

**UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL  
MESTRADO – GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Leonardo Bastos Moraes**

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL ORIUNDO  
DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE SEMENTE DE TABACO PARA  
OBTENÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATO (PHA)**

Santa Cruz do Sul, 24 de Março de 2017

**Leonardo Bastos Moraes**

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL ORIUNDO  
DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE SEMENTE DE TABACO PARA  
OBTENÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATO (PHA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado e Doutorado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Linha de Pesquisa em Microbiologia aplicada à Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

**Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Viviane Gomes Muller**

Santa Cruz do Sul, 24 de Março de 2017

*Dedico este trabalho a todos aqueles que, anonimamente, fizeram da ciência o que ela é hoje, um farol para a humanidade.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à CAPES e a UNISC pela oportunidade que me foi oferecida, na forma de uma bolsa PROSUP/CAPES. Igualmente ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, pelos aprendizados e lições que me foram transmitidos durante a permanência no mestrado e execução de minhas atividades acadêmicas. Creio que esta foi uma etapa crucial no desenvolvimento mais aprofundado de minhas habilidades intelectuais, bem como de minha formação acadêmica.

A minha orientadora, Prof. Dra. Maria Viviane Gomes Muller, que além de me guiar pelos meandros da ciência e da árdua jornada que é a vida acadêmica, sempre esteve ao meu lado, me dando todo o suporte necessário. Parafrazeando Isaac Newton, “*se pude enxergar mais longe, foi por que estava apoiado nos ombros de gigantes*”. Sem sombra de dúvidas, se cheguei até aqui foi por mérito e empenho igualmente, se não em grande parte, de minha orientadora. Seus ensinamentos não foram apenas de cunho acadêmico, contribuíram para a minha formação e elevação como pessoa.

Não existe exército de um homem só, igualmente dissertação de um indivíduo. Por trás do presente trabalho existe o esforço coletivo de diversas pessoas, sejam os autores que deram a base para que esse trabalho fosse fundamentado, ou todos aqueles que auxiliaram de alguma forma.

Fica o meu agradecimento ao professor Dr. Alexandre Rieger, eterno orientador, pelos conselhos para ambas as vidas, acadêmica e pessoal; ao grande mestre Dr. Valeriano Corbellini, que como sempre teve papel fundamental, com contribuições titânicas ao trabalho; igualmente a Dr. Rosana Schneider, por todo apoio oferecido; Ao Dr. Diego de Souza, pelos ensinamentos e auxílio; Michele Junkherr Rodrigues, Laboratório de Química Analítica, que teve papel fundamental no auxílio com as análises e tudo mais; a todos os amigos do bloco 20, dos Laboratórios de Ensino de Biologia, que como costume dizer são a minha segunda família.

Por fim, mas de forma alguma menos importante, minha família, pela paciência quase olímpica e suporte que me forneceram durante toda essas “desventuras em série” que foi o meu mestrado; aos amigos, que são inúmeros e estiveram sempre ali dando apoio, estímulos e me chamando para beber nos momentos mais inapropriados, este último de grande utilidade para o processo criativo.

## RESUMO

Os resíduos de forma geral podem ser considerados um dos problemas mais graves enfrentados hoje, com danos que vão além da esfera ambiental. Os atuais métodos de produção buscam cada vez mais alternativas que possam minimizar a geração de resíduos, ou então, tecnologias que possibilitem o retorno dos resíduos a cadeia produtiva. Nesse contexto, uma das alternativas que vem sendo investigada é a substituição de plásticos convencionais por biopolímeros. Os biopolímeros tem origem biológica e utilizam fontes renováveis e sustentáveis de matéria prima, incluindo resíduos de outros processos agroindustriais. Este trabalho teve como objeto de pesquisa o emprego de um resíduo, oriundo da produção de biodiesel, como substrato de baixo custo para a obtenção do biopolímero Polihidroxibutirato (PHA). O resíduo, torta de sementes de tabaco, passou por etapa de pré-tratamento, consistindo em uma hidrólise ácida com Ácido Sulfúrico 5% (v/v), neutralização com Hidróxido de Potássio até pH=7, sendo incorporado em um meio de cultivo. A bactéria utilizada passou por etapas de isolamento, caracterização e identificação molecular. Ensaio de acúmulo de PHA foram realizados com diferentes condições de tempo de inóculo, formulação de meio e estratégia de cultivo, de forma a otimizar a obtenção do polímero. Utilizou-se glicose nos experimentos controle para comparação do acúmulo de PHA. Foram utilizadas Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para analisar a presença e estrutura do polímero. O substrato utilizado foi analisado através de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) e análise centesimal. O resíduo analisado apresentou composição (%) de 4,51±0,56 para cinzas, 31,94±4,87 para proteínas, 27,05±5,30 para lipídeos e 36,48±9,04 para carboidratos, na análise centesimal. O hidrolisado obtido do pré-tratamento apresentou glicose, arabinose e xilose em sua composição. Verificou-se a presença de resíduo lipídico no hidrolisado, que foi utilizado pela bactéria nos ensaios. A bactéria isolada, denominada E10, foi identificada como sendo uma cepa de *Bacillus pumilus*, havendo crescimento satisfatório no meio de cultivo utilizado. A melhor condição de cultivo, evidenciada pelo acúmulo de PHA no interior das células, foi definida em 28°C, cultivado em incubador orbital a 150 revoluções por minuto, por um tempo de 40 horas. Ocorreu a formação de polímero nos cultivos, sendo este extraído, purificado e analisado. Os dados

obtidos da análise do polímero apontam para um copolímero formado por Polihidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato (P (3-HB-co-HV)). Os cultivos realizados em glicose (controle positivo) formaram apenas P (3-HB). Através da metodologia utilizada e da interpretação dos dados dos experimentos de cultivo, acredita-se que o hidrolisado de torta de sementes de tabaco tem potencial de aplicabilidade para obtenção de PHA. A bactéria *B. pumilus* E10 se mostrou um bom acumulador de PHA. Sugere-se futuramente a análise da composição lipídica e proteica do hidrolisado, o teste com cepas de outras bactérias padrão, a cinética do acúmulo de PHA e a quantificação da produção de polímero.

Palavras chave: PHA, P (3-HB-co-HV), *Bacillus pumilus*, Tabaco.

## ABSTRACT

Waste in general can be considered one of the most serious problems faced today, with damages that go beyond the environmental sphere. Current production methods increasingly seek alternatives that can minimize the generation of waste, or technologies that allow the return of waste to the production chain. In this context, one of the alternatives that has been investigated is the substitution of conventional plastics for biopolymers. Biopolymers are biologically based and use renewable and sustainable sources of raw material, including waste from other agro-industrial processes. The objective of this work was the use of a residue from the production of biodiesel as a low cost substrate for obtaining the biopolymer Polyhydroxybutyrate (PHA). The residue, tobacco seed cake, underwent a pre-treatment stage, consisting of an acid hydrolysis with 5% Sulfuric Acid (v / v), neutralization with Potassium Hydroxide up to pH = 7, being incorporated in a culture medium . The bacterium used was characterized by isolation, characterization and molecular identification. Assays of PHA accumulation were performed with different inoculum time conditions, media formulation and culture strategy, in order to optimize the polymer obtaining. Glucose was used in the control experiments to compare PHA accumulation. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) were used to analyze the presence and structure of the polymer. The substrate used was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and centesimal analysis. The analyzed residue presented composition (%) of  $4.51 \pm 0.56$  for ashes,  $31.94 \pm 4.87$  for proteins,  $27.05 \pm 5.30$  for lipids and  $36.48 \pm 9.04$  for carbohydrates, in Centesimal analysis. The hydrolyzed obtained from the pretreatment showed glucose, arabinose and xylose in its composition. The presence of lipid residue in the hydrolyzed, which was used by the bacteria in the assays, was verified. The isolated bacteria, called E10, was identified as a *Bacillus pumilus* strain, with satisfactory growth in the culture medium used. The best cultivation condition, evidenced by the accumulation of PHA inside the cells, was defined at 28°C, grown in an orbital incubator at 150 revolutions per minute, for a time of 40 hours. Polymer formation occurred in the cultures, which was extracted, purified and analyzed. The data obtained from the analysis of the polymer point to a copolymer formed by Polyhydroxybutyrate-co-

hydroxyvalerate (P (3-HB-co-HV).) Glucose cultures (positive control) formed only P (3-HB). The methodology used and the interpretation of the data of the cultivation experiments, it is believed that the tobacco seed cake hydrolyzate has potential of applicability to obtain PHA. *B. pumilus* E10 bacterium proved to be a good accumulator of PHA. In the future the analysis of the lipid and protein composition of the hydrolyzate, the test with strains of other standard bacteria, the kinetics of the accumulation of PHA and the quantification of the polymer production.

Keywords: PHA, P (3-HB-co-HV), *Bacillus pumilus*, Tobacco.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01. Esquema dos radicais mais comuns relacionados com os PHAs, o número de carbonos da cadeia e o nome dado ao polímero.....19
- Figura 02. Comparação entre uma refinaria comum e uma biorefinaria, detalhando as fontes, ou matérias-primas, passíveis de utilização em cada uma e os produtos obtidos, bem como o resíduo gerado e sua destinação.....24
- Figura 03. Arranjo taxonômico dos principais gêneros de bactérias estudados para a síntese e acúmulo de PHAs, com enfoque em algumas espécies de maior importância nos gêneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Cupriavidus* e *Bacillus*. .....26
- Figura 04. Esquema representando a rota bioquímica pela qual as moléculas de acetil-CoA são convertidas em P (3-HB) .....32
- Figura 05. Via da  $\beta$ -oxidação em detalhes, com as principais saídas de metabólitos secundários evidenciadas.....33
- Figura 06. Organização do cluster que abriga os genes responsáveis pela síntese e acúmulo de P (3-HB) em *B. megaterium*, com os seus respectivos pesos expressos Em pares de bases.....37
- Figura 07. Desenho experimental da metodologia abordada.....45
- Figura 08. Registro da torta de sementes de tabaco logo após ter sido submetida a hidrólise ácida.....57
- Figura 09. Hidrolisado de torta de sementes de tabaco após a neutralização com KOH, onde ocorreu a formação de sais (seta).....57
- Figura 10. Análise do hidrolisado de torta de sementes de tabaco, antes e após o cultivo, para a verificação e quantificação dos açúcares presentes nas amostras.....61
- Figura 11. Gel de agarose 1,5% onde foram aplicadas as amostras para verificação da qualidade da amplificação para os primers selecionados.....64
- Figura 12. Árvore filogenética das espécies de *Bacillus* com base em sequências de genes 16S rRNA.....65
- Figura 13. Espectros de absorvância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10 cultivada em ágar nutriente, suplementado com fontes energéticas distintas, para avaliar o perfil de acúmulo de PHA. ....67

- Figura 14. Espectros de absorvância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10, com detalhe nas regiões de 1000 nm até 2200 nm, onde se visualiza claramente o perfil de absorção em ~1720 nm em apenas algumas amostras.....68
- Figura 15. Espectros de absorvância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10 suplementada com diferentes fontes de carboidratos. ....69
- Figura 16. Espectros de absorvância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10, com detalhe nas regiões de 1000 nm até 2200 nm. ....69
- Figura 17. Espectros de absorvância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10 suplementada com diferentes fontes de nitrogênio, de fontes orgânicas e inorgânicas.....70
- Figura 18. Detalhe nas regiões de 1000 nm até 2200 nm nos espectros de absorvância de FTIR obtidos das amostras de E10, suplementada com distintas fontes de nitrogênio. ....71
- Figura 19. Espectros de absorvância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10 suplementada com Tween 80, glicerol, óleo de tabaco e biodiesel, para verificação do acúmulo de PHAs. ....72
- Figura 20. Análise das regiões de 1000 nm até 2200 nm nos espectros de absorvância de FTIR. ....73
- Figura 21. Espectros de FTIR oriundos das amostras que foram suplementadas com borra de tabaco e hidrolisado de torta de sementes de tabaco. ....73
- Figura 22. Dados da análise através de FTIR das amostras suplementadas com borra de tabaco bruta e hidrolisado de sementes de tabaco, com ênfase na região de 1000 nm até 2200 nm. ....74
- Figura 23. Inserções lipofílicas evidenciadas (setas negras) em células de E10 cultivadas através da metodologia de cultivo 1.....75
- Figura 24. Inserções lipofílicas evidenciadas (setas negras) em células de E10 cultivadas através da metodologia de cultivo 2.....76
- Figura 25. Inserções lipofílicas evidenciadas (setas negras) em células de E10 cultivadas através da metodologia de cultivo 3.....78
- Figura 26. Gráfico obtido com os valores de transmitância relativa oriundos das amostras de E10 cultivada por 24 horas em caldo BHI para avaliação do crescimento do pré-inóculo.....79

- Figura 27. Esporos evidenciados (setas negras) em células de E10 cultivadas diretamente no meio hidrolisado de torta de sementes de tabaco, por 48 horas.....80
- Figura 28. Extração do polímero obtido dos cultivos utilizando glicose como fonte de carbono (esquerda) e hidrolisado de torta de sementes de tabaco (direita) .....81
- Figura 29. Polímero extraído da biomassa cultivada com glicose, durante o processo de recristalização com éter de petróleo.....82
- Figura 30. Polímero extraído da biomassa cultivada com hidrolisado de torta de sementes de tabaco, durante o processo de recristalização com éter de petróleo.....83
- Figura 31. Análise da amostra de P (3-HB), oriundo de cultivo em glicose, onde observa-se um sinal forte de um duplete entre 1,0 e 1,5 ppm.....85
- Figura 32. Comparação da amostra de P (3-HB), oriundo de cultivo em glicose, com a amostra do trabalho de Doi e colaboradores (Doi, Kawaguchi et al. 1989) .....86
- Figura 33. Análise da amostra de PHA, oriundo de cultivo em hidrolisado de torta de sementes de tabaco.....87
- Figura 34. Análise da amostra de PHA obtido do cultivo em hidrolisado comparada com a amostra do trabalho de Doi e colaboradores (Doi, Kawaguchi et al. 1989) .....87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Informação dos pesos moleculares dos radicais mais comuns associados ao P (3-HB) na formação de copolímeros.....	20
Tabela 02. Fontes de substratos orgânicos possíveis de serem utilizados em biorefinarias como matéria-prima para obtenção de bioprodutos de valor agregado. A grande parte dos substratos orgânicos listados são resíduos de outros processos ou são produzidos com custos muito baixos.....	22
Tabela 03. Lista de microrganismos com capacidade de síntese e acúmulo de PHAs.....	31
Tabela 04. Características mais importantes descritas para a espécie <i>Bacillus pumilus</i> Meyer and Gottheil 1901.....	63

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVOS .....	16
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
3.1 Polihidroxicarboxilatos .....	17
3.1.1 Histórico .....	17
3.1.2 Características, Propriedades Físico-Químicas e Aplicações dos PHAs .....	18
3.2 Microrganismos produtores .....	25
3.3 Rotas e enzimas utilizadas .....	32
3.4 Métodos analíticos para detecção, identificação e acompanhamento da produção de PHA .....	40
3.5 Tabaco: aspectos ambientais e econômicos .....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
4.1 Justificativa da escolha do resíduo agroindustrial como substrato alternativo para obtenção de P (3-HB) .....	45
4.2 Processamento e tratamento da torta de tabaco .....	46
4.3 Análise da composição da torta de tabaco e do hidrolisado de torta de tabaco .....	47
4.3.1 Determinação dos constituintes da torta de tabaco .....	47
4.3.2 Determinação de açúcares presentes no hidrolisado de torta de tabaco .....	47
4.4 Seleção de linhagem microbiana .....	48
4.4.1 Isolamento de bactérias da ETE-UNISC .....	48
4.4.2 Identificação molecular do isolado selecionado .....	49
4.5 Triagem de substratos viáveis a produção de PHA via Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	51
4.6 Meios de cultivo para ensaios de produção de PHA .....	52
4.6 Padronização da técnica de cultivo para obtenção de P (3-HB) .....	53
4.7 Análise das amostras .....	54
4.7.1 Visualização dos grânulos de PHA .....	54
4.7.2 Densidade Óptica .....	55
4.7.3 Extração do PHA .....	55
4.7.4 Caracterização do PHA obtido via Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ...	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
5.1 Processamento e tratamento da torta de tabaco .....	56

5.2 Análise da composição da torta de tabaco e do hidrolisado de torta de tabaco.....	59
5.2.1 Determinação dos constituintes da torta de tabaco .....	59
5.2.2 Determinação de açúcares presentes no hidrolisado de torta de tabaco .....	60
5.3 Microrganismo selecionado.....	62
5.3.1 Isolamento de bactérias da ETE-UNISC e caracterização do isolado .....	62
5.3.2 Identificação molecular do isolado selecionado.....	63
5.4 Triagem de substratos viáveis a produção de PHA via Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	67
5.4 Padronização da técnica de cultivo para obtenção de PHA.....	75
5.5 Caracterização do PHA obtido .....	81
5.5.1 Extração do PHA .....	81
5.5.2 Análise das amostras de polímeros via RMN (Ressonância Magnética Nuclear) .....	84
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	94
7. REFERÊNCIAS.....	95

## 1 INTRODUÇÃO

Com o crescente aumento no consumo de produtos plásticos derivados de petróleo fica evidente a preocupação com a correta destinação desse resíduo que não é biodegradável. Na última década houve um grande esforço quanto ao desenvolvimento e pesquisa de novos produtos que possam substituir esses materiais por outros de origem natural.

Dentre as inúmeras alternativas levantadas os Polihidroxicanoatos (PHA) despertaram grande interesse por suas propriedades físico-químicas, como seu ponto de fusão elevado, resistência ao calor e alta hidrofobicidade. Dentre esses compostos, o Polihidroxibutirato (P3HB) tornou-se um candidato promissor para a substituição de alguns polímeros, como o polipropileno (PP).

Os PHA são biopolímeros obtidos através do cultivo de bactérias, em geral pertencentes às Proteobactérias, que são utilizados pelos microrganismos principalmente como forma de estoque de carbono e energia para períodos de escassez de nutrientes. Além disso, os PHA podem ser obtidos de inúmeras fontes renováveis, principalmente resíduos agroindustriais, já que o custo elevado de obtenção desses polímeros se deve basicamente à fonte de carbono utilizada.

Foram propostos inúmeros substratos de origem agroindustrial, como melaço, fibras vegetais, efluente de laticínios e excedentes agrícolas. Como a maioria desses resíduos se encontram numa forma bruta, com muitos dos constituintes organizados ainda na forma de macromoléculas, se faz necessário uma série de etapas preparatórias para tornar os substratos utilizáveis.

Superadas essas etapas do processo, compreendendo a escolha dos substratos e seu tratamento, os PHAs são tidos como os futuros substitutos de plásticos nas mais diversas aplicações.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver e aplicar técnicas que possibilitem utilizar subprodutos da produção de biodiesel como base para obtenção de biopolímeros, através da utilização de bactérias de interesse industrial.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Aplicar e desenvolver metodologias de pré-tratamento para o resíduo de torta de sementes de tabaco;
- Triar e identificar bactéria produtora de PHA, a partir do resíduo escolhido;
- Realizar a produção, extração e análise de PHA;
- Analisar os componentes do meio de cultivo utilizado para obtenção de PHA.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Polihidroxicanoatos

##### 3.1.1 Histórico

Os Polihidroxicanoatos (PHAs) são descritos para inúmeros organismos, principalmente bactérias, como polímeros de armazenagem de carbono e energia, principalmente (Valentin 1995, Huisman 1999, Marchessault 2005). Estes podem ser formados através da polimerização de alguns ácidos orgânicos, como ácido propiônico, acético e butírico, e então armazenados no interior da célula. Dos mais de 90 PHAs descritos (Valentin 1995) o Polihidroxi-butirato (P (3-HB)) ainda é o mais estudado e elucidado dos biopolímeros (C.S.K. Reddy 2003).

A primeira vez que o P (3-HB) foi descrito na literatura, através dos trabalhos do professor Maurice Lemoigne, entre 1923 e 1927 (Marchessault 2005), não houve um grande interesse em sua descoberta e possíveis aplicações. Lemoigne constatou em 1923 que, quando um cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* ficava sob uma atmosfera livre de O<sub>2</sub>, ocorria a acidificação do meio, descoberta essa atribuída posteriormente ao ácido 3-hidróxi-butírico e o polímero formado por ele (Lemoigne 1926).

Após esse episódio o P (3-HB) permaneceu oculto por mais de trinta anos, sendo novamente estudado na década de 50 por Wilkinson (Williamson and Wilkinson 1958) e Doudoroff (Doudoroff and Stanier 1959), de forma independente (Marchessault 2005). Porém, apenas com a crise no petróleo nos anos 70 que o P (3-HB) e os PHAs voltaram ao cenário científico, primeiramente através do desenvolvimento do “Biopol” (Marchessault 2005, Verlinden, Hill et al. 2007, Andreeßen and Steinbüchel 2010), o polímero biodegradável de origem biotecnológica produzido pela Imperial Chemical Industries (ICI) Ltda.

A primeira iniciativa industrial na produção de P (3-HB) ocorreu através de um programa similar, desenvolvido pela W. R. Grace Company, de Maryland, Estados Unidos. Esse programa foi fechado em 1962 por conta de dificuldades técnicas, principalmente quanto a baixa estabilidade térmica do P (3-HB) (Noel 1962, Marchessault 2005).

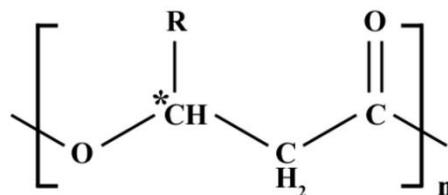
Posteriormente uma série de outras empresas começaram a manifestar interesse na pesquisa e desenvolvimento desse bioplásticos, entre elas as gigantes Proctor & Gamble e Monsanto, mas abandonaram os projetos principais, restando hoje apenas 7 empresas, localizadas em 6 países, uma delas no Brasil (Vasco 2014, S.A. 2016).

Atualmente grande parte das iniciativas com PHAs está atribuída ao desenvolvimento das chamadas “biorefinarias” ou, do inglês, *Biorefinery*. Por definição do Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL), “A biorefinaria é uma instalação que integra processos e equipamentos de conversão de biomassa para produzir combustíveis, energia e produtos químicos a partir de biomassa” (Energy 2016). Essa iniciativa busca acoplar o aproveitamento de resíduos orgânicos em processos biotecnológicos que possam gerar produtos de valor agregado com preços competitivos, aliados a um baixo impacto ambiental e diminuição no consumo energético (Nasib Qureshi 2014, Yang, Choi et al. 2015).

### **3.1.2 Características, Propriedades Físico-Químicas e Aplicações dos PHAs**

Os PHAs são um grupo muito diverso em sua composição, indo muito além do P (3-HB). A molécula central dos PHAs é o ácido 3-hidroxibutírico, porém os radicais que o compõem podem ir desde o grupo metil (C1) até tridecil (C13), apresentando mais de 90 combinações conhecidas até hoje (Valentin 1995, C.S.K. Reddy 2003, Verlinden, Hill et al. 2007).

De acordo com o tamanho de suas cadeias laterais os PHAs podem ser classificados em dois grupos basicamente: PHAs de cadeia curta (scl-PHA), que contém geralmente de 4 a 5 carbonos em suas unidades de repetição, e PHAs de cadeia média (mcl-PHA), que tem 6 ou mais carbonos em suas unidades de repetição (Valentin 1995, Lee 1996, Pollet 2012). A figura 01 ilustra as possibilidades mais comuns listadas na literatura de ocorrência dos radicais e seu número de carbonos, nome e grupo.



Poly(3-hydroxyalkanoate)

R group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C <sub>4</sub>	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C <sub>5</sub>	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C <sub>6</sub>	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C <sub>7</sub>	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C <sub>8</sub>	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C <sub>9</sub>	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C <sub>10</sub>	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C <sub>11</sub>	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C <sub>12</sub>	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C <sub>13</sub>	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C <sub>14</sub>	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C <sub>15</sub>	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C <sub>16</sub>	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

Figura 01. Esquema dos radicais mais comuns relacionados com os PHAs, o número de carbonos da cadeia e o nome dado ao polímero. O “R” na cadeia principal ilustrada acima indica o sítio de ligação desses radicais com a molécula central. Adaptado de Tan, Chen et al. (2014).

Existe uma terceira categoria de PHA, os denominados de cadeia longa (lcl-PHA), com cadeias com mais de 10 até, em média, 13 carbonos. Contudo, essa é a forma mais rara de PHA encontrada e ocorre dificilmente de forma natural, sendo produto de cultivos com bactérias modificadas geneticamente, com baixa fração de lcl-PHA no copolímero formado (Andreeßen, Taylor et al. 2014, Singh, Kumar et al. 2015).

O P (3-HB), fórmula molecular C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>, apresentando massa molar de 104.11 g/mol, é normalmente tido com a base de pesquisas envolvendo PHAs, tem ponto de fusão de 177°C, 80% de cristalinidade, resistência a tração de 40 MPa e extensão total antes da quebra de 8% (Luzier 1992). Esses valores são atribuídos ao homopolímero em estado bruto, sendo que o material, dessa forma, tem baixa aplicabilidade, pois tem baixa resistência e propensão significativa a quebra.

Porém, com a adição de 20 mol% de hidroxivalerato, observa-se uma alteração drástica e melhora elevada nas características do polímero, ponto de fusão de 130°C, 35% de cristalinidade, resistência a tração de 20 MPa e extensão total antes da quebra de 50% (Luzier 1992). Percebe-se, dessa forma, que os copolímeros têm uma melhora em sua estabilidade e propriedades físicas, em comparação de homopolímeros, utilizando o exemplo do P (3-HB).

Os PHAs de uma forma geral, tem solubilidade em solventes orgânicos, como clorofórmio e alguns, no caso de mcl-PHA, acetona. Quanto ao peso molecular dos radicais mais comuns, estes estão descritos na tabela 01.

Tabela 01. Informação dos pesos moleculares dos radicais mais comuns associados ao P (3-HB) na formação de copolímeros.

<b>Nome</b>	<b>Peso molecular (g mol<sup>-1</sup>)</b>
3-Hidroxibutirato	104,105
5-Hidroxivalerato	118,132
6-Hidroxihexanoato	132,159
2-Hidroxihexanoato	146,186
3-Hidroxioctanoato	160,213
10-Hidroxidecanoato	188,267

Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database (PubChem, 2016).

Os PHAs apresentam muitas características atrativas quando comparados com outros poliésteres derivados do petróleo. Além da ausência de toxicidade, elevada hidrofobicidade e estabilidade molecular (Singh, Kumar et al. 2015). Além disso, esse tipo de composto tem rápida decomposição na natureza e pode servir de base para obtenção de outras moléculas de interesse industrial (C.S.K. Reddy 2003, Marchessault 2005, Pollet 2012, Maity 2015).

Inicialmente, os PHAs surgiram como uma alternativa para a substituição de polímeros plásticos empregados na indústria em geral, especialmente os destinados as embalagens descartáveis (Tan, Chen et al. 2014, Singh, Kumar et al. 2015, Energy 2016). Entretanto, após inúmeras tentativas e novos desenhos experimentais, ainda existem algumas barreiras para o emprego dos PHAs nessa área, principalmente o custo final de obtenção e a extração desses compostos.

A melhor estratégia de extração envolve solventes orgânicos (Furrer, Panke et al. 2007, Verlinden, Hill et al. 2007, Divyashree and Shamala 2010), o que dificulta sua empregabilidade como substituinte ambientalmente correto. Algumas metodologias alternativas foram desenvolvidas, todavia, com o foco em aplicações médicas (Wampfler, Ramsauer et al. 2010), apresentando baixa capacidade de implementação em uma escala industrial para suprir a demanda necessária, até o momento, para materiais de maior consumo.

Neste ponto, foram levantadas alternativas do emprego desses compostos, destacando-se as áreas de medicina (para implantes e novas drogas, por exemplo), biorefinarias e denominada “química verde”.

Segundo definição da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US-EPA), química verde se refere a “*produtos químicos e processos que reduzem ou eliminam a geração de substâncias perigosas*” (EPA, 2016). Ainda, segundo a mesma agência, a difusão do uso de produtos químicos verdes trará economias na casa dos 65 bilhões de dólares até 2020 (EPA, 2016).

Foram definidos 12 princípios que regem a química verde (Anastas and Warner 2000), sendo eles:

1. Prevenção;
2. Economia atômica: processos com rendimentos próximos do máximo;
3. Sínteses químicas menos nocivas;
4. Projetos de produtos químicos mais seguros;
5. Solventes e auxiliares mais seguros;
6. Eficiência energética;
7. Utilização de insumos renováveis;
8. Redução de derivados;
9. Catálise;
10. Design para degradação;
11. Prevenção da poluição em tempo real;
12. Prevenção de acidentes.

A partir dessas prerrogativas, os PHAs de um modo geral têm seu papel como candidatos a substituintes de alguns componentes em processos de síntese de

compostos, fontes renováveis para abordagem de sínteses com baixo impacto ambiental e processo limpo (Ahmed, John et al. 2013, Zia, Noreen et al. 2016).

Outra forma de aproveitamento dos PHAs para obtenção de produtos com valor agregado está no emprego desses compostos em sistemas integrados de biorefinarias, o que igualmente corrobora com os 12 princípios da química verde, especialmente com o quesito 7, da Utilização de insumos renováveis.

Por definição, as biorefinarias são o que há de mais avançado nas abordagens que visam a substituição dos atuais processos de síntese e obtenção de compostos químicos (Nasib Qureshi 2014). Através da utilização de substratos de baixo custo (Tabela 02), ou até mesmo resíduos, evitando assim o ônus de serviços de tratamento, esta concepção trata da utilização de uma cadeia integrada que tende a minimizar as perdas durante o processo, acoplando seus distintos processos da maneira mais eficiente, ambiental e financeiramente (Maity 2015, Yang, Choi et al. 2015).

Tabela 02. Fontes de substratos orgânicos possíveis de serem utilizados em biorefinarias como matéria-prima para obtenção de bioprodutos de valor agregado. A grande parte dos substratos orgânicos listados são resíduos de outros processos ou são produzidos com custos muito baixos.

<b>Classes</b>	<b>Origem</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Referências</b>
Biomassa	Vegetal	Culturas energéticas	Girassol, soja, milho, cana-de-açúcar, mamona (Forster-Carneiro, Berni et al. 2013, Kachrimanidou, Kopsahelis et al. 2015)
		Florestal	<i>Pinus</i> , <i>Eucalyptus</i> , <i>Acacia</i> (Maity 2015, Rivas, Raspolli-Galletti et al. 2016)
	Animal	Fezes	bovinos, aves, suínos, ovinos (Fierro, Martínez et al. 2014, Ledda, Schievano et al. 2015)
Agroindustrial	Vegetal	Resíduos de lavoura	Folhas, talos, bagaços (Forster-Carneiro, Berni et al. 2013, Liao, Liu et al. 2014, Maity 2015)
		Subprodutos	Xaropes, restos de alimentos,
	Animal	Indústria de Laticíneos	Caseína, efluente, gordura (Ravikannan and Meenambal 2014, Nath, Verasztó et al. 2015, Németh and Kaleta 2015)

		Fishery	gordura, efluente	(Antelo, De Hijas-Liste et al. 2015)
	Outros	Processos industriais	Glicerol, ácidos orgânicos, restos de fermentações	(Choi, Song et al. 2015)
Lixo municipal	Coleta seletiva	Orgânicos	Restos alimentares, óleos de fritura	(Bonk, Chaturvedi et al. 2015, Surendra, Sawatdeenarunat et al. 2015)

As principais diferenças entre uma refinaria comum, como, por exemplo, uma refinaria de petróleo, e uma biorefinaria são as matérias primas, ou fontes, para os processos desenvolvidos, a geração de resíduos e os produtos possíveis de serem obtidos (Nasib Qureshi 2014, Maity 2015). Em uma refinaria comum (Figura 02), o petróleo serve de matéria prima básica, onde passa pelos processos direcionados para cada tipo de produto o qual se objetiva. O resíduo gerado ao final do processo dificilmente volta para a cadeia produtiva, quando muito, consegue ser direcionado para outro uso, como, por exemplo, produção de asfalto ou briquetes (Government 2016).

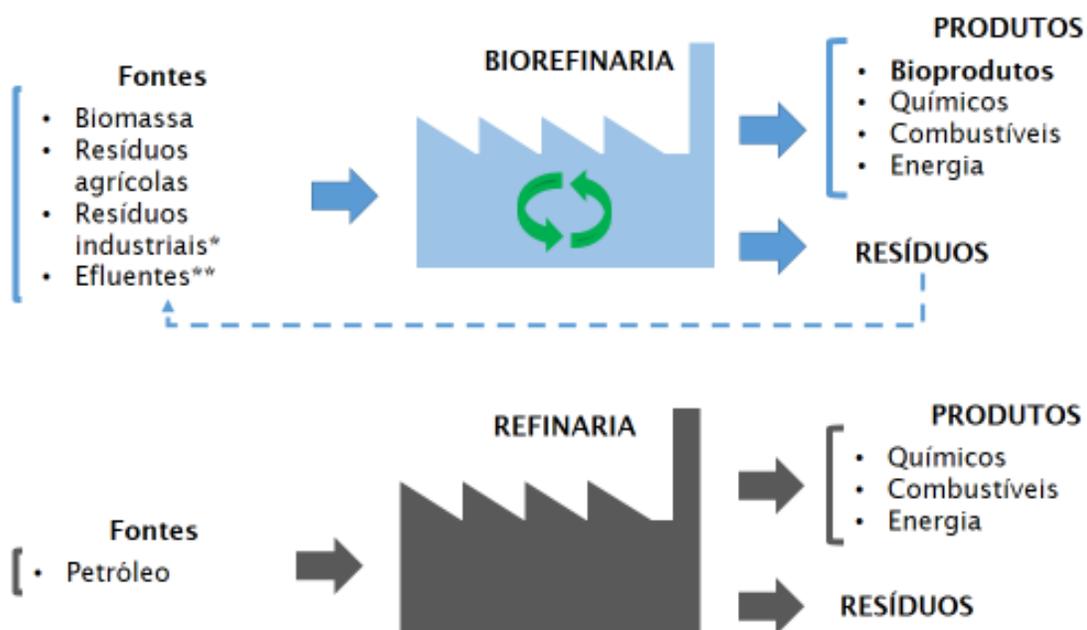


Figura 02. Comparação entre uma refinaria comum e uma biorefinaria, detalhando as fontes, ou matérias-primas, passíveis de utilização em cada uma e os produtos obtidos, bem como o resíduo gerado e sua destinação. \*Resíduos Industriais orgânicos (como biomassa vegetal,

animal, borras oleosas...); \*\*Efluentes com matéria orgânica, como estações de tratamento de esgoto doméstico e efluentes oriundos da indústria alimentícia.

No caso de uma biorefinaria, as fontes possíveis de matéria-prima podem ser variadas, necessitando apenas o pré-tratamento adequado, e o processo gera resíduos que podem retornar a cadeia produtiva. Além disso, por se tratarem de resíduos, em sua grande maioria, o processo desenvolvido nas biorefinarias corrobora com técnicas sustentáveis de aproveitamento eficiente de fontes energéticas, aproveitando quase a totalidade da energia residual das matérias-primas (Maity 2015, Yang, Choi et al. 2015).

Neste ponto, se encaixam os PHAs, primeiramente utilizando a estrutura de uma biorefinaria para serem obtidos, a partir de substratos de baixo valor, e, posteriormente, sendo encaminhados para processos secundários onde possam gerar outros componentes com valor agregado (Naranjo, Cardona et al. 2014, Jiang, Hill et al. 2016)

Outra aplicação dos PHAs, assim como do P (3-HB), é o seu uso na área médica, onde sua potencialidade, atualmente, está voltada a pesquisa de novos fármacos (Zhang, Cao et al. 2013) e matrizes para regeneração de tecidos (Williams and Martin 2005, Xiao, Ren et al. 2014). Além dessas duas aplicações, uso de copolímeros como forma de sistemas de entrega de drogas e associação com antibióticos (Löbler, Sternberg et al. 2011, Dinjaski, Fernández-Gutiérrez et al. 2014). Pelo fato de P (3-HB) ser encontrado no metabolismo de humanos, sua toxicidade e rejeição são quase nulas, além de ocorrerem rotas para a sua degradação (Luef, Stelzer et al. 2015, Zia, Noreen et al. 2016).

No Brasil a iniciativa para a pesquisa e produção de P (3-HB) iniciou-se nos anos 90, primeiramente com uma parceria entre a iniciativa privada (Copersucar) e instituições públicas (Instituto de Pesquisas Tecnológicas e Universidade de São Paulo). Dessa parceria surgiu a P (3-HB) Industrial, empresa localizada junto ao município de Serrana - São Paulo, que produz P (3-HB) a partir da cana-de-açúcar, denominado BioCycle® (P (3-HB) Industrial). A empresa iniciou suas atividades com uma planta piloto com capacidade para 5 t/ano e hoje está com capacidade instalada de 30.000 t/ano (S.A. 2016).

### 3.2 Microrganismos produtores de PHAs

Desde os primeiros estudos de Lemoigne em 1923, inúmeros microrganismos foram descritos como produtores de P (3-HB) (C.S.K. Reddy 2003) e seus copolímeros (Ozdemir 2011, Narayanan and Ramana 2012, Guo, Duan et al. 2013, Singh, Kumari et al. 2013). De fato, a obra da Sociedade Americana para Microbiologia (ASM), o distinto *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Bergey, Whitman et al. 2009), descreve P (3-HB) e os demais PHAs como forma de reserva de energia para diversos grupos de microrganismos.

Os PHAs são, dessa forma, abundantes nas diferentes espécies de bactérias, porém muitos microrganismos acumulam apenas uma fração reduzida de sua biomassa, como forma intermediária em suas rotas fisiológicas (Verlinden, Hill et al. 2007, Jendrossek and Pfeiffer 2014).

Com o estudo mais aprofundado, alguns gêneros foram destacados como maiores acumuladores, com potencial de aplicabilidade, sendo que suas rotas bioquímicas de formação e acúmulo de PHAs foram então objeto de trabalhos mais detalhados.

Sendo assim, dos principais gêneros que acumulam de forma natural P (3-HB), como material de reserva, *Bacillus* (Chen, Konig et al. 1991) e *Cupriavidus* (Vandamme and Coenye 2004) são os mais estudados. Outras bactérias de importância são os gêneros *Pseudomonas* (Prieto, Escapa et al. 2015), *Escherichia* (Agnew, Stevermer et al. 2012) e *Allochromatium* (Weissgerber, Zigann et al. 2011), estando representados na figura 03.

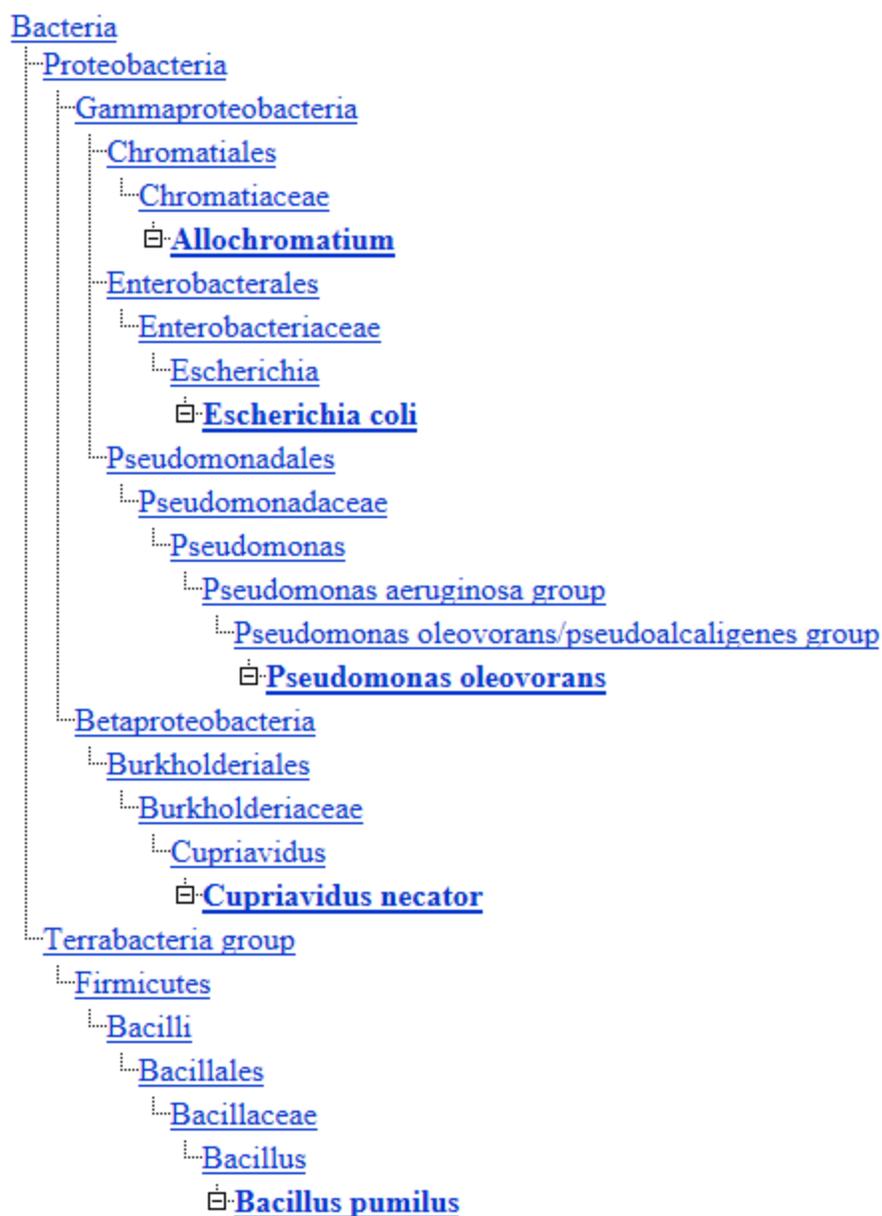


Figura 03. Arranjo taxonômico, construído utilizando a base de dados do NCBI, dos principais gêneros de bactérias estudados para a síntese e acúmulo de PHAs, com enfoque em algumas espécies de maior importância nos gêneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Cupriavidus* e *Bacillus*.

Uma das primeiras aparições do termo “bacilli” na ciência moderna remonta de 1878 (Sanderson 1878), de um trabalho médico que tratava da progressão dos processos infecciosos das doenças. O gênero *Bacillus* Cohn 1872 (Drews 2000, Bergey, Whitman et al. 2009) é um dos primeiros gêneros bacterianos descritos e estudado, largamente associado com saúde humana, animal e sua relação com os diferentes grupos de seres vivos.

Caracterizado como tendo formato de bastonete, reto ou levemente curvado, Gram positivo, ocorrendo em pares, cadeias ou longos filamentos. Basicamente aeróbios, poucos anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos. Encontrados em praticamente todos os extratos ambientais, indo desde organismos psicrófilos a termófilos extremos. Os esporos formados auxiliam na identificação de espécies, sendo estruturas resistentes a radiação, desinfetantes, ácidos, bases e pressão, constituindo um problema grave de contaminação em ambientes (Bergey, Whitman et al. 2009).

Foi a partir do gênero *Bacillus* que a descoberta de P (3-HB) ocorreu, graças ao trabalho de Lemoigne (Lemoigne 1926), sendo posteriormente revisado e aprofundado por Williamson e Wilkinson (Williamson and Wilkinson 1958) e Doudoroff e Stanier (Doudoroff and Stanier 1959).

Outro gênero que teve a sua capacidade de acúmulo de P (3-HB) estudada muito cedo na literatura foi *Cupriavidus*. O gênero *Cupriavidus* Makkar e Casida 1987 é descrito como sendo pertencente ao grupo das  $\beta$ -Proteobactérias, logo, Gram negativa, com formato de cocobacilo, reto, curto, presente no solo e outros meios em contato com o solo.

Esse gênero passou por inúmeras revisões taxonômicas ao longo dos anos (Bergey, Whitman et al. 2009), tendo sido descrito anteriormente como as espécies *Hydrogenomonas eutropha* (Repaske 1962), *Alcaligenes eutrophus* (Repaske and Repaske 1976) e *Ralstonia eutropha* (Beeby, Cho et al. 2012), sendo denominada atualmente *Cupriavidus necator*.

Em suas primeiras descrições quanto ao metabolismo, através de provas bioquímicas rotineiras, *C. necator* já demonstrava grande capacidade de acúmulo de P (3-HB) de forma natural, com facilidade de cultivo em diversas fontes de nutrientes (Repaske 1962).

Estudos posteriores elucidaram seu mecanismo genético que possibilita a síntese e o acúmulo de P (3-HB) (Slater, Voige et al. 1988, Brigham, Budde et al. 2010), a conformação dos grânulos intracelulares do polímero (Beeby, Cho et al. 2012) e a manipulação da síntese de copolímeros (Sato, Fujiki et al. 2013), o que torna *C. necator* uma das bactérias com maior acervo de estudos referentes aos PHAs, em específico P (3-HB).

Ainda no grupo das Proteobactérias, o gênero *Pseudomonas* tem igual importância nos estudos relacionados aos PHAs, especialmente os de cadeia média (mcl-PHA) e longa (lcl-PHA). Pertencente às  $\gamma$ -Proteobacterias, *Pseudomonas* está descrita como um bastonete Gram negativo, aeróbico, largamente distribuído na natureza, pode ser encontrado igualmente como patógeno para plantas, animais e outros organismos (Bergey, Whitman et al. 2009).

Interessante ressaltar que no gênero *Pseudomonas*, normalmente, a maioria das espécies não acumula de forma natural P (3-HB), sendo necessária a indução dessa síntese através de manipulação genética ou fisiológica (Bergey, Whitman et al. 2009), porém, outros PHAs ocorrem naturalmente (Muhr, Rechberger et al. 2013, Prieto, Escapa et al. 2015).

O gênero *Pseudomonas*, por suas características de crescimento rápido, fácil manipulação genética e gama variada de substratos orgânicos possíveis de serem utilizados como fontes de carbono e nitrogênio, tem grande aplicabilidade na área industrial, especialmente na área de poliésteres e biopolímeros (Lageveen, Huisman et al. 1988, Haywood, Anderson et al. 1990, Fernández, Rodríguez et al. 2005, Liu, Luo et al. 2011).

Usualmente, PHAs tem uma relação inversa quanto ao tamanho da cadeia central de carbonos e a sua abundância em ambientes naturais, sendo P (3-HB) mais facilmente encontrado e amplamente distribuído em inúmeros gêneros.

Ocorre que *Pseudomonas* produz tais moléculas em quantidades elevadas, quando comparado com outros microrganismos, necessitando de apenas alguns ajustes em rotas bioquímicas e substratos utilizados para o crescimento dos cultivos (Lageveen, Huisman et al. 1988, Liu, Luo et al. 2011, Guo, Duan et al. 2013, Sharma, Fu et al. 2014, Clomburg, Blankschien et al. 2015).

Além disso, é notável a habilidade de descontaminação de ambientes poluídos por esse gênero bacteriano (Crovadore, Cochard et al. 2016, Nwinyi, Ajayi et al. 2016), como mineralização de hidrocarbonetos, promoção do crescimento vegetal, inibição de patógenos vegetais e degradação de óleos residuais.

Diferentemente dos últimos gêneros citados, *Escherichia* não produz P (3-HB) de forma natural, sendo necessária a inserção de genes responsáveis pela síntese e

acúmulo. *Escherichia*, representada pela sua espécie de maior importância, *Escherichia coli* Castellani and Chalmers 1919, é uma bactéria do tipo bastonete, Gram negativo, ocorrendo de forma isolado ou em pares, com tempo de geração de 20 minutos, aeróbio ou anaeróbio facultativo, tendo tanto metabolismo fermentativo como respiratório.

Encontrada associada com a parte final do intestino de animais de sangue quente, mas também como importante patógenos de muitos animais, podendo secretar toxinas nocivas (Bergey, Whitman et al. 2009).

A importância de *E. coli* para os PHAs e polímeros em geral está relacionada com a grande adaptabilidade da maquinaria celular para a inserção de genes que manipulam as rotas de síntese (Agnew, Stevermer et al. 2012, Saika, Watanabe et al. 2014), acúmulo e degradação de PHAs, especialmente mcl-PHA (Slater, Voige et al. 1988, Yin, Wang et al. 2015).

Como *E. coli* é amplamente utilizada como microrganismo preferencial para fermentações e obtenção de outros bioprodutos (Maity 2015, Zhuang and Herrgård 2015, Menendez-Bravo, Roulet et al. 2016), os mecanismos de inserção, mutação e outras formas de manipulação já estão estabelecidos e padronizados. Além disso, o fato do crescimento acelerado permite a replicação em curta escala de tempo de linhagens competentes e adaptadas as situações desejadas.

Mais extremo ainda é o caso de *Allochrochromatium*, igualmente pertencente ao grupo das Proteobactérias ( $\gamma$ -Proteobactéria). Esse gênero, representado pela espécie *Allochrochromatium vinosum* (Ehrenberg 1838) Imhoff, Süling e Petri 1998, caracterizado por possuir capacidade autotrófica, está relacionada com o ciclo do enxofre e estritamente encontrada em ambientes aquáticos, sendo a bactéria puro sulfurosa mais encontrada na natureza (Weissgerber, Zigann et al. 2011).

Gram negativa, forma de bastonete, apresenta membrana fotossintética do tipo vesicular, onde estão localizados os pigmentos bacterioclorofila  $\alpha$  e carotenoides, além de grânulos de enxofre, que são facilmente visualizados em microscopia. Aceita uma variada gama de aceptores de elétrons, como sulfato, sulfeto, hidrogênio molecular, malato, acetato, fumarato. Algumas cepas utilizam butirato igualmente (Bergey, Whitman et al. 2009).

O interesse por essa bactéria surgiu com a exploração de sua enzima responsável pela síntese de P (3-HB), PHA sintase tipo III, muito semelhante em alguns pontos com as de *C. necator* (Jia, Yuan et al. 2001). Métodos de triagem e identificação para esse tipo de bactéria (Higuchi-Takeuchi, Morisaki et al. 2016), além dos mecanismos de síntese envolvidos com sua sintase única (Chen, Cao et al. 2015), bem como a aplicabilidade de expressão de seus componentes em outras bactérias (Perez-Zabaleta, Sjöberg et al. 2016). Além de PHAs, essa espécie está relacionada com a nova geração de processos envolvendo microrganismos em escala industrial para obtenção de novos nutracêuticos, biocombustíveis e biomateriais (Garay, Boundy-Mills et al. 2014).

Além desses já consagrados gêneros e respectivas espécies, atualmente muitos outros microrganismos vêm sendo descritos como bons acumuladores de P (3-HB) e de outros PHAs (Ansari and Fatma 2016, Damrow, Maldener et al. 2016, Muangwong, Boontip et al. 2016).

Essas bactérias são oriundas dos mais distintos habitats em que se pode encontrar vida, com rotas bioquímicas e fisiológicas que se distinguem das já elucidadas para a síntese e acúmulo de P (3-HB). Alguns dos microrganismos mais recentes estão listados na Tabela 03, abaixo.

Tabela 03. Lista de microrganismos com capacidade de síntese e acúmulo de PHAs. Alguns microrganismos dependem da inativação de algumas rotas ou estímulo durante o cultivo para que as condições favoráveis ao acúmulo sejam estimuladas.

<b>Família</b>	<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Ref.</b>
BEIJERINCKIACEAE	<i>Chelatococcus</i>	<i>C. thermostellatus</i>	(Ibrahim, Lebbe et al. 2016)
BRADYRHIZOBIACEAE	<i>Agromonas</i>	<i>A. oligotrophica</i>	(Bergey, Whitman et al. 2009)
BURKHOLDERIACEAE	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	(Bergey, Whitman et al. 2009)
	<i>Paucimonas</i>	<i>P. lemoignei</i>	(Bergey, Whitman et al. 2009)
CHITINISPIRILLACEAE	<i>Chitinispirillum</i>	<i>C. alkaliphilum</i>	(Sorokin, Rakitin et al. 2016)
CHROMATIACEAE	<i>Marichromatium</i>	<i>M. bheemicum</i>	(Higuchi-Takeuchi, Morisaki et al. 2016)
COMAMONADACEAE	<i>Acidovorax</i>	<i>A. defluvii</i> , <i>A.</i>	(Bergey, Whitman et al. 2009, Vigneswari, Lee et al. 2015)
	<i>Variovorax</i>	<i>V. paradoxus</i>	(Schürmann, Hirsch et al. 2013)
HALOFERACACEAE	<i>Haloferax</i>	<i>H. mediterranei</i>	(Liu, Cai et al. 2016)
HALOMONADACEAE	<i>Halomonas</i>	<i>H. aquamarina</i>	(Yin, Wang et al. 2015)
MERISMOPEDIACEAE	<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp.	(Damrow, Maldener et al. 2016)
OCEANOSPIRILLACEAE	<i>Neptunomonas</i>	<i>N. antarctica</i>	(Liu, Zhang et al. 2016)
RHIZOBIACEAE	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Sinorhizobium</i> sp.	(Jiang, Hill et al. 2016)
RHODOBACTERACEAE	<i>Sagittula</i>	<i>Sagittula</i> sp.	(Bergey, Whitman et al. 2009)
	<i>Rhodovulum</i>	<i>R. visakhapatnamense</i>	(Higuchi-Takeuchi, Morisaki et al. 2016)
	<i>Nereida</i>	<i>N. ignava</i>	(Arahal, Pujalte et al. 2016)
	<i>Thalassobius</i>	<i>T. mediterraneus</i>	(Rodrigo-Torres, Pujalte et al. 2016)
	<i>Levispirillum</i>	<i>Levispirillum</i> sp.	(Bergey, Whitman et al. 2009)
SAPROSPIRACEAE	<i>Haliscomenobacter</i>	<i>Haliscomenobacter</i> sp.	(Bergey, Whitman et al. 2009)
SPHINGOMONADACEAE	<i>Sandaracinobacter</i>	<i>S. sibiricus</i>	(Yurkov and Beatty 1998, Rosenberg, DeLong et al. 2014)
	<i>Sphingobium</i>	<i>Sphingobium</i> sp.	(Madueño, Macchi et al. 2016)
SYNTHROPHACEAE	<i>Desulfomonile</i>	<i>D. tiedjei</i>	(Gallert and Winter 2005, Bergey, Whitman et al. 2009, 2014)
XANTHOMONADACEAE	<i>Nevskia</i>	<i>Nevskia</i> sp.	(Bergey, Whitman et al. 2009)

### 3.3 Rotas e enzimas utilizadas

A síntese e acúmulo de P (3-HB) e outros PHAs envolvem enzimas e rotas metabólicas variadas, sendo conhecidas hoje no mínimo 12 rotas e mais de 45 enzimas envolvidas (Meng, Shen et al. 2014). Uma das primeiras rotas de formação de P (3-HB) descritas (Williamson and Wilkinson 1958, Doudoroff and Stanier 1959), sendo a mais conhecida e elucidada.

Essa rota essencial está relacionada com produção de grandes quantidades de acetil-CoA (Acetil-Coenzima A) oriundo da quebra de açúcares (Verlinden, Hill et al. 2007), geralmente, que é desviado das rotas metabólicas energéticas, entrando no ciclo de síntese e acúmulo de P (3-HB) (Figura 04).

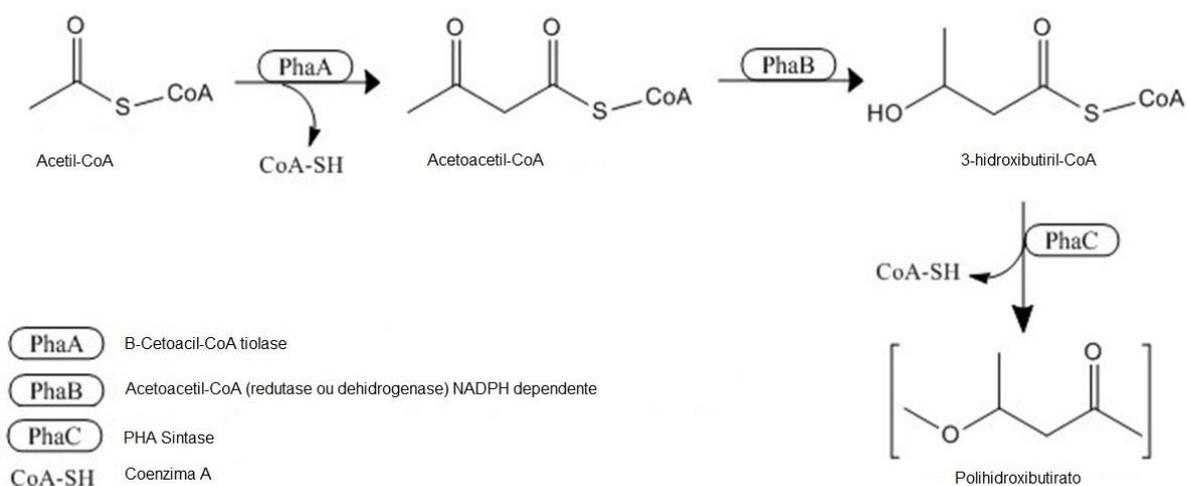


Figura 04. Esquema representando a rota bioquímica pela qual as moléculas de acetil-CoA são convertidas em polihidroxialcanoato.

Essa rota essencial de formação de PHB, que envolve basicamente três enzimas que são responsáveis pela conversão de acetil-CoA em intermediários até a sua polimerização (Doudoroff and Stanier 1959, Liebergesell, Hustede et al. 1991). A primeira dessas enzimas, PhaA ( $\beta$ -Cetoacil-CoA tiolase ou Acetoacetil-CoA tiolase) converte duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA (Acetoacetil-Coenzima A), através de uma reação de condensação (Uchino, Saito et al. 2007).

O segundo passo é a redução da molécula de acetoacetil-CoA em 3-hidroxiacetil-CoA (3-hidroxiacetil-Coenzima A), pela ação da enzima PhaB (Acetoacetil-CoA reductase ou dehidrogenase). A polimerização de 3-hidroxiacetil-CoA em P (3-HB), passo final na formação do polímero, ocorre

através da enzima denominada PhaC (PHA sintase) (Doudoroff and Stanier 1959, Valentin 1995, Prieto, Escapa et al. 2015).

Além desses metabólitos intermediários, a rota de síntese e metabolização de P (3-HB) depende de outros fatores, como NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotido fosfato) e FADH (Dinucleotídeo de flavina e adenina), onde outras rotas metabólicas podem influenciar ou mesmo interferir junto ao metabolismo de P (3-HB) (Sudesh, Abe et al. 2000, Kessler and Witholt 2001).

É o caso da  $\beta$ -oxidação, uma rota que envolve o metabolismo de ácidos graxos, onde seus intermediários podem ser agregados as rotas de síntese de PHAs (Brigham, Budde et al. 2010), formando os denominados PHAs de cadeia média (mcl-PHA) (Peña, Castillo et al. 2014) e longa (lcl-PHA) (Cerrone, Choudhari et al. 2014).

A  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos envolve principalmente 3 enzimas, FadA ( $\beta$ -kethiolase), FadB (Enoyl-CoA hydratase) e FadE (Acil-CoA desidrogenase) (Figura 05).

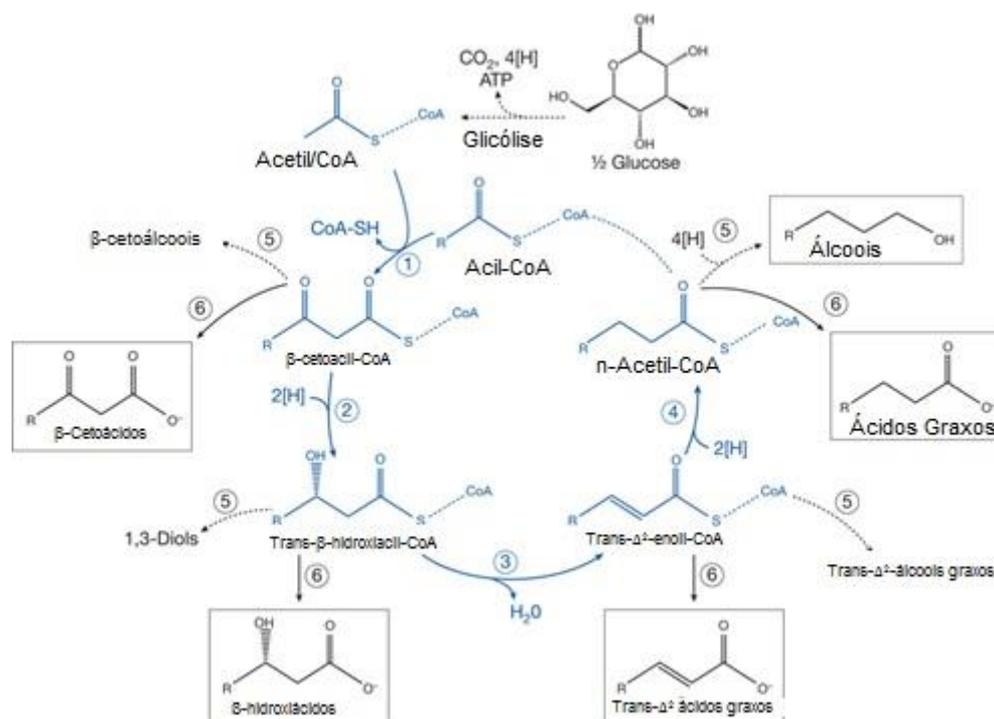


Figura 05. Via da  $\beta$ -oxidação em detalhes, com as principais saídas de metabólitos secundários evidenciadas. Fonte: (Dellomonaco, Clomburg et al. 2011).

Na primeira etapa, Acil-CoA é convertido em enoil-CoA, pela ação de FadE, com o consumo de FAD e geração de FADH<sub>2</sub>, originando enoil-CoA. A enzima FadB converte enoil-CoA, através de um processo de hidratação, em (S)-3-

hidroxiacil-CoA, que passa por uma nova oxidação, carregada pelas enzimas FadB ou FadJ, utilizando NAD na reação, gerando 3-cetoacil-CoA. A última etapa consiste na conversão de 3-cetoacil-CoA em acil-CoA, gerando ao final Acetil-CoA e Acil-CoA, sendo que Acil-CoA reinicia o ciclo.

Das enzimas envolvidas com a obtenção de P (3-HB), PhaC é uma das mais importantes e diversificada, variando de acordo com grupos de microrganismos (Meng, Shen et al. 2014, Zhang, Chen et al. 2015), além de alterar características como comprimento e estrutura e conformação (pela adição de outros PHAs) das cadeias de P (3-HB) (Zhang, Chen et al. 2015).

A classe de enzimas denominadas PHA sintase, ou PhaC, são subdivididas em 4 grupos, que têm por atividade básica a polimerização dos hidroxialcanoatos (HAs) obtidos do metabolismo de fontes energéticas nos distintos homopolímeros e copolímeros (Singh, Kumar et al. 2015).

Dos 4 grupos existentes, PHA sintase tipo I e II são muito semelhantes entre si, compostas por apenas uma subunidade (PhaC), com peso molecular de 65 kDa, polimerizando ésteres de cadeia curta (scl-HAs) e de cadeia média (mcl-HAs), como 3-hidroxiacetato (3-HA) e 3-hidroxiacetato (3-HA) (Rehm 2003).

O tipo I de PHA sintase é normalmente encontrada em *Cupriavidus necator*, uma das bactérias mais utilizadas para a obtenção de P (3-HB) e copolímeros como P(3HB:4HB) (Poli-3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato), P(3HB:3HV) (Poli-3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato) e P(3HB:3HV:4HB) (Poli-3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato) (Verlinden, Hill et al. 2011).

O principal microrganismo estudado anteriormente, *C. necator*, para a obtenção de PHA, principalmente P (3-HB), antes do advento da engenharia genética e das tecnologias para melhoramento genético de linhagens industriais de *E. coli* (Li, Chen et al. 2011, Park, Jho et al. 2014).

Anteriormente denominada *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus* e *Wautersia eutropha*, o nome e a taxonomia foram revisados por Vandamme and Coenye em 2004 (Vandamme and Coenye 2004), permanecendo *Cupriavidus necator* como o nome oficial desde então. *C. necator* pode ser encontrada em diversos ambientes, como corpos de água doce e amostras de distintos extratos

de solo, utilizando o excesso de carbono disponível (como acetato, glicose e frutose, por exemplo) para metabolizar P (3-HB) em taxas de até 75% de seu peso celular (Beeby, Cho et al. 2012).

Uma característica dessa espécie de bactéria reside na organização dos genes utilizados para a síntese e polimerização de P (3-HB), que estão arrançados na forma de um operon, denominado CAB, de acordo com a ordem de suas enzimas constituintes, PhaC, PhaB e PhaA, respectivamente (Beeby, Cho et al. 2012, Sato, Fujiki et al. 2013).

Como em *C. necator* a rota metabólica I é a mais utilizada, sendo a mais simples, do ponto de vista fisiológico e bioquímico, a obtenção de P (3-HB) pode facilmente ser modificada através de estratégias genéticas, inserindo ou alterando componentes diretamente no operon, ou através de rotas diretamente ligadas a ele (Sato, Fujiki et al. 2013, Meng, Shen et al. 2014).

Além disso, é notória a habilidade de produção do homopolímero 3-HB e do copolímero 3-HB:3-HV em condições normais de cultivo (Brigham, Budde et al. 2010, Beeby, Cho et al. 2012), porém, trabalhos recentes (Park and Kim 2011, Sato, Fujiki et al. 2013), alcançaram a produção de hexanoato e 4-hidroxibutirato, HÁ de maior interesse industrial e com maior número de aplicações.

O segundo tipo de PHA sintase, tipo II, ocorre principalmente no gênero *Pseudomonas* e outras Proteobacterias (Meng, Shen et al. 2014, Prieto, Escapa et al. 2015), e pode utilizar diversos HA na síntese do polímero, geralmente sintetizando copolímeros com scl-HAs e mcl-HAs. No caso de *Pseudomonas*, a área responsável pela PHA sintase está organizada na forma de um cluster, dividido em dois operons phaC1ZCSD e phaIF, respectivamente, com um ativador transcricional interno denominado PhaD, que regula a expressão dessas enzimas (Klinke, de Roo et al. 2000, Prieto, Escapa et al. 2015).

Outras enzimas importantes para a síntese e acumulação de PHAs, no gênero *Pseudomonas*, são phaJ (uma enzima da família enoil-CoA hidratase), FabG (3-Cetoacil redutase NADPH-dependente) e FadA (3-cetoacil-CoA tiolase) (Liu, Luo et al. 2011, Clomburg, Blankschien et al. 2015). Essas enzimas utilizam basicamente mcl-HAs, oriundos do catabolismo de ácidos graxos e açúcares simples, combinados, das rotas de  $\beta$ -oxidação e síntese “*de novo*” de ácidos

graxos, para a posterior polimerização em copolímeros de diferentes tamanhos de cadeia e ramificações (Verlinden, Hill et al. 2007, Jendrossek and Pfeiffer 2014).

Atualmente, *Pseudomonas* e *E. coli* são as bactérias mais utilizadas para manipulação genética visando a obtenção de PHA, seja de homo polímeros ou de copolímeros, com alto grau de produção e pureza, dependendo das estratégias utilizadas (Guo, Duan et al. 2013, Meng, Shen et al. 2014, Prieto, Escapa et al. 2015).

O tipo III de PHA sintase, encontrado em bactérias como *Allochromatium vinosum* (Tian, Sinskey et al. 2005) opera de forma semelhante as demais sintases. Esse tipo de PHA sintase é composto por duas subunidades, de cerca de 40 kDa cada uma, denominadas PhaC e PhaE, que utiliza como substrato para a polimerização, scl-HA (Tian, Sinskey et al. 2005, Sato, Minato et al. 2010).

A bactéria *A. vinosum*, pertencente as bactérias púrpuras sulfurosas, isolada comumente de ambientes aquáticos, tem papel importante no ciclo do enxofre, acumulando PHA em algumas condições específicas (Liebergesell, Hustede et al. 1991). Por conta disso, essa bactéria não foi muito pesquisada em relação à obtenção de PHA, com alguns trabalhos sobre síntese *in vitro* de PHA (Sato, Minato et al. 2010) e outros estudos com a relação das proteínas no processo de acúmulo do polímero (Liebergesell and Steinbüchel 1996).

O quarto e último tipo de PHA sintase, descrito até o presente momento, o tipo IV, se assemelha muito com o tipo III, porém apresenta uma outra subunidade, PhaR (Sudesh, Abe et al. 2000, Meng, Shen et al. 2014, Tan, Chen et al. 2014). O tipo IV é composto por duas subunidades, PhaC e PhaR, com pesos moleculares de 40 e 22 kDa, respectivamente (Rehm and Steinbüchel 1999).

Esse tipo de PHA sintase é muito comum na divisão Firmicutes, especificamente no gênero *Bacillus*, onde são muito eficientes na conversão de scl-HAs em homopolímeros, principalmente P (3-HB), mas também outros copolímeros, dependendo do substrato e da espécie envolvida (Tsuge, Hyakutake et al. 2015).

Em *Bacillus megaterium*, os genes responsáveis pela sintase estão organizados em um cluster, com cinco subunidades independentes, phaP, phaQ, phaR, phaB e phaC (Figura 06), com pesos moleculares e funções distintas na síntese e acumulação de P (3-HB) (Rehm and Steinbüchel 1999, Valappil, Boccaccini et al. 2007).

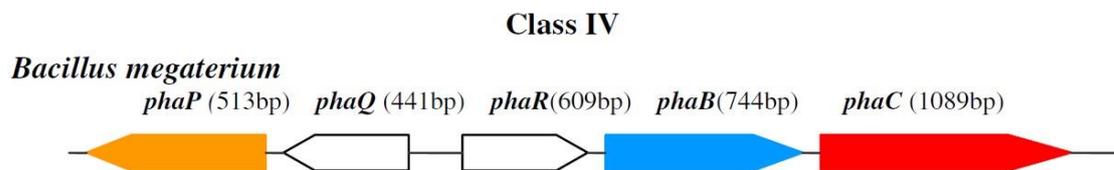


Figura 06. Organização do cluster que abriga os genes responsáveis pela síntese e acúmulo de P (3-HB) em *B. megaterium*, com os seus respectivos tamanhos em pares de base. Figura retirada de Valappil, S.P., et al., 2007 (Rehm and Steinbüchel 1999, Valappil, Boccaccini et al. 2007).

Após a fase de crescimento exponencial de bactérias do gênero *Bacillus*, as PHA sintases são ativadas com maior intensidade do que comparada a fase de crescimento inicial. Nesse ponto, iniciam a captação de acetil-CoA oriundo do metabolismo energético das células para a síntese massiva de PHAs, na forma de grânulos.

Esses grânulos, por sua vez, são visualizados como inclusões lipofílicas intracelulares (Williamson and Wilkinson 1958, Chen, König et al. 1991), e tem seu pico de acúmulo próximo a fase inicial de esporulação (Narayanan and Ramana 2012).

Tradicionalmente, o acúmulo de PHA, especialmente (P3HB), anteriormente a formação dos esporos estava relacionado de forma direta, onde o P (3-HB) acumulado serviria à célula como matriz energética para a formação dos esporos, sob condições de estresse ambiental e fisiológico (Kominek and Halvorson 1965, Chen, König et al. 1991, Valappil, Boccaccini et al. 2007, Narayanan and Ramana 2012).

Porém, estudos recentes com *Bacillus thuringiensis* (Wang, Li et al. 2016) demonstraram que não há uma relação direta entre o decréscimo de P (3-HB) e a formação de esporos, no que diz respeito a matriz energética. Foi constatado a redução do P (3-HB), formado na fase de crescimento exponencial e estacionária, relacionado com a atividade e expressão de PhaC, e seu posterior decréscimo, pela atividade da PHA depolimerase PhaZ (Wang, Li et al. 2016).

Este é um ponto importante a ser considerado, uma vez que esse gênero de bactérias é empregado em certos processos de obtenção de P (3-HB), devido a sua baixa produção de endotoxinas (Valappil, Boccaccini et al. 2007), bom crescimento em uma gama variada de substratos de baixo valor econômico (Full, Jung et al. 2006, Krueger, Radetski et al. 2012, Kumar, Ray et al. 2015) e extração simplificada (Divyashree and Shamala 2010).

Deve ser evitado a exposição dos cultivos em fases críticas de síntese e acúmulo de P (3-HB) a situações de estresse fisiológico e ambiental, como alterações bruscas no pH, temperatura e disponibilidade de fontes energéticas, de forma a não haver o consumo do polímero obtido (Kumar, Patel et al. 2013).

Devido a sua estreita relação com a polimerização e acúmulo de PHA no interior das células, PHA sintase geralmente é alvo de estudos para alterações em rotas e inserção de mutações para alterar aspectos como a formação e o acúmulo de P (3-HB) (Jendrossek and Pfeiffer 2014, Tan, Chen et al. 2014, Singh, Kumar et al. 2015).

Uma das abordagens mais utilizadas para a modificação de como a bactéria produz P (3-HB) é a inserção de plasmídeos recombinantes em cepas com altos índices de produção, como é o caso de *Escherichia coli*, plasmídeos esses oriundos de outros organismos (Ouyang, Liu et al. 2007, Wang, Mueller et al. 2010, Singh, Kumar et al. 2015, Yin, Wang et al. 2015).

Como fontes de genes relacionados a síntese e acúmulo de PHAs, os organismos mais utilizados e estudados até o presente momento são *Pseudomonas stutzeri* e *Pseudomonas putida* (Prieto, Escapa et al. 2015), *Cupriavidus necator* (Park, Jho et al. 2014) e *Bacillus megaterium* (Kumar, Patel et al. 2013).

Por exemplo, cepas de *E. coli* (DH5 $\alpha$  e K-12 MG1655) que receberam os genes para BTE, PhaJ3 and PhaC2 (oriundos de *P. aeruginosa* PAO1) e PP\_0763 (de *P. putida* KT2440), acumularam Polihidroxidodecanoato (P-HDD), em uma proporção de 17.3% de sua massa celular seca (CDW), utilizando como substrato uma fonte simples de carboidrato, sem presença de ácidos graxos (Agnew, Stevermer et al. 2012).

Trabalhos prévios (Haywood, Anderson et al. 1990) já relacionavam a habilidade natural de síntese e acúmulo de 3-Hidroxicanoato (3-HD), na forma de copolímero, porém, quando as bactérias foram geneticamente modificadas, os valores de obtenção desse HA foram mais elevados, em comparação com cepas selvagens, além do copolímero exibir uma composição e arranjo mais estáveis (Liu, Luo et al. 2011, Meng, Shen et al. 2014).

Além dessa metodologia, outra forma de modificação genética que afeta diretamente a obtenção de PHAs ocorre com o suprimento de HAs, basicamente scl-HAs e mcl-HAs, que são o suprimento de monômeros para PHA sintase realizar a polimerização. Como esses monômeros são gerados basicamente a partir de acetil-CoA, é necessária a compatibilidade entre as rotas de fornecimento dessas moléculas com a via de síntese de PHA (Eggers and Steinbuchel 2013, Prieto, Escapa et al. 2015).

Uma das rotas que gera a maior quantidade de acetil-CoA disponível para conversão em PHAs é a  $\beta$ -oxidação, citada anteriormente. Uma abordagem mais recente, que visa a obtenção de distintos copolímeros, acopla a  $\beta$ -oxidação com depolimerases, de forma simultânea, como método mais eficiente (Eggers and Steinbuchel 2013).

Testada em organismos como *Pseudomonas* sp., *C. necator* e outras bactérias Gram negativas, acoplar a rota da  $\beta$ -oxidação com depolimerases gera e desconstrói PHA ao mesmo tempo, originando uma série de HA de tamanho variado, que podem entrar novamente nas rotas de polimerização, vindo a ser um método eficiente, do ponto de vista energético, para as células (Arias, Bassas-Galia et al. 2013).

As depolimerases basicamente quebram a estrutura polimérica em monômeros de HA de distintos tamanhos de cadeia, dependendo do tipo e da especificidade dessas depolimerases, além das rotas metabólicas ativas na bactéria (Gangoiti, Santos et al. 2012, Santos, Gangoiti et al. 2012). A enzima PhaZ, por exemplo, pode ser encontrada em uma série de outros microrganismos, como *Nocardia* sp. (Bennur, Kumar et al. 2014), mas não apenas em bactérias, como também em fungos (Panagiotidou, Konidaris et al. 2014, Shalini Devi, Sreenivasulu et al. 2014).

A ação dessas depolimerases sobre as distintas formas de apresentação de PHAs, como filmes, grânulos e formas cristalizadas, é uma área de estudos muito atrativa, de forma a aumentar o conhecimento das relações entre essas enzimas com as rotas e mecanismos de acúmulo e de degradação intra e extra celular (Gangoiti, Santos et al. 2012, Eggers and Steinbuchel 2013, Panagiotidou, Konidaris et al. 2014, Martínez, de Santos et al. 2015).

### **3.4 Métodos analíticos para detecção, identificação e acompanhamento da produção de PHA**

Com a identificação pioneira dos PHAs por Lemoigne (Lemoigne 1926), e posteriormente, com trabalhos como o de Williamson e Wilkinson (Williamson and Wilkinson 1958), surgem os primeiros métodos analíticos para a detecção e identificação dos PHAs, em especial P (3-HB).

Inicialmente, dado os recursos tecnológicos da época, a identificação da presença de P (3-HB) ocorria através de sua extração e posterior digestão em ácido sulfúrico. Esse procedimento gerava ácido crotônico, analisado através de espectrofotômetro, ocorrendo pico de absorvância em 230 à 240 nm. Os valores obtidos eram então comparados com um gradiente de quantidades conhecidas de ácido crotônico, de forma a estabelecer uma relação da quantidade de P (3-HB) na amostra (Lemoigne 1926, Williamson and Wilkinson 1958, Noel 1962, Shah 2012).

Uma das dificuldades associadas a essa metodologia é a grande quantidade de polímero necessária para a execução da digestão e leitura das amostras. Além disso, essa técnica tem baixa precisão e podem ocorrer interpretações errôneas quando o polímero obtido dos cultivos apresenta-se na forma de copolímero (de Rijk, van de Meer et al. 2005).

Outro método analítico utilizado envolve a derivatização do polímero utilizando ácido sulfúrico e metanol, formando os ésteres metílicos, analisados através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), mais precisa e confiável que a anterior. Através dessa metodologia, é possível verificar a composição do polímero obtido através de todos os ésteres formados, independentemente se homopolímero ou copolímero (Elhottová, Tříska et al. 2000, Torri, Cordiani et al. 2014).

Além disso, com a utilização de GC-MS é possível ainda obter os dados referentes a quantificação das amostras, o que é útil para determinar o rendimento da produção. Igualmente como a técnica de UV, GC-MS utiliza-se de protocolos de purificação e tratamento das amostras, consumindo reagentes e gerando resíduos ao final do processo (Elhottová, Tříška et al. 2000, Lutke-Eversloh, Bergander et al. 2001, Pollet 2012, Simon-Colin, Gouin et al. 2012).

Complementar aos métodos anteriores, a Ressonância Magnética Nuclear (NMR) utiliza-se das características únicas de ressonância do núcleo dos átomos presentes na molécula analisada, possibilitando uma identificação mais precisa dos componentes da amostra. O tipo de metodologia mais comum para a análise de amostras, como P (3-HB), fundamenta-se na ressonância dos isótopos  $C^{13}$  e  $H^1$ , em condições aonde a amostra é bombardeada com pulsos de radiofrequência enquanto submetida a um campo magnético muito forte. É um dos métodos analíticos mais precisos para elucidação da estrutura da matéria de que é formada a amostra (Silverstein, Webster et al. 2006, Kriz, Pavia et al. 2010).

Um dos primeiros trabalhos de NMR para P (3-HB) foi o de Doi e colaboradores (Doi, Kawaguchi et al. 1989), que elucida com precisão os pontos de ressonância do grupo funcional 3-hidroxibutirato e demais grupos funcionais relacionados com o perfil da estrutura do P (3-HB). Essa metodologia requer uma amostra com grau de pureza elevado, necessitando etapas de purificação prévia, de forma a obter-se o composto a ser analisado em sua forma mais pura e sem contaminantes. Sendo assim, grandes volumes de solventes são necessários para a purificação das amostras e realização das análises, no caso de P (3-HB), clorofórmio deuterado é utilizado como solvente para a elaboração do ensaio (Doi, Kawaguchi et al. 1989).

Ao contrário das metodologias citadas anteriormente, uma outra alternativa, que se utiliza de passos simples de preparo de amostra e quase nenhum reagente ou solvente, é o emprego da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Essa metodologia se utiliza da leitura da absorção e emissão do espectro infravermelho de amostras em estados variados (líquido, sólido ou gasoso) (Silverstein, Webster et al. 2006, Kriz, Pavia et al. 2010).

Através da utilização de FTIR é possível obter o espectro de absorção (ou emissão) em amostras de biomassa, sem a necessidade de extração ou outro procedimento de purificação. O espectro obtido é então analisado para a presença de grupos funcionais relacionados com o P (3-HB) em comparação com os sinais associados a biomassa (Liau, Bin Ahmad et al. 2014).

### **3.5 Tabaco: aspectos ambientais e econômicos**

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) pertence à família das solanáceas, sendo uma planta perene, de característica herbácea, atingindo até 3 metros de altura. Naturalmente produz folhas de grande porte (30 a 40 cm), porém variedades comerciais podem chegar a atingir 80 cm. A superfície da planta fica coberta de uma substância viscosa e pegajosa, de aroma doce e pungente. Acredita-se que *N. tabacum* é originária de um cruzamento que ocorreu de forma natural e espontânea entre outras duas espécies, *Nicotiana sylvestris* e *Nicotiana tomentosa* (Gallego 2012).

O ato de consumir tabaco foi descrito primeiramente pelos navegadores na época das explorações do continente americano. Desde então, o hábito de fumar passou de um ritual religioso para uma prática cultural e de exploração econômica. As primeiras áreas de lavoura de tabaco surgiram próximas ao litoral da Bahia, com os primeiros colonizadores do Brasil. Com a chegada de imigrantes alemães, principalmente, nos estados do sul, aos poucos foram surgindo as primeiras lavouras de tabaco no sul. Ao passar dos anos, essa cultura ganha força, aliada a grande produtividade e clima ideal, sendo hoje uma das fontes econômicas mais expressivas no sul do país (FAO 2003, AFUBRA 2016).

Dados coletados junto ao IBGE e divulgados pela AFUBRA sobre a produção da safra 2000-2001 apontam para cifras de R\$ 1,23 bilhões, totalizando 504 728 toneladas de tabaco produzidas no sul do país. Em 2015 a safra total da região sul foi de 695 850 toneladas e R\$ 5,02 bilhões. Essa produção reflete o uso de 308 260 hectares, abrangendo as propriedades de 153.730 famílias (AFUBRA 2016).

Atualmente, duas variedades, tabaco Virginia e tabaco Burley, respectivamente, respondem pela maior parte da produção de tabaco no mundo. Existem outras variedades, como Oriental, Galpão comum, Mariland, porém essas são produzidas apenas em algumas áreas isoladas. O tabaco do tipo Virginia teve uma participação de 87% do total na safra 2015/2016, enquanto que Burley e galpão comum, 12% e 1%, respectivamente (Kist, Santos et al. 2016).

A produção de tabaco no sul do país tem um caráter familiar, de pequenas propriedades, distribuídas ao longo dos estados, aonde a mão de obra familiar representa mais de 50% do trabalho utilizado no cultivo e colheita (Dutra and Hilsinger 2013, INCA 2016). A produção do tabaco leva de 8 a 10 meses, desde a preparação do solo até a cura e venda das folhas, empregando diversos insumos, como fertilizantes e agrotóxicos.

Além disso, a cura das folhas colhidas, no caso da variedade Virgínia, utiliza de fornos a combustão, abastecidos com lenha. O tabaco Burley tem um processo de cura distinto, aonde a planta toda é seca em galpões e estruturas similares, retirando-se as folhas posteriormente (Dutra and Hilsinger 2013, INCA 2016).

Sendo assim, a cadeia produtiva do tabaco impacta diretamente no meio ambiente, principalmente pelo uso de agrotóxicos e de madeira para os fornos. A fonte de madeira mais empregada é o cultivo de *Eucalyptus* sp., que atinge grande porte em pouco tempo. Porém, muito das áreas de mata nativa já serviu de fonte de abastecimento aos fornos de secagem no passado (Dutra and Hilsinger 2013).

Muitas alternativas já foram consideradas para a substituição das lavouras de tabaco, visando atividades que pudessem ser empregadas em propriedades de pequeno porte e utilizando a mão de obra local e familiar. Porém, o emprego do tabaco e seus derivados como matéria prima para desenvolvimento de produtos de valor agregado vem sendo considerada uma das melhores estratégias (FAO 2003, Jul-Larsen, Madhun et al. 2012).

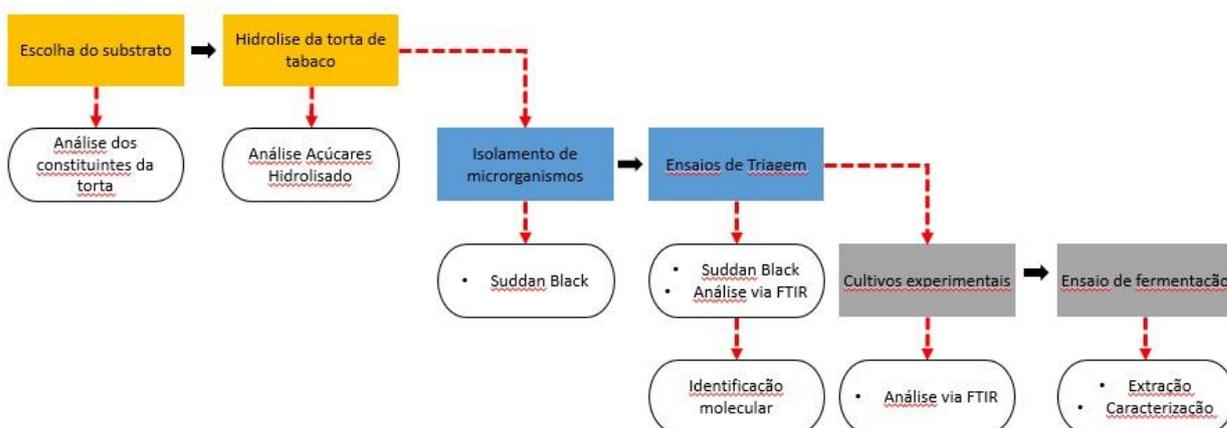
Uma alternativa local que foi implantada é a obtenção de sementes, oriundas do cultivo de tabaco energético, que difere do convencional, para

extração do óleo e posterior beneficiamento. O tabaco energético tem por objetivo maximizar a quantidade de sementes produzidas e não as folhas, obtendo assim maior quantidade de óleo para extração. As sementes de tabaco têm, em média, até 40% de óleo, que pelo método atual de prensagem a frio, consegue extrair até 34% desse total de óleo (Stanisavljević, Veličković et al. 2009, Riça, Moraes et al. 2016, Sunchem 2016).

Até a etapa de prensagem, são gerados 2 tipos de resíduos nesse processo: torta de sementes de tabaco e biomassa. A biomassa, composta de folhas e talos/caules pode ser destinada a confecção de briquetes energéticos, produção de biogás ou destinada a indústria da celulose. A torta de sementes de tabaco pode ser fornecida como complemento a alimentação de animais, devido ao alto índice de proteínas (NC 2016, Sunchem 2016).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Desenho experimental



### 4.2 Justificativa da escolha do resíduo agroindustrial como substrato alternativo para obtenção de P (3-HB)

O resíduo utilizado nesse trabalho foi a torta de sementes de tabaco, oriunda da produção de biodiesel a partir de tabaco energético. Para obtenção do óleo que será processado em biodiesel, as sementes são aquecidas e colocadas em um sistema que extrai o óleo através de pressão e calor. Ao final do processo se obtêm o óleo e dois resíduos: borra oleosa e torta de semente de tabaco.

A torta de sementes de tabaco constitui-se de um granulado de tamanho variado, de cor marrom escura, formando agregados na forma de placas, tendo um odor suave. A torta de sementes de tabaco utilizada foi obtida de várias extrações de óleo de sementes, essas de origem variada, não sendo todas produzidas em um único local.

A borra de tabaco, por sua vez, é constituída de uma mescla de óleo residual do processo de extração e particulado de torta de tabaco. Como a estratégia de cultivo escolhida para obtenção de P (3-HB) foi a metodologia de fermentação submersa, o óleo residual poderia gerar um meio bifásico, com o óleo na camada superior. Essa camada poderia impedir a troca de ar com o meio, o que poderia levar a um decréscimo no oxigênio dissolvido e consequente perda de eficiência nas fermentações.

## 4.2 Processamento e tratamento da torta de tabaco

Como forma de melhor aproveitar o resíduo e disponibilizar os nutrientes, a torta de tabaco foi submetida a um pré-tratamento ácido, utilizado em outros trabalhos para a liberação de açúcares e demais nutrientes presentes (Melo, Santos et al. 2008, Sharmada, Punja et al. 2016). Para a realização da hidrólise ácida, foram pesados 300 g de torta de sementes de tabaco, onde foi adicionada uma solução aquosa de 10% (v/v) de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), sendo então essa mistura levada a autoclave, ocorrendo o processo à 121°C, por 60 minutos. O processo ocorreu em garrafas do tipo Schott, seladas para evitar a perda no volume de solução utilizada.

Após isso, o material resultante da hidrólise foi filtrado, sendo que o material particulado que permaneceu no filtro foi deixado em estufa à 50°C até peso constante. O filtrado obtido da hidrólise teve o pH neutralizado até alcançar valor de pH=7, utilizando solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) na concentração de 8 mol/L e deixado em repouso por 24 horas em geladeira. Ao final desse tempo, o hidrolisado foi novamente filtrado para a remoção do excesso de sais de potássio, essencialmente sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ), formado pela neutralização.

Além da hidrólise da torta de tabaco em estado bruto, foram testadas abordagens para a remoção dos resíduos lipídicos, utilizando como referência trabalhos na área de extração de lipídeos de sementes (Shahidi 2001, Biondo, dos Santos et al. 2015). Para a remoção desses lipídeos, resultantes da extração incompleta de óleo de sementes de tabaco, foram utilizados dois solventes distintos, etanol 98% e uma solução de hexano e acetato de etila (2:1). O tratamento com etanol 98% foi realizado em temperatura ambiente e a 70°C, ambos em sistema fechado com refluxo, para evitar a perda de solvente por evaporação. O tratamento com hexano e acetato de etila foi realizado em ponto de ebulição, cerca de 65°C, igualmente em sistema fechado com refluxo. Após resfriamento, a torta de tabaco foi separada dos solventes por método de filtração, sendo lavada com etanol 70% e água destilada, para remoção dos solventes. A torta de tabaco foi seca a 50°C e então submetida a hidrólise ácida, nos mesmos parâmetros a que a torta de tabaco bruta foi processada.

### **4.3 Análise da composição da torta de tabaco e do hidrolisado de torta de tabaco**

#### **4.3.1 Determinação dos constituintes da torta de tabaco**

Para que o resíduo escolhido pudesse ser utilizado como substrato de baixo custo na obtenção de P (3-HB) primeiramente foi necessária a análise de sua composição, a fim de determinar os nutrientes presentes possíveis de serem utilizados.

A determinação dos constituintes da torta de sementes de tabaco foi realizada através das metodologias de Normas para determinação de proteínas, lipídios e carboidratos, do Instituto Adolfo Lutz (Pregolatto, 1985).

#### **4.3.2 Determinação de açúcares presentes no hidrolisado de torta de tabaco**

Após o pré tratamento da torta de tabaco, que teve por objetivo o aumento na disponibilização dos nutrientes presentes, realizou-se a análise dos açúcares liberados no hidrolisado obtido (Liang, Siddaramu et al. 2010, Kumar, Sen et al. 2013).

Para a análise dos açúcares, uma alíquota de 3 mL do hidrolisado foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi reservado e o *pellet* descartado. O sobrenadante foi então diluído nas escalas 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100, utilizando água destilada. As diluições foram armazenadas em vials e analisadas via HPLC. A curva padrão de glicose, frutose, arabinose, xilose, celobiose, maltose e sacarose foi obtida através de uma escala de diluição dos referidos açúcares, partindo de 0,3 mol/L até 0,0002 mol/L, lidos através das mesmas condições descritas para as amostras.

O aparelho HPLC (SHIMADZU) utilizado era composto por 6 módulos: DGU-20A N/S L20244606893; LC-20AT N/S L20114708996; SIL-20A N/S L20164604613; SPD-M20A N/S L20154704885; CTO-20A N/S L20204605053; CBM-20A N/S L20234609055. A fase móvel utilizada foi água Milli-Q, fluxo 0,6mL/min, detector RID, 25 minutos, temperatura 85°C e coluna Rezex RHM – Monosaccharide H+ (300x7.8mm) Phenomenex.

#### 4.4 Seleção de linhagem microbiana

Para a realização dos ensaios de aproveitamento de resíduo de tabaco na obtenção de P (3-HB) optou-se pelo isolamento de microrganismos selvagens, oriundos da estação de tratamento de efluentes da UNISC (ETE-UNISC). A escolha de isolar microrganismos de um ambiente como esse veio de duas condições as quais se encontram os microrganismos.

Primeiramente, a oferta e o tipo de nutrientes encontrados em sistemas de tratamento de afluentes são muito variados e sem uniformidade, gerando um estresse contínuo aos microrganismos. Segundo, por que, dada a complexidade e diversidade de microrganismos, há uma forte pressão seletiva quanto aos mais capacitados e com estratégias de crescimento mais ágil e dinâmico (Oshiki, Onuki et al. 2013).

Essa é a premissa para o estímulo à acumulação de P (3-HB) pelos microrganismos, como forma de armazenamento de energia (Prieto, Escapa et al. 2015, Wang, Li et al. 2016).

##### 4.4.1 Isolamento de bactérias da ETE-UNISC

O isolamento dos microrganismos foi realizado com a coleta de amostras de efluente em tratamento, recolhido diretamente dos reatores UASB (*Upflow anaerobic sludge blanket*) da ETE-UNISC. Alíquotas de 5 mL foram recolhidas, armazenadas em frascos estéreis. Para o isolamento de colônias com capacidade de crescimento e posterior acúmulo de P (3-HB), a partir de hidrolisado de torta de tabaco, foi utilizado um meio sólido, denominado posteriormente ágar hidrolisado de tabaco. Esse meio sólido foi elaborado a partir de hidrolisado de tabaco e 3 % de ágar bacteriológico, para solidificação do meio, sendo autoclavados separadamente, à 121°C, 1 atm por 15 minutos, e misturados, em partes iguais, ainda quentes para a total homogeneização do meio.

Das alíquotas obtidas junto a ETE-UNISC, inoculou-se 1 mL em 5 mL de caldo BHI (g/L: peptona de carne, 5; cloreto de sódio, 5; extrato de carne, 1,5; extrato de levedura, 1,5; agar bacteriológico, 15) e 1 mL em meio composto de 3 mL de hidrolisado de torta de tabaco e 2 mL de uma solução salina de Bushnell-Hass (1,0 eq de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1,0 eq  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1,0 eq  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 eq  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;

0,05 eq FeCl<sub>3</sub>; pH 7,0), por 48 horas, à 25°C. Decorrido o período, amostras recolhidas com alça bacteriológica foram estriadas por esgotamento em placas de petri contendo ágar hidrolisado de tabaco e incubadas por 48 horas nas mesmas condições anteriores.

As colônias que cresceram no ágar hidrolisado de tabaco foram transferidas para novas placas com o mesmo meio de cultivo, de forma a estimular o seu crescimento. Foram recolhidas amostras para realização da coloração de Gram e coloração de *Sudan Black B*, para identificação da morfologia e acúmulo de inclusões lipofílicas, respectivamente.

A seleção dos microrganismos ocorreu através da análise das inclusões lipofílicas, primeiramente. Essa análise teve caráter eliminatório, uma vez que as bactérias que não apresentaram inclusões lipofílicas foram descartadas das próximas etapas.

Por último, a capacidade de crescimento no meio composto de hidrolisado de torta de sementes de tabaco foi averiguada através do inóculo das cepas nesse meio, analisando a presença de inclusões lipofílicas após um período de 48 horas.

#### **4.4.2 Identificação molecular do isolado selecionado**

Para a identificação do isolado obtido nos ensaios de triagem, que posteriormente foi submetido aos ensaios de produção em bancada de P (3-HB), optou-se pela identificação molecular, através das técnicas de Reação em cadeia da polimerase (PCR) e posterior sequenciamento.

##### **4.4.2.1 Cultivo e extração de DNA**

O isolado foi cultivado previamente em tubos contendo BHI, por 24 horas, à 25°C. Após esse tempo, alíquotas de 5 mL foram transferidas para microtubos, sendo centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e seguiu-se a metodologia de Englen e Kelley (Englen and Kelley 2000), com modificações.

Foi adicionado 300 µL de tampão SET (dodecil sulfato de sódio, EDTA e Tris) e 40 µL de lisozima (100 µg/mL), incubado a 37°C por 60 minutos. Ao final desse tempo o material foi levado à fervura, 100°C, por 4 minutos e então

resfriado a temperatura ambiente. 20 µL de proteinase K (250 µg/mL) foi adicionado, juntamente com 60 µL de SDS 10%, sendo incubado a 55°C por 60 minutos. A mistura foi resfriada em gelo após essa etapa, adicionando na sequência, 500 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), centrifugando à 13.000 rpm por 3 minutos.

A fase orgânica foi transferida para um microtubo limpo, contendo 250 µL de NaCl 5M e 750 µL de isopropanol gelado, sendo centrifugado nas mesmas condições do passo anterior. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 750 µL de etanol 75%, repetindo a centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de DNA deixado secar a temperatura ambiente por 24 horas, sendo preservado em *freezer* a -20°C até o uso.

#### 4.4.2.2 Reação de PCR, sequenciamento e caracterização molecular

O DNA extraído da cepa E10 foi amplificado utilizando os primers 356F (5=ACWCCTACGGGWGGCWGC) e 1064R (5=AYCTCACGRACGAGCTGAC) e protocolo de amplificação (95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; 72°C por 5 minutos), segundo Winsley (Winsley, van Dorst et al. 2012). Os primers, , O material obtido da reação de PCR foi então aplicado em um gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio como agente intercalante, para a verificação da presença de amplificação do material. Como controle positivo foi utilizado DNA de uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* (KPC). Após a verificação da reação, uma alíquota de 25 µL da reação foi processada e purificada para posterior sequenciamento. A purificação foi realizada utilizando uma solução de PEG 20%, composta de 20 g polietileno glicol em 100 ml água ultrapura e adicionado a essa mistura 14,6 g NaCl, sendo a solução autoclavada, 121°C, 1 atm por 15 minutos.

A alíquota de 25 µL da reação foi adicionada em tubos contendo 25 µl da solução PEG 20%, sendo misturado até total homogeneização e posterior incubação a 37°C por 15 minutos. Após essa etapa, a amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado, sendo adicionado ao *pellet* obtido 500µl de etanol 50%, passando por homogeneização. A amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos e o etanol descartado, esperando 1

hora até total evaporação de eventuais resíduos. A amostra seca foi armazenada em *freezer* até o envio para sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado pela empresa Ludwig Biotecnologia, seguindo padrões internos de sequenciamento. A sequência obtida foi submetida a uma análise de alinhamento através da ferramenta web BLAST®, disponível no site do NCBI (NCBI, 2016). Após a análise, o resultado foi comparado com outras sequências de microrganismos que apresentaram maior relação com o isolado, ou seja, mais de 97% de similaridade, foram novamente analisados para refinamento dos dados. Ao final dessa análise, o maior valor de similaridade obtido por uma espécie e o número de sequências dessa mesma espécie, previamente depositadas por outros estudos, foi tomado como sendo o mais provável.

#### **4.5 Triagem de substratos viáveis a produção de PHA via Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Para avaliar a capacidade de acúmulo de PHA nas amostras de E10 em diferentes fontes de carbono, utilizou-se da técnica de FTIR, como demonstrada em outros trabalhos (Kansiz, Billman-Jacobe et al. 2000, Liao, Bin Ahmad et al. 2014, Ansari and Fatma 2016). A cepa E10 foi cultivada em placas de ágar nutriente (g/L: peptona de carne, 5; cloreto de sódio, 5; extrato de carne, 1,5; extrato de levedura, 1,5; agar bacteriológico, 15), adicionado de 1% de distintas fontes de nutrientes e de elementos traço.

Como fontes de carbono foram utilizados amido, glicose, sacarose, xilose e arabinose. As fontes de nitrogênio utilizadas foram  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , peptona e extrato de levedura. Os meios complexos testados foram o hidrolisado de torta de sementes de tabaco e a borra oleosa. Como fonte de lipídeos foi utilizado óleo de sementes de tabaco, glicerol e biodiesel (oriundo do óleo de sementes de tabaco). Além disso, também foi utilizado como substrato Tween 80®.

Como solução de elementos traço utilizou-se 40  $\mu\text{L}$  de uma solução composta por (g/L):  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.25;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2;  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 0.23;  $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 0.2. Os meios de cultivo, contendo os diferentes componentes, foram autoclavados ( $121^\circ\text{C}$  - 15

min.), ajustando-se previamente o pH em  $7\pm 0,2$ . O meio foi dispensado em placas de petri, contendo, cada uma, 10 mL de meio de cultivo.

Para o inóculo de E10 optou-se por utilizar erlenmeyer contendo 25 mL de caldo BHI, cultivado por 24 horas em incubadora orbital (Shaker), a  $28^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm. Ao final desse tempo, o meio foi homogeneizado vigorosamente e uma alíquota de 1,0 mL retirada para avaliação do crescimento da bactéria. Essa alíquota foi lida em espectrofotômetro, modo absorvância, 600 nm. Utilizou-se um inóculo de 0,3 mL para cada placa contendo o ágar nutriente adicionado das distintas fontes de nutrientes e elementos traço.

As placas contendo o inóculo foram cultivadas em estufa,  $28^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas. Ao final desse período de cultivo, utilizou-se uma alça calibrada para retirar uma amostra de cerca de 1  $\mu\text{L}$ , que foi diluída em 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (10 mg em 2 mL de água deionizada).

Dessa solução, contendo as células de E10, utilizou-se 30  $\mu\text{L}$  como amostra, que foi depositada sobre a superfície de probes de aço. As amostras foram secas utilizando ar quente, até que se observa-se a formação de um filme sobre a superfície metálica e levados para análise.

O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro FT-IR/FT-NIR PerkinElmer, modelo Spectrum 400, com leituras entre 400 e 4000 nm, modo DRIFTS.

#### **4.6 Meios de cultivo para ensaios de produção de PHA**

Para os ensaios de produção de PHA a partir da cepa isolada utilizou-se uma solução salina de Bushnell-Haas, acrescida de 5mL/L solução de elementos traço, composta de (g/L):  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.25;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2;  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 0.23;  $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 0.2. A solução salina foi autoclavada ( $121^{\circ}\text{C}$  - 15 min.) separado do substrato escolhido, ajustando-se o pH em  $7\pm 0,2$ . O substrato, previamente autoclavado ( $121^{\circ}\text{C}$  - 15 min.), foi adicionado na proporção adequada aos distintos ensaios.

O cultivo do microrganismo isolado foi testado em três formulações de meio para acumulação de P (3-HB). Primeiramente a cepa E10 foi cultivada em caldo BHI, e as células obtidas transferidas para um meio de cultivo contendo 1 parte

de solução salina e 2 de hidrolisado bruto de torta de tabaco. A segunda abordagem foi realizada com um meio de cultivo inicial (MI), composto de peptona bacteriológica e glicose, 1 g/L, respectivamente. Após um período de 24 horas, foram adicionados 30 mL de hidrolisado bruto de torta de tabaco aos 70 mL de MI onde a cepa E10 foi previamente cultivada. Ainda, foi testado o crescimento da cepa E10 diretamente no hidrolisado bruto de torta de tabaco, sendo adicionados 200 µL da mesma solução de elementos traço anteriormente descrita.

Além disso, foram utilizadas amostras de hidrolisado de torta de tabaco que passou por etapas de remoção de resíduos de lipídeos, cultivando a cepa E10 diretamente nesses meios, suplementados com 200 µL da mesma solução de elementos traço.

#### **4.6 Padronização da técnica de cultivo para obtenção de P (3-HB)**

Primeiramente os isolados foram cultivados em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI por 24h, em estufa, a 28°C, a fim de se obter fontes de inóculo. Após isso, amostras dos cultivos foram analisadas em espectrofotômetro (600 nm, no modo de Transmitância e Absorbância) para averiguar a densidade ótica do inóculo.

O cultivo do microrganismo isolado foi testado em três abordagens distintas. Primeiramente a cepa E10 foi cultivada em caldo BHI, por 24 horas, a 28°C, logo após centrifugando o meio de cultivo, 3000 rpm, 5 minutos, para retirar as células. O *pellet* de células obtido foi previamente lavado com solução salina de Bushnell-Haas e novamente centrifugado, nas mesmas condições anteriores. O *pellet* limpo foi inoculado em meio de cultivo, contendo 1 parte de solução salina e 2 de hidrolisado bruto de torta de tabaco, ou de glicose 2 M, no caso do controle positivo, ocorrendo o cultivo em agitador orbital, 150 rpm, 28°C, por 48 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

Na segunda abordagem testada, alíquotas de 1 mL de inóculo, oriundo do cultivo em tubos com BHI, foram inoculadas em erlenmeyers de 500 mL contendo 70 mL de caldo MI. O cultivo inicial, para o aumento do número de células, foi realizado em agitador orbital, 150 RPM, 28°C, por 24 horas. Alíquotas de 1 mL foram analisadas em espectrofotômetro (600 nm, no modo de

Transmitância) para averiguar o aumento da biomassa dos cultivos. Após esse período de cultivo inicial, foi adicionado aos cultivos 30 mL de hidrolisado bruto de torta de tabaco, ou, no caso do controle positivo, 30 mL de solução de glicose 2 M, em água destilada. O cultivo foi continuado por mais 40 horas, em agitador orbital, 150 rpm, 28°C. O experimento foi realizado em triplicata. Ao final desse tempo, alíquotas foram retiradas para a realização de coloração de *Sudan Black B*. Essa metodologia foi igualmente utilizada para testar o crescimento da cepa E10 em hidrolisados obtidos de torta de sementes de tabaco que passaram por processos de remoção de resíduos lipídicos, sendo que apenas foi alterado a etapa de adição de hidrolisado aos meios.

Além disso, foi testado o cultivo direto em hidrolisado bruto de torta de tabaco. Para isso, foi inoculado 1 mL do inóculo, oriundo do cultivo prévio em BHI, em 100 mL de hidrolisado bruto de torta de tabaco, suplementado com 200 µL da mesma solução de elementos traço, ocorrendo o cultivo em erlenmeyers de 500 mL, em agitador orbital, 150 rpm, 28°C, em duas faixas de tempo, 48 e 36 horas, respectivamente. Ambos os experimentos foram realizados em triplicata. Ao final desse tempo, alíquotas foram retiradas para a realização de coloração de *Sudan Black B*.

O método que obteve o melhor desempenho, averiguado pela presença de inclusões lipofílicas, foi repetido e teve amostras de 5 mL recolhidas a cada 12h para as análises propostas. Ao final do experimento, os cultivos foram centrifugados e a biomassa obtida separada do meio de cultivo. Ambos foram congelados, para a extração do P (3-HB) obtido ao final do cultivo e análise do meio restante, respectivamente.

## **4.7 Análise das amostras**

### **4.7.1 Visualização dos grânulos de PHA**

Para a visualização dos grânulos intracelulares de PHA foi utilizada a técnica de coloração com *Sudan Black B* (Williamson and Wilkinson 1958). Uma alçada do material colhido nos distintos experimentos foi depositada sobre uma lâmina de vidro limpa, deixando-se evaporar, onde foi adicionado 500 µL de solução de Sudan Black 3% (p/v), em solução de álcool etílico 70%, deixando repousar por 20 minutos. Após isso, a lâmina foi lavada com xilol, água destilada e contracorada com 1 mL de fucsina ácida, por 30 segundos. O excesso de

corante foi removido com água destilada e deixada secando a temperatura ambiente. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Nikon®, modelo Eclipse E2000®, no aumento de 1000x, sendo fotografadas com o auxílio de uma câmera Nikon® D5000.

#### **4.7.2 Densidade Ótica**

Para determinação da curva de crescimento, foram separadas alíquotas de 1 mL de cada tempo dos cultivos, lidas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 600 nm. Os resultados foram tabulados para a determinação da curva de crescimento da cepa testada.

#### **4.7.3 Extração do PHA**

Para a extração de PHA foi utilizada a metodologia adaptada de Divyashree e Shamala (Divyashree and Shamala 2010). A biomassa obtida dos cultivos, submetida a um processo de extração com digestão, utilizando hipoclorito de sódio (solução 50% em água destilada), e uma proporção de 5 partes de hipoclorito para cada 1 parte de biomassa, sob temperatura constante de 30°C, em banho termostático, por 15 minutos.

Após isso, o material resultante da digestão foi transferido para um funil de separação, onde foi adicionado 5 mL de clorofórmio, seguido de uma homogeneização forçada da mistura. A fase orgânica foi separada em funil de separação. Repetiu-se o procedimento repetido com outros 5 mL de clorofórmio.

As fases orgânicas obtidas foram mescladas e transferidas para funil de separação limpo, sendo lavadas com água destilada por 5 vezes, para total remoção do hipoclorito de sódio e outras impurezas da amostra. Após o procedimento de lavagem, a fase orgânica foi separada e a água residual removida com o auxílio de  $MgSO_4$  anidro.

O material obtido foi então filtrado e armazenado em tubos até o momento da análise. Algumas amostras foram recristalizadas utilizando 1 parte de éter de petróleo para cada 10 partes do polímero diluído em clorofórmio (fase orgânica), evaporando o solvente até que se obtivesse o polímero seco, depositado na forma de um fino filme.

#### **4.7.4 Caracterização do PHA obtido via Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

A composição do polímero obtido foi analisada através da metodologia adotada por Vishnuvardhan (Vishnuvardhan Reddy, Thirumala et al. 2009). As amostras foram solubilizadas em solução de  $\text{CDCl}_3$  (Clorofórmio deuterado) e analisadas em espectro de RMN (400MHz, H1), a 27°C. A área dos picos foi determinada pela integração do espectro utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna, comparada com espectros já validados e relacionados ao polímero PHA (Doi, Kawaguchi et al. 1989).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Processamento e tratamento da torta de tabaco**

A torta de sementes de tabaco que foi submetida a hidrólise ácida apresentou uma alteração no seu aspecto, antes do processamento a torta bruta estava compactada na forma de escamas e grumos, fortemente aderidos. Após a hidrólise essa conformação foi alterada para uma dispersão de grânulos menores, formando uma borra (Figura 07). O hidrolisado obtido logo após a retirada da autoclave apresentou coloração semelhante à da torta em estado bruto, marrom escuro, opaco.



Figura 08. Registro da torta de sementes de tabaco logo após ter sido submetida a hidrólise ácida, apresentando uma alteração em seus aspectos visual (de grumos e escamas para uma espécie de borra).

Após o resfriamento do hidrolisado, o mesmo foi submetido a filtração, utilizando filtro de papel, para a remoção do excesso de particulado em suspensão, de forma a facilitar o processo de neutralização. Ao final da filtração, pode-se observar a formação de uma camada oleosa muito delgada sobre a borra obtida do processo de hidrólise, possivelmente atribuída ao resíduo lipídico ainda presente.

Durante o processo de neutralização do hidrolisado com a adição de KOH a coloração se alterou levemente, ficando o hidrolisado mais turvo e opaco. Após o armazenamento em geladeira por um período de 12 horas, observou-se a formação de pequenos cristais (Figura 08) que se depositavam no fundo, atribuídos à reação de  $H_2SO_4$  com KOH. Esses cristais foram removidos com nova filtração a frio.



Figura 09. Hidrolisado de torta de sementes de tabaco após a neutralização com KOH, onde ocorreu a formação de sais (seta).

Quando o hidrolisado foi submetido a neutralização com NaOH o surgimento de cristais ao final do processo foi menor e a cor do hidrolisado ficou mais turva e escura. Cabe ressaltar que não houve crescimento das cepas em meio hidrolisado onde se utilizou NaOH para realizar a neutralização.

Mesmo que o custo de NaOH seja mais baixo que o de KOH (a nível de reagente analítico) e que sua utilização leva a uma menor formação de cristais, observa-se uma menor tolerância pelas bactérias utilizadas à presença de sais

de sódio, nesse caso, mais provavelmente,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , em comparação com o formado quando utilizado  $\text{KOH}$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

Segundo o Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (Bergey, Whitman et al. 2009), algumas bactérias como *Bacillus pumilus*, por exemplo, apresentam tolerância moderada a ambientes halófilos, com crescimento em até 10% de  $\text{NaCl}$ . Os dados obtidos da análise do sequenciamento da bactéria E10, que serão discutidos mais à frente no trabalho, permitiram a identificação desse isolado como sendo uma cepa de *Bacillus pumilus*, confirmando essa informação.

Ainda, de acordo com García e colaboradores (García, López et al. 2013), concentrações de 2 a 6 g/L de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  demonstraram ação inibitória no crescimento de *C. necator*. Quando na presença de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , esse efeito foi notado a partir da concentração de 20 g/L. Supõe-se que a neutralização com  $\text{NaOH}$  possa formar  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , causando algum tipo de estresse osmótico na bactéria.

A partir das observações realizadas durante o processamento da torta de sementes de tabaco, optou-se por testar uma metodologia de extração do resíduo lipídico da torta bruta, como forma de analisar a importância desse resíduo no meio de cultivo.

Após o processo de extração dos resíduos lipídicos com Álcool e com a solução de Hexano/Acetato de Etila, a torta, denominada então desengordurada, foi submetida aos mesmos processos de hidrólise que a torta bruta (com presença dos resíduos lipídicos). Foi obtido ao final da hidrólise um líquido mais escuro, mais translúcido e com menor formação de particulado em suspensão.

Porém, quando submetidas a cultivos teste, de forma a avaliar a possibilidade de emprego do substrato, não houve uma boa resposta de crescimento da cepa em nenhum dos meios desengordurados, tanto com etanol como com a solução de hexano/acetato de etila. Com isso, a ideia de remover os resíduos lipídicos foi descartada, entendendo-se que eles têm alguma importância expressiva como fonte energética para a bactéria utilizada.

Segundo os dados obtidos por Verlinder e colaboradores (Verlinden, Hill et al. 2011), sobre o aproveitamento de óleo doméstico usado, o rendimento

energético de substratos de origem lipídica é de grande interesse para a obtenção de P (3-HB). Ciesielski e colaboradores (Ciesielski, Mozejko et al. 2015) abordam diversos óleos vegetais com possibilidade de emprego para a produção de PHA, ressaltando que a obtenção de copolímeros é facilitada quando utilizado óleos como substrato.

Ainda, é sugerido o aproveitamento de subprodutos da obtenção de tais óleos como fontes de geração de energia para alimentar a demanda energética de todo o processo, aumentando assim a eficiência e diminuindo os custos de produção (García, López et al. 2013).

## **5.2 Análise da composição da torta de tabaco e do hidrolisado de torta de tabaco**

### **5.2.1 Determinação dos constituintes da torta de tabaco**

Como forma de avaliar a empregabilidade da torta de sementes de tabaco, para a obtenção de PHA, bem como a sua composição centesimal, optou-se pela metodologia do Instituto Adolfo Lutz (Pregnoatto 1985). As amostras submetidas a análise apresentaram valores de  $4,51 \pm 0,56$  para cinzas,  $31,94 \pm 4,87$  para proteínas,  $27,05 \pm 5,30$  para lipídeos e  $36,48 \pm 9,04$  para carboidratos. Destaca-se a elevada quantidade de lipídeos e proteínas, o que, em conjunto com os carboidratos, caracteriza o resíduo utilizado como de grande potencial energético para fermentações microbianas.

Os valores obtidos na caracterização centesimal demonstram que o resíduo empregado para a obtenção de PHA tem um grande potencial energético, com composição variada, apresentando altos teores de carboidratos e lipídeos, fontes primárias para as rotas de síntese de PHAs (Chen, König et al. 1991, Liebergesell, Hustede et al. 1991, Prieto, Escapa et al. 2015).

A determinação por vias colorimétricas é dificultada no caso do hidrolisado de torta de sementes de tabaco, pela coloração acentuada e opacidade do meio, o que dificulta a observação e medição com confiabilidade.

As análises para carboidratos apresentaram o maior desvio padrão, devido ao fato de que a maior parte desses estava na forma de fibras e pouco mais de 3% estavam na forma de açúcares livres e fermentáveis.

Mesmo que o resíduo passe por uma etapa de hidrólise, o que objetiva a disponibilização desses carboidratos para o microrganismo, uma grande quantidade de fibras pode ser um agravante, visto que a total conversão dificilmente ocorre sem tratamentos enzimáticos (Liang, Siddaramu et al. 2010, Gupta 2015).

Além disso, a quantidade de fibras e carboidratos na semente de tabaco (em estado bruto) não é muito elevada, sendo superada pelo material de reserva da semente, nesse caso, lipídeos, principalmente ácido linoleico (Maestri and Guzmán 1993).

Em uma análise dos constituintes do óleo de sementes de tabaco, Mukhtar e colaboradores (Mukhtar, Ullah et al. 2007) constataram a predominância de ácido linoleico (71.63%), seguido de ácido oleico (13.46%) e ácido palmítico (8.72%). Sendo assim, do ponto de vista fisiológico, acredita-se que o papel dos lipídeos no substrato escolhido tem maior relevância que os carboidratos.

### **5.2.2 Determinação de açúcares presentes no hidrolisado de torta de tabaco**

Como forma de analisar a viabilidade de emprego do hidrolisado de torta de sementes de tabaco foi crucial a análise dos açúcares presentes no hidrolisado, uma vez que os carboidratos são uma das fontes principais utilizadas pelas bactérias para a síntese e acúmulo de PHA. Primeiramente foi realizado a injeção de padrões conhecidos de açúcares, para a obtenção de uma curva padrão de quantificação.

Após a obtenção da curva dos açúcares o hidrolisado foi injetado na forma bruta, porém não houve leitura exata, com um componente aparecendo em 7,5 minutos, impedindo a verificação dos demais compostos. Optou-se pela diluição das amostras em água destilada (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100) para a análise via HPLC. A partir da curva foi possível determinar as concentrações de glicose e xilose, 0,02067 g/L e 0,00779 g/L, respectivamente, na diluição 1:2. Cabe ressaltar que esse valor encontrado é muito baixo quando se considera o emprego de resíduos agroindustriais na obtenção de PHA, tomando como base

outros trabalhos (Naranjo, Cardona et al. 2014, Vasco 2014, Getachew and Woldesenbet 2016).

Como o perfil lipídico do hidrolisado não foi analisado, este é o único componente do meio que foi quantificado, porém, como obteve-se PHA ao final dos cultivos, acredita-se que outros componentes serviram como fonte energética para a bactéria.

Além disso, observou-se uma redução nos valores de açúcares encontrados (Figura 12), com uma redução de glicose e xilose.

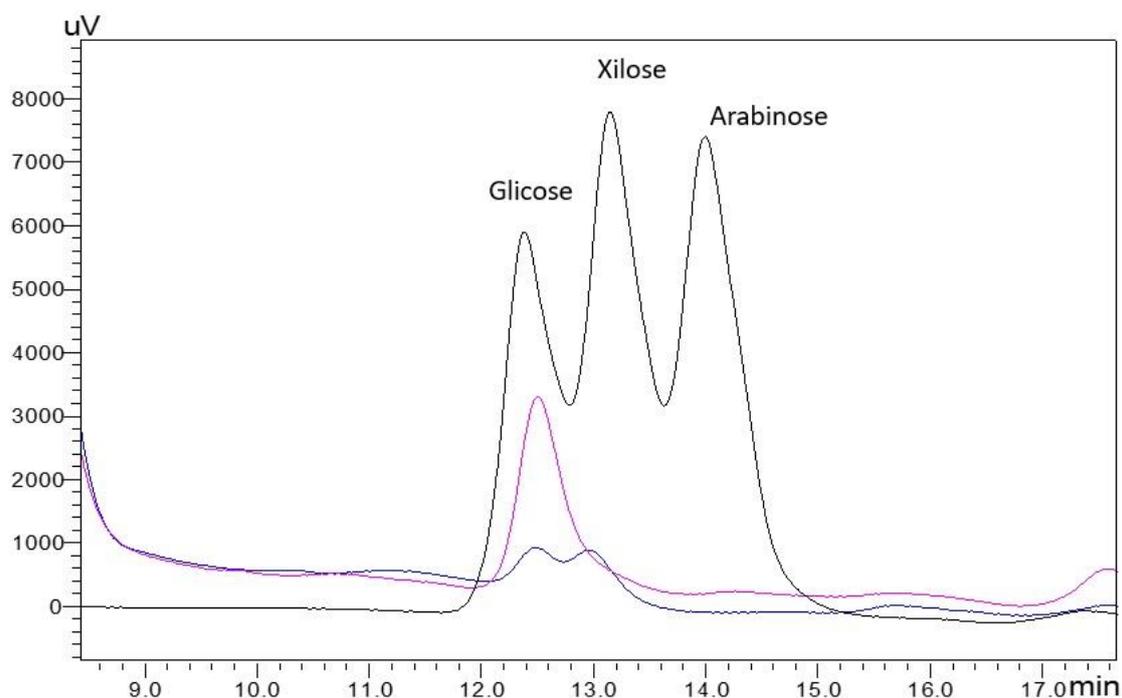


Figura 10. Análise do hidrolisado de torta de sementes de tabaco, antes (rosa) e após o cultivo (azul), para a verificação e quantificação dos açúcares presentes nas amostras, frente os padrões (preto).

Acredita-se que a ausência do sinal para xilose na amostra antes do cultivo (Figura 12) esteja atribuída ao fato de que sua quantidade presente na amostra seja muito pequena, em comparação com glicose. Num primeiro momento esse sinal foi “mascarado” pelo sinal mais forte da glicose, formando um único pico de leitura. Após o cultivo e com o consumo desses componentes pela bactéria, foi possível observar a presença de xilose de forma mais clara.

Um dos fatores que dificultaram a análise a partir de HPLC para a quantificação dos açúcares no meio foi a formação de sal de sulfato de potássio, que tinha um sinal muito mais forte que os açúcares. A ocorrência desse sal em

grande quantidade na amostra, devido a concentração necessária de KOH para neutralizar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, claramente teve impacto negativo para as análises.

Considerando o aproveitamento desse resíduo como um substrato para a obtenção de PHA, outras metodologias poderiam ser abordadas para uma melhora no rendimento da conversão das fibras presentes em carboidratos fermentáveis pela bactéria. Uma das alternativas seria o uso de fungos em uma etapa prévia, como forma de realizar a quebra dessas fibras, disponibilizando os carboidratos, que poderiam passar para um processo físico-químico posterior para completa digestão do material (Shirkavand, Baroutian et al. 2016).

Além disso, foi abordado apenas o emprego da torta de sementes de tabaco, sendo que a borra oleosa não foi utilizada, constituindo outro resíduo formado na extração do óleo. Essa borra oleosa pode passar por um sistema de filtração, para remoção dos sólidos ou então por extração com solventes orgânicos, sendo posteriormente encaminhada para tratamento que visem a liberação dos carboidratos presentes.

### **5.3 Microrganismo selecionado**

#### **5.3.1 Isolamento de bactérias da ETE-UNISC e caracterização do isolado**

Através da metodologia proposta, foi possível obter 23 isolados, onde apenas um dos isolados demonstrou a presença de inclusões lipofílicas, sugestivas da presença de PHA. A bactéria isolada que teve crescimento no hidrolisado de torta de sementes de tabaco e posterior acúmulo de grânulos de PHA, denominada então E10, foi cultivada inúmeras vezes, de forma a obter-se uma cepa pura, com afinidade pelo meio de cultivo utilizado. Através dessa metodologia foi possível a sua caracterização, primeiramente morfológica e posteriormente genética.

O isolado E10 tem formato baciliforme, Gram positivo, formador de esporos, apresentando grânulos de natureza lipofílica, evidenciados através de coloração de *Sudan Black B*, sendo indicativos de acúmulo de PHA. Além disso, o isolado E10 teve crescimento ótimo em meio com pH variando de 6 a 7, temperatura de 28°C a 30°C. Demais características relacionadas ao isolados estão descritas na tabela 04.

Tabela 04. Características mais importantes descritas para a espécie *Bacillus pumilus* Meyer and Gottheil 1901.

<b>Características de <i>Bacillus pumilus</i> Meyer and Gottheil 1901</b>	
<b>Morfológicas</b>	
Célula	célula em formato de bastão, móvel, 0,6-0,7 por 2,0-3,0 µm
Colônia	formato irregular, rugosa, com margens irregulares, cor branca à clara, opaca
Esporo	cilíndricos a elipsoidais, subterminais, esporângio não dilatado
<b>Fisiológicas</b>	
pH	6 até 9,5
Temperatura	de >5-15°C a 40-50°C
Crescimento em NaCl	até 10%
Catalase	positivo
Voges–Proskauer	positivo
<b>Hidrólise</b>	
Caseína	positivo
Esculina	positivo
Gelatina	positivo
Citrato como fonte de carbono	sim
Fenilalanina	não reduzida
Nitrato	não reduzido
Fermentação de glicose	produz ácido
<b>Outras</b>	
Patogenicidade	sim, humanos e outros grupos
Conteúdo G+C	39-46%
Cepas Tipo	NCDO 1766, ATCC 7061, DSM 27, JCM 2508, NCIMB 9369.

Fonte: Alguns dados observados pelo autor e demais compilados do Manual de Bacteriologia Sistêmica de Bergey's (Bergey, Whitman et al. 2009)

O isolado E10 demonstrou ter boa tolerância a armazenamento por longos períodos em geladeira, sendo facilmente retirado do estado de dormência induzido por baixas temperaturas, sem perder as características fermentativas desejadas.

### 5.3.2 Identificação molecular do isolado selecionado

#### 5.3.2.1 Cultivo e extração de DNA

O DNA que foi obtido da alíquota de 5 mL de um cultivo de 24 horas de E10, após a extração e ressuspensão em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8,0), foi quantificado via espectrometria, utilizando o

aparelho NanoDrop 2000C ® UV-Vis Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific), de forma a avaliar a pureza, concentração e presença de contaminantes. Obteve-se a concentração inicial de 1200 ng/µL, com uma relação para 260/280 nm de 1,879 e 260/230 nm= 2,092. O DNA obtido foi diluído até ser obtida a concentração de 100 ng/µL. Todas as outras amostras de DNA tiveram sua concentração ajustada para 100 ng/µL.

### 5.3.2.2 Reação de PCR, sequenciamento e caracterização molecular

Os produtos da PCR foram analisados quanto a sua qualidade de amplificação via eletroforese em gel de agarose 1,5%, com aplicação de voltagem constante de 50 V, por 2 horas. Ao final desse tempo o gel foi analisado em um transiluminador LED (KASVI), que emite luz azul no comprimento de 470 nm, sendo retiradas fotografias para registro (Figura 15.)

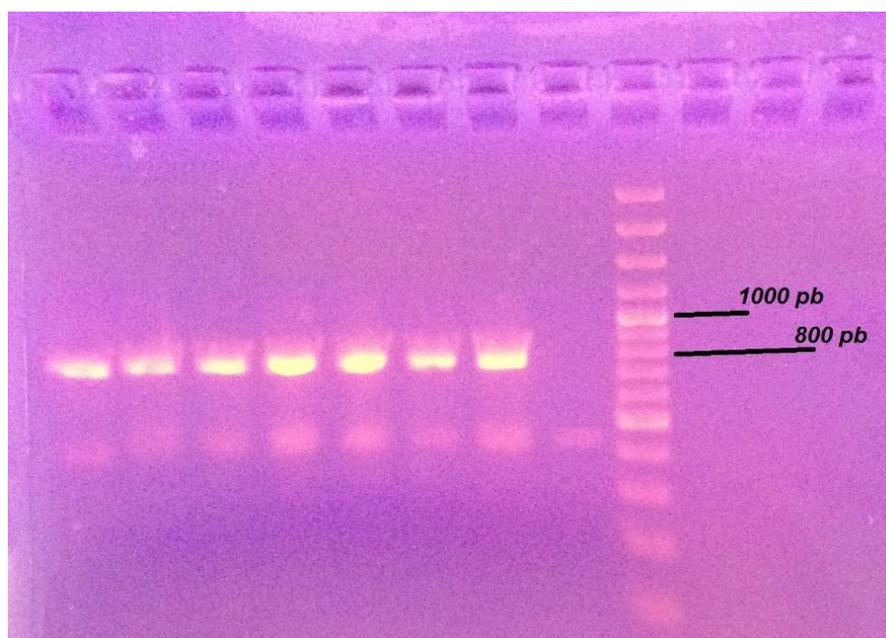


Figura 11. Gel de agarose 1,5% onde foram aplicadas as amostras para verificação da qualidade da amplificação para os primers selecionados aonde, da esquerda para a direita, as amostras são: controle positivo (KPC), E10, SN1, SNx, C1, EC (*Escherichia coli*), SA (*Staphylococcus aureus*) controle negativo (sem amplificação).

O restante do material amplificado de E10 foi submetido ao protocolo de purificação e submetido a sequenciamento terceirizado (ACTGene Análises Moleculares), utilizando um sequenciador ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para obtenção da sequência do isolado. A sequência obtida, com 725 nucleotídeos, foi submetida a alinhamento e checagem de similaridade utilizando a ferramenta web BLAST® ((NCBI) 2002), frente ao banco

de genomas disponíveis para o domínio Bacteria. A mesma análise foi repetida por 3 vezes.

Ao total, foram obtidos 16 hits (alinhamentos) com *Bacillus pumilus*, 8 para *Bacillus altitudinis*, 8 para *Bacillus sp.*, e 1 para *Bacillus safensis*. Segundo Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Bergey, Whitman et al. 2009), *B. pumilus*, *B. safensis* e *B. altitudinis* tem estreita relação quanto as suas regiões 16S, com uma alta similaridade, o que se observa pelo número de alinhamentos obtidos com tais espécies em outros trabalhos (Liu, Lai et al. 2013, Yuan and Gao 2015, Hao, Li et al. 2016, Nelson, Castro et al. 2016).

Além disso, consultando material anexo ao Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (Bergey, Whitman et al. 2009), referente ao gênero *Bacillus*, as análises filogenéticas (Figura 16) e descrições bioquímicas e morfológicas, apontam que de fato o isolado denominado E10 faz parte do gênero *Bacillus*, se tratando de *Bacillus pumilus* Meyer and Gottheil 1901.

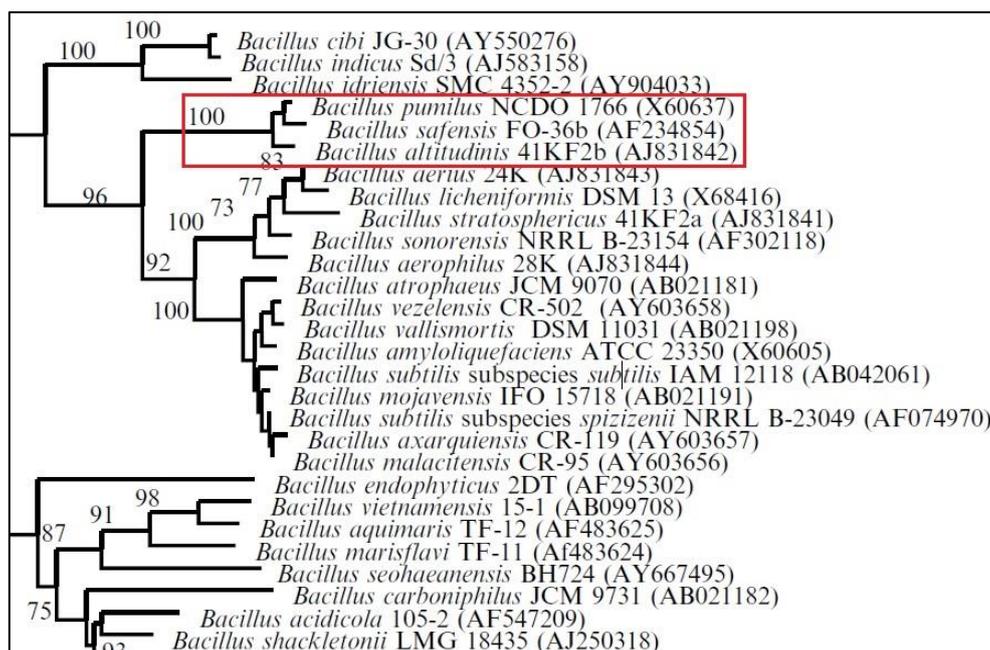


Figura 12. Árvore filogenética das espécies de *Bacillus* com base em sequências de genes 16S rRNA, onde o alinhamento de sequências foi realizada utilizando ClustalX, Bioedit e Treecon. \*Valores de Bootstrap superiores a 70% são apresentados (com base em 1000 repetições) nos pontos de ramificação. \*\*Números de acesso de sequência para cada linhagem são dadas entre parênteses. Fonte: (Bergey, Whitman et al. 2009).

Segundo a análise feita por Parvathi e colaboradores (Parvathi, Krishna et al. 2009), que caracterizaram isolados de *B. pumilus* molecular e bioquimicamente, as amostras obtidas apresentavam elevada atividade de

lipases e proteases. Essa informação corrobora com as observações realizadas quanto ao ótimo crescimento da cepa E10 no meio escolhido, rico em lipídeos e proteínas. É possível encontrar essa espécie associada até mesmo com áreas de solo contaminadas com hidrocarbonetos, onde são degradadores ativos dessa substância (Hao, Li et al. 2016).

Outras características para a espécie são a sua relação com plantas, tanto na forma de patógeno (Yuan and Gao 2015) como promotor do crescimento (Gutiérrez-Mañero, Ramos-Solano et al. 2001). O trabalho de Kang e colaboradores (Kang, Shen et al. 2013) explorou um possível mecanismo que pode explicar a relação entre a promoção do crescimento de plantas, induzido por *B. pumilus*, através da modulação e regulação com a microbiota nativa presente no solo. Diferentemente, Gutiérrez-Mañero e colaboradores (Gutiérrez-Mañero, Ramos-Solano et al. 2001), aborda a produção de giberelinas como possível fator de estímulo ao crescimento vegetal.

Além de patógeno em vegetais, existem relatos de *B. pumilus* presente em humanos (Tena, Martinez-Torres et al. 2007, Grass, Bierbaum et al. 2016, Shivamurthy, Gantt et al. 2016), causando sérias infecções. Ainda, a presença deste em fezes corvos (*Corvus brachyrhynchos*) (Nelson, Castro et al. 2016), incluso identificada como uma cepa multirresistente a antibióticos.

Do ponto de vista de empregabilidade industrial e na biotecnologia, este gênero se destaca pela variedade de compostos possíveis de serem obtidos. Na área médica Mahmoud e colaboradores (Mahmoud, Abdelmoneim et al. 2016) trabalharam com a obtenção de nanopartículas de prata, com atividade nematicida e antimicrobiana. O trabalho de Naruse e colaboradores (Naruse, Tenmyo et al. 1990) foi o primeiro a descrever a Pumilacidina, composto produzido apenas por esta espécie de *Bacillus*, com atividade antiviral, além de características que se assemelham a biosurfactantes.

Outros produtos que se podem obter de *B. pumilus* são enzimas, como proteases (Fellahi, Chibani et al. 2016), com emprego como aditivos em detergentes (Baweja, Tiwari et al. 2016), pigmentos celulares (Di Luccia, Riccio et al. 2015), emprego em biorremediação de áreas contaminadas (Hao, Li et al. 2016) e produção de moléculas para indústria alimentícia (Hua, Ma et al. 2007).

#### 5.4 Triagem de substratos viáveis a produção de PHA via Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A partir da bactéria isolada e devidamente caracterizada, denominada então E10, *Bacillus pumilus*, foi avaliado o acúmulo de PHA a partir de vários substratos, de forma isolada (Figura 13). Essa caracterização é necessária para compreender melhor o metabolismo da bactéria frente a diferentes substratos visando a obtenção de PHA.

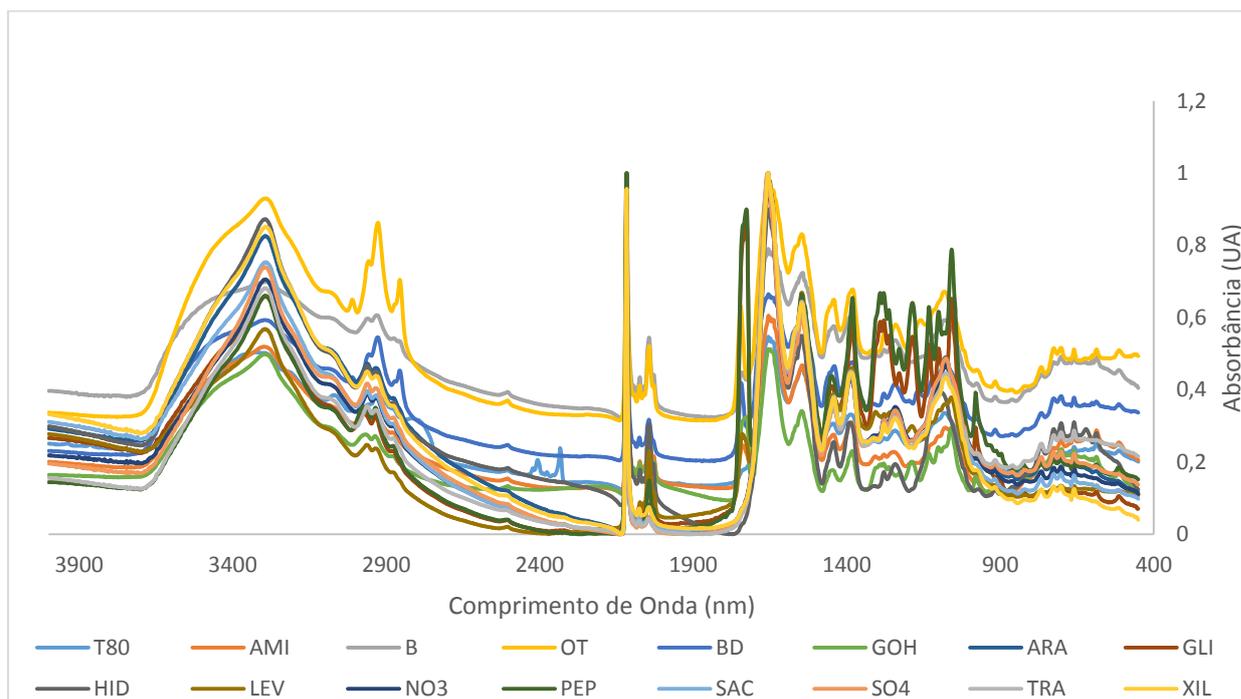


Figura 13. Espectros de absorbância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10 cultivada em ágar nutriente, suplementado com fontes energéticas distintas, para avaliar o perfil de acúmulo de PHA. T80= Tween 80; AMI= Amido; B= borra; OT= óleo de tabaco; BD= biodiesel; GOH= glicerol; ARA= arabinose; GLI= glicose; HID= hidrolisado; LEV= extrato de levedura; NO3= nitrato de amônia; PEP= peptona; SAC= sacarose; SO4= sulfato de amônia; TRA= solução de elementos traço; XIL= xilose.

Observa-se que apenas poucos compostos apresentaram bandas de absorção no comprimento de onda característico para ácidos carboxílicos (1700-1730), que representa o grupo C=O dos ácidos alifáticos saturados (Silverstein, Webster et al. 2006, Kriz, Pavia et al. 2010), como é o caso dos distintos PHAs (Shah 2012). Além disso, os valores das regiões do espectro compreendidas entre 1500 nm e 1600 nm, amida primária e secundária (Silverstein, Webster et al. 2006, Kriz, Pavia et al. 2010), respectivamente, são pontos tidos como referência para avaliação da biomassa microbiana.

Pode-se comparar esses dois pontos de referência com a banda em ~2100 nm, atribuída ao padrão interno de  $K_4[Fe(CN)_6]$ , como uma medida de comparação entre a biomassa acumulada da bactéria e do PHA, caso o mesmo tenha sido obtido (Figura 14).

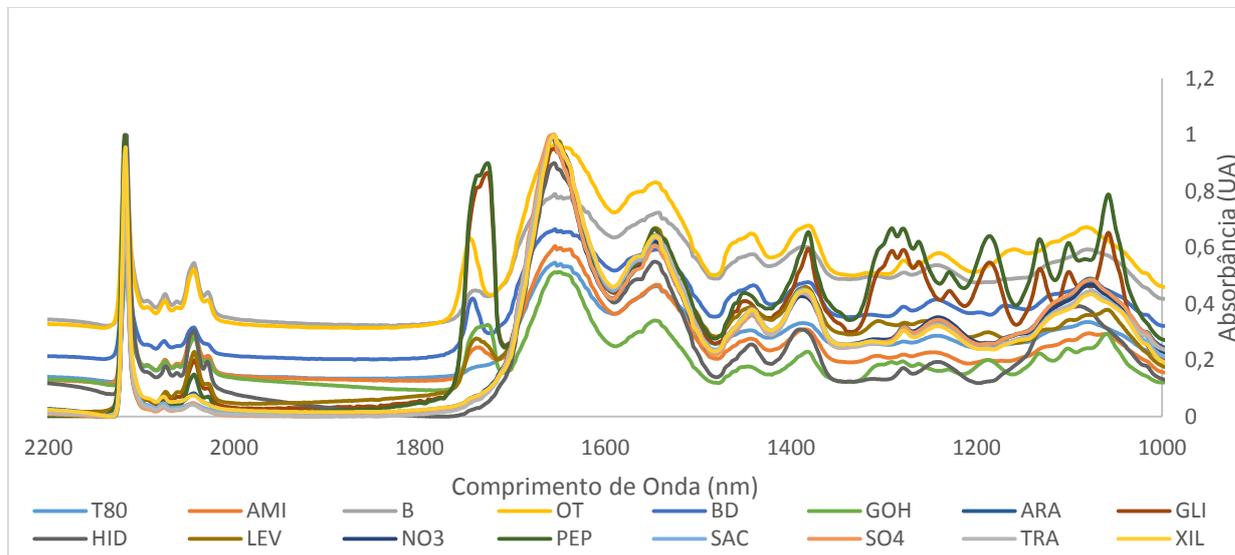


Figura 14. Espectros de absorvância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10, com detalhe nas regiões de 1000 nm até 2200 nm, onde se visualiza claramente o perfil de absorção em ~1720 nm em apenas algumas amostras. T80= Tween 80; AMI= Amido; B= borra; OT= óleo de tabaco; BD= biodiesel; GOH= glicerol; ARA= arabinose; GLI= glicose; HID= hidrolisado; LEV= extrato de levedura; NO3= nitrato de amônia; PEP= peptona; SAC= sacarose; SO4= sulfato de amônia; TRA= solução de elementos traço; XIL= xilose.

Comparando os resultados por grupo de substrato utilizado como suplementação ao meio, optou-se por subdividir os resultados em 4 grupos, sendo eles carboidratos, lipofílicos, nitrogênio e complexos. O grupo dos carboidratos reúne amido, sacarose, glicose, arabinose e xilose. Lipofílicos reúne os substratos óleo de tabaco, biodiesel, glicerol e Tween 80.

Nitrogênio agrupa os substratos testados como fontes de nitrogênio, como é o caso de Peptona, extrato de levedura, sulfato de amônia e nitrato de amônia. Por último, complexos agrupa o hidrolisado de torta de sementes de tabaco e a borra oleosa da extração do óleo do tabaco.

Do grupo que reúne os carboidratos, foi observado a presença de absorção na área correspondente a PHA apenas nas amostras suplementadas com amido ou glicose (Figura 15, Figura 16).

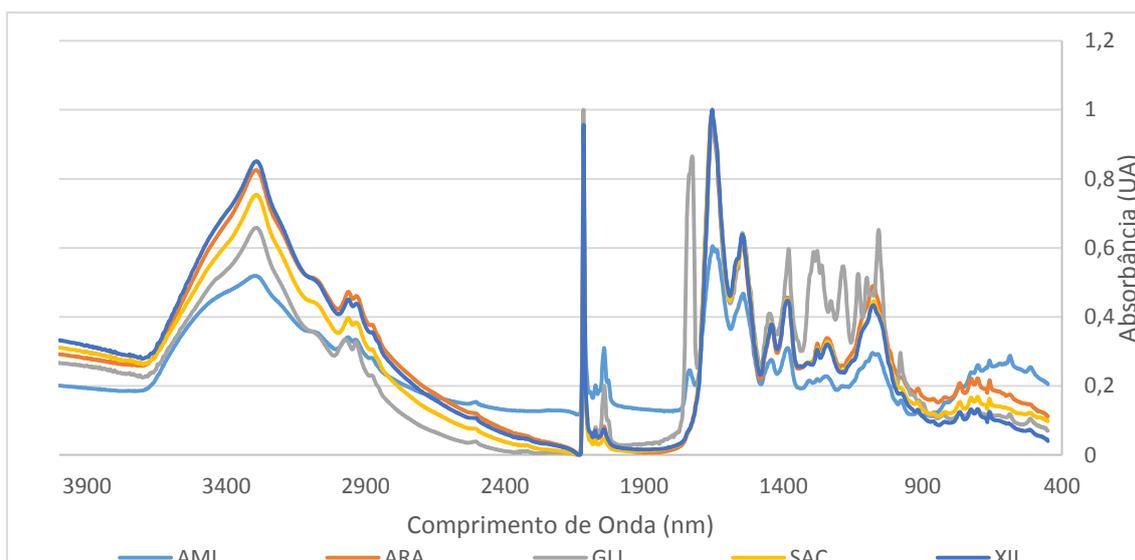


Figura 15. Espectros de absorvância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10 suplementada com diferentes fontes de carboidratos. AMI= Amido; B= borra; ARA= arabinose; GLI= glicose; SAC= sacarose; XIL= xilose.

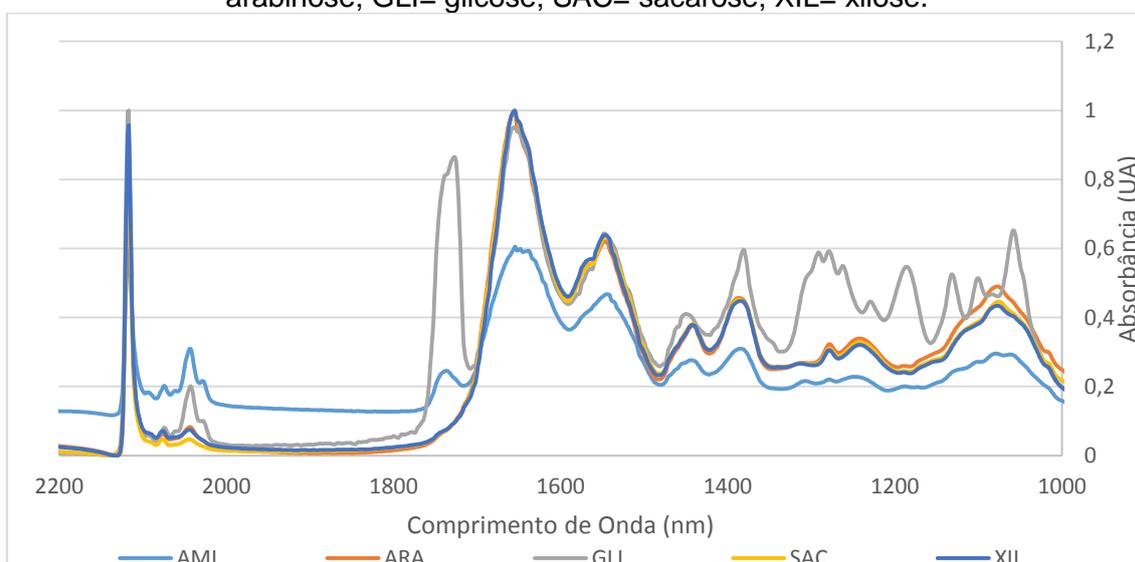


Figura 16. Espectros de absorvância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10, com detalhe nas regiões de 1000 nm até 2200 nm. AMI= Amido; B= borra; ARA= arabinose; GLI= glicose; SAC= sacarose; XIL= xilose.

A partir dessas constatações fica claro que a bactéria em questão tem preferência para aproveitamento dessas duas fontes, glicose e amido, como fontes primárias para a síntese e o acúmulo de PHA. A preferência para utilização de glicose já foi descrita para outras bactérias (Agnew, Stevermer et al. 2012, Prieto, Escapa et al. 2015, Tsuge, Hyakutake et al. 2015), e o amido igualmente (Almeida, Fávaro et al. 2012).

Estes dados vão de encontro com o que já está descrito para *B. pumilus* (Bergey, Whitman et al. 2009), tanto para o crescimento exponencial da bactéria

como para o acúmulo de PHA, como o P (3HB) (Gutiérrez-Mañero, Ramos-Solano et al. 2001, Parvathi, Krishna et al. 2009). Usualmente, grande parte dos estudos que abordam o aproveitamento de carboidratos para a obtenção de PHA tem como substrato inicial a glicose (Haywood, Anderson et al. 1990, Narayanan and Ramana 2012, Prieto, Escapa et al. 2015, Zhang, Chen et al. 2015).

Aparentemente a glicose tem via facilitada de aproveitamento na conversão bioquímica em PHA, especialmente P (3HB), o principal monômero utilizado por grande parte dos microrganismos. A glicose necessita ser convertida em acetil-CoA, o que, dependendo da bactéria e da rota metabólica ativada, pode demandar apenas algumas enzimas e pouca energia (Chien 2008, Beeby, Cho et al. 2012). O acetil-CoA então é convertido a monômeros de ácido 3-hidroxibutírico com a ação de apenas 3 enzimas (Anderson and Dawes 1990, Valentin 1995, Zhang, Chen et al. 2015), sendo uma das rotas mais energeticamente favoráveis para as bactérias, quando em presença de carboidratos fermentáveis.

Quanto a fonte preferencial de nitrogênio, acrescida ao ágar nutriente, peptona e extrato de levedura, respectivamente, foram as únicas fontes utilizadas durante o acúmulo de PHA (Figura 17, Figura 18).

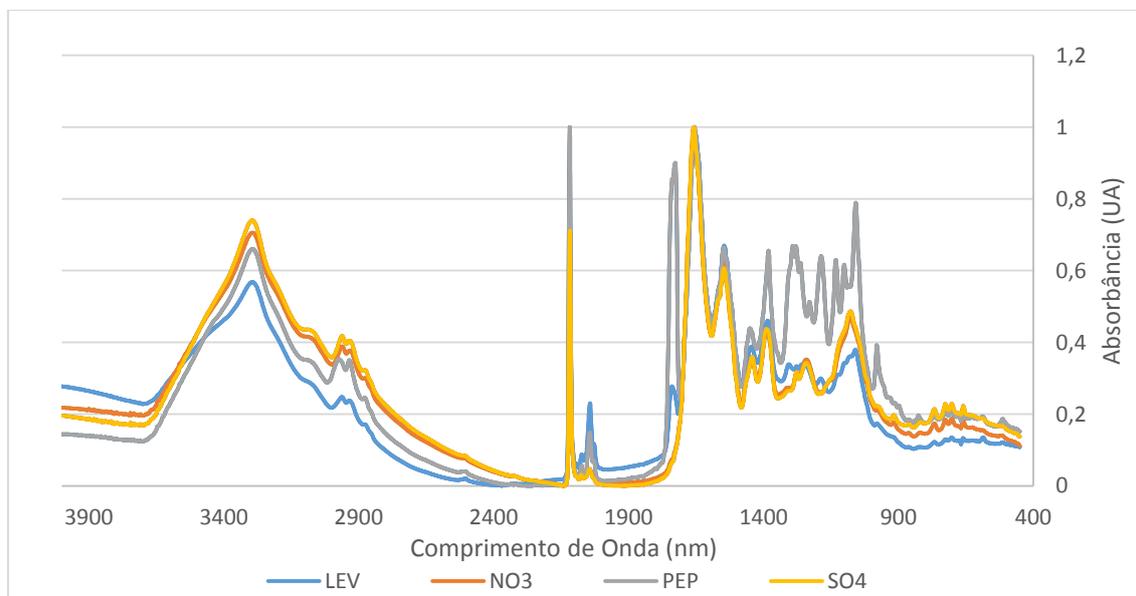


Figura 17. Espectros de absorvância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10 suplementada com diferentes fontes de nitrogênio, de fontes orgânicas e inorgânicas. LEV= extrato de levedura; NO3= nitrato de amônia; PEP= peptona; SO4= sulfato de amônia;

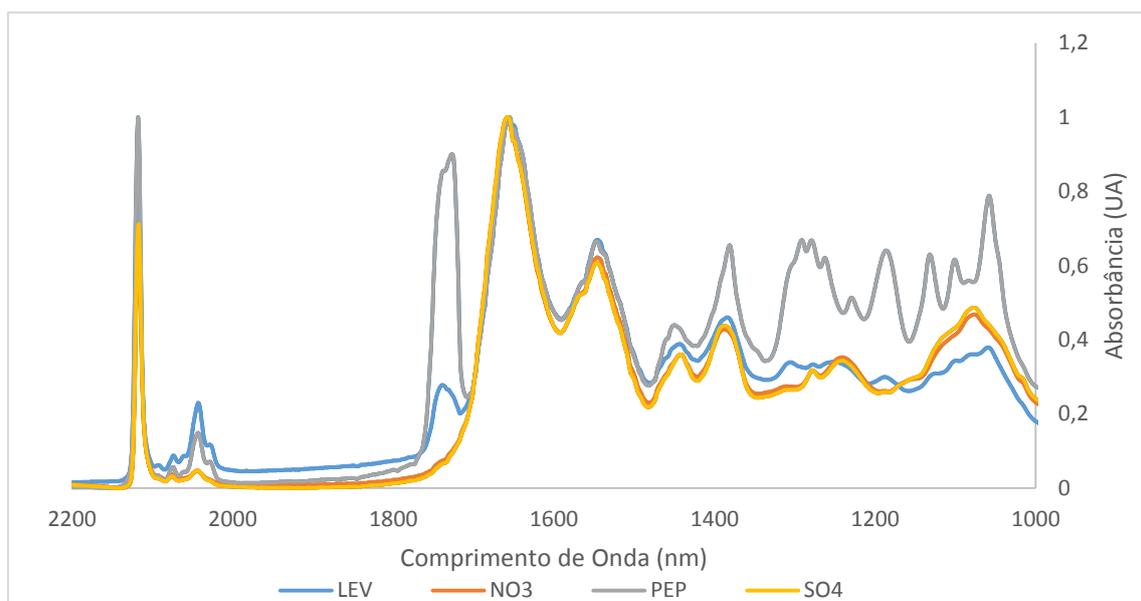


Figura 18. Detalhe nas regiões de 1000 nm até 2200 nm nos espectros de absorvância de FTIR obtidos das amostras de E10, suplementada com distintas fontes de nitrogênio. LEV= extrato de levedura; NO3= nitrato de amônia; PEP= peptona; SO4= sulfato de amônia;

Usualmente, o acúmulo de PHAs no geral ocorre através de mecanismos de estresse fisiológico, podendo estes serem de ordem metabólica (restrição de algum nutriente) ou ambiental (variações de temperatura, pH), por exemplo (Verlinden, Hill et al. 2007, Tan, Chen et al. 2014). Esse estresse desencadeia uma série de eventos e pode levar a ativação da rota de síntese e acúmulo de PHA, uma estratégia de armazenamento de energia em situações adversas. Esse PHA é posteriormente utilizado como fonte energética, para síntese de esporos, por exemplo, ou para reativação da bactéria, quando as características ótimas sejam novamente encontradas (Diomandé, Nguyen-The et al. 2015, Tsuge, Hyakutake et al. 2015, Zhang, Chen et al. 2015).

Ocorre que o nitrogênio é um dos fatores que mais está relacionado com o acúmulo exponencial de PHA pelas bactérias sob estresse fisiológico. A relação nitrogênio/carbono tem papel fundamental, geralmente, na fase crítica de acúmulo. Quando ocorre a presença de nitrogênio em maior quantidade que de carbono, as bactérias têm a tendência de partir para outras estratégias, como multiplicação celular acelerada (Bergey, Whitman et al. 2009, Madigan, Martinko et al. 2014). Quando a proporção é favorecida em detrimento da presença de carbono em excesso, ocorre a síntese e acúmulo de PHA, caso a bactéria em questão seja acumuladora de PHAs (Madigan, Martinko et al. 2014, Rosenberg, DeLong et al. 2014, Prieto, Escapa et al. 2015, Zhang, Chen et al. 2015).

Os dados obtidos dos espectros oriundos da cepa E10 cultivada com suplementação de Tween 80, glicerol, óleo de tabaco e biodiesel (Figura 19) apontam que apenas glicerol é aproveitado pela bactéria para formação de PHA.

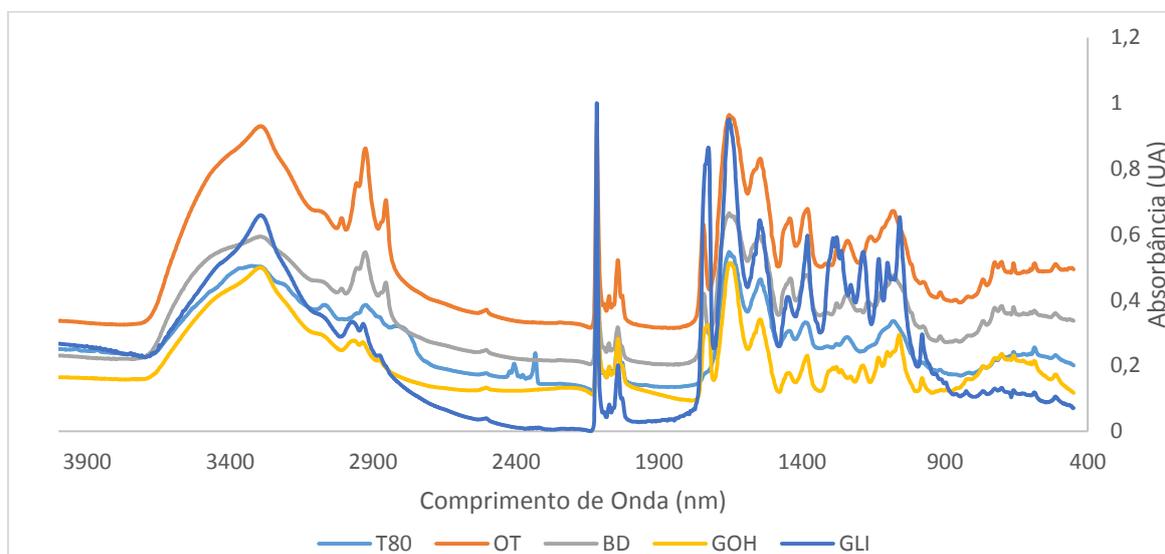


Figura 19. Espectros de absorbância de FTIR obtidos de amostras da cepa E10 suplementada com Tween 80, glicerol, óleo de tabaco e biodiesel, para verificação do acúmulo de PHAs. T80= Tween 80; OT= óleo de tabaco; BD= biodiesel; GOH= glicerol; GLI= glicose;

Esperava-se que ao menos o óleo de tabaco pudesse induzir ao acúmulo de PHAs, uma vez que esse é uma boa fonte energética e existem alguns estudos que apontam os resíduos lipídicos como boas fontes de nutrientes para obtenção de PHAs (Ciesielski, Mozejko et al. 2015, Kumar, Mehariya et al. 2015, Magdoui, Brar et al. 2015). O ponto chave no aproveitamento desse tipo de substrato está relacionado com a rota da  $\beta$ -oxidação, responsável pela metabolização e assimilação dos lipídeos, bem como na geração de compostos intermediários para inúmeras rotas secundárias (Liu, Luo et al. 2011, Cerrone, Choudhari et al. 2014, Meng, Shen et al. 2014).

Com a constatação de que não ocorre o acúmulo de PHA frente a presença desse tipo de compostos, mas, em contrapartida, na presença de glicerol (Figura 23), acredita-se que pode estar ocorrendo a hidrólise dos ácidos graxos residuais, presentes na torta. Esses ácidos graxos estariam liberando glicerol, que estaria sendo utilizado pela bactéria para a síntese de PHA. É possível observar que a amostra oriunda da suplementação com glicerol se assemelha muito com a de glicose. Os demais espectros estão relacionados com a presença de lipídeos e ácidos graxos.

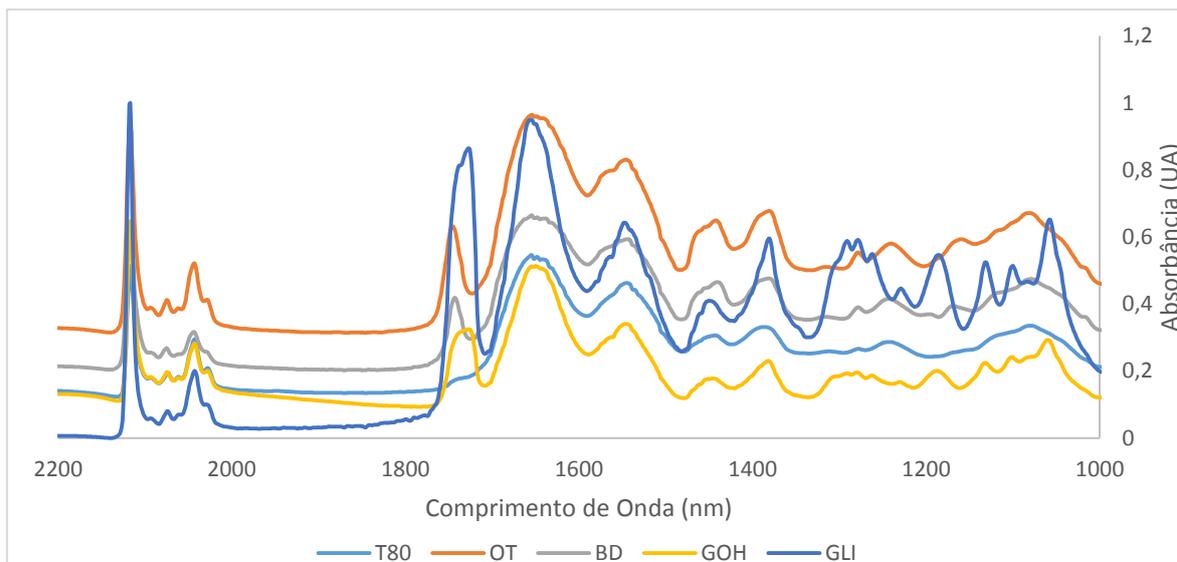


Figura 20. Análise das regiões de 1000 nm até 2200 nm nos espectros de absorvância de FTIR. T80= Tween 80; OT= óleo de tabaco; BD= biodiesel; GOH= glicerol; GLI= glicose;

Por último, foi avaliado o perfil de acúmulo de PHA com a adição de borra de tabaco em estado bruto ou hidrolisado de torta de sementes de tabaco ao ágar nutriente, posteriormente utilizado para o cultivo da cepa E10. Constatou-se a presença de PHA apenas na amostra de borra, em menor escala (Figura 21). Observa-se a presença de PHA na amostra de borra, porém, muito pouco destacado.

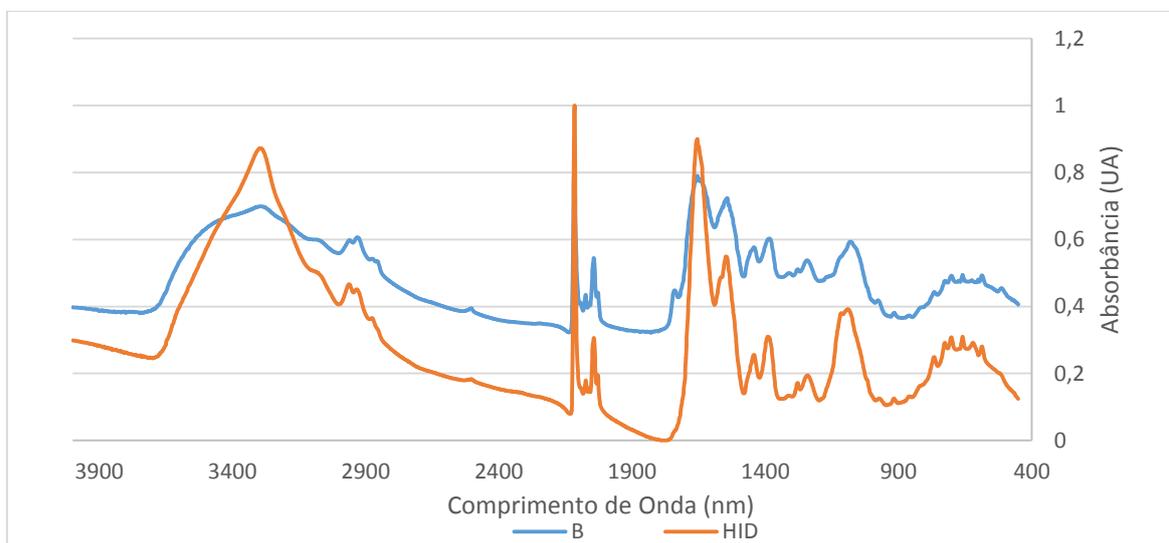


Figura 21. Espectros de FTIR oriundos das amostras que foram suplementadas com borra de tabaco e hidrolisado de torta de sementes de tabaco. B= borra; HID= hidrolisado.

Acredita-se que a ausência de PHA na amostra suplementada com hidrolisado possa estar ocorrendo devido ao meio que foi utilizado como base de cultivo, uma vez que a relação carbono/nitrogênio deve obedecer um limite. O

cenário mais provável é que ocorreu um aumento na oferta de nitrogênio, muito além da quantidade de carbono total, desencadeando multiplicação celular (Bergey, Whitman et al. 2009, Madigan, Martinko et al. 2014).

Realizando a comparação do perfil das amostras que foram analisadas frente aos dados da amostra de glicose (Figura 22), observa-se uma forte relação entre a área correspondente a biomassa (1500-1600 nm) entre a amostra de hidrolisado e de glicose. Observa-se a presença de PHA apenas na amostra de borra, em menor escala, se comparada com a mesma região da amostra de glicose. Além disso, atenta-se para a semelhança do perfil de amidas (1500-1600 nm) das amostras de hidrolisado e glicose.

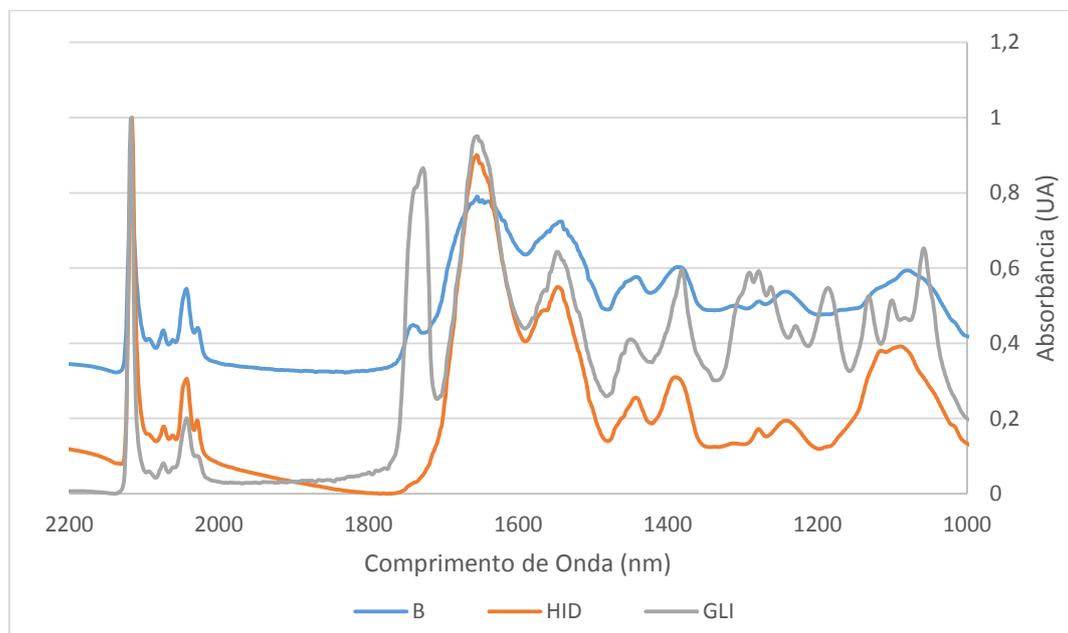


Figura 22. Dados da análise através de FTIR das amostras suplementadas com borra de tabaco bruta e hidrolisado de sementes de tabaco, com ênfase na região de 1000 nm até 2200 nm. B= borra; HID= hidrolisado; GLI= glicose.

Porém, o mesmo não ocorre com a mesma área na amostra de borra. Considerando que a amostra de borra de tabaco que foi adicionada ao meio de cultivo (ágar nutriente) tem uma parcela considerável de resíduo de óleo de tabaco em sua composição, acredita-se que a bactéria teve uma menor oferta de nutrientes facilmente metabolizáveis. Isso pode ter levado a um desenvolvimento mais lento e possivelmente a um menor acúmulo de biomassa.

#### 5.4 Padronização da técnica de cultivo para obtenção de PHA

Ao total foram testadas três metodologias de cultivo para o isolado E10, onde buscou-se o maior acúmulo aparente de PHA no interior das células, averiguado através da visualização das inclusões lipofílicas pela técnica de coloração com *Sudan Black B* (Williamson and Wilkinson 1958).

Na primeira abordagem, as células foram primeiramente cultivadas em BHI, purificadas e posteriormente transferidas para um novo meio de cultivo, composto de 1 parte de solução de Bushnell-Haas e 2 partes de fonte de carbono, hidrolisado para os ensaios e glicose 2M para o controle positivo (o controle negativo não recebeu suplementação, apenas salina). Com essa abordagem obteve-se uma quantidade razoável de inclusões lipofílicas, onde a maioria das células possuía ao menos 1 inserção na forma de grânulo (Figura 27). Nota-se os poucos grânulos formados nas células, algumas delas com apenas 1 ou 2 grânulos.

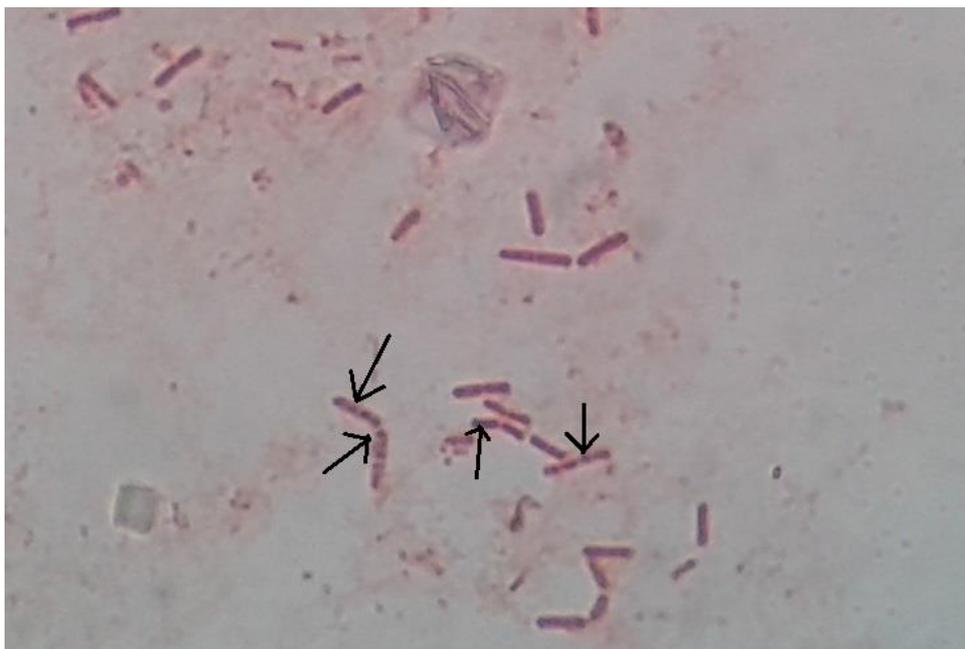


Figura 23. Inserções lipofílicas evidenciadas (setas negras) em células de E10 cultivadas através da metodologia de cultivo 1 (cultivadas em BHI, purificadas e transferidas o meio de cultivo).

Porém, como objetivou-se a maior obtenção aparente de polímero, essa metodologia foi descartada. Ainda, o fato de ter etapas de lavagem do *pellet* de células obtido no cultivo primário, aumenta-se a chance de contaminação e perda de algumas células. De fato houveram duas contaminações por outros microrganismos durante os testes dessa abordagem. O tempo para o

processamento seguro do inóculo e a perícia necessária dificultavam os ensaios, com longa espera das células em meio salino para reintrodução em meio fermentativo. Com isso, essa metodologia foi descartada.

A segunda metodologia abordada para a obtenção de PHA utilizou um pré-inóculo, onde as células foram transferidas diretamente do BHI (cultivo para padronização do inóculo) para um meio de cultivo com baixa quantidade de Peptona e Glicose (1g/L cada), onde se objetivou o aumento da massa celular do inóculo. Logo após um período inicial de cultivo, 24 horas, adicionou-se 30 mL da fonte de carbono (Hidrolisado ou glicose, esse último para o controle positivo), de forma a forçar as células a síntese e acúmulo de PHA. Essa metodologia se mostrou mais prática, simples, menos laboriosa e com menores oportunidades de contaminação durante o processo. O isolado E10 apresentou maior número de inclusões lipofílicas (Figura 28), sendo estas maiores que observado anteriormente. Observa-se os grânulos formados nas células que, comparados com a metodologia 1, são mais numerosos e de tamanho aumentado.



Figura 24. Inserções lipofílicas evidenciadas (setas negras) em células de E10 cultivadas através da metodologia de cultivo 2, onde foram cultivadas previamente para aumento da massa celular.

Foi observado que, após a adição da fonte suplementar de carbono para o controle positivo, glicose 2M, havia uma diminuição no número de células e de inclusões lipofílicas. A explicação mais plausível foi atribuída a um possível choque osmótico pela grande quantidade de glicose inserida de uma vez só nos

cultivos, tendo ao final uma concentração no meio de  $\pm 109,18$  g/L. Acredita-se que essa concentração causou um estresse muito grande nos cultivos, deflagrando o processo de dormência e esporulação do isolado E10. O processo de formação do endósporo no gênero *Bacillus* é conhecido por consumir grande parte das reservas de PHA e de outros HA produzidos durante as fases exponencial e estacionária de crescimento (Valappil, Boccaccini et al. 2007), sendo esse um agravante quando se deseja a obtenção de PHA para extração.

A terceira abordagem, onde o inóculo de E10 foi inserido diretamente no hidrolisado de sementes de tabaco, com suplementação de elementos traço, teve os melhores resultados. Essa metodologia foi desenvolvida com o intuito de diminuir o tempo hábil necessário para a implementação dos ensaios de acumulação de PHA, levando em consideração as inúmeras etapas das outras duas abordagens. Além disso, a chance de contaminação foi diminuída drasticamente, uma vez que não há intervenções durante o cultivo dos microrganismos.

Através da coloração de *Sudan Black B* (Figura 29) foi possível observar o maior acúmulo de inclusões lipofílicas nas células de E10, com inserções avantajadas, quando comparadas com as observadas nas outras metodologias avaliadas, e grande parte das células com mais de uma inserção. Observa-se os grânulos formados nas células que, comparados com as demais metodologias abordadas, são abundantes e com tamanho superior.



Figura 25. Inserções lipofílicas evidenciadas (setas negras) em células de E10 cultivadas através da metodologia de cultivo 3, onde foram cultivadas diretamente no meio hidrolisado de torta de sementes de tabaco.

Como fora observado o decréscimo de células viáveis, nos cultivos de controle positivo que recebiam glicose 2M, optou-se por reduzir a concentração de glicose, de forma a minimizar o impacto da adição massiva de glicose em um único momento. Com isso, definiu-se a concentração de 0,5 M, que, com a diluição no meio salino de Bushnell-Haas, permaneceu na faixa de  $\pm 30,02$  g/L. Ainda assim, a quantidade de inserções lipofílicas nas células não foi alterada de forma perceptível.

Definida a melhor metodologia para o cultivo visando o maior acúmulo possível de PHA, visualizado através da coloração de *Sudan Black B*, a próxima etapa de otimização na técnica de cultivo foi o preparo do inóculo. Inicialmente o inóculo de E10, 1 mL de células em suspensão em caldo BHI, com absorbância mínima de 1,00 UA, era transferido para um tubo contendo 10 mL de BHI, sendo incubado por 24 horas, a temperatura de 28°C. Durante o período de incubação foram realizadas leituras de absorbância e transmitância em um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 600 nm, de uma amostra de 1 mL, que fora retirada do tubo após homogeneização.

Com os valores de transmitância frente ao tempo (Figura 30), observou-se que, a partir do tempo de 12 horas, as leituras não sofriam alterações drásticas, com a estabilização da curva de crescimento e formação de um platô,

conformação típica da fase estacionária de crescimento de bactérias (Bergey, Whitman et al. 2009). Nota-se a estabilização do crescimento e formação de um platô na curva de crescimento a partir do tempo 12 horas, indicando máxima concentração de células nesse tempo.

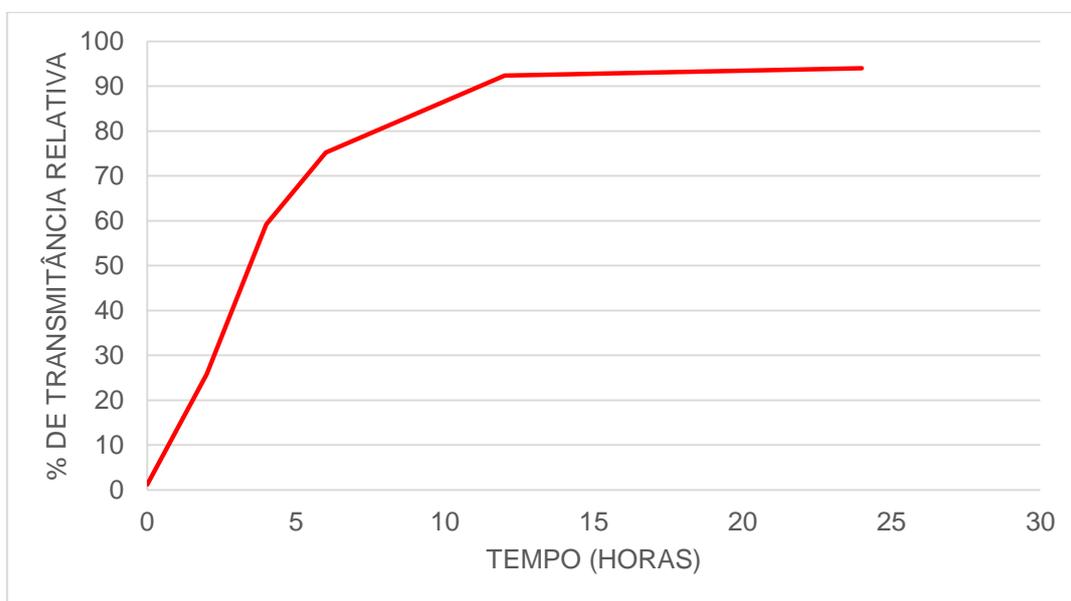


Figura 26. Gráfico obtido com os valores de transmitância relativa (obtido com os valores inversos da transmitância) oriundos das amostras de E10 cultivada por 24 horas em caldo BHI para avaliação do crescimento do pré-inóculo.

A partir dessas constatações o tempo do pré-inóculo foi reduzido para 12 horas, com um ganho de otimização de tempo de 50%. Essa otimização realizada na fase de preparo do inóculo para os ensaios de acúmulo de PHA é fundamental para a obtenção de um processo que possa ser o mais prático e efetivo, no menor tempo hábil. Dessa forma, estudos futuros com o emprego de escalas maiores de cultivo, em biorreatores, têm um ganho no que tange a maior eficiência do processo como um todo, além de ser um passo a mais no processo de melhoria do isolado buscando o maior acúmulo de PHA no menor tempo hábil possível.

Outra etapa que passou por um processo de otimização foi o tempo de cultivo no hidrolisado de sementes de tabaco. Inicialmente, os ensaios com a metodologia escolhida, inóculo direto em hidrolisado de sementes de tabaco, ocorria em agitador orbital, a 28°C, por 48 horas ininterruptas. Após isso, as células foram guardadas em *freezer* para posterior extração do polímero obtido.

Durante as extrações e posteriores checagens, utilizando coloração de Azul do Nilo (1% em solução aquosa) e espectrofotômetro, observou-se que, entre 40 horas e 48 horas não haviam grandes diferenças entre as amostras desses tempos e o acúmulo relativo de PHA. De fato, algumas amostras de 48 horas apresentavam já indícios de esporulação, com algumas amostras onde inclusive se encontravam células com os esporos totalmente formados (Figura 31). Observa-se os esporos formados em praticamente todas as células, poucas apresentam inclusões lipofílicas.

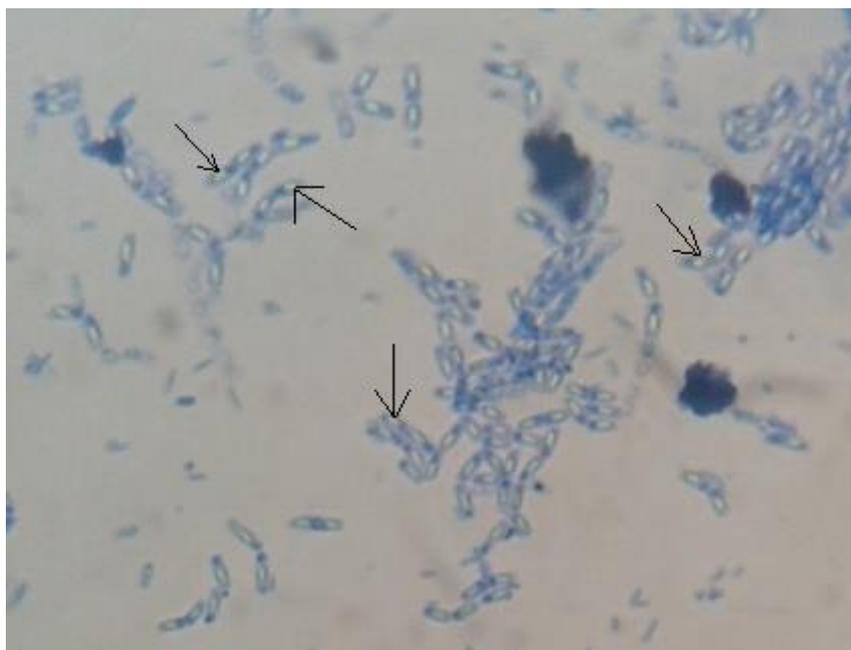


Figura 27. Esporos evidenciados (setas negras) em células de E10 cultivadas diretamente no meio hidrolisado de torta de sementes de tabaco, por 48 horas.

O corante Azul do Nilo indica igualmente PHA quando presente, podendo ser ainda utilizada luz no comprimento de onda UV (490 nm) em microscopia de fluorescência para a visualização mais clara das inclusões de PHA (Ostle and Holt 1982).

Com estas constatações buscou-se reduzir o tempo de cultivo das células, para 40 horas, ao invés das 48 horas anteriormente utilizadas. Com isso, não observou-se mais esporos na maioria das células, ocorrendo apenas em poucas células isoladas, que não representavam uma parcela grande das amostras observadas.

## 5.5 Caracterização do PHA obtido

### 5.5.1 Extração do PHA

Ao final dos tempos de cultivo estipulados foram testados ensaios para a extração do polímero obtido através da utilização dos distintos substratos. Optou-se pela metodologia de extração com solvente orgânico e hipoclorito de sódio (Divyashree and Shamala 2010), buscando uma extração mais limpa e com maior rendimento, destinada a análise via RMN.

Durante o procedimento de extração do polímero foram observadas algumas diferenças quanto as amostras, cultivadas em glicose apenas ou em hidrolisado de torta de sementes de tabaco. A extração das amostras oriundas do cultivo utilizando glicose apenas, pode-se observar que a mistura da solução contendo a biomassa e a fase orgânica tinham pouco contraste entre elas (Figura 32), onde a fase orgânica se apresentou mais translúcida e a fase aquosa, com a biomassa, mais opaca. Observa-se a diferença quanto a opacidade, bem como a coloração da mistura das fases orgânica e aquosa.



Figura 28. Extração do polímero obtido dos cultivos utilizando glicose como fonte de carbono (esquerda) e hidrolisado de torta de sementes de tabaco (direita).

Quanto a biomassa de E10, cultivada em meio contendo hidrolisado de torta de sementes de tabaco, foi observado a formação de duas fases muito opacas, sendo que a fase orgânica (contendo o solvente e o polímero) ao fundo estava completamente opaca e de coloração branca (Figura 32). A fase aquosa,

contendo o hipoclorito e restos celulares, apresentou-se menos opaca, porém ainda muito turva (Figura 32).

As fases orgânicas foram processadas de forma separada. Da fase orgânica oriunda de cultivos com glicose, após as lavagens, com água destilada, foi obtida uma solução límpida e sem coloração, que foi então submetida ao processo de recristalização (Figura 33). Durante a adição de éter de petróleo foi observado a formação do filme, porém, de forma dispersa na solução e muito fragmentado. Observa-se uma massa aglomerada de pequenos fragmentos dispersos, de coloração opaca, de tamanho reduzido, formando um aglomerado disperso na solução.



Figura 29. Polímero extraído da biomassa cultivada com glicose, durante o processo de recristalização com éter de petróleo.

Após a evaporação dos solventes, o filme obtido se mostrou quebradiço, esbranquiçado e muito delicado. O material ficou levemente aderido à superfície do recipiente. Não foi possível a aferição do peso do polímero obtido.

O processo descrito anteriormente, para a amostra dos cultivos de glicose, foi repetido para a amostra do cultivo de hidrolisado, sendo que foi observado uma turbidez maior, onde a fase orgânica se apresentou mais opaca. Após a lavagem e recristalização do polímero com éter de petróleo, foi observado a formação de um filme mais coeso (Figura 34), menos quebradiço e aparentemente em maior quantidade. Observa-se uma massa aglomerada de

um filme, disperso na solução. Não foi observada a fragmentação que ocorreu no polímero obtido dos cultivos em glicose.



Figura 30. Polímero extraído da biomassa cultivada com hidrolisado de torta de sementes de tabaco, durante o processo de recristalização com éter de petróleo.

Essa característica de recristalização dos polímeros obtidos dos diferentes cultivos da mesma cepa é atribuída a composição e arranjo do filme. Normalmente, nas condições de cultivo apenas com glicose como fonte de carbono, as bactérias do gênero *Bacillus* tem uma maior predisposição a acumular apenas homopolímeros (Kominek and Halvorson 1965, Divyashree and Shamala 2010, Tsuge, Hyakutake et al. 2015), em grande maioria P (3-HB), que posteriormente é utilizado para fins diversos. Este homopolímero de P (3-HB) tem por característica ser um material extremamente quebradiço e frágil, sem resistência mecânica (Chien 2008, Somleva, Peoples et al. 2013, Meng, Shen et al. 2014).

O mesmo não ocorre facilmente quando o material em si está na forma de um copolímero, constituído não só de P (3-HB), mas de outros HAs, como valerato (HV), hexanoato (Hhx) e octanoato (HO), que tem melhor resistência mecânica, elasticidade e maleabilidade (Kabe, Tsuge et al. 2012, Anjum, Zuber et al. 2016). Geralmente, a maioria das bactérias produz esse tipo de polímero apenas em condições extremas, com variação nas fontes de carbono disponíveis

ou com adição de ácidos graxos ao meio. Esses ácidos graxos passam por uma via de  $\beta$ -oxidação incompleta, gerando componentes de distintos tamanhos, que são encaminhados a vias secundárias de formação de HAs (Lageveen, Huisman et al. 1988, Braunegg, Lefebvre et al. 1998, Meng, Shen et al. 2014).

Quanto a extração do polímero utilizando como solvente clorofórmio e hipoclorito de sódio, para a digestão do conteúdo celular, optou-se pela escolha desse protocolo tomando como referência trabalhos anteriores, que citavam a pureza desse tipo de extração (Heinrich, Madkour et al. 2012). Um dos pontos negativos com essa metodologia são os resíduos de clorofórmio e hipoclorito que são gerados no processo, sendo ambos os compostos de atenção quanto a contaminação ambiental (Verlinden, Hill et al. 2007, Divyashree and Shamala 2010, Heinrich, Madkour et al. 2012).

Porém, mesmo explorando outros solventes, como diclorometano, acetona, acetato de etila, em proporção solvente/biomassa em taxas elevadas (15:1), a perda de polímero pode alcançar valores de 50% (Wampfler, Ramsauer et al. 2010, Madkour, Heinrich et al. 2013). A extração pelo método que emprega clorofórmio e hipoclorito ainda é considerada uma das melhores abordagens para uma extração com pureza e eficiência elevadas, sendo o método preferencial para análises do polímero (Heinrich, Madkour et al. 2012, Madkour, Heinrich et al. 2013, Tan, Chen et al. 2014, Singh, Kumar et al. 2015)

As amostras de polímeros obtidos dos cultivos foram armazenadas e analisadas através de RMN para a determinação do tipo de PHA presente.

### **5.5.2 Análise das amostras de polímeros via RMN (Ressonância Magnética Nuclear)**

As amostras que passaram pelo processo de extração, utilizando clorofórmio como solvente para o PHA obtido dos cultivos, foram então preparadas para análise via RMN. Foi pesado cerca de 1 miligrama de polímero seco, dissolvido em clorofórmio deuterado e analisado segundo a metodologia de Doi e colaboradores (Doi, Kawaguchi et al. 1989).

Quando cultivada apenas em glicose, E10 parece produzir apenas um homopolímero de P (3-HB) (Figura 35), claramente observado na análise por RMN.

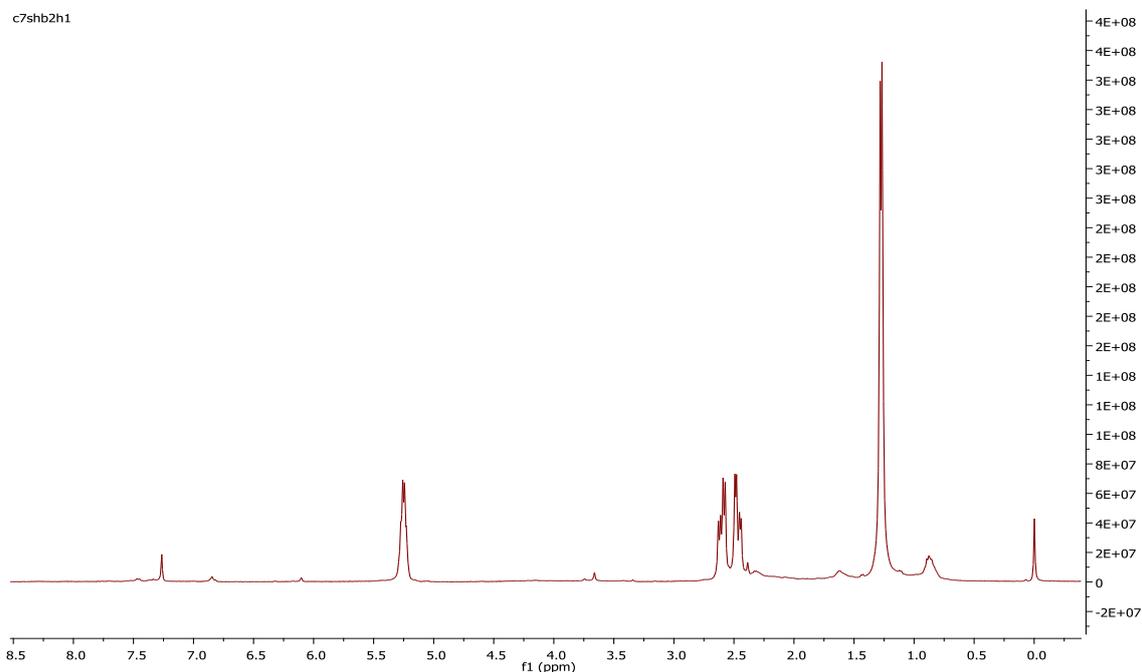


Figura 31. Análise da amostra de P (3-HB), oriundo de cultivo em glicose, onde observa-se um sinal forte de um duplete entre 1,0 e 1,5 ppm. Este arranjo está relacionado com a presença de P (3-HB). O sinal junto a 0 ppm indica o padrão interno de TMS (Tetrametilsilano).

Comparando-se os resultados obtidos com o trabalho de Doi e colaboradores (Doi, Kawaguchi et al. 1989), que caracteriza P (3-HB) pelo grupo funcional CH<sub>3</sub>, altamente blindado, ou seja, com baixa frequência quanto ao spin do núcleo (Figura 36). Os resultados obtidos são muito semelhantes com os observados no trabalho anteriormente citado, apontando fortemente para a confirmação da obtenção de um homopolímero de P (3-HB).

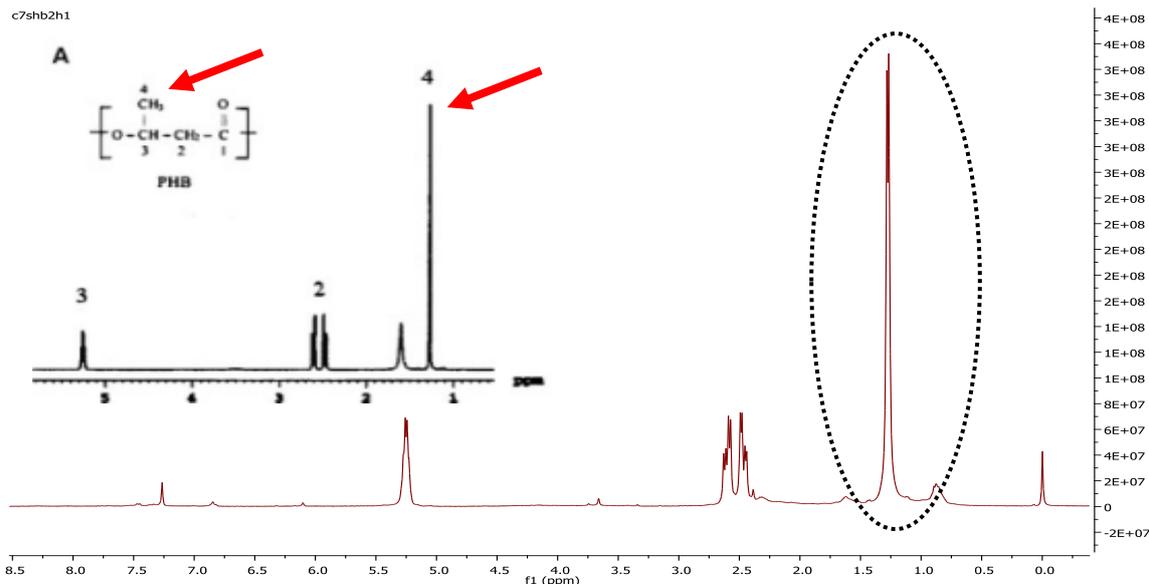


Figura 32. Comparação da amostra de P (3-HB), oriundo de cultivo em glicose, com a amostra do trabalho de Doi e colaboradores (Doi, Kawaguchi et al. 1989). Atribui-se o forte sinal observado ao grupo CH<sub>3</sub>, altamente blindado. Este arranjo está relacionado com a presença de P (3-HB). O sinal junto a 0 ppm indica o padrão interno de TMS (Tetrametilsilano).

A análise da amostra oriunda do cultivo em hidrolisado apresentou resultados distintos aos observados para os cultivos com glicose. Primeiramente, quando comparado a intensidade do sinal de P (3-HB) com o padrão interno de TMS, observa-se que houve uma menor formação desse HA (Figura 37) no cultivo em hidrolisado, comparado com glicose.

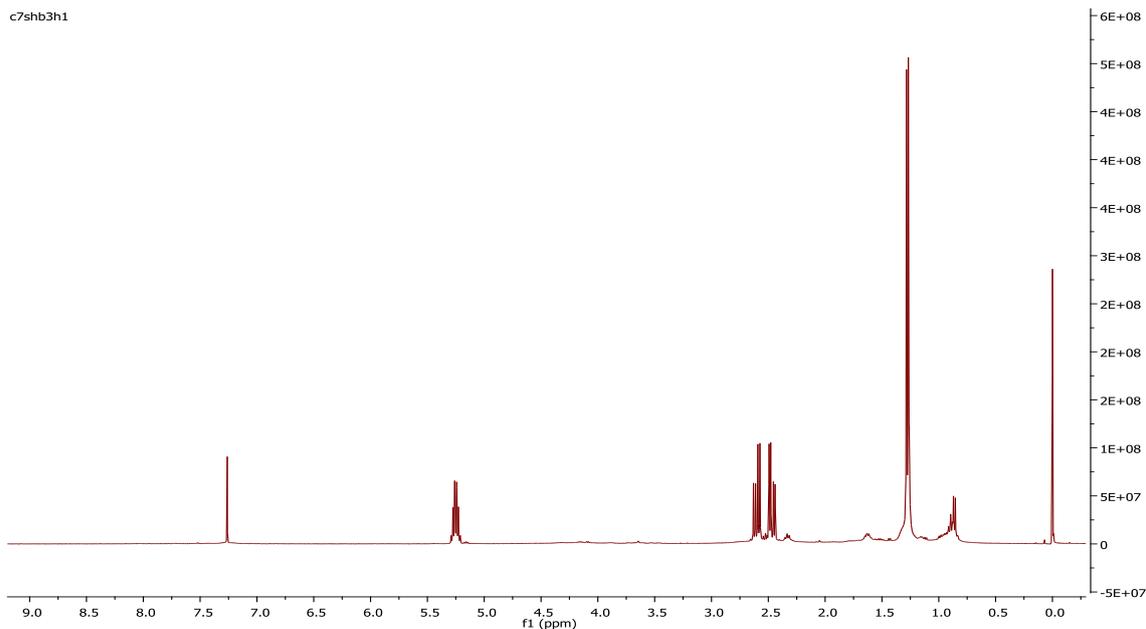


Figura 33. Análise da amostra de PHA, oriundo de cultivo em hidrolisado de torta de sementes de tabaco. Observa-se uma diminuição do sinal na região que indica P (3-HB), em comparação com o padrão interno de TMS, em 0 ppm.

Além disso, ao invés de um homopolímero, obteve-se um copolímero, formado por P (3-HB-co-HV) (Figura 38). Essa constatação deve-se ao sinal entre 0,75 e 1 ppm, na forma de um quinteto.

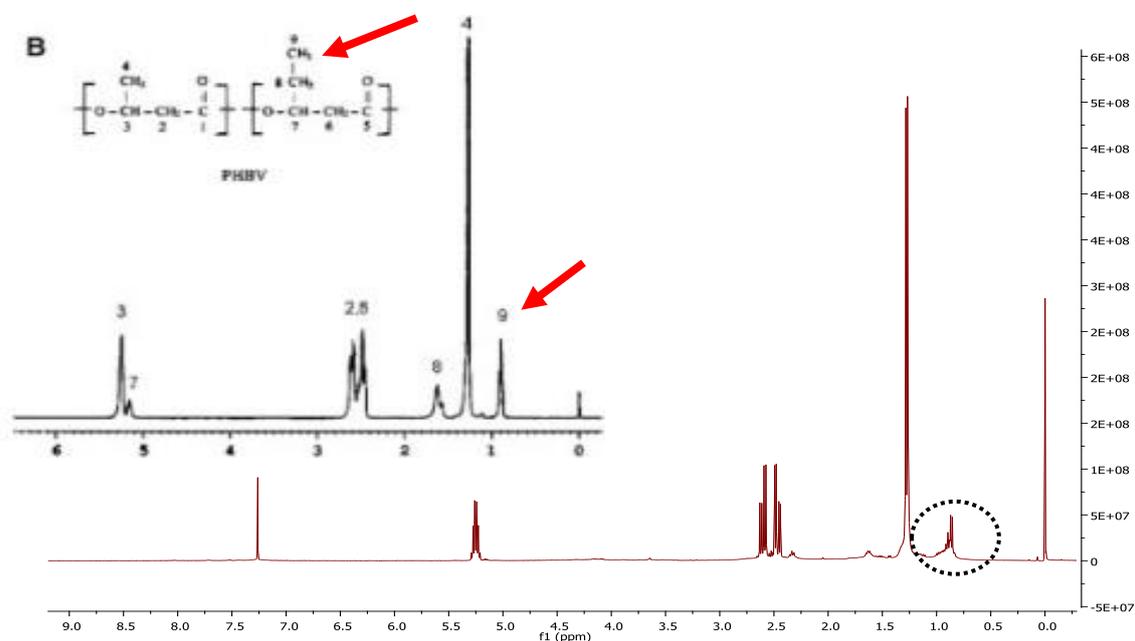


Figura 34. Análise da amostra de PHA obtido do cultivo em hidrolisado comparada com a amostra do trabalho de Doi e colaboradores (Doi, Kawaguchi et al. 1989). Observa-se claramente a semelhança entre os sinais obtidos com o trabalho citado acima, assim como o ponto (ppm) em que o sinal aparece.

Outros autores utilizaram o RMN como ferramenta para a identificação dos compostos presentes no PHA obtido (Alves, Ferreira et al. 2011, Rydz,

Sikorska et al. 2015), incluso como forma de validar ensaios de engenharia genética para aumento da produção de PHA específico (Scheel, Ji et al. 2016).

Analisando os dados obtidos por Scheel e colaboradores (Scheel, Ji et al. 2016) fica claro que o copolímero, quando formado, diminui a eficiência de produção e quantidade, sendo que, no trabalho em questão, o homopolímero P (3-HB) teve valores superiores de produção. Como discutido anteriormente, essa rota de síntese de monômeros de P (3-HB), quando devidamente sustentada por um substrato energético adequado, é uma das rotas mais eficientes para o acúmulo de PHA no interior das células (Eggers and Steinbuchel 2013, Jendrossek and Pfeiffer 2014, Peña, Castillo et al. 2014, Prieto, Escapa et al. 2015).

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O Hidrolisado obtido da torta de sementes de tabaco, após a análise dos dados de cultivo e dos nutrientes constituintes, demonstrou ser um substrato de baixo custo, acessível localmente, porém, com baixa aplicabilidade para estudos com PHA. Devido ao fato desse substrato ser oriundo de sementes, esperava-se um meio rico em nutrientes variados, com potencial energético elevado e fermentação superior.

Considerando a constituição variada da torta de sementes de tabaco, os açúcares, ao que tudo indica, estão em sua grande maioria na forma de fibras, constituintes provavelmente do tegumento da semente. Isso fica evidenciado pela presença de xilose e glicose, açúcares relacionados com a cobertura de sementes e tegumentos vegetais, em baixos níveis.

Não foi possível a análise do conteúdo proteico, de vitaminas e elementos traço, além das análises dos carboidratos terem demonstrado uma baixa concentração de açúcares. Entende-se, dessa forma, que os componentes que estão sendo metabolizados em acetil-CoA e posteriormente em PHA são os lipídeos residuais da torta de sementes de tabaco. Porém, como a análise através de FTIR demonstrou que não ocorre a formação de PHA através de óleo bruto ou borra, a bactéria deve estar utilizando outro substrato, como glicerol.

O glicerol pode ser oriundo do processo de hidrólise ácida da torta de tabaco contendo os resíduos lipídicos, que, sob pressão, altas temperaturas e ataque ácido, liberou glicerol e outros ácidos graxos de menor tamanho.

O perfil lipídico da torta não foi analisado, um dos motivos é que, após a hidrólise ácida e neutralização, ocorre a formação de sais e outros compostos que atrapalharam a análise via cromatografia gasosa (CG-MS). Além disso, o equipamento esteve por vários períodos sem gás e com uma demanda maior que a capacidade de análise comportada, gerando atrasos nas análises.

Esse perfil lipídico, se analisado antes e após a hidrólise da torta, bem como a análise do hidrolisado antes e após o cultivo poderia enriquecer o trabalho com: a) o perfil de lipídeos presentes na amostra; b) os lipídeos

presentes no meio utilizado para os testes de acúmulo de PHA; c) o lipídeo que teve maior consumo, em relação com o acúmulo de PHA.

Além disso, a análise da presença de glicerol antes e após o cultivo de E10 no meio hidrolisado de torta de sementes de tabaco teria sido muito interessante, uma vez que os resultados de triagem através de FTIR demonstraram que a cepa em questão é uma boa fermentadora de glicerol.

Baseando-se na literatura, onde o gênero *Bacillus* está descrito como sendo uma das bactérias que desvia acetil-CoA de outras rotas metabólicas, como a  $\beta$ -oxidação, para síntese de 3-HB e posterior polimerização, entende-se que esse é o mecanismo bioquímico e fisiológico mais provável e estar ocorrendo nos experimentos abordados nesse trabalho. A escassez de trabalhos que abordam a espécie *B. pumilus* e a produção de PHA é outro fator que impede uma análise mais profunda e comparação dos dados obtidos com outros trabalhos.

A cepa *B. pumilus* E10 demonstrou ser um bom acumulador de PHA, considerando as situações extremas a que foi exposto, inclusive formando um copolímero de P (3-HB-co-HV) quando cultivado no meio com hidrolisado de torta de sementes de tabaco. Esse achado é importante, já que os copolímeros apresentam propriedades distintas dos homopolímeros, como aumento dos valores de resistência a tração mecânica, elasticidade intrínseca e ponto de transição vítrea.

Essas características são fundamentais para a definição de microrganismos com potencial de aplicabilidade para ensaios de maior escala, antevendo seu emprego posterior em processos em escala industrial. Ainda, E10 teve um crescimento rápido e não demonstrou sinais de esporulação até 48 horas de cultivo.

Mesmo quando exposta a algumas variações de temperatura por pequenos períodos de tempo, o que muitas vezes é considerado fator de estresse que poderia ser um estímulo a esporulação. Essa característica é muito importante quando se pensa no ponto de vista da escalabilidade do processo, onde uma bactéria com baixa resistência a fatores de estresse ambiental poderia prejudicar ou mesmo inviabilizar a obtenção do biopolímero desejado.

Ainda sobre a aplicabilidade do microrganismo, a ferramenta de análise FTIR demonstrou-se muito útil no que tange aos substratos possíveis de serem explorados para a síntese de PHA. Uma vez que trabalhos de referência, como o de Bergey e colaboradores (Bergey, Whitman et al. 2009), apresentam dados de quais substratos são utilizados pelas diferentes bactérias, ainda se carece de dados sobre quais substratos são eficientemente convertidos em PHA e quais os tipos formados.

Foi possível verificar que a cepa em questão tem preferência por extrato de levedura e peptona, como fontes de nitrogênio, e glicose e amido, como fontes energéticas. Um fato interessante foi a ausência de PHA na amostra suplementada com hidrolisado, que, quando cultivado em meio líquido, tem bom acúmulo de PHA (evidenciado pela análise através de RMN).

Possivelmente seja possível atribuir esse fato a uma condição de excesso de nitrogênio em relação com o carbono disponível, bem como, teoricamente, de alguns ácidos graxos e resíduos lipídicos. Esses fatores podem ter inibido alguma rota principal, em detrimento de outra, o que pode causar competição por substratos energéticos.

Ficou evidente que a metodologia de FTIR é simples, rápida e tem grande importância para a avaliação não só de substratos possíveis de serem fermentados a PHA, mas também como um a possível ferramenta de monitoramento de obtenção de PHA, requerendo pouco material. Acoplado essa análise com RMN e CG-MS, por exemplo, é possível instaurar modelos preditivos para distintas características, servindo como base para um correto processo de otimização biotecnológico.

Cabe ressaltar aqui que a análise via RMN foi crucial para a confirmação de que as inclusões lipofílicas, visualizadas através da coloração de Sudan Black B, e os achados utilizando a análise através de FTIR eram de fato os grânulos de PHA. Mais importante ainda, a confirmação de P (3-HB) nas amostras de cultivo em glicose (situação clássica e tida como modelo) e o copolímero quando amostras de cultivo em hidrolisado.

Com as dificuldades enfrentadas ao longo do desenvolvimento do trabalho observou-se alguns pontos a serem abordados futuramente, por outros

trabalhos na área. O primeiro ponto seria uma análise completa da composição da torta e do hidrolisado, de forma a efetuar variações na etapa de pré-tratamento. Com isso, seria possível otimizar o método que melhor se encaixa com esse tipo de resíduo, para a maior liberação possível de nutrientes passíveis de serem utilizados pelos microrganismos escolhidos.

Outro ponto seria a análise em específico do perfil do resíduo de lipídeos que se encontra presente no hidrolisado. Com essa informação em mãos seria possível avaliar a composição mais exata do meio de cultivo e assim buscar na literatura as rotas bioquímicas mais provavelmente relacionadas com o acúmulo de PHA pela cepa *B. pumilus* E10 e de outras bactérias do gênero *Bacillus*.

Com a exploração de uma metodologia mais eficiente de extração, o segundo passo seria a triagem mais extensa de microrganismos com capacidade fermentativa desse meio, para a obtenção de PHA. Através de cepas padrão, oriundas de coleções, e de novos isolados de ambientes distintos, seria possível comparar os microrganismos com a cepa utilizada, otimizando a obtenção de PHA.

A ampliação da escala do experimento seria crucial para determinar variáveis como, por exemplo, a quantidade necessária de oxigênio dissolvido e disponível para a bactéria no meio. Essa é uma informação indispensável para a otimização dos cultivos de forma a obter a produção máxima de PHA.

Além dessa informação, outro ponto que se beneficiaria de um aumento na escala dos experimentos seria a utilização de um biorreator com sensores acoplados, o que oferecia coleta de dados em tempo real, de forma mais simplificada e através de meios não invasivos. Um aumento na quantidade de dados disponíveis é indispensável na determinação de condições ótimas de cultivo.

Explorar outras técnicas analíticas, como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) e Varredura diferencial de calorimetria (DSC). A análise de CG-MS auxiliaria na determinação da composição exata do biopolímero, assim como de seus radicais constituintes, uma vez que o biopolímero estudado é um copolímero de P (3-HB-co-HV). Além

disso, análise através de CG-MS também indicaria a presença de outros HAs na amostra quando empregada outra bactéria ou algum outro composto no meio.

Com a quantificação das amostras em distintos tempos e variadas condições de cultivo, com a análise em paralelo através de FTIR, seria possível criar um modelo de comportamento da bactéria e utilizar o método mais rápido para monitorar os cultivos, no caso FTIR. Com a amostra tendo um padrão quantificado para comparação, seria possível realizar a quantificação incluso através desse modelo, utilizando apenas FTIR.

No caso do uso de DSC, seria possível o levantamento de características intrínsecas do biopolímero, como transição vítrea, cristalização e fusão, dados interessantes para a caracterização da amostra. Além disso, seria possível a análise de empregabilidade do polímero para determinados fins, como, por exemplo, viabilidade de produção para substituição de um outro polímero de origem química e emprego em blendas com outros polímeros e biopolímeros.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia aplicada para o tratamento do resíduo de torta de sementes de tabaco, hidrólise ácida, apresentou baixa eficiência na liberação dos carboidratos presentes na amostra. Tendo em vista que o objetivo do pré-tratamento visava a liberação máxima dos nutrientes presentes na torta de tabaco, essa metodologia deverá ser aprimorada em estudos futuros.

A partir do meio elaborado foi possível isolar uma bactéria, denominada E10, posteriormente identificada como *Bacillus pumilus*, com capacidade de fermentar o meio com o hidrolisado obtido da torta de sementes de tabaco, acumulando PHA no interior da célula.

Foi possível, através de ensaios de fermentação, a obtenção de PHA, que posteriormente passou por etapas de extração e análise química de sua composição. Os resultados obtidos das análises de FTIR e RMN comprovaram o acúmulo de PHA, especificamente PHB e P-3HB-co-HV no interior das células de E10.

A análise dos componentes da torta de sementes de tabaco contribui para definir quais os seus constituintes e definir qual seria o melhor meio a ser utilizado posteriormente para os ensaios de fermentação. Pela análise realizada a torta de sementes de tabaco não é um substrato energeticamente favorável para a obtenção de PHA.

## 8. REFERÊNCIAS

(2014). The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

(NCBI), N. C. f. B. I. (2002, 2003 Aug 13). "The BLAST Sequence Analysis Tool." 2002, Oct 9. 2016, from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

AFUBRA. (2016). "Associação dos Fumicultores do Brasil " Retrieved Dezembro, 2016.

Agnew, D. E., A. K. Stevermer, J. T. Youngquist and B. F. Pflieger (2012). "Engineering *Escherichia coli* for production of C12–C14 polyhydroxyalkanoate from glucose." Metabolic Engineering **14**(6): 705-713.

Ahmed, A., B. John and S. Friedrich (2013). Synthesis of Poly-(R)-3 Hydroxyoctanoate (PHO) and Its Graphene Nanocomposites. Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Materials II, American Chemical Society. **1144**: 199-209.

Almeida, J. R. M., L. C. L. Fávaro and B. F. Quirino (2012). "Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste." Biotechnology for Biofuels **5**: 48-48.

Alves, V. D., A. R. Ferreira, N. Costa, F. Freitas, M. A. M. Reis and I. M. Coelho (2011). "Characterization of biodegradable films from the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct." Carbohydrate Polymers **83**(4): 1582-1590.

NCBI (2016). "National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA." from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

EPA (2016, 09/29/2016). "US Environmental Protection Agency." Retrieved November, 2016, from <https://www.epa.gov/greenchemistry>.

Anastas, P. T. and J. C. Warner (2000). Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press.

Anderson, A. J. and E. A. Dawes (1990). "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates." Microbiological Reviews **54**(4): 450-472.

Andreeßen, B. and A. Steinbüchel (2010). "Biosynthesis and Biodegradation of 3-Hydroxypropionate- Containing Polyesters." Applied and Environmental Microbiology **76**(15): 4919-4925.

Andreeßen, B., N. Taylor and A. Steinbüchel (2014). "Poly(3-Hydroxypropionate): a Promising Alternative to Fossil Fuel-Based Materials." Applied and Environmental Microbiology **80**(21): 6574-6582.

Anjum, A., M. Zuber, K. M. Zia, A. Noreen, M. N. Anjum and S. Tabasum (2016). "Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements." Int J Biol Macromol **89**: 161-174.

Ansari, S. and T. Fatma (2016). "Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization." PLoS ONE **11**(6): e0158168.

Antelo, L. T., G. M. De Hijas-Liste, A. Franco-Uría, A. A. Alonso and R. I. Pérez-Martín (2015). "Optimisation of processing routes for a marine biorefinery." Journal of Cleaner Production **104**: 489-501.

Arahal, D. R., M. J. Pujalte and L. Rodrigo-Torres (2016). "Draft genomic sequence of *Nereida ignava* CECT 5292(T), a marine bacterium of the family Rhodobacteraceae." Standards in Genomic Sciences **11**: 21.

Arias, S., M. Bassas-Galia, G. Molinari and K. N. Timmis (2013). "Tight coupling of polymerization and depolymerization of polyhydroxyalkanoates ensures efficient management of carbon resources in *Pseudomonas putida*." Microb Biotechnol **6**(5): 551-563.

Baweja, M., R. Tiwari, P. K. Singh, L. Nain and P. Shukla (2016). "An Alkaline Protease from *Bacillus pumilus* MP 27: Functional Analysis of Its Binding Model toward Its Applications As Detergent Additive." Frontiers in Microbiology **7**: 1195.

Beeby, M., M. Cho, J. Stubbe and G. J. Jensen (2012). "Growth and Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha*." Journal of Bacteriology **194**(5): 1092-1099.

Bennur, T., A. R. Kumar, S. Zinjarde and V. Javdekar (2014). "Nocardiopsis species as potential sources of diverse and novel extracellular enzymes." Applied Microbiology and Biotechnology **98**(22): 9173-9185.

Bergey, D. H., W. B. Whitman, P. De Vos, G. M. Garrity and D. Jones (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York, Springer.

Biondo, P. B. F., V. J. dos Santos, P. F. Montanher, O. de O. S. Junior, M. Matsushita, V. C. Almeida and J. V. Visentainer (2015). "A new method for lipid extraction using low-toxicity solvents developed for canola (*Brassica napus* L.) and soybean (*Glycine max* L. Merrill) seeds." Analytical Methods **7**(23): 9773-9778.

Bonk, F., T. Chaturvedi, A. I. Torres, J. E. Schmidt, M. H. Thomsen and G. Stephanopoulos (2015). Exploring Opportunities for the Production of Chemicals from Municipal Solid Wastes within the Framework of a Biorefinery. Computer Aided Chemical Engineering. **37**: 2123-2128.

Braunegg, G., G. Lefebvre and K. F. Genser (1998). "Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects." Journal of Biotechnology **65**(2-3): 127-161.

Brigham, C. J., C. F. Budde, J. W. Holder, Q. Zeng, A. E. Mahan, C. Rha and A. J. Sinskey (2010). "Elucidation of  $\beta$ -Oxidation Pathways in *Ralstonia eutropha* H16 by Examination of Global Gene Expression." Journal of Bacteriology **192**(20): 5454-5464.

C.S.K. Reddy, R. G., Rashmi, V.C. Kalia (2003). "Polyhydroxyalkanoates: an overview." Bioresource Technology **87**: 10.

Cerrone, F., S. K. Choudhari, R. Davis, D. Cysneiros, V. O'Flaherty, G. Duane, E. Casey, M. W. Guzik, S. T. Kenny, R. P. Babu and K. O'Connor (2014). "Medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production from volatile fatty acids derived from the anaerobic digestion of grass." Appl Microbiol Biotechnol **98**(2): 611-620.

Chen, C., R. Cao, R. Shrestha, C. Ward, B. B. Katz, C. J. Fischer, J. M. Tomich and P. Li (2015). "Trapping of Intermediates with Substrate Analog H<sub>4</sub>BCoA in the Polymerizations Catalyzed by Class III Polyhydroxybutyrate (PHB) Synthase from *Allochromatium Vinosum*." ACS chemical biology **10**(5): 1330-1339.

Chen, G. Q., K. H. Konig and R. M. Lafferty (1991). "Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*." FEMS Microbiol Lett **68**(2): 173-176.

Chien, C. C. (2008). Polyhydroxyalkanoates: In nature, in the laboratory and in industry. Biotechnology: Research, Technology and Applications: 47-70.

Choi, S., C. W. Song, J. H. Shin and S. Y. Lee (2015). "Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives." Metabolic Engineering **28**: 223-239.

Ciesielski, S., J. Mozejko and N. Pisutpaisal (2015). "Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production." Journal of Cleaner Production **106**: 408-421.

Clomburg, J. M., M. D. Blankschien, J. E. Vick, A. Chou, S. Kim and R. Gonzalez (2015). "Integrated engineering of  $\beta$ -oxidation reversal and  $\omega$ -oxidation pathways for the synthesis of medium chain  $\omega$ -functionalized carboxylic acids." Metabolic Engineering **28**: 202-212.

Crovadore, J., B. Cochard, G. Calmin, R. Chablais, T. Schulz and F. Lefort (2016). "Whole-Genome Sequence of *Pseudomonas xanthomarina* Strain UASWS0955, a Potential Biological Agent for Agricultural and Environmental Uses." Genome Announcements **4**(5): e01136-01116.

Damrow, R., I. Maldener and Y. Zilliges (2016). "The Multiple Functions of Common Microbial Carbon Polymers, Glycogen and PHB, during Stress Responses in the Non-Diazotrophic Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Frontiers in Microbiology **7**: 966.

de Rijk, T. C., P. van de Meer, G. Eggink and R. A. Weusthuis (2005). Methods for Analysis of Poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) Composition. Biopolymers Online, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Dellomonaco, C., J. M. Clomburg, E. N. Miller and R. Gonzalez (2011). "Engineered reversal of the [bgr]-oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals." Nature **476**(7360): 355-359.

Di Luccia, B., A. Riccio, A. Vanacore, L. Baccigalupi, A. Molinaro and E. Ricca (2015). "Matrix Production, Pigment Synthesis, and Sporulation in a Marine Isolated Strain of *Bacillus pumilus*." Marine Drugs **13**(10): 6472-6488.

Dinjaski, N., M. Fernández-Gutiérrez, S. Selvam, F. J. Parra-Ruiz, S. M. Lehman, J. San Román, E. García, J. L. García, A. J. García and M. A. Prieto (2014). "PHACOS, a functionalized bacterial polyester with bactericidal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Biomaterials **35**(1): 14-24.

Diomandé, S. E., C. Nguyen-The, M.-H. Guinebretière, V. Broussolle and J. Brillard (2015). "Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation." Frontiers in Microbiology **6**: 813.

Divyashree, M. S. and T. R. Shamala (2010). "Extractability of polyhydroxyalkanoate synthesized by *Bacillus flexus* cultivated in organic and inorganic nutrient media." Indian Journal of Microbiology **50**(1): 63-69.

Doi, Y., Y. Kawaguchi, Y. Nakamura and M. Kunioka (1989). "Nuclear Magnetic Resonance Studies of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Polyphosphate Metabolism in *Alcaligenes eutrophus*." Applied and Environmental Microbiology **55**(11): 2932-2938.

Doudoroff, M. and R. Stanier (1959). "Role of poly-beta-hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria." Nature **183**(4673): 1440.

Drews, G. (2000). "The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century." FEMS Microbiology Reviews **24**(3): 225.

Dutra, É. J. and R. Hilsinger (2013). "A cadeia produtiva do tabaco na região Sul do Brasil: aspectos quantitativos e qualitativos." Geografia Ensino & Pesquisa **17**(3).

Eggers, J. and A. Steinbuchel (2013). "Poly(3-hydroxybutyrate) degradation in *Ralstonia eutropha* H16 is mediated stereoselectively to (S)-3-hydroxybutyryl coenzyme A (CoA) via crotonyl-CoA." J Bacteriol **195**(14): 3213-3223.

Elhottová, D., J. Tříška, S. O. Petersen and H. Šantrůčková (2000). "Analysis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in environmental samples by GC-MS/MS." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **367**(2): 157-164.

Energy, U. S. D. o. (2016). "National Renewable Energy Laboratory", 2016, from <http://www.nrel.gov/>.

Englen, M. D. and L. C. Kelley (2000). "A rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction." Lett Appl Microbiol **31**(6): 421-426.

FAO (2003). ISSUES IN THE GLOBAL TOBACCO ECONOMY: Selected case studies. Roma, Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação.

Fellahi, S., A. Chibani, E. Feuk-Lagerstedt and M. J. Taherzadeh (2016). "Identification of two new keratinolytic proteases from a *Bacillus pumilus* strain using protein analysis and gene sequencing." AMB Express **6**: 42.

Fernández, D., E. Rodríguez, M. Bassas, M. Viñas, A. M. Solanas, J. Llorens, A. M. Marqués and A. Manresa (2005). "Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions." Biochemical Engineering Journal **26**(2-3): 159-167.

- Fierro, J., E. J. Martínez, A. Morán and X. Gómez (2014). "Valorisation of used cooking oil sludge by codigestion with swine manure." Waste Management **34**(8): 1537-1545.
- Forster-Carneiro, T., M. D. Berni, I. L. Dorileo and M. A. Rostagno (2013). "Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil." Resources, Conservation and Recycling **77**: 78-88.
- Full, T. D., D. O. Jung and M. T. Madigan (2006). "Production of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species." Letters in Applied Microbiology **43**(4): 377-384.
- Furrer, P., S. Panke and M. Zinn (2007). "Efficient recovery of low endotoxin medium-chain-length poly([R]-3-hydroxyalkanoate) from bacterial biomass." Journal of Microbiological Methods **69**(1): 206-213.
- Gallego, M. J. (2012). *Nicotiana*. Flora iberica. S. Castroviejo, Aedo, C., Laínz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J. & Benedí, C. Madrid, Real Jardín Botánico.
- Gallert, C. and J. Winter (2005). *Bacterial Metabolism in Wastewater Treatment Systems*. Environmental Biotechnology, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 1-48.
- Gangoiti, J., M. Santos, M. A. Prieto, I. de la Mata, J. L. Serra and M. J. Llama (2012). "Characterization of a novel subgroup of extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerases from Actinobacteria." Applied and Environmental Microbiology **78**(20): 7229-7237.
- Garay, L. A., K. L. Boundy-Mills and J. B. German (2014). "Accumulation of High-Value Lipids in Single-Cell Microorganisms: A Mechanistic Approach and Future Perspectives." Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(13): 2709-2727.
- García, I. L., J. A. López, M. P. Dorado, N. Kopsahelis, M. Alexandri, S. Papanikolaou, M. A. Villar and A. A. Koutinas (2013). "Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*." Bioresource Technology **130**: 16-22.
- Getachew, A. and F. Woldesenbet (2016). "Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material." BMC Research Notes **9**: 509.
- Government, U. S. (2016). "Energy Information Administration " Retrieved 02/16/2016, 2016, from <http://www.eia.gov/>.
- Grass, G., G. Bierbaum, E. Molitor, N. Götte and M. Antwerpen (2016). "Genome Sequence of *Bacillus pumilus* Strain Bonn, Isolated from an Anthrax-Like Necrotic Skin Infection Site of a Child." Genome Announcements **4**(1): e01741-01715.
- Guo, W., J. Duan, W. Geng, J. Feng, S. Wang and C. Song (2013). "Comparison of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates synthases from *Pseudomonas mendocina* NK-01 with the same substrate specificity." Microbiological Research **168**(4): 231-237.

Gupta, S. K. (2015). Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production: Opportunities and Constraints, Elsevier Science.

Gutiérrez-Mañero, F. J., B. Ramos-Solano, A. n. Probanza, J. Mehouchi, F. R. Tadeo and M. Talon (2001). "The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins." Physiologia Plantarum **111**(2): 206-211.

Hao, K., H. Li, F. Li and P. Guo (2016). "Complete Genome Sequence of *Bacillus pumilus* PDSLzg-1, a Hydrocarbon-Degrading Bacterium Isolated from Oil-Contaminated Soil in China." Genome Announcements **4**(5): e01079-01016.

Haywood, G. W., A. J. Anderson, D. F. Ewing and E. A. Dawes (1990). "Accumulation of a Polyhydroxyalkanoate Containing Primarily 3-Hydroxydecanoate from Simple Carbohydrate Substrates by *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB 40135." Applied and Environmental Microbiology **56**(11): 3354-3359.

Heinrich, D., M. H. Madkour, M. A. Al-Ghamdi, I. I. Shabbaj and A. Steinbüchel (2012). "Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite." AMB Express **2**: 59-59.

Higuchi-Takeuchi, M., K. Morisaki and K. Numata (2016). "A Screening Method for the Isolation of Polyhydroxyalkanoate-Producing Purple Non-sulfur Photosynthetic Bacteria from Natural Seawater." Frontiers in Microbiology **7**: 1509.

Higuchi-Takeuchi, M., K. Morisaki, K. Toyooka and K. Numata (2016). "Synthesis of High-Molecular-Weight Polyhydroxyalkanoates by Marine Photosynthetic Purple Bacteria." PLoS ONE **11**(8): e0160981.

Hua, D., C. Ma, S. Lin, L. Song, Z. Deng, Z. Maomy, Z. Zhang, B. Yu and P. Xu (2007). "Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: identification of major metabolites." J Biotechnol **130**(4): 463-470.

HUISMAN, L. L. M. A. G. W. (1999). "Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic." MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS **63**(1): 33.

Ibrahim, M. H. A., L. Lebbe, A. Willems and A. Steinbüchel (2016). "Chelatococusthermostellatus sp. nov., a new thermophile for bioplastic synthesis: comparative phylogenetic and physiological study." AMB Express **6**: 39.

INCA. (2016, 18/07/2016). "Produção de fumo em folha no Brasil." Retrieved Dezembro, 2016, from [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/observatorio\\_controle\\_tabaco/site/home/dados\\_numeros/producao\\_fumo](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/observatorio_controle_tabaco/site/home/dados_numeros/producao_fumo).

Jendrossek, D. and D. Pfeiffer (2014). "New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate)." Environmental Microbiology **16**(8): 2357-2373.

Jia, Y., W. Yuan, J. Wodzinska, C. Park, A. J. Sinskey and J. Stubbe (2001). "Mechanistic Studies on Class I Polyhydroxybutyrate (PHB) Synthase from

Ralstonia eutropha: Class I and III Synthases Share a Similar Catalytic Mechanism." Biochemistry **40**(4): 1011-1019.

Jiang, G., D. J. Hill, M. Kowalczyk, B. Johnston, G. Adamus, V. Irorere and I. Radecka (2016). "Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery." International Journal of Molecular Sciences **17**(7): 1157.

Jing, Y., Y. Gao, W. Wang, Y. Cheng, P. Lu, C. Ma and Y. Zhang (2016). "Optimization of the extraction of polysaccharides from tobacco waste and their biological activities." Int J Biol Macromol **91**: 188-197.

Jul-Larsen, A., A. S. Madhun, K. A. Brokstad, E. Montomoli, V. Yusibov and R. J. Cox (2012). "The human potential of a recombinant pandemic influenza vaccine produced in tobacco plants." Hum Vaccin Immunother **8**(5): 653-661.

Kabe, T., T. Tsuge, K.-i. Kasuya, A. Takemura, T. Hikima, M. Takata and T. Iwata (2012). "Physical and Structural Effects of Adding Ultrahigh-Molecular-Weight Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] to Wild-Type Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]." Macromolecules **45**(4): 1858-1865.

Kachrimanidou, V., N. Kopsahelis, M. Alexandri, A. Strati, C. Gardeli, S. Papanikolaou, M. Komaitis, I. K. Kookos and A. A. Koutinas (2015). "Integrated sunflower-based biorefinery for the production of antioxidants, protein isolate and poly(3-hydroxybutyrate)." Industrial Crops and Products **71**: 106-113.

Kang, Y., M. Shen, H. Wang and Q. Zhao (2013). "A possible mechanism of action of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus pumilus* WP8 via regulation of soil bacterial community structure." J Gen Appl Microbiol **59**(4): 267-277.

Kansiz, M., H. Billman-Jacobe and D. McNaughton (2000). "Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics." Applied and Environmental Microbiology **66**(8): 3415-3420.

Kessler, B. and B. Witholt (2001). "Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism." Journal of Biotechnology **86**(2): 97-104.

Kist, B. B., C. E. d. Santos, C. d. Carvalho, M. Treichel, C. F. Filter and R. R. Beling (2016). Anuário Brasileiro do Tabaco 2016. Santa Cruz do Sul, Brazil, Editora Gazeta.

Klinke, S., G. de Roo, B. Witholt and B. Kessler (2000). "Role of phaD in Accumulation of Medium-Chain-Length Poly(3-Hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans*." Applied and Environmental Microbiology **66**(9): 3705-3710.

Kominek, L. A. and H. O. Halvorson (1965). "Metabolism of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate and Acetoin in *Bacillus cereus*." Journal of Bacteriology **90**(5): 1251-1259.

Kriz, G. S., D. L. Pavia and G. M. Lampman (2010). Introdução À Espectroscopia, Cengage Learning.

Krueger, C. L., C. M. Radetski, A. G. Bendia, I. M. Oliveira, M. A. Castro-Silva, C. R. Rambo, R. V. Antonio and A. O. S. Lima (2012). "Bioconversion of cassava starch by-product into Bacillus and related bacteria polyhydroxyalkanoates." Electronic Journal of Biotechnology **15**(3).

Kumar, G., B. Sen and C.-Y. Lin (2013). "Pretreatment and hydrolysis methods for recovery of fermentable sugars from de-oiled Jatropha waste." Bioresource Technology **145**: 275-279.

Kumar, P., S. Mehariya, S. Ray, A. Mishra and V. Kalia (2015). "Biodiesel Industry Waste: A Potential Source of Bioenergy and Biopolymers." Indian Journal of Microbiology **55**(1): 1-7.

Kumar, P., S. K. S. Patel, J. K. Lee and V. C. Kalia (2013). "Extending the limits of Bacillus for novel biotechnological applications." Biotechnology Advances **31**(8): 1543-1561.

Kumar, P., S. Ray, S. K. S. Patel, J.-K. Lee and V. C. Kalia (2015). "Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by Bacillus thuringiensis under non-limiting nitrogen conditions." International Journal of Biological Macromolecules **78**: 9-16.

Lageveen, R. G., G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink and B. Witholt (1988). "Formation of Polyesters by Pseudomonas oleovorans: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates." Applied and Environmental Microbiology **54**(12): 2924-2932.

Ledda, C., A. Schievano, B. Scaglia, M. Rossoni, F. G. Ación Fernández and F. Adani (2015). "Integration of microalgae production with anaerobic digestion of dairy cattle manure: An overall mass and energy balance of the process." Journal of Cleaner Production.

Lee, S. Y. (1996). "Bacterial Polyhydroxyalkanoates." Biotechnology and Bioengineering **49**: 14.

Lemoigne, M. (1926). "Products of dehydration and of polymerization of b-hydroxybutyric acid." Bulletin de la Societe de Chimie Biologique **8**: 12.

Li, Q., Q. Chen, M. J. Li, F. S. Wang and Q. S. Qi (2011). "Pathway engineering results the altered polyhydroxyalkanoates composition in recombinant Escherichia coli." New Biotechnology **28**(1): 92-95.

Liang, Y., T. Siddaramu, J. Yesuf and N. Sarkany (2010). "Fermentable sugar release from Jatropha seed cakes following lime pretreatment and enzymatic hydrolysis." Bioresour Technol **101**(16): 6417-6424.

Liao, W., Y. Liu and D. B. Hodge (2014). Integrated Farm-Based Biorefinery. Biorefineries: Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels: 255-270.

Liau, C. P., M. Bin Ahmad, K. Shameli, W. M. Z. W. Yunus, N. A. Ibrahim, N. Zainuddin and Y. Y. Then (2014). "Preparation and Characterization of Polyhydroxybutyrate/Polycaprolactone Nanocomposites." The Scientific World Journal **2014**: 9.

- Liebergesell, M., E. Hustede, A. Timm, A. Steinbüchel, R. C. Fuller, R. W. Lenz and H. G. Schlegel (1991). "Formation of poly(3-hydroxyalkanoates) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria." Archives of Microbiology **155**(5): 415-421.
- Liebergesell, M. and A. Steinbüchel (1996). "New knowledge about the PHA-locus and P(3HB) granule-associated proteins in *Chromatium vinosum*." Biotechnology Letters **18**(6): 719-724.
- Liu, G., S. Cai, J. Hou, D. Zhao, J. Han, J. Zhou and H. Xiang (2016). "Enoyl-CoA hydratase mediates polyhydroxyalkanoate mobilization in *Haloferax mediterranei*." Scientific Reports **6**: 24015.
- Liu, Q., G. Luo, X. R. Zhou and G.-Q. Chen (2011). "Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by  $\beta$ -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*." Metabolic Engineering **13**(1): 11-17.
- Liu, X.-J., J. Zhang, P.-H. Hong and Z.-J. Li (2016). "Microbial production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate by *Neptunomonas antarctica*." PeerJ **4**: e2291.
- Liu, Y., Q. Lai, C. Dong, F. Sun, L. Wang, G. Li and Z. Shao (2013). "Phylogenetic Diversity of the *Bacillus pumilus* Group and the Marine Ecotype Revealed by Multilocus Sequence Analysis." PLoS ONE **8**(11): e80097.
- Löbler, M., K. Sternberg, O. Stachs, R. Allemann, N. Grabow, A. Rook, C. F. Kreiner, D. Streufert, A. T. Neffe, B. D. Hanh, A. Lendlein, K.-P. Schmitz and R. Guthoff (2011). "Polymers and drugs suitable for the development of a drug delivery drainage system in glaucoma surgery." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **97B**(2): 388-395.
- Luef, K. P., F. Stelzer and F. Wiesbrock (2015). "Poly(hydroxy alkanoate)s in medical applications." Chemical and Biochemical Engineering Quarterly **29**(2): 287-297.
- Lutke-Eversloh, T., K. Bergander, H. Luftmann and A. Steinbüchel (2001). "Identification of a new class of biopolymer: bacterial synthesis of a sulfur-containing polymer with thioester linkages." Microbiology **147**(Pt 1): 11-19.
- Luzier, W. D. (1992). "Materials derived from biomass/biodegradable materials." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(3): 839-842.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, D. A. Stahl and T. Brock (2014). Brock Biology of Microorganisms, Pearson.
- Madkour, M. H., D. Heinrich, M. A. Alghamdi, I. I. Shabbaj and A. Steinbüchel (2013). "PHA Recovery from Biomass." Biomacromolecules **14**(9): 2963-2972.
- Madueño, L., M. Macchi, I. S. Morelli and B. M. Coppotelli (2016). "Draft Whole-Genome Sequence of *Sphingobium* sp. 22B, a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium from Semiarid Patagonia, Argentina." Genome Announcements **4**(3): e00488-00416.

Maestri, D. M. and C. A. Guzmán (1993). "Chemical composition of tobacco seeds (*Nicotiana tabacum* L) from Argentina." Journal of the Science of Food and Agriculture **61**(2): 227-230.

Magdoui, S., S. K. Brar, J. F. Blais and R. D. Tyagi (2015). "How to direct the fatty acid biosynthesis towards polyhydroxyalkanoates production?" Biomass and Bioenergy **74**: 268-279.

Mahmoud, W. M., T. S. Abdelmoneim and A. M. Elazzazy (2016). "The Impact of Silver Nanoparticles Produced by *Bacillus pumilus* As Antimicrobial and Nematicide." Frontiers in Microbiology **7**: 1746.

Maity, S. K. (2015). "Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I." Renewable and Sustainable Energy Reviews **43**: 1427-1445.

Marchessault, R. W. L. a. R. H. (2005). "Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology." Biomacromolecules **6**(1): 8.

Martínez, V., P. G. de Santos, J. García-Hidalgo, D. Hormigo, M. A. Prieto, M. Arroyo and I. de la Mata (2015). "Novel extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Streptomyces exfoliatus* K10 DSMZ 41693: a promising biocatalyst for the efficient degradation of natural and functionalized mcl-PHAs." Applied Microbiology and Biotechnology.

Melo, W. C., A. S. d. Santos, L. M. M. Santa Anna and N. Pereira Jr. (2008). "Acid and enzymatic hydrolysis of the residue from Castor Bean (*Ricinus communis* L.) oil extraction for ethanol production: detoxification and biodiesel process integration." Journal of the Brazilian Chemical Society **19**: 418-425.

Menendez-Bravo, S., J. Roulet, M. Sabatini, S. Comba, R. Dunn, H. Gramajo and A. Arabolaza (2016). "High cell density production of multimethyl-branched long-chain esters in *Escherichia coli* and determination of their physicochemical properties." Biotechnology for Biofuels **9**: 215.

Meng, D. C., R. Shen, H. Yao, J. C. Chen, Q. Wu and G. Q. Chen (2014). "Engineering the diversity of polyesters." Current Opinion in Biotechnology **29**(1): 24-33.

Muangwong, A., T. Boontip, J. Pachimsawat and S. C. Napathorn (2016). "Medium chain length polyhydroxyalkanoates consisting primarily of unsaturated 3-hydroxy-5-cis-dodecanoate synthesized by newly isolated bacteria using crude glycerol." Microbial Cell Factories **15**: 55.

Muhr, A., E. M. Rechberger, A. Salerno, A. Reiterer, K. Malli, K. Strohmeier, S. Schober, M. Mittelbach and M. Koller (2013). "Novel Description of mcl-PHA Biosynthesis by *Pseudomonas chlororaphis* from Animal-Derived Waste." Journal of Biotechnology **165**(1): 45-51.

Mukhtar, A., H. Ullah and H. Mukhtar (2007). "Fatty Acid Composition of Tobacco Seed Oil and Synthesis of Alkyd Resin." Chinese Journal of Chemistry **25**(5): 705-708.

Naranjo, J. M., C. A. Cardona and J. C. Higueta (2014). "Use of residual banana for polyhydroxybutyrate (PHB) production: Case of study in an integrated biorefinery." Waste Management **34**(12): 2634-2640.

- Narayanan, A. and K. V. Ramana (2012). "Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycoides* DFC1 using response surface optimization for physico-chemical process parameters." 3 Biotech **2**(4): 287-296.
- Naruse, N., O. Tenmyo, S. Kobaru, H. Kamei, T. Miyaki, M. Konishi and T. Oki (1990). "Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity." J Antibiot (Tokyo) **43**(3): 267-280.
- Nasib Qureshi, D. H., Alain Vertes (2014). Biorefineries, Elsevier.
- Nath, A., B. Verasztó, S. Basak, A. Koris, Z. Kovács and G. Vatai (2015). "Synthesis of Lactose-Derived Nutraceuticals from Dairy Waste Whey—a Review." Food and Bioprocess Technology.
- NC, T. (2016). "Tyton BioEbergy Systems." 2016, from <http://www.tytonbio.com/>.
- Nelson, R. L., M. A. Castro, M. Katti, J. A. Eisen and T. A. Van Laar (2016). "Genome Sequence of a Multidrug-Resistant Strain of *Bacillus pumilus*, CB01, Isolated from the Feces of an American Crow, *Corvus brachyrhynchos*." Genome Announcements **4**(4): e00807-00816.
- Németh, Á. and Z. Kaleta (2015). "Complex utilization of dairy waste (whey) in Biorefinery." WSEAS Transactions on Environment and Development **11**: 80-88.
- Noel, B. J. (1962). Process for preparing poly-beta-hydroxybutyric acid. G. W. R. Co. United States Google Patents.
- Nwinyi, O. C., O. O. Ajayi and O. O. Amund (2016). "Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of *Pseudomonas*." Brazilian Journal of Microbiology **47**(3): 551-562.
- Oshiki, M., M. Onuki, H. Satoh and T. Mino (2013). "Microbial Community Composition of Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Organisms in Full-Scale Wastewater Treatment Plants Operated in Fully Aerobic Mode." Microbes and Environments **28**(1): 96-104.
- Ostle, A. G. and J. G. Holt (1982). "Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate." Applied and Environmental Microbiology **44**(1): 238-241.
- Ouyang, S.-P., Q. Liu, L. Fang and G.-Q. Chen (2007). "Construction of pha-Operon-Defined Knockout Mutants of *Pseudomonas putida* KT2442 and their Applications in Poly(hydroxyalkanoate) Production." Macromolecular Bioscience **7**(2): 227-233.
- Ozdemir, N. C. a. G. (2011). "Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) production from domestic wastewater using *Enterobacter aerogenes* 12Bi strain." African Journal of Microbiology Research **5**(6): 12.
- Panagiotidou, E., C. Konidaris, A. Baklavariadis, I. Zuburtikudis, D. Achilias and P. Mitlianga (2014). "A simple route for purifying extracellular poly(3-hydroxybutyrate)-depolymerase from *penicillium pinophilum*." Enzyme Research **2014**.

Park, D. H. and B. S. Kim (2011). "Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil." New Biotechnology **28**(6): 719-724.

Park, I., E. H. Jho and K. Nam (2014). "Optimization of Carbon Dioxide and Valeric Acid Utilization for Polyhydroxyalkanoates Synthesis by *Cupriavidus necator*." Journal of Polymers and the Environment **22**(2): 244-251.

Parvathi, A., K. Krishna, J. Jose, N. Joseph and S. Nair (2009). "Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India." Brazilian Journal of Microbiology **40**: 269-275.

Peña, C., T. Castillo, A. García, M. Millán and D. Segura (2014). "Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work." Microbial Biotechnology **7**(4): 278-293.

Perez-Zabaleta, M., G. Sjöberg, M. Guevara-Martínez, J. Jarmander, M. Gustavsson, J. Quillaguamán and G. Larsson (2016). "Increasing the production of (R)-3-hydroxybutyrate in recombinant *Escherichia coli* by improved cofactor supply." Microbial Cell Factories **15**: 91.

Pollet, L. A. a. E. (2012). Biodegradable Polymers. Environmental Silicate Nano-Biocomposites. L. A. a. E. Pollet, Springer: 450.

Pregolato, W. (1985). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Instituto Adolfo Lutz.

Prieto, A., I. F. Escapa, V. Martínez, N. Dinjaski, C. Herencias, F. de la Peña, N. Tarazona and O. Revelles (2015). "A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*." Environmental Microbiology: n/a-n/a.

Ravikannan, S. P. and T. Meenambal (2014). "Experimental studies on Windrow composting and vermicomposting (Twin process) of organic fraction of municipal solid waste with sludge from varied industries." Pollution Research **33**(2): 455-458.

Rehm, B. H. (2003). "Polyester synthases: natural catalysts for plastics." Biochem J **376**(Pt 1): 15-33.

Rehm, B. H. A. and A. Steinbüchel (1999). "Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis." International Journal of Biological Macromolecules **25**(1-3): 3-19.

Repaske, R. (1962). "NUTRITIONAL REQUIREMENTS FOR *HYDROGENOMONAS EUTROPHA*." Journal of Bacteriology **83**(2): 418-422.

Repaske, R. and A. C. Repaske (1976). "Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*." Applied and Environmental Microbiology **32**(4): 585-591.

Riça, L. B., L. B. Moraes, D. d. Souza, R. d. C. d. S. Schneider and M. V. G. Müller (2016). "Aproveitamento de torta do tabaco gerado na produção de biodiesel para a obtenção de bioplástico." Revista Jovens Pesquisadores **6**(2).

- Rivas, S., A. M. Raspolli-Galletti, C. Antonetti, V. Santos and J. C. Parajó (2016). "Sustainable conversion of *Pinus pinaster* wood into biofuel precursors: A biorefinery approach." Fuel **164**: 51-58.
- Rodrigo-Torres, L., M. J. Pujalte and D. R. Arahal (2016). "Draft genome sequence of *Thalassobius mediterraneus* CECT 5383(T), a poly-beta-hydroxybutyrate producer." Genomics Data **7**: 237-239.
- Rosenberg, E., E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt and F. Thompson. (2014). "The Prokaryotes Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria."
- Rydz, J., W. Sikorska, M. Kyulavska and D. Christova (2015). "Polyester-Based (Bio)degradable Polymers as Environmentally Friendly Materials for Sustainable Development." International Journal of Molecular Sciences **16**(1): 564-596.
- S.A., P. I. (2016). "BIOCYCLE." 2016, from <http://www.biocycle.com.br/site.htm>.
- Saika, A., Y. Watanabe, K. Sudesh and T. Tsuge (2014). "Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) by recombinant *Escherichia coli* expressing leucine metabolism-related enzymes derived from *Clostridium difficile*." Journal of Bioscience and Bioengineering **117**(6): 670-675.
- Sanderson, J. B. (1878). "Lectures on the Infective Processes of Disease." British Medical Journal **1**(893): 179-183.
- Santos, M., J. Gangoiti, M. J. Llama, J. L. Serra, H. Keul and M. Möller (2012). "Poly(3-hydroxyoctanoate) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13: Catalysis of ester-forming reactions in non-aqueous media." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **77**: 81-86.
- Sato, S., T. Fujiki and K. Matsumoto (2013). "Construction of a stable plasmid vector for industrial production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by a recombinant *Cupriavidus necator* H16 strain." Journal of Bioscience and Bioengineering **116**(6): 677-681.
- Sato, S., M. Minato, Y. Kikkawa, H. Abe and T. Tsuge (2010). "In vitro synthesis of polyhydroxyalkanoate catalyzed by class II and III PHA synthases: A useful technique for surface coatings of a hydrophobic support with PHA." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **85**(6): 779-782.
- Scheel, R. A., L. Ji, B. R. Lundgren and C. T. Nomura (2016). "Enhancing poly(3-hydroxyalkanoate) production in *Escherichia coli* by the removal of the regulatory gene *arcA*." AMB Express **6**: 120.
- Schürmann, M., B. Hirsch, J. H. Wübbeler, N. Stöveken and A. Steinbüchel (2013). "Succinyl-CoA:3-Sulfino-propionate CoA-Transferase from *Variovorax paradoxus* Strain TBEA6, a Novel Member of the Class III Coenzyme A (CoA)-Transferase Family." Journal of Bacteriology **195**(16): 3761-3773.
- Shah, R. K. (2012). "FTIR analysis of polyhydroxyalkanoates by novel *Bacillus* sp. AS 3-2 from soil of Kadi region, North Gujarat, India." Journal of Biochemical Technology **3**(4): 4.
- Shahidi, F. (2001). Extraction and Measurement of Total Lipids. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, Inc.

Shalini Devi, S., Y. Sreenivasulu and K. V. Bhaskar Rao (2014). "Talaromyces verruculosus, a novel marine fungi as a potent polyhydroxybutyrate degrader." Research Journal of Pharmacy and Technology **7**(4): 433-438.

Sharma, U., J. Fu, D. B. Levin, R. Sparling and N. Cicek (2014). Effects of media sterilization and variable carbon-loading on medium-chain length PHA (bioplastics) production by Pseudomonas putida LS46 using biodiesel derived glycerol. American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2014, ASABE 2014.

Sharmada, N., A. Punja, S. Shetty Sonali, B. Shet Vinayaka, C. Goveas Louella and C. V. Rao (2016). Optimization of pre-treatment of de-oiled oil seed cake for release of reducing sugars by response surface methodology. Bioethanol. **2**.

Shirkavand, E., S. Baroutian, D. J. Gapes and B. R. Young (2016). "Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment - A review." Renewable and Sustainable Energy Reviews **54**: 217-234.

Shivamurthy, V. M., S. Gantt, C. Reilly, P. Tilley, J. Guzman and L. Tucker (2016). "Bacillus pumilus Septic Arthritis in a Healthy Child." The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien des Maladies Infectieuses et de la Microbiologie Médicale / AMMI Canada **2016**: 3265037.

Silverstein, R. M., F. X. Webster and D. J. Kiemle (2006). Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, Ltc.

Simon-Colin, C., C. Gouin, P. Lemechko, N. Kervarec and J. Guezennec (2012). "Development of a three-steps derivatization assay for the localization of double bond in monounsaturated monomers of poly-beta-hydroxyalkanoates by GC-MS." Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **900**: 64-70.

Singh, G., A. Kumari, A. Mittal, A. Yadav and N. K. Aggarwal (2013). "Poly-β-Hydroxybutyrate Production by Bacillus subtilis NG220 Using Sugar Industry Waste Water." BioMed Research International **2013**: 10.

Singh, M., P. Kumar, S. Ray and V. C. Kalia (2015). "Challenges and Opportunities for Customizing Polyhydroxyalkanoates." Indian Journal of Microbiology **55**(3): 235-249.

Slater, S. C., W. H. Voige and D. E. Dennis (1988). "Cloning and expression in Escherichia coli of the Alcaligenes eutrophus H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway." Journal of Bacteriology **170**(10): 4431-4436.

Somleva, M. N., O. P. Peoples and K. D. Snell (2013). "PHA Bioplastics, Biochemicals, and Energy from Crops." Plant Biotechnology Journal **11**(2): 233-252.

Sorokin, D. Y., A. L. Rakitin, V. M. Gumerov, A. V. Beletsky, J. S. Sinnighe Damsté, A. V. Mardanov and N. V. Ravin (2016). "Phenotypic and Genomic Properties of Chitinispirillum alkaliphilum gen. nov., sp. nov., A Haloalkaliphilic Anaerobic Chitinolytic Bacterium Representing a Novel Class in the Phylum Fibrobacteres." Frontiers in Microbiology **7**: 407.

Stanisavljević, I. T., D. T. Veličković, Z. B. Todorović, M. L. Lazić and V. B. Veljković (2009). "Comparison of techniques for the extraction of tobacco seed oil." European Journal of Lipid Science and Technology **111**(5): 513-518.

Sudesh, K., H. Abe and Y. Doi (2000). "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters." Progress in Polymer Science **25**(10): 1503-1555.

Sunchem. (2016). "Energy Tobacco "Solaris". 2016, from <http://www.sunchem.it/testo-il-gruppo/?lang=en>.

Surendra, K. C., C. Sawatdeenarunat, S. Shrestha, S. Sung and S. K. Khanal (2015). "Anaerobic digestion-based biorefinery for bioenergy and biobased products." Industrial Biotechnology **11**(2): 103-112.

Tan, G. A., C. L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I. M. N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo and J. Y. Wang (2014). "Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review." Polymers **6**(3): 706-754.

Tena, D., J. A. Martinez-Torres, M. T. Perez-Pomata, J. A. Saez-Nieto, V. Rubio and J. Bisquert (2007). "Cutaneous infection due to *Bacillus pumilus*: report of 3 cases." Clin Infect Dis **44**(4): e40-42.

Tian, J., A. J. Sinskey and J. Stubbe (2005). "Class III Polyhydroxybutyrate Synthase: Involvement in Chain Termination and Reinitiation†." Biochemistry **44**(23): 8369-8377.

Torri, C., H. Cordiani, C. Samori, L. Favaro and D. Fabbri (2014). "Fast procedure for the analysis of poly(hydroxyalkanoates) in bacterial cells by off-line pyrolysis/gas-chromatography with flame ionization detector." J Chromatogr A **1359**: 230-236.

Tsuge, T., M. Hyakutake and K. Mizuno (2015). "Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*." Applied Microbiology and Biotechnology **99**(15): 6231-6240.

Uchino, K., T. Saito, B. Gebauer and D. Jendrossek (2007). "Isolated Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Granules Are Complex Bacterial Organelles Catalyzing Formation of PHB from Acetyl Coenzyme A (CoA) and Degradation of PHB to Acetyl-CoA." Journal of Bacteriology **189**(22): 8250-8256.

Valappil, S. P., A. R. Boccaccini, C. Bucke and I. Roy (2007). "Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: Insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*." Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology **91**(1): 1-17.

Valentin, A. S. a. H. E. (1995). "Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids." FEMS Microbiology Letters **128**: 10.

Vandamme, P. and T. Coenye (2004). "Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **54**(6): 2285-2289.

Vasco, J. M. N. (2014). Design and analysis of the polyhydroxybutyrate (PHB) production from agroindustrial wastes in Colombia. Doctor of Philosophy in Engineering, Universidad Nacional de Colombia.

Verlinden, R. A. J., D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, Z. Piotrowska-Seget and I. K. Radecka (2011). "Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*." AMB Express **1**: 11-11.

Verlinden, R. A. J., D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams and I. Radecka (2007). "Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates." Journal of Applied Microbiology **102**(6): 1437-1449.

Vigneswari, S., T. S. Lee, K. Bhubalan and A. A. Amirul (2015). "Extracellular Polyhydroxyalkanoate Depolymerase by *Acidovorax* sp. DP5." Enzyme Research **2015**: 212159.

Vishnuvardhan Reddy, S., M. Thirumala and S. K. Mahmood (2009). "Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge." World Journal of Microbiology and Biotechnology **25**(3): 391-397.

Wampfler, B., T. Ramsauer, S. Rezzonico, R. Hischer, R. Köhling, L. Thöny-Meyer and M. Zinn (2010). "Isolation and Purification of Medium Chain Length Poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHA) for Medical Applications Using Nonchlorinated Solvents." Biomacromolecules **11**(10): 2716-2723.

Wang, Q., A. P. Mueller, C. R. Leong, K. Matsumoto, S. Taguchi and C. T. Nomura (2010). "Quick and efficient method for genetic transformation of biopolymer-producing bacteria." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **85**(6): 775-778.

Wang, X., Z. Li, X. Li, H. Qian, X. Cai, X. Li and J. He (2016). "Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Metabolism Is Unrelated to the Sporulation and Parasporal Crystal Protein Formation in *Bacillus thuringiensis*." Frontiers in Microbiology **7**: 836.

Weissgerber, T., R. Zigan, D. Bruce, Y.-j. Chang, J. C. Detter, C. Han, L. Hauser, C. D. Jeffries, M. Land, A. C. Munk, R. Tapia and C. Dahl (2011). "Complete genome sequence of *Allochromatium vinosum* DSM 180(T)." Standards in Genomic Sciences **5**(3): 311-330.

Williams, S. F. and D. P. Martin (2005). Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHA) in Medicine and Pharmacy. Biopolymers Online, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Williamson, D. H. and J. F. Wilkinson (1958). "The Isolation and Estimation of the Poly- $\beta$ -hydroxy-butyrates Inclusions of *Bacillus* Species." Journal of General Microbiology **19**(1): 198-209.

Winsley, T., J. M. van Dorst, M. V. Brown and B. C. Ferrari (2012). "Capturing greater 16S rRNA gene sequence diversity within the domain Bacteria." Appl Environ Microbiol **78**(16): 5938-5941.

Xiao, W., W. Ren, Y. H. Zhang and L. Q. Zhao (2014). "Vascularization of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyoctanoate) osteochondral scaffold in vitro." Chinese Journal of Tissue Engineering Research **18**(8): 1185-1190.

Yang, X., H. S. Choi, C. Park and S. W. Kim (2015). "Current states and prospects of organic waste utilization for biorefineries." Renewable and Sustainable Energy Reviews **49**: 335-349.

Yin, J., H. Wang, X. Z. Fu, X. Gao, Q. Wu and G. Q. Chen (2015). "Effects of chromosomal gene copy number and locations on polyhydroxyalkanoate synthesis by *Escherichia coli* and *Halomonas* sp." Applied Microbiology and Biotechnology **99**(13): 5523-5534.

Yuan, Y. and M. Gao (2015). "Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy." Scientific Reports **5**: 10259.

Yurkov, V. V. and J. T. Beatty (1998). "Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**(3): 695-724.

Zhang, J., Q. Cao, S. Li, X. Lu, Y. Zhao, J. S. Guan, J. C. Chen, Q. Wu and G. Q. Chen (2013). "3-Hydroxybutyrate methyl ester as a potential drug against Alzheimer's disease via mitochondria protection mechanism." Biomaterials **34**(30): 7552-7562.

Zhang, W., C. Chen, R. Cao, L. Maurmann and P. Li (2015). "Inhibitors of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases: Synthesis, Molecular Docking, and Implications." ChemBioChem **16**(1): 156-166.

Zhuang, K. H. and M. J. Herrgård (2015). "Multi-scale exploration of the technical, economic, and environmental dimensions of bio-based chemical production." Metabolic Engineering **31**: 1-12.

Zia, K. M., A. Noreen, M. Zuber, S. Tabasum and M. Mujahid (2016). "Recent developments and future prospects on bio-based polyesters derived from renewable resources: A review." Int J Biol Macromol **82**: 1028-1040.