

DIANA CAROLINA TUSSO PINZÓN

**Caracterização do gene PHA sintase de bactérias isoladas
a partir de amostras de solo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão Original

São Paulo
2015

RESUMO

TUSSO, D. C. T. **Caracterização do gene PHA sintase de bactérias isoladas a partir de amostras de solo.** 2015. 130 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres produzidos por microrganismos na forma de grânulos intracelulares, como fonte de carbono e energia. Estes materiais despertam um grande interesse biotecnológico, já que conferem propriedades termoplásticas e elastoméricas semelhantes aos plásticos sintéticos de origem petroquímica. Na biossíntese dos PHA, a PHA sintase é a enzima chave para sua produção e catalisa a incorporação de monômeros 3HA à cadeia polimérica. A partir de isolados bacterianos obtidos por Lício (2011) capazes de produzir Poli(3-hidroxibutirato) (P3HB). Estes isolados foram identificados pela análise da sequência dos genes rDNA 16S e pela construção de uma árvore filogenética como pertencentes ao gênero *Burkholderia* sp. Posteriormente, os genes da PHA sintase desses isolados foram克lonados no plasmídeo pBBRMCS-2, e expressos em mutantes de *Pseudomonas* sp. (LFM461) e *Burkholderia sacchari* (LFM344), deficientes no acúmulo de PHA. As linhagens recombinantes foram cultivadas em excesso de glicose como fonte de carbono com o objetivo de avaliar o potencial da PHA sintase de incorporar monômeros (3HA) ao PHA. Foram realizados ensaios de acúmulo de PHA usando glicose como fonte de carbono, apresentando a produção de unidades de 3HB, 3HO e 3HD nas linhagens recombinantes de *Pseudomonas* sp. As linhagens recombinantes de *B. sacchari* incorporaram como único constituinte P(3HB). Ensaios de acúmulo de PHA foram realizados nas linhagens recombinantes de *B. sacchari*, usando como co-substratos diferentes ácidos graxos, sendo detectada a incorporação de unidades de 3HV e 3HHx além do 3HB, quando foram fornecidos ácido hexanóico e valérico. Estes resultados indicam que as PHA sintases classe I são capazes de incorporar diferentes unidades monoméricas.

Palavras-chave: Biopolímeros. Polihidroxialcanoatos. PHA sintase. *Pseudomonas* sp. *Burkholderia* sp.

ABSTRACT

TUSSO, D. C. T. **PHA synthase gene characterization of bacteria isolated from soil samples.** 2015. 130 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The polyhydroxyalkanoates (PHA) polyesters produced by microorganisms are as intracellular granules as a source of carbon and energy. These materials arouse great interest in biotechnology, as provide thermoplastic and elastomeric properties similar to the synthetic plastics petrochemical origin. In the biosynthesis of PHA, the PHA synthase is the key enzyme for its production and catalyzes the incorporation of 3HA monomer to the polymer chain. From bacterial isolates obtained by Lício (2011) capable of producing poly (3-hydroxybutyrate) (P3HB). These isolates were identified by sequence analysis of 16S rDNA genes and the construction of a phylogenetic tree of the genus *Burkholderia* as sp. There after, the PHA synthase genes were cloned into these isolated pBBRMCS-2 plasmid and expressed in mutant of *Pseudomonas* sp. (LFM461) and *Burkholderia sacchari* (LFM344), deficient in PHA accumulation. The recombinant strains were grown in excess glucose as carbon source in order to evaluate the potential of PHA synthase incorporate monomers (3HA) to PHA. Were performed PHA accumulation assays using glucose as carbon source, with the production of 3HB units, 3HO and 3HD in recombinant strains of *Pseudomonas* sp. The recombinant strains of *B. sacchari* incorporated as sole constituent of P (3HB). PHA accumulation assays were performed on the recombinant strains of *B. sacchari*, as co-substrates using different fatty acids being detected to incorporate 3HV units and 3HHx addition of 3HB, were provided as valeric and hexanoic acid. These results indicate that the PHA synthases of Class I are able to incorporate different monomer units.

Keywords: Biopolymers, Polhyhydroxyalkanoate, PHA synthase, *Pseudomonas* sp. *Burkholderiasp.*

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história tem se desenvolvido materiais com características que se ajustam às necessidades do homem, tal é o caso dos plásticos, materiais sintéticos, produzidos a partir de petróleo ou gás natural. Atualmente os plásticos sintéticos têm várias aplicações, desde embalagens, produtos domésticos, canos para drenagem materiais de construção, etc. (FORMIGONI; RODRIGUES, 2009).

A grande demanda de plásticos de origem petroquímica tem causado problemas ambientais, uma vez que, são acumulados no meio ambiente, pois não são biodegradáveis. Além disso, ao utilizar grandes quantidades de petróleo, são gerados milhões de toneladas de CO₂ e de outros gases, provocando riscos para a saúde pública. Em 2011, aproximadamente 280 milhões de toneladas de plásticos de origem petroquímica foram produzidos com a expectativa de aumentar 4% ao ano até 2016 (CHEN; PATEL, 2012; GUMEL, ANNUAR; CHISTI, 2013). A área de maior produção está nos países asiáticos (excluindo Japão), onde o consumo de plásticos atual, é de aproximadamente de 20 Kg/per capita. A redução do consumo de plástico é dificultada devido às suas propriedades versáteis, mas é possível substituí-los (CHANPRATEEP, 2010). Uma alternativa é desenvolver materiais sustentáveis ao meio ambiente para minimizar os problemas que são causados pelos plásticos convencionais de origem petroquímica.

Dentre esses materiais são encontrados os polímeros biodegradáveis, os quais podem ser descompostos pela ação de micro-organismos, tais como bactérias, fungos e algas. Descobertos há cerca de 10 anos, estes materiais, atualmente têm uma participação mínima no mercado internacional, em virtude de seu alto custo e limitada aplicabilidade. Vários polímeros biodegradáveis são formados durante o ciclo de crescimento de organismos vivos, envolvendo processos metabólicos complexos para sua formação dentro da célula, sendo denominados polímeros biodegradáveis naturais (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Existem várias classes de polímeros naturais, dentre eles os poliésteres bacterianos, mais comumente chamados poli-hidroxialcanoatos (PHAs), produzidos naturalmente por uma grande variedade de bactérias como reserva de carbono e energia. Os PHAs tem sido amplamente estudados, já que caracterizam-se principalmente por serem produzidos a partir de fontes renováveis, serem biocompatíveis e biodegradáveis. O termo biodegradável é aplicado a qualquer polímero prontamente degradado a CO₂ e água, sugerindo que podem ser assimilados por

distintos micro-organismos impedindo assim o seu acúmulo ambiental (FOSTER et al., 1995; JENDROSSEK; HANDRICK, 2002; KIM; RHEE, 2003; MATAVULJ; MOLITORIS, 1992; TOKIWA; CALABIA, 2004; WITT et al., 2001;). A biocompatibilidade indica que os PHAs não causam efeitos tóxicos quando são aplicados em diversos hospedeiros, pois são imunologicamente inertes e podem ser degradados pelos tecidos humanos lentamente (VERLINDEN et al., 2007).

A síntese de PHA depende da natureza química da fonte de carbono oferecida às bactérias, também das vias metabólicas que cada uma possui e da classe de PHA sintase. Presente no genoma do micro-organismo. Dependendo da fonte de carbono fornecida, as vias metabólicas bacterianas darão origem a diferentes hidroxiacil-CoA, os quais serão reconhecidos e polimerizados pela PHA sintase (SILVA et al., 2007).

Um dos fatores que determina a composição do polímero, é a especificidade pelo substrato da enzima PHA sintase (PhaC), enzima chave para biossíntese de PHAs, responsável por catalisar a incorporação de monômeros à cadeia polimérica em formação. Existem quatro classes de PHA sintases, as mais destacadas são a classe I, capazes de polimerizar unidades de HA_{SCL} e as de classe II, específicas para unidades de HA_{MCL}. Poucas PHA sintases apresentam a capacidade de incorporar 3HA_{SCL}, assim como, 3HA_{MCL}, como por exemplo as PHA sintases de *Aeromonas caviae* e *Thiocapsa pfennigii* (STEINBÜCHEL; HEIN, 2001).

A partir da sua composição monomérica, os PHAs estão classificados em dois grandes grupos: PHAs de cadeia curta (PHAs_{SCL}), sendo o P3HB seu principal representante, e os PHAs de cadeia média (PHAs_{MCL}). As propriedades dos PHAs podem variar de acordo com sua composição. O homopolímero P3HB é altamente cristalino, rígido e quebradiço, enquanto, os PHAs_{MCL} são menos rígidos e quebradiços do que P3HB, mas o alongamento para ruptura é alto, representando um material elástico com temperatura de fusão baixa (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Recentemente tem-se demonstrado, que as propriedades anteriormente descritas, podem ser melhoradas com a obtenção de copolímeros PHAs_{SCL-MCL}, despertando um grande interesse industrial, já que as propriedades destes copolímeros resultam ser semelhantes ao polietileno de baixa densidade, permitindo ampliar seu uso para diferentes aplicações (HÄNGGI, 1995; LEE et

al., 2000; LENZ; MARCHESSAULT, 2005; LU et al., 2004; RAMSAY et al., 1990; WEI et al., 2009).

Esses polímeros podem ser sintetizados por linhagens naturais, apesar disso, linhagens recombinantes têm contribuído a aumentar o rendimento do polímero sintetizado assim como modular a composição do PHA a partir da escolha do hospedeiro adequado (AHN et al., 2000; LEE et al., 2001; PARK et al., 2001). Isto é, a expressão de genes relacionados à síntese de PHA em outros hospedeiros, pode revelar propriedades não detectadas na linhagem original devido ao metabolismo desta não suprir de forma adequada os monômeros desejados.

Neste contexto, este trabalho buscou avaliar a capacidade de diferentes PHA sintases na incorporação de monômeros na cadeia principal quando são expressas em outras bactérias, apontando à produção de polímeros que são interessantes industrialmente.

6 CONCLUSÕES

Os isolados SCU 63 e SCU 66, são bactérias isoladas a partir de amostras de solo, que são capazes de produzir P(3HB) com altos teores de polímero que superam a micro-organismos de referência como *Burkholderia sacchari* LFM 101.

Estes isolados foram identificados pela análise do gene 16S rDNA como pertencentes ao gênero *Burkholderia* sp. apresentando proximidade filogenética com pelo menos outros quatro isolados de área de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro.

A partir de resultados na detecção, identificação e a construção de uma árvore filogenética do gene *phaC* dos isolados SCU 63 e SCU 66, indicam fortemente que possuem uma PHA sintases da classe I, na qual o gene *phaC* está agrupado na forma do operon *phaCAB*.

A expressão dos genes dos isolados levou à produção de monômeros 3HB, 3HD e 3HDD em mutante de *Pseudomonas* sp. LFM 461 e P(3HB) em mutante de *Burkholderia sacchari* LFM 344, quando glicose (10 g/L) era fornecida como única fonte de carbono, por um período de 72 h.

Em experimentos fornecendo-se glicose (10 g/L) com ácido butírico e ácido octanóico (1g/L) foi detectado unicamente P(3HB), não gerando unidades 3HHx em linhagens recombinantes de *Burkholderia sacchari* LFM 344, abrigando os genes *phaC* dos isolados.

Quando foram usados ácidos graxos impares, propiônico, valérico e heptanóico como co-substratos, foi detectada a presença tanto de monômeros 3HB quanto de monômeros 3HV, obtendo maiores proporções deste monômero quando o ácido heptanóico foi suprido. No caso do ácido nonanóico não foi possível evidenciar a incorporação do monômero 3HV à cadeia principal do monômero.

As linhagens recombinantes de *B. sacchari* foram capazes de acumular P(3HB-*co*-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanóico com frações molares de 1,55 e 1,00 mol%, indicando que as PHA sintases dos isolados SCU 63 e SCU 66 permite a formação de PHA com teores combinados de 3HB e 3HHx.

Também foi evidenciada a produção do copolímero P(3HB-*co*-4HB) em ambas linhagens recombinantes com valores alto na fração molar de 4HB na linhagem recombinante LFM 344 pBBR1MCS-2::*phaC*_{SCU63} com uma fração molar de 14,01 mol% e também foi observado um alto teor de polímero total com um valor de 49,03% da massa seca celular.

A produção de terpolímeros P(3HB-co-3HV-co-3HHx) usando varias proporções de ácidos hexanóico e heptanóico como co-substratos foi evidencia em ambas linhagens recombinantes, confirmando que as PHA sintases são capazes de incorporar diferentes monômeros além do 3HB à cadeia principal do polímero, quando são usadas diferentes fontes de carbono como co-substratos.

REFERÊNCIAS¹

- AHN, W. S; PARK, S. J.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 3624-3627, 2000.
- AMARA, A. A.; REHM, B. H. Replacement of the catalytic nucleophile cysteine-296 by serine in class II polyhydroxyalkanoate synthase from *Pseudomonas aeruginosa*-mediated synthesis of a new polyester: identification of catalytic residues. **Biochem. J.**, v. 374, n. Pt 2, p. 413-421, 2003.
- ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A. The synthesis of short- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) mixtures from glucose- or alkanoic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*. **J. Ind. Micro. Biotech.**, v. 28, p. 147-153, 2002.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 450-472, 1990.
- BABEL, W.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. 342 p.
- BAKER, G.; SMITH, J.; COWAN, D. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **J. Micro. Meth.**, v. 55, n. 3, p. 541-555, 2003.
- BEEBY, M.; CHO, M.; STUBBE, J.; JENSEN, J. J. Growth and Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha*. **J. Bacteriol.**, v. 194, n. 5, p. 1092-1099, 2012.
- BHUBALAN, K.; LEE, W. H.; LOO, C. Y.; YAMAMOTO, T.; TSUGE, T.; DOI, Y.; SUDESH, K. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate-*co*-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palmkernel oil and 3HV-precursors. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 93, p.17-23, 2008.
- BRÄMER, C. O.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; VANDAMME, P.; STEINBÜCHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. Nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar cane plantation in Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 1709-1713, 2001.
- BRÄMER, C. O.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. C. G.; PRIEFERT, H.; STEINBÜCHEL, A. Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate producing strain *Burkholderia sacchari* IPT 101 and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 271-279, 2002.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRUCE, THIAGO.; MARTINEZ, I. B.; NETO, O. M.; VICENTE, A. C. P.; KRUGER, R. H.; THOMPSON, F. L. Bacterial Community Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Soils. **Microb. Ecol.**, v. 60, p. 840–849, 2010.

BONFIELD, J. K.; STADEN, R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. **DNA. Seq.**, v. 6, n. 2, p. 109-117, 1996.

RANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(p-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible and biodegradable polyesters. **Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.** v.41, p. 77-93, 1990.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: Technology and economics. **Trends. Biotechnol.**, v. 5, p. 246-250.

CASTANEDA, M.; GUZMAN, J.; MORENO, S.; ESPIN, G. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 2624–2628, 2000.

CATALÁN, A. I.; FERREIRA, F.; GILLA, P. R.; BATISTA, S. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the lacZlacY genes. **Enz. Micro. Techn.**, v. 40, p. 1352–1357, 2007.

CESÁRIO, T. M.; RAPOSO, R. S.; DE ALMEIDA, M. C. M. D.; KEULEN, F. V.; FERREIRA, B. S.; TELO, J. P.; DA FONSECA, M. M. R. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. XX, p. 9, 2014.

CHANG, H. M.; WANG, Z. H.; LUO, H. N.; XU, M.; REN, X. Y.; ZHENG, G. X.; WU, B. J.; ZHANG, X. H.; LU, X. Y.; CHEN, F.; JING, X. H.; WANG, L. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.47, n. 7, p. 533-539, 2014.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.

CHAUDHRY, N. W.; JAMIL, N.; ALI, I.; AYAZ, H. M.; HASNAIN, S. Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. **Ann. Microbiol.**, v. 61, p. 623–629, 2011.

CHEE, J. Y.; LAU, N. S.; SAMIAN, M. R.; TSUGE, T.; SUDESH, K. Expression of *Areomonas caviae* polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Burkholdeia* sp. USM (JCM15050) enables the biosynthesis of SCL-MCL PHA from pal oil products. **J. Appl. Microbiol.**, v.112, n. 1, p. 45-54, 2012.

CHEN, G. G. Q. **Plastics from Bacteria: natural functions and applications**. Berlin: Springer Science & Business Media, 2009. 450 p.

CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G. A. Elastomeroc biomaterials for tissue engineering. **Prog. Polym. Sci.**, v. 38, p. 584-671, 2013.

CHEN, G. Q.; PATEL, M. K. Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review. **Chem. Rev.**, v. 112, n. 4, p. 2082-2099, 2012.

CHO, M.; BRIGHAM, C. J.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. Purification of polyhydroxybutyrate synthase from its native organism, *Ralstonia eutropha*: Implications for the initiation and elongation of polymer formation in vivo. **Biochemistry**, v. 51, p. 2276-2288, 2012.

CLEMENTE, T.; SHAH, D.; TRAN, M.; STARK, D.; PADGETTE, S.; DENNIS, D.; BRUCKENER, K.; STEINBUCHEL, A.; MITSKY, T. Sequence of PHA synthase gene from two strains of *Rhodospirillum rubrum* and in vivo substrate specificity of four PHA synthases across two heterologous expression systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 420-429, 2000.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. **Environ. Microbiol.**, v. 5, n. 9, p. 719-729, 2003.

DENNIS, D.; MCCOY, M.; STANGL, A.; VALENTIN, H. E.; WU, Z. Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. **J. Biotechnol.**, v. 64, n. 2-3, p. 177-186, 1998.

DOI, Y. **Microbial polyesters**. New York: VCH Publishers, 1990. 166 p.

DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; SOGA, K. Biosynthesis of copolymers in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ^{13}C -labeled acetate and propionate. **Macromolecules**, v. 20, p. 2988-2991, 1987.

DOI, Y.; TAMAKI, A.; KUNIOKA, M.; SOGA, K. Biosynthesis of terpolyesters of 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 5-hydroxyvalerate, in *Alcaligenes eutrophus* from 5-chloropentanoic and pentanoic acids. **Makromol. Chem. Rapid Commun.**, v. 8, p. 631-635, 1987.

DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; SOGA, K. Nuclear magnetic resonance studies on unusual bacterial copolymers of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate. **Macromolecules**, v. 21, p. 2722-2727, 1988.

EGGINK, G.; VAN DER WAL, H.; HUIBERTS, G. N. M.; DE WAARD, P. Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxybutyrate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida*. **Ind. Crops. Prod.**, v. 1, p. 157-163, 1993.

ELLAR, D.; LUNDGREN, D. G.; OKAMURA, K.; MARCHESSAULT, R. H. Morphology of

Poly- β -hydroxybutyrate Granules. **J. Mol. Biol.**, v. 35, p. 489-502, 1968.

FIGUEIREDO, T. V. B.; CAMPOS, M. I.; SOUSA, J. R.; DRUZIAN, I. J. Produção E Caracterização De Polihidroxialcanoatos Obtidos Por Fermentação Da Glicerina Bruta Residual Do Biodiesel, **Quim. Nova.**, v. 37, n. 7, p. 1111-1117, 2014.

FILIPOV, M. C. O. **Obtenção e caracterização de mutantes de *Burkholderia* sp. IPT 101 deficientes na síntese ou no reconsumo de poli-3-hidroxibutirato.** 2000. 154 f (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FORMIGONI, A.; RODRIGUES, E. F. **A Busca Pela Sustentabilidade Do PET, Através Da Sustentabilidade Da Cadeia De Suprimentos.** International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo, 2009. p. 1-10.

FOSTER, L. J. R.; ZERVAS, S. J.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. The biodegradation of poly-3-hydroxyalkanoates, PHAs, with long alkyl substituents by *Pseudomonas maculicola*. **Biodegradation**, v. 6, p. 67-73, 1995.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros Biodegradáveis – Uma Solução Parcial Para Diminuir A Quantidade Dos Resíduos Plásticos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis gene of *Aeromonas caviae*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4821-4830, 1997.

FUKUI, T.; SHIOMI, N.; DOI, Y. Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 3, p. 667-673, 1998.

FUKUI, T.; ABE, H.; DOI, Y. Engineering of *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from fructose and solid-state properties of the copolymer. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 618-624, 2002.

GAO, X.; CHEN, J. C.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, n.6, p. 768-774, 2011.

GAO, X.; YUAN, X. X.; SHI, Z. Y.; GUO, Y. Y.; SHEN, X. W.; CHEN, J. C.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *E. coli* containing an optimized PHA synthase gene. **Microbial. Cell. Factories.**, v. 11, n. 130, p. 1-10, 2012.

GOMES, R. **Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica.** 2009. 100 f (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GOMEZ, J. G. C. **Isolamento e caracterização de bactérias productoras de polihidroxialcanoatos**. 1994. 92 f (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLII, R. C. P.; TORRES, B. B.; BUENO NETTO, C. L.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, L. F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 45, p. 785-791, 1996.

GOMEZ, J. G. C.; FONTOLAN, V.; ALLII, R. C. P.; RODRIGUES, M. F. A.; BUENO NETTO, C. L.; SILVA, L. F.; SIMÕES, D. A. Production of poly-3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate (P3HB-*co*-3HV) by soil isolated bacteria able to use sucrose. **Rev. Microbiol.**, v. 28, p. 43-48, 1997.

GOMEZ, J. G. C **Produção por Pseudomonas sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: Avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes**. 2000. 155 f (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

GOMEZ, J. G. C; BUENO, C. Produção de poliésteres bacterianos. In: LTDA, E. B. (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, v.3 Procesos fermentativos e enzimáticos, 2001.

GRAGE, K.; JAHNS, A. C.; PARLANE, N.; PALANISAMY, R.; RASIAH, I. A.; ATWOOD, J. A.; REHM, B. H. A. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 660-669, 2009.

GRILLO, R.; PEREIRA, A.; MELO, N. F. S.; PORTO, R. M.; FEITOSA, L. O.; TONELLO, P. S.; FILHO, N. L. D.; ROSA, A. H.; LIMA, R.; FRACETO, L. F. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: preparation, characterization and release kinetics in water. **J. Hazard. Mater.**, v. 186, n. 2-3, p. 1645-1651, 2011.

GROSS, R. A.; BRANDL, H.; ULMER, H. W.; POSADA, M. A.; FULLER, R. C.; LENZ, R. W. The biosynthesis and characterization of new poly(P-hydroxyalkanoates). **Polymer. Prepr.**, v. 30, p. 492-493, 1989.

GUMEL, A. M.; ANNUAR , M. S. M.; CHISTI, Y. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. **J Polym. Environ.**, v. 21, p. 580–605, 2013.

HANG, X.; ZHANG, G.; WANG, G.; ZHAO, X.; CHEN, G. PCR cloning of polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from *Burkholderia caryophylli* and their functional expression in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS. Microbiology. Letters.**, v. 210, p. 49-54, 2002.

HÄNGGI, U. J. Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. **FEMS. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 213-220, 1995.

HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; CHU, L.; DAWES, E. A. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 52, p. 91–96, 1988.

HENDERSON, R. A.; JONES, C. W. Poly-3-hydroxybutyrate production by washed cells of *Alcaligenes eutrophus*; purification, characterization and potential regulatory role of citrate synthase. **Arch. Microbiol.**, v. 168, p. 486–492, 1997.

HOFFMANN, N.; AMARA, A. A.; BEERMANN, B. B.; QI, Q.; HINZ, J.; REHM, B. H. A. Biochemical characterization of the *Pseudomonas putida* 3-hydroxyacyl ACP:CoA transacylase, which diverts intermediates of fatty acid de novo biosynthesis. **J Biol. Chem.**, v. 277, n. 45, p. 42926-42936, 2002.

HOLMES, P. A.; COLLINS, S. H.; WRIGHT, L. F. **3-Hydroxybutyrate Polymers**. U.S. patent 4,477,654, 1984.

HUIJBERTS, G. N. M.; DE RIJK, T. C.; DE WAARD, P.; EGGINK, G. ¹³C Nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 176, p.1661–1666, 1995.

HUSCHNER, F.; GROUSSEAU, E.; BRIGHAM, C. J.; PLASSMEIER, J.; POPOVICB, M.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acids and their salts. **Process. Biochemistry.**, v. XX, p. 8, 2014.

IQBALA, N. M. D.; AMIRUL, A. A. Synthesis of P(3HB-*co*-4HB) copolymer with target-specific 4HB molar fractions using combinations of carbon substrates. **J Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 89, p. 407–418, 2014.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 403-432, 2002.

JUNG, Y. M.; PARK, J. S.; LEE, Y. H. Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned *phaCAB* genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. **Enzyme. Microb. Technol.**, v. 26, p. 201–208, 2000.

KANG, C. K.; LEE, H. S.; KIM, J. H. Accumulation of PHA and its copolymers by *Methylobacterium* sp. KCTC 0048. **Biotechnol. Lett.**, v. 15, p. 1017–1020, 1993.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97–104, 2001.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates.

Process. Biochemistry., v. 40, p. 607-619, 2005.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) having a high hydroxyvalerate content with valeric acid feeding. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 34, p. 457–461, 2007.

KIM, B. S.; LEE, S. C; LEE, S.Y; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K.; WOO, S. I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 43, n. 9, p. 892-898, 1994.

KIM, D. Y.; RHEE, Y. H. Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61, p. 300-308, 2003.

KIM, J. H; KIM, B. G; CHOI, C. Y. Effect of propionic acid on Poly (beta-hydroxybutyric-*co*-beta-hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol. Lett.**, v. 14, p. 903–906, 1992.

KOVACH, M. E.; ELZER, P. H.; HILL, D. S.; ROBERTSON, G. T.; FARRIS, M. A.; ROOP, R. M.; PETERSON, K. M. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene.**, v. 166, n. 1, p. 175-176, 1995.

KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; DOI, Y. New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids. **Polym. Commun.**, v. 29, p. 174–176, 1989.

LAFFERETY, R. M.; KORSATKO, B.; KORSATKO, W. **Microbial production of poly-β-hydroxybutyric acid.** In: RHEM, H. J.; REED, G. (eds) Biotechnology. Weinheim: VCH, 1988. v. 6b, p. 136-176.

LANGENBACH, S.; REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Functional expression of the PHA synthase gene PhaC1 from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 150, p. 303–309, 1997.

LAU, N. S.; CHEE, J. Y.; TSUGE, T.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of a novel polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer produced by *Burkholderia* sp. USM (JCM15050). **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 20, p. 7916-7923, 2010.

LAU, N. S.; SUDESH, K. Revelation of the ability of *Burkholderia* sp. USM (JCM 15050) PHA synthase to polymerize 4-hydroxybutyrate monomer. **AMB. Express.**, v. 2, n.41, p. 2-9, 2012.

LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science.**, v. 38, p. 536-583, 2013.

LEAF, T. A.; SRIENC, F. Metabolic modeling of polyhydroxybutyrate biosynthesis. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 57, p. 557– 570, 1998.

LEE, H. J.; CHOI, M. H.; KIM, T. U.; YOON, S. C. Accumulation of polyhydroxyalkanoic acid containing large amounts of unsaturated monomers in *Pseudomonas fluorescens* BM07 utilizing saccharides and its inhibition by 2-bromooctanoic acid. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 4963-4974, 2001.

LEE, I. Y.; KIM, M. K.; CHANG, H. N., PARK, Y. H. Regulation of poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 131, p. 35-39, 1995.

LEE, M. Y; PARK, W. H. Preparation of bacterial copolyesters with improved hydrophylicity by carboxilation. **Macromol. Chem. Phys.**, v. 201, p. 2771-2774, 2000. 1v.

LEE, S. Y.; CHOI, J. I. Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 71, p. 183-207, 2001.

LEE, W. H.; LOO, C. Y.; NOMURA, C. T.; SUDESH, K. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 15, p. 6844-6851, 2008.

LENZ, R. W.; MARCHESSAULT, R. H. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. **Biomacromolecules.**, v. 6, p. 1-7, 2005.

LIEBERGESELL, M.; SCHMIDT, B. ; STEINBÜCHEL, A. Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 78, n. 2-3, p. 227-32, 1992.

LÍCIO, D.; GOMEZ, J. G.C.; SILVA, L. F. Avaliação da produção de PHA por linhagens bacterianas isoladas de amostra de lodo de esgoto. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17., 2-5 ago. 2009, Natal. **Anais...**Natal- RN: UFRN, 2009.

LÍCIO, D. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase**. 2011.(Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LOPES, M. S. G.; GOMEZ, J. G. C.; TACIRO, M. K.; MENDONÇA, T. T.; SILVA, L. F. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous remotion of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 41, p.1353-1363, 2014.

LOPEZ, N. I.; PETTINARI, J. M.; MENDEZ, B. S. Detection of reserve polymer synthesis genes in natural bacterial populations. **FEMS. Microbiology. Ecology.**, v. 22, p. 129-136, 1997.

LU, X. Y.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) with flexible 3-hydroxyhexanoate content in *Aeromonas hydrophila* CGMCC 0911. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, p. 41-45, 2004.

LUO, R.; CHEN, J.; ZHANG, L.; CHEN, G. Polyhydroxyalkanoate copolyesters produced by *Ralstonia eutropha* P3HB-4 harboring a low-substrate-specificity PHA synthase PhaC_{Ps} from *Pseudomonas stutzeri* 1317. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 218–225, 2005.

LUTZ, S.; BORNSCHEUER, U. T. **Protein Engineering Handbook**. Alemanha: Protein Engineering Handbook, 2012.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Micro. Mol. Bio. R.**, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.

MATAVULJ, M.; MOLITORIS, H. P. Fungal degradation of polyhydroxyalkanoates and a semiquantitative assay for screening their degradation by terrestrial fungi. **FEMS. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 323-331, 1992.

MATSUDA, T. S.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; PRADELLA, J. G. C. Produção de PHA em *Aeromonas* isoladas de lodo de esgoto. CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador/BA.

MATSUMOTO, K.; KEI, K.; JO, S. J.; SONG, Y.; TAGUCHI, S. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* using propionate as a precursor. **J. Bio.**, v. 152, p. 144-146, 2011.

MATSUSAKI, H.; MANJI, S.; TAGUCHI, K.; KATO, M.; FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and molecular analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 24, p. 6459-6467, 1998.

MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 585–592, 1999.

MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 14, p. 4235-4243, 2001.

MENDONÇA, T. T. **Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) P(3HB-co-3HHx)**. 2009.(Mestrado em Biotecnologia). - Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MENDONÇA, T. T.; GOMEZ, J. G.; BUFFONI, E.; SÁNCHEZ, R. J.; SCHRIIPSEMA, J.; LOPEZ, M. C. G.; SILVA, L. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v.116, p. 815-829, 2013.

MICHELIN-RAMOS, M. E. **Caracterização de linhagens bacterianas para a produção de poli-3-hidroxibutirato (P3HB) a partir de hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar**. 2003. 93. Tese- Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

MILLER, S. C.; LIPUMA, J. J.; PARKE, J. L. Culture-based and non-growth-dependent detection of the Burkholderia cepacia complex in soil environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 8, p. 3750-3758, 2002.

MIYAMOTO, C. M.; SUN, W. Q.; MEIGHEN, E. A. The LuxR regulator protein controls synthesis of polyhydroxybutyrate in *Vibrio harveyi*. **BBA. Protein. Struct. Mol. Enzym.**, v. 1384, p. 356–364, 1998.

NAIK, S.; GOPAL, V.; SOMAL, P. Bioproduction of polyhydroxyalkanoates from bacteria: A metabolic approach. **World. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, p. 2307–2314, 2008.

NODA, I.; SATKOWSKI, M. M.; DOWREY, A. E.; MARCOTT, C. Polymer alloys of Nodax copolymers and poly(lactic acid). **Macromol. Biosci.**, v.4, n. 3, p. 269-75, 2004.

OEDING, V.; SCHLEGEL, H. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H-16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochem. J.**, v. 134, p. 239-248, 1973.

PARK, J. S.; HUH, T. L.; LEE, Y. H. Characteristics of cell growth and poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis of *Alcaligenes eutrophus* transformants harboring cloned *phaCAB* genes. **Enzyme. Microb. Technol.**, v. 21, p. 85-90, 1997.

PARK, J. S.; LEE, Y. H. Metabolic characteristics of isocitrate dehydrogenase leaky mutant of *Alcaligenes eutrophus* and its utilization for poly-beta-hydroxybutyrate production. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 81, p. 197–205, 1996.

PARK, J. S.; AHN, W. S.; GREEN, P. R.; LEE, S. Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate-*co*-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 74, p. 81-86, 2001.

PAN, W.; PERROTTA, J. A.; STIPANOVIC, A. J.; NOMURA, C. T.; NAKAS, J. P. Production of polyhydroxyalkanoates by Burkholderia cepacia ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, n. 3, p. 459-469, 2012.

PEREIRA, E. M.; SILVA, Q. S. R.; GOMEZ, C. J. G.; SILVA, L. F. Disruption of the 2-methylcitric acid cycle and evaluation of poly-3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate biosynthesis suggest alternate catabolic pathways of propionate in *Burkholderia sacchari*. **Can. J. Microbiol.**, v.55, n. 6, p. 688-697, 2009.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly-beta-hydroxybutyrate (P3HB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the P(3HB) polymerase gene (*phaC*). **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 26, p. 15298-15303, 1989.

PRADELLA, J.G.C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Relatório técnico n. 84396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. São Paulo, 2006.

PRIETO, M. A. From Oil to Bioplastics, a Dream Come True?. **Journal Of Bacteriology**, v. 189, n. 2, p. 289–290, 2007.

PROSSER, J. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. **Plant and Soil**, v. 244, n. 1-2, p. 9-17, 2002.

QIU, Y. Z.; OUYANG, S. P.; SHEN, Z.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Metabolic Engineering for the Production of Copolymers Consisting of 3-Hydroxybutyrate and 3-Hydroxyhexanoate by *Aeromonas hydrophila*. **Macromol. Biosci.**, v. 4, p. 255-261, 2004.

QU, X. H.; WU, Q.; LIAN, J.; ZOU, B.; CHEN, G. Q. Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on *in vitro* growth and differentiation of smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, p. 2944 - 2950, 2006.

RAI, R.; KESHAVARZ, T.; ROETHER, J. A.; BOCCACCINI, A. R.; ROY, I. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. **Mat. Sci. Eng. R.**, v. 72, p. 29 - 47, 2011.

RAMSAY, B. A.; JULIANA, A.; COOPER, D. G. Production of Poly-3-Hydroxyalkanoic Acid by *Pseudomonas cepacia*. **App. Env. Micro.**, v. 55, p. 584-589, 1989.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. A. Production of poly(β -hydroxybutyric-*co*- β -hydroxyvaleric) acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

ROMO, D. M. R.; GROSSO, M. V. N.; SOLANO, C. M.; CASTAÑO, D. M. A most effective method for selecting a broad range of short and medium- chain-length polyhydroxyalcanoate producing microorganisms. **Elec. J. Biot.**, v.10, n. 3, 2007.

REDDY, C. S.; GHAI, R.; RASHMI, K. V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bio. Tech.**, v. 87, p. 137-146, 2003.

REHM, B. H. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochem. J.**, v. 376, n. Pt 1, p. 15-33, 2003.

REHM, B. H. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, n. 4, p. 207-213, 2006.

REN, Q. **Biosynthesis of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates: from Pseudomonas to Escherichia coli**. 1997. (PhD Thesis). ETH Zürich, Switzerland.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography A**, v. 445, n. 0021-9673, p. 285-289, 1988.

RODRIGUES, M. F.; VICENTE, E. J.; STEINBÜCHEL, A. Studies on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in a PHA synthase I-negative mutant of *Burkholderia cepacia* generated by homogenotization. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 193, n. 1, p. 179 -185, 2000.

SATOH, Y.; MINAMOTO, N.; TAJIMA, K.; MUNEKATA, M. Polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus* sp. INT005 is composed of PhaC and PhaR. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 94, n. 4, p. 343-350, 2002.

SCHEMBRI, M. A.; BAYLY, R. C.; DAVIES, J. K. Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 4501– 4507, 1995.

SCHLEGEL, H. G.; LAFFERTY, R.; KRAUSS, I. The isolation of mutants not accumulating poly-beta-hydroxybutyric acid. **Arch. Mikrobiol.**, v. 71, n. 3, p. 283-294, 1970.

SCHUBERT, P.; STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Cloning of the Alcaligenes eutrophus genes for synthesis of poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 5837 – 5847, 1988.

SENIOR, P. J.; DAWES, E. A. P3HB-biosynthesis and regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochem. J.**, v. 134, p. 225–238, 1971.

SHEN, L.; HAUFÉ, J.; PATEL, M. K. **Product overview and market projection of emerging bio-based plastics (PRO-BIP 2009)**. Universiteit Utrecht. The Netherlands, p. 226, 2009.

SHEU, D. S.; WANG, Y. T.; LEE, C. Y. Rapid Detection Of Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria Isolated From The Environment By Colony Pcr. **Microbiology**, v. 146, p. 2019-2025, 2000.

SHIN, H. D.; LEE, J. N.; LEE, Y. H. In vivo blending of medium chain length polyhydroxy-alkanoates and polyhydroxybutyrate using recombinant *Pseudomonas putida* harboring *phaCAB* operon of *Ralstonia eutropha*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p.1729–1735, 2002.

SILVA, L. F. Estudo do catabolismo de propionato em *Burkholderia* sp visando o aumento da eficiência na produção de poli-3-hisroxibutirato-co-3hidroxivalerato (P3HB-co-3HV) - um plástico biodegradável [Dissertação]. São Paulo: Programa de doutorado em Microbiologia apresentada ao ICB USP; 1998.

SILVA, L.; GOMEZ, J. G.; OLIVEIRA, M. S.; TORRES, B. B. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. **Journal of Biotechnology**, v. 76, p. 165–174, 2000.

SILVA, L.; GOMEZ, J. G.; COSTA, R.; KEICO, M.; PRADELLA, J. G. Produção Biotecnológica De Poli-Hidroxialcanoatos Para A Geração De Polímeros Biodegradáveis No Brasil. **Quim. Nova.**, v. 30 No. 7, p. 1732-1743, 2007.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System For Invivo Genetic-Engineering - Transposon Mutagenesis In Gram-Negative Bacteria. **Bio-Technology.**, v. 1, n. 9, p. 784-791, 1983.

SLATER, S. C.; VOIGE, W. H.; DENNIS, D. E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the Alcaligenes eutrophus H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **J. Bacteriol.**, v. 170, n. 10, p. 4431-446, 1988.

SLATER, S. C.; GALLAHER, T.; DENNIS, D. Production of poly-(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 1089-1094, 1992.

SPIEKERMANN, P.; BERND, H. A.; REHM, R. K.; BAUMEISTER, D.; STEINBÜCHEL, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Arch. Microbiol.**, v. 171, p. 73-80, 1999.

SQUIO, C. R.; FALCÃO, G. M. Estratégias De Cultivo Para Produção Dos Plásticos Biodegradáveis Poli(3- Hidroxibutirato) E Poli(3-Hidroxibutirato-Co-3-Hidroxivalerato) Por Bactérias. **Quim. Nova.**, v. 27, No. 4, p. 615-622, 2004.

STACKEBRANDT, E. A. G., MICHAEL. 16S/23S rRNA Sequencing. In: LTD, J. W. A. S. (Ed.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. New York, NY, USA, 1991. p.115-175.

STEINBÜCHEL, A.; HEIN, S. Biochemical and Molecular Basis of Microbial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.**, v. 71, p. 82-119, 2001.

STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINKEY, A. J.; LAWRENCE, A. G.; LIU, P. Nontemplate-Dependent polymerization processes: Polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 74, p. 433-480, 2005.

SUN, Z.; RAMSAY, J. A.; GUAY, M.; RAMSAY, B. Increasing the yield of MCL-PHA from nonanoic acid by co-feeding glucose during the PHA accumulation stage in two-stage fed-batch fermentations of *Pseudomonas putida* KT2440. **J. Bio.**, v. 132, p. 280-282, 2007.

SURIYAMONGKOL, P., WESWLAK, R., SURESH, N., MOLONEY, M., S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. **Bio. Adv.**, v. 25, p. 148-175, 2007.

TAGUCHI, S. A. B.; NAKAMURAC, H.; KICHISE, T. A.; TSUGE, T. D.; YAMATO, I. C.; DOI, Y. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase. **Bio. Eng. J.**, v. 16, p. 107-113, 2003.

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, p. 706-754, 2014.

TAPPEL, R. C.; KUCHARSKI, J. M.; MASTROIANNI, J. M.; STIPANOVIC, A. J.; NOMURA, C. T. Biosynthesis of Poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] Copolymers with Controlled Repeating Unit Compositions and Physical Properties. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 2964–2972, 2012.

TIAN, J.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 11, p. 3814-3824, 2005.

TIMM, A.; BYROM, D.; STEINBUCHEL. Formation of blends of various poly(3-hydroxyalkanoic acids) by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, p. 296-301, 1990.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P. Degradation of microbial polyesters. **Biotechnol. Lett.**, v. 26, p. 1181-1189, 2004.

TRIPATHI, L.; WU, L. P.; DECHUAN, M.; CHEN, J.; WU, Q.; CHEN, G. Q. *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions. **Bioresource Technology**, v.142, p. 225–231, 2013.

TZU, H. Y.; CHEN, P. L.; SEMBLANTE, G. U.; YOU, S. J. Detection of Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria from Domestic Wastewater Treatment Plant Using Highly Sensitive PCR Primers. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, n. 8, p. 1141–1147, 2012.

UEDA, S.; MATSUMOTO, S.; TAKAGI, A.; YAMANE, T. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from methanol and n-amyl alcohol by the methylotrophic bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Methylobacterium extorquens*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 3574–3579, 1992.

ULMER, H. W.; GROSS, R. A.; WEISBACH, P.; FULLER, R. C.; LENZ, R. W. The bacterial synthesis of functional poly(b-hydroxyalkanoate). **Polymer. Prep.**, v. 30, n. 2, p. 402-407, 1989.

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.

VANZIN, C. **Estudo da biossintese de poli-3-hisroxiburitato-co-hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal**. 2008. 202 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

VERLINDEN, R. A.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAMS, C. D. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, n. 6, p. 1437-1449, 2007.

WANG, Y.; YIN, J.; CHEN, G. Q. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 30, p. 59-65, 2014.

WEI, X.; HU, Y. J.; XIE, W. P.; LIN, R. L.; CHEN, G. Q. Influence of poly(3-hydroxybutirate-*co*-4-hydroxybutirate-*co*-3-hydroxyhexanoate) on growth and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 90, p. 894-895, 2009.

WILLIAMS, S. F.; MARTIN, D. P. Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHA) in Medicine and Pharmacy. In: WILEY-VCH. (Ed.). **Polyesters III - Applications and Commercial Products**, v.4, 2005. p. 91-128.

WITT, U.; EINING, T.; YAMAMOTO, M.; KLEEBERG, I.; DECKWER, W. D.; MÜLLER, R. J. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: Evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. **Chemosphere.**, v. 44, p. 289-299, 2001.

YAGI, K.; MIYAWAKI, I.; KAYASHITA, A.; KONDO, M.; KITANO, Y.; MURAKAMI, Y.; MAEDA, I.; UMEDA, F.; MIURA, Y.; KAWASE, M.; MIZOGUCHI, T. Biosynthesis of poly(3-hydroxyalkanoic acid) copolymer from CO₂ in *Pseudomonas acidophila* through introduction of the DNA fragment responsible for chemolithoautotrophic growth of *Alcaligenes hydrogenophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p.1004-1007, 1996.

YOO, S.; KIM, W. S. Cybernetic model for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid in *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 43, p. 1043–1051, 1994.

YU, J.; SI, Y.; KEUNG, W.; WONG, R. Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha*. **Process. Biochem.**, v. 37, p. 731-738, 2002.

ZHANG, X.; WEI, C.; HE, Q.; REN, Y. Enrichment of chlorobenzene and o-nitrochlorobenzene on biomimetic adsorbent prepared by poly-3-hydroxybutyrate (P3HB). **J Hazard. Mater.**, v. 177, n. 1-3, p. 508-515, 2010.