da glutathiona peroxidase bacteriana. Embora exista uma homologia significativa entre as sequências bacterianas e as GPxs clássicas de mamíferos, o substrato preferencial se distingue (Bao *et al.*, 2023). Isso está relacionado à

disponibilidade de glutathione no ambiente celular, que é limitada ou ausente, principalmente em organismos Gram-positivos (Smirnova e Oktyabrsky, 2005). As GPxs clássicas de mamíferos devem ter evoluído devido à maior concentração de GSH no ambiente extracelular eucariótico e à maior eficiência catalítica por esse substrato conferida pela substituição de uma cisteína por uma selenocisteína (Figura 34). Esse resultado revelou uma adaptação evolutiva associada à mudança na especificidade dos agentes redutores, alcançada por meio da mutação de apenas alguns elementos-chave, sem alterações drásticas na sequência proteica.

Figura 34: Alinhamento entre as sequências da GPx4 de *Homo sapiens* e a PIGPx2. O asterisco demarca o resíduo de cisteína peroxidásica (C) ou selenocisteína (U) do sítio catalítico e o sinal positivo a cisteína de resolução ausente na GPx humana.

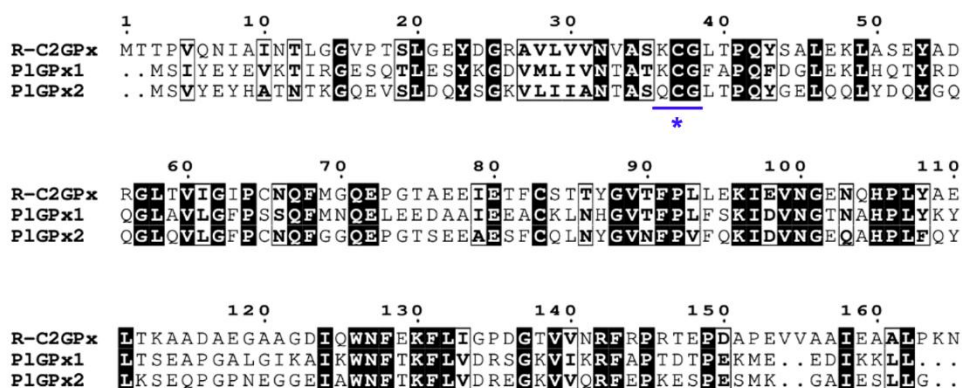


Entretanto, relatos experimentais que demonstrem a utilização de tiorredoxina como sistema redutor por glutathione peroxidases bacterianas ainda são escassos na literatura. A enzima codificada pelo gene BtuE de *E. coli* possui, em seu sítio ativo, atividade peroxidase não específica, embora prefira a tiorredoxina A para a decomposição de peróxidos (Arenas *et al.*, 2010). Uma proteína GPx-like recombinante do Gram-positivo *Corynebacterium glutamicum*, denominada MPx, atua como uma peroxidase antioxidante capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos, utilizando tanto os sistemas de regeneração dependentes de micorredoxina quanto de tiorredoxina (Si *et al.*, 2015). Estudos demonstraram que a enzima de *Staphylococcus aureus* também utiliza o mesmo sistema (Maji, Shukla e Bhattacharyya, 2025). Por fim, os dados são consistentes com a ausência de genes codificando glutathione redutase nos genomas analisados, sugerindo que essas enzimas provavelmente não utilizam o sistema glutathione/glutathione redutase como principal via de regeneração catalítica *in vivo*.

4.3.3 Avaliação da habilidade da *PlGPx2* modificar o poliestireno

Após o contato com a *PlGPx2*, os filmes de poliestireno não apresentaram modificações no perfil de suas ligações, conforme observado por FT-IR ATR. Ou seja, não houve a incorporação de grupos funcionais associados à oxidação, como hidroxilas e carbonilas, como foi observado por Rong *et al.* (2024) em filmes de polietileno tratados com uma glutathione peroxidase de *Rhodococcus* sp.. Os pesquisadores ressaltam que essa função estaria associada à liberação de espécies reativas de oxigênio formadas pelas NOS redox bridges, que podem ser formadas entre o enxofre da cisteína catalítica e o nitrogênio de aminoácidos como lisina, glicina e arginina (Bazzi e Sayyad, 2025; Rabe von Pappenheim *et al.*, 2022). A *PlGPx2* possui apenas uma glicina (C₃₅+1) em posição adequada para exercer esse tipo de função, enquanto a Gpx da linhagem de *Rhodococcus* apresenta também uma lisina (C₃₅-1), à qual os autores atribuem a atuação nesse processo. Entretanto, esse processo ainda pode ocorrer *in vivo* em *Paenibacillus lautus*. A *PlGPx1*, expressa de forma insolúvel em *E. coli* (e, portanto, não pode ser avaliada), apresenta o resíduo de lisina na mesma posição que a Gpx de *Rhodococcus*, o que sugere que esse mecanismo esteja presente (Figura 35).

Figura 35: Alinhamento das sequências de GPx de *Paenibacillus lautus* e de *Rhodococcus* sp. C2. O asterisco marca a região onde se espera que ocorra a NOS redox bridge.

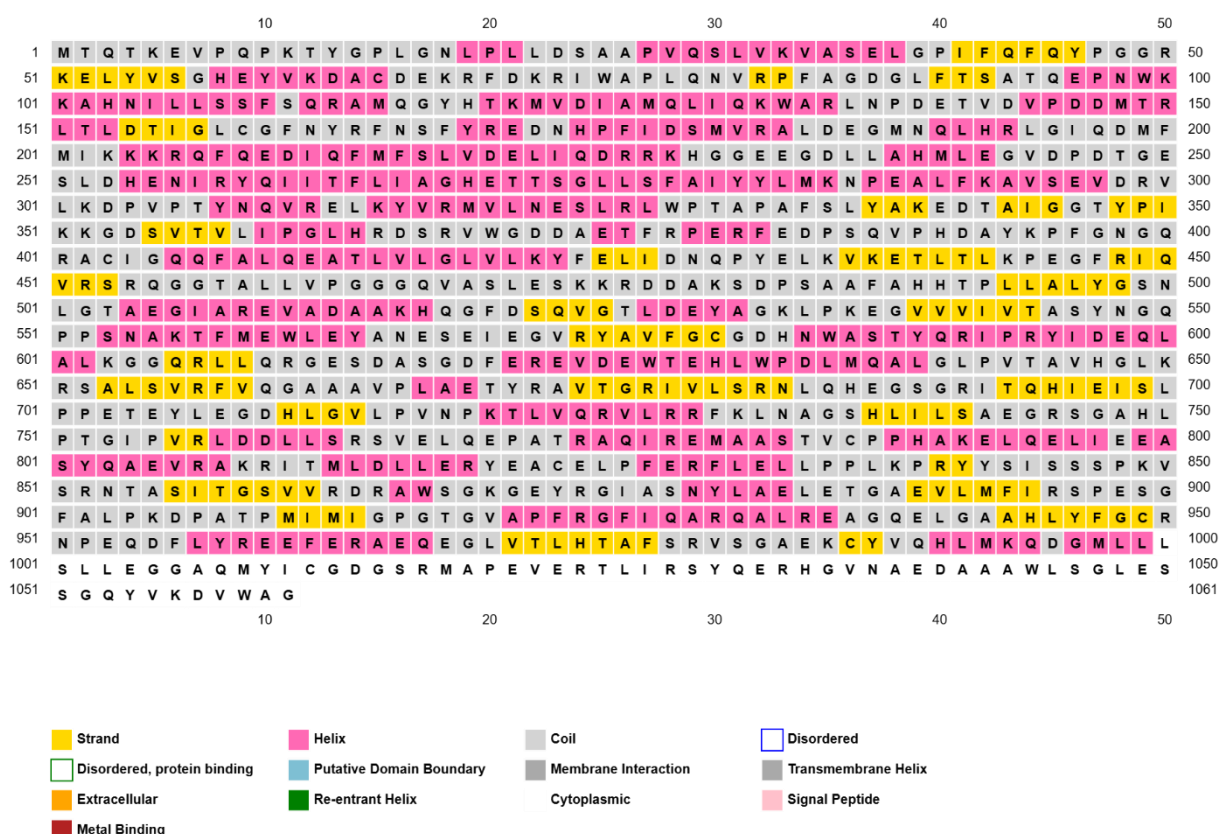


4.4 CITOCROMO P450 102 (CYP102)

Cada um dos genomas apresenta 1 sequência de citocromo P450 102. A maioria dos membros da família CYP102 consiste em enzimas “autossuficientes”, que não necessitam de proteínas adicionais de transferência de elétrons para serem cataliticamente ativas. Essas enzimas são compostas por uma proteína redutase do citocromo P450 (CPR), contendo os cofatores FAD e FMN, fusionada ao domínio heme do CYP (Figura 36) (Finnigan *et al.*, 2020;

Hannemann *et al.*, 2007; Wong e Bell, 2005). Embora seja considerada autossuficiente, estudos estruturais e bioquímicos indicaram que sua forma monomérica é virtualmente inativa, enquanto sua forma de homodímero é ativa (Girvan *et al.*, 2011; Kitazume *et al.*, 2007). O domínio FAD aceita dois elétrons (na forma de um íon hidreto) provenientes do NADPH, uma molécula de alta energia. O FAD reduzido transfere esses elétrons para o domínio FMN (mononucleotídeo de flavina). O domínio FMN transfere os elétrons, um de cada vez, para o heme no centro catalítico da enzima P450, onde ocorre a oxidação do substrato. Sua estrutura apresenta múltiplas conformações (aberta e fechada), com alta dinâmica conformacional. Na conformação fechada, a proteína torna-se mais compacta, mantendo os domínios heme e FAD em contato. Já na conformação aberta, um dos domínios FMN interage com a face proximal do heme, enquanto o outro permanece associado ao domínio FAD. Para permitir a transferência eficiente de elétrons ao domínio heme, os domínios FMN alternam entre as conformações aberta e fechada. Nesse processo, o FAD, localizado próximo ao FMN, pode aceitar elétrons e se reposicionar em direção ao heme, favorecendo a formação de um complexo ativo para a transferência de elétrons (Su *et al.*, 2020).

Figura 36: Representação da estrutura secundária da *P/CYP102* predita com o software PSIPRED. A estrutura caracteriza-se por apresentar 2 regiões distintas: o citocromo P450 (1-482) e a NADPH-P450 redutase (483-1061). Na segunda região, destacam-se os domínios FAD (493-632) e FMN (671-904).



4.4.1 Clonagem e expressão recombinante

A ORF de Cyp102, oriunda de *Paenibacillus lautus*, foi amplificada por PCR, e um amplicon de 3208 pb foi observado em gel de agarose a 1% (Figura 37A). O produto da PCR foi clivado com as enzimas *Bgl*I e *Sal*I e ligado em pET28a, também clivado com *Sal*I, porém, com *Bam*HI. A clonagem nesse vetor foi confirmada por linearização com *Sal*I (Figura 37B). A sequência esperada para a proteína de fusão encontra-se no APÊNDICE D -Sequências das proteínas de fusão.

Os plasmídeos resultantes foram transformados em *E. coli* Rosetta (DE3). Em meio Terrific Broth, os transformantes foram cultivados até atingirem a fase logarítmica de crescimento, quando o indutor IPTG foi adicionado e a alíquota não induzida foi coletada. Após 20 horas de indução a 20 °C, o processo foi encerrado e a alíquota final foi coletada (Figura 38). Ao ressuspender o *pellet*, foi observado que a suspensão se tornou avermelhada, o que ocorre devido ao grupamento heme em excesso no meio de cultura. O grupamento é essencial para a função da proteína. No decorrer da purificação, notou-se que as proteínas concentradas apresentaram coloração amarelada, decorrente da presença do domínio redutase.

Figura 37: Géis de agarose apresentando o produto da amplificação da ORF de *P/Cyp102* e a confirmação da clonagem por linearização por digestão. (A) Amplificação da ORF. 1: Amplicon (3208 pb). (B) Confirmação da clonagem por clivagem. 1: pET28-a recombinante linearizado. 2: pET28-a linearizado. M: Marcador molecular (GeneRuller 1 kb - Thermo Fisher)

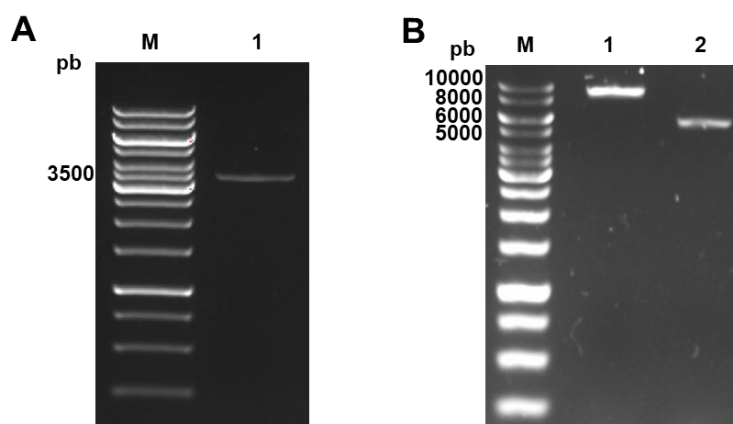
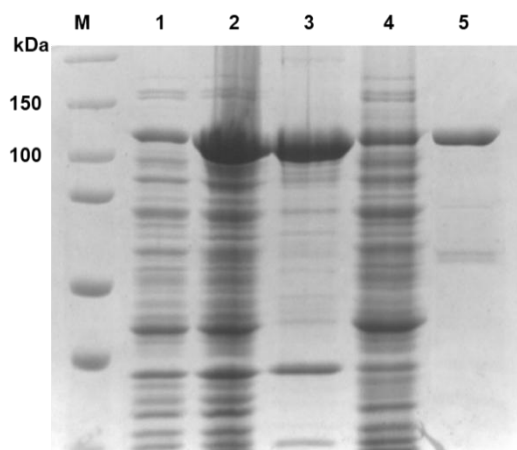


Figura 38: Perfil de expressão heteróloga da *P/CYP102* em *E. coli* Rosetta, apresentado em SDS-PAGE. (1) Não Induzido. (2) Induzido. (3) Fração Insolúvel. (4) Fração Solúvel. (5) Proteína Purificada. M: Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad).



Os experimentos destinados à caracterização funcional da CYP102 de *Paenibacillus lautus* encontram-se em andamento e deverão fornecer informações sobre sua atividade catalítica e seu potencial em função da biodegradação de PS. Em conjunto com os resultados apresentados nesta tese, esses estudos contribuirão para a elucidação do potencial biotecnológico dessa enzima e ampliarão a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na biodegradação de poliestireno.

CONCLUSÕES

O trabalho apresenta uma proposta biotecnológica para contribuir para a remediação da poluição por poliestireno, colocando como protagonistas as bactérias intestinais da larva de *Sphenophorus levis*.

A alimentação das larvas de bicudo da cana-de-açúcar com poliestireno expandido reduziu a massa das larvas, indicando que o material, por si só, não era suficiente para manter a biomassa, sendo necessário obter energia a partir de suas reservas, como o corpo gorduroso.

A análise das bibliotecas do gene 16S revelou uma mudança drástica na sua microbiota bacteriana intestinal após a alimentação com EPS. Uma menor incidência de bactérias intestinais e uma elevação na quantidade do endossimbionte obrigatório. Isso pode ocorrer devido ao estresse nutricional a que as larvas foram submetidas, reprimindo as bactérias do lúmen intestinal.

Em contrapartida, o lúmen intestinal das larvas ainda assim foi capaz de fornecer micro-organismos aptos a modificar a superfície do poliestireno. Cepas dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Cytobacillus* e *Raoultella*, isoladas a partir de um enriquecimento em meio de cultura mineral com filmes de poliestireno, modificaram a topografia e a composição atômica da superfície do polímero. No entanto, somente a linhagem de *Paenibacillus* adicionou grupos funcionais associados à oxidação, observáveis por FTIR-ATR, e promoveu ao polímero a perda de massa molecular. Indicando que, de fato, essa cepa apresenta a possibilidade de ser utilizada como ferramenta biotecnológica para a biodegradação de PS.

O sequenciamento do genoma total das linhagens, agora identificadas como *Paenibacillus lautus* e *Bacillus cereus*, foi realizado para desvendar os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo. Uma série de hidrolases e oxigenases candidatas foi identificada, entre as quais se destacaram as oxidases multicobre, as ring-cleaving oxigenases, os citocromos P450 e as glutathione peroxidases-like.

A expressão recombinante de GPx em *E. coli* de ambas as espécies apresentou rendimento satisfatório, permitindo a análise da atividade das GPx. Como descrito para as glutathione peroxidases bacterianas, ambas as proteínas testadas apresentaram atividade de tiorredoxina peroxidase, mas somente a P/GPx2 apresentou atividade frente à glutathione, indicando uma atividade promíscua.

A *PIGPx2* recombinante não foi capaz de modificar o filme de poliestireno *in vitro*, possivelmente por não possuir um resíduo de lisina adjacente à cisteína peroxidática. Entretanto, a *PIGPx1*, expressa de forma insolúvel, possui os atributos necessários para que isso ocorra *in vivo*.

De forma geral, os dados apresentados demonstram o potencial de uma cepa de *Paenibacillus lautus* no contexto da biodegradação de polímeros complexos, como o poliestireno. Espera-se, portanto, compreender melhor os mecanismos com que isso ocorre e explorar maneiras de integrar esses resultados a outras tecnologias de gestão de resíduos sólidos.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERTSSON, A.-C.; ANDERSSON, S. O.; KARLSSON, S. The mechanism of biodegradation of polyethylene. **Polymer Degradation and Stability**, v. 18, n. 1, p. 73–87, jan. 1987.
- ALBERTSSON, A.-C.; KARLSSON, S. Aspects of biodeterioration of inert and degradable polymers. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 31, n. 3, p. 161–170, jan. 1993.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. *et al.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, 18 abr. 2019.
- ALMEIDA, L. C. **Bicudo da cana-de-açúcar** Piracicaba Centro de Tecnologia Canavieira, , 2005.
- ANBUTSU, H. *et al.* Small genome symbiont underlies cuticle hardness in beetles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 40, 3 out. 2017.
- ANDRADY, A. L.; NEAL, M. A. Applications and societal benefits of plastics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1977–1984, 27 jul. 2009.
- ARENAS, F. A. *et al.* The Escherichia coli btuE gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 4, p. 690–694, ago. 2010.
- ARFIN, T.; MOHAMMAD, F.; YUSOF, N. A. Applications of polystyrene and its role as a base in industrial chemistry. . *Em: Polystyrene: synthesis, characteristics and applications*. Nova Iorque: Nova Science Publishers, 2015. p. 269–280.
- ARTHAM, T.; DOBLE, M. Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Polycarbonates. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, n. 1, p. 14–24, 9 jan. 2008.
- ATIQ, N. *et al.* Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 14, p. 1537–1541, 2010.
- AUTA, H. S.; EMENIKE, C. U.; FAUZIAH, S. H. Screening of Bacillus strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 1552–1559, dez. 2017.

BANKEVICH, A. *et al.* SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, maio 2012.

BAO, Y.-J. *et al.* Analysis and Characterization of Glutathione Peroxidases in an Environmental Microbiome and Isolated Bacterial Microorganisms. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 299–309, 28 mar. 2023.

BAPTISTA NETO, J. A. *et al.* Microplastics and attached microorganisms in sediments of the Vitória bay estuarine system in SE Brazil. **Ocean & Coastal Management**, v. 169, p. 247–253, mar. 2019.

BARDAJÍ, D. K. R.; FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G. Isolation of a polyethylene degrading *Paenibacillus* sp. from a landfill in Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 5, p. 699–704, 27 jul. 2019.

BAZZI, S.; SAYYAD, S. Revealing arginine-cysteine and glycine-cysteine NOS linkages by a systematic re-evaluation of protein structures. **Communications Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 146, 13 maio 2025.

BIOBAM BIOINFORMATICS. **OmicsBox – Bioinformatics Made Easy**, 2019. Disponível em: <<https://www.biobam.com/omicsbox>>

BOKULICH, N. A. *et al.* Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 90, 17 dez. 2018.

BOLYEN, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 24 ago. 2019.

BOMBELLI, P.; HOWE, C. J.; BERTOCCHINI, F. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. **Current Biology**, v. 27, n. 8, p. R292–R293, abr. 2017.

CALLAHAN, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 23 jul. 2016.

CALUMBY, R. J. N. *et al.* Characterization of cultivable intestinal microbiota in *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) and determination of its cellulolytic activity. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 110, n. 2, 8 jun. 2022.

CASTELIANI, A. *et al.* Behavioral aspects of *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), damage to sugarcane and its natural infection by *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditidae). **Crop Protection**, v. 137, p. 105262, nov. 2020.

CHAUMEIL, P.-A. *et al.* GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database. **Bioinformatics**, v. 38, n. 23, p. 5315–5316, 30 nov. 2022.

CHOUAIA, B. *et al.* Complete Genome Sequence of *Rhynchophorus ferrugineus* Endocytobiont “*Candidatus Nardonella dryophthoridicola*” Strain NardRF. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 26, jul. 2021.

DANMEK, K. *et al.* Evaluation of Red Palm Weevils (*Rhynchophorus ferrugineus*: Curculionidae) for Putative Oxidation of Ingested Polystyrene and Polyurethane and Their Gut Microbiota Response. **Insects**, v. 16, n. 6, p. 587, 2 jun. 2025.

DEGASPARI, N. *et al.* Biology of *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col Curculionidae), with artificial diet and in the field. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, n. 6, p. 553–558, 1987.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 8 mar. 2004.

EIBEN, S. *et al.* Preparative use of isolated CYP102 monooxygenases—A critical appraisal. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 4, p. 662–669, ago. 2006.

EVANGELISTA, D. E. *et al.* Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the pectin methylesterase from the sugar cane weevil *Sphenophorus levis*. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 70, n. 3, p. 331–334, 1 mar. 2014.

EWING, B. *et al.* Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1 mar. 1998.

FAILOR, K. C. *et al.* *Ysinibacillus*. Em: **Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] Wiley, 2019. p. 1–62.

FARZANE BASAVAND *et al.* Investigation on Gut Microbiota Diversity of *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) Larvae. **Biology Bulletin**, v. 51, n. 2, p. 294–301, 9 abr. 2024.

FEENSTRA, K. A. *et al.* Combining substrate dynamics, binding statistics, and energy barriers to rationalize regioselective hydroxylation of octane and lauric acid by CYP102A1 and mutants. **Protein Science**, v. 16, n. 3, p. 420–431, 2 mar. 2007.

FETZNER, S. Ring-Cleaving Dioxygenases with a Cupin Fold. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2505–2514, 15 abr. 2012.

FILIPPIS, F. DE *et al.* Plastics shape the black soldier fly larvae gut microbiome and select for biodegrading functions. **Microbiome**, v. 11, n. 1, p. 205, 14 set. 2023.

FINNIGAN, J. D. *et al.* Cytochromes P450 (P450s): A review of the class system with a focus on prokaryotic P450s. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 122, p. 289–320, 2020.

FONSECA, F. P. P. *et al.* Recombinant expression, localization and in vitro inhibition of midgut cysteine peptidase (Sl-CathL) from sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 58–69, jan. 2012.

GALLOWAY, T. S.; LEWIS, C. N. Marine microplastics spell big problems for future generations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 9, p. 2331–2333, 22 mar. 2016.

GANESH KUMAR, A. *et al.* Biodegradation of polystyrene by deep-sea *Bacillus paralicheniformis* G1 and genome analysis. **Science of The Total Environment**, v. 774, p. 145002, jun. 2021.

GAO, J. *et al.* A comprehensive review on biological funnel mechanism in lignin valorization: Pathways and enzyme dynamics. **Microbiological Research**, v. 287, p. 127835, out. 2024.

GASTEIGER, E. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 1 jul. 2003.

GAUSEPOHL, H.; NIESSNER, N. Polystyrene and Styrene Copolymers. *Em: Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. [s.l.] Elsevier, 2001. p. 7735–7741.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, 7 jul. 2017.

GIAKOUMAKIS, N. S. *et al.* Total revalorization of high impact polystyrene (HIPS): enhancing styrene recovery and upcycling of the rubber phase. **Green Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 340–352, 2024.

GIRÓN-PÉREZ, K. *et al.* Atracção de adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) a fragmentos vegetais em diferentes estados de conservação. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 842–846, dez. 2009.

GIRVAN, H. M. *et al.* Flavocytochrome P450 BM3 mutant W1046A is a NADH-dependent fatty acid hydroxylase: Implications for the mechanism of electron transfer in the P450 BM3 dimer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 507, n. 1, p. 75–85, mar. 2011.

GRAU, T.; VILCINSKAS, A.; JOOP, G. Probiotic *Enterococcus mundtii* Isolate Protects the Model Insect *Tribolium castaneum* against *Bacillus thuringiensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 7 jul. 2017.

GREULE, A. *et al.* Unrivalled diversity: the many roles and reactions of bacterial cytochromes P450 in secondary metabolism. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 8, p. 757–791, 2018.

GU, J.-D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, n. 2, p. 69–91, set. 2003.

GUENGERICH, F. P.; MUNRO, A. W. Unusual Cytochrome P450 Enzymes and Reactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 24, p. 17065–17073, jun. 2013.

HANNEMANN, F. *et al.* Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1770, n. 3, p. 330–344, mar. 2007.

HO, B. T.; ROBERTS, T. K.; LUCAS, S. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 308–320, 17 fev. 2018.

HOU, L.; MAJUMDER, E. L.-W. Potential for and Distribution of Enzymatic Biodegradation of Polystyrene by Environmental Microorganisms. **Materials**, v. 14, n. 3, p. 503, 21 jan. 2021.

HUANG, W.-C. *et al.* Control of the stereo-selectivity of styrene epoxidation by cytochrome P450 BM3 using structure-based mutagenesis. **Metallomics**, v. 3, n. 4, p. 410, 2011.

ILLUMINA. **16S Metagenomic Sequencing Library Preparation**. Disponível em: <https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2026.

IMMANUEL, O. M.; ISAIAH, I. A. Polystyrene degradation by bacteria isolated from the larvae of <i>Rhynchophorus phoenicis</i>; **Nigerian Journal of Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 99–106, 12 mar. 2024.

IUPAC. **The IUPAC Compendium of Chemical Terminology**. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2025.

JAYAKUMAR, V.; RAMESH SUNDAR, A.; VISWANATHAN, R. Biological Suppression of Sugarcane Smut with Endophytic Bacteria. **Sugar Tech**, v. 21, n. 4, p. 653–660, 3 ago. 2019.

JIANG, S. *et al.* Isolation, Identification, and Characterization of Polystyrene-Degrading Bacteria From the Gut of *Galleria Mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 18 ago. 2021a.

JIANG, S. *et al.* . Biodegradation of Polystyrene by *Tenebrio molitor*, *Galleria mellonella*, and *Zophobas atratus* Larvae and Comparison of Their Degradation Effects. **Polymers**, v. 13, n. 20, p. 3539, 14 out. 2021b.

JIN, Y. *et al.* Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 322–329, abr. 2018.

KANG, M.-G.; KWAK, M.-J.; KIM, Y. Polystyrene microplastics biodegradation by gut bacterial *Enterobacter hormaechei* from mealworms under anaerobic conditions: Anaerobic oxidation and depolymerization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 459, p. 132045, out. 2023.

KAPLAN, D. L.; HARTENSTEIN, R.; SUTTER, J. Biodegradation of polystyrene, poly(methyl methacrylate), and phenol formaldehyde. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 551–553, set. 1979.

KATO, K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 14, p. 3059–3066, 15 jul. 2002.

- KIM, H. R. *et al.* Biodegradation of Polystyrene by *Pseudomonas* sp. Isolated from the Gut of Superworms (Larvae of *Zophobas atratus*). **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 11, p. 6987–6996, 2 jun. 2020.
- KIM, H.-W. *et al.* Biodegradation of polystyrene by bacteria from the soil in common environments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, p. 126239, ago. 2021.
- KIM, Y.-B. *et al.* Biodegradation of polystyrene and systems biology-based approaches to the development of new biocatalysts for plastic degradation. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 37, p. 100505, mar. 2024.
- KITAZUME, T. *et al.* Obligatory Intermolecular Electron-Transfer from FAD to FMN in Dimeric P450BM-3. **Biochemistry**, v. 46, n. 42, p. 11892–11901, 1 out. 2007.
- KRIVENTSEVA, E. V *et al.* OrthoDB v10: sampling the diversity of animal, plant, fungal, protist, bacterial and viral genomes for evolutionary and functional annotations of orthologs. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D807–D811, 8 jan. 2019.
- KRUEGER, M. C.; HARMS, H.; SCHLOSSER, D. Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 21, p. 8857–8874, 30 nov. 2015.
- KURIWADA, T. *et al.* Biological Role of *Nardonella* Endosymbiont in Its Weevil Host. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13101, 1 out. 2010.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.
- LENFANT, N. *et al.* Proteins with an alpha/beta hydrolase fold: Relationships between subfamilies in an ever-growing superfamily. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, n. 1, p. 266–268, mar. 2013.
- LI, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 15 ago. 2009.
- LI, M.-X. *et al.* Cockroach *Blattella dubia* biodegrades polystyrene plastics: Insights for superior ability, microbiome and host genes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 479, p. 135756, nov. 2024.

- LI, P. *et al.* Characteristics of Plastic Pollution in the Environment: A Review. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 107, n. 4, p. 577–584, 12 out. 2021.
- LI, S. *et al.* Gut microbiota mediate *Plutella xylostella* susceptibility to Bt Cry1Ac protoxin is associated with host immune response. **Environmental Pollution**, v. 271, p. 116271, fev. 2021.
- LIN, W. *et al.* Biodegradation of polystyrene by bacteria isolated from the yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) gut. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 12, n. 2, p. 112071, abr. 2024.
- LIU, R. *et al.* Biodegradation of polystyrene (PS) by marine bacteria in mangrove ecosystem. **Journal of Hazardous Materials**, v. 442, p. 130056, jan. 2023.
- LOGAN, N. A.; VOS, P. DE. *Bacillus. Em: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. [s.l.] Wiley, 2015. p. 1–163.
- LUCAS, N. *et al.* Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. **Chemosphere**, v. 73, n. 4, p. 429–442, set. 2008.
- MAJI, S.; SHUKLA, M.; BHATTACHARYYA, S. **Deciphering the Structure and Mechanism of SaGpx: A Non-Canonical Glutathione Peroxidase from *Staphylococcus aureus***, 24 nov. 2025.
- MALLISETTY, R. *et al.* Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by *Paenibacillus* Sp. and *Serratia* Sp. isolated from marine soil sample. **Materials Today: Proceedings**, jun. 2023.
- MANNI, M. *et al.* BUSCO Update: Novel and Streamlined Workflows along with Broader and Deeper Phylogenetic Coverage for Scoring of Eukaryotic, Prokaryotic, and Viral Genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 10, p. 4647–4654, 27 set. 2021.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2 maio 2011.
- MASSOS, A.; TURNER, A. Cadmium, lead and bromine in beached microplastics. **Environmental Pollution**, v. 227, p. 139–145, ago. 2017.
- MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, v. 16, n. 4, p. 404–405, 1 abr. 2000.

- MENG, T. K. *et al.* *Bacillus megaterium*: a Potential and an Efficient Bio-Degrader of Polystyrene. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, 2021.
- MIAO, S.; ZHANG, Y. Feeding and degradation effect on plastic of *Zophobas morio*. **Journal of Environment Entomology**, v. 32, p. 435–444, 2010.
- MOHAN, A. J. *et al.* Microbial assisted High Impact Polystyrene (HIPS) degradation. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 204–207, ago. 2016.
- MOHAN, C. *et al.* hRNAi-mediated knock-down of *Sphenophorus levis* V-ATPase E in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp interspecific hybrid) affects the insect growth and survival. **Plant Cell Reports**, v. 40, n. 3, p. 507–516, 3 mar. 2021.
- MUTHUKUMAR, J.; KANDUKURI, V. A.; CHIDAMBARAM, R. A critical review on various treatment, conversion, and disposal approaches of commonly used polystyrene. **Polymer Bulletin**, v. 81, n. 4, p. 2819–2845, 30 fev. 2024.
- NELSON, D. R. Cytochrome P450 diversity in the tree of life. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1866, n. 1, p. 141–154, jan. 2018.
- NIKOLAIVITS, E. *et al.* Progressing Plastics Circularity: A Review of Mechano-Biocatalytic Approaches for Waste Plastic (Re)valorization. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 22 jun. 2021.
- PALMIERI, L.; PAVARINI, R.; SHARMA, P. P. Draft Genome Sequence of “*Candidatus Nardonella dryophthoridicola*” Strain NARMHE1, Endosymbiont of *Metamasius hemipterus* (Coleoptera, Curculionidae, Dryophthorinae). **Microbiology Resource Announcements**, v. 11, n. 11, 17 nov. 2022.
- PARTHASARATHY, A. *et al.* Polystyrene Degradation by *Exiguobacterium* sp. RIT 594: Preliminary Evidence for a Pathway Containing an Atypical Oxygenase. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1619, 10 ago. 2022.
- PATEL, S.; GUPTA, R. S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 406–438, 1 jan. 2020.

PAULA, F. F. P. DE. **Biologia molecular aplicada à identificação de alvos para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis***. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2012.

PEDEZZI, R. *et al.* A novel β -fructofuranosidase in Coleoptera: Characterization of a β -fructofuranosidase from the sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 55, p. 31–38, dez. 2014.

PEIXOTO, J.; SILVA, L. P.; KRÜGER, R. H. Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 324, p. 634–644, fev. 2017.

PENG, B.-Y. *et al.* Biodegradation of Polystyrene by Dark (*Tenebrio obscurus*) and Yellow (*Tenebrio molitor*) Mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae). **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 9, p. 5256–5265, 7 maio 2019.

PILAPITIYA, P. G. C. N. T.; RATNAYAKE, A. S. The world of plastic waste: A review. **Cleaner Materials**, v. 11, p. 100220, mar. 2024.

PLASTICS EUROPE. **"Plastics – the fast Facts" 2025**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2025/09/PE_TheFacts_25_digital-1pager-scrollable.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2026.

PRASAD, A. V.; SINGH, R. P. Recent Developments in the Degradation and Stabilization of High-Impact Polystyrene. **Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews**, v. 37, n. 4, p. 581–598, nov. 1997.

PRECETTI, A. A. C. M.; ARRIGONI, E. B. **Aspectos biológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar. Boletim Técnico Coopersucar – Edição Especial. 15p**Coopersucar, , 1990.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9490, 10 mar. 2010.

PRIEST, F. G. *Paenibacillus. Em: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. [s.l.] Wiley, 2015. p. 1–40.

QIU, Q. *et al.* Biodegradation of polystyrene and its mechanisms driven by a customized lignin-degrading microbial consortium and degrading bacteria. **Journal of Environmental Management**, v. 384, p. 125560, jun. 2025.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 27 nov. 2012.

RABE VON PAPPENHEIM, F. *et al.* Widespread occurrence of covalent lysine–cysteine redox switches in proteins. **Nature Chemical Biology**, v. 18, n. 4, p. 368–375, 14 abr. 2022.

RADDADI, N.; FAVA, F. Biodegradation of oil-based plastics in the environment: Existing knowledge and needs of research and innovation. **Science of The Total Environment**, v. 679, p. 148–158, ago. 2019.

REN, L. *et al.* Biodegradation of Polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the Guts of Wax Moth *Galleria mellonella*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 11, p. 1941, 31 maio 2019.

RIBEIRO, N.; ABELHO, M.; COSTA, R. A Review of the Scientific Literature for Optimal Conditions for Mass Rearing *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Entomological Science**, v. 53, n. 4, p. 434–454, out. 2018.

RINKE, R. *et al.* Microbial diversity in the larval gut of field and laboratory populations of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 2679–2691, 2011.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W320–W324, 1 jul. 2014.

ROBESON, M. S. *et al.* RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management. **PLOS Computational Biology**, v. 17, n. 11, p. e1009581, 8 nov. 2021.

RODRIGUES, J. P. *et al.* Significance of interactions between microplastics and POPs in the marine environment: A critical overview. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 111, p. 252–260, fev. 2019.

RONG, Z. *et al.* Degradation of low-density polyethylene by the bacterium *Rhodococcus* sp. C-2 isolated from seawater. **Science of The Total Environment**, v. 907, p. 167993, jan. 2024.

SALAZAR-RIVERA, G. I. *et al.* Disentangling the gut bacterial communities of the agave weevil, *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Symbiosis**, v. 92, n. 3, p. 381–392, 29 abr. 2024.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1 dez. 1977.

SCHWENGERS, O. *et al.* Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. **Microbial Genomics**, v. 7, n. 11, 30 nov. 2021.

SEKHAR, V. C. *et al.* Microbial degradation of high impact polystyrene (HIPS), an e-plastic with decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide. **Journal of Hazardous Materials**, v. 318, p. 347–354, nov. 2016.

SEKOWSKA, A. *Raoultella* spp.—clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 3, p. 221–227, 6 maio 2017.

SHIBAO, P. Y. T. *et al.* Sugarcane cystatins: From discovery to biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 676–686, 15 jan. 2021.

SI, M. *et al.* Functional characterization of a mycothiol peroxidase in *Corynebacterium glutamicum* that uses both mycoredoxin and thioredoxin reducing systems in the response to oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 469, n. 1, p. 45–57, 1 jul. 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Infrared Spectroscopy. *Em: Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Seventh ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. .

SINGH, A.; CHAUHAN, A.; GAUR, R. A comprehensive review on the synthesis, properties, environmental impacts, and chemiluminescence applications of polystyrene (PS). **Discover Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 47, 20 mar. 2025.

SINGH, R. K. *et al.* Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: a comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 220, 18 dez. 2020.

SMIRNOVA, G. V.; OKTYABRSKY, O. N. Glutathione in Bacteria. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 11, p. 1199–1211, nov. 2005.

SOARES-COSTA, A. *et al.* Digestive physiology and characterization of digestive cathepsin L-like proteinase from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 4, p. 462–468, abr. 2011.

SONG, L.; FLOREA, L.; LANGMEAD, B. Lighter: fast and memory-efficient sequencing error correction without counting. **Genome Biology**, v. 15, n. 11, p. 509, 15 nov. 2014.

SU, M. *et al.* Cryo-EM reveals the architecture of the dimeric cytochrome P450 CYP102A1 enzyme and conformational changes required for redox partner recognition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 6, p. 1637–1645, fev. 2020.

SULONG, N. H. R.; MUSTAPA, S. A. S.; RASHID, M. K. A. Application of expanded polystyrene (EPS) in buildings and constructions: A review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 20, 20 maio 2019.

SUSSARELLU, R. *et al.* Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 9, p. 2430–2435, mar. 2016.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 25 jun. 2021.

TARARA, M.; AHUJA, S.; MELLIES, J. L. A Cytochrome P450 Facilitates Polyethylene Metabolism in a Microbial Community. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 18, p. 8775, 9 set. 2025.

THOMPSON, R. C. *et al.* Our plastic age. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1973–1976, 27 jul. 2009.

TOKIWA, Y. *et al.* Biodegradability of Plastics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 9, p. 3722–3742, 26 ago. 2009.

TOPPO, S. *et al.* Evolutionary and Structural Insights Into the Multifaceted Glutathione Peroxidase (Gpx) Superfamily. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 9, p. 1501–1514, set. 2008.

TOUSSAINT, B. *et al.* Review of micro- and nanoplastic contamination in the food chain. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 36, n. 5, p. 639–673, 4 maio 2019.

TSOCHATZIS, E. *et al.* Gut Microbiome and Degradation Product Formation during Biodegradation of Expanded Polystyrene by Mealworm Larvae under Different Feeding Strategies. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7568, 14 dez. 2021.

VANIN, S. A. A new species of *Sphenophorus* Schoenherr from Brazil (Coleoptera, Curculionidae, Rhynchophorinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 34, n. 4, p. 697–701, 1990.

VILANOVA, C. *et al.* The Generalist Inside the Specialist: Gut Bacterial Communities of Two Insect Species Feeding on Toxic Plants Are Dominated by *Enterococcus* sp. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 28 jun. 2016.

VOITH, K. *et al.* Non-Conventional Reinforced EPS and Its Numerical Examination. **Processes**, v. 11, n. 1, p. 12, 21 dez. 2022.

WALKER, B. J. *et al.* Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112963, 19 nov. 2014.

WANG, W. *et al.* Degradation and potential metabolism pathway of polystyrene by bacteria from landfill site. **Environmental Pollution**, v. 343, p. 123202, fev. 2024.

WANG, Y. *et al.* Airborne Microplastics: A Review on the Occurrence, Migration and Risks to Humans. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 107, n. 4, p. 657–664, 19 out. 2021.

WANG, YATONG *et al.* A glutathione peroxidase from Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. ANT506: Cloning and heterologous expression of the gene and characterization of recombinant enzyme. **Bioengineered**, v. 8, n. 6, p. 742–749, 2 nov. 2017.

WANG, Z. *et al.* A polystyrene-degrading *Acinetobacter* bacterium isolated from the larvae of *Tribolium castaneum*. **Science of The Total Environment**, v. 726, p. 138564, jul. 2020.

WEBER, E. *et al.* Screening of a minimal enriched P450 BM3 mutant library for hydroxylation of cyclic and acyclic alkanes. **Chem. Commun.**, v. 47, n. 3, p. 944–946, 2011.

WEI, R.; ZIMMERMANN, W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1308–1322, 28 nov. 2017.

WEISBURG, W. G. *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, jan. 1991.

WONG, L.; BELL, S. G. Iron: Heme Proteins, Mono- & Dioxygenases Based in part on the article Iron: Heme Proteins, Mono- & Dioxygenases by Masanori Sono & John

H. Dawson which appeared in the *Encyclopedia of Inorganic Chemistry, First Edition*. Em: **Encyclopedia of Inorganic Chemistry**. [s.l.] Wiley, 2005. .

WOO, S.; SONG, I.; CHA, H. J. Fast and Facile Biodegradation of Polystyrene by the Gut Microbial Flora of *Plesiophthalmus davidis* Larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 18, set. 2020.

YANG, J. *et al.* Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 23, p. 13776–13784, 2 dez. 2014.

YANG, Y. *et al.* Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 2. Role of Gut Microorganisms. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 20, p. 12087–12093, 20 out. 2015a.

YANG, Y. *et al.* . Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 20, p. 12080–12086, 20 out. 2015b.

YEOM, S.-J.; LE, T.-K.; YUN, C.-H. P450-driven plastic-degrading synthetic bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 166–179, fev. 2022.

YUAN, X. *et al.* Kinetics and Activation Parameters for Oxidations of Styrene by Compounds I from the Cytochrome P450_{BM-3} (CYP102A1) Heme Domain and from CYP119. **Biochemistry**, v. 48, n. 38, p. 9140–9146, 29 set. 2009.

YUAN, Y. *et al.* Unique *Raoultella* species isolated from petroleum contaminated soil degrades polystyrene and polyethylene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 263, p. 115232, set. 2023.

YUN, S.-D. *et al.* Exploring a New Biocatalyst from *Bacillus thuringiensis* JNU01 for Polyethylene Biodegradation. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 10, n. 6, p. 485–492, 13 jun. 2023.

ZERVA, A. *et al.* Investigation of *Abortiporus biennis* lignocellulolytic toolbox, and the role of laccases in polystyrene degradation. **Chemosphere**, v. 312, p. 137338, jan. 2023.

ZHANG, X.; LI, S. Expansion of chemical space for natural products by uncommon P450 reactions. **Natural Product Reports**, v. 34, n. 9, p. 1061–1089, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Biodegradation of polyethylene and polystyrene: From microbial deterioration to enzyme discovery. **Biotechnology Advances**, v. 60, p. 107991, nov. 2022.

APÊNDICE A - SEQUÊNCIAS DA REGIÃO V3-V4 DAS BACTÉRIAS ISOLADAS

Este apêndice apresenta a sequência da região V3-V4, entre as posições 314 e 805 do gene 16S, das bactérias isoladas e identificadas nesse trabalho, conforme apresentado na seção 4.3 do capítulo 1.

Bacillus cereus

>PX753250.1

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC
AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAG
AACAAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC
GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAA
AGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTG GGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC

Paenibacillus lautus

>PX753252.1

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGC
AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGAAG
AACGTCTTCTAGAGTAACTGCTAGGAGAGTGACGGTACTTGAGAAGAAAGCCCCG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGA
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGGTGTTTAAACCCGAG
GCTCAACTTCGGGTTCGCACTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG
TGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG GGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC

Lysinibacillus sp.

>>PX753251.1

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGC
AACGCCGCGTGAGTGAAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTAAGGGAAG
AACAAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTATTAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGG
CTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAG
TGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGC

GAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC

***Cytobacillus* sp.**

>PX753253.1

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGC
AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAG
AACAAAGTACCGGAGTAAGTACCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAGA
GTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGG
CGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC

***Raoultella* sp.**

>PX753254.1

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
CATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGG
AAGGCATTAAGGTTAATAACCTTGGTGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGG
CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGT
AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCG
AAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC

APÊNDICE B - SEQUÊNCIAS DAS ORFS E PROTEÍNAS DE INTERESSE NO CONTEXTO DA BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS – *Bacillus cereus*

Este apêndice apresenta uma seleção de sequências de nucleotídeos das ORFs e de sequências de aminoácidos das proteínas por elas codificadas, obtidas a partir do genoma de *Bacillus cereus*. Trata-se de um conjunto de proteínas candidatas a desempenhar um papel na biodegradação do poliestireno, conforme exposto na seção 4.2 do capítulo 2.

>EGOBGB_22575 glutathione peroxidase

```
ATGACAGTTTATGATTTTTCAGCTAAAACAATTACAGGTGAAGAAAAATCGTTAAA
AGATTACAAAGGAAAAGCACTTCTTATTGTCAATGTAGCTAGCAAATGTGGTTTCA
CACCACAATATAAAGGATTACAAGAGGTATATGATAAATATAAAGACCAAGGACTC
GAAATACTCGGATTTTCCTTGTAACCAATTCGGGGGACAAGAACCAGGTACAGAAG
CGGACATTACTAGTTTTTGTGAATTAACTACGGTGTAACCTCCCGATGTTTGCAA
AGGTTGATGTGAAAGGTGATAAGGCTCACCTCTATATACATACATGACAGAACAA
GCACCAGGTTTACTTGGTATGAAAGCAGTGAAATGGAATTTTACAAAGTTTTTAAT
CGGAAAAGACGGGAAAGTAGTAGGGCGTTTTGCTCCGCAGACGAAGCCGGTAGA
TTTAGAGGTTGAGATTGAGAAGGTGCTTGGAGAATAA
```

>EGOBGB_22575 glutathione peroxidase

```
MTVYDFSAKTITGEEKSLKDYK GKALLIVNVASKCGFTPQYKGLQEVYDKYKDQGL
EILGFPCNQFGGQEPGTEADITSFCELNYGVNFPMPFAKVVDVKGDKAHPLYTYMTEQA
PGLLGMKAVKWNFTKFLIGKDGKVVGGRFAPQTKPVDLEVEIEKVLGE
```

>EGOBGB_02135 bifunctional P-450/NADPH--P450 reductase

```
ATGGAAAAAAAAGTATCTGCCATTCCTCAGCCGAAAACATATGGACCGCTGGGTAA
TCTCCCATTAATCGATAAAGATAAACCGACCTATCCTTTATCAAGATAGCGGAAGA
GTATGGTCCCATTTTTCAAATTCAACTTTAAGTGATACCATCATTGTTCGTTTCTGG
ACATGAATTGGTAGCGGAAGTCTGTGACGAAACACGGTTCGATAAAAGTATAGAG
GGTGCTTTAGCAAAAGTTCGTGCCTTTGCTGGGGACGGATTATTTACTAGCGAGAC
TCACGAGCCTAACTGGAAAAAAGCTCATAATATTTTGATGCCTACATTCAGCCAAC
GGGCAATGAAAGATTACCATGCCATGATGGTCGATATTGCTGTACAACCTCGTTCAA
AAATGGGCACGGCTTAATCCGAATGAAAACGTAGATGTTCCGGAGGATATGACACG
TCTTACGTTAGATACAATTGGTCTATGTGGTTTTAATTACCGATTCAATAGCTTTTAT
CGTGAGACACCTCATCCTTTTATTACTAGCATGACCCGTGCTCTAGATGAGGCGATG
CACC AATTGCAGCGGCTGGATATAGAAGACAACTTATGTGGAGAACGAAACGTC
AATTT CAGCATGATATCCAATCTATGTTTTCTTTAGTAGATAATATTATTGCTGAACGT
AAAAGTAGTGAGATCAGGAAGAAAATGATTTACTTTCCCGTATGTAAATGTGCC
AGATCCGGAACTGGTGAAAAATTAGATGATGAAAACATTCGTTTCCAAATTATTA
CTTTTTTAATAGCTGGACATGAGACAACAAGTGGATTGTTATCTTTTGCAATTTACT
TCTTATTAAAGAATCCGGATAAATTGAAAAAAGCCTATGAAGAAGTAGACCGTGTT
```

TTGACAGATCCTACTCCAACATACCAACAAGTTATGAAACTGAAGTATATGCGGAT
 GATTTTAAATGAATCGCTACGTCTATGGCCTACCGCTCCAGCATTTCAGTCTTTATGC
 AAAAGAAGATACAGTGATTGGCGGGAAATACCCAATTAAGAAAGGAGAAGATCGT
 ATTTCTGTTCTTATTCCACAGCTACATAGGGATAAAGATGCATGGGGAGACAATGTG
 GAAGAATTCCAACCTGAACGATTTGAAGAGCTGGATAAGGTTCCCTCATCATGCTTA
 TAAGCCATTTGGAAATGGCCAGAGAGCATGTATCGGTATGCAATTTGCACTTCATG
 AAGCCACTCTTGTAATGGGAATGCTTCTTCAACATTTTGAATTAATCGATTATCAAA
 ACTATCAGCTGGACGTAAAACAAACATTAACGCTAAAGCCCGGTGATTTTAAGATT
 AGGATTCTACCCCGAAAACAACTATTAGTCATCCTACTGTTCTTGACCTACAGA
 GGACAAGCTGAAAAACGATGAAATTAAGCAACACGTCCAGAAGACACCTTCTATT
 ATTTGGGGCCGATAATCTTTCACCTTCTTGTTCTGTATGGCTCGGATACAGGTGTAGCA
 GAAGGTATTGCAAGAGAATTAGCAGATACAGCTAGTTTAGAAGGAGTTCAAACGG
 AAGTGGTAGCTCTTAACGATCGAATTGGAAGTTTGCCAAAAGAAGGAGCGGTACT
 TATTGTGACTTCTTCTTATAATGGAAAACCGCCAAGTAATGCAGGGCAGTTTGTGC
 AATGGTTGGAGGAACTAAAACCAGATGAGCTAAAAGGGGTTCAATACGCAGTTTT
 TGGTTGTGGAGATCATAATTGGGCTAGTACCTACCAACGGATTCCAAGATACATTGA
 TGAGCAAATGGCTCAAAAAGGAGCAACAAGATTTTCTAAACGCGGAGAAGCAGA
 TGCAAGTGGTGATTTTCGAGGAACAGCTTGAGCAATGGAAACAAAACATGTGGTCT
 GATGCGATGAAGGCATTTGGATTGGAGCTCAACAAAAATATGGAAAAAGAGCGCA
 GTACTTTGAGTCTGCAATTTGTCAGTCGTCTTGGAGGATCTCCTCTTGACGAACA
 TATGAAGCAGTTTATGCATCTATACTAGAAAATCGTGAACCTTCAATCATCCAGCAGT
 GATAGAAGTACACGACATATCGAGGTATCTTTGCCAGAAGGCGCTACATATAAAGA
 AGGAGACCACCTTGGAGTGTTGCCAGTTAATAGCGAGAAAAATATCAACCGAATTT
 TAAAACGTTTTGGATTAAATGGGAAGGATCAAGTTATACTGAGTGCAAGTGGACGA
 AGTATAAATCACATACCTTTAGACAGTCCTGTAGTTTATTGGACCTTCTTAGTTATA
 GTGTTGAAGTTCAAGAAGCTGCCACTCGAGCACAAATACGAGAAATGGTAACATT
 CACAGCATGTCCTCCTCATAAAAAAGAATTGGAAGCATTATTAGAAGAAGGAGTTT
 ATCATGAACAAATATTAAAGAAACGGATTTCAATGTTGGACCTTCTTGAAAAGTAT
 GAGGCTTGTGAAATCCGATTTGAACGCTTTTTAGAACTTCTTCCTGCGCTCAAACC
 GCGTTACTATTCTATTTCAAGCTCTCCACTCGTTGCACACAATCGTCTGAGCATTAC
 GGTCGGTGTTGTTAATGCGCCTGCATGGAGTGGGGAAGGGACATATGAAGGAGTC
 GCTTCTAATTACTTAGCTCAGCGTCATAATAAAGATGAGATTATCTGTTTCATTTCGAA
 CGCCACAATCAAACCTTTGAATTACCTAAAGATCCAGAAACACCAATTATTATGGTTG
 GGCCAGGTACTGGAATTGCACCATTCCGTGGATTCTTGCAAGCGCGTCGTGTTCAA
 AAGCAAAAAGGTATTAACCTTAGGACAAGCGCATCTATATTTTGGTTGTCGTCATCCT
 GAAAAAGATTATCTTTATCGTACAGAACTAGAAAATGATGAAAGAGATGGATTAAT
 CTCTTTACACACAGCTTTTTCTCGTTTAGAGGGACATCCAAAACATATGTACAGC
 ATTTGATAAAACAAGATAGAATCAATTTAATTTTCGTTATTAGATAATGGAGCTCATCT
 TTATATATGTGGTGATGGAAGTAAAATGGCTCCGGATGTAGAAGATACCTTTGTCA
 AGCATATCAAGAAATTCATGAAGTCAGTGAACAAGAAGCAAGAAATTGGTTGAAT
 CGTGTGCAAGATGAAGGGCGATATGGAAAAGATGTTTGGGCTGGTATATGA

>EGOBGB_02135 bifunctional P-450/NADPH--P450 reductase

MEKKVSAIPQPKTYGPLGNLPLIDKDKPTLSFIKIAEEYGPIFQIQTLSDTIIVVSGHELV
 AEVCDETRFDKSIEGALAKVRAFAGDGLFTSETHEPNWKKAHNLMPTFSQRAMKD
 YHAMMVDIAVQLVQKWARLNPENVDVPEDMTRLTLDTIGLCGFNYRFNSFYRETP
 HPFITSMTALDEAMHQLQRLDIEDKLMWRTRKQFQHDIQSMFSLVDNIIAERKSSGD
 QEENDLLSRMLNVPDPETGEKLDDENIRFQIITFLIAGHETTSGLLSFAIYFLLKNPDKL
 KKAYEEVDRLTDPPTYQQVMKLYMRMILNESLRWLWPTAPAFSLYAKEDTVIGGK

YPIKKGEDRISVLIPQLHRDKDAWGDNVEEFQPERFEELDKVPHHAYKPFNGNGQRACI
 GMQFALHEATLVMGMLLQHFELIDYQNYQLDVKQTLTLKPGDFKIRILPRKQTISHPT
 VLAPTEDKLKNDEIKQHVQKTPSIIGADNLSLLVLYGSDTGVAEGIARELADTASLEGV
 QTEVVALNDRIGSLPKEGAVLIVTSSYNGKPPSNAGQFVQWLEELKPDELKGVQYAVF
 GCGDHNWASTYQRIPRYIDEQMAQKGATRFSKRGEADASGDFEEQLEQWKQNMWS
 DAMKAFGLELNKNMEKERSTLSLQFVSRLGGSPLARTYEAVYASILENRELQSSSSDR
 STRHIEVSLPEGATYKEGDHLGVLPVNSEKNINRILKRFGNLNGKDQVILSASGRSINHIP
 LDSPVSLDLLSYSVEVQEAATRAQIREMVTFTACPPHKKELEALLEEGVYHEQILKK
 RISMLDLLEKYEACEIRFERFLELLPALKPRYYSISSSPLVAHNRLSITVGVVNAPAWSG
 EGTYEGVASNYLAQRHNKDEIICFIRTPQSNFELPKDPETPIIMVGPGTGIAPFRGFLQA
 RRVQKQKGINLGQAHLYFGCRHPEKDYLRYTELENDERDGLISLHTAFSRLEGHPKTY
 VQHLIKQDRINLISLLDNGAHLYICGDGSKMAPDVEDTLCQAYQEIHVEVSEQEARNW
 LNRVQDEGRYGKDVWAGI

>EGBGB_04900 Multicopper oxidase with three cupredoxin domains (includes cell division protein FtsP and spore coat protein CotA)

ATGAAGCGATTTGTATTAGCAGTCATTACAGTCTCTGCAATATTTTAAATTGCTGCCT
 GTTCTGTGACGACAAATACAACAAATGATCATAAAAATATGAATGATAAAAAACA
 CTACAGACTGAAACAGCTACAACACCATTGAAAGTTGAAAAAGGACCAGAAGTTA
 CTTTAATAGCGAAAGAAGAAAAGCAAAAATTAAGTAACGGTGTATTGTTCCAGTC
 TGGACATTTAATGGCTCATCTCCTGGTTCAGAAATTCGGGTGAAAAAAGGTGAAA
 AGGTGAAAGTGACATTAAAAAATGAATTATCTGCACCAGTATCTATTTCATTGGCATG
 GATATCCTGTCCCAAATAACATGGATGGAATTCAGGCGTGACACAAGATGCAGTT
 GAACCAGGAAAAAGTTTCACTTACGAATTTGAAGCGAACGTACCAGGAACGTACT
 GGTATCACTCGCATCAAGATTCTGTAAATCAATTAGATAGAGGTTTGTATGGAGCGC
 TCATTGTAGAAGATACAAAGGAAAAATATGATAAAGATTACACATTAATGTTGGATG
 AATGGGTACAGATAAAGAAGAAATGAATAAGCAGTTAAAAGAAATGACAAAAGG
 GCAAATAGGTAATAAATCTAAAGGTAATGAAAATGGGGAAAAGAATGATGATAAGA
 ACGGCATGGCTCATTCTGATATGAACATGGGCAGTGATAAAAAAGACTCTAGTAAT
 ATGGAAGGAATGGACCATGGAAATATGAAGATGGAAGGTCATGATATGAGTATGTA
 CGACTTATTCACAATCAATGGAAAAAGCGGTGATTTAGTAGCGCCATTAAAAGTGA
 ATAAGGGAGATAACGTTTCGTCTTAGACTCGTCAATGCTGGTTATCTATCATGATA
 TACATGTTTCATGGCCATGATATAAAAGTAATTGCGACAGATGGTCAACCAATAAACG
 ATCCAAAAGTTATAAAGGATAAAGTAATTTCAATCGCACCGGGTGAACGTTATGAT
 ATTGAATTTACTGCTAATAATCCTGGGAAATGGTATGTTGAAGACCATTGAAAAAT
 AAAGGTGCAAAAGGAATGAAAGCTGTTATTGAGTATGATGGCAGCAAAGAGATGA
 AAGATAAAGCAGACGAAAAAGAAAAATTACCGAAAGTAGATATAATGAAATATGG
 TACTAAAAAATTAGGTAGTTTCACATTAAATCAAGAGTATACTGCCACATATAATATG
 GACTTAAATACGCAAATGAATGGAAATGAAATGGTATATACAATTAACGGAAAGGT
 ATTTCCGGATATTGACCCAATTCAAGTAAAAAAGGGTGATTTAGTAAAAGTGAAGT
 TGGTAAATCGTTCTAAAATGGATGATCACCCAATGCATTTACACGGACACTTTTTCC
 AGGTGTTGAGTAAAGATGGAAAACCGATAGAAGGTTCTCCAATTGTGAAAGATAC
 ATTGAACTTAAAACCGGGAGAAGAATATGAAGTAGCCTTTGTAGCAGATAATCCGG
 GCGATTGGATGTTCCACTGTCATGATTTACACCATGCTTCAGCTGGGATGGTAACAG
 AAGTAAATATACAGATTACAAATCGGATTATGTTCCAAACCGAAACATTCCTAATA
 AGCCAGAGTAA

>EGBGB_04900 Multicopper oxidase with three cupredoxin domains (includes cell division protein FtsP and spore coat protein CotA)

MKR**FVLAVITVSAIFLIA**CSVTTNTTNDHKNMNDKKTTLQTETATTPLKVEKGPEVTL
 IAKEEKQKLSNGVIVPVWTFNGSSPGSEIRVKKGEKVKVTLKNELSAPVSIHWHGYPV
 PNNMDGIPGVTQDAVEPGKSFTYEFEANVPPTYWYHSHQDSVNQLDRGLYGALIVE
 DTKEYDKDYTLMLDEWVTDKEEMNKQLKEMTKGQIGNKSKGNENGEKNDDKNG
 MAHSDMNMGSDKKDSSNMEGMDHGNMKMEGHDMSMYDLFTINGKSGDLVAPLK
 VNKGDNVRLRLVNAGYLSHDIHVHGHDIKVIATDGQPINDPKVIKDKVISIAPGERYDI
 EFTANNPGKWYVEDHSKNKGAKGMKAVIEYDGSKEMKDKADEKEKLPKVDIMKYG
 TKKLGSFTLNQEYTATYNMDLNTQMNGNEMVYTINGKVFPDIDPIQVKKGDLVKVK
 LVNRSKMDDHPMHLHGHHFFQVLSKDGGKPIEGSPIVKDTLNLKPGEYEYVAFVADNPG
 DWMFHCHDLHHASAGMVTEVKYTDYKSDYVPNRNIPNKPE
 >EGBGB_10475 Copper oxidase

ATGAAGAGATTTGTATTAACAGCAGTTACAGTCTCCGCAATATCTTTAATTGCCGCA
 TGTTCTGCGACTACAAATACAACAAGTGATCAAAAAAATATGAATGATAAAAAGGT
 AACACAAACTGAAACGGCAACAAAGCCGTTACAAGTTGTAAAAGGGCCAGAAGT
 TACTCTAGTGGCGAAAGAAGAGAAACAAAACTAAGCAACGGTGTTGTTGTTCCG
 GTATGGACATTTAATGGATCATCTCCTGGACCAGAAATCCGTGTAAAAAAGGTGA
 CAAGGTAAAGTTACATTAAAGAATGAACCTATCTGCACCTGCGTCTATTCACTGGC
 ATGGGTATCCGGTTCCAAATAATATGGACGGCATCCCGGGAGTTACACAAGATGCG
 GTTGAACCTGGAAAAAGTTTTACCTATGAATTTGAAGCAAACGTACCAGGAACGT
 ATTGGTATCATTCACATCAAGACTCTGTTAATCAACTAGATAGAGGATTGTATGGCG
 CTCTTGTTGTAGAAGATACAAATGAAAAGTATGATAAAGATTACACATTAATGTTAG
 ATGAATGGGTAAACAGATAAAAAAGAAATTGATAAGCAAATAAAAGAAATGACAAA
 AGGTAAAGTAGAAAAAACAGACGGTGATGCGAAAAAGAATGATGATATGAAAGG
 CATGGATCATTCGGGTATGGACATGGGAAGTGACAAAAAAGACTCTGGTAGTATGG
 AAGGCATGGACCATGGAAATATGAAGATGGATAAAAATAAAGAGTCGAATGGAAT
 GCAAATGGAAGGCCATGATATGAGTATGTATGATTTATTCACAATCAATGGTAAAAG
 TGGGGATTTAATAGAGCCATTGAAAGTGAAAAAAGGTGACAAGGTTTCGACTTCGA
 TTCGTTAATGCTGGTTATCTATCACATGATATCCATGTTTCATGGTCATGATATTAAAGT
 GATTGCGACAGATGGCCAACCAATTAATGATCCAAAGGTTATAAAAGACCAAGTAA
 TTCAATTGCACCAGGTGAACGGTACGACGTTGAGTTTACAGCTAACAAACCCTGG
 AAAATGGTATGTTGAGGATCATGCAAAAAGATAAAGGGGGCAAAAGGAATGAAAGCT
 GTTATTGAATATGATGGCAGCAAAGAGATGAAAGATAAAGCAAATGAAAAAGAAA
 AACTTCCAAAATTAGATATGACAAAATACGGTGCAAAGAAATTAGGAGGTTTTACA
 TTAGACCAACAGTATACTGCCACATATACAATGGATTTAAACACTCAAATGAATGGA
 AATGAAATGGTATACACAATTAATGGAAAAACATTCCCTGATATTGATCCAATTCAG
 GTGAAAAAAGGAGATTTAGTAAAAGTAAAATTAGTAAACAAATCTAAAACAGATG
 ATCATCCAATGCATTTACACGGTCATTTCTTCCAAGTATTAAGTAAAGATGGAAAGC
 CAATAGAAGGTTCTCCAATTATAAAAGATACCCTTAACCTGAAACCAGGAGAAGAA
 TATGAAGTAGCCTTTGTAGCAGATAATCCAGGTGAATGGATGTTCCACTGTCACGAT
 TTACATCATGCTTCAGCGGGGATGGTAACAGAAGTGAAATATAAAGATTACAAATC
 TGATTATGTTCCAAACCCTAATATTCCTAATATGCCAGAGTAA
 >EGBGB_10475 Copper oxidase

MKR**FVLTA**VTV**SAISLIA**CSATTNTTSDQKNMNDKKVTQTETATKPLQVVKGPEVTL
 VAKEEKQKLSNGVVVPVWTFNGSSPGPEIRVKKGDKVKVTLKNELSAPASIHWHGYV
 VNNMDGIPGVTQDAVEPGKSFTYEFEANVPPTYWYHSHQDSVNQLDRGLYGALVV
 EDTNEKYDKDYTLMLDEWVTDKKEIDKQIKEMTKGKVEKTDGDAKKNDMDMKGMD
 HSGMDMGSDKKDSGSMEGMDHGNMKMDKNKESNGMQMEGHDMSMYDLFTING
 KSGDLIEPLKVKKGDKVRLRFVNAGYLSHDIHVHGHDIKVIATDGQPINDPKVIKDQV

ISIAPGERYDVEFTANNPGKWYVEDHAKDKGAKGMKAVIEYDGSKEMKDKANEKEK
 LPKLDMTKYGAKKLGGFTLDQQYTATYTMDLNTQMNGNEMVYTINGKTFFPIDPIQ
 VKKGDLVKVKLVNKSKTDDHPMHLHGHHFQVLSKDGKPIEGSPIIKDTLNLKPGEEY
 EVAFVADNPGEWFMFHCHDLHHASAGMVTEVKYKDYKSDYVPNPINPMPEATTATG
 TTCCAAACCCTAATATTCCTAATATGCCAGAGTAA

>EBOGBB_04690 Aromatic ring-opening dioxygenase, catalytic subunit, LigB family
 ATGATGCCATCATTATTTCTAGCACATGGTTCGCCTATGCTCGCTATTCAAGATACAG
 ACTATACACGATTTTTTAAAAACACTTGGAGAAACATATAAACCGAAAGCAATTGTT
 ATTTTCACTGCTCATTGGGAAAGTGAAGTATTAACGATTTTCCTCATCAGATAACGAG
 TATGAAACAATTTATGATTTTGGAGGTTTTCCCCCTGAGTTATACGAAATCAAATATC
 GTGCGAAAGGCTCTTCTCATATTGCATCTATTTTAGAAACAAAATTTAAGAACAAA
 GGTATTTTCAGTCCATCATAATATGACGAGAGGTTTAGATCATGGTTCATGGACACTC
 CTGCACCGCATGTATCCAGAAGCAAATATTCCTGTCTGCGTGCAGAAATATCAGTCAATCCA
 TTCCTTTCTGCAAAAGAACAATTTGAAATTGGAGAAGCACTTAAAGGACTCGGAC
 AAGAAGATATTTTAGTAATCGGGAGTGGCGTTACCGTTCATAATTTACGAGCACTGA
 AATGGAATCAAACCTACACCTGAAAAATGGGCAATTGAATTTGATGATTGGATTATTA
 AACATATGCAGAATAACGATAAAGATGCATTGTTTAATTGGGAGAAAAATGCTCCT
 CATGCACAATTAGCAGTACCAAGAGCAGAACATTTTGTTTCCTTTATTTATCGCTATG
 GGAAGTGGTGAAAATAGCGGTGAAGTCATTCACCGTAGTTACGAGCTTGGTACATT
 AAGTTATCTTTGTGTTTCGATTTTAA

>EBOGBB_04690 Aromatic ring-opening dioxygenase, catalytic subunit, LigB family
 MMPSLFLAHGSPMLAIQD TDYTRFLKTLGETYKPKAIVIFTAHWESEVLTIS SSDNEYE
 TIYDFGGFPPELYEIKYRAKGSSHIASILETKFKNKGISVHHNMTRGLDHGSWTLLHR
 MYPEANIPVVQISVNPFLSAKEQFEIGEALKGLGQEDILVIGSGVTVHNLRLALKWNQT
 TPEKWAIEFDDWIIKHMQNNDKDALFNWEKNAPHAQLAVPRAEHFVPLFIAMGSGE
 NSGEVIHRSYELGTL SYLCVRF

APÊNDICE C - SEQUÊNCIAS DAS ORFS E PROTEÍNAS DE INTERESSE NO CONTEXTO DA BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS – *Paenibacillus lautus*

Este apêndice apresenta uma seleção de sequências de nucleotídeos das ORFs e de sequências de aminoácidos das proteínas por elas codificadas, obtidas a partir do genoma de *Paenibacillus lautus*. Trata-se de um conjunto de proteínas candidatas a desempenhar um papel na biodegradação do poliestireno, conforme exposto na seção 4.2 do capítulo 2.

>BOGOAH_21065 Glutathione peroxidase

ATGTCGATCTATGAATATGAAGTAAAAACGATACGCGGCGAATCCCAAACGCTGGA
ATCTTATAAAGGCGATGTCATGCTGATCGTCAATACGGCGACCAAATGCGGCTTTGC
CCCTCAATTCGACGGTCTGGAGAAGCTGCACCAAACCTACCGCGACCAGGGATTG
GCCGTTCTCGGCTTCCCCAGCAGCCAATTCATGAATCAAGAGCTGGAGGAGGATG
CCGCGATAGAAGAGGCCTGCAAGCTCAATCACGGCGTCACCTTCCCGCTGTTTTCC
AAGATCGATGTGAACGGCACGAACGCTCATCCGCTTTACAAATACCTGACCAGTGA
AGCCCCCGGCGCACTGGGCATCAAGGCGATCAAATGGAACCTTCACCAAATTTCTG
GTGGACCGCAGCGGCAAGGTGATCAAGCGCTTTGCACCGACGGACACTCCAGAG
AAGATGGAAGAGGATATCAAGAAGCTGCTGTAA

>BOGOAH_21065 Glutathione peroxidase

MSIYEYEVKTIRGESQTLESYKGDVMLIVNTATKCGFAPQFDGLEKLHQTYRDQGLA
VLGFPSSQFMNQELEEDAAIEEACKLNHGVTFPLFSKIDVNGTNAHPLYKYLTSEAPG
ALGIKAIKWNFTKFLVDRSGKVIKRFAPDTTPEKMEEDIKLL

>BOGOAH_25850 Glutathione peroxidase

ATGTCAGTTTATGAATATCATGCAACCAATACCAAGGGGCAGGAAGTCTCGCTCGA
TCAGTATTCGGGCAAGGTCTTGATCATCGCGAATACGGCAAGCCAATGCGGCCTTA
CGCCGCAATATGGAGAGCTTCAGCAACTGTACGACCAATACGGTCAGCAAGGGCT
TCAGGTTCTTGGCTTTCCGTGCAATCAGTTTGGCGGACAGGAGCCGGGTACGAGC
GAAGAGGCCGAATCGTTCTGTCAATTGAACCTATGGCGTGAACCTTTCCGGTTTTCCA
GAAGATTGACGTGAATGGGGAGCAGGCGCACCCGTTATTTTCAGTATCTGAAATCGG
AGCAGCCCGGACCGAATGAAGGCGGAGAGATCGCCTGGAATTTTACGAAGTTCTT
GGTGGACCGCGAAGGCAAGGTGGTTCAGCGGTTTGAGCCGAAGGAATCGCCTGA
ATCCATGAAGGGCGCCATTGAATCCCTGCTGGGTAA

>BOGOAH_25850 Glutathione peroxidase

MSVYEHATNTKGQEVSLDQYSGKVLIIANTASQCGLTPQYQYQGLYDQYGGQGL
QVLGFPNCFGGQEPGTSEEAESEFCQLNYGVNFPVQKIDVNGEQAHPLFQYLKSEQ
PGPNEGGEIAWNFTKFLVDREGKVQRFEPKESPESMKGAIESLLG

>BOGOAH_19680 Bifunctional cytochrome P450/NADPH--P450 reductase

ATGACACAAACCAAGGAAGTGCCTCAGCCTAAAACCTACGGTCCGCTCGGCAATC
TGCCGCTGCTGGATTCCGCCGCTCCGGTCCAATCGCTTGTGAAGGTTGCCTCCGAG
CTCGGACCGATCTTTCAATTTCAATATCCGGGCGGACGCAAGGAAGTGTACGTTTC
GGGACATGAATATGTCAAGGATGCTTGTGACGAGAAGCGGTTTGATAAACGAATCT
GGGCACCGCTGCAGAATGTCCGCCCATTCGCAGGGGATGGATTGTTTACGAGCGC

CACGCAGGAGCCCAACTGGAAAAAAGCCCATAACATTTTGTCTCTCCAGCTTCAGC
CAGCGCGCGATGCAAGGCTACCACACCAAAATGGTTCGATATCGCCATGCAGCTGAT
CCAGAAATGGGCTAGGCTCAATCCGGACGAAACCGTGGACGTTCTTGACGACATG
ACGCGCTTGACGCTGGATACGATCGGCCTCTGCGGATTTAATTACCGGTTTAACAG
CTTTTACCGCGAAGACAACCATCCATTTATCGACAGCATGGTGCAGGGCGCTGGATG
AGGGCATGAACCAGCTTCATCGTCTGGGCATCCAGGACATGTTTATGATTAAAAAG
AAACGGCAGTTTCAAGAGGATATCCAGTTCATGTTCTCCCTTGTGGATGAGCTCAT
CCAAGATCGCAGAAAGCACGGCGGAGAAGAAGGGGATTTGCTGGCGCATATGCTG
GAAGGCGTCGATCCCGATACAGGCGAGTCTCTTGATCATGAGAACATCCGTTACCA
GATCATCACCTTTCTGATCGCCGGACATGAGACGACAAGCGGGTTGCTGTCTTTG
CCATTTATTATTTGATGAAAAATCCGGAAGCCTTGTTTAAGGCGGTCAGCGAAGTG
GACCGCGTACTGAAAGATCCCGTTCCGACCTATAACCAGGTGAGGGAACCTCAAAT
ACGTCCGCATGGTACTCAACGAGTCGCTGCGCTTATGGCCAACGGCGCCTGCTTTC
TCCTTGATGCAAAGGAAGATACGGCGATCGGGGGAACCTATCCCATTAAGAAAGG
GGACAGCGTGACCGTCCTGATCCAGGGCTCCATCGGGACTCGCGGGTGTGGGGG
GACGATGCGGAAACGTTTCAGACCCGAACGTTTCGAGGATCCGAGCCAGGTGCCGC
ATGACGCCTACAAACCGTTTGGTAACGGCCAACGCGCCTGCATCGGGCAGCAGTT
TGCGCTGCAGGAAGCAACCCTGGTGCTTGGTTTGGTTCTCAAATATTTCGAACTGA
TCGATAACCAGCCTTATGAGCTGAAAGTGAAGGAAACACTCACTCTGAAGCCGGA
AGGGTTCCGCATTCAGGTTCGAAGCCGTCAAGGCGGGACGGCTCTCCTGGTACCG
GGTGGCGGTCAAGTTGCTTCACTCGAATCGAAGAAGCGGGATGATGCCAAGTCCG
ATCCTTCGGCGGCATTTGCCCATCATACGCCGCTGCTCGCATTGTACGGTTCCAATC
TGGGCACGGCTGAGGGAATTGCCAGAGAGGTGGCGGATGCTGCGAAGCACCAAG
GGTTCGACAGCCAGGTGGGCACACTGGACGAATATGCAGGAAAGCTTCCGAAGG
AAGGCGTCGTAGTCATCGTTACTGCTTCGTACAACGGACAACCGCCTTCCAATGCC
AAGACTTTCATGGAATGGCTGGAGTACGCGAACGAATCCGAAATTGAGGGCGTTC
GTTACGCGGTATTTCGGGTGCGGAGACCATAACTGGGCAAGCACGTATCAGCGAATT
CCCCGCTACATCGACGAGCAGCTTGCACTCAAAGGGGGACAGCGTCTGCTCCAGC
GCGGCGAAAGTGATGCAAGCGGCGATTTTGAGCGGGAAGTCGATGAGTGGACGG
AGCATTTATGGCCGGATTTGATGCAAGCACTCGGATTGCCGGTTACGGCGGTCCAT
GGACTGAAACGCAGCGCCTTGTCGGTTTCGGTTTCGTCCAGGGTGCGGCCGCCGTTT
CGTTGGCGGAAACCTACCGTGCCGTGACGGGGCGTATCGTGCTTAGCCGCAATCTG
CAGCATGAGGGCAGCGGAAGGATCACGCAGCATATCGAAATCTCGCTCCCGCCGG
AAACGGAATACCTCGAAGGCGATCATCTGGGAGTGCTTCCGGTCAATCCAAAGAC
ACTGGTTCAGCGAGTACTTCGAAGATTCAAACCTGAACGCGGGGCTCCCATCTCATAT
TGTCTGCAGAAGGAAGAAGCGGCGCGCATTTGCCGACCGGCATCCCCGTCCGACT
CGACGATCTGCTGTCCCGCAGCGTCGAACCTGCAGGAACCGGCTACAAGGGCGCAG
ATACGGGAAATGGCCGCTAGCACGGTATGTCCGCCGCATGCCAAAGAGCTCCAAG
AACTGATAGAGGAAGCGAGCTATCAGGCCGAAGTTCGGGCCAAACGGATCACCAT
GCTCGACCTGCTGGAGCGGTATGAAGCCTGCGAGCTGCCGTTTGAACGGTTTCTT
GAGCTTCTGCCGCCATTGAAGCCGAGATATTATTCGATATCCAGCTCACCGAAGGTT
AGCCGGAATACGGCAAGCATCACGGGGAGCGTCGTTTCGAGACCGGGCATGGAGC
GGCAAGGGAGAATATCGGGGCATTGCTTCGAACCTATTTGGCCGAATTGGAAACGG
GCGCGGAGGTCTTGATGTTTATACGCTCTCCCGAGTCGGGTTTTGCGCTGCCGAAG
GATCCGGCTACGCCCATGATCATGATCGGACCAGGCACGGGCGTTGCACCGTTTCAG
GGGATTTATCCAAGCGAGACAAGCGCTTCGGGAGGCAGGTCAAGAGCTGGGTGCC
GCGCATCTGTACTTCGGCTGCCGGAATCCGGAGCAGGACTTCCTGTATCGCGAGGA
GTTTGAGCGGGCAGAGCAGGAGGGGCTTGTCACGTTGCATACGGCTTTCTCGAGG
GTAAGCGGAGCGGAGAAATGCTATGTTTCAGCATTTGATGAAACAAGACGGAATGT
TATTGCTGTCGCTGCTTGAGGGCGGAGCGCAAATGTACATTTGCGGCGACGGCTCC

CGGATGGCTCCGGAGGTGGAACGAACGCTGATTCGTTTCCTATCAGGAGCGTCATG
GCGTGAATGCTGAAGATGCTGCTGCCTGGCTGTCGGGTTTGGAGTCGTCAGGACA
ATATGTAAAAGACGTCTGGGCTGGTTGA

>BOGOAH_19680 Bifunctional cytochrome P450/NADPH--P450 reductase

MTQTK EVPQPKTYG PLGNLPLDSAAPVQSLVKVASELGPIFQFQYPGGRKELYVSGH
EYVKDACDEKRFDKRIWAPLQNV RPFAGDGLFTSATQEPNWKKAHNILLSSFSQ RAM
QGYHTKMVDIAMQLIQKWARLNPDETVDVPDDMTRLTLDITIGLCGFNYRFNSFYRE
DNHPFIDSMVRALDEGMNQLHRLGIQDMFMIKKKRQFQEDIQFMFSLVDELIQDRRK
HGEEGDLLAHMLEGVDPDTGESLDHENIRYQIITFLIAGHETTSGLLSFAIYYLMKNP
EALFKAVSEVDRVLKDPVPTYNQVRELKYVRMVLNESLRLWPTAPAFSLYAKEDTAIG
GTYPIKKGDSVTVLIPGLHRDSRVWGDDAETFRPERFEDPSQVPHDAYKPFNGNQRA
CIGQQFALQEATLVLGLVLKYFELIDNQPYELKVKETLTLKPEGFRIQVRSRQGGTALL
VPGGGQVASLESKKRDDAKSDPSAAFAHHTPLLALYGSNLGTAEGIAREVADA AKHQ
GFDSQVGTLD EYAGKLPKEGVVVIVTASYNGQPPSNAKTFMEWLEYANESEIEGVRY
AVFGCGDHNWASTYQRI PRYIDEQLALKGGQRLLQRGESDASGDFEREVDEWTEHL
WPDLMQALGLPVTAVHGLKRSALSVRFVQGAAAVPLAETYRAVTGRIVLSRNLQHE
GSGRITQHIEISLP PETEYLEGDHLGVLVPNPKTLVQRVLR RFKLNAGSHLILSAEGRSG
AHLPTGIPVRLDDLLSRVELQEPATRAQIREMAASTVCPPHAKELQELIEEASYQAEV
RAKRITMLDLLERYEACELPFERFLELLPPLKPRYYSISSSPKVS RNTASITGSVVRDRA
WSGKG EYRGIASNYLA ELETGAEVL MFIRSPESGFALPKDPATPMIMIGPGTG VAPFRG
FIQARQALREAGQELGA AHLYFGCRNPEQDFLYREEFERAEQEGLVTLHTAFSRVSGA
EKCYVQHLMKQDGM LLLSLLEGGAQMYICGDGSRMAPEVERTLIRSYQERHGVNAE
DAAAWLSGLESSGQYVKDVWAG

>BOGOAH_20555 Putative ring-cleaving dioxygenase MhqA

ATGAACGGATTAAAAGGAATTCACCACGTAACAGCCATTACGAGCAGTGCCGAGA
AGAACTACGAGTTCTTCACCTATGTGCTGGGCATGCGGCTCGTTAAGAAGACGGTT
AACCAGGACGATATTCAGACCTACCACCTGTTCTTTGCGGATGACAAGGGCAGTGC
AGGCACGGATATGACCTTCTTCGACTTCCCGGGTATTCCGAAGGGCAGACACGGTA
CGGACGAGATCTACAAAACCTCGTTCCGTGTTCTTAACGATGCAGCGCTGGACTAT
TGGGTCAAGCGATTTGATCGGATGGACGTGAAGCATCAAGGCATTCAAGAGTTATT
CGGCAAAAAGACACTCGCTTTTGTGATTTCGACGATCAGCAATATCAACTCATCT
CCGACGAGAACAATGAAGGCGTGGCTTCGGGAACGCCTTGGCAGAAGGGGGCCGA
TTCCCTTGAGCATGCGATTACAGGACTTGGCCCGGTCTTTGTGCGGGTGTCCAAT
TTCGATCATTTCAAAGAAGTGATGGAGAAGGTGCTTCAGTTTAAGGAAATCGGCA
AGGAAGGCTCGCTTCATCTGTTTGAGGTAGGTGAAGGCGGCAATGGCGCGCAGGT
CGTTGTGCGAGTACAACGCCGTGCTCCCGCGGGGCCAGCAGGGCTTCGGTACCGTT
CACCACGCGGCCTTCCGGGTAGAGGACCGTTCCGGTGCTGGAGCACTGGATCAAGC
GTCTGGACGACTTCCAATCCATACGTCGGGCTTTGTGCGACCGCTATTTCTTCCAGT
CCCTGTACGCACGCGTCGCGCCGAGATTCTGTTGAGTTTGCCACCGACGGTCCG
GGCTTCATGGGGGATGAGCCGTATGAAACGCTGGGCGAAAAATTGTCCCTGCCTC
CATTCCTGGAGCCGAAGCGCGAGCAGATCGAGAGCATGGTTCGCCCCGATTGATAC
GGTGCGCAGCACGAAGGAATTCGTCAAGGAATGA

>BOGOAH_20555 Putative ring-cleaving dioxygenase MhqA

MNGLKGIHHVTAITSSAEKNYEFFTYVLGMRLVKKT V NQDDIQTYHLFFADDKGSAG
TDMTFFDFPGIPKGRHGTDEIYKTSFRVPNDAA LDYVVKRFDRMDVKHQGIQELFGK
KT LAFVDFDDQYQLISDENNEGVASGTPWQKGPIPLEHAITGLGPVFVRVSNFDHFK
EVMEKVLQFKEIGKEGSLHLFEV GEGGNGAQVVVEYNAVLPRAQQGFGTVHHAAFR
VEDRSVLEHWIKRLDDFQFHTSGFVD RYFFQSLYARVAPQILFEFATDGP GFMGDEPYE
TLGEKLSLPPFLEPKREQUIESMVRPIDTVRSTKEFVKE

>BOGOAH_30770 Putative ring-cleaving dioxygenase MhqA

ATGAAGTTTAAAGGAATTCATCACGTATCCGCGTTAACGGCTGCGGCTTCGCGGAA
CTTCGAATTTTATACAAAGGTTCTGGGCATGCGATTGGTCAAGAAAACGGTGAACC
AGGACGATGTGTTCGGTGTACCATCTGTTTTACGGCGATGAAAAAGGAAATCCCGGC
ACGGAGCTTACCTTCTTCGAAATTCCGATGGCCGGCCGGACCCGTGAGGGGAAACA
ACAGCATTTTCGGCGACATCCCTGCGCGTGCCCAACGACCGCGCCTTGGAATATTGG
ACCCGGCGGCTGGACGAGCACGGCGTAGAACGCGAGGAGATCAAGGAACGTGCG
GGCCGATTGACCCTTCTCTTCAGGGATTTTCGAGGGCCAGCGCATCATTCTCGTTTC
GGATGAACATAACGAGGGAGTTCCAGGCGGCGTTCCATGGGAAAAGGGGCCGGTT
CCGGCGGAATACGCTATCATCGGATTAGGCCCGGTGCAGCTGACCGTGCCTAATCC
AGTGCAGACCGTGAAGGTATTGACGGAGCTGATGGGCTTCCGCTACAAAGGGCAC
TATGCTTCGCCAGTAGACGGGCAGCCGGATATCCTGGTCTTTGAGACGGGAGAAG
GCGGTACGGGAGCGGAAGTGCATGTGGAGGAACGAACGGATCTTCCGCAGGAGC
GTCTTGGCCGCGGCGGCGTTCATCACGTTGCATTCCGCGTCGAGGACGAGGAAGA
GCTTCGGTCCTGGATTGACCGGATCGGCGATGTGGGCTTTTCGAATTCGGGATTG
TTGATCGCTTCTACTTCCGTTCCCTTGTATTTCCGGGAGCCTAACGGTATTTTGTTCGA
GGTAGCTACCGACGGTCCGGGCTTTGACACGGATGAGCATATCGACCATCTCGGCG
AGTCCCTTGCGCTGCCGCCGTTTCTGGAGCCGAAGCGGGAACAGATCGAAGCCAA
CCTGAAGCCTCTCCATACGATGCAATGA

>BOGOAH_30770 Putative ring-cleaving dioxygenase MhqA

MKFKGIHHVSALTAASRNFEFYTKVLGMRLVKKTQDDVSVYHLFYGDEKGNPG
TELTFEIPMAGRTREGNNSISATSLRVPNDRALEYWTRRLDEHGVEREEIKERAGRLT
LLFRDFEGQRIILVSDEHNEGVPGGVPWEKGPVPAEYAIIGLGPVQLTPNPVQTVKVL
TELMGFRYKGHYASPDGQPDILVFETGEGGTGAEVHVEERTDLPQERLGRGGVHHV
AFRVEDEEELRSWIDRIGDVGFSNSGFVDRFYFRSLYFREPNLILFEVATDGPFGDTDE
HIDHLGESLALPPFLEPKREQIEANLKPLHTMQ

>BOGOAH_30770 Putative ring-cleaving dioxygenase MhqA

MKFKGIHHVSALTAASRNFEFYTKVLGMRLVKKTVNQDDVSVYHLFYGDEKGNPG
TELTFEIPMAGRTREGNNSISATSLRVPNDRALEYWTRRLDEHGVEREEIKERAGRLT
LLFRDFEGQRIILVSDEHNEGVPGGVPWEKGPVPAEYAIIGLGPVQLTVPNPVQTVKVL
TELMGFRYKGHYASPVDGQPDILVFETGEGGTGAEVHVEERTDLPQERLGRGGVHHV
AFRVEDEEELRSWIDRIGDVGFSNSGFVDRFYFRSLYFREPNLILFEVATDGPFGDTDE
HIDHLGESLALPPFLEPKREQIEANLKPLHTMQ

APÊNDICE D -SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO

Este apêndice apresenta as proteínas de fusão expressas neste trabalho (Seções 4.3 e 4.4 do Capítulo 2), constituídas pela região N-terminal codificada pelo vetor pET-28a(+), que contém a cauda de histidinas (His-tag), fusionada às sequências proteicas de interesse. O fragmento N-terminal derivado do vetor está destacado em amarelo, enquanto a His-tag encontra-se sublinhada.

PIGPx1

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMSIYEEYVKTI RGESQTLESYKGDV MLIVNTATKCG
FAPQFDGLEKLHQTYRDQGLAVLGFPSSQFMNQELEEDAAIEEACKLNHGVT FPLFSK
IDVNGTNAHPLYKYLTSEAPGALGIKAIKWNFTKFLVDRSGKVIKRFAPTDTP EKMEE
DIKKLL

PIGPx2

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMSVY EYHATNTKGQEVSLDQYSGKVLIIANTASQC
GLTPQY GELQQLYDQYGQQGLQVLGFPCNQFGGQEPGTSEEAE SFCQLNYGVNF P VF
QKIDVNGEQAHP LFQY LKSEQPGPNEGGEI AWNFTKFLVDREGKV VQRFEPKES PES
MKGAIESLLG

BcGPx

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM M TVYDFSAKTITGEEKSLKDYKGKALLIVNVASKC
GFTPQYKGLQEVDKYKDQGLEILGFPCNQFGGQEPGT EADITSFCELNYGVNF P MF
AKVDVKGDKAHP LYTYMTEQAPG LLGMKAVKWNFTKFLIGKDGKV VGRFAPQTKP
VDLEVEIEKVLGE

PlCYP102

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMTQTKEVPQPKTYGPLGNLPLLDSAAPVQSLVKVASE
LGPIFQFQYPGGRKELYVSGHEYVKDACDEKRFDKRIWAPLQNV RPFAGDGLFTSAT
QEPNWKKAHNILLSSFSQRAMQGYHTKMVDIAMQLIQKWARLN PDETVDVPDDMT
RLTLDTIGLCGFNYRFNSFYREDNHPFIDSMVRALDEGMNQLHRLGIQDMFM IKKKR
QFQEDIQFMFSLVDELIQDRRKHGGEEDLLAHMLEGVDPDTGESLDHENIRYQIITFL
IAGHETTSGLLSFAIYYLMKNPEALFKAVSEVDRVLKDPVPTYNQVRELKYVRMVLN
ESLRLWPTAPAFSLYAKEDTAIGGTYP IKKGDSVTVLIPGLHRDSRVWGDDAETFRPER
FEDPSQVPHDAYKPFNGQRACIGQQFALQEATLVLGLVLKYFELIDNQPYELKVKET
LTLKPEGFRIQVRSRQGGTALLVPGGGQVASLESKKRDDAKSDPSAAFAHHTPLLALY
GSNLGTAEGIAREVADA AKHQGFDSQVGTLD EYAGKLPKEGVVIVTASYNGQPPSN
AKTFMEWLEYANESEIEGVRYAVFGCGDHNWASTYQRIPRYIDEQLALKGGQRLLQR
GESDASGDFEREVDEWTEHLWPDLMQALGLPVTAVHGLKRSALSVRFVQGAAAVPL
AETYRAVTGRIVLSRNLQHEGSGRITQHIEISLPPETEYLEGDHLGVLPVNP KTLVQRV
LRRFKLNAGSHLILSAEGRSGAHLPTGIPVRLDDLLSRSVELQEPATRAQIREMAASTV
CPHAKELQELIEEASYQAEVR AKRITMLDLLERYEACELPFERFLELLPPLKPRYY SIS

SSPKVSRNTASITGSVVRDRAWSGKGEYRGIASNYLAELETGAEVLMFIRSPESGFALP
KDPATPMIMIGPGTG VAPFRGFIQARQALREAGQELGAAHLYFGCRNPEQDFLYREEF
ERAEQEGLVTLHTAFSRVSGAEKCYVQHLMKQDGMLLSLLEGGAQMYICGDGSRM
APEVERTLIRSYQERHGVNAEDAAWLSGLESSGQYVKDVWAG