

**KELLI CARDOSO LOPES RODRIGUES**

**PRODUÇÃO DE ELASTÔMEROS BIODEGRADÁVEIS  
POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE LODO DE ESGOTO**

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 corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo  
2013

## RESUMO

RODRIGUES, K. C. L. **Produção de elastômeros biodegradáveis por bactérias isoladas de lodo de esgoto.** 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Polihidroxicanoatos (PHA) são polímeros armazenados intracelularmente como forma de reserva, podendo servir como fonte de carbono e energia em casos de escassez nutricional. PHA têm despertado interesse industrial, pois apresentam propriedades termoplásticas, são biodegradáveis e podem ser sintetizados a partir de matérias primas renováveis. Os monômeros que constituem os PHA podem ser divididos em dois grupos: os de cadeia curta, que contêm de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal, e os de cadeia média, contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal. A produção de PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA<sub>MCL</sub>) é realizada principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de diferentes isolados bacterianos para produção de PHA<sub>MCL</sub> a partir de carboidratos ou glicerol. Um total de 39 isolados foi avaliado. Não foi detectado nenhum isolado capaz de utilizar eficientemente amido, lactose ou sacarose para produção destes polímeros. Embora muitos isolados tenham apresentado bom desempenho na produção de PHA a partir de glicose ou frutose, este foi inferior à linhagem de referência (*Pseudomonas* sp. LFM046). A linhagem de referência não foi capaz de utilizar glicerol e muitos dos isolados apresentaram bom desempenho na conversão dessa fonte de carbono em PHA<sub>MCL</sub>. Neste trabalho, pela primeira vez foram detectadas bactérias capazes de produzir PHA<sub>MCL</sub> a partir de xilose, representando cerca de 10% da massa seca celular. Com base no sequenciamento do rDNA 16S, estes isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. Ensaio em biorreator, utilizando o isolado SCU 164, resultou em uma biomassa de aproximadamente 6 g/L, contendo cerca de 11 a 14% de PHA. Na tentativa de obter linhagens bacterianas mais eficientes no consumo deste açúcar, cópias dos genes responsáveis pelo catabolismo (*xyiAB*) e metabolismo (*xyiFGH*) de xilose em *Escherichia coli* foram inseridos no isolado SCU 164. As linhagens recombinantes foram analisadas quanto à capacidade do consumo de xilose e a produção de PHA<sub>MCL</sub>. A superexpressão dos genes *xyiAB* e *xyiFGH* não levou a melhora no consumo de xilose ou produção de PHA<sub>MCL</sub>.

Palavras-chave: Polihidroxicanoatos. Carboidratos. Metabolismo. Xilose. *Pseudomonas* sp.

## ABSTRACT

RODRIGUES, K. C. L. **Production of biodegradable elastomers by bacteria isolated from sewage sludge.** 2013. 126 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polymers stored intracellularly as a form of reserve, possibly serving as carbon and energy source in cases of nutritional shortage. PHA has attracted industrial interest, since they have thermoplastic properties, are biodegradable and can be synthesized from renewable raw materials. The monomers constituting the PHA can be classified into two groups: short-chain-length monomers, containing 3 to 5 carbon atoms in the chain and medium-chain-length monomers containing from 6 to 16 carbon atoms in the chain. The production of PHA monomers containing medium-chain-length monomers (PHA<sub>MCL</sub>) is made mainly by bacteria belonging to the *Pseudomonas* genus. This study aimed to evaluate the potential of different bacterial isolates regards the PHA<sub>MCL</sub> production from carbohydrates or glycerol. A total of 39 strains were evaluated. The isolates were unable to efficiently utilize starch, lactose or sucrose to produce these polymers. Although many isolates showed good PHA production from glucose or fructose, their performance was inferior to the reference strain (*Pseudomonas* sp. LFM046). The reference strain was unable to utilize glycerol and many of the isolates showed good performance in converting this carbon source into PHA<sub>MCL</sub>. In this work, bacteria capable of producing PHA<sub>MCL</sub> representing about 10% of the cell dry weight from xylose were first detected,. These isolates were identified as belonging to the *Pseudomonas* genus after sequencing of their rDNA16S gene. Bioreactor cultures using the isolated SCU 164 resulted in a cell dry weight of about 6 g/L, containing 11-14% of PHA. Aiming to obtain bacterial strains more efficient, copy of those responsible for the catabolism (XylAB) genes and metabolism (xylFGH) xylose genes related to xylose catabolism (*xylAB*) in *Escherichia coli* were inserted into the isolated SCU 164. The recombinant strains did not presented an improved performance on xylose consumption and PHA production.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates. Carbohydrate. Metabolism. Xylose. *Pseudomonas* sp.

## 1 INTRODUÇÃO

A evolução da humanidade, desde suas origens, está intimamente ligada à capacidade do homem em criar alternativas constantes para garantir sua sobrevivência e melhorar sua qualidade de vida. Neste aspecto, é possível observar os grandes avanços nas áreas da ciência e tecnologia, saúde, transportes, entre outros. Grande parte das mudanças ocorridas até hoje, se deve à disponibilidade de materiais adequados, que transformaram brilhantes idéias, em realidade. Se analisarmos a história humana, identificaremos períodos designados pelos materiais disponíveis no momento; caracterizando as diversas idades históricas, como a idade da Pedra, do Bronze e do Ferro (MORAWETZ, 1995).

O século XX é caracterizado por diversas mudanças realizadas pelo homem devido à crescente e ampla utilização do petróleo para suprir necessidades energéticas e de materiais. Um bom exemplo dessa verdadeira revolução em nossa sociedade é o uso dos polímeros de origem petroquímica. Materiais como, fibras sintéticas, e os diversos tipos de borrachas e plásticos, revolucionaram o desenvolvimento de muitos setores, particularmente considerando-se na área automotiva, de manufaturas e aplicações nas ciências médicas. É possível que em um futuro próximo, o atual período seja conhecido como a Idade dos polímeros; e tal denominação não será grande absurdo, uma vez que, materiais poliméricos de origem petroquímica são essenciais para a manutenção do estilo de vida atual (HAGE, 1998).

Contudo, apesar de sua grande contribuição para a sobrevivência e melhora na qualidade de vida, em função de seu reduzido custo e grande solidez, o amplo uso de plásticos de origem petroquímica, é responsável por sérios problemas de ordem ambiental, pois necessitam de longo período de tempo para sua degradação, permanecendo no meio ambiente como contaminantes, prejudicando a sobrevivência de muitas espécies (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; LUENGO et al., 2003).

Na tentativa de minimizar este problema, a busca por materiais que possam substituir os plásticos de origem petroquímica, tem sido foco de estudo em todo mundo, e, no Brasil, o impulso para este estudo ocorreu no início da década de 90 (SILVA et al., 2007), onde pesquisas têm sido realizadas na tentativa de desenvolver plásticos biodegradáveis, materiais rapidamente biotransformados quando dispostos no ambiente, pela ação de microrganismos de ocorrência natural, entre eles fungos, bactérias e algas; e que aliados a propriedades similares aos plásticos convencionais. Outra característica que aumenta o interesse nesses materiais biodegradáveis é o fato de poderem ser produzidos a partir de fontes de carbono

renováveis (GOMEZ; BUENO-NETTO, 2001; KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; ROSA et al., 2000).

Entre os polímeros biodegradáveis mais estudados, destacam-se o ácido polilático (PLA), a poli( $\epsilon$ -prolactona) (PCL) e os polihidroxialcanoatos (PHAs) (GOMEZ; BUENO-NETTO, 2001). Neste contexto, os PHAs merecem atenção especial, uma vez que podem ser obtidos a partir de diversas fontes renováveis de carbono. As propriedades termo-mecânicas de PHAs podem ser moduladas pela sua composição monomérica, permitindo sua utilização em um grande número de aplicações.

A síntese de PHAs depende de três fatores principais: as vias metabólicas presentes na bactéria, o tipo da PHA sintase bacteriana (enzima responsável pela biossíntese de PHAs) e a fonte de carbono fornecida. A manipulação destes três fatores permite modular a composição destes biopolímeros (REHM, 2003). Com relação a sua composição, os PHAs são constituídos de monômeros que podem ser divididos em dois grupos: os 3HAs de cadeia curta (3HA<sub>SCL</sub> - do inglês *short-chain-length*), contendo 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal, e os 3HAs de cadeia média (3HA<sub>MCL</sub> - do inglês *medium-chain-length*), contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal (STEINBUCHER; VALENTIN, 1995). Os monômeros de cadeia curta são mais comuns, e podem ser encontrados em PHA produzidos por muitos grupos de bactérias (STEINBUCHER, 1991), enquanto os PHA contendo monômeros de cadeia média são mais restritos, normalmente encontrados em bactérias do gênero *Pseudomonas* (HUISMAN et al., 1989).

Poli-3-hidroxibutirato (P3HB) foi o primeiro PHA descoberto e certamente é o mais estudado até o momento. A avaliação deste polímero revelou pela primeira vez as propriedades termoplásticas dos PHAs (BAPTIST, 1962). Ao longo dos anos 1980, diversos co-monômeros foram incorporados ao P3HB permitindo diversificar suas propriedades termomecânicas (FENG et al., 2002). Também na década de 1980, foi observado o acúmulo de PHA por linhagens de *Pseudomonas* (DE SMET et al., 1983). Estes polímeros apresentavam em sua composição 3HA<sub>MCL</sub> (contendo de 6 a 16 átomos de carbono) e por isso foram denominados PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA<sub>MCL</sub>). Enquanto o P3HB e seus copolímeros (PHA<sub>SCL</sub>) são termoplásticos com alta cristalinidade, PHA<sub>MCL</sub> apresentam baixa cristalinidade e propriedades semelhantes à elastômeros. Dessa forma, o espectro de aplicações para PHA<sub>MCL</sub> é bastante diferente das aplicações para P3HB e seus copolímeros. As aplicações para PHA<sub>MCL</sub> incluem: a confecção de filmes de recobrimento (DE KONING et al., 1997); agentes ligantes em formulações de tintas a base de água (VAN DE WALLE et al., 1999); como fontes de monômeros quirálicos para a síntese de compostos

ativos (EUGENIO et al., 2010; O'CONNOR et al., 2005; WITHOLT; KESSLER, 1999), como suporte para engenharia de tecidos e implantes médicos temporários (KIM et al., 2007; MISRA et al., 2006; WANG et al., 2002; ZINN et al., 2001) e ainda como dispositivos de liberação controlada de fármacos (KABILAN et al., 2012).

A capacidade de bactérias do gênero *Pseudomonas* produzir PHA<sub>MCL</sub> está relacionada com o tipo de PHAs sintases presentes nestas bactérias, aos quais apresentam maior especificidade por monômeros HA<sub>MCL</sub> (STEINBUCHEL; VALENTIN, 1995). Entretanto, a capacidade de *Pseudomonas* direcionar intermediários do metabolismo de ácidos graxos ( $\beta$ -oxidação ou biossíntese) para biossíntese de PHA, também é importante para estabelecer esta capacidade nestas bactérias. Quando ácidos graxos são utilizados como fonte de carbono, estes são metabolizados pela  $\beta$ -oxidação e os intermediários direcionados para biossíntese de PHA. Carboidratos, por outro lado, são convertidos a acetil-CoA e os monômeros gerados na via de biossíntese de ácidos graxos.

Muitos dos trabalhos realizados até o momento utilizam diversas fontes de carbono, tais como: hidrocarbonetos (PREUSTING et al., 1991), ácidos graxos (RAMSAY et al., 1991) e óleos vegetais (EGGINK et al., 1995) para a produção de PHA<sub>MCL</sub>, enquanto a produção a partir de carboidratos foi pouco explorada.

Gomez (2000) demonstrou, ao contrário do proposto por outros autores, que o uso de carboidratos ou ácidos graxos deve levar a custo semelhante de produção. O uso de carboidratos ou glicerol para a produção de PHA<sub>MCL</sub> é especialmente interessante no Brasil, pois temos à disposição importantes resíduos contendo essas fontes de carbono. Glicerol é o principal resíduo do processo de produção do biodiesel (SILVA et al., 2010). Sacarose é o principal açúcar na cana e glicose e frutose são obtidos pela sua hidrólise (GOMEZ, 2000). Amido é o principal resíduo do processamento da mandioca e outros tubérculos (COSTA et al., 2009). Lactose é o principal resíduo no soro de leite (FONSECA et al., 2008). A utilização de xilose proveniente da hidrólise do bagaço de cana para a geração de bioprodutos pode ser fundamental para viabilizar o processo de produção de etanol de segunda geração (DIAS et al., 2010).

Bactérias produtoras de PHA<sub>MCL</sub> despertam ainda interesse, pois são capazes de gerar monômeros HA<sub>MCL</sub>. Desta forma, a expressão de genes de PHA sintase com maior especificidade por monômeros HA<sub>SCL</sub> permite a produção de copolímeros P3HB-*co*-3HA<sub>MCL</sub> (CHEEMA et al., 2012; GOMES, 2009) que apresentam propriedades semelhantes ao polietileno de baixa densidade, podendo inclusive substituí-lo em algumas aplicações (NODA et al., 2005).

## 6 CONCLUSÕES

- Isolados de *Pseudomonas* avaliados foram incapazes de utilizar eficientemente sacarose, lactose e amido para produção de PHA<sub>MCL</sub>, indicando que são carentes de genes que codificam enzimas como invertase,  $\beta$ -galactosidase e amilase.
- Frutose e glicose foram utilizadas para produção de PHA<sub>MCL</sub> por diversos isolados, entretanto, nenhum deles apresentou desempenho superior à linhagem controle (LFM046).
- A linhagem controle (LFM046) não foi capaz de utilizar eficientemente glicerol para a produção de PHA<sub>MCL</sub>, entretanto diversos isolados foram.
- Pela primeira vez, foram detectados isolados selvagens com capacidade de produzir PHA<sub>MCL</sub> a partir de xilose.
- O sequenciamento do rDNA 16S dos isolados produtores de PHA<sub>MCL</sub> a partir de xilose indicou que devem pertencer ao gênero *Pseudomonas*, estando próximos de *P. putida* ou *P. taiwanensis*. Entretanto, o sequenciamento completo do gene do rDNA 16S, bem como outras análises, serão necessárias para confirmar a identidade destes isolados.
- A superexpressão de genes *xylAB* e *xylFGH* não levou a aumento da produção de PHA<sub>MCL</sub> pelo isolado SCU164 a partir de xilose, indicando que este não é o passo limitante para produção desse polímero.
- Cultivos em biorreator com o isolado SCU 164 demonstraram acúmulo de PHA<sub>MCL</sub> associado ao crescimento celular, entretanto, estudos adicionais deverão ser realizados para explorar o potencial de produção desta linhagem bacteriana.

## REFERÊNCIAS\*

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Antimicrobianos: base teórica e uso clínico.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/polimixinas5.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/polimixinas5.htm)>. Acesso em: 23 nov. 2013.
- ALDOR, I. S.; KEASLISNG, J. D. Process desing for microbial plastic factories: metabolic engineering of Polyhydroxyalkanoates. **Curr. Op. Biotechnol.**, v. 14, p. 475-483, 2003.
- ALMEIDA, K. L. **Produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolípido.** 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology**, v. 54, p. 450-472, 1990. Review.
- APPLIED BIOSYSTEMS (Org). **Espectrometria de massas e suas aplicações.** São Paulo: Abi Expert Training Center, 2005. 40p.
- ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 26, 2006.
- BAPTIST, J. N. Process for preparing poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. **US Patent Application.** US 3036959, 1962.
- AUSSCHUSS FÜR BIOLOGISCHE ARBEITSSSTOFFE. (BAUA). Disponível em: <[http://www.baua.de/nm\\_15226/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf](http://www.baua.de/nm_15226/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf)>. Acesso em: 27 nov. 2013.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 36, p. 493-496, 1966.
- BIOCYCLE - **PHB Industrial.** Disponível em: <<http://www.biocycle.com.br/site.htm>>. Acesso em: 10 set. 2013.
- BUSCARIOLLO, B. N. **Avaliação da diversidade microbiana da Fundação Parque Zoológico de São Paulo visando à obtenção de bactérias produtoras de Polihidroxicanoatos.** 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2013.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 41, p. 77-93, 1990.

\*De acordo com:

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

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127-161, 1998.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CASTRO, I. P.; BINGER, D.; RODRIGUES, A.; BECKER, J.; SANTOS, V. A. M.; WITTMANN, C. In-silico-driven metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for enhanced production of poly-hydroxyalkanoates. **Metabolic Engineering**, v. 15, p. 113-123, 2013.

CHEEMA, S.; BASSAS-GALIA, M.; SARMA, P. M.; LAL, B.; ARIAS, S. Exploiting metagenomic diversity for novel polyhydroxyalkanoate synthases: production of a terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate) with a recombinant *Pseudomonas putida* strain. **Bioresour. Technol.**, v.103, n. 1, p. 322-328, 2012.

CLSI - **Clinic and laboratiry Standards Institute. Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; twenty-first informational supplenment.** CSI document M100-S21. WAYNE, P. A.: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BISEGURANÇA. **CTNBio**. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3913.html>>. Acesso em: 18 nov. 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **CONAB**. Estudo de Prospecção de Mercado, Safra 2012/2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 18 nov. 2013.

COSTA, S. G.; 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*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, n. 8, p. 1063-1072, 2009.

DE KONING, G. J. M.; KELLERHALS, M.; VAN MEURS, C. *et al.* A process for the recovery of poly(3-hydroxyalkanoates) from *Pseudomonads*. Process development and economic evaluation. **Bioproc. Eng.** v.17, p. 15-21, 1997.

DE SMET, M. J.; EGGINK, G.; WITHOLT, B.; KINGMA, J.; WYNBERG, H. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **J. Bacteriol.**, v. 154, n. 2, p. 870-878. 1983.

DIAS, J. M.; LEMOS, P. C.; SERAFIM, L. S.; OLIVEIRA, C.; EIROA, M.; ALBUQUERQUE, M. G.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. **Macromol Biosci.**, v. 6, n. 11, p. 885-906, 2006. Review.

DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A.; JESUS, C. D. F; ROSSELL, C. E. V. Simulation of 1<sup>ST</sup> and 2<sup>ND</sup> generation production from sugarcane: comparison between different biomass pretreatment methods. In: SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA PARA COMBUSTÍVEIS E PRODUTOS QUÍMICOS, 32., 2010. **Anais...** Clearwater Beach, Florida, EUA, 2010.

EGGINK, G.; WAARD, P.; HUIJBERTS, G. N. M. Formation of novel poly (hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOATES, 4., 1995, Montreal, **Abstracts...** Montreal: Canadian Journal of Microbiology, p. 14-21. Suppl.1995.

ERBEZNIK, M.; HUDSON, S. E.; HERRMAN, A. B.; STROBEL, H. J. Molecular analysis of the xylFGH Operon, Coding for Xylose ABC Transport, in *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **Current Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 295-299, 2004.

EUGENIO, L. I.; ESCAPA, I. F.; MORALES, V.; DINJASKI, N.; GALÁN, B.; GARCIA, J. I.; PRIETO, M. A. The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for metabolic balance. **Environ. Microbiology**, v. 12, p. 2007-2221, 2010.

FENG, L.; WATANABE, T.; WANG, Y.; KICHISE, T.; FUKUCHI, T.; CHEN, G. Q.; DOI, Y.; INOUE, Y. Studies on comonomer compositional distribution of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)s and thermal characteristics of their fractions. **Biomacromolecules**, v.3, p. 1071-1077, 2002.

FONSECA, G. G.; SILVA, L. F. S.; GOMEZ, J. G. C. Biodegradable polyesters from cheese whey. **Advances in Cheese Whey Utilization**, 2008.

FONSECA, G. G. **Produção de polihidroxialcanoatos por *Escherichia coli* recombinante**. Dissertação (Mestrado) – 2003. 178 f. Curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2003.

FREIRE, R. K. B. **Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 132f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. (GenBank). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 13 dez. 2013.

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

GOMEZ, J. G. C.; MÉNDEZ, B. S.; PABLO, I.N.; PETTINARI, M. J.; PIETRO, M. A.; SILVA, L. F. Making green even greener: towards sustainable production of polyhydroxyalkanoates from agroindustrial by-products, In: **Advances in Applied Biotechnology**. Ed. Marian Petre, chapter 3, p.41-62, 2012.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de poliésteres bacterianos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processo fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001. v. 3, p. 219-248.

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

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

HAGE JR, E. Aspectos históricos sobre o desenvolvimento da ciência e da tecnologia de polímeros. **Polímeros (online)**, v. 8, p. 6-9, 1998. ISSN 0104-1428.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P.; FISCHER, B. D.; **Microbiologia ilustrada.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; EWING, D. F.; DAWES, E. A. Accumulation of polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB 40135. **Applied Environment Microbiology**, v. 56, p. 3354-3359, 1990.

HONNA, C. Y. **Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de ramnolipídeos.** 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

HUISMAN, G. W. et al. Synthesis of polyhydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1949-1954, 1989.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 320-326, 2006.

JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 3195-3202, 2009.

JIN, Y.; NI, H.; LAPLAZA, J. M.; JEFFRIES, T. Xylulokinase overexpression in two strains of *saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 495-503, 2003.

KABILAN, S.; AYYASAMY, M.; JAYAVEL, S.; PARAMASAMY, G. *Pseudomonas* sp. As a Source of Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoates for Controlled Drug Delivery: Perspective. **International Journal of Microbiology**. 2012. doi:10.1155/2012/317823.

KILL, K.; BINNEWIES, T. T.; WILLENBROCK, H.; HANSEN, S. K.; YANG, L.; JELSBAK., USSERKY, D. W.; FRIIS, C. Comparative Genomics of *Pseudomonas*. In: REHM, B. H. A. (Ed.). **Pseudomonas: model organism, pathogen, cell factory.** New Zealand: Wiley-VCH, 2008. v. 1, p. 1-24.

KHANNA, S.; SRIVSTAVA, A. K. Recent advances in microbial Polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.

KIM, D. Y.; KIM, H. W.; CHUNG, M. G.; RHEE, Y. H. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. **J. Microbiol.** v. 45, p. 87-97, 2007.

KOLLER, M.; SALERNO, A.; MUHR, A.; REITERER, A.; CHIellini, E.; CASELLA, S.; HORVAT, P.; BRAUNEGG, G. Whey lactose as raw material for microbial production of biodegradable polyesters. **Materials Science – Polymers- Polyester.** 2012.

KOVAC, M. E.; ELZER, P. H.; HILL, D. S. et al. Four new derivatives of the broad host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene.** v. 166, p. 175-176, 1995.

KRUEGER, C. L. **Seleção de linhagens de *Bacillus* produtoras de polihidroxialcanoatos a partir de residuo do processamento da mandioca.** 2009. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2009.

LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Tibtech,** v. 14, p. 431-438, 1996b.

LE MEUR, S.; ZINN, M.; EGLI, T.; THONY-MEYER, L.; REN, Q. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT2440. **BMC Biotechnol.** v. 12, n. 1, p. 1-12, 2012

LEMOIGNE, M. Produits de deshydratation et depolymerisation de l'acide b-oxobutyrique. **Bull. Soc. Chem. Biol. (Paris),** v. 8, p. 770–782, 1926.

LÍCIO, D. C. P. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase.** 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LOPES, M. S. G. **Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 2010. 128 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LUENGO, J. M.; GARCIA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVEIRA, E. R. Bioplastics from microorganisms. **Curr. Opin. Microbiol.,** v. 3, p. 251-260. 2003. Review.

MADKOUR, M. H.; HEINRICH, D.; ALGHAMDI, M. A.; SHABBAJ, I. I.; STEINBÜCHEL, A. PHA Recovery from Biomass. **BioMacromolecules,** v. 14, p. 2963-2972, 2013. Review.

MARTINEZ, V.; LA PEÑA, F.; HIDALGO, J. G.; LA MATA, I.; GARCIA, J. L.; PRIETO, M. A. Identification and Biochemical Evidence of a Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerase in the *Bdellvidrio bacteriovorus* Predatory Hydrolytic Arsenal. **Appl. Environ. Microbiol.,** v. 78, n. 17, p. 6017, 2012.

MATSUDA, T. S. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais.** 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MCCOLL, G. J.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. **Journal of bacteriology**. v. 181, p. 585-592, 1999.

MEIJNEN, J. P.; WINDE, J. H.; RUIJSSENAARS, H. J. Engineering *Pseudomonas putida* S12 for efficient utilization of D-xylose and L-arabinose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 16, p. 5031-5037, 2008.

MENDONÇA, T. T. **Avaliação do potencial de Burkholderia sacchari produzir o copolímero biodegradável poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) P3HB-co-3HHx**. 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar/>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

MISRA, S.K.; VALAPPIL, S.P.; ROY, I.; BOCCACCINI, A.R. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic phase composites for tissue engineering applications. **Biomacromolecules**. v. 7, n. 8, p. 2249-2258, 2006.

MORAWETZ, H. **In polymers: the origins and growth of a science**. New York: John Wiley, 1985.

MUNDO EDUCAÇÃO. Disponível em: <<http://www.mundoeducacao.com/quimica/sacarose-ou-acucar-comum.htm>>. Acesso em: 01 dez. 2013.

NEVES, A. L. P. **Uso de enzimas na extração de polihidroxialcanoatos sintetizados por *Cupriavidus necator***. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2009.

NODA, I.; GREEN, P. R.; SATKOWSKI, M. M.; SCHECHTMAN, L. A. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers. **Biomacromolecules**. v. 6, n. 2, p. 580-586, 2005.

NONATO, R. V.; MANTELATO, P. E.; ROSSEL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Biotechnology**, v. 57, p. 1-5, 2001.

O'CONNOR, K. E.; ROO, G.; WARD, P. G. Accumulation of Polyhydroxyalkanoate from Styrene and Phenylacetic Acid by *Pseudomonas putida* CA-3. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 2046, 2005.

PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. **Einstein**, v. 10(1), p.118-9, 2012.

PEIXOTO, R. M. **Bioprospecção de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biosurfactantes**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PREUSTING, H. J.; KINGMA, J.; WITHOLT, B. Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures. **Enz. Microb. Technol.**, v. 13, p. 770-780, 1991.

PUCHALKA, J.; OBERHARDT, M. A.; GODINHO, M.; BIELECKA, A.; REGENHARDT, D.; TIMMIS, K. N.; JASON, A. P.; SANTOS, V. A. P. M.; Genome – Scale Reconstruction and Analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 Metabolic Network Facilitates Applications in Biotechnology. **PLoS Comp. Biol.**, v. 4, p. 1-8, 2008.

RAICHER, G. **Análise Econômica da Produção de Polímeros Biodegradáveis no contexto de uma Biorefinaria a partir de cana de açúcar**. 2011. 178 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biotecnologia/USP/ Instituto Butantã/ IPT, São Paulo, 2011.

RAMSAY, B. A. et al. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric-co-  $\beta$ -hydroxyvaleric acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

RAMSAY, B. A. et al. Continuous production of long-side chain poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates by *Pseudomonas oleovorans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 625-629, 1991.

REHM, B. H. A.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 24, p. 44-51, 1998.

REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochem. J.**, v. 37, p. 615-633, 2003.

REHM, B. H. A. Biotechnological relevance of pseudomonads. In REHM, B. H. A. (Ed.). ***Pseudomonas*: model organism, pathogen, cell factory**. New Zeland: Wiley-VCH, 2008. Chapter 14, p. 377-395.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **J. Chromatogr.**, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROSA, D. S.; PENTEADO, D. F.; CALIL, M. R. Propriedades térmicas e biodegradabilidade de PCL e PHB em um pool de fungos. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 75-80, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

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

SHARMA, P. K.; FU, J.; CICEK, N.; SPARLING, R.; LEVIN, D. B. Kinetics of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by a novel isolate of *Pseudomonas putida* LS46. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 982-989, 2012.

- SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; ALTERTHUM, F. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of the recovered cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 23, p. 117-122, 1992.
- SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 174-183, 2010.
- SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Quím. Nova**, v. 30, p. 1732-1743, 2007.
- SILVA-QUEIROZ, S. R.; SILVA, L. F.; PRADELLA, J. G. C.; PEREIRA, E. M.; GOMEZ, J. G. C. PHA<sub>MCL</sub> biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. **Journal of Biotechnology**, v. 143, p. 111-118, 2009.
- SINGH, P.; PARMAR, N. Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB)-producing bacteria. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 10, p. 4907-4919, 2011.
- SLATER, S.; HOUMIEL, K. L.; TRAN, M.; MITSKY, T. A.; TAYLOR, N. B.; PADGETTE, S. R.; GRYS, K. J. Multiple  $\beta$ -ketothiolases mediate poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Rastonia eutropha*. **J. Bacteriol.**; v. 180, n.8, p. 1979-1987, 1998.
- STEINBÜCHEL, A. Production of rubber-like polymers by microorganisms. **Curr. Op. in Microbiol.**, v. 6, p. 261-270, 2003.
- STEINBÜCHEL, A.; HEIN, S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in micro-organisms. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 71, p. 81-123, 2001.
- STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 128, p. 219-228, 1995.
- STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. Biomaterials Novel materials from biological sources. **Macmillan Publishers**, Basingstoke, p. 123-213, 1991.
- STRELEC, T. **Isolamento de bactérias produtoras de biosurfactantes ramnolipídios e polihidroxialcanoatos e avaliação da relação metabólica no processo de síntese**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Instituto Butantan, São Paulo, 2006.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progr. Polym.**, v. 25, p. 1503-55, 2000.
- TAGUCHI, S.; DOI, Y. Evolution of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production System by “Enzyme Evolution”: Successful Case Studies of Directed Evolution. **Macromolecular Bioscience**. v. 4, p. 145-156, 2004.

TAJALLI, K.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. **Curr. Op. in Microbiol.**, v. 13, p. 321-326, 2010.

TORTAJDA, M.; DA SILVA, L. F.; PIETRO, M. A. Second generation functionalized medium chain length Polyhydroxyalkanoates: the gateway to high-value bioplastic applications. **Int. Microbiol.**, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2013.

VALENTIN, H. E.; LEE, E. Y.; CHOI, C. Y. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacterial. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 40, p. 710-716, 1994.

VAN DE WALLE, G. A. M.; BUISMAN, G. J. H.; WEUSTHUIS, R. A. Development of environmentally friendly coatings and paint using medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) as the polymer binder. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 123-128, 1999.

WANG, Y.; AMER, G. A.; SHEPPARD, B. J.; LANGER, R. A tough biodegradable elastomer. **Nat. Biotechnol.**, v. 20, n. 6, p. 602-606, 2002.

WANG, L. T.; TAI, C. J.; WU, Y. C.; CHEN, Y. B.; LEE, F. L.; LEE, F. L.; WANG, S. L. *Pseudomonas taiwanensis* sp. nov., isolated from soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 60, p. 2094-2098, 2010.

WITHOLT, B.; KESSLER, B. Perspectives of medium chain length poly (hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. **Current Opinion Biotechnol.**, v. 10, n. 3, p. 279-285, 1999.

WHISTLER, R. H. History and future expectation of starch use. In: WHISTLER, R. H.; BEMILLER, J.; PASCHALL, E. **Starch chemistry and technology**. Academic Express, 1984. p. 1-9.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 53, n. 5, p. 5-21, 2001.

ZORTÉA, M. E. B.; SAVOLDI, T. E.; GONGOLESKI, M. S.; HASAN, S. D. M.; FIORESE, M. L. Uso de diferentes fontes renováveis de carbono provenientes de resíduos das indústrias de alimentos e óleo de soja visando à produção de poli (3-hidroxibutirato). **Engevista**, v. 15, n. 2, p. 166-175, 2013.