

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOTECNOLOGIA

ESTHER CECÍLIA NUNES DA SILVA

Produção de copolímeros do tipo P(3HB-co-3HV) por *Methylopila oligotropha* (cepa MCSUBH) isolada do manguezal de Cubatão-SP.

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOTECNOLOGIA

ESTHER CECÍLIA NUNES DA SILVA

Produção de copolímeros do tipo P(3HB-co-3HV) por *Methylopila oligotropha* (cepa MCSUBH) isolada do manguezal de Cubatão-SP.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Elen Aquino Perpetuo.

Versão corrigida.

A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cecília Nunes da Silva, Esther
Produção de copolímeros do tipo P(3HB-co-3HV) por
Methylopila oligotropha (cepa MCSUBH) isolada do
manguezal de Cubatão-SP. / Esther Cecília Nunes da
Silva; orientadora Elen Aquino Perpetuo. -- São
Paulo, 2021.
82 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Copolímeros. 2. Copolímeros. Poli(3-
hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato). 3.
Metilotrófica. 4. Metanol. 5. Ácido Valérico. I.
Aquino Perpetuo, Elen, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Esther Cecília Nunes da Silva.

Título da Dissertação: Produção de copolímeros do tipo P(3HB-co-3HV) por *Methylophila oligotropha* (cepa MCSUBH) isolada do manguezal de Cubatão-SP.

Orientador: Profa. Dra. Elen Aquino Perpetuo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): **Assinatura:**
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): **Assinatura:**
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): **Assinatura:**
 Nome:
 Instituição:

Presidente: **Assinatura:**
 Nome:
 Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP.02.2021

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção CEP nº 1098/2020, aprovado em 07/05/2020, e por solicitação da Prof. Dra. *Elen Aquino Perpetuo*, do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (orientadora), informamos que o título do projeto da aluna: *Esther Cecília Nunes da Silva* foi alterado para: "Produção de copolímeros do tipo P(3HB-co-3HV) por *Methylopila oligotropha* (cepa MCSUBH) isolada do manguezal de Cubatão-SP", visto melhor adequação do título ao estudo desenvolvido.

São Paulo, 31 de maio de 2021.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEP SH ICB/USP

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Deus e minha família, á minha orientadora e aos amigos, pelo suporte emocional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo carinho e apoio para concretizar meu sonho e dar o suporte e amparo para minhas tomadas de decisão.

À Elen que ao longo dos anos entre uma iniciação, TCC e qualificação suportou meus erros e mais importante ensinou como corrigi-los.

Ao grupo de pesquisa do Centro de Pesquisa do Meio Ambiente (CEPEMA-Poli-USP) por todo ensinamento e paciência, que tiveram comigo.

Aos meus amigos, que carrego sempre em meu coração.

Ao Professor Dr. José Gregório pelo suporte e disposição em ceder gentilmente o Laboratório para concluir a minhas análises.

Ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia por proporcionar minha formação.

Agradeço ao Centro de Pesquisa para Inovação em Gás (RCGI) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (Proc. 2013/50218-2 e 2014/50279-4).

RESUMO

SILVA, E. C. N. **Produção de copolímeros do tipo P(3HB-co-3HV) por *Methylopila oligotropha* (cepa MCSUBH) isolada do manguezal de Cubatão-SP.** 2021 84f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Neste trabalho, a cepa MCSUBH, metilotrófica, aeróbia facultativa, isolada e identificada como *Methylopila oligotropha*, foi caracterizada como uma nova bactéria capaz de produzir polihidroxicanoatos (PHA). Esta cepa foi isolada de área de manguezal em Cubatão-SP e cultivada em experimentos em frascos agitados, a fim de verificar sua capacidade de produção de poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (P(3HB-co-3HV)) a partir de metanol e outros co-substratos (ácido cítrico; propanol; ácido propiônico e ácido valérico). Em diferentes fontes de carbono (ácido cítrico; propanol e ácido propiônico), a cepa acumulou valores de poli (3-hidroxi butirato) (PHB) entre 1,31 e 1,53g.L⁻¹. No entanto, somente foi capaz de acumular o P(3HB-co-3HV) apenas quando o ácido valérico foi fornecido como co-substrato na presença de metanol. Além disso, foram testadas diferentes estratégias para a produção do copolímero como: tempo de cultivo, concentração de metanol e concentração de nitrogênio. A produção de P(3HB-co-3HV) variou entre 0,49 e 2,41g.L⁻¹ com diferentes frações molares de ácido 3-hidroxi valérico (3HV) (entre 1,86-20 mol%)

Palavras chaves: Copolímeros. Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato). Metilotrófica. Metanol. Ácido Valérico.

ABSTRACT

SILVA, E. C. N. **Production of P(3HB-co-3HV) type copolymers by *Methylopila oligotropha* (MCSUBH strain) isolated from the mangroves of Cubatão-SP. 2021 84p. Master dissertation (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.**

In this work, the strain MCSUBH, methylotrophic, aerobic, facultative, isolated and identified as *Methylopila oligotropha*, was characterized as a new bacterium capable of producing polyhydroxyalkanoate (PHA). This strain was isolated from a mangrove area in Cubatão-SP and cultivated in experiments in agitated flasks, in order to verify its production capacity of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-3HV)) from methanol and other co-substrates (citric acid; propanol; propionic acid and valeric acid). In different sources of carbon (citric acid; propanol and propionic acid), the strain accumulated values of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) between 1.31 and 1.53g.L⁻¹. However, it was only able to accumulate P(3HB-co-3HV) when valeric acid was supplied as a co-substrate with methanol. Moreover, different strategies for the production of the copolymer were tested, such as: cultivation time, methanol concentration and nitrogen concentration. The production of P(3HB-co-3HV), varied between 0.49 and 2.41g.L⁻¹, containing different molar fractions of 3-hydroxyvaleric acid (3HV) (1.86 to 20 mol%).

Keywords: Copolymers. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Methylotrophic. Methanol. Valeric Acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mapa de resíduos plásticos produzidos em 2016 no mundo com os 5 maiores geradores.....	21
Figura 2: Grânulos intracelular em micro-organismos.....	26
Figura 3: Estruturas de tipos selecionados de PHA: homo (a , f), co (b , c, e, g , h , i) e terpolímeros (d) produzidos por diferentes cepas de produção microbiana. a - d: PHA de comprimento de cadeia curta (PHASCL), e - h: PHA de comprimento de cadeia média (PHAMCL). a - h: Polimeros; i: PHA com grupos tioéster. a: PHB; b: P(3HB-co-3HV); c: P(3HB-co-4HB)); d: P(3HB-co-3HV-co-4HB); e: Poli(3-hidroxi octanoato-co-3-hidroxi decanoato-co-3-hidroxi dodecanoato); f: PHD; g: Poli (3-hidroxi non-8-enoato-co-3-hidroxi decanoato-co-3-hidroxi undec-10-enoato); h: Poli (3-hidroxi hexanoato-co-3-hidroxi dec-9-enoato-co-3-hidroxi 5-fenilvalerato); i: Poli(3-hidroxi butirato-co-3-mercaptopbutirato).....	27
Figura 4: Artigos publicados desde 1996 a 2019, com as palavras chaves de polyhydroxyalkanoate” e “biopolymer”, de acordo com a base de dados do “Science direct”.	29
Figura 5: Esquema de vários tipos de produção de produtos químicos a partir de metanol. O metanol obtido a partir de diferentes recursos pode ser oxidado em CO ₂ por dissimilação ou entrar nas vias metabólicas do carbono e ser convertido em produtos químicos através das vias de assimilação de carbono. Setas contínuas apresentam reações de uma etapa e setas pontilhadas apresentam reações de várias etapas.....	32
Figura 6: Via metabólicas para a síntese de PHA a partir de metanol em <i>M. extorquens</i> AM1 e AM1C Ac em condições deficientes em Co ₂ ⁺ . Setas com linhas duplas e triplas representam polimerização pela PHA- <i>sintase</i> de <i>M. extorquens</i> AM1 (PhaC Me) e pela PHA- <i>sintase</i> de <i>A. caviae</i> (PhaC Ac), respectivamente. A seta pontilhada representa a polimerização por PhaC Me sob condições suficientes de Co ₂ ⁺ . PhaA, p-cetotiolase; PhaB, NADPH-acetoacetil-CoA redutase; DepA, DepB e DepC, despolimerases de PHA; Pcc, propionil-CoA carboxilase; Ccr, crotonil-CoA redutase/carboxilase.	34
Figura 7: Composição do copolímero e relação da sua microestrutura.....	35

Figura 8: Representação do cultivo de acúmulo de PHA em M4 com metanol e co-substrato.	43
Figura 9: Fluxograma da representação dos ensaios realizados em dois estágios e as variações, que foram realizadas em cada um dos estágios.	44
Figura 10: Teste com diferentes meios de cultivo para a produção de PHB para a cepa MCSUBH	48
Figura 11: Crescimento celular, consumo de metanol e ácido valérico para a produção de P(3HB-co-3HV) em duas etapas. A primeira etapa com 24 horas de cultivo e adição de metanol e a segunda etapa, com a renovação do meio sem nitrogênio, com a adição de metanol e ácido valérico, por mais 24 horas.....	51
Figura 12: Crescimento celular, consumo de metanol e ácido valérico para a produção de P(3HB-co-3HV) em duas etapas. A primeira etapa com 40 horas de cultivo e adição de metanol e a segunda etapa com a renovação do meio sem nitrogênio, com a adição de metanol e ácido valérico, por mais 24 horas.....	52
Figura 13: Crescimento celular, consumo de metanol e ácido valérico para a produção de P(3HB-co-3HV) em duas etapas. A primeira etapa com 48 horas de cultivo e adição de metanol e a segunda etapa com 48 horas de cultivo com adição de metanol e ácido valérico, com limitação de nitrogênio. As amostras foram monitoradas em relação ao crescimento celular (espectrofotômetro) e consumo de substrato (HPLC).	53
Figura 14: Crescimento celular, consumo de metanol e ácido valérico para a produção de P(3HB-co-3HV) em duas etapas. A primeira etapa, com 48 horas de crescimento e o consumo do substrato metanol. A segunda etapa demonstra o consumo de metanol e do co-substrato ácido valérico, com 40 horas de produção, sendo que após 24 horas foi complementado 1% de metanol.	54
Figura 15: Crescimento celular com os substratos metanol e ácido valérico. Em 48 horas de crescimento de 40 horas de produção, com 2% de metanol e 0,1% de ácido valérico.	55
Figura 16: Crescimento celular com os substratos 1% de metanol e 0,05% ácido valérico. ...	57
Figura 17: Crescimento celular com os substratos 1% de metanol e 0,3% de ácido valérico.	58

Figura 18: Crescimento celular com os seguintes substratos metanol e ácido valérico. Em 96 horas de cultivo com, após 48 horas de cultivo foram complementados 2% de metanol e 0,1% de ácido valérico em 0,5 (g.L-1) de nitrogênio.	59
Figura 19: Crescimento celular, pH e PHA (0h,24h,72h e 96h). Com 96 horas de cultivo, após 48 horas de cultivo foram complementados 2% de metanol e 0,1% de ácido valérico, em 0,5 (g.L-1) de nitrogênio.....	60
Figura 20: Crescimento celular com os seguintes substratos metanol e ácido valérico. Em 96 horas de cultivo com, após 48 horas de cultivo foram complementados 2% de metanol e 0,1% de ácido valérico, em 1(g.L-1) de nitrogênio.	61
Figura 21: Crescimento celular, pH e PHA (0h,24h,72h e 96h). Com 96 horas de cultivo, após 48 horas de cultivo foram complementados 2% de metanol e 0,1% de ácido valérico, em 1 (g.L ⁻¹) de nitrogênio.	62
Figura 22: Representação da taxa de conversão Y _{3HV} /Substrato ensaios com produção de P(3HB-co-3HV).	63
Figura 23: Representação da taxa de conversão Y _{PHA/S+S1} dos ensaios com produção de P(3HB-co-3HV).	64
Figura 24: Curva de calibração para quantificar o ácido propiônico. Concentração x Área....	78
Figura 25: Curva de calibração para quantificar o ácido valérico. Concentração x Área.	79
Figura 26: Curva de calibração para quantificar o ácido cítrico. Concentração x Área.....	80
Figura 27: Curva de calibração para quantificar o propanol. Concentração x Área.	80
Figura 28: Curva de calibração para quantificar o metanol. Concentração x Área.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físicas de diferentes tipos de PHA em comparação com plásticos convencionais.	35
Tabela 2: Composição dos meios de cultivo testados.	42
Tabela 3: Consumo de substrato e co-substrato na segunda etapa de produção de PHA pela cepa MCSUBH, com concentração inicial de $1,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Produção de MSC, após a finalização dos ensaios. Produção de PHA a partir do micro-organismo cepa MCSUBH com diferentes substratos analisados.....	50
Tabela 4: Produção de PHA a partir do cepa com diferentes tempos analisados.....	54
Tabela 5: Produção de PHA pela cepa MCSUBH com diferentes tempos analisados e concentrações de metanol.....	56
Tabela 6: Produção de PHA pela cepa MCSUBH em diferentes concentrações de ácido valérico.	58
Tabela 7: Produção de PHA a partir da cepa MCSUBH diferentes concentrações de nitrogênio.	63
Tabela 8: Dados comparativos entre micro-organismos descritos na literatura como produtores de P(3HB-co-3HV).....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

WWF - World Wildlife Fund

PHAs - Polihidroxicanoatos

PHB - Polihidroxiacetato

P(3HB-co-3HV) - Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)

P(3HB-co-4HB) - Poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato)

P(3HB-co-3HV-co-4HB) - Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato)

P(3HB-co-3HD-co-3HD) - Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)

PHD - Poli(3-hidroxiacetato)

3HV - 3-hidroxiacetato

CO₂ – Dióxido de carbono

RuMP - Ciclo da Ribulose Monofosfato

CBB - Ciclo de Calvin Benson-Bassham

HA – hidroxicanoatos

3HB – 3-hidroxiacetato

PHA_{SCL} - Polihidroxicanoatos de cadeia curta

PHA_{MCL} – Polihidroxicanoato de cadeia média

PHA_{LCL} – Polihidroxicanoato de cadeia longa

C₁ – Compostos com 1 carbono

ATP - Trifosfato de adenosina

PQQ - Pirroloquinolina quinona

NADP - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

XuMP - Monofosfato de xilulose

EMC - Etilmalonil -CoA

TCA – Ciclo do ácido cítrico

HCHO – Formaldeído

H₄F - Tetrahidrofolato

H₄MPT - tetra-hidrometanopterina

ADP - Adenosina difosfato

NADH - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo

FDH - formate desidrogenase

T_m – Temperatura de fusão cristalina

T_g - Temperatura de transição vítrea

MPa – Megapascal

HHx - 3-hidroxihexanoato

PE-HD - polietileno de alta densidade

PE-LD - polietileno de baixa

PP - polipropileno.

PLA - Ácido poliláctico

GC – Cromatografia gasosa

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

RPM – Rotações por minuto

UV - Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

° C - Grau Celsius

μm – Micrometro

μL - Microlitro

β – Beta

nm – nanômetro

Hz - Hertz

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1. Plásticos biodegradáveis.....	25
2.2. Polihidroxialcanoato (PHAs).....	26
2.3. Síntese de PHA por bactérias metilotróficas.....	29
2.3.1. Gênero <i>Methylopila</i>	29
2.3.2. Metabolismo de bactéria metilotróficas.....	30
2.3.3. Vias metabólicas de oxidação de carbono.....	31
2.3.4. Assimilação de formaldeído pela via da serina.....	32
2.3.5. Síntese de PHB e P(3HB- <i>co</i> -3HV).....	33
2.4. Propriedades de copolímero.....	35
2.5. Aplicação de P(3HB- <i>co</i> -3HV).....	37
2.6. FONTES DE CARBONO.....	38
2.6.1. Metanol como substrato.....	38
2.6.2. Fontes de carbono auxiliares para produção de copolímero.....	38
3. OBJETIVO.....	40
4. METODOLOGIA.....	41
4.1. Micro-organismo isolado.....	41
4.2. Meios de cultivo testados.....	41
4.3. Ensaio com <i>cepa</i> MCSUBH.....	42
4.4. Ensaio em shaker de bancada.....	43
4.5. Produção de P(3HB- <i>co</i> -3HV) em dois estágios.....	44
4.6. Produção de P(3HB- <i>co</i> -3HV) em um estágio.....	44

4.7.	Análise gravimétrica da biomassa	45
4.8.	Quantificação de P (3HB-co-3HV).....	45
4.9.	Quantificação de Substratos.....	46
4.10.	Relação de substrato em células (m), e fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{3HV/Substrato}$ e $Y_{PHA/S+S1}$)	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1.	Avaliação da capacidade de acúmulo de PHB da <i>cepa</i> MCSUBH	48
5.2.	Avaliação da Capacidade de acúmulo de copolímero com diferentes fontes de carbono 49	
5.3.	Avaliação da produção de P(3HB- <i>co</i> -3HV) a partir das variações de tempo.	51
5.4.	Modificações na concentração de metanol e tempo de ensaio	54
5.5.	modificações nas concentrações de ácido valérico.....	56
5.6.	Produção de P(3HB- <i>co</i> -3HV) em um estágio.....	58
5.7.	Conversão do substrato em célula e conversão de substrato em produto em dois estágios	63
6.	CONCLUSÕES	67
7.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	68
	ANEXO I - Curvas de calibração	78
	ANEXO II – Cronograma de atividades.....	82

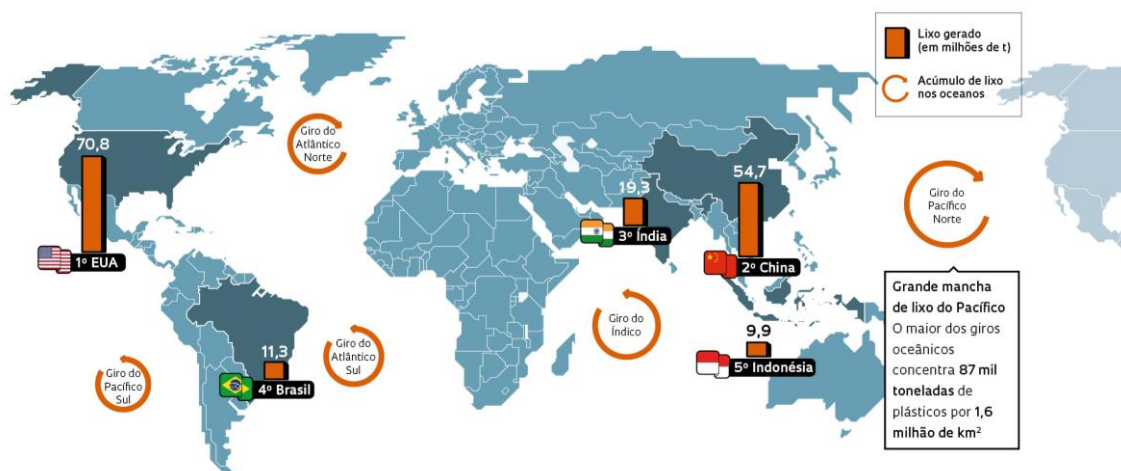
1. INTRODUÇÃO

Plásticos convencionais são materiais poliméricos derivados de materiais fósseis e englobam grande parte dos produtos plásticos que movimentam o mercado econômico. Atualmente, a produção de plásticos é um dos pilares da economia e supera a maioria dos materiais fabricados pelo homem, ficando atrás do aço e cimento no setor de construção. A produção desses materiais plásticos acelerou no início dos anos 2000, em proporções semelhantes às embalagens não recicláveis, representando metade dos resíduos plásticos do mundo (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017).

Os plásticos são economicamente atrativos aos mercados devido ao seu baixo custo de produção e sua ampla utilidade, presente em diversos setores, desde bens de consumo à automotivos e eletrônicos. Dentre esses produtos há uma diferenciação entre eles em relação a sua origem. Os bioplásticos são concorrentes aos plásticos convencionais, uma vez que, apelam ao novo conceito econômico, que ajudam a romper com o conceito linear caracterizado por “fabricar, usar e descartar”. Os bioplásticos são favoráveis a um ciclo sustentável e uma política circular baseada na bioeconomia e também no modelo “fabricar, usar, reutilizar e reciclar”. Eles são materiais poliméricos de origem biológica, e ganharam notoriedade no mercado, pois diminuem as emissões de carbono e o seu ciclo não promove grandes danos ambientais, quando comparados aos plásticos convencionais.

Aproximadamente 368 milhões de toneladas de plásticos foram produzidas no ano de 2019 (PLASTICS – THE FACTS, 2019) e a estimativa é que este consumo continue aumentando até 2050, produzindo cerca de 12 bilhões de toneladas de lixo plástico no meio ambiente. Em 2016, o Brasil foi responsável pela produção de 11,3 milhões de toneladas de lixo plástico, principalmente nos setores de construção civil, alimentos e automóveis, assumindo a quarta posição de maior produtor, segundo a FAPESP (FAPESP, 2019) (Figura 1).

Figura 1: Mapa de resíduos plásticos produzidos em 2016 no mundo com os 5 maiores geradores



Fonte: (FAPESP, 2019)

Um dado alarmante é que apenas 9% das 9 bilhões de toneladas de plástico que o mundo possui já manufaturado foi reciclado, acabando o restante, em sua maioria, em lixões, aterros e em ambientes marinhos, depositados diretamente no meio ambiente, gerando danos, pois o plástico possui um tempo de vida longo e é inerte ao ataque de micro-organismos. Desta forma, eles acabam se perpetuando no meio ambiente, promovendo alguns fenômenos como o a mancha de lixo no Pacífico, onde há uma concentração de 87 mil toneladas de plásticos (FAPESP, 2019). Grande parte das cidades brasileiras recebem coleta de lixo convencional, cerca de 90%, porém não preveem a segregação dos resíduos na fonte, o que dificulta o processo de coleta seletiva e a reciclagem desses materiais. Apenas 22% dos municípios apresentam coleta seletiva (CEMPRE, 2019). Logo, muito do que é produzido permanece no meio ambiente.

Uma alternativa à produção dos plásticos petroderivados são os bioplásticos. Estes apresentam um potencial promissor para a substituição de plásticos derivados de petróleo, já que podem ser produzidos a partir de fontes renováveis ou resíduos orgânicos. Os bioplásticos podem ser distinguidos entre origem de fontes renováveis e biodegradáveis ou de origens renováveis e não biodegradáveis. No entanto, a relação mais comum em sua divisão é em relação à sua composição, que diferencia as propriedades físicas e químicas, como também os processos de obtenção do mesmo.

Em especial, os polihidroxicanoatos (PHAs) representam uma classe de biopolímeros sustentáveis, que vem despertando interesse em pesquisas científicas, assim como estratégias para viabilizar sua produção. Os PHAs são produzidos naturalmente por bactérias, como reserva de carbono na forma de grânulos intracelulares em meio de cultivos seletivos, ou por excesso da fonte de carbono ou por limitação de nutrientes, necessários à multiplicação celular. São biodegradáveis e também biocompatíveis, ou seja, não produzem subprodutos tóxicos durante o seu processo de degradação, servindo como uma alternativa ambientalmente e economicamente mais viável com relação à produção e consumo de plásticos mundialmente. Muitos pesquisadores tem estudado a viabilidade da produção comercial de PHAs e muitos avanços foram conquistados desde então para a caracterização e síntese de biopolímeros (CESPEDES et al., 2018; MENDONÇA et al., 2017; MATIAS et al., 2017; MENDONÇA et al., 2014).

As propriedades dos PHAs variam de acordo com sua composição monomérica, que por sua vez depende da fonte de substrato utilizada para sua produção, além de outros fatores. Isso garante aos biopolímeros características variadas, podendo ser estas características termoplásticas, termofixas, mecânicas ou elastoméricas. Essa versatilidade mostra o seu potencial para substituição aos polímeros convencionais, principalmente devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (KHOSRAVI-DARANI et al., 2013; URTUVIA et al., 2014). Eles são completamente degradados à água e dióxido de carbono sob condições aeróbias e a metano sob condições anaeróbias, por micro-organismos no solo, mar e água (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010).

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 e URTUVIA et al., 2014). Esses fatores restringem a produção deste tipo de biopolímero, sendo que a produção total de polímeros em 2014 foi de apenas 2%, por exemplo (EUROPEAN BIOPLASTICS, 2015).

O PHB (polihidroxibutirato) é composto por unidades monoméricas de quatro carbonos, e é o tipo mais comum de PHA sintetizado por micro-organismos, sendo comparável aos termoplásticos derivados de petróleo, porém é um homopolímero rígido, quebradiço e com alto custo de produção, o que restringe a sua aplicação. Para melhorar

as propriedades físicas do PHB produzido por micro-organismos, várias tentativas têm sido feitas para sintetizar copolímeros e outros monômeros (KARTHIKEYAN et al., 2015), além dos estudos realizados para melhorar suas propriedades mecânicas para aplicação em embalagens de alimentos (HOLMES, 1985 e BUGNICOURT et al., 2014) e no campo biomédico (YEO et al., 2018 e MANAVITEHRANI et al., 2011).

Copolímeros tais como poli(3-hidroxi-*n*-butirato-co-3-hidroxi-*n*-valerato) (P(3HB-co-3HV)) e poli(3-hidroxi-*n*-butirato-co-4-hidroxi-*n*-butirato) (P(3HB-co-4HB)), são mais flexíveis e mais resistentes que o PHB, e podem ser obtidos pela adição no meio de cultivo de co-substratos, sendo eles: ácido propiônico, ácido valérico, 1,4-butanodiol, butirolactona ou 4-hidroxi-*n*-butirato de sódio (KESHAVARZ; ROY, 2010; ASHBY et al., 2015; CASTILHO; MITCHELL; FREIRE, 2009; LUZIER, 1992 e RIIS; MAI, 1988), melhorando as propriedades do material, diminuindo a cristalinidade, a rigidez temperatura de fusão e o módulo de Young (ANJUM et al., 2016).

Deste modo, a partir da variação da fonte de carbono é possível obter outros tipos de copolímeros como o P(3HB-co-3HV), que têm o maior valor comercial, pois a introdução do 3-hidroxi-*n*-valerato (3HV), produzido pelos micro-organismos pela indução de co-substratos específicos, na molécula de PHB melhora substancialmente as propriedades físico-químicas do copolímero (ORITA et al., 2014). Além disso, a fim de reduzir o custo de produção, novas fontes de substrato têm sido estudadas, entre elas o metanol e o metano, que são substratos de baixo custo, os quais podem ser utilizados como substrato por bactérias metilotróficas, que ocorrem naturalmente no meio ambiente.

A cepa MCSUBH pertence a um grupo de bactérias do tipo metilotróficas, capazes de consumir carbonos primários, que não possuem ligação carbono-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. Elas podem ser encontradas em diversos ambientes, sendo mais comum em solos, como na rizosfera de arrozais, por exemplo, devido à produção natural de metano; mas podem ser encontradas também em plantas, pois estas produzem metanol e 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 tóxico para elas; 2) oxidar o formaldeído à CO₂ e 3) assimilar

uma unidade de carbono primário, podendo ser: a) à formaldeído, no caso do Ciclo da Ribulose Monofosfato (RuMP), b) à CO₂, no caso do Ciclo de Calvin Benson-Bassham (CBB) ou c) a uma combinação de metileno-H₄F e CO₂ no caso do Ciclo das Serinas. Isso torna estes micro-organismos potenciais hospedeiros para a produção de compostos de grande valor agregado, como os PHAs (CHISTOSERDOVA, 2011; OCHSNER et al., 2015)

Essa cepa MCSUBH, foco do presente projeto, foi um dos micro-organismos selecionados dentre as 105 bactérias isoladas do mangue de Cubatão – SP e Guarujá – SP (KAROLSKI et al, 2018). Após isolados, estes micro-organismos foram identificados por amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA , sendo eles: *Methylopila oligotropha* PadubW estirpe (número de acesso MH061206.1), *Methylobacterium radiotolerans* estirpe MAMP4754 (número de acesso MF133459.1) e *Methylobacterium populi* estirpe MAMP4754 (número de acesso MF133459.1) respectivamente nos resultados do BLAST. Todos este micro-organismos foram testados para a produção de PHB, por uma nova técnica, utilizando o MALDI-Biotyper para identificação do polímero e confirmando essa identificação por análise de ressonância magnética (KAROLSKI et al., 2018).

Para realizar os ensaios subsequentes, a cepa MCSUBH foi escolhida, já que apresentou melhores resultados e é um gênero pouco explorado na literatura. O gênero já foi relatado apresentando resultados de acúmulo de grânulos, porém não há relatos da capacidade de produção de PHB (DORONINA et al., 2000; LI et al., 2011) e não há relatos em relação a produção de copolímeros do tipo P(3HB-co-3HV). Por esses motivos, explorar o potencial desse gênero contribui não só com a ciência básica, mas também com o conhecimento de outros micro-organismos produtores de biopolímero.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PLÁSTICOS BIODEGRADÁVEIS

Os polímeros são formados por unidades repetitivas (monômeros) ligadas entre si por ligações covalentes. Há polímeros biodegradáveis que existem em escala industrial desde o final dos anos 90 (ELIAS; MÜLHAUPT, 2015). A biodegradabilidade é um processo em que uma substância pode ser convertida em água, gás carbônico e biomassa através da ação de micro-organismos. Tal processo apresenta vantagem ao produto, pois agrega valor em sua comercialização no mercado. Além disso, há um fator importante em relação às fontes que dão origem ao produto tornando seu ciclo de vida ambientalmente correto e compreende-se a importância de agregar valor aos produtos com fontes renováveis (HARDING; GOUNDEN; PRETORIUS, 2017).

Os biopolímeros podem ser produzidos por micro-organismos e oferecem uma grande gama de oportunidade comercialmente rentáveis. Existe uma enorme variabilidade de biopolímeros que são encontrados naturalmente no meio ambiente. Aliando estratégias de química combinatória, modificação genética do micro-organismo produtor ou otimização do seu cultivo nos bioprocessos, pode-se atrair grande interesse na área de materiais, podendo ser desenvolvidos para atender demandas específicas (SILVA et al., 2007).

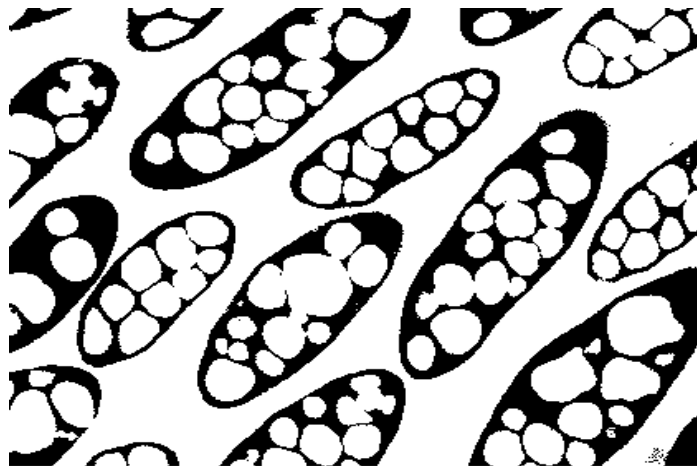
Os biopoliésteres são acumulados como reserva de carbono e energia por diversas bactérias (SILVA et al., 2007) e despertam grande interesse em virtude de suas propriedades termoplásticas, pois apresentam diversas utilidades que competem com os plásticos convencionais e apresentam como vantagens, a biodegradabilidade e produção por fontes renováveis (REDDY et al., 2003).

Por fim, são necessários esforços sinérgicos em diferentes áreas científicas e a estreita cooperação entre a academia e a indústria para transferir o desenvolvimento laboratorial para a produção de biopolímero em escala industrial. Isso deve basear-se nos princípios de emitir, desperdiçar o mínimo possível e por consequência ter uma produção mais limpa, como geralmente sugerido para a fabricação sustentável do futuro (SCHNITZER; ULGIATI, 2007).

2.2.POLIHIDROXIALCANOATO (PHAS)

Os polihidroxicanoatos (PHAs) foram relacionado primeiramente a um polímero de reserva de energia em micro-organismos, sendo classificado como material de armazenamento bacteriano, análogo ao amido e ao glicogênio (HAYWOOD et al., 1991). Atualmente, são reconhecidos como poliésteres, produzido por bactérias na forma de grânulos intracelulares como reserva de carbono e energia (Figura 2).

Figura 2: Grânulos intracelular em micro-organismos.



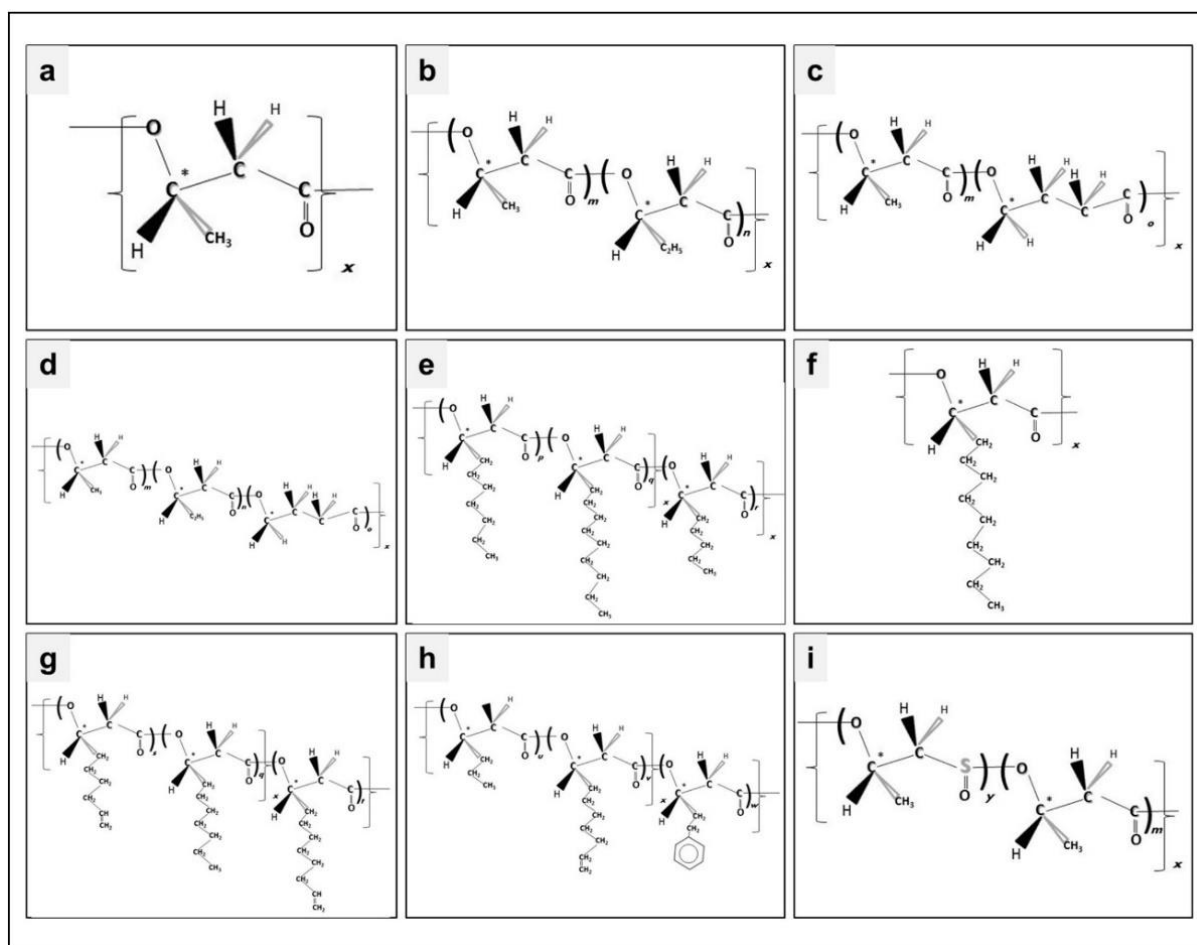
Fonte: (KÜNKEL et al., 2016).

Essa produção de PHAs por bactérias ocorre quando há modificações no meio nutritivo que estressam os micro-organismos como: excesso de fonte de carbono e limitação de nutrientes relacionados com a multiplicação celular tais como: nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro entre outros (MADISON; HUISMAN, 1999; STEINBIICHEL; VALENTIN, 1995a; WANG; YIN; CHEN, 2014). Por anos, a unidade de 3-hidroxiбутирато (3HB) foi pensada para ser o único constituinte de hidroxicanoato que forma o bloco de construção desse polímero de reserva microbiana, que pode constituir até 90% da massa seca celular, que servirá de energia quando os elementos essenciais estiverem novamente disponíveis para o crescimento celular. (STEINBIICHEL; VALENTIN, 1995b)

Porém, a partir de 1974, Wallen e Rohwedder relataram a identificação de hidroxicanoatos (HA) diferentes de 3HB. Ao longo dos anos, com o avanço da tecnologia e de métodos analíticos descobriu-se diferentes heteropolímeros. Atualmente, a composição destes é identificada com uma cadeia de carbono junto a um radical de cadeia curta ou longa (Figura 3), que representam as estruturas de PHA classificadas em

três tipos: homopolímero, onde há a presença de somente um monômero diferente em sua estrutura química; copolímeros, com a presença de dois tipos diferentes monômeros em estruturas químicas; e o terpolímero, caso particular de um copolímero que apresenta três tipos diferentes de monômeros.

Figura 3: Estruturas de tipos selecionados de PHA: homo (a, f), co (b, c, e, g, h, i) e terpolímeros (d) produzidos por diferentes cepas de produção microbiana. a - d: PHA de comprimento de cadeia curta (PHASCL), e - h: PHA de comprimento de cadeia média (PHAMCL). a - h: Polímeros; i: PHA com grupos tioéster. a: PHB; b: P(3HB-co-3HV); c: P(3HB-co-4HB)); d: P(3HB-co-3HV-co-4HB); e: Poli(3-hidroxi-octanoato-co-3-hidroxi-decanoato-co-3-hidroxi-dodecanoato); f: PHD; g: Poli(3-hidroxi-nonanoato-co-3-hidroxi-decanoato-co-3-hidroxi-undecanoato); h: Poli(3-hidroxi-hexanoato-co-3-hidroxi-decanoato-co-3-hidroxi-5-fenilvalerato); i: Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-mercaptop butirato).



Fonte: (KOLLER et al., 2017a)

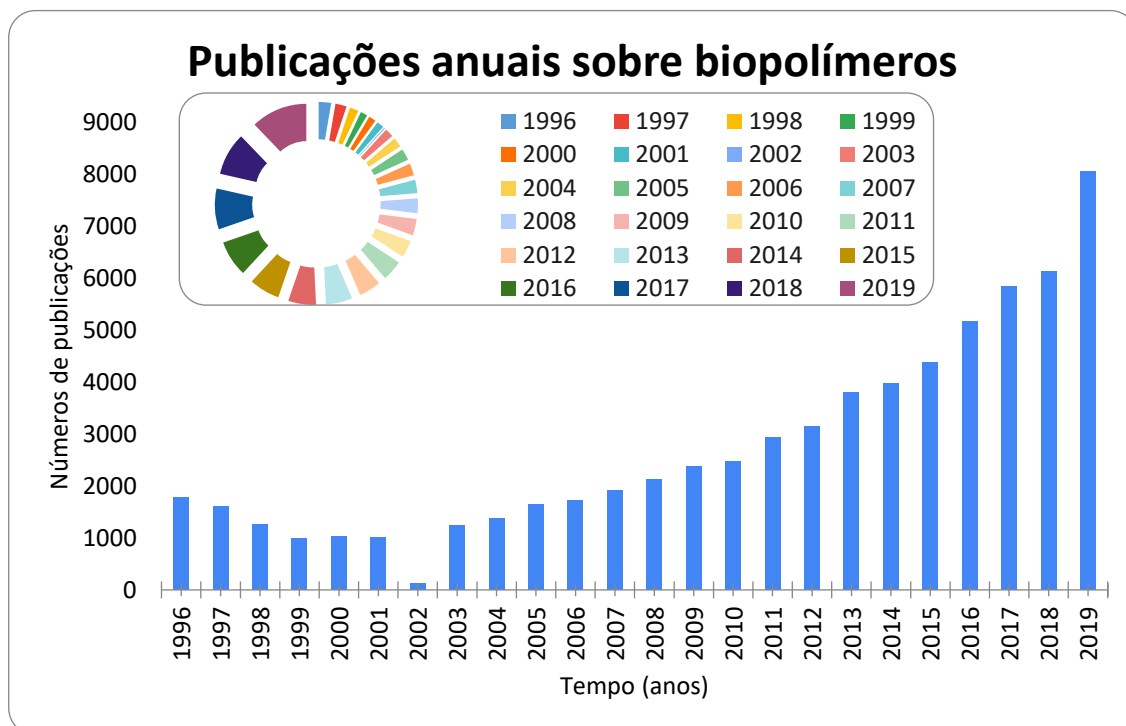
Tal descoberta ganhou notoriedade e fomentou iniciativas comerciais no mesmo século, além de ganhar cada vez mais espaço no mercado atual, em função de suas propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade, termoplaticidade, e suas diversas fontes de matérias primas, que podem ser renováveis (ŁABUZEK; RADECKA, 2001; LAKSHMI et al., 2012; MOORKOTH; NAMPOOTHIRI, 2016) ou residuárias (GHATE et al., 2011; VENKATA MOHAN et al., 2010). Tais propriedades o tornam

substituto de grande potencial à plásticos convencionais. A enzima chave para a biossíntese de PHA, a PHA-*sintase*, é responsável por definir a natureza final do polímero de acordo com o substrato disponibilizado no meio de cultivo.

Segundo alguns trabalhos reportados na literatura (STEINBIICHEL; VALENTIN, 1995b) os PHAs são divididos em três grandes grupos: monômeros de cadeia curta PHA_{SCL} (do inglês “short chain length”), que consistem em 3 a 5 átomos de carbono; monômeros de comprimento médio da cadeia PHA_{MCL} (“medium chain length”), que consistem em 6 a 14 átomos de carbono; e monômeros de cadeia longa PHA_{LCL} (“long chain length”), que consistem em 14 e mais átomos de carbono. (KOLLER et al., 2017b; SILVA et al., 2007; STEINBIICHEL; VALENTIN, 1995b).

Com o crescente fomento da pesquisa na busca de diferentes tipos de copolímeros, há uma grande lista de publicações disponibilizadas. A Figura 4 apresenta um gráfico informando os artigos publicados desde 1996 a 2019, com as palavras chaves de “*polyhydroxyalkanoate*” e “*biopolymer*”, de acordo com a base de dados do “*Science direct*”. Com esses dados, pode-se constatar que com exceção de 2002, houve um aumento constante no número de publicações internacionais, confirmando o interesse mundial na busca e no investimento tecnológico de alternativas para a geração de biopolímeros.

Figura 4: Artigos publicados desde 1996 a 2019, com as palavras chaves de polyhydroxyalkanoate” e “biopolymer”, de acordo com a base de dados do “Science direct”.



Fonte: Acervo pessoal.

2.3. SÍNTESE DE PHA POR BACTÉRIAS METILOTRÓFICAS

2.3.1. Gênero *Methylopila*

O gênero estudado no presente projeto apresenta pouco relato na literatura sobre a produção de PHA, sendo este um dos primeiros estudos realizados para produção de PHB e P(3HB-co-3HV). As principais espécies relatadas na literatura são apresentadas como bactérias não pigmentadas e metilotróficas facultativas, como as espécies *Methylopila capsulata* IMIT (DORONINA et al., 1998), *Methylopila jiangsuensis* sp. (LI et al., 2011), *Methylopila carotae* sp. (KAPARULLINA et al., 2019), *Methylopila turkiensis* sp. (AGAFONOVA et al., 2015) *Methylopila henanense* sp. (WANG et al., 2015). Contudo, para a produção de biopolímeros há uma escassez em relatos sobre o gênero, sendo que somente a espécie *Methylopila jiangsuensis* sp. foi descrita e apresentou relato da formação de grânulos, identificados através da microscopia eletrônica, com a afirmação de ser PHB, porém sem quantificação e caracterização do grânulo.

Além disso, o trabalho que isolou o micro-organismo estudado, *cepa* MCSUBH validou a técnica rápida, com custo reduzido, para comprovar a produção de PHB por desorção/ionização a laser assistida por matriz técnica (MALDI-Biotyper) (KAROLSKI et al., 2018), conhecida por identificar bactérias com base em uma única colônia isolada. O trabalho apresentou resultados promissores, sendo possível identificara produção de PHB, mas sem quantificação e otimização da produção desse biopolímero.

Ao ser cultivada com metanol, sob limitação de um nutriente essencial como o nitrogênio, a *cepa* MCSUBH acumulou o homopolímero PHB e ao oferecer como co-substrato o ácido valérico a bactéria acumulou o copolímero P(3HB-co-3HV) (dados deste projeto). A PHA sintase desta bactéria ainda não foi descrita na literatura, uma vez que o gene codificador da mesma não foi estudado. Por isso, a confirmação da produção de PHAs por esse gênero, na presença de co-substratos, contribuirá para o conhecimento de outras vias metabólicas para produção de copolímeros.

2.3.2. Metabolismo de bactéria metilotróficas

A síntese de PHAs pode ocorrer a partir de fontes de carbono estruturalmente relacionadas aos monômeros (ácido graxos, álcoois e alcanos), como a partir de outras fontes de carboidratos não relacionados estruturalmente (carboidratos) que podem ser metabolizados pela β -oxidação ou biossíntese de novo ácidos graxos. Quando cultivadas em metanol, metilobactérias acumulam P(3HB-co-3HV) na presença de propanol, pentanol, propionato e valerato; além disso, adição de substratos aumenta o teor de 3HV no copolímero, que possui maior extensão do que o 3HB (TROTSENKO; DORONINA; KHMELENINA, 2005b). No entanto o substrato mais comum para a produção de P(3HB-co-3HV) é o ácido valérico utilizado por bactérias metilotróficas (CAL et al., 2016; KIM; KIM; KIM, 1999; YEZZA et al., 2006).

A inserção de unidades de 3-hidroxivalerato (3HV), compostas por cinco átomos de carbono dá origem ao copolímero P(3HB-co-3HV), com propriedades que lhe conferem maior maleabilidade. Há estudos que mostram a *M. extorquens* AM1 é capaz de sintetizar copolímeros do tipo P(3HB-co-3HV) a partir do metanol como única fonte de carbono sob condições deficientes de Co^{2+} (ORITA et al., 2014).

Bactérias metilotróficas são capazes de usar compostos C₁ reduzidos, como metanol e metilamina como fonte de carbono e energia, mas ainda há outros subgrupos dessas bactérias que têm a capacidade de usar o metano, metilssulfonato e ainda outras espécies capazes de consumir o enxofre metilado, aminas metiladas e hidrocarbonetos hlogenados, clorometano, bromometano e diclorometano, tanto na presença ou na ausência de metanol (SCHRADER et al., 2009b).

Além disso, as metilotróficas tem o potencial de converter esses compostos em vários produtos químicos de interesse comercial. O PHA é um exemplo desses, além de outros micro-organismos terem capacidade de sintetizar (ARUN et al., 2009; EL-ABD et al., 2017; MATIAS et al., 2017), incluindo bactérias metilotróficas (BONTRONE et al., 1992; KAROLSKI et al., 2018; ZHANG et al., 2018b). As bactérias metilotróficas aeróbicas oxidam a fonte reduzida de C₁ em CO₂. Esse processo de conversão ocorre em várias etapas formando o formaldeído como intermediário central, na qual é acoplado à fosforilação ao transporte de elétrons para geração de ATP (HANSON; HANSON, 1996).

A conversão de metanol é iniciada pela desidrogenação do metanol à formaldeído. Essa etapa enzimática é catalisada por uma enzima dependente de pirroloquinolina quinona (PQQ) diferente entre os grupos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo dependente de NADP para o primeiro grupo e periplásmica para o segundo.

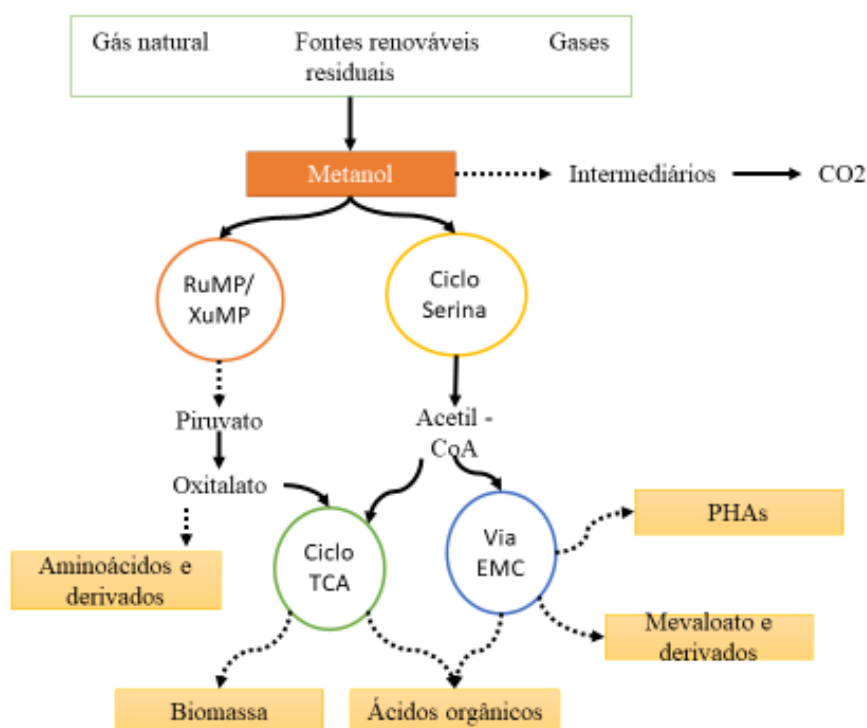
2.3.3. Vias metabólicas de oxidação de carbono

A capacidade de sintetizar citocininas e auxinas foi demonstrado para representantes dos gêneros de metilotróficos aeróbicos, utilizando três vias distintas do metabolismo C₁: Via das serinas, correspondente aos gêneros: *Methylobacterium*, *Aminobacter*, *Methylopila*, *Methylorhabdus*, *Hyphomicrobium*, *Methylocystis* e *Methylosinus*; Via RuMP, *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylovorus*, *Methylophaga*, *Methylomonas* e *Methylomicrobium*; e a Via XuMP específica para *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Albibacter*, *Ancylobacter*, *Angulomicrobium* e *Schlegelia* (TROTSENKO; DORONINA; KHMELENINA, 2005a).

Na natureza há uma diversidade de micro-organismos, bactérias e leveduras, que oxidam o composto C₁ em vários produtos químicos. Nos organismos metilotróficos, o metanol é convertido enzimaticamente em formaldeído *in vivo*, o qual é oxidado

posteriormente em CO₂ através das vias metabólicas do carbono. A Figura 5, ilustra um resumo das vias metabólicas e os possíveis produtos químicos sintetizados por elas. Há duas rotas, sendo uma a da Serina (células que utilizam este caminho têm o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e a outra Ribulose Monofosfato (células que utilizam este caminho têm o TCA incompleto). No entanto a via associada à produção de PHA é a via da serinas (HANSON; HANSON, 1996; PIEJA; ROSTKOWSKI; CRIDDLE, 2011).

Figura 5: Esquema de vários tipos de produção de produtos químicos a partir de metanol. O metanol obtido a partir de diferentes recursos pode ser oxidado em CO₂ por dissimilação ou entrar nas vias metabólicas do carbono e ser convertido em produtos químicos através das vias de assimilação de carbono. Setas contínuas apresentam reações de uma etapa e setas pontilhadas apresentam reações de várias etapas.



Fonte:(ZHANG et al., 2018b) Adaptado.

2.3.4. Assimilação de formaldeído pela via da serina

O ciclo da serina é outra *via* metabólica para assimilação do formaldeído, primeiro intermediário na oxidação do metanol, em bactérias metilotróficas. Essa via metabólica foi caracterizada para a produção de PHB em *Methylobacterium extorquens* (ORITA et al., 2014) e associada à outros gêneros (TROTSSENKO; DORONINA; KHMELENINA, 2005a). Existem duas rotas existentes para gerar metileno-H₄F a partir do formaldeído. Uma delas é o formaldeído e H₄F convertido em metileno-H₄F (SCHRADER et al., 2009) e, nessa rota, há um número menor de enzimas envolvidas e ATP consumido. A outra

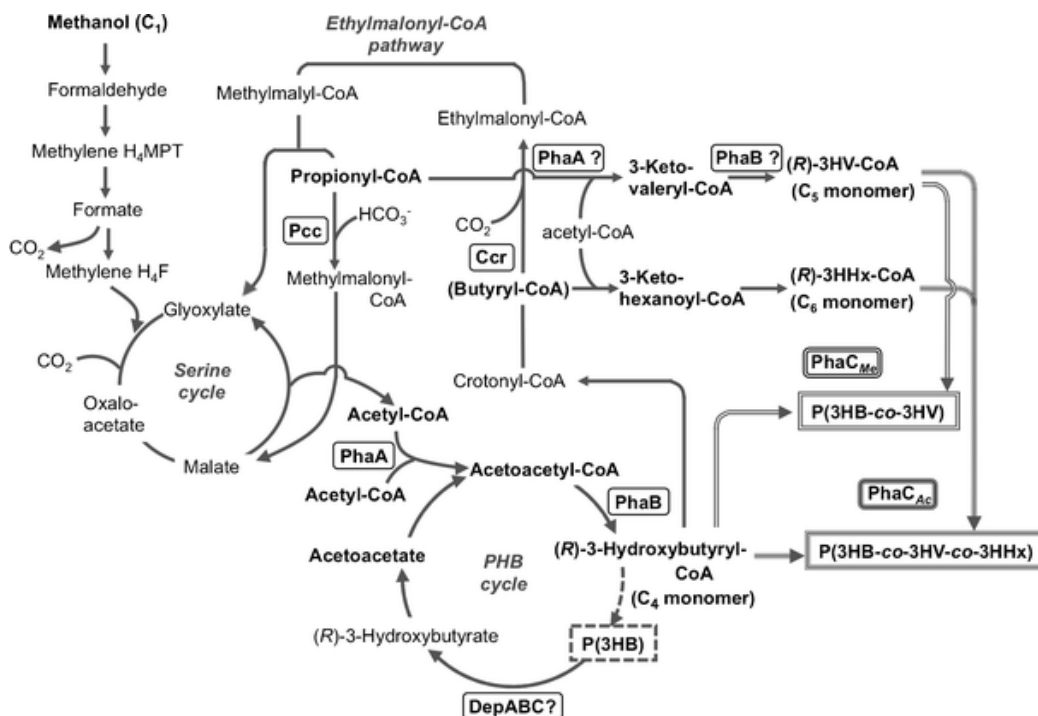
rota, o formaldeído será convertido formato por meio de enzimas dependentes de tetra-hidrometanopterina (H₄MPT), onde em seguida o formato é convertido em metileno- H₄F via H₄-enzimas dependentes. O balanço de carbono da *via*, como mostrado aqui, é: CO₂ + 2HCHO + 2NADH + 2ATP = piruvato + 2NAD⁺ + 2ADP + FPH₂ (ZHANG et al., 2017).

2.3.5. Síntese de PHB e P(3HB-*co*-3HV)

As metilobactérias, pela *via* das serinas, possuem a capacidade de biossíntese de PHB e P(3HB-*co*-3HV). Durante o crescimento dos micro-organismos, como fonte de carbono principal metano ou metanol e adição de co-substratos precursores que estão relacionados à unidade do copolímero (propanol, ácido propiônico e ácido valérico), os biopolímeros são acumulados nos grânulos intracelulares e permitem obter copolímeros com monômeros predefinidos (3HB ou 3HV) com proporções e características físico-químicas melhoradas (TROTSENKO; DORONINA; KHMELENINA, 2005a). Os co-substratos mais utilizados para tal síntese são: propanol, ácido propiônico e ácido valérico (CAL et al., 2016; COLOMBO et al., 2016; KAPARULLINA et al., 2019; KIM; KIM; KIM, 1999). Ainda, há outros co-substratos que são utilizados e produzem esse copolímero, porém não estão associados ao ciclo e, são chamados de substratos não relacionados.

No entanto, a eficiência da conversão em β-hidroxicvalerato é baixa quando comparada a outros micro-organismos produtores. Por esse motivo, uma das estratégias de aumentar o rendimento do copolímero e conseqüentemente reduzir seu custo, seria obter *M. extorquens* mutantes defeituosos em propionil-CoA carboxilase, metilmalonil-CoA mutase e enzimas de propionil-CoA e descarboxilação de valeril-CoA. Tais enzimas estão presentes na biossíntese desse copolímero e representadas na Figura 6.

Figura 6: Via metabólicas para a síntese de PHA a partir de metanol em *M. extorquens* AM1 e AM1C Ac em condições deficientes em Co^{2+} . Setas com linhas duplas e triplas representam polimerização pela PHA-sintase de *M. extorquens* AM1 (PhaC Me) e pela PHA-sintase de *A. caviae* (PhaC Ac), respectivamente. A seta pontilhada representa a polimerização por PhaC Me sob condições suficientes de Co^{2+} . PhaA, p-cetotiolase; PhaB, NADPH-acetoacetyl-CoA redutase; DepA, DepB e DepC, despolimerases de PHA; Pcc, propionil-CoA carboxilase; Ccr, crotonil-CoA redutase/carboxilase.

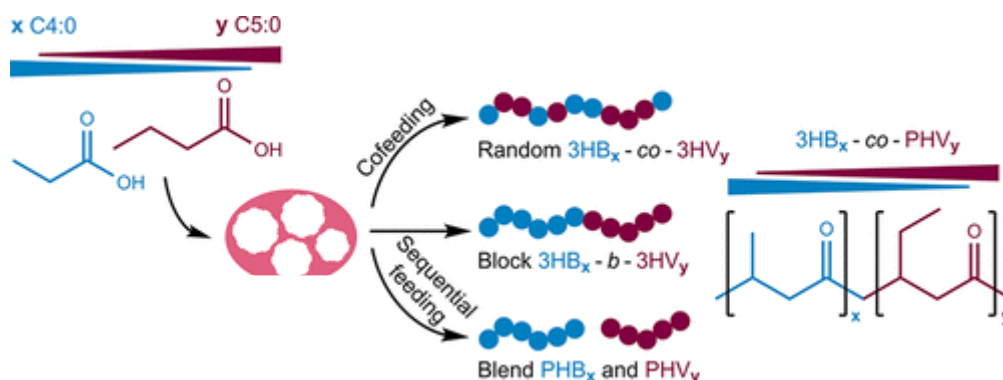


Fonte: (ORITA et al., 2014).

Sobre o controle da composição do copolímero, há relatos na literatura que indicam que a microestrutura depende da ordem de adição do substrato sendo que a co-alimentação, quando se faz a mistura entre dois substratos indutores da produção dos monômeros e alimenta uma única vez, essa pode gerar copolímeros aleatórios. Já a alimentação sequencial, onde os substratos são colocados em períodos diferentes, pode criar copolímeros em bloco ou mesclados, segundo a literatura a síntese de um polímero em bloco é que após a adição do segundo substrato, esse é utilizado para sintetizar novas

cadeias de polímero em vez de alongar as existentes. (FERRE-GUELL; WINTERBURN, 2018), conforme ilustra a Figura 7.

Figura 7: Composição do copolímero e relação da sua microestrutura.



Fonte: (FERRE-GUELL; WINTERBURN, 2018)

2.4. PROPRIEDADES DE COPOLÍMERO

Os copolímeros apresentam propriedades diferentes, quando comparados aos homopolímeros altamente cristalinos, como o ácido 3-hidroxi-butírico P(3HB) (VOLOVA et al., 2016). Além disso, um grande número de produtores de PHA geneticamente modificados e capazes de sintetizá-los já foram descritos até agora (ACKERMANN et al., 1995; CHEN; HAJNAL, 2015; HÖFER et al., 2010). Além de modificações, há investidas em otimização de processos para aumentar a produção em micro-organismos selvagens (BHUBALAN et al., 2010; LIU et al., 2016; PEÑA et al., 2014).

A literatura relata que mais de 150 hidroxialcanoatos distintos que foram identificados como constituintes de PHA bacterianos (SILVA et al., 2007). Entre os PHAs, o PHB e o P(3HB-co-3HV), se encaixam entre os materiais mais atrativos para aplicação biomédica. A utilização desses biopolímeros para implantes em tecido já foi relatada por não resultar em produtos tóxicos para a célula e não causar rejeição ou reações inflamatórias. A modificação na estrutura molecular e a proporção molar dos grupos estruturais na composição do PHA interfere em propriedades físicas, (Tabela 1) tornando o bioproduto com características semelhantes aos plásticos convencionais (GERALDO; PRADELLA; PAULO, 2006).

Tabela 1: Propriedades físicas de diferentes tipos de PHA em comparação com plásticos convencionais.

Material	T _m (°C)	T _g (°C)	Tensão de cisalhamento (MPa)	Elongamento na ruptura (%)
----------	------------------------	------------------------	---------------------------------	-------------------------------

PHB	177	4	43	5
P(HB-co-10% HV)	150	-	25	20
P(HB-co-20% HV)	135	-	20	100
Polipropileno	170	-	34	400
Poliestireno	110	-	50	-

HB: 3-hidroxibutirato; 3HV: 3-hidroxivalerato; HHx: 3-hidroxihexanoato.

Fonte: (GERALDO; PRADELLA; PAULO, 2006)

Pode-se observar que a temperatura do ponto de fusão (T_m) é 177 °C e a temperatura de transição vítrea (T_g) e de 4°C, uma das razões para PHB ser um material quebradiço. Além disso, apresenta um alongamento na ruptura baixo, conferindo um material altamente cristalino, o que influencia nos mecanismos de degradação e liberação do ativo, por consequência diminui seu potencial para algumas aplicações na área biomédica. A introdução do monômero 3HV ao PHB é uma estratégia promissora para a alteração das propriedades mecânicas e térmicas desses materiais (MONTORO, 2011). Na Tabela 1 é possível verificar a diminuição da temperatura de fusão e o aumento do alongamento com o aumento da proporção molar de 3HV.

Os copolímeros P(3HB-co-3HV) apresentam menor cristalinidade, maior maleabilidade e por consequência maior velocidade de degradação, no entanto, algumas de suas propriedades de hidrofobicidade podem restringir aplicações “*in vivo*”. Suas superfícies são praticamente inertes e hidrofóbicas e não têm atividade fisiológica. Contudo, sua citocompatibilidade pode ser melhorada através de modificações químicas com grupos funcionais ou modificações na superfície topográfica (POUTON; AKHTAR, 1996).

O teor de 3-hidroxivalerato (3HV), nos copolímeros de P(3HB-co-3HV) são comparáveis às poliolefinas, em relação aos seus altos valores de alongamento. Verificou-se que a temperatura de fusão do P(3HB-co-3HV) dependendo da parcela da porção 3HV no copoliéster, estava na faixa de 150 a 135°C, como observado na Tabela 1 e em outros estudos de 75 a 170 °C (KUNIOKA; TAMAKI; DOI, 1989). Os copolímeros de P(3HB-co-3HV) apresentam características avançadas do material, processabilidade e menor cristalinidade, maior elasticidade e ductilidade (FERRE-GUELL; WINTERBURN, 2018; KOLLER et al., 2014). Entretanto, a estabilidade do P(3HB-co-3HV) (para partes de HV de até 15 % em mol) durante o processamento por fusão ainda é baixa em comparação

com outros termoplásticos, como as poliolefinas (A. JAVADI , P. SRIKANTH , S. GONG, 2011; KOVALCIK et al., 2015).

2.5. APLICAÇÃO DE P(3HB-co-3HV)

A incorporação do monômero 3-hidroxivalerato (3HV) ao monômero 3-hidroxibitrato (HB) formando o P(3HB-co-3HV) supera as propriedades inferiores do PHB (HAN et al., 2017). Por consequência, os copolímeros de P(3HB-co-3HV) tendem a possuir maior potencial biomédico quando comparado ao PHB. As propriedades mecânicas, bem como o controle da biodegradabilidade e a biocompatibilidade, são essenciais ao desenvolvimento de materiais para implantes médicos. Nas duas últimas décadas, numerosos trabalhos foram conduzidos para ajustar propriedades mecânicas manipulando as composições de copolímeros e a massa molar desse material (SANKHLA et al., 2010; SINGH SAHARAN; GREWAL; KUMAR, 2014).

Devido às suas características superiores, o P(3HB-co-3HV) tornou-se mais atraente para aplicações biomédicas, especialmente relacionadas à administração de medicamentos, pois apresenta grande potencial para a obtenção de micro e nanocarreadores biomedicamente importantes, é altamente solúvel em solventes orgânicos como o clorofórmio ou diclorometano, além de possuir baixa solubilidade em todos os outros solventes (RADU et al., 2019). Na literatura, nanopartículas esféricas de PHBHV foram relatadas em estudos de câncer, apresentando-se benéficas ao tratamento, já que não apresentaram efeitos citotóxicos ou influência na viabilidade celular (RADU et al., 2017).

O grande gargalo da produção do P(3HB-co-3HV) é encontrar um substrato promissor com menores custos para promover o crescimento em alta densidade celular. Segundo TAYLOR et al., 1994, os produtos de degradação do P(3HB-co-3HV) não são tóxicos, em ensaios de bioluminescência bacteriana *in vitro*. Ainda há estudos que relatam que não houve nenhuma resposta inflamatória observada após seis meses de implante em camundongos desse copolímero, na validação *in vivo* (GOGOLEWSKI et al., 1993). No entanto, o P(3HB-co-3HV) exibe uma taxa de degradação *in vitro* e *in vivo* relativamente baixa em comparação com os polímeros de PLA (ácido polilático).

2.6. FONTES DE CARBONO

2.6.1. Metanol como substrato.

O custo do substrato como fonte de carbono é um dos gargalos na viabilidade econômica dos processos biotecnológicos para a produção de PHAs. Atualmente, o metanol vem sendo estudado e considerado uma alternativa de fonte de carbono para os processos fermentadores. Há duas formas de produção do metanol, a partir de processos termoquímicos e bioquímicos, sendo que ambos apresentam vantagens e desvantagens. Os processos termoquímicos têm sido explorados há muito tempo, no entanto atualmente não se apresentam economicamente atraentes. Já o processo de conversão bioquímica ainda se limita em experimentos em escala laboratorial (GAUTAM et al., 2020).

O metanol obtido através da via bioquímica apresenta-se como matéria-prima alternativa potencial para produtos derivados de petróleo (ZHANG et al., 2018a), sendo renovável e podendo ser produzido em larga escala, especialmente a partir de gás natural. É amplamente utilizado para sintetizar biodiesel, aminoácidos e proteínas unicelulares. E em função dos investimentos no setor de bioenergia do setor sucroalcooleiro, o custo do metanol têm sofrido redução (YANG; JACKSON, 2012). Portanto, apresenta vantagens como: baixo custo, reaproveitamento de um resíduo, redução do risco de contaminação e não concorrência com outros setores para seu uso, como ocorre com amido de milho, cana-de-açúcar (ZHANG et al., 2017). Por essas razões, o metanol ganhou notoriedade para diversos processos biotecnológicos, como produção de PHAs, aminoácidos, ácidos orgânicos, químicos finos, proteínas e outros produtos químicos (ZHANG et al., 2018b).

2.6.2. Fontes de carbono auxiliares para produção de copolímero

A síntese de P(3HB-co-3HV) tanto pode ocorrer a partir de fontes de carbono estruturalmente relacionadas ao monômero (ácidos, álcoois e alcanos), mas também a partir de outras fontes de carbono não relacionadas estruturalmente (carboidratos), que podem ser metabolizados pela β -oxidação ou biossíntese de novos ácido graxos. As fontes de carbono auxiliares apresentam-se como um dos gargalos para a produção de P(3HB-co-3HV), representando 40% do custo total (CHOI; LEE, 1999). Dentre fontes mais utilizada para a produção desse copolímero estão: ácido propiónico, n-propanol (que são precursores geradores de propionil-CoA) e ácido valérico. Apesar dessas fontes de

carbono apresentarem a vantagem de melhorar o bioplástico produzido, ainda sim apresentam a desvantagem de elevar o custo da produção.

Alguns micro-organismos apresentam a capacidade de gerar P(3HB-co-3HV) a partir de carbonos não relacionados como glicose (ZHANG et al., 2015), ácido cítrico, extrato de carne, ácido acético (ARAMVASH et al., 2016) e soro de queijo (HILLIOU et al., 2016). Ainda há estudos de engenharia metabólica para expandir o espectro de substratos utilizáveis e melhorar a produção de PHAs (MOHANDAS et al., 2017; QIU et al., 2004; TIMM; DAVID; STEINBÜCHEL, 1990)

3. OBJETIVO

Objetivo geral:

- Avaliar a capacidade de produção de copolímeros do tipo P(3HB-co-3HV) por *Methylopila oligitropha* (cepa MCSUBH).

Objetivos específicos:

- Analisar a produção de copolímeros com metanol + co-substratos, com co-alimentação;
- Verificar fatores que influenciam a produção do copolímero: meio de cultura, tempo de cultivo, concentração de co-substrato e nitrogênio;
- Avaliar a eficiência das diferentes estratégias para a produção de copolímeros;
- Estabelecer os fatores de conversão substrato em células ($Y_{x/s}$), conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) e porcentagem de biopolímero em biomassa.

4. METODOLOGIA

4.1. MICRO-ORGANISMO ISOLADO

Neste trabalho, foi utilizado um micro-organismo *Methylopila oligotropha* (número de acesso MH356231.1, resultados do BLAST), Este foi preservado em glicerol (20%) e armazenado em freezer – 80°C. Para os testes iniciais, o micro-organismo foi retirado do estoque e inoculado em Meio4 (M4) e 1% de metanol durante 96 horas e, posteriormente, estriado em placa de Petri contendo M4 sólido e 1% de metanol para constatar a pureza das colônias.

4.2. MEIOS DE CULTIVO TESTADOS

Inicialmente, para entender o comportamento dos micro-organismos em relação ao meio de cultivo, foram testados dois diferentes meios para a produção de PHB, sendo eles: Meio 784 (M784) e M4 (BOURQUE; POMERLEAU; GROLEAU, 1995). Os testes serviram para avaliar o comportamento dos isolados em diferentes concentrações de nitrogênio e sua fórmula molecular ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com $1,5\text{g.L}^{-1}$ e NH_4Cl com $0,5\text{g.L}^{-1}$) com as concentrações iniciais de 1% de metanol, em shaker de bancada à 28°C, sob agitação de 200 rpm. Ambos os cultivos foram mantidos durante 48 horas com meio completo e, após esse período, as células foram centrifugadas por 10 minutos em uma rotação de 5000 rpm e submetidas a um novo meio, agora na ausência de nitrogênio por mais 48 horas com 1% de metanol.

Tabela 2: Composição dos meios de cultivo testados.

Nutriente	Concentração (L ⁻¹)	
	M784	M4
NH₄Cl*	0,5g	----
(NH₄)₂SO₄*	-----	0.5; 1.0 e 1.5g
KH₂PO₄	0,54g	1.305g
K₂HPO₄	0,7g	-----
Na₂HPO₄.7H₂O	-----	4.02g
MgSO₄.7H₂O	1g	1.35g
CaCl₂.2H₂O	0.2g	60mg
FeSO₄.7H₂O	4mg	60mg
MnCl₂.4H₂O	30µg	----
Mn SO₄. H₂O	----	14.7mg
ZnSO₄.7H₂O	100µg	7.8mg
CuSO₄.5H₂O	10µg	-----
CuCl₂.2 H₂O	-----	2.4mg
NiCl₂.6H₂O	20µg	-----
Na₂MoO₄. 2H₂O	60µg	2.4mg
CoCl₂.6 H₂O	200µg	2.4mg
H₃BO₃	300 µg	1.8mg

Fonte: (BOURQUE; POMERLEAU; GROLEAU, 1995)

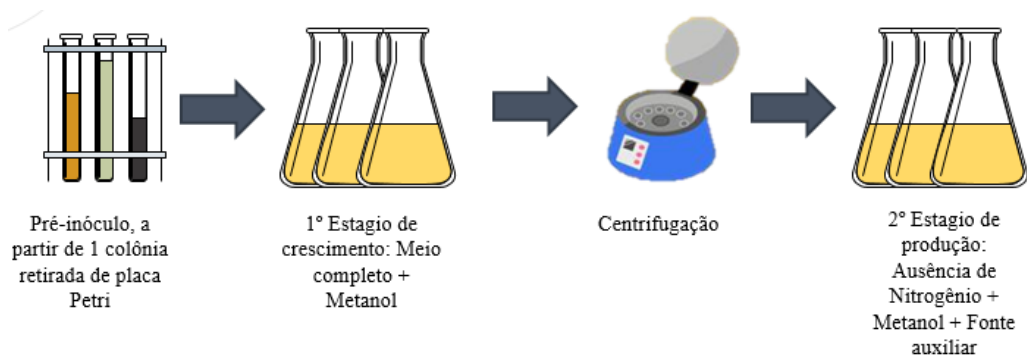
Os meios de cultura sólidos foram obtidos pela adição de ágar (15g/L) à composição do meio líquido. As soluções dos meios de cultura foram esterilizadas em autoclave por 20 min a 121°C, com exceção das soluções não autoclaváveis, as quais foram esterilizadas por meio de filtração 0,22 µm (Millipore).

4.3. ENSAIOS COM *CEPA* MCSUBH

O micro-organismo foi cultivado inicialmente em meio mínimo sólido em placa de Petri, para verificar sua pureza. Retirou-se então, uma colônia da placa para o preparo do pré-inóculo em tubo de polipropileno de 50 mL, ocupando 20% do volume total com M4 e 1% de metanol. Este cultivo foi incubado a 28°C, sob agitação de 200 rpm por 48 horas, em pH 7, ajustados com HCl 1M e NaOH 1M. Após o crescimento, inoculou-se 1 mL em frascos de vidro do tipo Erlenmeyers de 250 mL, sob as mesmas condições descritas.

Para realizar os ensaios de produção dos biopolímeros, o micro-organismo foi inoculado com uma densidade óptica ($D.O_{600nm}$) inicial de 0,1 em M4 completo com 1% metanol. Após x horas, a biomassa foi centrifugada a 5000 rpm, por 10 min e temperatura de 24° C, para então entrar no segundo estágio de cultivo. Para o segundo estágio, foi feita a troca do meio em condições assépticas para um meio em ausência da fonte de nitrogênio e com duas fontes de carbono, sendo o metanol como fonte de carbono principal e variando o co-substrato entre ácido valérico, ácido propiônico, propanol, glicose e ácido cítrico. Este procedimento foi realizado para verificar se o consumo desses substratos estaria relacionado com a produção de biopolímeros. A Figura 8, representa a metodologia realizada nesta etapa.

Figura 8: Representação do cultivo de acúmulo de PHA em M4 com metanol e co-substrato.



Fonte: Acervo pessoal

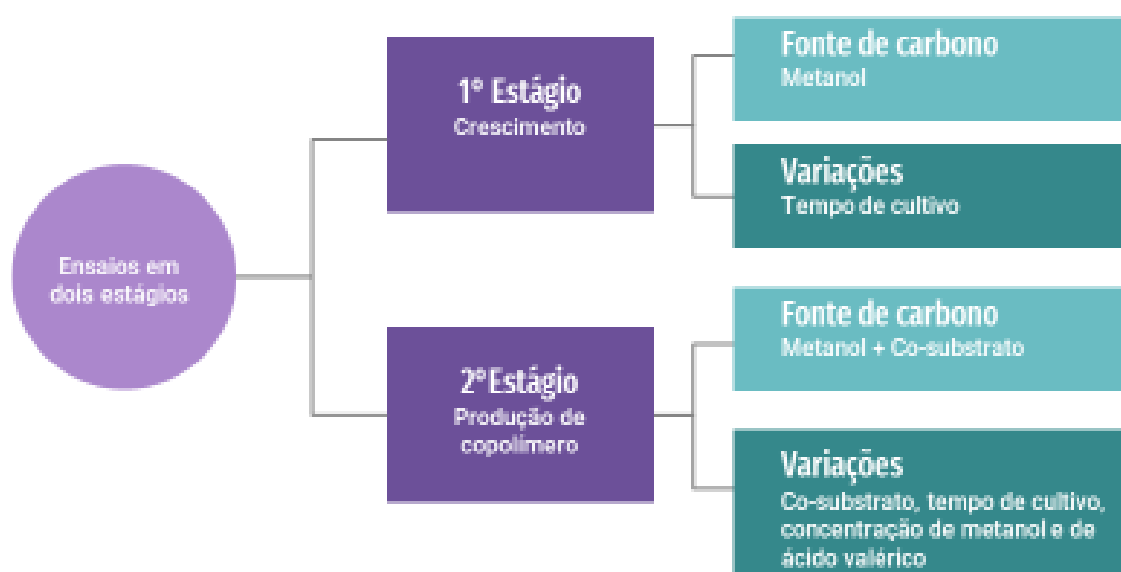
4.4. ENSAIOS EM SHAKER DE BANCADA

Os ensaios foram cultivados em dois estágios, sendo o primeiro estágio de crescimento bacteriano, com adição de nitrogênio e com metanol como fonte de carbono e o segundo com a limitação de nitrogênio, com metanol e mais uma fonte de carbono auxiliar. A fim de determinar o comportamento dos micro-organismos no acúmulo de copolímeros, os ensaios iniciais foram realizados em tempos diferentes. Para isso, considerou-se a fase estacionária da bactéria isolada e a fase log da mesma com o intuito de testar qual seria a melhor fase de acúmulo de PHB. Portanto, analisou-se o crescimento em duas fases em tempos de cultivo diferentes. Amostras do cultivo foram retiradas a cada 4 horas durante o período de 12 horas e para cada tempo foram medidas a densidade óptica das amostras (DO_{600nm}). Ao final do cultivo, os ensaios foram centrifugados por 10 min, 4°C e 8000 rpm para a liofilização e pesagem da biomassa final.

4.5. PRODUÇÃO DE P(3HB-CO-3HV) EM DOIS ESTÁGIOS.

Os ensaios para a produção de P(3HB-co-3HV) foram feitos em dois estágios em meios de cultura diferentes. O primeiro estágio foi realizado com meio de cultura completo, contendo somente uma fonte de carbono e metanol em frascos de vidro de 500 mL. Para o segundo estágio, as células foram centrifugadas a 5000 rpm, por 10 min e à 24°C, e a biomassa resultante foi transferida para um meio sem fonte de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com a adição de dois substratos, sendo 1% de metanol e 0,1% de outra fonte de carbono, como glicose (ZHANG et al., 2015), ácido cítrico (ARAMVASH et al., 2016), ácido valérico, ácido propiônico ou propanol (KIM; KIM; KIM, 1999). Nos ensaios contendo fontes de carbono auxiliares de origem ácida, estas foram previamente neutralizadas com uma solução de NaOH (3N). O fluxograma, Figura 9, representa os ensaios e as suas variações em ambos os estágios.

Figura 9: Fluxograma da representação dos ensaios realizados em dois estágios e as variações, que foram realizadas em cada um dos estágios.



Fonte: Acervo pessoal

4.6. PRODUÇÃO DE P(3HB-CO-3HV) EM UM ESTÁGIO

Para avaliar a influência do nitrogênio, os ensaios foram submetidos a duas concentrações de nitrogênio, sendo testados 0,5 e 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O tempo de cultivo foi estabelecido de acordo com os resultados observados em ensaios anteriores, sendo de 96 horas com base nos resultados do ensaio 48h/48h, onde obtivemos o melhor acúmulo. Já a concentração de metanol, foi estabelecida com base no ensaio 48h/40h, onde a adição

de 2% de metanol, permitiu o melhor acúmulo proporcional do monômero 3HV. Deste modo, o ensaio teve início com 2 % de metanol e após 48 horas acrescentou-se mais metanol, a fim de manter em 2%, além da adição de 0,1% de ácido valérico.

As amostras do cultivo foram retiradas a cada 4 horas até o término do ensaio e para cada tempo foram medidas a densidade óptica das amostras (DO_{600nm}) e a quantificação do consumo do metanol e do ácido valérico. A cada 24h, os ensaios foram centrifugados por 10 min, 4°C e 8000 rpm para a liofilização e pesagem da biomassa e medição do pH.

4.7. ANÁLISE GRAVIMÉTRICA DA BIOMASSA

O protocolo de extração de P (3HB-co-3HV) (LEMECHKO; FELLIC; BRUZAUD, 2019) realizado nesse trabalho foi feito após o término dos ensaios, onde as células foram centrifugadas por 10 minutos, 5000 rpm e 4° C e lavadas com água destilada e centrifugadas novamente nas mesmas condições, a fim de diminuir os resíduos inorgânicos polares proveniente do meio de cultivo. Após essa etapa, as amostras foram preenchidas com água destilada e colocadas em uma temperatura -80°C para posterior liofilização. As células liofilizadas foram transferidas ao tubo de ensaio e à elas adicionou-se clorofórmio na proporção de 1g para 50 mL. Estas então, foram colocadas na estufa por 24 horas à 60°C. Após este período adicionou-se 10 mL de água, homogeneizou-se por 30 segundos e então centrifugou-se por 10 minutos a 8000 rpm e 24°C para promover uma separação de fases e extrair o biopolímero. Com uma seringa de vidro retirou-se a fase inferior e filtrou-se em membranas de 0,22 µm RC (Millipore) em uma placa de vidro. A massa da extração adquirida foi relacionada com a massa pesada.

4.8. QUANTIFICAÇÃO DE P (3HB-CO-3HV).

Para quantificar a produção de P (3HB-co-3HV) foi realizada a propanólise (RIIS; MAI, 1988). Para isso, pesou-se a biomassa liofilizada dos ensaios realizados e adicionou-se 100 µL de ácido benzóico (40 mg/mL) em n-propanol. Nos tubos de ensaio, adicionou-se 2 mL de 1,2-dicloroetano e 2 mL de HCl + n-propanol em uma proporção de 4:1. Homogeneizou-se a solução e então colocou-se no banho-maria a 98°C por 3 horas. Após o término do período, adicionou-se 4 mL de água destilada, homogeneizou-

se novamente por 30 segundos e centrifugou-se à 2000 rpm por 2 min. Então houve a remoção da fase superior e ocorreu uma segunda lavagem adicionando-se 4 mL de água destilada. Posteriormente ao momento de decantação, os tubos foram centrifugados e a fase superior foi removida. Para finalização da amostra adicionou-se sulfato de sódio anidro para retirar o excesso de água. Acertou-se o pH entre o intervalo de 5 a 7. As amostras foram então analisadas por cromatografia gasosa. O volume de 1 μ L da amostra foi analisado em cromatógrafo gasoso HP7890A Series GC System equipado com uma coluna HP-5. Nas seguintes condições:

Gás de arraste: Nitrogênio (0,6 mL/min)

Temperatura do injetor: 250°C.

Temperatura do detector: 300°C

Sistema de detecção: ionização de chama (FID)

Programa de temperaturas do forno: 100°C por 3 minutos (6°C/min), elevação da temperatura até 180°C por 5 minutos (6°C/min) e até 240°C por 1 minutos.

4.9. QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTRATOS.

Os substratos analisados foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu, Japão). Os compostos foram separados por uma coluna de exclusão iônica (Biorad, modelo Aminex HPX - 87H, EUA) com uma fase móvel de solução de H₂SO₄ (5mM) a uma vazão de 0,7 mL/min. A detecção foi realizada por detector de arranjo de diodos (PDA) em 208 nm. Para cada composto foi gerado uma curva de calibração com diferentes concentrações de: ácido valérico (0,01 a 1 %), ácido cítrico (0,01 a 1%) e propanol (0,025 a 2%).

4.10. RELAÇÃO DE SUBSTRATO EM CÉLULAS (M), E FATORES DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM PRODUTO ($Y_{3HV/SUBSTRATO}$ E $Y_{PHA/S+S1}$)

Para avaliar a relação da biomassa produzida total em PHA e a produção de 3HV nos ensaios, foram realizados os cálculos matemáticos detalhados a seguir: a equação 1, relaciona a conversão de PHA em biomassa na célula. Em relação a taxa de conversão de produção de 3HV, a partir do substrato, foi utilizada a equação 2; e a taxa de conversão de produção total de PHA a partir dos substratos e co-substratos, foi calculada pela equação 3.

Fração da massa m de PHA (gramas) em Biomassa (gramas):

$$m = \frac{PHA}{Biomassa} \quad (1)$$

Taxa de conversão de produção de 3HV a partir do co-substrato, ácido valérico, consumido.

$$Y_{\frac{3HV}{Substrato}} = \frac{Produção\ de\ 3HV\ [g.L^{-1}]}{Substrato\ consumido\ [g.L^{-1}]} \quad (2)$$

Taxa de conversão de produção de PHA a partir dos substratos (metanol) (S) e do co-substratos (ácido valérico) (S₁) consumidos

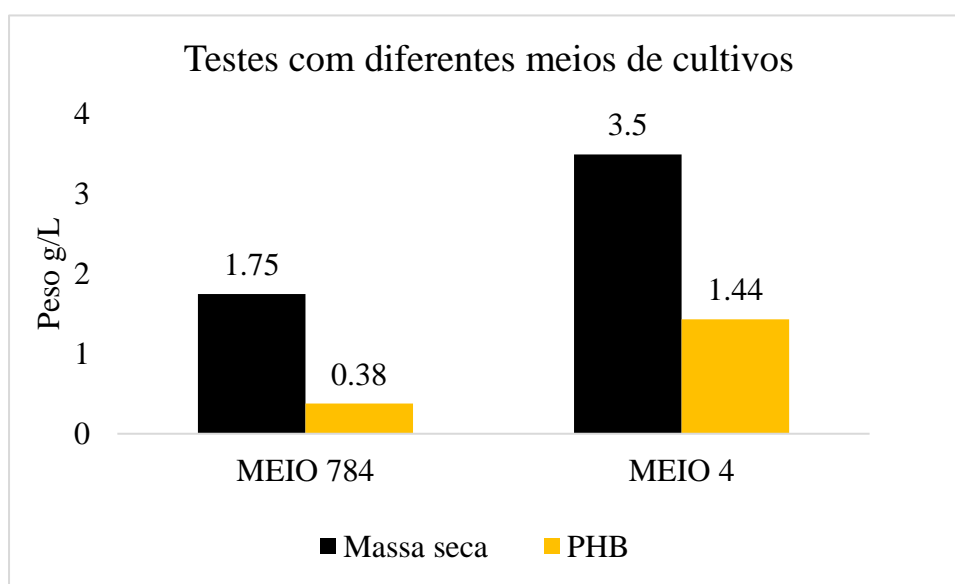
$$Y_{\frac{PHA}{S+S_1}} = \frac{Produção\ de\ PHA\ [g.L^{-1}]}{S+S_1} \quad (3)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ACÚMULO DE PHB DA CEPA MCSUBH

Em trabalhos anteriores realizados com a espécie *Methylopila* foi comprovada a capacidade desta em acumular PHB (DORONINA et al., 2000; LI et al., 2011). Esta capacidade também foi evidenciada quando a cepa foi cultivada sob condições de estresse, em meio de cultivo sem nitrogênio e com excesso de carbono (KAROLSKI et al., 2018). No entanto, a fim de aumentar a quantidade de biomassa e otimizar as condições de acúmulo, neste trabalho foram testados dois meios de culturas diferentes, descritos anteriormente, usando metanol como principal fonte de carbono. A Figura 10 ilustra o rendimento da biomassa e a massa de PHB medidos por gravimetria.

Figura 10: Teste com diferentes meios de cultivo para a produção de PHB para a cepa MCSUBH



Os resultados obtidos mostram o acúmulo de PHB nas condições testadas, sendo que para o M784 este acúmulo foi de 0,38 g.L⁻¹ (21,75%) em relação à massa seca e para o M4 foi de 1,44 g.L⁻¹(41%). Na literatura, para o M784 em frascos agitados, o acúmulo está na faixa de 20% à 40% para outras bactérias metilotróficas (BOURQUE D, OUELLETTE B, ANDRÉ G, 1992) e de 40% a 60% para o M4 (BOURQUE; POMERLEAU; GROLEAU, 1995). Para a espécie estudada, os resultados demonstraram que houve um melhor rendimento, quando as células foram cultivadas em M4, tanto para

a produção de biomassa, que pode ser explicada pela concentração maior de nitrogênio presente no meio, mas também obteve uma acúmulo maior de PHB. Deste modo, o meio M4 foi escolhido para os ensaios posteriores, a fim de testar as diferentes fontes de carbono para a produção do copolímero.

5.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ACÚMULO DE COPOLÍMERO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Para avaliar o potencial da *cepa* MCSUBH em produzir o copolímero P(3HB-*co*-HV) foram testadas diferentes fontes de carbono, sendo estas: propanol, ácido cítrico, ácido propiônico e ácido valérico, com concentração de 0,1%, nas condições descritas anteriormente. Estes resultados estão descritos na Tabela 3, em relação ao consumo do substrato, co-substrato e produção de massa seca celular (MSC). O primeiro substrato testado foi o ácido valérico, onde foi observado que durante o crescimento do micro-organismo houve o consumo de 0,27% de metanol na primeira fase. Já na segunda fase, o consumo médio de metanol foi 0,62% e ácido valérico 0,02%. Na literatura, o co-substrato analisado é relatado como um dos precursores para a síntese de P(3HB-*co*-HV) em bactérias metilotróficas, sendo que o rendimento com a limitação de nitrogênio da MSC variava de 0,7 a 1,4 g.L⁻¹ (KIM; KIM; KIM, 1999; ORITA et al., 2014), enquanto que no presente trabalho o rendimento foi de 2,21 g/L de MSC, com concentração inicial de 1,5g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄.

Outro substrato analisado foi o propanol, nas mesmas condições e concentrações do ensaio descrito anteriormente. Durante o crescimento do micro-organismo, o consumo de metanol foi de 0,28% na primeira fase, mas pode-se observar que houve consumo médio tanto de metanol (0,76%) como de propanol (0,061%). Não há relatos na literatura da média consumida de propanol nos ensaios de produção de P(3HB-*co*-HV) por bactérias metilotróficas, embora haja relatos do uso dessa fonte de carbono (KIM; KIM; KIM, 1999; PATEL; HOU; FELIX, 1978). Nesta condição, o resultado para a MSC foi de 3,71 g/L, uma quantidade maior quando comparado ao ensaio anterior, no entanto a produção foi somente de PHB.

Quando cultivado em glicose, o micro-organismo consumiu 0,5% do metanol na primeira fase, mas pode-se observar que no segundo estágio houve consumo médio tanto de metanol 0,48% como de glicose. A produção de MSC para esse ensaio foi de 2,78 g/L.

O ácido propiônico é uma das fontes mais utilizadas para produção de P(3HB-co-HV) por bactérias. Para esse substrato houve consumo de 0,5% metanol na primeira fase, mas pode-se observar que no segundo estágio houve consumo médio de ácido propiônico (0,04%) e a produção de MSC foi de 2,96 g/L.

Os resultados descritos na Tabela 3, demonstram que houve produção de copolímero somente na presença de ácido valérico, o que sugere um efeito inibitório tanto para o crescimento celular, quanto para produção de biopolímero. No entanto, apesar do ácido propiônico ser um dos co-substratos mais comuns para a produção de P(3HB-co-3HV) (GOMEZ et al., 1996; MARANGONI; FURIGO; DE ARAGÃO, 2002; VILLANO et al., 2014), para bactérias metilotróficas, sem modificação genética, o ácido valérico é relatado como precursor do monômero 3HV (KIM; KIM; KIM, 1999; YEZZA et al., 2006). No trabalho de KIM; KIM; KIM, 1999, houve uma produção de 24% de PHA, porém com uma porcentagem 3HV mol% maior. Embora as outras fontes de carbono auxiliares não tenham incorporado o 3HV em seu grânulo, pôde-se constatar que foram consumidas e produziram um acúmulo de PHB, sendo que a glicose (50,29%) e o ácido propiônico (49,56%) proporcionaram maiores porcentagens desse biopolímero, com resultados que mostram valores entre 20-53%. Ainda, vale ressaltar que o micro-organismo apresentou um acúmulo de 41%, quando submetido apenas a uma fonte de carbono (metanol), em condições não otimizadas, o que demonstra o potencial para a produção de PHB.

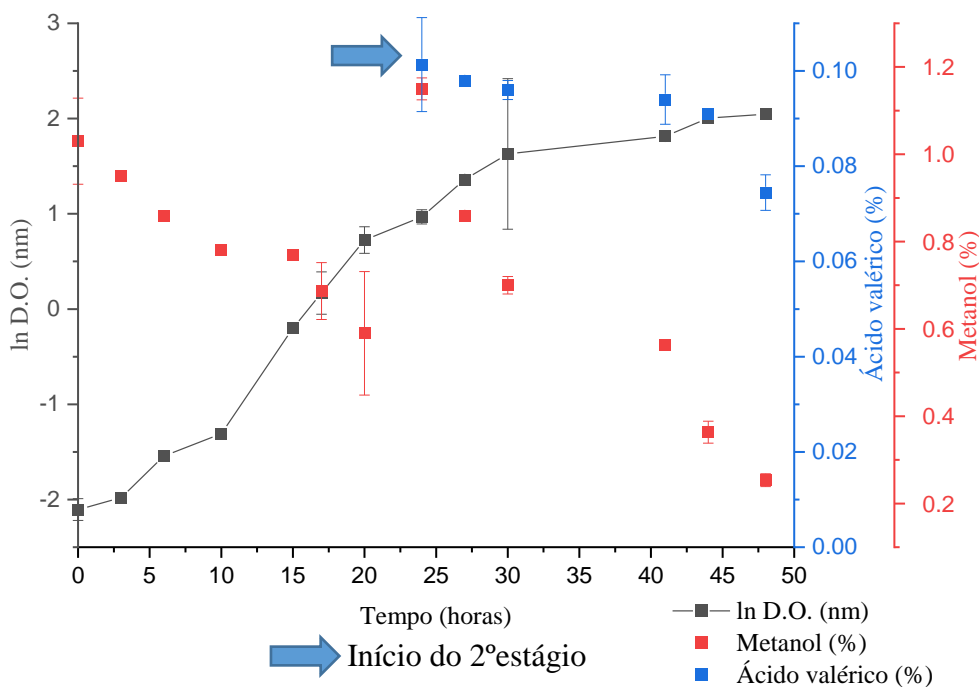
Tabela 3: Consumo de substrato e co-substrato na segunda etapa de produção de PHA pela cepa MCSUBH, com concentração inicial de 1,5g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. Produção de MSC, após a finalização dos ensaios. Produção de PHA a partir do micro-organismo cepa MCSUBH com diferentes substratos analisados.

Co-substrato	Consumo do metanol (2º estágio)	Consumo do co-substrato	% PHA	3HB mol%	3HV % mol	MSC g/L
Ácido Valérico	0,62 ± 0,01	0,02 ± 0,01	34,41 ± 0,62	93,87 ± 0,06	6,18 ± 0,06	2,21 ± 0,01
Propanol	0,76 ± 0,05	0,06 ± 0,001	49,56 ± 5,37	100,00 ± 0,06	0,00 ± 0,00	3,71 ± 0,20
Glicose	0,48 ± 0,02	ND	50,29 ± 0,32	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,78 ± 0,10
Ácido propiônico	ND	0,04 ± 0,01	41,34 ± 3,30	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,96 ± 0,30
Ácido cítrico	0,50 ± 0,01	0,03 ± 0,01	45,30 ± 0,96	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,90 ± 0,01

5.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE P(3HB-co-3HV) A PARTIR DAS VARIAÇÕES DE TEMPO.

Para avaliar o potencial, em relação ao tempo de fermentação, da *cepa* MCSUBH em produzir o copolímero P(3HB-co-HV) e a influência sobre o acúmulo e a fração de 3HV nele incorporado, foram testados diferentes tempos de cultivo em ambas as fases. Os tempos de produção podem ser uma alternativa estratégica em relação a fonte de carbono, considerada um dos gargalos da produção de biopolímeros (LU; TAPPEL; NOMURA, 2009). Todos os ensaios continham as mesmas concentrações de fonte de carbono sendo, 1% de metanol na fase de crescimento e produção e 0,1% de ácido valérico na segunda fase. O ensaio com ácido valérico, descrito anteriormente, está repetido na Tabela 3, descrito como 24h/24h e representado na Figura 11, em relação ao crescimento (ln D.O.), consumo de metanol e ácido valérico.

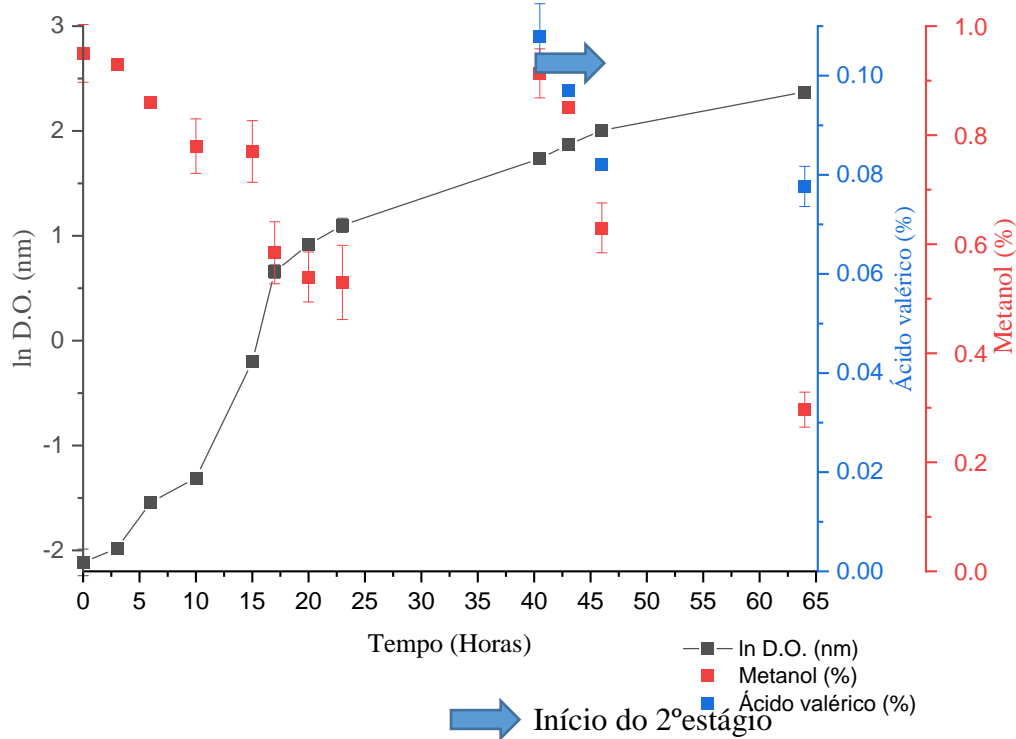
Figura 11: Crescimento celular, consumo de metanol e ácido valérico para a produção de P(3HB-co-3HV) em duas etapas. A primeira etapa com 24 horas de cultivo e adição de metanol e a segunda etapa, com a renovação do meio sem nitrogênio, com a adição de metanol e ácido valérico, por mais 24 horas



Para melhor comparação dos resultados em relação ao tempo, outro ensaio de 40h/24h, representado na Figura 12, foi realizado com tempo de cultivo de 40 horas (na primeira etapa), onde teve um consumo de 0,40% de metanol. Na troca do meio com a limitação

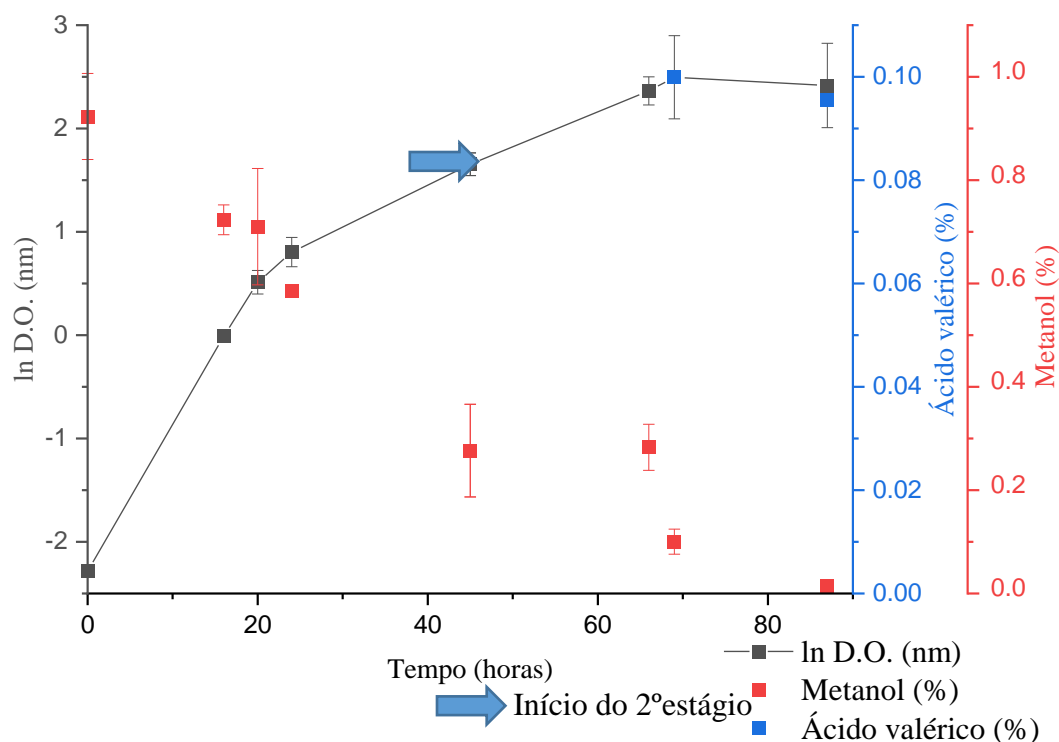
de nitrogênio, o tempo de cultivo foi de 24 horas, sendo o consumo de ácido valérico de 0,03% e de metanol de 0,62%. A quantidade de MSC foi de 2,89 g/L.

Figura 12: Crescimento celular, consumo de metanol e ácido valérico para a produção de P(3HB-co-3HV) em duas etapas. A primeira etapa com 40 horas de cultivo e adição de metanol e a segunda etapa com a renovação do meio sem nitrogênio, com a adição de metanol e ácido valérico, por mais 24 horas.



O ensaio 48h/48h, representado na Figura 13, foi realizado com o ácido valérico, onde a fase de crescimento foi de 48 horas e após esse período houve a troca de meio com a limitação de nitrogênio com metanol durante 24 horas e, após 24 horas do início da segunda etapa adicionou-se o ácido valérico. Nesse ensaio, o consumo de metanol na fase de crescimento foi de 0,38%. Porém, na fase de produção houve um consumo de 0,9% do metanol e um consumo de 0,005% de ácido valérico, tal comportamento pode ser explicado, pois a bactéria tem uma preferência por consumir um substrato mais simples o metanol.

Figura 13: Crescimento celular, consumo de metanol e ácido valérico para a produção de P(3HB-co-3HV) em duas etapas. A primeira etapa com 48 horas de cultivo e adição de metanol e a segunda etapa com 48 horas de cultivo com adição de metanol e ácido valérico, com limitação de nitrogênio. As amostras foram monitoradas em relação ao crescimento celular (espectrofotômetro) e consumo de substrato (HPLC).



Nos resultados, apresentados na Tabela 4, obtidos a partir da propanólise, pôde-se constatar que o maior consumo do metanol ocorreu no ensaio 48h/48h, com a maior produção (48,71%) de P(3HB-co-3HV) quando comparado aos ensaios deste trabalho e aos relatos na literatura 8,4-30% (ORITA et al., 2014; YEZZA et al., 2006). O ensaio 24h/24h apresentou proporções semelhantes de incorporação de 3HV, porém com um menor acúmulo do copolímero, o que sugere que a presença de ácido valérico para o micro-organismo pode apresentar um efeito inibitório para o acúmulo. O ensaio de 40h/24h teve uma menor porcentagem de biopolímero, quando comparado os outros dois ensaios, contudo uma maior incorporação de 3HV. Diferentes configuração do bioprocessos podem representar uma alternativa para o uso de outras fontes de carbono, uma vez que disponibilizando um tempo maior de consumo do substrato metanol, houve uma produção maior de biopolímero, para os ensaios realizados.

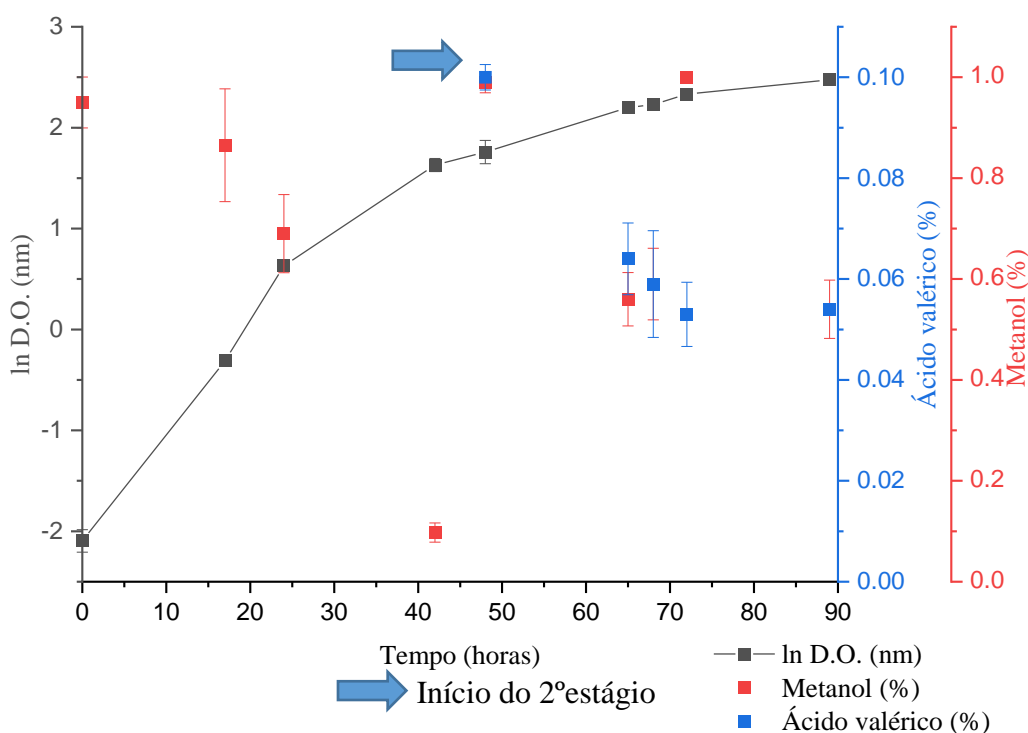
Tabela 4: Produção de PHA a partir do cepa com diferentes tempos analisados.

Condições	% P(3HB-co-3HV)	3HB mol%	3HV mol%
Ensaio 24h/24h	34,41 ± 0,62	93,82 ± 0,06	6,18 ± 0,06
Ensaio 40h/24h	27,04 ± 0,97	88,32 ± 0,56	11,68 ± 0,56
Ensaio 48h/48h	48,71 ± 4,64	94,95 ± 0,22	5,05 ± 0,22

5.4. MODIFICAÇÕES NA CONCENTRAÇÃO DE METANOL E TEMPO DE ENSAIO

Ainda em relação aos tempos de ensaio, foram testadas diferentes produções de biopolímeros com diferentes concentrações de metanol. No primeiro ensaio, representado na Figura 14, o consumo de metanol na segunda etapa foi de 0,86% e 0,054% de ácido valérico, com a produção de MSC de 3,3g/L.

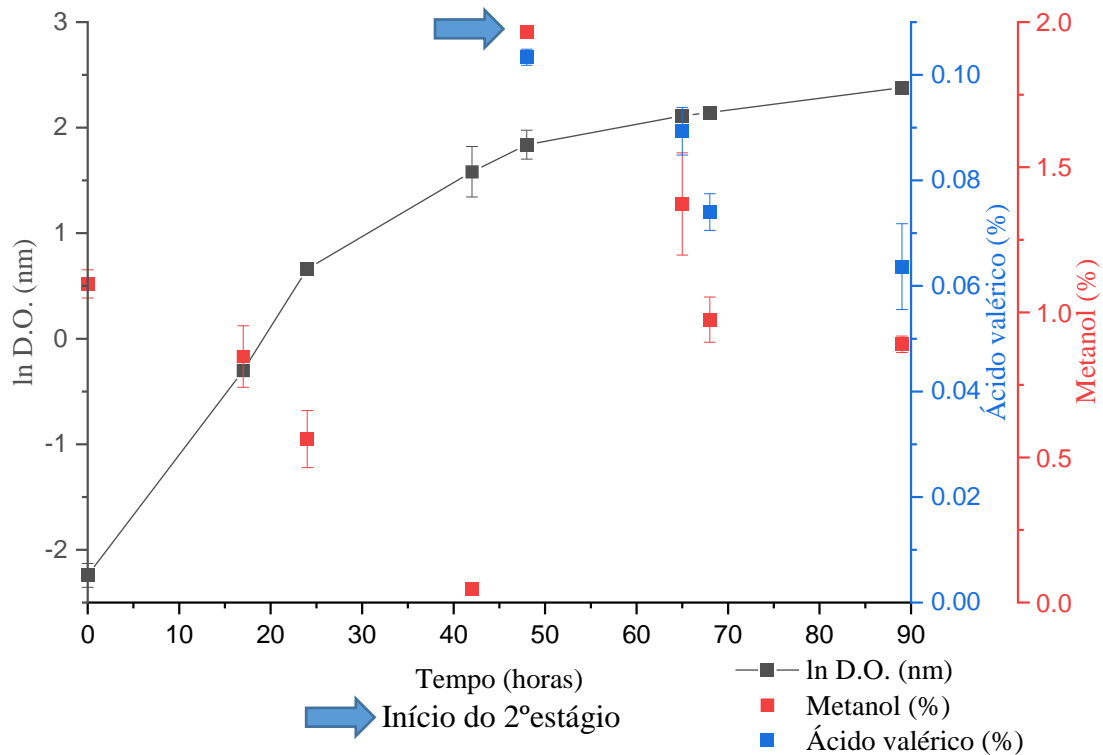
Figura 14: Crescimento celular, consumo de metanol e ácido valérico para a produção de P(3HB-co-3HV) em duas etapas. A primeira etapa, com 48 horas de crescimento e o consumo do substrato metanol. A segunda etapa demonstra o consumo de metanol e do co-substrato ácido valérico, com 40 horas de produção, sendo que após 24 horas foi complementado 1% de metanol.



Ainda assim, com as mesmas condições de pH, rotação e temperatura testadas em duas etapas. O ensaio, representado pela Figura 15, nas primeiras 48 horas (primeira

etapa) foi cultivado com 1% de metanol. Após a troca do meio, no segundo estágio, foi acrescido 2% de metanol com 0,1% de ácido valérico. Com um consumo de 1,06% de metanol e 0,036% de ácido valérico com a produção de biomassa de 3,23 g/L.

Figura 15: Crescimento celular com os substratos metanol e ácido valérico. Em 48 horas de crescimento de 40 horas de produção, com 2% de metanol e 0,1% de ácido valérico.



Com o aumento no tempo de cultivo, a concentração de PHA total diminuiu em relação aos outros ensaios conforme demonstra a Tabela 5, porém com o aumento da concentração de metanol e, portanto, o maior consumo de metanol e apresentou a maior produção de P(3HB-co-3HV) em relação a MSC, ainda é importante ressaltar que houve um aumento da fração de 3HV.

Tabela 5: Produção de PHA pela *cepa* MCSUBH com diferentes tempos analisados e concentrações de metanol

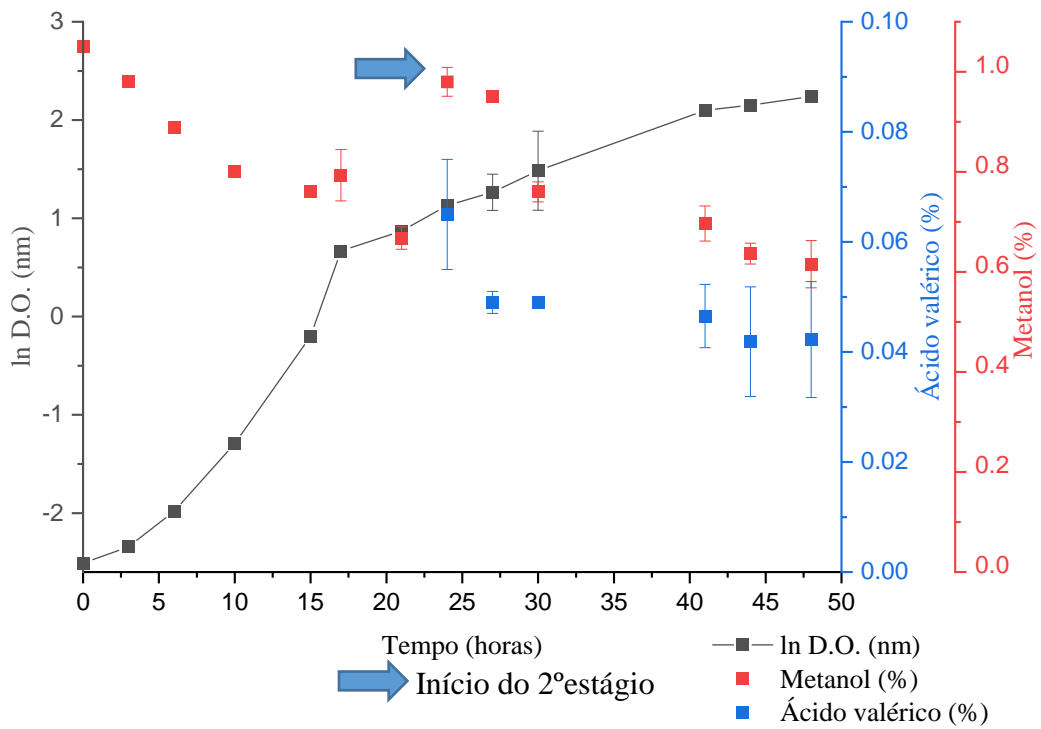
Condições	% P(3HB-co-3HV)	3HB mol%	3HV mol%
48h/40h - Com 1% e após 20h 1% de metanol	25,05 ± 1,34	78,77 ± 0,22	21,23 ± 0,22
48h/40h - Com 2% de Metanol	25,17 ± 2,02	79,14 ± 0,72	20,86 ± 0,72

5.5. MODIFICAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO VALÉRICO

Com o objetivo de avaliar o potencial da bactéria em produzir o copolímero HV em maiores concentrações molares à cadeia polimérica de HB, foram realizados experimentos com diferentes proporções de ácido valérico. No intuito de avaliar a quantidade e o teor de P(3HB-co-HV), as combinações preliminares que foram construídas (KIM; KIM; KIM, 1999) variaram entre 0,05%, 0,1% (já descrita) e 0,3% de ácido valérico.

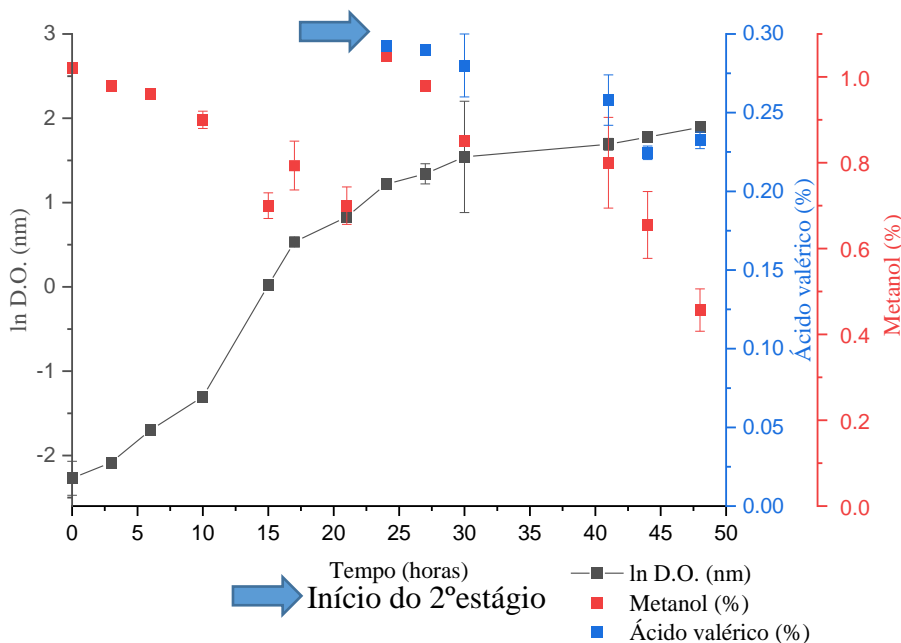
Os cultivos de MCSUBH foram realizados em dois estágios de crescimento, sendo 24 h de cultivo com o meio completo e após 24 h houve a troca do meio sem a disposição de nitrogênio para o acúmulo de PHA. Nessa etapa ocorreram variações do co-substrato, mantendo-se o metanol a 1% e variando a concentração de ácido valérico a 0,05%. Pode-se observar na Figura 16, que o consumo de ácido valérico foi de 0,013%, menor consumo de metanol de 0,31%. No entanto, a produção de biomassa foi de 2,27g/L, maior do que quando comparada a 0,1% de ácido valérico.

Figura 16: Crescimento celular com os substratos 1% de metanol e 0,05% ácido valérico.



Outra concentração testada, nas mesmas condições do ensaio anterior, foi mantendo-se o metanol a 1% e variando-se a concentração de ácido valérico a 0,30%. Pode-se observar na Figura 17, que o consumo de ácido valérico foi de 0,06%, menor consumo desse e metanol de 0,50%. Contudo, a produção de biomassa foi de 1,68g/L, menor do que quando comparada a 0,05% e 0,1% de ácido valérico.

Figura 17: Crescimento celular com os substratos 1% de metanol e 0,3% de ácido valérico.



Contudo, com uma concentração fixa de 1% de metanol nas duas fases, foi possível observar o efeito do ácido valérico em promover o acúmulo de frações de 3HV. A Tabela 6 apresenta os valores das três concentrações testadas, onde pode-se constatar que com o aumento da concentração do co-substrato houve um declínio na porcentagem do biopolímero total. Em contrapartida, houve um aumento na fração molar de 3HV, chegando a 10,83%.

Tabela 6: Produção de PHA pela cepa MCSUBH em diferentes concentrações de ácido valérico.

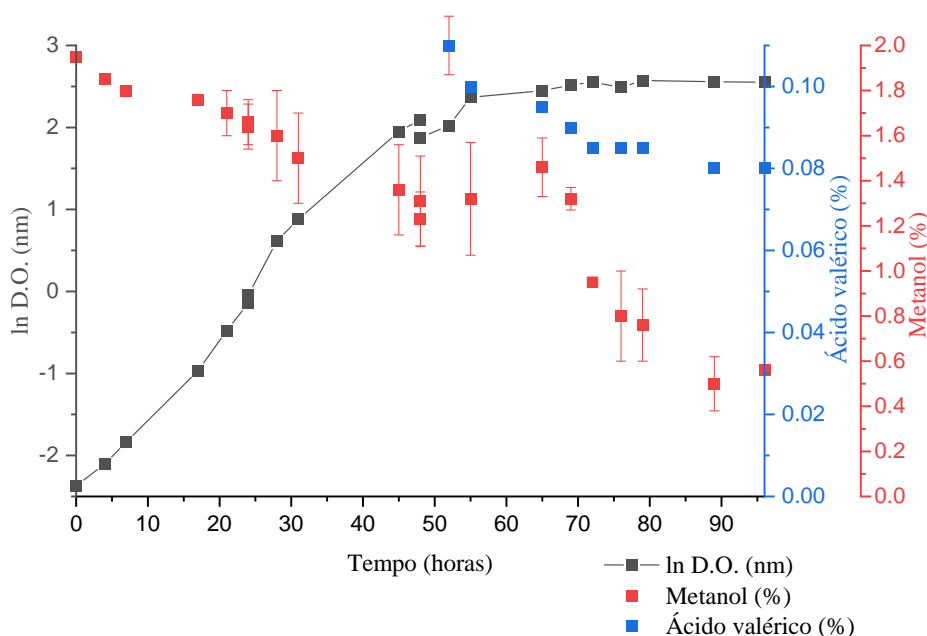
Concentração de ácido valérico	% P(3HB-co-3HV)	3HB mol%	3HV mol %
0,05	37,34 ± 2,03	97,24 ± 0,17	2,76 ± 0,17
0,10	34,41 ± 0,62	93,82 ± 0,06	6,18 ± 0,06
0,30	29,00 ± 2,57	89,18 ± 0,55	10,83 ± 0,55

5.6. PRODUÇÃO DE P(3HB-CO-3HV) EM UM ESTÁGIO.

O ensaio em um estágio com a cepa MCSUBH, foi realizado em frascos agitados, como descrito na metodologia (item 4.5), com o objetivo de diminuir o custo do processo com a troca de meio. Foram observadas as melhores condições de cultivo com relação aos ensaios em dois estágios, sendo considerado o ensaio com a melhor concentração de

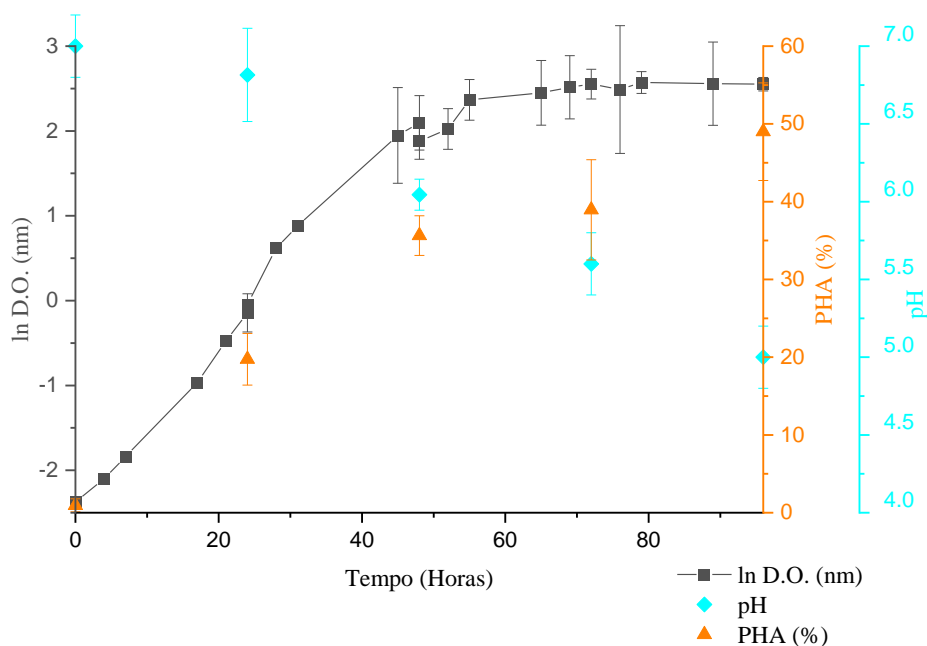
metanol (2%), que proporcionou uma maior produção de P(3HB-co-3HV) em relação a massa seca e o melhor rendimento da fração molar 3HV com a concentração de ácido valérico de 0,1%. Tais observações estão relatadas nos ensaios 48h/48h para a melhor produção de biopolímero e nos ensaios 48h/40h para o melhor rendimento de incorporação do monômero 3HV. A Figura 18, mostra o ensaio com a concentração de 0,5 g.L⁻¹ de nitrogênio, ilustrando comportamento do micro-organismo em relação ao consumo do metanol e ácido valérico. Pode-se observar que o consumo de ácido valérico foi de 0,034% e metanol de 2,16%. Contudo, a produção de biomassa foi de 2,78 g.L⁻¹.

Figura 18: Crescimento celular com os seguintes substratos metanol e ácido valérico. Em 96 horas de cultivo com, após 48 horas de cultivo foram complementados 2% de metanol e 0,1% de ácido valérico em 0,5 (g.L-1) de nitrogênio.



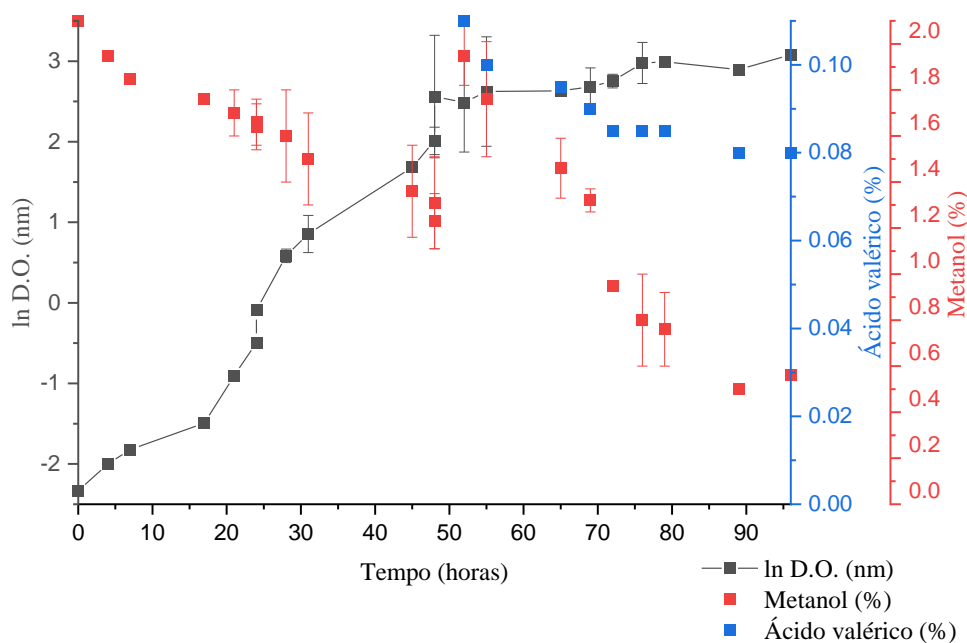
A Figura 19 ilustra o comportamento da cepa com relação ao pH, crescimento celular e produção de PHA, para as mesmas condições descritas anteriormente. É possível verificar o decaimento de pH, o que é relatado na literatura e está associado a mesma via metabólica para a produção de biopolímero. Ao final do ensaio, a produção chega a 49% de produção de P(3HB-co-3HV). Pelos ensaios realizados, foi possível observar que a produção de copolímero inicia com a introdução do co-substrato, formando PHB após 24 horas do início do ensaio.

Figura 19: Crescimento celular, pH e PHA (0h,24h,72h e 96h). Com 96 horas de cultivo, após 48 horas de cultivo foram complementados 2% de metanol e 0,1% de ácido valérico, em 0,5 (g.L⁻¹) de nitrogênio



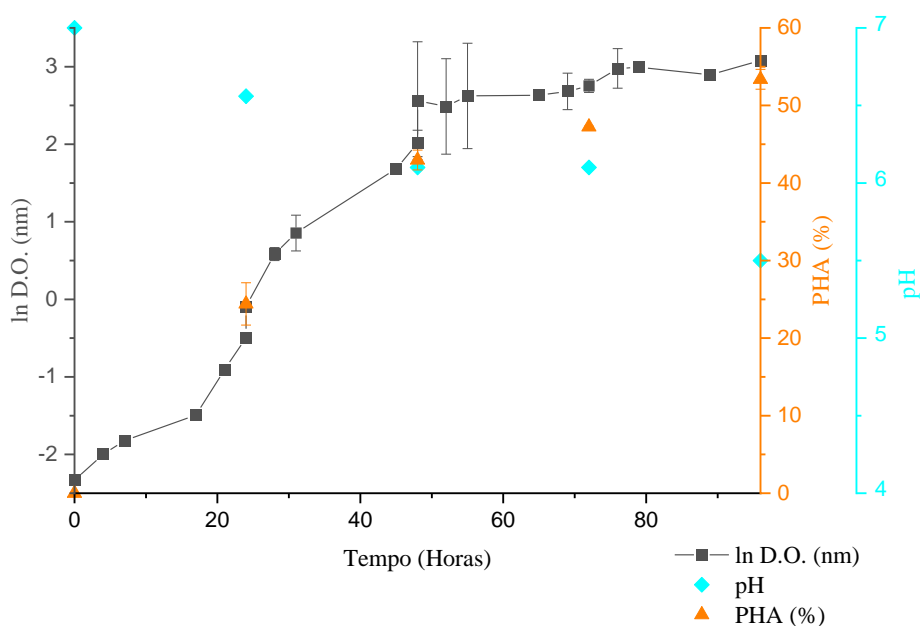
No ensaio de um estágio, em frascos agitados sem ajustes de condições físico-químicas, descrito na metodologia (item 4.5), a Figura 20 mostra o comportamento do micro-organismo em relação ao consumo do metanol e ácido valérico. Pôde-se observar que o consumo de ácido valérico foi de 0,039% e metanol de 2,26%, contudo, a produção de biomassa foi de 4,53 g.L⁻¹, maior do que quando comparada ao ensaio anterior (0,5 g.L⁻¹ de nitrogênio) e está relacionada com a maior produção de biomassa durante o cultivo, pela maior disponibilização de nitrogênio. Com a maior concentração de nitrogênio (1,5 g.L⁻¹), em dois estágios, não foi possível chegar na fase estacionária pela limitação de nitrogênio e o excesso da fonte de carbono. No entanto quando se diminui a concentração de nitrogênio foi possível observar a entrada na fase estacionária e o acúmulo de PHB após 24 horas. Após a adição de ácido valérico iniciou-se a incorporação do monômero 3HV ao copolímero. Também é possível observar que a concentração de nitrogênio não altera significativamente a produção de PHA, como já descrito para outros gêneros(KUMAR et al., 2015), mas os resultados mostram que ele interfere na produção de biomassa.

Figura 20: Crescimento celular com os seguintes substratos metanol e ácido valérico. Em 96 horas de cultivo com, após 48 horas de cultivo foram complementados 2% de metanol e 0,1% de ácido valérico, em 1(g.L-1) de nitrogênio.



A Figura 21 ilustra o comportamento da cepa com relação ao pH, crescimento celular e produção de PHA. É possível verificar o decaimento de pH e ao final do ensaio a produção chega a 53,38% de produção de P(3HB-co-3HV). Pelos ensaios realizados, foi possível observar que a produção de copolímero iniciou-se com a introdução do co-substrato, e após 24 horas houve formação de PHB, chegando a 24% da biomassa.

Figura 21: Crescimento celular, pH e PHA (0h,24h,72h e 96h). Com 96 horas de cultivo, após 48 horas de cultivo foram complementados 2% de metanol e 0,1% de ácido valérico, em 1 (g.L⁻¹) de nitrogênio.



A partir dos resultados da Tabela 7, foi possível verificar que a produção de PHA iniciou-se após 24 horas para as duas concentrações de nitrogênio, contudo caracterizado somente como PHB, já que não houve o co-substrato indutor. Com o decorrer do tempo, observou-se um aumento da produção de biopolímero, como é possível verificar em outros relatos na literatura (CARDOSO et al., 2020; YEZZA et al., 2006). Entretanto, a formação do monômero 3HV ocorre a partir de 48 horas, com a adição de 0,1% de ácido valérico, variando a fração molar entre 1,86-2,78 no término do ensaio.

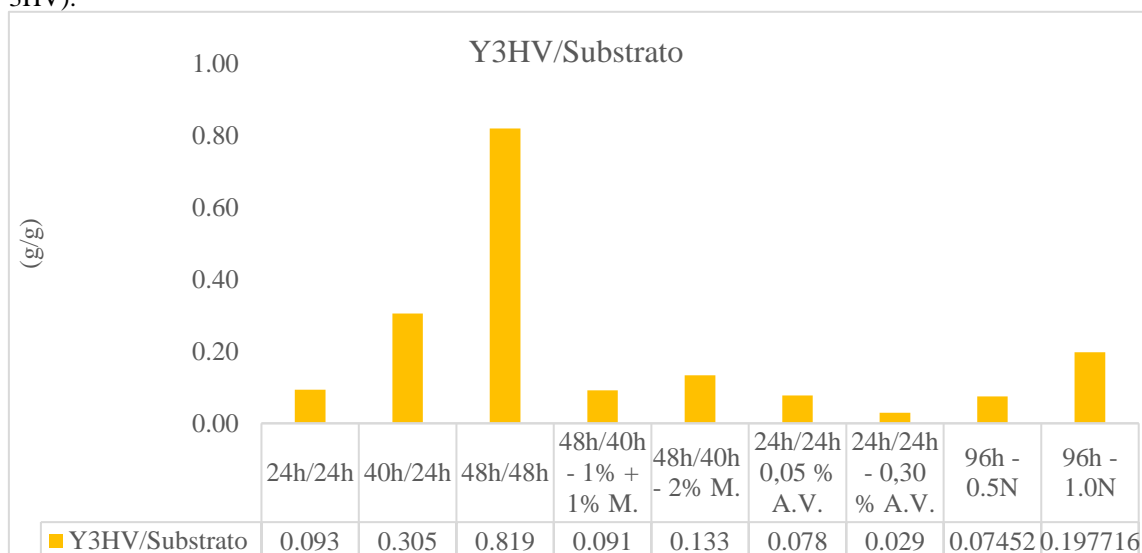
Tabela 7: Produção de PHA a partir da cepa MCSUBH diferentes concentrações de nitrogênio.

Concentração de nitrogênio	Tempo	% P(3HB-co-3HV)	3HB mol%	3HV % mol
0,5 (g.L ⁻¹) de nitrogênio	0	0,95 ± 0,84	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	24	19,74 ± 3,32	99,93 ± 0,06	0,07 ± 0,06
	48	35,64 ± 2,54	99,72 ± 0,01	0,28 ± 0,01
	72	47,84 ± 1,55	99,43 ± 0,03	0,57 ± 0,03
	96	49,00 ± 6,28	98,14 ± 0,09	1,86 ± 0,09
1,0 (g.L ⁻¹) de nitrogênio	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	24	24,41 ± 2,73	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	48	42,96 ± 1,28	98,64 ± 0,02	1,36 ± 0,02
	72	47,24 ± 0,09	99,43 ± 0,03	1,57 ± 0,03
	96	53,38 ± 1,28	97,22 ± 0,19	2,78 ± 0,19

5.7. CONVERSÃO DO SUBSTRATO EM CÉLULA E CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM PRODUTO EM DOIS ESTÁGIOS

A quantificação da conversão do substrato em célula, foi calculada a partir das fórmulas já descritas, através do consumo de metanol e ácido valérico, que foram responsáveis pela produção do copolímero. Os resultados demonstrados na Figura 22, ilustram a conversão do substrato consumido (ácido valérico) no monômero 3HV, onde pode-se constatar que o melhor resultado de conversão foi no ensaio de 48h/48h, que teve a maior porcentagem de acúmulo.

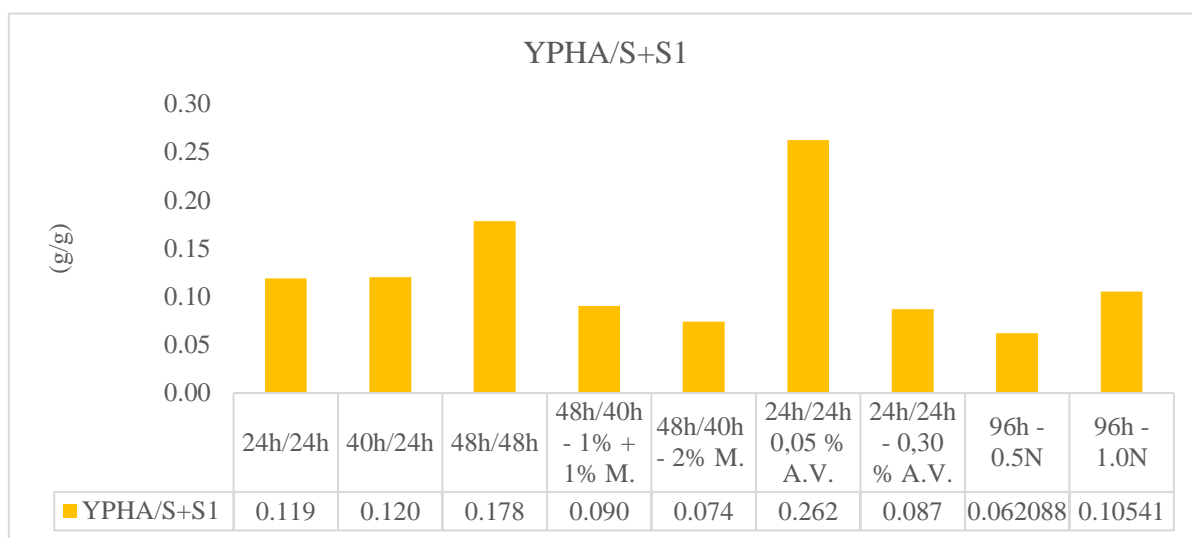
Figura 22: Representação da taxa de conversão Y_{3HV/Substrato} ensaios com produção de P(3HB-co-3HV).



Ainda, é possível observar na Figura 23, que mostra os resultados para a conversão de P(3HB-co-3HV) a partir dos dois substratos fornecidos, metanol e ácido valérico, que

os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 24h/24h – 0,05%, onde houve menor consumo dos substratos e maior acúmulo de copolímero.

Figura 23: Representação da taxa de conversão YPHA/S+S1 dos ensaios com produção de P(3HB-co-3HV).



Em resumo, pôde-se constatar a produção de biopolímeros em frascos agitados, na ausência de nitrogênio e presença de diferentes fontes de carbono. Na ausência do ácido valérico, não se observou a inclusão da unidade de 3HV ao copolímero. Em presença de 0,05-0,2% de ácido valérico pode-se observar um acúmulo de 3HV em até 11,68% mol no PHA, e foi possível verificar que o aumento da concentração do co-substrato é diretamente proporcional à fração de 3HV no copolímero. Vale ressaltar que, para os ensaios com maior tempo de cultivo (88 horas de ensaio) e com o aumento da concentração de metanol, obteve-se ainda uma fração molar de 21,229% de 3HV. Na Tabela 8, é possível observar que o acúmulo de P (3HB-co-3HV) foi significativo, quando comparado aos outros micro-organismos, porém somente em relação a fração de 3HV o valor foi mediano, em relação ao ensaio com 48 horas e concentração de ácido valérico de 0,2%. No entanto, com o maior tempo de cultivo e um aumento da concentração de metanol, houve um aumento na fração molar do 3HV, o que torna esta configuração de processo promissora em relação ao produto obtido.

Tabela 8: Dados comparativos entre micro-organismos descritos na literatura como produtores de P(3HB-co-3HV).

Bactéria	Tipo de cultivo	Biomassa (g/L)	P(3HB-co-3HV) (%)	3HV (mol %)	Tempo de cultivo	Substrato	Co-substrato	Referência
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Frascos	1,4	24	22	60	Metanol	Ácido valérico	(KIM; KIM; KIM, 1999)
<i>M. extorquens AMI</i>	Frascos	0,7	8,4	3,92	72	Metanol	Ácido Valérico	(ORITA et al., 2014)
<i>Methylobacterium sp. KCTC 0048</i>	Fermentador	2,18	18,7	40,6	66	Metanol	Ácido Valérico	(KANG; LEE; KIM, 1993)
<i>Methylobacterium sp. GW2</i>	Frascos	N.I.	30	15	66	Metanol	Ácido valérico	(YEZZA et al., 2006)
<i>cepa MCSUBH</i>	Frascos	1,68	29	10,83	48	Metanol	Ácido Valérico	Este trabalho
<i>cepa MCSUBH</i>	Frascos	3,23	25,052	21,23	88	Metanol	Ácido Valérico	Este trabalho
<i>cepa MCSUBH</i>	Frascos	4,53	53,38%	2,78	96	Metanol	Ácido Valérico	Este trabalho

Os valores obtidos em relação ao acúmulo P(3HB-co-3HV) são compatíveis com a literatura, apresentando resultados maiores em relação ao acúmulo de 53%, com cultivos de 96h, mas menores em relação a fração molar de 3HV, quando comparados a outros estudos. Para os outros co-substratos analisados foi possível observar que, a presença deles não induziu a produção do copolímero, acumulando somente o PHB em concentrações de até 50% do valor da biomassa. Portanto, com os resultados até o momento é possível constatar que somente o ácido valérico foi capaz de estimular a produção de P(3HB-co-3HV) para a *cepa* MCSUBH

Os resultados obtidos até o momento se mostraram promissores, por relatar o acúmulo de copolímeros de P(3HB-co-3HV) na *cepa* MCSUBH, sendo que os coolímeros apresentam características físico-químicas melhores, quando comparados ao PHB. Além disso, os ensaios produziram diferentes teores de 3-hidroxivalerato (3HV), o que pode resultar em mudanças no comportamento mecânico do bioplástico, comparáveis às poliolefinas, em relação aos seus altos valores de alongamento. Ainda é importante

ressaltar que os copolímeros de P(3HB-co-3HV) apresentam características avançadas do material, processabilidade e menor cristalinidade, maior elasticidade e ductilidade (FERRE-GUELL; WINTERBURN, 2018; KOLLER et al., 2014).

6. CONCLUSÕES

A cepa MCSUBH apresentou potencial para a produção de PHA e, na presença de um co-substrato, foi capaz de produzir um co-polímero do tipo de P(3HB-*co*-HV). Em todos os ensaios realizados com esta cepa, houve produção de biopolímeros, porém somente o ácido valérico mostrou-se precursor do acúmulo do monômero 3HV. Além disso, foi possível verificar que a modificação das estratégias de cultivo influenciou na produção do copolímero. Em relação ao tempo de cultivo, pode-se observar que com o aumento do tempo houve um maior acúmulo de P(3HB-*co*-HV), mas um menor acúmulo do monômero 3HV. A concentração de metanol a 2%, nos ensaios em dois estágios aumentou a incorporação do monômero 3HV. Já com o aumento da concentração de ácido valérico, pode-se constatar houve um declínio na porcentagem do co-polímero, mas em contrapartida, houve um aumento na fração molar de 3HV, chegando a 10,83%. Desse modo, verificou-se que a cepa apresentou potencial para acumular diferentes molaridades de 3HV com diferentes estratégias, com relação ao tempo de cultivo, concentração de metanol e ácido valérico. Constatou-se ainda que a concentração de nitrogênio não interferiu no acúmulo do biopolímero, mas interferiu na produção de biomassa.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

A. JAVADI , P. SRIKANTH , S. GONG, L. T. Misturas de polímeros e biocompósitos à base de PHBV, biodegradáveis e biodegradáveis: propriedades e aplicações. **Manual de Aplicações de Engenharia de Bioplásticos e Biocompósitos**, v. pp. 373-, 2011.

ACKERMANN, J. UWE et al. *Methylobacterium rhodesianum* cells tend to double the DNA content under growth limitations and accumulate PHB. **Journal of Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 9–20, 1995.

AGAFONOVA, N. V. et al. *Methylopila turkiensis* sp. nov., a new aerobic facultatively methylotrophic phytosymbiont. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 84, n. 4, p. 544–552, 27 jul. 2015.

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.

ANJUM, A. et al. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 161–174, 2016.

ARAMVASH, A. et al. Effective enhancement of hydroxyvalerate content of PHBV in *Cupriavidus necator* and its characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 397–404, 2016.

ARUN, A. et al. Microbial production of poly- β -hydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 7, p. 2320–2323, 2009.

ASHBY, R. D. et al. Methanol-induced chain termination in poly(3-hydroxybutyrate) biopolymers: Molecular weight control. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 195–201, 2015.

BHUBALAN, K. et al. Improved synthesis of P(3HB-co-3HV-co-3HHx) terpolymers by mutant *Cupriavidus necator* using the PHA synthase gene of *Chromobacterium* sp. USM2 with high affinity towards 3HV. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 8,

p. 1436–1442, 2010.

BONTRONE, K. M. et al. The Biological and Physical-Chemistry of Polyhydroxyalkanoates as Seen by Nmr-Spectroscopy. **Fems Microbiology Reviews**, v. 103, p. 269–277, 1992.

BOURQUE D, OUELLETTE B, ANDRÉ G, G. D. Production of poly- β -hydroxybutyrate from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 37, p. 7–12, 1992.

BOURQUE, D.; POMERLEAU, Y.; GROLEAU, D. High-cell-density production of poly- β -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.

BUGNICOURT, E. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. **Express Polymer Letters**, v. 8, n. 11, p. 791–808, 2014.

CAL, A. J. et al. Methanotrophic production of polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate with high hydroxyvalerate content. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 302–307, 2016.

CARDOSO, L. O. B. et al. Increased P3HB accumulation capacity of *Methylorubrum* sp. in response to discontinuous methanol addition. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2020.

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.

CEMPRE. Review 2019. **Review 2019**, p. 21, 2019.

CESPEDES, L. G. et al. A non-naturally-occurring P(3HB-co-3HAMCL) is produced by recombinant *Pseudomonas* sp. from an unrelated carbon source. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 512–519, 2018.

CHEN, G.-Q.; HAJNAL, I. The ‘PHAome’. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 559–564, 1 out. 2015.

CHOI, J.; LEE, S. Y. Efficient and economical recovery of poly (3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple. **Biotechnology and bioengineering**, v. 62, n. 5, p. 546–553, 1999.

COLOMBO, B. et al. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. **Bioresource Technology**, v. 218, n. 2016, p. 692–699, 2016.

DORONINA, N. V. et al. *Methylopila capsulata* gen. nov., sp. nov., a novel non-pigmented aerobic facultatively methylotrophic bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 4, p. 1313–1321, 1 out. 1998.

DORONINA, N. V. et al. *Methylopila helvetica* sp. nov. and *Methylobacterium dichloromethanicum* sp. nov. - Novel aerobic facultatively methylotrophic bacteria utilizing dichloromethane. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 210–218, 2000.

EL-ABD, M. A. E. et al. Identification, Biodegradation and bio-evaluation of biopolymer produced from *Bacillus thuringensis*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 04, p. 103–110, 2017.

ELIAS, H.-G.; MÜLHAUPT, R. Plastics, General Survey, 5. Plastics and Sustainability. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015. p. 1–7.

FAPESP - Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/planeta-plastico/>. Acessado em: 20/01/2020.

FERRE-GUELL, A.; WINTERBURN, J. Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates with Controlled Composition and Microstructure. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 3, p. 996–1005, 2018.

GAUTAM, P. et al. Bio-methanol as a renewable fuel from waste biomass: Current trends and future perspective. **Fuel**, v. 273, n. December 2019, p. 117783, 2020.

GERALDO, J.; PRADELLA, C.; PAULO, S. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. [s.l: s.n.].

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production , use , and fate of all plastics ever made. n. July, p. 25–29, 2017.

GHATE, B. et al. 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.

GHOLAMI, A. et al. Industrial production of polyhydroxyalkanoates by bacteria: Opportunities and challenges. **Minerva Biotecnologica**, v. 28, n. 1, p. 59–74, 2016.

GOGOLEWSKI, S. et al. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 27, n. 9, p. 1135–1148, set. 1993.

GOMEZ, J. G. C. et al. **Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid** *Appl Microbiol Biotechnol*. [s.l.] Springer-Verlag, 1996.

HAN, J. et al. Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers. **Biomaterials**, v. 139, p. 172–186, 1 set. 2017.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 439–471, 1996.

HARDING, K. G.; GOUNDEN, T.; PRETORIUS, S. “Biodegradable” Plastics: A Myth of Marketing? **Procedia Manufacturing**, v. 7, p. 106–110, 2017.

HAYWOOD, G. W. et al. 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, n. 2, p. 83–88, 1991.

HILLIOU, L. et al. Effects of fermentation residues on the melt processability and thermomechanical degradation of PHBV produced from cheese whey using mixed microbial cultures. **Polymer Degradation and Stability**, v. 128, p. 269–277, 2016.

HÖFER, P. et al. Production of functionalized polyhydroxyalkanoates by genetically modified Methylobacterium extorquens strains. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 1–13, 2010.

HOLMES, P. A. Applications of Phb - A Microbially Produced Biodegradable

Thermoplastic. **Physics in Technology**, v. 16, p. 32–36, 1985.

KANG, C. K.; LEE, H. S.; KIM, J. H. Accumulation of PHA and its copolyesters by *Methylobacterium* sp. KCTC 0048. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 10, p. 1017–1020, 1993.

KAPARULLINA, E. N. et al. *Methylopila carotae* sp. nov., a facultative methylotroph, isolated from a root of *Daucus carota* L. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 9, p. 1307–1316, 10 set. 2019.

KAROLSKI, B. et al. MALDI-Biotyper as a tool to identify polymer producer bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, 2018.

KARTHIKEYAN, O. P. et al. Review of sustainable methane mitigation and biopolymer production. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 15, p. 1579–1610, 2015.

KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 321–326, 2010.

KIM, S. W.; KIM, P.; KIM, J. H. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from *Methylobacterium organophilum* by potassium-limited fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 8–9, p. 555–560, 1999.

KOLLER, M. et al. Novel precursors for production of 3-hydroxyvalerate-containing poly[(R)-hydroxyalkanoate]s. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 3, p. 161–167, 2014.

KOLLER, M. et al. **Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner** *New Biotechnology* Elsevier B.V., , 25 jul. 2017a.

KOLLER, M. et al. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. **New biotechnology**, v. 37, n. Pt A, p. 24–38, 25 jul. 2017b.

KOVALCIK, A. et al. Designing packaging materials with viscoelastic and gas barrier properties by optimized processing of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with lignin. **Reactive and Functional Polymers**, v. 94, p. 25–34, 2015.

KUMAR, P. et al. 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.

KUNIOKA, M.; TAMAKI, A.; DOI, Y. Crystalline and Thermal Properties of Bacterial Copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). **Macromolecules**, v. 22, n. 2, p. 694–697, 1989.

KÜNKEL, A. et al. Polymers, Biodegradable. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016. p. 1–29.

ŁABUZEK, S.; RADECKA, I. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 353–357, 2001.

LAKSHMI, R. S. et al. Production and Optimization of Polyhydroxybutyrate from *Rhizobium* sp. present in root nodules. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSRJBPS)**, v. 3, n. 2, p. 21–25, 2012.

LEMECHKO, P.; FELLIC, M. LE; BRUZAUD, S. International Journal of Biological Macromolecules Production of poly (3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) using agro-industrial effluents with tunable proportion of 3-hydroxyvalerate monomer units. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 429–434, 2019.

LI, L. et al. *Methylophilum jiangsuensis* sp. nov., an aerobic, facultatively methylotrophic bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 1561–1566, jul. 2011.

LIU, C. C. et al. Recent strategies for efficient production of polyhydroxyalkanoates by micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 9–15, 2016.

LU, J.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). **Polymer Reviews**, v. 49, n. 3, p. 226–248, 2009.

LUZIER, W. D. Materials derived from biomass/biodegradable materials. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 3, p. 839–842, 1992.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999.

MANAVITEHRANI, I. et al. Biomedical applications of biodegradable polymers.

- Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 49, n. 12, p. 832–864, 2011.
- 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.
- MATIAS, F. et al. Polyhydroxybutyrate and polyhydroxydodecanoate produced by *Burkholderia contaminans* IPT553. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 1, p. 124–133, 2017.
- MENDONÇA, T. T. et al. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 815–829, 2014.
- MENDONÇA, T. T. et al. Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by *Burkholderia sacchari*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 654–663, 2017.
- MOHANDAS, S. P. et al. Production and characterization of polyhydroxybutyrate from *Vibrio harveyi* MCCB 284 utilizing glycerol as carbon source. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 698–707, 2017.
- MONTORO, S. R. Redução da Massa Molecular e Funcionalização do Via Hidrólise Ácida e Transesterificação com Glicóis. **Spectrum**, v. 21, p. 182–187, 2011.
- MOORKOTH, D.; NAMPOOTHIRI, K. M. Production and characterization of poly(3-hydroxy butyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 253–260, 2016.
- ORITA, I. et al. 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.
- PATEL, R. N.; HOU, C. T.; FELIX, A. Microbial oxidation of methane and methanol: Isolation of methane-utilizing bacteria and characterization of a facultative methane-utilizing isolate. **Journal of Bacteriology**, v. 136, n. 1, p. 352–358, 1978.
- PEÑA, C. et al. 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.

PIEJA, A. J.; ROSTKOWSKI, K. H.; CRIDDLE, C. S. Distribution and Selection of Poly-3-Hydroxybutyrate Production Capacity in Methanotrophic Proteobacteria. **Microbial Ecology**, v. 62, n. 3, p. 564–573, 2011.

POUTON, C. W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, n. 2, p. 133–162, 1996.

QIU, Y. Z. et al. Metabolic engineering for the production of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate by *Aeromonas hydrophila*. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 3, p. 255–261, 2004.

RADU, I. C. et al. Poly(HydroxyButyrate-co-HydroxyValerate) (PHBHV) nanocarriers for silymarin release as adjuvant therapy in colo-rectal cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. AUG, 2017.

RADU, I. C. et al. Poly(3-hydroxybutyrate-CO-3-hydroxyvalerate) PHBHV biocompatible nanocarriers for 5-FU delivery targeting colorectal cancer. **Drug Delivery**, v. 26, n. 1, p. 318–327, 2019.

REDDY, C. S. K. et al. Polyhydroxyalkanoates: An overview. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 137–146, 2003.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination microbial biomass after hydrochloric of poly-beta-hydroxybutyric acid propanolysis. **Journal of Chromatography**, v. 445, p. 285–289, 1988.

SANKHLA, I. S. et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production from a local isolate, *Brevibacillus invocatus* MTCC 9039. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1947–1953, 2010.

SCHNITZER, H.; ULGIATI, S. Less bad is not good enough: approaching zero emissions techniques and systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 15, n. 13–14, p. 1185–1189, 2007.

SCHRADER, J. et al. Methanol-based industrial biotechnology: current status and future perspectives of methylotrophic bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 107–115, 2009a.

SCHRADER, J. et al. **Methanol-based industrial biotechnology: current status and future perspectives of methylotrophic bacteria** *Trends in Biotechnology*, fev. 2009b.

SILVA, L. F. DA et al. Produção biotecnológica de poli-hidroxiálcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, v. 30, n. 7, p. 1732–1743, 2007.

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.

STEINBIICHEL, A.; VALENTIN, H. E. **Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids** *FEMS Microbiology Letters*. [s.l: s.n.].

STEINBIICHEL, A.; VALENTIN, H. E. **Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids** *Microbiology Letters*. [s.l: s.n.].

TAYLOR, M. S. et al. Six bioabsorbable polymers: In vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *Journal of Applied Biomaterials*, v. 5, n. 2, p. 151–157, 1994.

TIMM, A.; DAVID, B.; STEINBÜCHEL, A. Formation of blends of various poly(3-hydroxyalkanoic acids) by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p. 296–301, 1990.

TORUN KÖSE, G. et al. Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 24, n. 11, p. 1949–1958, 2003.

TROTSSENKO, Y. A.; DORONINA, N. V.; KHMELENINA, V. N. Biotechnological Potential of Aerobic Methylotrophic Bacteria: A Review of Current State and Future Prospects. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 41, n. 5, p. 433–441, set. 2005a.

TROTSSENKO, Y. A.; DORONINA, N. V.; KHMELENINA, V. N. Biotechnological Potential of Aerobic Methylotrophic Bacteria: A Review of Current State and Future Prospects. v. 41, n. 5, p. 495–503, 2005b.

VENKATA MOHAN, S. et al. Fermentative effluents from hydrogen producing bioreactor as substrate for poly(β -OH) butyrate production with simultaneous treatment: An integrated approach. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 23, p. 9382–9386, 2010.

VILLANO, M. et al. Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: From culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. *New*

- Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 289–296, 2014.
- VOLOVA, T. G. et al. Properties of a novel quaterpolymer P(3HB/4HB/3HV/3HHx). **Polymer**, v. 101, p. 67–74, 28 set. 2016.
- WANG, Y. N. et al. *Methylopila henanense* sp. nov., a novel methylotrophic bacterium isolated from tribenuron methyl-contaminated wheat soil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 329–336, 2015.
- WANG, Y.; YIN, J.; CHEN, G. Q. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 59–65, 2014.
- YANG, C. J.; JACKSON, R. B. China's growing methanol economy and its implications for energy and the environment. **Energy Policy**, v. 41, p. 878–884, 2012.
- YEO, J. C. C. et al. Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 92, n. October 2017, p. 1092–1116, 2018.
- YEZZA, A. et al. 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.
- ZHANG, T. et al. Enrichments of methanotrophic–heterotrophic cultures with high poly- β -hydroxybutyrate (PHB) accumulation capacities. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 65, p. 133–143, 2018a.
- ZHANG, W. et al. Guidance for engineering of synthetic methylotrophy based on methanol metabolism in methylotrophy. **RSC Advances**, v. 7, n. 7, p. 4083–4091, 2017.
- ZHANG, W. et al. Biotechnology for Biofuels Current advance in bioconversion of methanol to chemicals. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1–11, 2018b.
- ZHANG, Y. Z. et al. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 82–88, 2015.

ANEXO I - CURVAS DE CALIBRAÇÃO

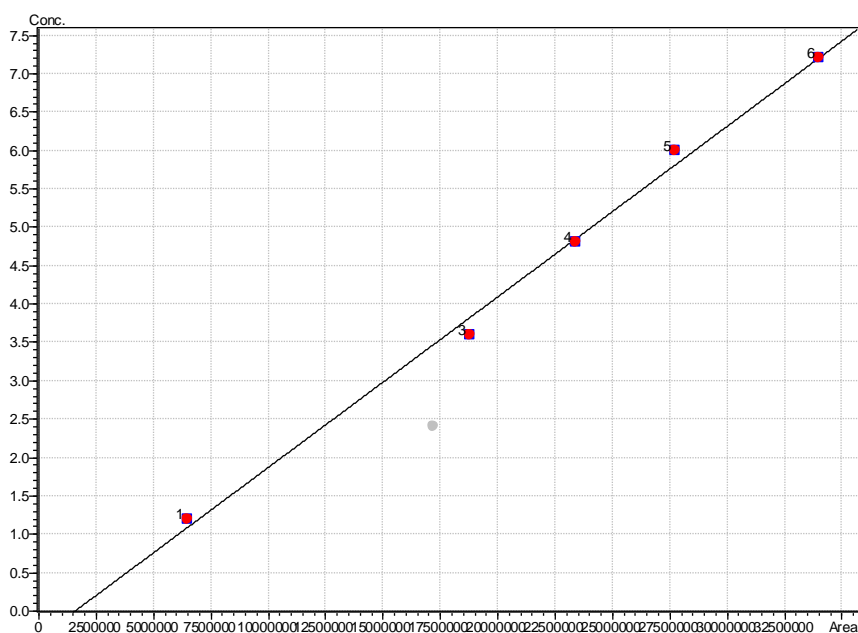
Curvas de calibração para quantificação do consumo dos substratos testados, obtidas por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e padrões comerciais.

Curva de ácido propiônico

Curva de calibração realizada para quantificar o ácido propiônico. Concentrações utilizadas de: 0,10 g.L⁻¹; 0,50 g.L⁻¹; 0,60 g.L⁻¹; 0,7 g.L⁻¹; 1 g.L⁻¹.

Informações sobre o gráfico geradas pelo software HPLC: Função linear: $y = 2.222424e^{-007}x - 0.3489156$; $r^2 = 0.9952129$.

Figura 24: Curva de calibração para quantificar o ácido propiônico. Concentração x Área.

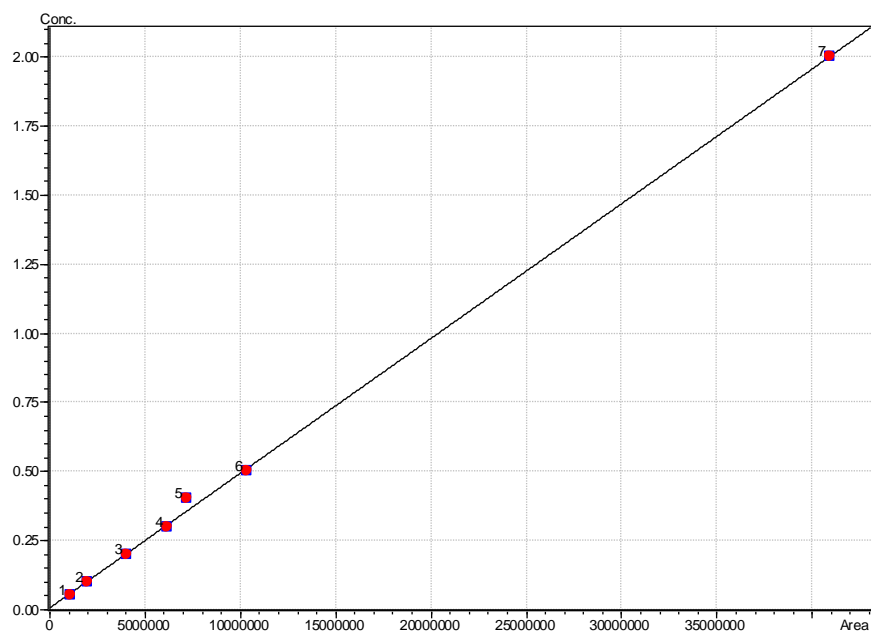


Curva de Ácido Valérico

Informações sobre o gráfico geradas pelo software HPLC: Função linear: $y = 4.875318e^{-008}x + 7.368294e^{-003}$; $r^2 = 0.9992089$

Curva de calibração realizada para quantificar o ácido propiônico. Concentrações utilizadas de: 0,10 g.L⁻¹; 0,20 g.L⁻¹; 0,30 g.L⁻¹; 0,40 g.L⁻¹; 0,50 g.L⁻¹; 2,00 g.L⁻¹.

Figura 25: Curva de calibração para quantificar o ácido valérico. Concentração x Área.

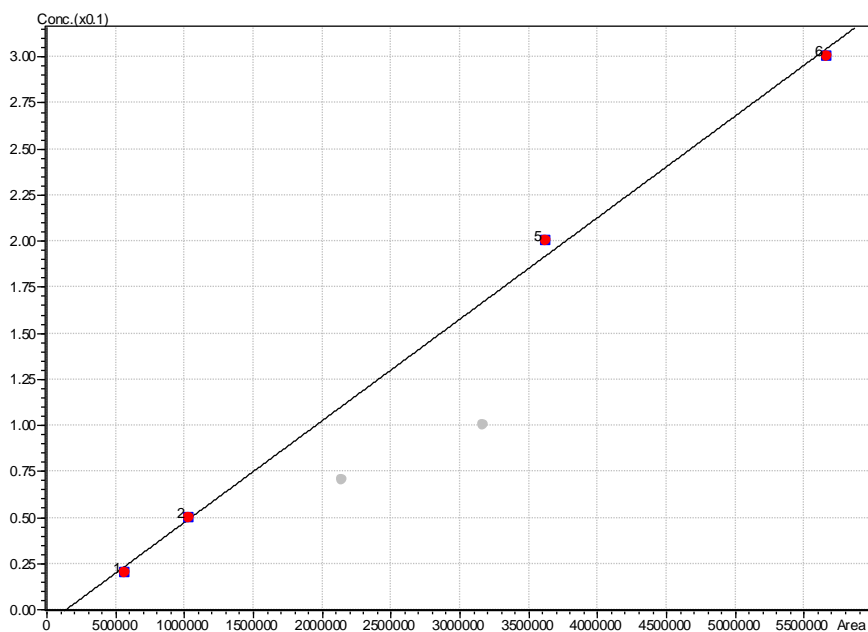


Curva de Ácido cítrico

Curva de calibração realizada para quantificar o ácido propiônico. Concentrações utilizadas de: 0,10 g.L⁻¹; 0,30 g.L⁻¹; 0,60 g.L⁻¹; 1,00 g.L⁻¹.

Informações sobre o gráfico geradas pelo software HPLC: Função linear: $y = 5.514e^{-008}x + -7.645233e^{-003}$; $r^2 = 0.9981899$

Figura 26: Curva de calibração para quantificar o ácido cítrico. Concentração x Área.

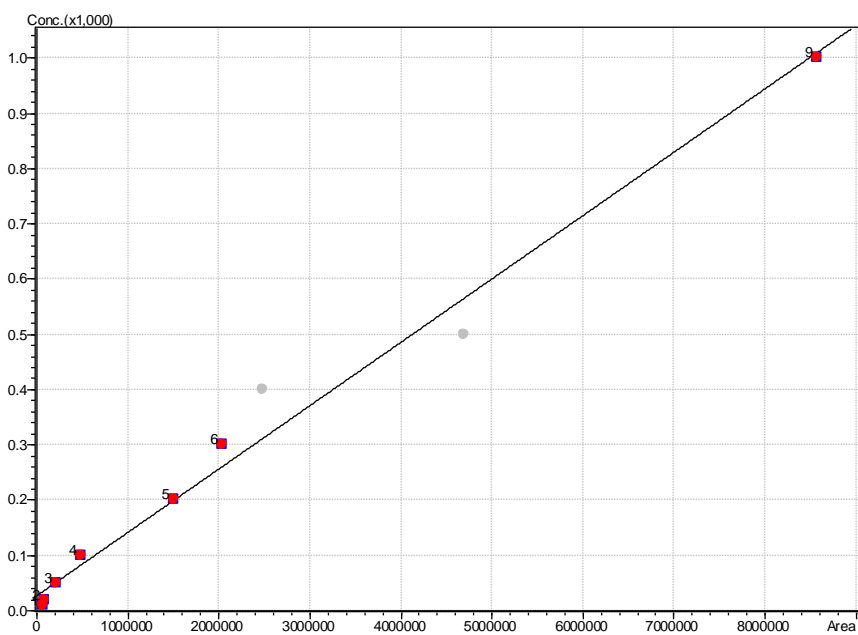


Curva de propanol

Informações sobre o gráfico geradas pelo software HPLC: Função linear: $y = 1.146403e^{-004}x + 27.31592$; $r^2 = 0.9962182$.

Curva de calibração realizada para quantificar o ácido propiônico. Concentrações utilizadas de: 0,10 g.L⁻¹; 0,20 g.L⁻¹; 0,30 g.L⁻¹; 0,50 g.L⁻¹; 1,00 g.L⁻¹.

Figura 27: Curva de calibração para quantificar o propanol. Concentração x Área.

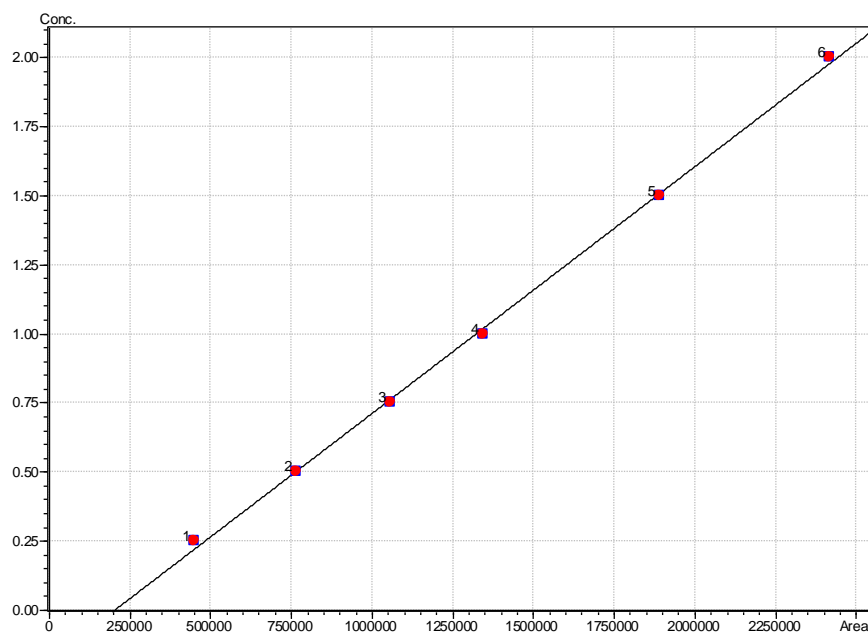


Curva do Metanol

Informações sobre o gráfico geradas pelo software HPLC: Função linear: $y = 8.928894e^{-007}X + -0.1796635$; $r^2 = 0.9990641$

Curva de calibração realizada para quantificar o ácido propiônico. Concentrações utilizadas de: 0,10 g.L⁻¹; 0,50 g.L⁻¹; 0,75 g.L⁻¹; 1,00g.L⁻¹; 2,00 g.L⁻¹; 3,00 g.L⁻¹.

Figura 28: Curva de calibração para quantificar o metanol. Concentração x Área.



ANEXO II – CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Tabela AII – 1: Cronograma apresentado ao programa de Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia com atividades previstas para o mestrado.

Atividades/Semestres	2018	2019		2020	
	2º	1º	2º	1º	2º
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X
Créditos em disciplinas	X	X	X		
Isolamento e identificação bacterianos	X	X			
Produção de PHB com metanol	X	X			
Produção de copolímero com metanol + complementos			X	X	X
Avaliação dos Resultados		X	X	X	X
Divulgação dos Resultados			X		X
Defesa					X

A Tabela AII -1 apresenta a lista de atividades no início do mestrado com o projeto, no ingresso do programa e a tabela AII – 2 relata as alterações em relação ao tempo de proposto inicialmente.

Tabela AII – 2: Cronograma de atividades com realizadas durante o período de mestrado.

Atividades/Semestres	2018	2019		2020		2021
	2º	1º	2º	1º	2º	1º
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	
Créditos em disciplinas	X	X	X			
Isolamento e identificação bacterianos	X	X				
Produção de PHB com metanol	X	X				
Produção de copolímero com metanol + complementos			X	X	X	
Avaliação dos Resultados		X	X	X	X	
Divulgação dos Resultados			X		X	
Defesa						X

Figura AII – 1: Representação dos créditos obtidos para depósito da dissertação

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	29	34
Estágios:			
Total:	0	29	34