UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LETÍCIA OLIVEIRA BISPO CARDOSO

Produção de Polihidroxibutirato (PHB) por Bactérias Metilotróficas

SÃO PAULO

2017

LETÍCIA OLIVEIRA BISPO CARDOSO

Produção de Polihidroxibutirato (PHB) por Bactérias Metilotróficas

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Augusto Oller do
Nascimento

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Elen Aquino Perpetuo

SÃO PAULO

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Escola Politécnica da Universidade de São Paulo

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 27 de Abril de 2017

Leticia O. B. Cardoso

Assinatura do autor

Cláudio Augusto Oller do Nascimento

Assinatura do orientador

Catálogo-na-publicação

Cardoso, Leticia Oliveira Bispo

Produção de Polihidroxibutirato (PHB) por Bactérias Metilotróficas / L. O. B. Cardoso, E. A. Perpetuo, C. A. O. Nascimento -- versão corr. -- São Paulo, 2017.

79 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Bioprocessos 2.Biotecnologia 3.Bioprodutos I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t. III.Perpetuo, Elen Aquino IV.Nascimento, Cláudio Augusto Oller do

CARDOSO, L. O. B. **Produção de Polihidroxibutirato (PHB) por Bactérias Metilotróficas**. 2017. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Aos meus pais, por acreditarem em mim.

Ao meu amor, por todo o apoio, admiração e carinho.

À minha mãe científica, sem você nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por acreditarem nos meus sonhos mesmo que, por vezes, não os compreendam;

Ao meu amor, Danilo, por suportar toda essa jornada ao meu lado, me apoiando sempre e acreditando em mim. Sem você seria muito mais difícil, obrigada por estar comigo;

Ao meu orientador, Cláudio, por me dar a oportunidade de desenvolver o mestrado;

À minha co-orientadora, Elen, e mãe científica de coração, por toda a confiança depositada em mim e todo conhecimento compartilhado;

Aos meus companheiros de todos os dias: Ingrid, Marcela, Louise, Felipe e Bruno. Obrigada pelas risadas nos momentos de desespero, pelos cafés científicos e por todo o conhecimento e cumplicidade compartilhados;

À Dra. Maria Anita Mendes, por sempre estar disposta em ajudar quando necessário;

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, tornando possível que ele fosse realizado.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê – Arthur Schopenhauer

RESUMO

CARDOSO, L. O. B. **Produção de Polihidroxibutirato (PHB) por Bactérias Metilotróficas**. 2017. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Os plásticos, polímeros geralmente derivados de petróleo com características bastante atraentes e valor baixo estão presentes em quase todos os objetos produzidos pelos homens, desde consumo doméstico até produtos de alta tecnologia. Em 2015, aproximadamente 320 milhões de toneladas de plásticos foram produzidas e a estimativa é que este consumo continue aumentando até 2020. No entanto, cerca de 60% do que é produzido, são plásticos não biodegradáveis, os quais são persistentes ambientalmente, afetando negativamente diversos seres vivos, inclusive os seres humanos. Diante deste cenário, e como alternativa ambientalmente correta, podemos fazer uso de biopolímeros, em especial o polihidroxibutirato (PHB). O PHB é um homopolímero biodegradável, biocompatível e possui características similares às do polipropileno, podendo servir como potencial substituto a esse polímero derivado de petróleo. No entanto, o PHB ainda não está difundido no nosso cotidiano, porque apresenta alto custo de produção e purificação, principalmente devido aos substratos utilizados, que na maioria das vezes são açúcares e chegam a representar 30% do preço final do produto. Visando diminuir o preço de produção, o objetivo deste trabalho é produzir o PHB utilizando bactérias metilotróficas, isoladas de ambiente estuarino e capazes de consumir metanol. Após isolamento seletivo, duas bactérias do gênero *Methylobacterium* sp. foram isoladas e identificadas por biologia molecular e espectrometria de massas (MALDI-TOF). A produção de PHB foi estudada em frascos agitados sem quaisquer ajustes de condições físico-químicas por um período de 168 horas sob 28 °C e 180 RPM em agitador orbital de bancada e também em biorreator sob 28 °C, 180 RPM e pH 7,0 durante 96 horas. Os melhores resultados foram obtidos por *M. extorquens* sem ajuste de condições físico-químicas, tendo atingido produtividade do produto de 125 mg.L⁻¹ e acúmulo de 30% de PHB em biomassa. *M. rhodesianum* obteve produtividade do produto de 38 mg.L⁻¹ em seu melhor resultado, porém é uma produtora em potencial de polietileno glicol a partir de metanol.

Palavras-chave: Polihidroxialcanoatos. Metanol. Biopolímeros. Bioprodutos. Bactérias Metilotróficas.

ABSTRACT

CARDOSO, L. O. B. **Polyhydroxybutyrate (PHB) Production by Methylophilic Bacteria**. 2017. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Plastics, usually petroleum-derived polymers that have attractive characteristics and low price, are present in literally almost all products produced by humans. They are present since from home consuming to high technology products. In the year of 2015 approximately 320 million tons of plastics were produced and is estimate this consumption will continue to increase until 2020. However, about 60% of this production is non-biodegradable plastics, which makes them environmentally persistent, affecting negatively several living beings including humans. Considering this scenario, and as an environmentally correct alternative, we can make use of biopolymers, especially polyhydroxybutyrate (PHB). PHB is a biodegradable, biocompatible homopolymer and has characteristics similar to those of polypropylene, which may serve as a potential substitute for this petro derivative polymer. However, PHB is still not widespread in our daily lives, once has a high cost of production and purification, mainly due to the substrates used, which in most cases are sugars, and they can represent 30% of the final price of the product. In order to decrease the price of production, this work aims to produce PHB using methylotrophic bacteria, isolated from an estuarine environment and capable of consuming methanol. After a selective isolation, two bacteria of the genus *Methylobacterium* sp. were isolated and identified by molecular biology and mass spectrometry (MALDI-TOF). PHB production was studied in shake flasks without any physical-chemical adjustments for a 168 hour period under 28 °C and 180 RPM in a rotary shaker and also in bioreactor under 28 °C, 180 RPM and pH 7.0 for 96 hours. The best results were obtained by *M. extorquens* without adjustment of physical-chemical conditions, reaching a product productivity of 125 mg.L⁻¹ and accumulation of 30% of PHB in biomass. *M. rhodesianum* obtained product productivity of 38 mg.L⁻¹ at its best result, but is a potential producer of polyethylene glycol from methanol.

Key-words: Polyhydroxyalkanoates. Methanol. Biopolymers. Bioproducts. Methylophilic Bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Blocos de países produtores de plásticos mundialmente.	18
Figura 2 – Capacidade de produção de bioplásticos em 2014, por tipo de material.	19
Figura 3 – Estrutura geral da molécula de um polihidroxialcanoato (PHA).	23
Figura 4 – Estrutura molecular do monômero de polihidroxibutirato (PHB).	23
Figura 5 – Esquema representando as principais vias metabólicas de bactérias metilotróficas a partir do metano.	30
Figura 6 – Representação do metabolismo de síntese do PHB através do metanol.	31
Figura 7 – Valor comercial dos principais substratos utilizados na produção de PHAs.	34
Figura 8 – Representação dos pontos de coleta de amostra no Sistema Estuarino de Santos (SES) no Estado de São Paulo.	37
Figura 9 – Representação da coleta de amostras e isolamento realizados no Sistema Estuarino de Santos.	38
Figura 10 – Representação da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper.	40
Figura 11 – Representação da técnica de coloração por Sudan Black B para análise de grânulos intracelulares.	42
Figura 12 – Representação do princípio da técnica de espectrofotometria.	44
Figura 13 – Representação da determinação de peso seco.	45
Figura 14 – Representação da metodologia empregada na quantificação de biomassa seca.	46
Figura 15 – Representação da metodologia utilizada para extração de PHB intracelular, adaptado de Law & Slepecky (1961).	47
Figura 16 – Espectro de massas obtido para o Isolado 1 através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper.	50
Figura 17 – Espectro de massas obtido para o Isolado 2 através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper.	50
Figura 18 – Espectro de massas obtido para a bactéria de coleção de cultura adquirida do CBMAI através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper.	51
Figura 19 – Representação da morfologia das bactérias.	52
Figura 20 – Análise microscópica para identificação de grânulos intracelulares, que podem ser visualizados em azul.	53
Figura 21 – Monitoramento do pH e da biomassa de <i>M. extorquens</i> CBMAI.	54

Figura 22 – Monitoramento da biomassa e da produção de biopolímero por <i>M. extorquens</i> CBMAI.	55
Figura 23 – Representação do acúmulo de biopolímero por biomassa por <i>M. extorquens</i> CBMAI.	55
Figura 24 – Caracterização do PHB produzido por <i>M. extorquens</i> CBMAI por espectrometria de massas MALDI-TOF.	56
Figura 25 – Monitoramento do pH e da biomassa por <i>M. extorquens</i> MB91.	57
Figura 26 – Monitoramento do pH e da biomassa por <i>M. rhodesianum</i> B237.	57
Figura 27 – Monitoramento da biomassa e da produção de biopolímero por <i>M. extorquens</i> MB91.	58
Figura 28 – Monitoramento da biomassa e da produção de biopolímero por <i>M. rhodesianum</i> B237.	58
Figura 29 – Representação do acúmulo de biopolímero por biomassa por <i>M. extorquens</i> MB91.	59
Figura 30 – Representação do acúmulo de biopolímero por biomassa por <i>M. rhodesianum</i> B237.	59
Figura 31 – Caracterização do homopolímero produzido por <i>M. extorquens</i> MB91 através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF.	60
Figura 32 – Caracterização do homopolímero produzido por <i>M. rhodesianum</i> B237 através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF.	60
Figura 33 – Monitoramento da biomassa e do consumo de metanol por <i>M. extorquens</i> MB91. Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L ⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.	62
Figura 34 – Monitoramento da biomassa e do consumo de metanol por <i>M. rhodesianum</i> B237.	62
Figura 35 – Monitoramento da biomassa e do consumo de metanol por <i>M. extorquens</i> MB91.	63
Figura 36 – Monitoramento da biomassa e do consumo de metanol por <i>M. rhodesianum</i> B237.	64
Figura 37 – Demonstração da característica das bactérias <i>M. extorquens</i> MB91 e <i>M. rhodesianum</i> B237 à formação de biofilme.	64
Figura 38 – Relação da porcentagem de biopolímero em biomassa em <i>M. extorquens</i> MB91.	65

Figura 39 – Relação da porcentagem de biopolímero em biomassa em <i>M. rhodesianum</i> B237.	66
Figura 40 – Curva de calibração realizada para quantificar o metanol.	76
Figura 41 – Exemplo de cromatograma de metanol analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Tempo de retenção do metanol em 18.9 minutos.	76
Figura 42 – Curva de peso seco realizada para a bactéria <i>Methylobacterium extorquens</i> CBMAI, nas seguintes absorvâncias: 0; 0,2; 0,6; 0,8 e 1,0.	76
Figura 43 – Comprovante de apresentação de trabalho em congresso nacional.	78
Figura 44 – Representação dos créditos obtidos para depósito da dissertação durante os 48 meses de mestrado.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas do polihidroxibutirato (PHB) e do polipropileno (PP).	24
Tabela 2 – Principais fabricantes de PHB no mundo.	26
Tabela 3 – Principais microrganismos utilizados na produção de PHAs.	29
Tabela 4 – Classificação das pontuações fornecidas pelo equipamento, de acordo com o fabricante.	51
Tabela 5 – Identificação em nível de gênero e espécie obtidos através da espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper.....	51
Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos para os ensaios em frascos agitados sem quaisquer ajustes de condições físico-químicas.	66
Tabela 7 – Resumo dos resultados obtidos para os ensaios em biorreator com controle de pH.	66
Tabela 8 – Cronograma apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química com as atividades previstas para o mestrado.	79
Tabela 9 – Cronograma com as atividades realizadas ao longo dos 48 meses de mestrado. ...	79

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

4HB	Monômero de ácido 4-hidroxibutírico
Bio-PA	Poliamida de origem biológica
Bio-PE	Polietileno de origem biológica
Bio-PET30	Tereftalato de polietileno de origem biológica
CBB	Ciclo de Benson-Bhassham
CBMAI	Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria
CHCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico
HB	Monômero de ácido 3-hidroxibutírico
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
HV	Monômero de ácido valérico
<i>mcl</i> -PHAs	“ <i>medium chain length</i> ”-PHAs
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
P(3HB-co-4HB)	Poli (3-hidroxibutirato- <i>co</i> -4-hidroxibutirato)
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
PHB- <i>co</i> -HV	Poli (hidroxibutirato- <i>co</i> -valerato)
PHB- <i>co</i> -HX	Poli (hidroxibutirato- <i>co</i> -hexanoato)
PLA	Ácido polilático
PP	Polipropileno
PTT	Tereftalato de polítrimetileno
RID	“ <i>Refractive Index Detector</i> ”
RPM	Rotações por minuto
RuMP	Ciclo da Ribulose Monofosfato
<i>scl</i> -PHAs	“ <i>short chain length</i> ”-PHAs
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SES	Sistema Estuarino de Santos
STR	“ <i>Stirred Tank Reactor</i> ”
TCA	Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos
USEPA	“ <i>United States Environmental Protection Agency</i> ”
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrometro
$D(-)$	Dextrógiro
Da	Dalton
GPa	Gigapascal
Mpa	Megapascal
Y_p/s	Fator de conversão produto em célula
Y_x/s	Fator de conversão substrato em célula
P_p	Produtividade do produto
μL	Microlitro
Nm	Nanometro
Hz	Hertz
Ns	Nanosiemens
kV	Quilovolt
kDa	Quilodalton

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos gerais	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Polihidroxialcanoatos (PHAs)	22
3.2 Polihidroxibutirato (PHB)	23
3.2.1 Histórico	25
3.2.2 PHB em escala industrial	25
3.3 Fatores que influenciam a produção de PHAs	27
3.4 Extração dos PHAs	27
3.5 Microrganismos produtores de PHAs	28
3.6 Bactérias metilotróficas	29
3.6.1 Metabolismo	30
3.6.2 Produção de PHB por bactérias metilotróficas	32
3.7 Metanol como substrato	33
3.8 Biodegradabilidade	34
3.9 Parâmetros cinéticos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Reagentes	37
4.2 Coleta de amostras	37
4.3 Isolamento	38
4.3.1 <i>Methylobacterium extorquens</i> de referência	39
4.4 Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper	39
4.5 Identificação através da amplificação do gene 16S rRNA	40

4.6 Meio de cultura para produção de PHB.....	41
4.7 Sudan Black B	42
4.8 Culturas em frascos agitados	42
4.8.1 Pré-inóculo	42
4.8.2 Culturas em agitador orbital de bancada	43
4.9 Culturas em biorreator	43
4.10 Técnicas analíticas	44
4.10.1 Medida indireta do crescimento celular por absorbância.....	44
4.10.1.1 Curva de massa seca	45
4.10.1.2 Medida do crescimento celular através de peso seco	45
4.10.1.3 Consumo de metanol.....	46
4.10.1.4 Leitura de pH.....	46
4.10.1.5 Extração de PHB	47
4.10.1.6 Quantificação de PHB	48
4.10.1.7 Caracterização de PHB.....	48
4.11 Parâmetros de conversão	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Isolamento e identificação bacterianos	50
5.2 Sudan Black B	53
5.3 Ensaio preliminares	54
5.4 Ensaio em frascos agitados	56
5.5 Ensaio em biorreator	63
6 CONCLUSÕES	67
¹ REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	75

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos derivados do petróleo são dominantes mundialmente devido à sua ampla gama de utilidades, que vão desde embalagens e bens de consumo à peças automotivas e eletrônicos. Aproximadamente 320 milhões de toneladas de plásticos foram produzidas no ano de 2015 e a estimativa é que este consumo continue aumentando até 2020 (Plastics Europe, 2016). Somente no ano de 2014 a China foi capaz de produzir aproximadamente 68 milhões de toneladas, tornando-se o maior país produtor de plásticos mundialmente (Figura 1). Na Europa, segundo lugar na lista de maiores produtores de plástico, a maior demanda por plásticos vem do setor de embalagens, o que inclui principalmente as sacolas plásticas e as embalagens de alimentos (Plastics Europe, 2016). Esse é um dado alarmante, pois estes produtos são muito utilizados em nosso cotidiano, e muito do que é produzido e consumido não é descartado adequadamente, tornando-se persistente ambientalmente, prejudicando toda a biota.

Figura 1 – Blocos de países produtores de plásticos mundialmente.

Fonte: Adaptado de Plastics Europe, 2016.

O Brasil é responsável pela produção de 6,5 milhões de toneladas de plásticos no mundo, principalmente nos setores de construção civil, alimentos e automóveis. Aproximadamente, 80% da coleta dos resíduos urbanos são realizadas por caminhões de lixo,

sendo que esse serviço está disponível em 90% dos municípios brasileiros. No entanto, a coleta seletiva que destina os rejeitos à reciclagem está presente em apenas 15% destes (ABIPLAST, 2015). Fato ainda mais preocupante é que hoje, cerca de 60% do que é produzido são plásticos não biodegradáveis (Figura 2) (European Bioplastics, 2015).

Figura 2 – Capacidade de produção de bioplásticos em 2014, por tipo de material.

Fonte: Adaptado de European Bioplastics, 2015.

Uma alternativa ambientalmente correta à produção de plásticos petroderivados são os bioplásticos, ou também denominados de biopolímeros. Em especial, os polihidroxialcanoatos (PHAs) representam uma classe de polímeros que podem servir como potenciais substitutos aos plásticos convencionais. Isso porque os PHAs são produzidos naturalmente por bactérias através de fontes renováveis, são biodegradáveis e também biocompatíveis, ou seja, não produzem subprodutos tóxicos durante o seu processo de degradação. Nesse sentido, utilizar-se de uma fonte de substrato de baixo custo como o metanol para produção de polihidroxibutirato (PHB), um biopolímero da classe dos PHAs, seria uma alternativa ambientalmente e economicamente mais viável como alternativa à produção e consumo de plásticos mundialmente.

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são uma classe de biopolímeros produzidos naturalmente por bactérias como grânulos de reserva de energia. Eles são biodegradáveis e

podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, possuindo características variadas de acordo com a sua composição monomérica. Atualmente existe cerca de 150 monômeros datados na literatura, o que atribui a eles uma ampla gama de aplicabilidades e potencial poder de substituição frente aos polímeros convencionais (KHOSRAVI-DARANI et al., 2013; URTUVIA et al., 2014).

No entanto, entre os principais gargalos de produção dos PHAs estão o alto custo de produção e purificação. Os substratos utilizados atualmente são, em sua maioria, açúcares, e por este motivo, eles possuem também uma grande limitação de uso e custo, pois são fontes de alimento, sendo esta finalidade mais nobre para sua utilização (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011; URTUVIA et al., 2014). Esses fatores restringem a produção deste tipo de biopolímeros, sendo que a produção total de polímeros em 2014 foi de apenas 2%, por exemplo (European Bioplastics, 2015).

Atualmente, existe uma planta industrial produtora de PHB localizada no município de Serrana-SP, a qual utiliza o açúcar extraído da cana-de-açúcar como substrato. No entanto, toda a sua produção é exportada, porque o PHB ainda possui alto custo para o mercado interno, mas é muito interessante comercialmente para o mercado externo. A planta piloto produz de 50 a 60 toneladas por ano de PHB, o qual é exportado para o Japão, os EUA e a Europa. A resina biodegradável custa quatro vezes mais que a normal, mas há dois pontos a destacar: a escala ainda é muito reduzida e ninguém consegue produzi-la mais barata que o Brasil. O quilo do PHB de açúcar custa US\$5 dólares, sendo que o equivalente na Inglaterra custa US\$14 dólares, por esta razão ainda é vantajoso para o mercado exterior. A competitividade do preço aliada à maior consciência dos consumidores e ao maior nível de exigência da legislação ambiental em alguns países desenvolvidos incentivam o investimento em pesquisa sobre o PHB em escala industrial (Agência FAPESP, 2012).

A fim de reduzir o custo de produção, novas fontes de substrato têm sido estudadas, entre elas o metanol, que é um substrato de baixo custo. Além disso, bactérias metilotróficas, capazes de utilizá-lo como substrato, ocorrem naturalmente no meio ambiente. Neste contexto, o presente trabalho visa produzir, especificamente, o polihidroxibutirato (PHB) por bactérias metilotróficas, isoladas de ambiente estuarino impactado por atividade antrópica. O PHB é o polihidroxialcanoato mais estudado atualmente e possui uma variedade de aplicações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho visa analisar a produção de polihidroxibutirato (PHB) a partir de metanol por bactérias metilotróficas. Estas bactérias foram isoladas de ambiente estuarino da cidade de Santos, no Estado de São Paulo, e a produção do biopolímero pelos isolados foi estudada.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Realizar o isolamento de bactérias metilotróficas do Sistema Estuarino de Santos (SES);
- ❖ Identificar os isolados em nível de gênero e espécie através das técnicas de espectrometria de massas e biologia molecular;
- ❖ Avaliar a produção do biopolímero em agitador orbital de bancada;
- ❖ Quantificar a produção do biopolímero;
- ❖ Caracterizar o biopolímero por espectrometria de massas;
- ❖ Avaliar a produção do biopolímero em biorreator controlando o pH, a fim de estudar sua influência na produção do biopolímero;
- ❖ Estabelecer os parâmetros de conversão de substrato em célula e produto (PHB).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Os PHAs são uma classe de biopolímeros biodegradáveis produzidos naturalmente por bactérias. Além disso, eles também são biocompatíveis, ou seja, não produzem metabólitos tóxicos durante seu processo de degradação, e também podem ser produzidos através de fontes renováveis.

Suas propriedades variam de acordo com sua composição monomérica, que depende diretamente da fonte de substrato utilizada para sua produção, além de outros fatores. Atualmente existem cerca de 150 monômeros diferentes datados na literatura, o que atribui à esta classe de biopolímeros uma ampla gama de características, podendo ser elas termoplásticas, termofixas, mecânicas ou elastoméricas. Essa versatilidade mostra o seu potencial para substituição aos polímeros convencionais, principalmente devido a ampla gama de aplicabilidades que podem ser atingidas de acordo com a composição monomérica do polímero formado.

Em condições aeróbias são degradados completamente em dióxido de carbono e água e em condições anaeróbias podem ser convertidos em metano através de microrganismos presentes no solo, mar e água (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010).

Os PHAs são sintetizados dentro do citoplasma das bactérias, como grânulos intracelulares de reserva de energia. Estes biopolímeros podem chegar a atingir 90% (m/m) em biomassa, uma vez que isso não altera, de forma considerável, a pressão osmótica dentro da célula (LAYCOCK et al., 2014). Eles possuem tamanho aproximado de 0,2-0,5 μm , são hidrofóbicos e apresentam configuração *D*(-), devido à estereoespecificidade da enzima PHA sintase (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Por serem grânulos de reserva de energia, eles somente são sintetizados em condições específicas de cultivo, como quando há excesso de fonte de carbono e limitação de nutrientes. Uma vez acabada a fonte de carbono, os PHAs são utilizados como fonte de energia para o crescimento bacteriano (SUDESH; ABE; DOI, 2000; CHODAK, 2008; LAYCOCK et al., 2014; GE et al., 2016).

A molécula de um PHA (Figura 3) é composta por monômeros condensados por ligações éster. A composição monomérica do biopolímero, além de seu peso molecular e outros parâmetros está diretamente ligada ao substrato que é oferecido à bactéria e também ao

seu modo de cultivo. De acordo com a sua estrutura molecular, pode-se dividir os monômeros de PHAs em duas classes: a) os *short-chain length* PHAs (scl-PHAs), que possuem de 3-5 átomos de carbono e b) os *medium-chain length* PHAs (mcl-PHAs) que possuem de 6-18 átomos de carbono.

Figura 3 – Estrutura geral da molécula de um polihidroxialcanoato (PHA).

Fonte: Acervo pessoal.

Em geral, o peso molecular dos PHAs pode variar entre 2×10^5 e 3×10^6 Da (SUDESH; ABE; DOI, 2000). Quanto maior a massa molecular do biopolímero produzido, melhores serão as suas propriedades, possibilitando sua utilização na produção de biofilmes e fibras por extração quente ou fria, por exemplo (AGUS et al., 2006). Atualmente, o polihidroxibutirato, um scl-PHA, é o mais conhecido e vem sendo largamente estudado devido às suas propriedades de grande valor agregado.

3.2 Polihidroxibutirato (PHB)

O polihidroxibutirato (PHB) é um homopolímero, ou seja, ele é composto apenas por monômeros do ácido 3-hidroxibutírico (Figura 4). Ele possui propriedades físico-químicas muito similares às do polipropileno (PP), principal polímero petroderivado consumido mundialmente (ABIPLAST, 2014), tendo um grande potencial para sua substituição. Além disso, o PHB é inerte, biodegradável, possui resistência aos raios ultravioleta (UV) e também possui ótimas propriedades termoplásticas (HOLMES, 1985; KESHAVARZ; ROY, 2010).

Figura 4 – Estrutura molecular do monômero de polihidroxibutirato (PHB).

Fonte: Acervo pessoal.

Os átomos de carbono assimétricos da molécula de PHB possuem configuração *D*(-), e por este motivo, apresentam alto grau de cristalinidade (55-80%), atribuindo ao polímero uma relativa fragilidade. Além disso, o PHB apresenta uma característica de cristalização secundária que o torna ainda mais quebradiço conforme o tempo (VIZCAINO-CASTON et al., 2016). Como dito anteriormente, suas melhores características são as termoplásticas.

A Tabela 1 reúne as características físico-químicas do PHB em comparação com as do PP. Nela, pode ser observado que a maior parte das características de ambos polímeros são similares, como por exemplo: a temperatura de fusão, cristalinidade, densidade e Módulo de Young, sendo este último um parâmetro que mede a rigidez de materiais sólidos, podendo variar entre 0,002 e 4,8 GPa. As principais diferenças entre ambos os polímeros são àquelas relacionadas às características elastoméricas, como a força de tensão e resistência à ruptura, as quais são melhores no PP, ressaltando novamente o potencial termoplástico do PHB.

Tabela 1 – Características físico-químicas do polihidroxibutirato (PHB) e do polipropileno (PP).

Características	PHB	Polipropileno
Temperatura de fusão (°C)	175	176
Temperatura de transição vítrea (°C)	4	-10
Cristalinidade (%)	60	50
Densidade (g.cm ³)	1.25	0.91
Módulo de Young (GPa)	3.5	1.5
Força de tensão (MPa)	0	38
Resistência à ruptura (%)	5	400

Fonte: Adaptado de Chodak (2008).

Suas características termoplásticas são muito importantes, permitindo sua aplicação em tesouras, fraldas e embalagens de cosméticos. Atualmente, estima-se seu uso até mesmo na área médica em produtos cardiovasculares, devido a sua eficácia no reparo de tecidos moles e de nervos, em tratamentos dentários e também como suturas e bandagens (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; KESHAVARZ; ROY, 2010). Contudo, caso a aplicação a qual o PHB for destinado necessite de propriedades elastoméricas, estas podem ser atribuídas a ele adicionando-se monômeros de ácido hidroxivalérico à molécula, transformando-o em

um copolímero denominado de PHB-*co*-HV. Depois do PHB, este copolímero é o mais estudado, especialmente devido a sua característica de suplementação ao PHB.

3.2.1 Histórico

Beijerinck foi o primeiro a observar a produção de PHAs, em 1888. Por falta de conhecimento, ele os denominou como lipídeos, conceito este que só foi mudar em 1925 quando Lemoigne definiu as inclusões lipídicas produzidas por *Bacillus megaterium* como sendo o homopolímero polihidroxibutirato. A partir daí, iniciaram-se mais estudos a fim de aprofundar os conhecimentos na área e em 1950 já se podia afirmar com clareza que estas inclusões serviam como reserva de energia para uma variedade de bactérias. Ainda no final desta década, Stanier e colaboradores descobriram que esta reserva de energia era, na verdade, uma resposta à limitação de nutrientes quando em excesso de carbono (SUDESH; ABE; DOI, 2000; KESHAVARZ; ROY, 2010).

Até então, somente o homopolímero PHB era conhecido, mas em 1974, Wallen e Rohwedder identificaram os monômeros de 3-hidroxivalerato e 3-hidroxihexanoato em extração feitas em clorofórmio a partir de lodo de esgoto ativado. Logo, iniciaram-se estudos para melhor caracterizar esses polímeros formados em relação às suas massas moleculares, cristalinidade, entre outras propriedades e também descobrir novos monômeros. No início da década de 1980, a *Imperial Chemical Industries Ltd.* foi pioneira e começou a produzir um biopolímero com qualidades termoplásticas, constituído de monômeros de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxivalerato, ou seja, um copolímero. A bactéria utilizada na época foi a que hoje é denominada como *Cupriavidus necator*, e foi capaz de produzir 90% de copolímero em massa seca em um processo de fermentação de larga escala. Este copolímero final foi denominado pela companhia de “*Biopol*”. A partir dos anos 2000, o foco passou a ser na engenharia metabólica, pois uma vez conhecidas as enzimas necessárias para a produção de biopolímeros, e quais microrganismos são capazes de produzi-los, pode-se escolher as melhores condições para a produção destes (CHODAK, 2008).

3.2.2 PHB em escala industrial

Atualmente o PHB já é produzido em escala industrial em sua forma de homopolímero e também como copolímero (junção de mais um monômero no mesmo polímero), inclusive

por uma empresa brasileira. A PHB Industrial S.A. é responsável pela marca “*Biocycle*”, e é pioneira no Brasil em estudos com o homopolímero polihidroxibutirato e também com o copolímero PHB-HV para aplicações na área de injeção, extrusão e poliuretanas. Ela produz o PHB através de cana-de-açúcar utilizando a bactéria *Cupriavidus necator* e possui, hoje, uma planta piloto situada na cidade de Serrana, no interior do Estado de São Paulo. Em atividade desde 1995, apresenta capacidade de produção de até 50 toneladas por ano (Biocycle, 2016).

O biopolímero produzido pela PHB Industrial é produzido através da sacarose obtida da cana-de-açúcar, e por este motivo ele é considerado caro para o mercado interno do país. No entanto, ele possui valor para o mercado exterior, pois o preço do PHB brasileiro custa em média \$5 dólares, enquanto que o equivalente na Inglaterra custa \$14 dólares. Isso ocorre, pois, apesar de ambos utilizarem a mesma fonte de substrato, ela é obtida a partir de produtos diferentes. Enquanto o PHB produzido no exterior utiliza sacarose obtida da beterraba, no Brasil ela é obtida a partir da cana-de-açúcar, barateando seu custo no mercado externo (Agência FAPESP 2012).

No entanto, como pode ser visto na Tabela 2, existe atualmente uma tendência mundial entre os principais produtores de PHB em se utilizar de açúcares como substrato, mesmo estando atribuído a ele um maior custo de produção.

Tabela 2 – Principais fabricantes de PHB no mundo.

Fabricante	Marca	Microrganismo	Fonte de Carbono	Tipo de PHA	PHB/ Biomassa (%)
Biomer, Alemanha	Biomer	<i>Alcaligenes latus</i>	Sacarose da Beterraba	PHB	> 75
PHB Industrial, Brasil	Biocycle	<i>Cupriavidus necator</i>	Sacarose da Cana-de-açúcar	PHB	> 90
Metabolix, EUA	Mirel	<i>Cupriavidus necator</i>	Glicose	P(3HB-co-4HB)	> 75
Tianan Biologic Material, China	Enmat	<i>Cupriavidus necator</i>	Glicose + Propionato	P(HB-co-HV)	> 75
ETH, Suíça	PHA	<i>Pseudomonas putida</i>	Ácidos graxos	mcl-PHAs	Aprox. 60

Fonte: Adaptado de Mozejko-Ciesielska & Kiewisz (2016)

Contudo, a competitividade do preço do PHB aliada à maior consciência dos consumidores e também ao maior nível de exigência da legislação ambiental em alguns países desenvolvidos incentivam o investimento em pesquisa sobre o PHB em escala industrial.

3.3 Fatores que influenciam a produção de PHAs

A produção de polihidroxialcanoatos está diretamente ligada a condições específicas de crescimento. Entre elas, está a limitação de nutrientes, que podem vir a ser o oxigênio, nitrogênio e fósforo. A completa ausência de nutrientes não é interessante, pois estes são essenciais para o metabolismo bacteriano. Para que a célula perceba a necessidade de produzir grânulos de reserva e, conseqüentemente produza o PHB é necessário que os nutrientes estejam presentes, e que também haja excesso de fonte de carbono (SINGH SAHARAN; GREWAL; KUMAR, 2014). Nesse sentido, diversos estudos foram realizados visando obter o melhor meio de cultura para os microrganismos produtores de PHAs. Bourque et al. (1995) e Mokhtari-Hosseini et al., (2009a) estudaram a influência dos sais presentes no meio de cultura, sendo que este último trabalho chegou a conclusões de que deficiências de nitrogênio, qualquer que seja sua fonte, fósforo e magnésio implicam diretamente no acúmulo de PHB dentro das células de *Methylobacterium extorquens*.

Além disso, o pH também é um fator importante, pois estudos mostram que as bactérias tendem a manter o pH citoplasmático compatível com aquele ótimo para o funcionamento da célula, ou seja, entre 7,0 – 8,0 (CHEN et al., 2013b). Ele é um fator físico-químico determinante principalmente quando estudada a composição monomérica do biopolímero, pois um pH básico favorece o acúmulo de monômeros de ácido hidroxivalérico (HV). Outros estudos mostram que um consórcio bacteriano conseguiu acumular 25% de PHB em massa seca em pH 7, enquanto que acumulou 15% e 8,5% em pH 6,0 e 9,0, respectivamente, comprovando que um pH neutro favorece a formação de biopolímeros (SINGH SAHARAN; GREWAL; KUMAR, 2014; VENKATA MOHAN et al., 2010).

3.4 Extração dos PHAs

Os PHAs, em sua maioria, são produzidos intracelularmente. Nesse sentido, é necessário que seja realizado um processo de extração preliminar à sua purificação, que consiste basicamente no rompimento da parede celular da bactéria para a que haja a remoção

da camada proteica que envolve os PHAs. O polímero então pode ser recuperado através de solubilização em solvente apropriado. A extração pode ser realizada através de diversos métodos, sendo os mais conhecidos e utilizados a extração por solventes e a digestão química ou enzimática.

A extração por solvente foi um dos primeiros métodos a ser utilizado para recuperar os PHAs de dentro das células bacterianas. O princípio dessa técnica é de que o solvente é capaz de modificar a permeabilidade da parede celular, fazendo com que o biopolímero seja liberado da célula. Para realizar sua recuperação, utiliza-se um solvente no qual o biopolímero precipite e então se pode realizar a separação por centrifugação ou filtração. As principais vantagens da utilização desse método são o alto teor de pureza do biopolímero extraído, uma vez que o solvente não causa sua degradação. Além disso, a utilização de solventes proporciona também a remoção de endotoxinas, permitindo sua utilização em aplicações médicas. Por outro lado, prejudica a morfologia natural dos grânulos, que podem ser úteis na produção de fibras (JACQUEL et al., 2008).

O método de digestão química é uma alternativa à utilização de solventes para a extração dos biopolímeros, evitando assim danos ambientais e diminuindo os custos dos processos de recuperação do produto. Nesse método o foco é solubilizar todo e qualquer material celular que esteja em torno dos PHAs, podendo, então, purificá-los. Um dos métodos mais utilizados é a digestão química, que utiliza hipoclorito de sódio (NaClO) ou até mesmo surfactantes para solubilizar os materiais celulares. Existem também métodos envolvendo enzimas, porém estes acabam por encarecer o processo, e por este motivo, são métodos pouco utilizados.

3.5 Microrganismos produtores de PHAs

Os microrganismos capazes de produzir PHAs são bactérias, em sua maioria. Essas bactérias ocorrem naturalmente na natureza, e podem produzir os biopolímeros através de diversas fontes de carbono. Levando em consideração o valor agregado do produto e o alto custo de produção que a sua biossíntese apresenta, é necessário que o microrganismo escolhido para este fim possua taxas de conversão de substrato em produto elevadas, bem como sua taxa de crescimento, a fim de produzir uma quantidade maior de polímero em um menor espaço de tempo (RAMSAY et al., 1990). Outro fator importante a ser considerado é a

porcentagem de PHB em biomassa, que segundo estudos realizados (RAMSAY et al., 1990), deve ser superior a 60% para que o processo seja viável em escala industrial.

Atualmente, existe uma gama variada de bactérias sendo utilizadas na produção de PHAs, como pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3 – Principais microrganismos utilizados na produção de PHAs.

Microrganismos	Biopolímero/Monômeros	Fonte
<i>Cupriavidus necator</i>	PHB; P(3HB-co-3HV)	(Bormann & Roth, 1999; García et al., 2013)
<i>Azotobacter sp.</i>	PHB	(Chen & Page, 1997; Peña et al., 2014)
<i>Pseudomonas sp.</i>	PHB	(Ashby et al., 2015; Costa et al., 2009)
<i>Methylobacterium sp.</i>	PHB; PHB-co-HV	(Mothes; Ackermann; Babel, 1998; Orita et al., 2014)
<i>Aeromonas sp.</i>	PHB-co-HX; PHB	(Chen et al., 2013b; Qiu; Han; Chen, 2006)
<i>Bacillus sp.</i>	HB; HV; 4HB; PHB-co-HV	(Kumar et al., 2015; Valappil et al., 2007)

Fonte: Adaptado de Anjum et al. (2016)

3.6 Bactérias metilotróficas

Bactérias metilotróficas são aquelas capazes de consumir moléculas que contenham apenas um átomo de carbono como única fonte de carbono para o seu crescimento. Dentre os substratos mais comuns estão o metano, metanol, aminas metílicas, halo metanos e espécies metílicas contendo enxofre. Essas bactérias receberam diversas classificações ao longo dos anos, podendo ser divididas de acordo com o substrato utilizado para crescimento em a) facultativas, capazes de consumir, também, compostos com mais de um átomo de carbono, ou b) obrigatórias, que consomem apenas carbonos primários. Também podem ser divididas em Tipo I e II, de acordo com a via metabólica utilizada para assimilação do carbono, além de poderem ser autotróficas ou heterotróficas (CHISTOSERDOVA, 2011).

Elas podem ser encontradas em diversos ambientes, sendo mais comuns em solos, como na rizosfera de arrozais, por exemplo, devido à produção natural de metano; podem ser

encontradas também em plantas, pois estas produzem metanol e em menor quantidade em ambientes marinhos, devido ao metano dissolvido no oceano (CHISTOSERDOVA, 2015).

A característica de metilotrofia associada às bactérias possui três objetivos metabólicos principais, sendo 1) oxidar carbonos primários a formaldeído, mesmo este sendo um intermediário extremamente tóxico para elas, 2) oxidar o formaldeído à CO_2 e 3) assimilar uma unidade de carbono primário, podendo ser a) à formaldeído, no caso do Ciclo da Ribulose Monofosfato (RuMP), b) à CO_2 , no caso do Ciclo de Calvin Benson-Bassham (CBB) ou c) a uma combinação de metileno- H_4F e CO_2 no caso do Ciclo das Serinas. Isso torna estes microrganismos potenciais hospedeiros para a produção de compostos de grande valor agregado, como os PHAs (CHISTOSERDOVA, 2011; OCHSNER et al., 2015).

3.6.1 Metabolismo

O metabolismo de bactérias metilotróficas é variado, porém constitui três etapas essenciais, sendo 1) a oxidação da fonte de carbono primária a formaldeído, o qual pode ser transformado em um radical metil ou metileno acompanhado de um tetrahydrofolato (H_4F); 2) transformação da molécula de formaldeído (metil ou metileno- H_4F) em CO_2 e 3) assimilação da fonte de carbono primária a ser utilizada nos diversos metabolismos. No Ciclo RuMP utiliza-se o formaldeído, enquanto que o Ciclo de Benson-Bhassham utiliza o CO_2 e o Ciclo das Serinas utiliza a combinação de ambos (CHISTOSERDOVA, 2011). A Figura 5 representa um esquema para melhor compreensão do metabolismo metilotrófico.

Figura 5 – Esquema representando as principais vias metabólicas de bactérias metilotróficas a partir do metano.

Fonte: Adaptado de Chistoserdova, 2011.

3.6.1.1 Biossíntese de PHB

A produção de PHB acontece sob condições específicas de crescimento, pois quando as condições de cultivo estão balanceadas, a produção de Acetil-CoA é alta. Contudo, ele é direcionado para a via do ácido cítrico, inibindo a produção de PHB. Quando há a limitação de nutrientes, o Acetil-CoA não consegue ser oxidado de maneira rápida o suficiente na via TCA, e acaba se acumulando. Quando isso ocorre em excesso de fonte de carbono, esse Acetil-CoA acumulado é direcionado para a via do PHB, sendo transformado no homopolímero e armazenado até que a fonte de carbono se esgote (CHODAK, 2008).

Figura 6 – Representação do metabolismo de síntese do PHB através do metanol.

Fonte: Adaptado de Khanna; Srivastava, (2005) e Korotkova; Lidstrom (2001).

Representação das enzimas envolvidas na produção de PHB. Em 1) β -ketotiolase, 2) acetoacetyl-CoA redutase, 3) PHB sintase, 4) PHB depolimerase, 5) β -hidroxibutirato desidrogenase e 6) acetoacetato-succinato-CoA transferase.

Como pode ser visto na Figura 6, existem três enzimas principais para que esse processo aconteça, sendo elas a β -ketotiolase, NADPH ligada a uma acetoacetyl-CoA redutase e PHB sintase, sendo esta última a responsável específica pela produção de PHB. Quando a fonte de carbono é esgotada, o PHB passa a servir como a fonte de carbono de reserva. Essa

ação é realizada através das enzimas PHB depolimerase, β -hidroxibutirato desidrogenase, acetoacetato-succinato-CoA transferase e β -ketolase.

3.6.2 Produção de PHB por bactérias metilotróficas

Os polihidroxialcanoatos, de forma geral, são sintetizados por uma variada gama de bactérias capazes de utilizar diversos substratos, como por exemplo, as do gênero *Bacillus* sp., *Aeromonas* sp., *Rhodococcus* sp. e *Ralstonia eutropha* (HAYWOOD et al., 2010; JIAN et al., 2010; KIM et al., 2003; LABUZEC; RADECKA 2001).

No entanto, apesar de algumas destas bactérias conseguirem produzir copolímeros, PHAs de alto valor agregado, elas o fazem a partir de substratos dispendiosos. HAYWOOD et al. (1990) relataram a produção de P(3HB-co-3HV) a partir de *Rhodococcus* sp. a partir de glicose. VALAPPIL et al. (2007) conseguiram produzir um copolímero contendo monômeros de 3-hidroxibutirato (3HB), 3-hidroxivalerato (3HV) e 4-hidroxibutirato (4HB) por *Bacillus* sp., porém, eles utilizaram vários açúcares para tanto, e como já foi mencionado, este tipo de substrato encarece o preço do produto final. MIZUNO et al. (2010) também relataram a produção de P(3HB-co-3HV), porém também utilizaram glicose como substrato.

Além destes autores, muitos outros produziram PHAs através de açúcares, sendo este um substrato bem estabelecido para este fim. No cenário acadêmico, utilizar de protocolos bem estabelecidos para descobrir novos monômeros de PHAs é interessante, porém quando considerado o cenário econômico, é necessário buscar alternativas aos substratos que podem encarecer o preço final do biopolímero produzido. Neste sentido, já existem alguns estudos que buscam utilizar outras fontes de carbono. GHATE et al. (2011), por exemplo, conseguiram produzir PHB utilizando *Bacillus* sp. com material oriundo de agroindústrias.

Em relação às bactérias metilotróficas, especificamente, nota-se que os estudos avançaram bastante desde BOURQUE et al. (1992). Neste estudo, os autores conseguiram produzir PHB através de metanol utilizando uma *Methylobacterium* sp. em uma concentração de 25% de PHB em biomassa. Posteriormente, YEZZA et al. (2006) conseguiram aumentar esta proporção para até 40% de PHB em biomassa sem qualquer otimização de cultivo e também conseguiram produzir o copolímero P(3HB-co-3HV) através do metanol utilizando o mesmo gênero de bactéria. Ainda buscando otimizar a produção de PHB, MOKHTARI-HOSSEINI et al. (2009a) utilizaram um regime de batelada alimentada para buscar aumentar a produção de PHB e ZUÑIGA et al. (2011) conseguiram produzir 38% de PHB em biomassa

utilizando metano como fonte de carbono, avançando ainda mais no estudo de bactérias metano e metilotróficas. Neste último estudo, os autores induziram o uso de um substrato (metano) que representa um importante gás responsável pelo efeito estufa e, neste caso, o uso dele como substrato aumentaria o sequestro deste no meio ambiente.

O presente trabalho buscou estudar bactérias metilotróficas isoladas do meio ambiente, testando sua capacidade de produzir PHAs a partir do metanol, com a premissa de que elas também seriam promissoras produtoras também a partir do metano, considerando suas vias metabólicas.

3.7 Metanol como substrato

Muito embora os PHAs estejam se tornando populares na comunidade científica, a maior dificuldade da sua produção em escala industrial é justamente o seu preço de síntese e purificação. Estima-se que 30% do preço final do biopolímero estejam atribuídos ao substrato utilizado para sua produção (TAN et al., 2014). Em sua maioria, os PHAs são produzidos a partir de açúcares, como a glicose, a cana-de-açúcar e até mesmo o amido. Isso encarece o custo do biopolímero quando se considera que estes substratos podem ter destinações mais nobres, como a indústria alimentícia. Outros estudos mostram que o processo de purificação também contribui para o alto custo do produto final, sendo responsável por 50% de seu preço (ANIS et al., 2013; VIZCAINO-CASTON et al., 2016).

O metanol, ou álcool metílico, é o mais simples dos álcoois, sendo incolor, inflamável e líquido à temperatura ambiente. Por possuir estas características, ele é amplamente utilizado como solvente e intermediário em sínteses orgânicas. Ele ocorre no meio ambiente como consequência à ação de indústrias e também pode ser sintetizado naturalmente a partir de microrganismos anaeróbios e vegetação, além de poder ser produzido através de fontes renováveis como resíduos de agricultura (PUBCHEM, 2016).

Do ponto de vista econômico, o metanol apresenta uma ligeira vantagem em relação aos açúcares atualmente utilizados para produção de PHB, chegando a atingir um preço aproximadamente 30% menor que açúcar, como pode ser visto na Figura 7. No entanto, quando comparado ao petróleo, o seu valor comercial é 2,2% maior. Porém, deve-se considerar que o preço do petróleo é instável quando comparado ao do metanol e os plásticos derivados do petróleo podem levar centenas de anos para ser degradados, o que ressalta a questão da persistência destes no meio ambiente.

Figura 7 – Valor comercial dos principais substratos utilizados na produção de PHAs.

Fonte: Baseado em Index Mundi, 2016.

O amido, também utilizado como substrato para produção de PHAs, apresenta um baixo custo comercial, porém ele possui uma destinação mais nobre, pois serve como alimento e, neste sentido, sofre maior influência da legislação. Logo, a utilização do metanol aparece como alternativa à produção de PHAs, pois apresenta custo estável no mercado, e, apesar de ser utilizado como matéria-prima para o biodiesel, não impede sua utilização como substrato para produção dos biopolímeros.

3.8 Biodegradabilidade

O termo biodegradabilidade refere-se a qualquer composto que possa ser degradado pela ação de agentes biológicos. Esta é a principal característica que difere os polihidroxialcanoatos dos polímeros convencionais. Os PHAs pertencem a um grupo de biopolímeros que além de serem produzidos biologicamente, também podem ser biodegradados (CHANPRATEEP, 2010). Em condições aeróbias, os PHAs podem ser transformados em água e dióxido de carbono, enquanto que em ambientes anaeróbios, eles são transformados em metano e dióxido de carbono por diversos microrganismos presentes no solo, ambiente marinho e em resíduos domésticos (ANJUM et al., 2016).

A biodegradação, no entanto, depende de diversos fatores, tais como: superfície de contato, temperatura, pH, peso molecular do biopolímero, além de sua composição e

cristalinidade, no caso dos PHAs. Estudos mostraram que o homopolímero PHB é mais rapidamente degradado que àqueles biopolímeros contendo monômeros de ácido hidroxivalérico (HV) (REDDY et al., 2003). Os microrganismos capazes de degradar os PHAs possuem a enzima PHA depolimerase, que é capaz de transformar a cadeia polimérica novamente em monômeros de ácido hidroxibutírico, que podem ser utilizados como fonte de carbono novamente. Além disso, existem enzimas que podem atuar na biodegradação dos PHAs com auxílio de temperatura, através do processo de hidrólise.

Estudos mostram que a temperatura de 60 °C os PHAs podem ser degradados em 85% em sete semanas, enquanto que em ambientes marinhos que não ultrapassam os 6 °C, a sua degradação leva cerca de 254 dias (REDDY et al., 2003). Sob condições anaeróbias, o copolímero PHB-*co*-HV foi degradado completamente em esgoto, solo e água dentro de 6, 75 e 350 semanas, respectivamente (CASTILHO; MITCHELL; FREIRE, 2009; ANJUM et al., 2016)

3.9 Parâmetros cinéticos

Como citado anteriormente, para que um microrganismo seja considerado apto a ser utilizado em larga escala na produção de biopolímeros ele deve suprir alguns requisitos, como: a) possuir alto fator de conversão substrato em produto; b) altas taxas de crescimento e c) ser capaz de acumular altas concentrações de biopolímero intracelularmente (RAMSAY et al., 1990). Esses fatores definirão a viabilidade da utilização do microrganismo de interesse na produção de PHAs.

Eles podem ser calculados através de parâmetros clássicos de cinética bacteriana (Schmidell et al. 2007). O fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) permite que seja calculada a quantidade de substrato que está sendo convertida em material celular e o fator de conversão de substrato em produto $Y_{p/s}$ permite que seja calculada a quantidade de substrato que está sendo convertida no produto de interesse. Estes dois fatores são de extrema importância, pois indicam o fator de conversão do substrato. Se o valor obtido é baixo, significa que está ocorrendo um desperdício de substrato que está sendo utilizado na produção de outros materiais celulares ou metabólitos.

Para avaliar o desempenho do processo de produção do bioproduto, utiliza-se o parâmetro de produtividade (P_p), a fim de avaliar a concentração do produto em função do tempo, que juntamente com a porcentagem de polímero em biomassa contribuem para uma

melhor avaliação da produção de PHAs. A porcentagem obtida é de extrema importância, pois estudos indicam que para que seja viável a sua utilização em larga escala o microrganismo deve ser capaz de acumular, pelo menos, 60% de biopolímero por biomassa (RAMSAY et al., 1990). No entanto, é o conjunto de todos estes fatores que indicará a viabilidade da utilização dos microrganismos em um processo industrial.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

O metanol (P.A.) e o reagente Sudan Black B utilizados neste trabalho foram obtidos da Vetec Química Fina Ltda., segmento da Sigma-Aldrich. O padrão de polihidroxibutirato foi obtido diretamente da Sigma-Aldrich. Todos os demais sais e reagentes utilizados possuíam grau analítico.

4.2 Coleta de amostras

As amostras para o isolamento bacteriano foram coletadas no mês de março de 2016, no Sistema Estuarino de Santos (SES), como indicado na Figura 8. O SES compreende o maior porto da América do Sul e um complexo industrial significativo no Brasil. Vários estudos realizados nesta área identificaram contaminação na água e nos sedimentos como resultado da atividade humana. O SES apresenta um perfil claro com água salobra do estuário em sua área interna e água do mar no estuário inferior, onde a salinidade varia de 15 a 31.

Figura 8 – Representação dos pontos de coleta de amostra no Sistema Estuarino de Santos (SES) no Estado de São Paulo.

As coletas foram realizadas no mês de março de 2016 seguindo as normas da USEPA.
Fonte: Acervo pessoal.

A coleta de amostras foi realizada em três diferentes pontos do Sistema Estuarino de Santos, especificamente em a) latitude $23^{\circ}58'12.04''S$ e longitude $46^{\circ}20'57.29''O$, b) latitude $23^{\circ}58'10.51''S$ e longitude $46^{\circ}20'42.67''O$ e c) latitude $23^{\circ}58'12.71''S$ e longitude

46°20'20.36"O. Os sedimentos foram coletados por meio de uma pá, recolhidos e colocados dentro de tubos de plástico estéreis para análise posterior. Toda amostragem, manuseio e armazenamento de sedimentos foi realizada de acordo com as diretrizes da USEPA.

4.3 Isolamento

Para selecionar somente aquelas bactérias capazes de consumir metanol como única fonte de carbono e energia, o isolamento foi realizado em tubos de polipropileno contendo 40 mL de meio de cultura contendo apenas os sais necessários para auxiliar no crescimento celular, sendo sua composição: 5 mL de FeSO_4 [1mM], 0,5 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [1M], 250 μL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [1M] e 5 mL de M2), sendo a composição do M2: 2,5 g de NH_4Cl , 10,44 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 5,3 g de KH_2PO_4 acrescido 0,5% (v/v) de metanol.

As amostras foram mantidas em agitador orbital de bancada (Infors HT, Modelo Multitron Pro) sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28 °C por 72h. Após este período, foram plaqueadas em meio de cultura sólido nas mesmas condições do cultivo líquido. Após uma série de diluições, as colônias puras e isoladas foram submetidas à identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF utilizando-se do software Biotyper (Bruker Daltonics) e também à identificação por biologia molecular através da amplificação do gene 16S rRNA. A Figura 9 representa o fluxograma de coleta de amostras e isolamento bacteriano.

Figura 9 – Representação da coleta de amostras e isolamento realizados no Sistema Estuarino de Santos.

Fonte: Acervo pessoal.

Após as identificações terem sido realizadas, as diferentes bactérias encontradas foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para preservação das linhagens. Para tanto, uma alíquota de 500 μL foi retirada do ensaio líquido e armazenada juntamente com 500 μL de glicerol em tubos criogênicos.

4.3.1 *Methylobacterium extorquens* de referência

A bactéria do gênero *Methylobacterium extorquens* foi adquirida da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI-UNICAMP-SP. Esta serviu como referência à produção de polihidroxibutirato, uma vez que já está datada na literatura sua capacidade de produzi-lo a partir do metanol (HÖFER; VERMETTE; GROLEAU, 2011; MOKHTARI-HOSSEINI et al., 2009b; YEZZA et al., 2006).

4.4 Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper

As diferentes colônias isoladas através do plaqueamento foram transferidas para uma placa (96 MSP, Bruker Daltonics, EUA) e então adicionado 1 μL de matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico [CHCA] diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%), seguido de secagem a temperatura ambiente. A análise dos espectros de massa foi realizada em um espectrômetro MALDI-TOF LT Microflex Bruker. Os espectros de massa foram adquiridos na faixa de massas de 0 – 11.000 m/z e então analisados pelo software MALDI Biotyper RTC, que considera as massas e intensidades relativas dos espectros desconhecidos e os compara com um banco de dados interno, resultando na identificação das bactérias.

Quando necessário, foi realizada a extração de proteínas das bactérias para melhor identificação. Para tanto, uma alíquota de 1 mL foi recolhida do meio de cultura e foi centrifugada (24300 x g por 2 minutos) (Eppendorf, Modelo 5804R). Ao *pellet* foi adicionado 300 μL de água deionizada e 900 μL de etanol para inativação da bactéria. A solução foi homogeneizada, centrifugada novamente e o sobrenadante descartado. Então foram adicionados 30 μL de ácido fórmico 70% e 50 μL de acetonitrila para lise das células bacterianas. Novamente a solução foi homogeneizada e centrifugada, mas desta vez com objetivo de separar os sedimentos celulares das proteínas. Então 1 μL do sobrenadante foi depositado em placa (96 MSP, Bruker Daltonics, EUA), seguido de secagem a temperatura ambiente. Ao sobrenadante seco foi adicionado 1 μL de solução matriz (ácido alfa-ciano-4-

hidroxi-cinâmico [CHCA] diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%), seguido de secagem a temperatura ambiente e então a amostra estava pronta para ser analisada.

A Figura 10 mostra a representação da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper. As amostras são depositadas em uma placa de 96 poços e sobre elas uma matriz, que tem por função excitar as proteínas através da incidência de um laser. Essas proteínas possuem um tempo de voo específico devido ao seu tamanho, e percorrem um tubo a vácuo até chegar ao detector, que separa as proteínas de acordo com o seu tempo de voo, gerando como resultado um espectro de massas específico para cada bactéria, comparando-os com um banco de dados.

Figura 10 – Representação da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper.

Fonte: Acervo pessoal.

4.5 Identificação através da amplificação do gene 16S rRNA

A identificação molecular dos isolados foi realizada através da amplificação do gene 16S do DNA ribossomal. A extração do DNA foi realizada baseando-se no protocolo de (CHEN; KUO, 1993). A amplificação dos nucleotídeos do gene que codifica o rDNA 16S foi

realizada através de PCR (reação de polimerase em cadeia) com o seguinte protocolo: 1 µL do DNA genômico, 0,04 µL da enzima Taq-polimerase 5 unidades (GE) (5 unidades), 2,75 µL do tampão da enzima Taq (GE), 0,5 µL dNTPs (10mM), 1,10 µL de MgCl₂ na concentração de 25 mM e 20,86 µL de água duplamente destilada-deionizada autoclavada. Para a bactéria comercial foi utilizado também 1 µL dos primers 347F (5'-GGAGGCAGCAGTRRGAAT-3') e 803R (5'-CTACCRGGGTATCTAATCC-3') (WUYTS, 2004) na concentração de 10 µM e para as bactérias isoladas do SES – Santos foi utilizado 1 µL dos primers U515-F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e E1406-R (5'-GACGGGCGGTGWGTRCA-3') (SOERTEL et al., 2012). A reação foi calculada para uma margem de segurança de 10% sendo que o volume final para cada reação foi de 25 µL. As amostras foram submetidas a 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 60 segundos em um termociclador (Master Cycler - eppendorf). A eficiência da amplificação foi verificada através de eletroforese em gel contendo 0,8 % de agarose, conforme descrito por (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A sequência obtida do gene 16S foi analisada pelo sequenciador de DNA ABI modelo 3130 (Applied Biosystems) e o kit de sequenciamento ABI Prism (Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit V 3.1, Perkin-Elmer). Estas sequências obtidas para as linhagens isoladas foram comparadas com sequências conhecidas do banco de dados NCBI (NCBI, 2016).

4.6 Meio de cultura para produção de PHB

Como citado anteriormente, a produção de PHB ocorre em condições específicas quando há a limitação de nutrientes e excesso de fonte de carbono. Nesse sentido, foi adaptado de Bourque et al. (1995) um meio de cultura otimizado (M4) para a produção do homopolímero, contendo: (NH₄)₂SO₄ 1.5 g/L; KH₂PO₄ 1.305 g/L; Na₂HPO₄·12H₂O 4.02 g/L; H₃BO₃ 1.8 mg/L; CoCl₂·6H₂O 2.4 mg/L; CuSO₄·5H₂O 2.4 mg/L; CaCl₂·2H₂O 60 mg/L; MgSO₄·7H₂O 1.35 g/L; FeSO₄·7H₂O 60 mg/L; Na₂MoO₄·2H₂O 2.4 mg/L; ZnSO₄·7H₂O 7.8 mg/L. Metanol na concentração de 0,5% (v/v) foi adicionado diretamente na preparação dos inóculos bacterianos.

4.7 Sudan Black B

A coloração por Sudan Black B é uma técnica que apresenta um controle qualitativo à produção de PHB, pois somente os grânulos intracelulares são corados, indicando a presença dos biopolímeros. Segundo protocolo adaptado de Legat et al. (2010), uma gota do cultivo líquido foi coletada e depositada sobre uma lâmina de microscopia para fazer um esfregaço com auxílio de um palito de madeira. Esse esfregaço foi seco sobre bico de Bunsen para sua completa fixação na placa. Após a secagem, as lâminas foram mergulhadas em solução de Sudan Black B 3% (m/v em 70% de etanol) por 20 minutos. Após esse período, as lâminas foram descoloridas em xileno, e após completa descoloração, mergulhadas em solução de safranina (0,5%) por 30 segundos. Ao final desse processo, as lâminas foram lavadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente antes de serem analisadas em microscópio óptico em aumento de 100 vezes, como indicado na Figura 11.

Figura 11 – Representação da técnica de coloração por Sudan Black B para análise de grânulos intracelulares.

Fonte: Acervo pessoal.

4.8 Culturas em frascos agitados

4.8.1 Pré-inóculo

Preliminarmente aos ensaios, foi necessário realizar um pré-inóculo para estimular o crescimento bacteriano. Para tanto, foram retiradas alíquotas de 100 µL das bactérias previamente isoladas que estavam armazenadas a – 80 °C, as quais foram inseridas em 50 mL de meio de cultura M4 em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 0,5% (v/v) de metanol.

Esses cultivos foram mantidos a 28 °C e agitação de 180 RPM durante 72 horas. Desses cultivos, uma nova alíquota foi coletada e transferida para novos frascos erlenmeyer contendo 50 mL de M4 e 0,5% (v/v) de metanol, os quais foram mantidos nas mesmas condições anteriores.

4.8.2 Culturas em agitador orbital de bancada

Para realização dos ensaios em agitador orbital de bancada, foram realizados seis inóculos, para que as análises de crescimento celular, consumo de metanol, pH e produção de PHB pudessem ser realizadas diariamente durante o período 144 horas, ou uma semana. Isso porque era necessário que o volume total do ensaio (50 mL) fosse utilizado, para que as análises de biomassa e produção de PHB pudessem ser realizadas com peso satisfatório.

Para tanto, o pré-inóculo foi dividido em seis partes iguais, as quais foram transferidas para tubos de polipropileno para que fossem lavadas com água deionizada para retirada do excesso de metanol (24300 x g durante 5 minutos) (Hitachi, CR22N). Essas lavagens foram realizadas três vezes. Os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 50 mL de M4 acrescido de 0,5% (v/v) de metanol e então foram transferidos para frascos erlenmeyer, os quais foram mantidos em agitador orbital de bancada a 180 RPM e temperatura de 28 °C durante o período de 7 dias.

4.9 Culturas em biorreator

O biorreator utilizado foi o modelo Labfors 5 da marca Infors HT (INFORS, Basel, Suíça). Para dar início aos ensaios, ele foi primeiramente esterilizado em autoclave a 120 °C por 30 minutos com 1150 mL de água deionizada e somente após seu resfriamento foram adicionados os sais do meio M4 para que não ocorresse precipitação.

Como citado anteriormente no item 4.8.1, foi necessária a preparação um pré-inóculo em frascos agitados. Como o volume comportado pelo biorreator é maior, o volume total do pré-inóculo de 50 mL foi transferido para tubos de polipropileno, e então foram realizadas lavagens sucessivas com água deionizada para retirada do excesso de metanol. O *pellet* resultante foi ressuspensado novamente em água deionizada e através de uma seringa estéril foi adicionado ao biorreator por um septo de silicone. Essa quantidade de água deionizada foi utilizada de acordo com o volume de 1200 mL de M4 que foi necessário para a realização do

ensaio, considerando as retiradas de amostra para controle diário de acúmulo de biomassa seca, consumo de metanol e produção de PHB durante os sete dias de ensaio. As condições operacionais foram mantidas de acordo com aquelas utilizadas nas culturas de frascos agitados, portanto a temperatura utilizada foi mantida a 28 °C com auxílio de banho termostatzado (Tecnal, TE-2005) e a rotação utilizada foi de 200 RPM. O pH foi monitorado através de um eletrodo de pH (Mettler Toledo, 405-DPAS-SC-K8S/225) acoplado ao biorreator, sendo mantido em pH 7,0 com soluções de NaOH 1 M e HCl 1 M.

4.10 Técnicas analíticas

4.10.1 Medida indireta do crescimento celular por absorbância

Preliminarmente alguns ensaios tiveram seu crescimento celular medido através de espectrofotometria (Eppendorf, Biophotometer D30), uma técnica que se baseia na quantidade de luz que é absorvida por uma amostra, em um determinado comprimento de onda na região do espectro visível (Figura 12). No presente trabalho foi utilizado o comprimento de onda de 600 nm. O branco utilizado para zerar o aparelho foi o próprio meio de cultura utilizado nos ensaios.

Figura 12 – Representação do princípio da técnica de espectrofotometria.

Fonte: Acervo pessoal.

4.10.1.1 Curva de massa seca

A determinação de peso seco foi adaptada de Postma (1989), consistindo de secagem prévia de membranas (GSTF04700 Millipore) durante 2,5 minutos em micro-ondas em potência alta. Após seu resfriamento foi realizada pesagem em balança analítica. A filtração das amostras foi realizada em um sistema de filtração ligado a uma bomba de vácuo. Para esse procedimento, a bomba foi ligada e a membrana depositada sobre o dispositivo e molhada com água deionizada para que houvesse a sua fixação. Então, aproximadamente 10 mL de cultivo foram colocados sobre a membrana com o auxílio de uma pipeta calibrada e o mesmo foi lavado duas vezes com 10 mL de água deionizada. Após esse processo, as membranas foram retiradas do dispositivo com o cuidado de não tocar nas células e secas em micro-ondas novamente em potência alta durante 2,5 minutos. Após o resfriamento das membranas, elas foram pesadas novamente e do seu peso final foi descontado o valor do peso inicial, sem as células (Figura 13). A curva de peso seco realizada neste trabalho encontra-se no Anexo I.

Figura 13 – Representação da determinação de peso seco.

Fonte: Acervo pessoal.

4.10.1.2 Medida do crescimento celular através de peso seco

Quando especificado, o crescimento celular foi medido diariamente diretamente através da pesagem da biomassa seca. Para tanto, o inóculo foi transferido para tubos de polipropileno previamente pesados em balança analítica (Precisa, XR205SM-DR), e então foi centrifugado até obtenção de um *pellet*. Para inativação das bactérias, o tubo foi submetido a choque térmico. Primeiramente foi submetido à temperatura de -20 °C durante 1 hora e então

o tubo foi deixado aberto em estufa a 60 °C até que a massa obtida através de sua pesagem em balança analítica fosse constante. O valor da biomassa seca foi determinado através da diferença da massa do tubo após a secagem e a massa do tubo previamente à secagem, conforme indicado na Figura 14.

Figura 14 – Representação da metodologia empregada na quantificação de biomassa seca.

Fonte: Acervo pessoal.

4.10.1.3 Consumo de metanol

O consumo de metanol foi monitorado periodicamente através de uma alíquota do meio de cultura, a qual foi filtrada em filtro 0,22 μm . O filtrado foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu, Japão) através de injeção de 1000 μL em uma coluna HPX-87H, com fase móvel isocrática de ácido sulfúrico 5 mM, detector RID e fluxo de 0,6 mL/min durante 32 minutos. A quantificação das amostras foi realizada correlacionando-se os resultados a uma curva de calibração previamente realizada (Anexo I) em concentrações de 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 6% (v/v) de metanol em água deionizada.

4.10.1.4 Leitura de pH

A leitura do pH dos cultivos em frascos agitados foi realizada diariamente através de pHmetro (Lucadema, LUCA-210). Nos ensaios em biorreator, o pH foi monitorado através de

um eletrodo de pH calibrado com soluções tampão em pH 4 e pH 7 previamente à realização do ensaio.

4.10.1.5 Extração de PHB

Adaptando o protocolo sugerido por Law & Slepecky (1961), amostras de 50 mL foram coletadas do ensaio e centrifugadas a 24300 x g a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 5 mL de NaClO comercial foram adicionados à biomassa, a qual foi mantida a 37°C durante 1 hora a fim de romper a membrana das células. Então, foram realizadas lavagens (24300 x g por 5 minutos) com água, etanol e acetona para retirar impurezas e separar o PHB. Após as lavagens, o polímero foi solubilizado em 10 mL de clorofórmio e filtrado em filtro 0,22 µm com auxílio de seringa de vidro em béqueres de 25 mL previamente pesados em balança analítica (Figura 15). Os béqueres foram deixados em capela até completa evaporação do solvente e obtenção do polímero puro.

Figura 15 – Representação da metodologia utilizada para extração de PHB intracelular, adaptado de Law & Slepecky (1961).

Fonte: Acervo pessoal.

4.10.1.6 Quantificação de PHB

A quantificação do PHB foi realizada posteriormente à sua extração das células. A medida foi realizada através de balança analítica, subtraindo da massa final do béquer ao final da extração, a sua massa inicial.

4.10.1.7 Caracterização de PHB

A caracterização do biopolímero produzido foi realizada através de espectrometria de massas MALDI-TOF. Para tanto, após o processo de extração de PHB, quando este ainda estava dissolvido em clorofórmio, foi coletado 1 mL, o qual foi utilizado para análise. Desta alíquota, 1 µL foi depositado em uma placa seguido de secagem a temperatura ambiente. Ao sobrenadante seco foi adicionado 1 µL de solução matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico [CHCA] diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%), seguido de secagem a temperatura ambiente. Para análise dos espectros de massa foi utilizado um espectrômetro UltrafleXtreme MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Germany) operando no modo reflectron e no modo de íon positivo linear. Os espectros de massa foram adquiridos na faixa de massas de 0 – 5000 Da e de 2 – 20 kDa para os modos reflectron e linear, respectivamente. Os íons foram formados através de irradiação de um *smartbeam* usando uma frequência de 2000 Hz, PIE 100 ns e lentes de 7 kV. As voltagens para as fontes primárias e secundárias de íons foram 25 kV e 23 kV, respectivamente. Os polímeros foram identificados através do software *Polytools*.

4.11 Parâmetros de conversão

Para melhor compreensão sobre a viabilidade da produção de PHAs por bactérias metilotróficas foram realizados cálculos sobre os parâmetros de conversão de substrato em célula e substrato em produto, que podem ser melhor visualizados nas equações 1 e 2 abaixo.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (1)$$

Onde X , S e X_0 , S_0 referem-se à concentração de biomassa/substrato utilizada ao final e início do experimento, respectivamente.

$$Y_{p/s} = \frac{P-P_0}{S_0-S} \quad (2)$$

Onde P e P_0 referem-se à concentração de produto produzida ao final e ao início do experimento, respectivamente.

A produtividade relaciona a quantidade de produto produzida em um período de tempo, como indicado na equação 3.

$$Pp = \frac{Pm-P_0}{T_{fP}} \quad (3)$$

Onde Pm indica o valor máximo ou final de produto obtido e P_0 indica o valor inicial do produto, divididos pelo tempo de produção.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação bacterianos

Inicialmente, foi realizado o isolamento de bactérias metilotróficas do Sistema Estuarino de Santos (SES). A coleta de amostras foi realizada em três pontos diferentes, resultando no isolamento de duas bactérias, denominadas de Isolados 1 e 2, as quais foram submetidas à identificação em nível de gênero e espécie pela técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF, utilizando o software Biotyper e também através da técnica de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Paralelamente, para validação das técnicas de identificação, uma linhagem de coleção de cultura adquirida do CBMAI (denominada aqui de *Methylobacterium extorquens* CBMAI), foi também testada. As Figuras 16, 17 e 18 mostram os espectros de massas obtidos através da técnica MALDI-TOF para ambos os isolados e bactéria de referência, respectivamente.

Figura 16 – Espectro de massas obtido para o Isolado 1 através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper.

Figura 17 – Espectro de massas obtido para o Isolado 2 através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper.

Figura 18 – Espectro de massas obtido para a bactéria de coleção de cultura adquirida do CBMAI através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper.

Estes espectros de massas foram utilizados para a identificação dos isolados através do software Biotyper, que compara os espectros obtidos com aqueles em seu banco de dados, e atribui grau de confiança à identificação através de pontuações, que são diferenciadas pelo fabricante em 4 categorias, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Classificação das pontuações fornecidas pelo equipamento, de acordo com o fabricante.

Classificação	Descrição
2.300 – 3.000	Alta probabilidade de identificação de espécie
2.000 – 2.299	Identificação de gênero segura, provável identificação de espécie
1.700 – 1.999	Provável identificação de gênero
0.000 – 1.699	Identificação não confiável

Considerando todas essas características da técnica de espectrometria de massas, a identificação final obtida para os Isolados 1 e 2 e para a bactéria de referência (CBMAI) pode ser visualizada na Tabela 5. Nela, vemos que as pontuações das três identificações foram superiores à 2.0, o que indica identificação de gênero segura e provável identificação de espécie.

Tabela 5 – Identificação em nível de gênero e espécie obtidos através da espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper.

Bactéria	Identificação em gênero e espécie	Classificação
Isolado 1	<i>Methylobacterium extorquens</i> MB91 UFL	2.203

Isolado 2	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> B237 UFL	2.144
CBMAI	<i>Methylobacterium extorquens</i> MB91 UFL	2.166

As identificações resultaram em bactérias do gênero *Methylobacterium* sp., já conhecidas na literatura como produtoras de PHAs a partir do metanol, inclusive o PHB (HÖFER; VERMETTE; GROLEAU, 2011; MOKHTARI-HOSSEINI et al., 2009b; YEZZA et al., 2006). A Figura 19 mostra a morfologia das três bactérias em placa contendo meio de cultura sólido acrescido de 0,5% (v/v) de metanol, mostrando sua similaridade e coloração rosa característica.

Figura 19 – Representação da morfologia das bactérias.

A) *M. extorquens* (Isolado 1), B) *M. rhodesianum* (Isolado 2) e C) *Methylobacterium extorquens* de referência (CBMAI) em placas contendo meio sólido acrescido de 0,5% (v/v) de metanol.

A fim de comprovar a identificação previamente realizada pelo MALDI-TOF-Biotyper, foi realizada a identificação molecular (gene 16S rRNA) dos isolados através de sequenciamento de DNA. Estas sequências obtidas para cada isolado (Anexo II) foram comparadas com sequências conhecidas do banco de dados (*NCBI- National Center for Biotechnology Information*). *Methylobacterium extorquens* CBMAI e o isolado 1 do SES – Santos obtiveram resultado de identidade de 99% com *Methylobacterium extorquens* (LT594351.1 e KF681061.1). O isolado 2 obteve resultado de identidade de 99% com *Methylobacterium rhodesianum* (HM245434.1), atribuindo confiabilidade às identificações obtidas por espectrometria de massas.

5.2 Sudan Black B

Após o isolamento e identificação bacterianos, foi realizada uma análise qualitativa preliminar para avaliar a produção de PHB pelos isolados. Essa análise foi realizada através da técnica de coloração por Sudan Black B, que é um corante específico de lipídeos. Através dele, os grânulos de PHB existentes dentro da célula das bactérias são corados, deixando-as com uma coloração arroxeada, que contrasta com a coloração adquirida pela própria célula bacteriana através da safranina. No caso das bactérias gram-negativas, como as do gênero *Methylobacterium* sp., as células adquirem uma cor avermelhada. Após o processo de coloração as células bacterianas e os grânulos de PHB podem ser visualizadas em microscópio óptico. A Figura 20 ilustra a análise microscópica da coloração realizada a partir de esfregaços de *Methylobacterium extorquens* MB91 e *Methylobacterium rhodesianum* B237.

Figura 20 – Análise microscópica para identificação de grânulos intracelulares, que podem ser visualizados em azul.

(A) *Methylobacterium extorquens* (B) *Methylobacterium rhodesianum*. Imagem adquirida através de microscopia óptica em aumento de 1000x.

Como pode ser visto ambas as bactérias apresentaram a formação de grânulos intracelulares. O PHB é um grânulo intracelular de reserva de energia, que já foi conhecido na história como uma inclusão lipídica por Lemoigne em meados de 1925, inclusive, antes de ser caracterizado como um biopolímero. Além disso, já está datada na literatura a capacidade do gênero *Methylobacterium* sp. em produzir PHAs, em geral, a partir de metanol. A junção desses resultados estimulou a continuação do trabalho proposto.

5.3 Ensaio preliminares

Previamente aos ensaios com as bactérias isoladas, foi realizado um ensaio com a bactéria de coleção de cultura – *M. extorquens* CBMAI, a fim de entender melhor o seu comportamento em relação à produção de polihidroxibutirato.

As Figuras 21, 22 e 23 mostram o comportamento do pH, a produção de biopolímero e seu acúmulo conforme o crescimento celular de *M. extorquens* CBMAI, respectivamente, quando cultivada em frascos agitados sem quaisquer ajustes de condições físico-químicas conforme descrito no Item 4.8.2.

Figura 21 – Monitoramento do pH e da biomassa de *M. extorquens* CBMAI.

Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.

A Figura 21 mostra que há um decaimento expressivo nas primeiras 24 horas de cultivo e que se mantém ao longo das 168 horas de ensaio. Essa característica pode ser atribuída ao funcionamento da enzima metanol desidrogenase, que ao oxidar o metanol à formaldeído, gera íons H⁺ que ficam livres e afetam o pH do meio de cultura, acidificando-o.

Figura 22 – Monitoramento da biomassa e da produção de biopolímero por *M. extorquens* CBMAI.

Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.

A Figura 22 mostra que o comportamento da produção de biopolímero é associado ao crescimento em *M. extorquens* CBMAI, o que dispensa a necessidade de um processo em duas etapas, como citado na literatura (CHEN; PAGE, 1997; WENDLANDT et al., 2001; CHEN et al., 2013a). Ou seja, não é necessário que haja o acúmulo de biomassa para só então ocorrer o acúmulo de biopolímero no interior das células. Esses dois processos ocorrem simultaneamente. O melhor resultado foi atingido em 168 horas de cultivo, chegando a atingir uma produtividade de produto de 70 mg.L⁻¹ e acúmulo de 17% de biopolímero em biomassa, como pode ser visto na Figura 23.

Figura 23 – Representação do acúmulo de biopolímero por biomassa por *M. extorquens* CBMAI.

Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.

Figura 24 – Caracterização do PHB produzido por *M. extorquens* CBMAI por espectrometria de massas MALDI-TOF.

Após os ensaios de produção, o biopolímero foi extraído do interior das células e foi submetido à identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF, como pode ser visto na Figura 24. O resultado foi positivo quanto à produção de polihidroxibutirato, tendo o espectro de massas reconhecido a repetição de um monômero de 74 Da, característico deste biopolímero.

Os estudos com *M. extorquens* CBMAI serviram como aprendizado para uma melhor compreensão dos procedimentos de produção e extração do biopolímero do interior das células. O consumo de metanol não foi uma preocupação neste momento, pois essa bactéria possui relatos na literatura da produção de biopolímeros a partir de metanol. Os resultados obtidos serviram para encorajar os próximos estudos com as bactérias isoladas.

5.4 Ensaios em frascos agitados

Os ensaios com as bactérias isoladas em frascos agitados sem quaisquer ajustes de condições físico-químicas também seguiram o protocolo descrito no Item 4.8.2.

As Figuras 25 e 26 mostram o comportamento do pH conforme os crescimentos celulares de *M. extorquens* MB91 e *M. rhodesianum* B237, respectivamente. Ambas as bactérias apresentaram a mesma característica de decaimento no pH que a bactéria de coleção de referência, o que era esperado uma vez que elas possuem a mesma via metabólica para a produção de biopolímeros.

Figura 25 – Monitoramento do pH e da biomassa por *M. extorquens* MB91.

Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.

Figura 26 – Monitoramento do pH e da biomassa por *M. rhodesianum* B237.

Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.

As Figuras 27 e 28 mostram a produção de biopolímero conforme os crescimentos celulares de *M. extorquens* MB91 e *M. rhodesianum* B237, respectivamente.

Mais uma vez as bactérias isoladas mostraram comportamento similar à de referência. Através das figuras pode-se perceber que ambos os isolados possuem a produção de biopolímero associada ao seu crescimento. No entanto, comparando os isolados, *M. extorquens* MB91 apresentou melhores resultados, chegando a atingir produtividade do produto de 125 mg.L⁻¹ enquanto que *M. rhodesianum* B237 atingiu produtividade do produto de apenas 42 mg.L⁻¹.

Porém, mesmo quando comparada com a bactéria de referência, *M. extorquens* isolada do sistema estuarino de Santos mostrou resultados melhores, atingindo quase o dobro de

produção de biopolímero com a mesma biomassa, o que mostra seu potencial como produtora de biopolímero.

As três bactérias apresentaram seus melhores resultados após o período de 168 horas, no entanto, pode-se ver que o crescimento celular de *M. extorquens* MB91 tende a um aumento mesmo após esse período. Contudo, o ensaio foi encerrado para fins de comparação com as outras bactérias, pois não seria viável a produção do biopolímero em um longo período de tempo.

Figura 27 – Monitoramento da biomassa e da produção de biopolímero por *M. extorquens* MB91.

Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.

Figura 28 – Monitoramento da biomassa e da produção de biopolímero por *M. rhodesianum* B237.

Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.

As Figuras 29 e 30 mostram a porcentagem de acúmulo de biopolímero quanto à biomassa produzida por *M. extorquens* MB91 e *M. rhodesianum* B237, respectivamente.

Na Figura 29 fica evidente mais uma vez o potencial de *M. extorquens* MB91, sendo ela a bactéria que apresentou melhor resultado de acúmulo de biopolímero em biomassa, atingindo percentual de 30%. Este valor vai de encontro com àqueles datados na literatura, que mostram resultados de 25 – 40% de acúmulo sem ajustes de condições físico-químicas (BOURQUE et al., 1992; YEZZA et al., 2006).

Figura 29 – Representação do acúmulo de biopolímero por biomassa por *M. extorquens* MB91.

Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.

Figura 30 – Representação do acúmulo de biopolímero por biomassa por *M. rhodesianum* B237.

Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.

M. rhodesianum mostrou resultados inferiores (Figura 30), porém foi capaz de acumular biopolímero dentro das células em percentual de 14%. Vale ressaltar que esta espécie foi pouco estudada na literatura e portanto é necessário que sejam estudados os melhores parâmetros para que haja uma maior produção de biopolímeros.

O biopolímero produzido pelas bactérias *M. extorquens* MB91 e *M. rhodesianum* B237 foram analisados por espectrometria de massas MALDI-TOF e são apresentados respectivamente nas Figuras 31 e 32.

Figura 31 – Caracterização do biopolímero produzido por *M. extorquens* MB91 através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF.

Na Figura 31 observa-se o espectro de massa obtido para *M. extorquens* MB91, onde o monômero obtido possui uma unidade de repetição de 74 Da, assim como o biopolímero produzido por *M. extorquens* comercial, comprovando a produção de PHB.

Figura 32 – Caracterização do biopolímero produzido por *M. rhodesianum* B237 através da técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF.

No entanto, a Figura 32 mostra o espectro de massa obtido para *M. rhodesianum* B237, onde o monômero obtido não foi àquele correspondente ao do PHB. A massa obtida

para o monômero produzido por *M. rhodesianum* B237 foi de 44 Da, e o software utilizado para identificação de polímeros, *Polytools*, o identifica como o monômero de polietileno glicol (PEG).

Essa produção de polietileno glicol por *M. rhodesianum*, ainda que pequena, mostra um grande avanço na área, levando em consideração que não existem relatos deste gênero de bactéria produzindo este polímero através de metanol.

Além disso, o etileno glicol (EG) é um produto químico a granel que é usado principalmente como agente anti-congelamento e como matéria-prima na síntese de plásticos. Atualmente, a produção de EG comercial depende exclusivamente de síntese química utilizando recursos fósseis e processos poluidores. Deste modo, a produção microbiana de etileno glicol tem sido alvo de muitos estudos, pois poderia tornar o processo mais sustentável (LIU et al. 2013; STEPHANOPOULOS et al. 2013).

As Figuras 33 e 34 mostram o consumo de metanol conforme os crescimentos celulares de *M. extorquens* MB91 e *M. rhodesianum* B237, respectivamente.

M. extorquens MB91 foi capaz de consumir 50% do metanol disponível no meio de cultura (Figura 13), enquanto que *M. rhodesianum* consumiu 40% (Figura 14). Isso indica que a concentração de metanol ainda estava em excesso, sendo esse um dos requisitos para a produção de biopolímeros. Usualmente na literatura são encontrados valores de 0,5% (v/v) de metanol como substrato, o que corresponde a 3960 mg.L⁻¹ de metanol. Neste trabalho, foram utilizadas concentrações em torno de 5500 mg.L⁻¹, um valor ligeiramente maior, mas que não apresentou toxicidade à bactéria. Yezza et al. (2006) relataram em seus trabalhos que bactérias do gênero *Methylobacterium extorquens* somente são inibidas sob concentrações maiores que 2% (v/v) ou 15,8 g.L⁻¹.

Figura 33 – Monitoramento da biomassa e do consumo de metanol por *M. extorquens* MB91.

Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.

Figura 34 – Monitoramento da biomassa e do consumo de metanol por *M. rhodesianum* B237.

Ensaio realizado durante 168 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM e temperatura de 28°C.

Através da análise do consumo de metanol foi possível calcular os fatores de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) e produto ($Y_{p/s}$).

Novamente, *M. extorquens* MB91 apresentou melhores resultados, tendo atingido $Y_{x/s}$ de 140 mg.g⁻¹ de metanol, e também $Y_{p/s}$ de 60 mg.g⁻¹ de metanol após o período de 168 horas. Esses dados devem ser diretamente relacionados, uma vez que a produção de biopolímero é associada ao crescimento. Bourque et al. (1995) chegaram a obter conversão celular de 300 mg.g⁻¹ de metanol em seu estudo com conversão de produto de aproximadamente 80 mg.g⁻¹ de metanol. Neste estudo uma concentração similar de biopolímero foi atingida utilizando metade do valor de biomassa, mais uma vez mostrando o potencial da bactéria para produção deste biopolímero.

M. rhodesianum B237 atingiu $Y_{x/s}$ de 120 mg.g^{-1} de metanol, o que vai de acordo com o que foi descrito por Bormann et al. (1997) e mostra-se similar àquele obtido para *M. extorquens*. No entanto, seu valor de $Y_{p/s}$ foi de apenas 20 mg.g^{-1} de metanol, valor 3 vezes menor que àquele obtido por *M. extorquens* MB91. Para fins de comparação, *M. extorquens* MB91 mostra um maior potencial à produção de biopolímeros do que *M. rhodesianum* B237.

Contudo, é necessário levar em consideração que, como citado anteriormente, *M. rhodesianum* é uma bactéria pouco estudada na literatura, e muito menos para a produção de PEG a partir de metanol. Até o momento, apenas uma patente relata a produção deste polímero pela bactéria, o que mostra um grande potencial a ser explorado. Nesse sentido, novos estudos a fim de entender melhor seu comportamento de crescimento e acúmulo de biopolímeros frente às suas características físico-químicas de cultivo deverão ser estudadas.

5.5 Ensaio em biorreator

Os ensaios com as bactérias isoladas em biorreator foi realizado mantendo-se o pH em 7,0, de acordo com o protocolo descrito no Item 4.9.

As Figuras 35 e 36 mostram o consumo de metanol conforme os crescimentos celulares de *M. extorquens* MB91 e *M. rhodesianum* B237, respectivamente.

Figura 35 – Monitoramento da biomassa e do consumo de metanol por *M. extorquens* MB91.

Ensaio realizado durante 96 horas em ensaio realizado em biorreator contendo 1200 mL de M4 acrescido de 5 g.L^{-1} de metanol sob agitação de 180 RPM, temperatura de 28°C e pH 7.

Figura 36 – Monitoramento da biomassa e do consumo de metanol por *M. rhodesianum* B237.

Ensaio realizado durante 96 horas em biorreator contendo 1200 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol sob agitação de 180 RPM, temperatura de 28°C e pH 7.

Ambos os isolados foram capazes de consumir aproximadamente 20% do metanol disponível no meio de cultura, o que indica novamente que o metanol estava em excesso no meio de cultura, condição necessária para a produção de biopolímeros.

No entanto, o crescimento celular só foi medido no início e ao fim do ensaio, pois ambas as bactérias apresentaram uma forte característica à formação de biofilme, como pode ser visto na Figura 37. Nesse sentido, a coleta de amostras ao longo do processo não relacionava fielmente a biomassa produzida. Porém, as medições ao início e fim do ensaio permitiram que fossem efetuados os cálculos de conversão de substrato em célula e substrato em produto.

Figura 37 – Demonstração da característica das bactérias *M. extorquens* MB91 e *M. rhodesianum* B237 à formação de biofilme.

Após 96 horas de cultivo, *M. extorquens* MB91 apresentou produtividade de 36 mg.L⁻¹, como representado na Figura 38.

Figura 38 – Relação da porcentagem de biopolímero em biomassa em *M. extorquens* MB91.

Ensaio realizado com *M. extorquens* MB91 em biorreator contendo 1200 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol. O ensaio foi mantido a temperatura de 28 °C e agitação de 180 RPM durante o período de 96 horas.

Além disso, seu fator de conversão de substrato em produto (Y_{p/s}) foi de 30 mg.g⁻¹ de metanol, atingindo um acúmulo de 14% de polihidroxibutirato em biomassa.

Importante ressaltar que, como também foi mencionado anteriormente, Bourque et al. (1995) obtiveram concentrações de 300 mg.g⁻¹ de biomassa sob otimização de nutrientes em biorreator. Neste trabalho, utilizando *M. extorquens* sem quaisquer ajustes de condições físico-químicas, a bactéria foi capaz de acumular o biopolímero em concentrações muito próximas àquelas atingidas na literatura, com uma menor quantidade de biomassa, mostrando seu potencial. No entanto, em biorreator essa característica não se repetiu. A produtividade celular e a produtividade do produto obtidas em biorreator foram menores, o que pode ser atribuído à agitação mais vigorosa do biorreator.

Como pode ser visto na Figura 39, após 96 horas de cultivo, *M. rhodesianum* B237 foi capaz de produzir 8 mg.L⁻¹ de polietileno glicol, atingindo um acúmulo de PEG em biomassa de 3% e conversão de substrato em produto de apenas 10 mg.g⁻¹ de metanol. Esses valores estão muito abaixo daqueles obtidos por Bormann & Roth (1999), que chegaram a alcançar valores de 32% de PHB em biomassa utilizando glicerol como fonte de carbono. Nesse cenário, percebe-se que o cultivo de *M. rhodesianum* B237 necessita de controle de outros parâmetros ou até mesmo de nutrientes, para que possa ser atingido um maior acúmulo de biopolímero dentro das células.

Figura 39 – Relação da porcentagem de biopolímero em biomassa em *M. rhodesianum* B237.

Ensaio realizado com *M. rhodesianum* B237 em biorreator contendo 1200 mL de M4 acrescido de 5 g.L⁻¹ de metanol. O ensaio foi mantido a temperatura de 28 °C e agitação de 180 RPM durante o período de 96 horas.

Resumidamente, as Tabelas 6 e 7 apresentam os principais resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 6 – Resumo dos resultados obtidos para os ensaios em frascos agitados sem quaisquer ajustes de condições físico-químicas.

Ensaio em Frascos Agitados					
Bactéria	Produtividade Celular (mg.L ⁻¹)	Yx/s	Produtividade Produto (mg.L ⁻¹)	Yp/s	%Biopolímero/Biomassa
<i>M. extorquens</i> CBMAI	406	-	70	-	17
<i>M. extorquens</i> MB91	418	140	125	60	30
<i>M. rhodesianum</i> B237	293	120	42	20	14

Tabela 7 – Resumo dos resultados obtidos para os ensaios em biorreator com controle de pH.

Ensaio em Biorreator					
Bactéria	Produtividade Celular (mg.L ⁻¹)	Yx/s	Produtividade Produto (mg.L ⁻¹)	Yp/s	%Biopolímero/Biomassa
<i>M. extorquens</i> MB91	248	170	36	32	15
<i>M. rhodesianum</i> B237	253	190	8	10	3

6 CONCLUSÕES

- A amostragem do Sistema Estuarino de Santos – SP permitiu o isolamento de duas bactérias metilotróficas: *M. extorquens* MB91 e *M. rhodesianum* B237, identificadas por espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper e amplificação do gene 16S rRNA;
- A coloração por Sudan Black B foi positiva para produção de biopolímeros intracelulares por ambos os isolados;
- *M. extorquens* MB91 foi a melhor produtora de PHB sem ajustes de condições físico-químicas, mostrando grande potencial para o seu uso industrialmente;
- *M. rhodesianum* B237 foi capaz de produzir PEG a partir do metanol, o que mostra grande potencial, pois não há relatos deste produto na literatura;
- A utilização do biorreator não favoreceu o acúmulo de biopolímero em nenhum dos isolados, tendo piorado o seu acúmulo dentro das células.

REFERÊNCIAS

- ABISPLAST, 2015. Disponível em: < <http://www.abiplast.org.br/site/publicacoes/perfil-2015> > Acesso em: 12 de Dezembro de 2016.
- AGÊNCIA FAPESP, 2012. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/plastico_biodegradavel_de_acucar_esta_pronto_para_escalaindustrial/15994/> Acesso em: 12 de Agosto de 2016.
- AGUS, J.; KAHAR, P.; ABE, H.; DOI, Y.; TSUGE, T. Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 5, p. 1138–1146, 2006.
- AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 732–743, 2010.
- ANIS, S. N. S.; IQBAL, N. M.; KUMAR, S.; AL-ASHRAF, A. Increased recovery and improved purity of PHA from recombinant *Cupriavidus necator*. **Bioengineered**, v. 4, n. 2, p. 115–118, 2013.
- ANJUM, A.; ZUBER, M.; ZIA, K. M.; NOREEN, A.; ANJUM, M. N.; TABASUM, S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 161–174, 2016.
- ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y.; STRAHAN, G. D.; LEVINE, A. C.; NOMURA, C. T. Methanol-induced chain termination in poly(3-hydroxybutyrate) biopolymers: Molecular weight control. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 195–201, 2015.
- BIOCYCLE, 2016. Disponível em: < <http://www.biocycle.com.br/site.html> > Acesso em: 17 de Julho de 2016.
- BORMANN, E. J.; LEISSNER, M.; BEER, B. Growth and formation of poly(hydroxybutyric acid) by *Methylobacterium rhodesianum* at methanol concentrations of above 25 g/l. **Acta Biotechnologica**, v. 17, n. 4, p. 279–289, 1997.
- BORMANN, E. J.; ROTH, M.; LINS, W.; LEISSNER, M. Selection of capsule deficient strains of *Methylobacterium rhodesianum* producing polyhydroxybutyrate. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 8, p. 539–544, 1999.
- BOURQUE, D.; POMERLEAU, Y.; GROLEAU, D. High-cell-density production of poly-??-
-
- ¹De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: Production of high-molecular-mass PHB. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 3–4, p. 367–376, 1995.
- CASTILHO, L. R.; MITCHELL, D. A.; FREIRE, D. M. G. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5996–6009, 2009.
- CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621–632, 2010.
- CHEN, B-Y.; HUNG, J-Y.; SHIAU, T-Z.; WEI, Y-H. Exploring two-stage fermentation strategy of polyhydroxyalkanoate production using *Aeromonas hydrophila*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 80-94, 2013a.
- CHEN, G.; PAGE, W. J. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 5, p. 347–350, 1997.
- CHEN, H.; MENG, H.; NIE, Z.; ZHANG, M. Polyhydroxyalkanoate production from fermented volatile fatty acids: Effect of pH and feeding regimes. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 533–538, 2013b.
- CHEN, W.; KUO, T. T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 9, p. 2260, 1993.
- CHISTOSERDOVA, L. Modularity of methylotrophy, revisited. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 2603–2622, 2011.
- CHISTOSERDOVA, L. Methylotrophs in natural habitats: current insights through metagenomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 14, p. 5763–5779, 2015.
- CHODAK, I. Polyhydroxyalkanoates: Origin, properties and applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, p. 451–477, 2008.
- COSTA, S. G. V. A. O.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 1063–1072, 2009.
- EUROPEAN BIOPLASTICS, 2015. Disponível em: < <http://www.european-bioplastics.org/news/publications/> > Acesso em: 10 de Agosto de 2016.
- GARCÍA, I. L.; LÓPEZ, J. A.; DORADO, M. P.; KOPSAHELIS, N.; ALEXANDRI, M.; PAPANIKOLAOU, S.; VILLAR, M. A.; KOUTINAS, A. A. Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-

¹De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 16–22, 2013.
- GE, L.; AMY TAN, G. Y.; WANG, L.; CHEN, C. L.; LI, L.; NGIN TAN, S.; WANG, J. Y. Determination of monomeric composition in polyhydroxyalkanoates by liquid chromatography coupled with on-line mass spectrometry and off-line nuclear magnetic resonance. **Talanta**, v. 146, p. 107–113, 2016.
- GHATE, B.; PANDIT, P.; KULKARNI, C.; MUNGI, D. D.; PATEL, T. S. PHB Production using novel agro-industrial sources from different *Bacillus* species. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 3, p. 242 - 249, 2011.
- HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; WILLIAMS, D. R.; DAWES, E. A. Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, p. 83 - 88, 1991.
- HÖFER, P.; VERMETTE, P.; GROLEAU, D. Introducing a new bioengineered bug: *Methylobacterium extorquens* tuned as a microbial bioplastic factory. **Bioengineered Bugs**, v. 2, n. 2, 2011.
- INDEX MUNDI, 2016. Disponível em: < <http://www.indexmundi.com/pt/> > Acesso em: 5 de Dezembro de 2016.
- JIAN, J.; LI, Z-J.; YE, H-M.; YUAN, M-Q.; CHEN, G-Q. Metabolic engineering for microbial production of polyhydroxyalkanoates consisting of high 3-hydroxyhexanoate content by recombinant *Aeromonas hydrophila*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6096 - 6102, 2010.
- KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 321–326, 2010.
- KHAN, A. B.; KHATTAK, M. I.; TARAR, O. M.; HABIB, F.; JAMIL, K.; YASMIN, A.; PARVEZ, S. Separation of polyhydroxyalkanoates-producing bacterial strains using PHA synthase gene and their evaluation for PHA deposition. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 645–652, ago. 2013.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607–619, 2005.
- KHOSRAVI-DARANI, K.; MOKHTARI, Z. B.; AMAI, T.; TANAKA, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1407–1424, 2013.

¹De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- KIM, M.; CHO, K.-S.; RYU, H. W.; LEE, E. G. CHANG, Y. K. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 55 - 59, 2003.
- KOROTKOVA, N.; LIDSTROM, M. E. Connection between Poly-B-Hydroxybutyrate Biosynthesis and Growth on C 1 and C 2 Compounds in the Methylotroph extorquens AM1. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 3, p. 1038–1046, 2001.
- KUMAR, P.; RAY, S.; PATEL, S. K. S.; LEE, J. K.; KALIA, V. C. Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 9–16, 2015.
- KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620–634, 2011.
- LABUZEC, S.; RADECKA, I. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 353 - 357, 2001.
- LAW, J. H.; SLEPECKY, R. A. Assay of poly-B-hydroxybutyric acid. **Journal of Bacteriology**, v. 82, n. 1958, p. 33–36, 1961.
- LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 2, p. 397–442, 2014.
- LEGAT, A.; GRUBER, C.; ZANGGER, K.; WANNER, G.; STAN-LOTTER, H. Identification of polyhydroxyalkanoates in Halococcus and other haloarchaeal species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 1119–1127, 2010.
- MARANGONI, C.; FURIGO, A.; DE ARAGÃO, G. M. F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 137–141, 2002.
- MIZUNO, K.; OHTA, A.; HYAKUTAKE, M.; ICHINOMIYA, Y.; TSUGE, T. Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 1335-1339, 2010.
- MOKHTARI-HOSSEINI, Z. B.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; SHOJAOSADATI, S. A.; KARIMZADEH, R.; HEIDARZADEH-VAZIFEKHORAN, A. Effect of feed composition on PHB production from methanol by HCDC of *Methylobacterium extorquens* (DSMZ 1340). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 8, p. 1136–1139, 2009a.
- MOKHTARI-HOSSEINI, Z. B.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; SHOJAOSADATI, S. A.;

¹De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- KARIMZADEH, R.; KHOSRAVI-DARANI, K. Media selection for poly(hydroxybutyrate) production from methanol by *Methylobacterium extorquens* DSMZ 1340. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 28, n. 3, p. 45–52, 2009b.
- MOTHES, G.; ACKERMANN, J. U.; BABEL, W. Regulation of poly(β -hydroxybutyrate) synthesis in *Methylobacterium rhodesianum* MB 126 growing on methanol or fructose. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 4, p. 360–363, 1998.
- MOŹEJKO-CIESIELSKA, J.; KIEWISZ, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? **Microbiological Research**, v. 192, p. 271–282, 2016.
- NCBI, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> > Acesso em: 13 de Novembro de 2016.
- OCHSNER, A. M.; SONNTAG, F.; BUCHHAUPT, M.; SCHRADER, J.; VORHOLT, J. A. *Methylobacterium extorquens*: methylotrophy and biotechnological applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 517–534, 2015.
- ORITA, I.; NISHIKAWA, K.; NAKAMURA, S.; FUKUI, T. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from methanol by *Methylobacterium extorquens* AM1 and the engineered strains under cobalt-deficient conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3715–3725, 2014.
- PLASTICS EUROPE, 2016. Disponível em: < <http://www.plasticseurope.org/information-centre/publications.aspx> > Acesso em: 10 de Agosto de 2016.
- PEÑA, C.; LÓPEZ, S.; GARCÍA, A.; ESPÍN, G.; ROMO-URIBE, A.; SEGURA, D. Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 39–47, 2014.
- POSTMA, E. Enzymic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces-Cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 468–477, 1989.
- PUBCHEM, 2016. Metanol. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/methanol> > Acesso em: 18 de Outubro de 2016.
- QIU, Y. Z.; HAN, J.; CHEN, G. Q. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 5, p. 537–542, 2006.
- RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBÉ, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. A. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2093–8, 1990.

¹De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: An overview. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 137–146, 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. .
- SINGH SAHARAN, B.; GREWAL, A.; KUMAR, P. Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, p. 1–18, 2014.
- SOERGEL, D. a W.; DEY, N.; KNIGHT, R.; BRENNER, S. E. Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. **The ISME Journal**, v. 6, n. 7, p. 1440–1444, 2012.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 25, n. 10, p. 1503–1555, 2000.
- TAN, G. Y. A.; CHEN, C. L.; LI, L.; GE, L.; WANG, L.; RAZAAD, I. M. N.; LI, Y.; ZHAO, L.; MO, Y.; WANG, J. Y. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. **Polymers**, v. 6, n. 3, p. 706–754, 2014.
- URTUVIA, V.; VILLEGAS, P.; GONZÁLEZ, M.; SEEGER, M. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 208–213, 2014.
- VALAPPIL, S. P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G. J.; HERNIMAN, J. M.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 475–487, 2007.
- VENKATA MOHAN, S.; VENKATESWAR REDDY, M.; VENKATA SUBHASH, G.; SARMA, P. N. Fermentative effluents from hydrogen producing bioreactor as substrate for poly(B-OH) butyrate production with simultaneous treatment: An integrated approach. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9382–9386, 2010.
- VIZCAINO-CASTON, I.; KELLY, C. A.; FITZGERALD, A. V. L.; LEEKE, G. A.; JENKINS, M.; OVERTON, T. W. Development of a rapid method to isolate polyhydroxyalkanoates from bacteria for screening studies. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 1, p. 101–104, 2016.
- WENDLANDT, K. D.; JECHOREK, M.; HELM, J.; STOTTMEISTER, U. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. **Journal of Biotechnology**, v.

¹De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

86, p. 127 - 133, 2001.

WUYTS, J. The European ribosomal RNA database. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 90001, p. 101D–103, 2004.

YEZZA, A.; FOURNIER, D.; HALASZ, A.; HAWARI, J. Production of polyhydroxyalkanoates from methanol by a new methylotrophic bacterium *Methylobacterium* sp. GW2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 211–218, 2006.

ZUÑIGA, C.; MORALES, M.; BORGNE, S. L.; REVAH, S. Production of poly-B-hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 876-882, 2011.

¹De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

ANEXOS

ANEXO I – Curvas de Calibração e Peso Seco

Figura 40 – Curva de calibração realizada para quantificar o metanol.

Concentrações utilizadas de: 0; 3960 mg.L⁻¹; 7920 mg.L⁻¹; 23760 mg.L⁻¹; 28800 mg.L⁻¹ e 47520 mg.L⁻¹. Esses valores correspondem a concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2; 3; 4; 5 e 6% (v/v) de metanol em água.

Figura 41 – Exemplo de cromatograma de metanol analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Tempo de retenção do metanol em 18.9 minutos.

Figura 42 – Curva de peso seco realizada para a bactéria *Methylobacterium extorquens* CBMAI, nas seguintes absorvâncias: 0; 0,2; 0,6; 0,8 e 1,0.

ANEXO II – Sequenciamento Parcial do Gene 16S

Sequenciamento da bactéria *Methylobacterium extorquens* CBMAI

TAATAAGCGCAGCTGGATCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTG
TCCGGGACGATAATGACGGTACCGGAAGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCGATTAAAGTCGGG
GGTGAAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAATTGCCTTCGATACTGGTTGGCTTGAGACCGGAAGAGGACA
GCGGAAGTGCAGGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGT
CTGGTCCGGTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAACCCCTGGTAGA

Sequenciamento do Isolado 1 (*Methylobacterium extorquens*)

CGGGGCTGAATAAGACAAAGGGGGGGTTCTGTGCTCGGATCCTGGGCGTAAGGGCGCGTAGGCGGCCGA
TTAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAATTGCCTTCGATACTGGTTGGCTTGAGACCG
GAAGAGGACAGCGGAAGTGCAGGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAGTGGCGA
AGGCGGCTGTCTGGTCCGGTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGCCGTTGGCCTGCTTGCAGGTGAGTGGCGCCGCTAA
CGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCATCCCTTGACATGGCA
TGTTACCTCGAGAGATCGGGGATCCTCTTCGGAGGCGTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGC
TCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCATCATTCA
GTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCTCAT
GGCCCTTACGGGATGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGACGCGAAGCCGCGAGGTG
GAGCAAATCCCCAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGGGTGCATGAAGGCGGAATC
GCTAGTAATCGTGGATCAGCACGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAACCCGCGCCCGTCA
G

Sequenciamento do Isolado 2 (*Methylobacterium rhodesianum*)

TGGAATCCCGTGGGCGCGCGGAGGGCGGTGAAGGTGCCCGGGATCACTGGGGCGTAAGGGGCGCGTAG
GCGGCCGATTAAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACCACAGAATTGCCCTTCGATACTGGTTGGCT
TGAGACCGGAAGAGGACAGCGGAAGTGCAGGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACC
AGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCCGGTTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGCCGTTGGCCTGCTTGCAGGTGAGTGGC
GCCGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCATCCCTTG
ACATGGCATGTTACCCCGAGAGATCGGGGATCCTCTTCGGAGGCGTGACACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCC
ATCATTGAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAA
GTCCTCATGGCCCTTACGGGATGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGAGGGACGCGAAACC
GCGAGGTTGAGCAAATCCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGGGTGCATGAAG
GCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCACGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACTACCGCG
CCCCGTC

Figura 15

Comprovante de apresentação de trabalho em Congresso Nacional.

ANEXO IV – Cronograma de atividades

Tabela 8 – Cronograma apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química com as atividades previstas para o mestrado.

ATIVIDADE	Fev/15 Ag/15	Ag/15 Fev/16	Fev/16 Ag/16	Ag/16 Fev/17
Revisão bibliográfica	X	X	X	X
Aquisição de bactérias		X		
Curva de crescimento (determinação de parâmetros cinéticos)		X	X	
Bioprocessos (escala laboratório)			X	
Avaliação dos resultados			X	X
Divulgação dos resultados			X	X

A Tabela 6 lista as atividades apresentadas no início do mestrado da aluna Letícia Oliveira Bispo Cardoso, e a Tabela 7 lista as atividades que foram cumpridas ao longo dos 48 meses de seu mestrado, com algumas adaptações que foram necessárias, como a apresentação do trabalho ocorrendo no último semestre do curso de pós-graduação, por exemplo.

Tabela 9 – Cronograma com as atividades realizadas ao longo dos 48 meses de mestrado.

ATIVIDADE	Fev/15 Ag/15	Ag/15 Fev/16	Fev/16 Ag/16	Ag/16 Fev/17
Revisão bibliográfica	X	X	X	X
Aquisição de bactérias		X		
Curva de crescimento (determinação de parâmetros cinéticos)		X	X	
Bioprocessos (escala laboratório)		X	X	X
Avaliação dos resultados			X	X
Divulgação dos resultados			X	X

Figura 44 – Representação dos créditos obtidos para depósito da dissertação durante os 48 meses de mestrado.

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	32	40	42
Estágios:			
Total:	32	40	42