



**'UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS DO RIO MADEIRA NA PRODUÇÃO DE
BIOPOLÍMEROS**

EDILANE MARTINS FERREIRA

**MANAUS
2015**

EDILANE MARTINS FERREIRA

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS DO RIO MADEIRA NA PRODUÇÃO DE
BIOPOLÍMEROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof. Dr. Rudi Emerson de
Lima Procópio**
**Co-orientador: Prof. Dr. Aldo Rodrigues
de Lima Procópio**

MANAUS

2015

EDILANE MARTINS FERREIRA

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS DO RIO MADEIRA NA PRODUÇÃO DE
BIOPOLÍMEROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação: ___/___/___

Banca Examinadora:

Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio
Instituição: UEA

Dra. Érica Simplício de Souza
Instituição: UEA

Dr. André Luiz Willerding
Instituição: CBA

MANAUS

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo, com muito amor: ao meu marido Luciano, por todo apoio, companheirismo e paciência, no desenvolvimento do meu trabalho, e ao meu filho Júlio César, que esteve comigo na construção desta obra, dentro e fora de meu ventre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que na sua infinita bondade iluminou sempre meus caminhos e deu-me forças para seguir em frente nesta caminhada apesar das dificuldades encontradas nesta jornada.

Agradecimento especial ao meu esposo Luciano que sempre me apoiou, compreendendo-me, amando-me, sendo meu alicerce nas horas difíceis, base primordial para o meu sucesso pessoal e profissional e ao meu filho, Júlio César, pelo imensurável amor.

Agradeço a minha família, que mesmo distante, sempre me apoiou e me deu forças com suas orações e muito amor.

Ao professor orientador Rudi Procópio por todos os ensinamentos passados, incentivo e conselhos profissionais dados, pela atenção e confiança dedicados ao longo do trabalho. Gostaria de ratificar a sua competência e participação com discussões, correções e sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho com êxito.

Ao meu co-orientador, Aldo Procópio por dispor de boa parte do seu tempo para ensinar as técnicas, a execução do trabalho, o esclarecimento de dúvidas e a correção da Dissertação.

Agradeço aos colegas de trabalho e técnicos do Laboratório de Microbiologia do Programa de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, da Universidade do Estado do Amazona – MBT/UEA, por serem companheiros e terem colaborado para a realização deste trabalho. Destaco aqui a Monique Antunes que não mediu esforços para me ajudar na execução da primeira etapa para a qualificação do projeto.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, na pessoa do Prof. Dr. Rudi Procópio e aos técnicos Isaque Ferreira da Silva, Samára Ferreira Santos e Diego R. Bilby de Freitas, que colaboraram na realização de algumas etapas deste estudo.

A Universidade do Estado do Amazonas, por meio da Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais - MBT, pela oportunidade e espaço concedido para a realização deste curso.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de mestrado concedida a mim.

A todos os mestres e colaboradores que fazem parte da equipe pedagógica e administrativa do Programa de Biotecnologia e Recursos Naturais, pela sabedoria e eficiência em seus ensinamentos.

Aos Professores da banca, pela dedicação, compreensão, análise e recomendações para o aperfeiçoamento e melhorias deste trabalho.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que fizeram parte dessa etapa decisiva em minha vida.

*“O êxito da vida não se mede pelo caminho que
você conquistou, mas sim pelas dificuldades que
superou no caminho”.*

(Abraham Lincon)

RESUMO

Os plásticos têm papel fundamental na sociedade, com diversas finalidades e amplo mercado, constantemente em crescimento. Grandes problemas ambientais ocorrem devido ao uso excessivo de plásticos derivados do petróleo, principalmente devido sua rápida descartabilidade e lenta degradação, afetando a qualidade de vida da população atual, surgindo a necessidade de se buscarem alternativas para substituição deste material. Apresentam-se como solução os plásticos biodegradáveis, que são polímeros com as propriedades desejáveis dos plásticos convencionais e rapidamente biodegradados quando descartados no ambiente. Dentre eles, estão os polihidroxicanoatos (PHAs), uma grande família de poliésteres, intracelulares, acumulados na forma de grânulos por diversas bactérias a partir de substratos de fontes renováveis, como reserva de carbono e/ou energia, sob limitação de um nutriente essencial ao seu crescimento. O objetivo deste trabalho é selecionar bactérias capazes de produzir PHA, da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Programa de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, da Universidade do Estado do Amazonas – MBT/UEA. Inicialmente, 140 isolados coletados no Rio Madeira localizado no município de Autazes/AM em 2010, foram reativados e purificados em meio NA e MM. Para a seleção de linhagens com potencial de produção de biopolímeros, dos 140 isolados corados com Sudan Black, 47 mostraram-se positivos para a coloração. Destes, 08 isolados foram selecionados, por apresentarem maiores alterações morfológicas da célula quando visualizados em microscópio, sugerindo potencial para produção de biopolímeros. Os mesmos foram submetidos à coloração por Nile Red e Nile Blue para confirmação da produção de biopolímeros. Para elucidar qualitativa e quantitativamente os PHAs produzidos pelos 08 isolados, foi utilizada a massa celular liofilizada realizando a metanólise para a extração do biopolímero. Em seguida, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa. Como resultados, dos 08 isolados identificados com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA, foram encontradas espécies pertencentes à três gêneros: *Bacillus*, *Brevibacterium* e *Lysinibacillus*, sendo o gênero *Bacillus* o mais significativo, além de apresentarem características desejáveis para a produção de PHA, como o curto tempo de geração, crescem facilmente até alcançar um alta densidade celular, utilizam fonte de carbono e nitrogênio de baixo custo. Todos os isolados identificados são Gram-positivas, oferecendo a vantagem da falta de LPS e proteínas de excreção, o que os tornam bons candidatos como produtores de PHA para aplicações biomédicas. A análise cromatográfica revelou um polímero constituído principalmente de monômeros 3-hidroxi-butanato (HB). Vale ressaltar, que sobre o gênero *Brevibacterium* existem pouquíssimos trabalhos publicados relatando a produção de biopolímeros e quanto ao gênero *Lysinibacillus*, não foi relatado nada sobre a produção de biopolímeros, até o momento. Estes resultados demonstram a importância de trabalhos de bioprospecção com o objetivo de detectar bactérias produtoras de PHA.

Palavras-chave:

Biopolímeros. Polihidroxicanoatos. Rio Madeira. *Bacillus* sp. Polihidroxi-butanato.

ABSTRACT

Plastics play a fundamental role in society, with different purposes and broad market, constantly growing. Major environmental problems occur due to excessive use of petroleum-derived plastics, mainly due to its rapid disposability and slow degradation, affecting life quality of the current population, resulting in the need to find alternatives to replace this material. Biodegradable plastics are presented as solution, which are polymers with desirable properties of conventional plastics and quickly biodegradability when discarded into the environment. Among them there are polyhydroxyalkanoates (PHAs), a large family of polyesters, intracellulars, accumulated in the form of granules by various bacteria from renewable sources substrates, using it as carbon and/or energy source, under limitation of an essential nutrient for their growth. The objective of this study is to select bacteria capable of producing PHA, from the collection of microorganisms of the “Laboratório de Microbiologia do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas –MBT/UEA”. Initially, 140 isolates sampled from Madeira River of Autazes municipality (Amazonas State) in 2010, were reactivated and purified through NA and MM. To select bacteria lines with biopolymer production potential, all isolates were stained with Sudan Black, and 47 were positive for staining. Within the positive group, 08 isolates were selected for presenting major cell morphological changes when seen in the microscope, suggesting potential for biopolymers production. Then they were stained with Nile Red and Nile Blue to confirm biopolymer production. To elucidate qualitatively and quantitatively the PHAs produced by the 08 isolates, it was used the lyophilized cellular mass performing methanolysis for biopolymer extraction. Thus, samples were analyzed by gas chromatography. As result, from 08 isolates identified by partial sequence identity of 16S rRNA, there were species belonging to three genera: *Bacillus*, *Brevibacterium* and *Lysinibacillus*, being genus *Bacillus* the most significant, thus having desirable characteristics for PHA production, such as short generation time, easy growth until reaching a high cell density and use of low cost carbon and nitrogen source. All identified isolates are gram-positive, providing the advantage of the lack of LPS and protein excretion, which make them good candidates as PHA producers for biomedical applications. Chromatographic analysis revealed a polymer consisting mainly of monomer 3-hydroxybutyrate (HB). It is noteworthy that on *Brevibacterium* genus there are very few published studies about the production of biopolymers and in terms of gender *Lysinibacillus* did not report anything about the production of biopolymers, yet. These results demonstrate the importance of bio prospection works aiming to detect bacteria PHA producers.

Keywords:

Biopolymers, Polyhydroxyalkanoates, Madeira River, *Bacillus* sp., polyhydroxybutyrate.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Classificação dos polímeros biodegradáveis.....	6
Figura 2. Ciclo de vida ideal dos polímeros biodegradáveis provenientes de fontes renováveis.....	7
Figura 3. Células bacterianas contendo grânulos de polímeros biodegradável.....	7
Figura 4. Estrutura geral dos polihidroxicanoatos.....	8
Figura 5. Representação do grânulo de PHA.....	9
Figura 6. Fatores que influenciam na síntese de PHA por bactérias.....	10
Figura 7. Embalagens de P(3HB-co-3HV) degradado em lodo ativado aeróbico durante 0, 2, 4, 6, 8, e 10 semanas.....	22
Figura 8. Duas réguas utilizadas em um teste caseiro de biodegradabilidade durante 6 meses.....	22

CAPÍTULO I

Figura 1. Localização do município de Autazes/AM e Foz do Rio Madeira.....	30
Figura 2. Isolados reativados e purificados em meio NA (A e B). Isolados em meio MM com coloração Nile Blue e Nile Red (C e D), respectivamente, para produção de polímeros.....	36
Figura 3. Esfregaços corados com Gram e visualizados em lente de imersão em microscopia óptica 1000x. A- Meio NA (UEA 20223); B- Meio MM (UEA 20223); C- Meio NA (UEA 20229), D- Meio MM (UEA 20229).....	40
Figura 4. Esfregaços corados com Safranina e visualizados em lente de imersão em microscopia óptica. A- Meio NA (UEA 20171); B- Meio MM com Nile Blue (UEA 20171); C- Meio MM com Nile Red (UEA 20171); D- Meio NA (UEA 20261); E- Meio MM com Nile Blue (UEA 20261); F- Meio MM com Nile Blue (UEA 20261).....	41
Figura 5. Figura 5: Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16s rRNA, mostrando a relação filogenética entre os 8 isolados identificados.....	47
Figura 6: Cromatograma exibindo o perfil de composição monomérica de PHA dos 8 isolados.....	49
Figura 7. Bipolímero de <i>Ralstonia eutropha</i>	50

LISTA DE TABELAS E QUADROS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Classes de PHA sintase.....	11
Tabela 2. Propriedades dos polímeros.....	14
Tabela 3. Principais características dos polímeros poli-3-hidroxi- butirato, polihidroxi-octanoato e polipropileno.....	15
Tabela 4. Produtores comerciais do PHA.....	16

CAPÍTULO I

Quadro 1. Seleção de linhagens produtoras de PHA.....	37
Tabela 1. Seleção de linhagens produtoras de PHA.....	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COPERSUCAR	- Cooperativa de Produtores de Cana-de-Açúcar
Hidroxiacil-CoA	- Hidroxiacil coenzima A
ICI	- Imperial Chemical Industries
LPS	- Lipopolissacarídeo
MM	- Meio Mineral
NA	- Nutriente Ágar
P(3HB)	- Poli(3-hidroxiacetato)
P(3HB-co-3HV)	- Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)
P(3HB-co-4HB)	- Poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato)
P(3HHx) -co-P(3HO)	- Poli(3- hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)
P(3HV)	- Poli(3-hidroxiacetato)
P(4HB)	- Poli(4-hidroxiacetato)
PBAT	- Co-poliésteres aromáticos
PBS	- Tampão fosfato-salina
PCL	- Policaprolactonas
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PEA	- Poliesteramidas
PESA	- Co-poliésteres alifáticos
PHA	- Polihidroxialcanoato
PHA _{LCL}	- Polihidroxialcanoato de cadeia lateral longa
PHA _{MCL}	- Polihidroxialcanoato de cadeia lateral média
PHA _{SCL}	- Polihidroxialcanoato de cadeia lateral curta
PHB	- Polihidroxiacetato
PHBHHx	- Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)
PHBV	- Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)
PHO	- Polihidroxiacetato
PLA	- Poli (ácido láctico)
PP	- Polipropileno
rRNA	- RNA ribossomal
Tg	- Temperatura de transição vítrea

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Plásticos como problema ambiental	4
2.2 Biopolímeros.....	5
2.3 Polihidroxialcanoatos.....	7
2.4 Metabolismo dos Polihidroxialcanoatos.....	8
2.5 Histórico e Indústria dos Biopolímeros	12
2.6 Poli-hidroxitirato (PHB)	13
2.7 Poli-hidroxitirato-co-hidroxitirato (PHB-co-HV).....	16
2.8 Diversidade bacteriana na produção de Polihidroxialcanoatos	17
2.9 Aplicações de Biopolímeros	18
2.10 Biodegradação dos polihidroxialcanoatos	21
2.11 Caracterização do Ambiente Amazônico.....	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 Geral.....	26
3.2 Específicos	26
CAPÍTULO 1	29
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Local de Coleta dos Microrganismos.....	30
2.2 Reativação e Purificação dos Microrganismos	31
2.3 Seleção das linhagens produtoras de biopolímeros: Teste qualitativo	31
2.3.1 Preparo das bactérias para microscopia	32
2.4 Extração e Purificação de biopolímeros: Teste qualitativo	32
2.5 Análise do biopolímero em Cromatografia Gasosa	33
2.6 Caracterização Genética	33
2.6.1 Extração do DNA Genômico.....	33
2.6.2 Amplificação do gene 16S rRNA	34
2.6.3 Análise da árvore filogenética.....	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1 Isolamento e seleção de linhagens bacterianas produtoras de PHA.....	35
3.2 Caracterização molecular dos isolados selecionados	41
3.3 Identificação e diversidade das bactérias utilizando gene 16S rRNA	42
3.4. Análise filogenética.....	46
3.5 Análise do biopolímero em Cromatografia Gasosa	47
4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	51
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

Encontrado em vários tipos de embalagens, bem como em aplicações comerciais e domésticas, o plástico é um componente comum na vida moderna. Seus benefícios de baixo custo, resistência, impermeabilidade a gases e água, transparência, capacidade de vedação e impressão, são altamente valorizados. Mas, as mesmas características de resistência e durabilidade que tornam o plástico tão útil e econômico podem ser um grande problema quando se faz necessário seu descarte (GAMAL et al., 2013). Uma classe de biopolímeros que surgem como alternativa ambientalmente correta aos polímeros petroquímicos são os polihidroxicanoatos (PHAs), pois são materiais biodegradáveis, biocompatíveis e que podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis (MATIAS e RODRIGUES, 2011; MATSUDA, 2009), além de apresentarem propriedades termoplásticas e/ou elastoméricas (GAMAL et al., 2013; KHAN et al., 2013; SHAMALA et al., 2012).

Os polihidroxicanoatos são poliésteres acumulados por diversos microrganismos como corpos de inclusão, ou seja, na forma de grânulos intracelulares que atuam como reserva de carbono e energia (KHAN et al., 2013; FACCIN, 2012; BRITO et al., 2011) e podem corresponder até cerca de 80% da massa seca celular (RAICHER, 2011; RIIS & MAI, 1988). A síntese de PHA normalmente ocorre quando há excesso de fonte de carbono disponível e limitação de pelo menos um nutriente essencial à multiplicação das células bacterianas (BRITO et al., 2011; ROZO, 2011).

Devido às suas características químicas e de biodegradabilidade os PHAs podem ser utilizados na indústria química, farmacêutica e médica, para muitos fins humanos (MATIAS e RODRIGUES, 2011).

Para Falcone e colaboradores (2007), tais materiais encontraram aplicações na área médica (fios de sutura, implantes, sistema de liberação controlada de drogas, enxerto vascular, etc.) em decorrência de sua biocompatibilidade, capacidade de dissolução no interior dos organismos e propriedades mecânicas adequadas a tais aplicações. Com o tempo, poderão também encontrar aplicações

no setor de embalagens e setor agrícola. Este fato apresenta grande interesse, uma vez que o setor de embalagens é responsável por mais de um terço do total de resinas transformadas no Brasil. A produção mundial em 2011 alcançou 280 milhões de toneladas, e o Brasil produziu o equivalente a 2% da produção mundial, cerca de 6 milhões de toneladas, sendo que 40% destinava-se à indústria de embalagens (ABIPLAST, 2013). Atualmente, a situação mostra um aumento no consumo de plásticos que no futuro serão dispostos no ambiente acarretando problemas ecológicos imediatos.

Observa-se que duas áreas de aplicações são bastante destacadas, embalagens e aplicações médicas. No entanto, um dos problemas enfrentados no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis como substitutos de plásticos convencionais é o seu preço elevado em comparação com os plásticos petroquímicos (GAMAL et al., 2013). Isso também é observado por Falcone colaboradores (2007), que avaliaram os polímeros biodegradáveis não sendo capazes de competir com os polímeros tradicionais como polipropileno e poliestireno, especialmente devido ao custo elevado e desempenho inferior.

Por outro lado, muitas possibilidades venham sendo exploradas para redução dos custos de produção dos biopolímeros, que depende da obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos no produto desejado, da utilização de substratos de baixo custo, do desenvolvimento de processos que permitam explorar ao máximo o potencial dessas linhagens e do desenvolvimento de processos de extração-purificação mais econômicos e eficientes (NEVES, 2009).

Contudo, a aplicação do PHA no campo da medicina não é prejudicada pelo custo de produção por ser aplicação de ponta. Assim o PHA é usado para confecção de tecidos, na administração de medicamentos e são ainda polímeros com potencial de aplicações terapêuticas (BRITO et al., 2011).

Estima-se que mais de 300 espécies de bactérias e mais de 90 gêneros, incluindo organismos Gram-negativos e Gram-positivos acumulam PHAs naturalmente (KHAN et al., 2013). O primeiro relatório sobre PHA foi em 1920, quando Lemoigne, involuntariamente, achou em uma cepa *Bacillus megaterium*, grânulos intracelulares e definiu as suas características químicas. Na década de

1970, a busca por novas bactérias produtoras de PHA aumentou devido à primeira crise mundial do petróleo e as bactérias pertencentes a *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Nocardia* e outros gêneros começaram a ser estudadas, gerando a grande maioria dos artigos em 1980 e 1990 (MATIAS E RODRIGUES, 2011). Matias e Rodrigues (2011) relatam também que, a primeira produção industrial começou a se tornar uma realidade através da utilização de *Cupriavidus necator*, anteriormente classificada como *Ralstonia eutropha* e *Alcaligenes eutrophus*, na década de 1980. Esta bactéria se tornou o modelo molecular e celular para a produção de PHA e para aplicações industriais.

Diante do exposto e com o aumento de preço do petróleo, principal fonte de matéria-prima para a produção dos polímeros, associada a uma crescente preocupação social com os índices de poluição mundial, há uma considerável atração por PHA. Devido à sua biodegradabilidade e propriedades termoplásticas, os biopolímeros possuem muitas aplicações em indústrias de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, de tintas, produtos agrícolas entre outras. No entanto, o alto custo de produção em comparação com os polímeros petroquímicos baratos, impede a sua utilização em escala industrial. Contínuos esforços estão sendo feitos e vários estudos estão em andamento para desenvolver estratégias, utilizando substratos de baixo custo como fonte de carbono e alto rendimento de biopolímeros (KHAN et al., 2013). Neste sentido, o estudo para a descoberta e seleção de novas linhagens com potencial de produção de biopolímeros é de grande importância.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plásticos como problema ambiental

Na sociedade moderna, e presentes na vida das pessoas com diversas aplicações, os plásticos têm grande influência, sendo uma delas a substituição de matérias-primas convencionais como metais, vidros, papéis e madeira. Há também sua aplicação na manufatura de embalagens e outros produtos por causa de sua praticidade e rápida descartabilidade (ROZO, 2011; KHAN et al., 2013).

Com o aumento do preço do petróleo e as preocupações sobre aquecimento global, os plásticos convencionais produzidos a partir de petroquímicos enfrentam hoje dois grandes desafios: a maioria destes plásticos não são biodegradáveis e representam recursos não renováveis em um curto espaço de tempo (BRITO et al., 2011). Estima-se que cerca de 150 milhões de toneladas de plásticos são produzidos no mundo (RODRIGUEZ, 2012; SILVA et al., 2007) e pelo menos 25 milhões de toneladas destes plásticos são descartados para o ambiente, representando uma ameaça aos componentes bióticos e abióticos do ambiente (KHAN et al., 2013). No entanto, uma vasta gama de alternativas biodegradáveis tem sido propostas para mitigar o problema do uso de plásticos de base petroquímica (RODRIGUEZ, 2012; ROZO, 2011; SILVA et al., 2007).

Na Biotecnologia industrial observa-se a utilização de microrganismos ou enzimas para a produção de uma grande variedade de produtos bioquímicos, desenvolvendo assim, uma bioeconomia que pode substituir partes da economia petroquímica atual e muitos polímeros (RODRIGUEZ, 2012), dependendo de suas propriedades químicas, térmicas e mecânicas, também se apresentam como excelentes candidatos para a produção de novas formulações de plásticos em diversas aplicações (THOMSON et al., 2013; MACAGNAN et al., 2012).

Os polihidroxicanoatos bacterianos constituem uma classe de polímeros bastante estudada no país e têm atraído muita atenção nos últimos anos como alternativa para a substituição de plásticos derivados do petróleo (POBLETE-CASTRO et al., 2012; KAWASHIMA et al., 2012; BORSCHIVER et al., 2008) por apresentarem características de biodegradabilidade, termoplasticidade,

biocompatibilidade e diversas propriedades mecânicas, além de serem produzidos a partir de recursos renováveis (THOMSON et al., 2013; RODRIGUEZ, 2012; SILVA et al., 2007).

Para Silva et al. (2007), dois componentes são preponderantes na determinação do preço dos polímeros produzidos a partir de matéria-prima renovável e são imperativos para garantir uma competição com polímeros de origem petroquímica: custo da matéria-prima e energia, bem como de investimento de capital para implantação de uma unidade industrial de produção. Na questão do custo da matéria-prima e energia é amplamente reconhecida a vantagem competitiva do nosso país devido suas condições edafoclimáticas favoráveis e grande extensão territorial (potencial de produzir biomassa). Resta, portanto, converter estas vantagens competitivas em processos de alto desempenho e economicamente diferenciados. Dentro deste quadro, nos últimos anos houve um esforço, no Brasil, realizado por diversos grupos de pesquisa para viabilizar a produção de PHA.

2.2 Biopolímeros

Biopolímeros são polímeros obtidos a partir de fontes renováveis, geralmente biodegradáveis e não tóxicos, podendo ser produzidos por microrganismos, plantas e animais ou sintetizados quimicamente a partir de açúcares, amido, óleos e gorduras, entre outros (FACCIN, 2012; BORSCHIVER et al., 2008).

As fontes renováveis são assim conhecidas por possuírem um ciclo de vida mais curto comparado com fontes fósseis como o petróleo o qual leva milhares de anos para se formar. Alguns fatores ambientais e socioeconômicos que estão relacionados ao crescente interesse pelos biopolímeros são: os grandes impactos ambientais causados pelos processos de extração e refino utilizados para produção dos polímeros provenientes do petróleo, a escassez do petróleo e aumento do seu preço (BRITO et al., 2011).

Dentre as características citadas sobre biopolímeros merece destaque a biodegradação, que é um processo nos quais a degradação resulta da ação de microrganismos e suas enzimas, e convertido a composto orgânico, podendo ser consumidos em semanas ou meses sob condições favoráveis de biodegradação (FACCIN, 2012; BRITO et al., 2011).

Os polímeros biodegradáveis são divididos em 4 grupos conforme a Figura 1, onde observa-se um fluxograma classificando alguns polímeros biodegradáveis de acordo com sua fonte de obtenção (BRITO et al., 2011). Agro-polímeros são obtidos a partir de agro-produtos por meio do fracionamento da biomassa, que estão divididos em polissacarídeos, proteínas e lipídeos. No segundo grupo estão os poliésteres sintetizados por microrganismos a partir de fontes renováveis, como os polihidroxicarboxilatos. O terceiro grupo é formado por polímeros sintetizados quimicamente a partir de monômeros derivados de processos biotecnológicos, como é o caso do poli (ácido lático) e o último grupo contempla polímeros biodegradáveis provenientes de origem não renováveis totalmente sintetizados em processos petroquímicos (AVEROUS e BOQUILLON, 2004 apud FACCIN, 2012).

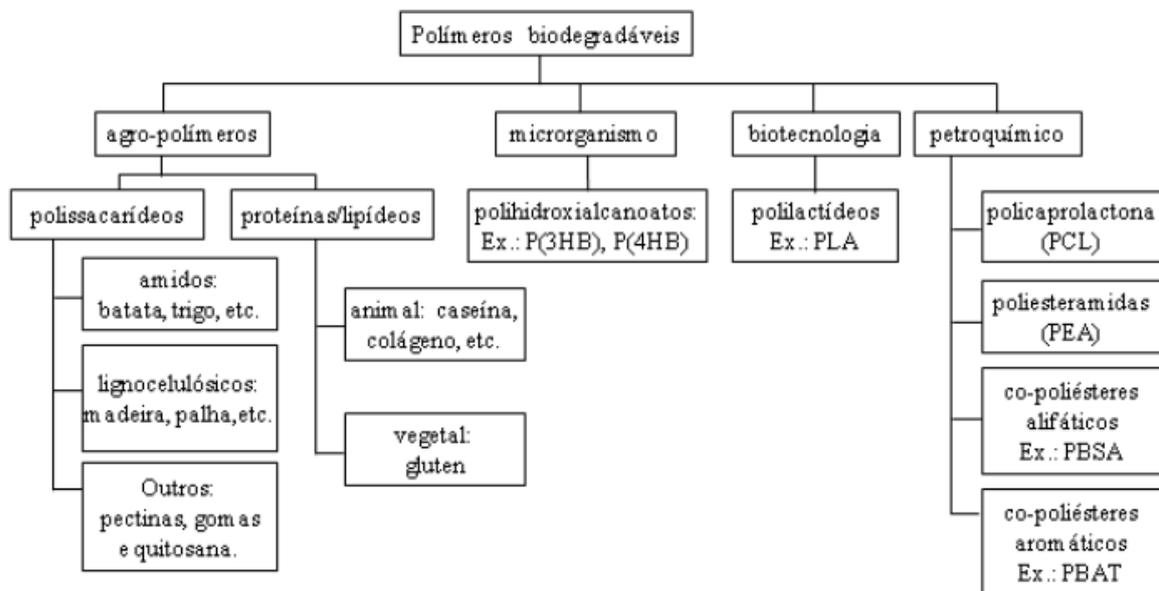


Figura 1: Classificação dos polímeros biodegradáveis.
Fonte: Averous e Boquillon (2004) apud Faccin (2012).

Dentre os polímeros biodegradáveis, os que têm atraído mais atenção são os obtidos a partir de fontes renováveis (SILVA et al., 2007; BOIN et al., 2009) devido ao menor impacto ambiental causado com relação a sua origem, o balanço positivo de dióxido de carbono (CO₂) após compostagem, e a possibilidade de

formação de um ciclo de vida fechado, como ilustrado na Figura 2 (BRITO et al., 2011).

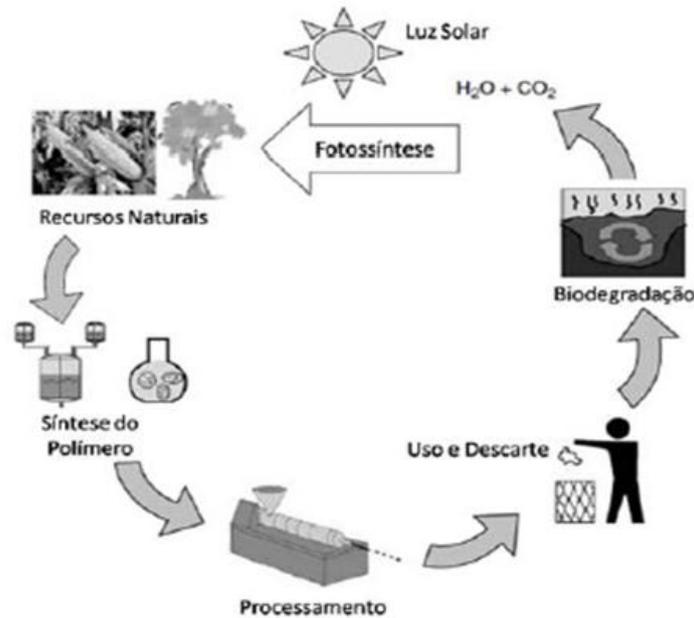


Figura 2: Ciclo de vida ideal dos polímeros biodegradáveis provenientes de fontes renováveis. Fonte: Brito et al., (2011).

2.3 Polihidroxialcanoatos

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são materiais de reserva de energia e carbono (TAJIMA et al., 2012; HAN et al., 2011; CHEN et al., 2011; ROA et al., 2010) acumulados por uma ampla variedade de microrganismos, como inclusões de poliésteres insolúveis (hidrofóbicas) na forma de grânulos intracelulares, podendo corresponder a 90% da massa celular, conforme ilustrado na Figura 3 (RYAN et al., 2013; TORREGO-SOLANA et al., 2012; MACAGNAN et al., 2012).

A síntese de PHA por bactérias em um meio nutritivo ocorre quando há excesso de fonte de carbono e a limitação de pelo menos um nutriente como nitrogênio, fósforo, enxofre, oxigênio, magnésio, potássio ou ferro, necessário à realização de sínteses metabólicas e crescimento (LEE et al., 2012; POBLETE-CASTRO et al., 2012; SILVA et al., 2007).

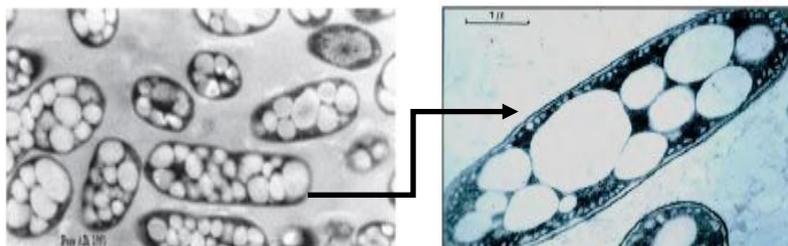


Figura 3: Células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável. Fonte: Adaptado Silva et al., (2007).

Mais de 100 diferentes unidades monoméricas já foram identificadas como constituintes dos PHAs armazenados por microrganismos (SHRIVASTAV, 2013; FACCIN, 2012; ROZO, 2011, CHEN, 2010). A Figura 4 apresenta a estrutura química geral de unidade monomérica de PHA, sendo os diferentes polímeros e copolímeros representados pelos diferentes tipos de radical R e número de “n”.

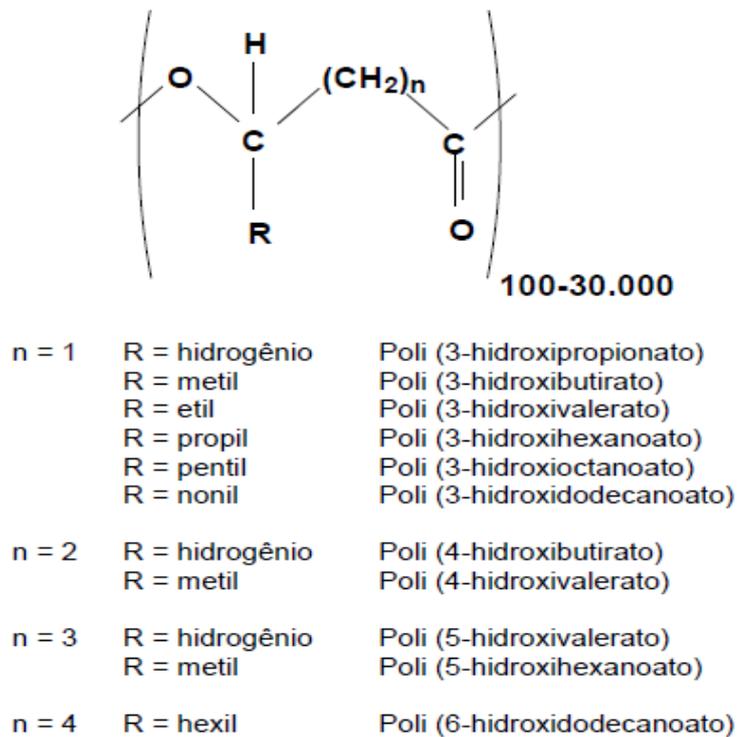


Figura 4: Estrutura geral dos polihidroxiacanoatos.
Fonte: Lee (1996)

O radical R pode variar de um único átomo de hidrogênio até tridecil (C13), podem conter insaturações, grupos aromáticos ou ainda ligações a elementos como flúor, cloro e cromo. Os PHAs possuem cadeias lineares, sendo que a polimerização acontece devido à ligação entre o grupamento carboxila de um monômero e o grupamento hidroxila de outro monômero, formando, então, o poliéster (FACCIN, 2012).

2.4 Metabolismo dos Polihidroxiacanoatos

Como já citado, anteriormente, os PHAs são materiais lipídicos acumulados por uma grande variedade de microrganismos na presença de fonte abundante de

carbono. As fontes de carbono assimiladas são bioquimicamente transformadas em unidades de hidroxialcanoatos, polimerizadas e armazenadas na forma de inclusões insolúveis em água no citoplasma da célula (BRITO et al., 2011), sendo compostos por um centro hidrofóbico contendo PHA na forma amorfa cercado por uma membrana formada por uma monocamada de fosfolípídios contendo proteínas catabólicas (Pha Polimerase e Pha depolimerase) e não catabólicas (fasinas) conforme ilustrado na figura 5 (FACCIN, 2012), despertando assim, grande interesse, pois são termoplásticos, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis pela agricultura. Suas propriedades permitem que sejam utilizados como substitutos dos plásticos convencionais, de origem petroquímica, em algumas aplicações (GAMAL et al., 2013).

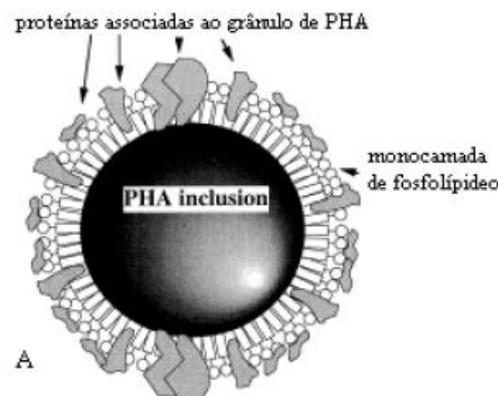


Figura 5: Representação do grânulo de PHA.
Fonte: Faccin (2012).

As propriedades do polímero, bem como suas aplicações, dependem de sua composição monomérica. Por outro lado, a produção de PHA depende da natureza química da matéria prima oferecida como fonte de carbono à bactéria, bem como das vias metabólicas que esta possui (MATSUDA, 2009; TAJIMA et al., 2011). A capacidade de realizar este processo de polimerização é dependente da presença de uma enzima conhecida como PHA sintase (BRITO et al., 2011).

O produto da PHA sintase é um poliéster cristalino de alta massa molar. Após isolamento, no entanto, ele um termoplástico cristalino com propriedades comparáveis as do polipropileno. Em diversas etapas do metabolismo, a partir da fonte de carbono, a bactéria pode gerar intermediários na forma de hidroxiacil-CoA,

os quais serão reconhecidos e polimerizados pela enzima PHA sintase, presente nas bactérias capazes de acumular estes materiais (Figura 6) (SILVA et al., 2007). Assim, tanto a especificidade das vias metabólicas geradoras do hidroxiaxil-CoA como da PHA sintase, podemos impedir ou favorecer a combinação de certos monômeros em uma mesma cadeia polimérica ou, ainda, restringir a quantidade de um determinado monômero que pode ser incorporado ao PHA (STRELEC, 2006; RODRIGUEZ, 2012, ROZO, 2011).

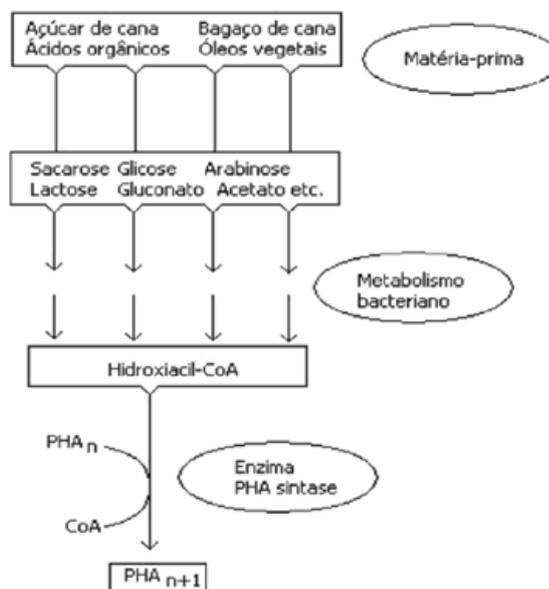


Figura 6: Fatores que influenciam na síntese de PHA por bactérias.
Fonte: Silva et al., (2007).

A PHA sintase é a enzima chave para a biossíntese de PHA e catalisa a ligação dos monômeros por transesterificação (CHEN et al., 2012; TORREGO-SOLANA et al., 2012), uma vez que sua especificidade pelo substrato definirá a natureza do polímero final. Quatro classes de PHA sintases já foram descritas de acordo com as diferenças na estrutura protéica, no número de subunidades e pela especificidade do substrato (RODRIGUEZ, 2012; ROZO, 2011; MATSUDA, 2009; STRELEC, 2006), das quais são destacadas aqui as PHA sintases da classe I, capazes de polimerizar unidades de hidroxiaxil-CoA com cadeia curta (3-5 átomos de carbono) e as de classe II, específicas para monômeros de cadeia média (6-14 átomos de carbono) (THOMSON et al., 2013; TAJIMA et al., 2012).

Definem-se assim dois grandes grupos de PHA gerados por estas enzimas: PHA_{scl} (“short chain length”) e PHA_{mcl} (“medium chain length”) (JIN e NIKOLAU,

2012; FACCIN, 2012). Enquanto o primeiro grupo apresenta propriedades termoplásticas, o segundo apresenta-se como elastômero, o que diferencia suas aplicações. Assim, há grande potencial para produzir PHA bacterianos com diferentes composições e propriedades diversas. Mais de 150 hidroxialcanoatos distintos já foram identificados como constituintes de PHA bacterianos (KAN et al., 2012; CHEN et al., 2012; FACCIN, 2012). Por esta razão, o domínio sobre o processo de síntese pode permitir a produção de PHA sob medida para as aplicações que se desejar.

Com base nesta diferenciação, é observado na Tabela 1 que as PHA sintases da classe I são encontradas em diversas bactérias heterotróficas e nas púrpuras não fototróficas do enxofre, como a *Ralstonia eutropha*, atualmente denominada de *Cupriavidus necator* (RODRIGUEZ, 2012; ROZO, 2011), consistem de um único polipeptídeo, codificado pelo gene *phaC* e apresentam especificidade por HA_{SCL}. PHA sintases da classe II são encontradas em *Pseudomonas*, constituem-se de um único polipeptídeo e apresentam especificidade por HA_{MCL}. A classe III de PHA sintases é encontrada em bactérias púrpuras do enxofre e em algumas cianobactérias, sendo representadas pela *Allochromatium vinosum* (ROZO, 2011; MATSUDA, 2009). Compreende enzimas com especificidade para HA_{SCL}, constituídas de duas subunidades polipeptídicas (*phaC* e *phaE*). A quarta classe de PHA sintases é encontrada em bactérias do gênero *Bacillus* sp e também são constituídas de duas subunidades proteicas (*phaC* e *phaR*) como as de classe III, apresentando, entretanto, uma das subunidades muito menor (RODRIGUEZ, 2012; ROZO, 2011; MATSUDA, 2009; , STRELEC, 2006).

Tabela 1- Classes de PHA sintases

Classe	Subunidades	Espécies	Substrato
I	PhaC ~60-73 kDa	<i>Ralstonia eutropha</i>	3HA _{SCL} -CoA (~C ₃ a C ₅) 4HA _{SCL} -CoA 5HA _{SCL} -CoA, 3MA _{SCL} -CoA
II	PhaC ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA _{MCL} -CoA (~≥C ₅)
III	PhaC - PhaE ~40 kDa ~40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA _{SCL} -CoA 3HA _{MCL} -CoA (~C ₆ a C ₈) 4HA-CoA, 3HA-CoA
IV	PhaC - PhaR ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{SCL} -CoA

Fonte: Matsuda (2009).

Os PHAs produzidos por bactérias são termoplásticos completamente degradáveis (BRITO et al., 2011) que normalmente apresentam alta massa molar, são altamente cristalinos, são ópticamente ativos e isotáticos, apresentam características piezoelétricas e são insolúveis em água. Por causa do conjunto particular de propriedades, são potenciais substitutos do polipropileno em várias aplicações (FINKLER, 2006).

Contudo, em função da alta cristalinidade, os PHAs não são flexíveis o suficiente para formar filmes e tendem a ser quebradiços, o que compromete sua propriedade de barreira ao vapor d'água. Estas limitações podem ser contornadas pelo melhoramento das formulações de misturas com outros polímeros e/ou aditivos (FINKLER, 2006). O primeiro polímero da família dos PHA a ser estudado foi o homopolímero poli-hidroxibutirato (PHB), cujas propriedades termoplásticas foram logo em seguida modificadas pela produção do copolímero de poli-hidroxibutirato e hidroxivalerato (PHB-co-HV) (RYAN et al., 2013; TAJIMA et al., 2012; CHEN et al., 2011; MATIAS E RODRIGUES, 2011).

2.5 Histórico e Indústria dos Biopolímeros

De todos os PHAs conhecidos, o poli-hidroxibutirato (PHB) é o mais estudado e caracterizado, uma vez que foi o primeiro a ser descoberto e também o mais amplamente encontrado em bactérias (FONSECA, 2003)

Lemoigne, no Instituto Pasteur, em 1925, foi o primeiro pesquisador a descrever o bioplástico, identificado como poli(3-hidroxibutirato), sendo então marcada a descoberta do PHB, extraído de *Bacillus megaterium*. Esta primeira observação foi praticamente esquecida até meados da década de 1970, quando, devido à crise do petróleo, foi criado um movimento científico que visava descobrir fontes alternativas de combustíveis, e, com isso, colocou-se em destaque o tema (SILVA et al., 2007; FONSECA, 2003).

Em 1976, a empresa *Imperial Chemical Industries* (ICI) iniciou a avaliação do PHB, objetivando sua produção e comercialização, porém os primeiros resultados demonstraram que era um material de dureza elevada e quebradiço. Assim, a

primeira produção industrial de PHAs ocorreu em 1982, onde foi depositada a patente do produto, descrevendo o processo de produção sob o nome industrial BIOPOL[®] (copolímero PHBV), a partir da bactéria *Cupriavidus necator*. E em 1990, foi lançado o primeiro produto comercial baseado em PHAs; era um frasco de shampoo da Wella, na Alemanha. Atualmente, a produção da ICI é comercializada pela Monsanto (VOAIDES et al., 2010; MATSUDA, 2009; FONSECA, 2003).

Em 1992, teve início no Brasil o desenvolvimento de tecnologia para produção de bioplásticos empregando matéria-prima de baixo custo, como a cana-de-açúcar, por meio da parceria entre COPERSUCAR, Instituto de Pesquisas Tecnológicas e Universidade de São Paulo (SILVA et al., 2007; CARASCHI et al., 2002). Em 1996, a empresa Monsanto adquiriu o processo de produção do BIOPOL[®], focando suas investigações em culturas geneticamente modificadas, e, em 2001, o processo BIOPOL[®] foi vendido para a *US Biotechnology Company Metabolix*, empresa que comercializa e investe em pesquisas para produção de bioplástico a partir de fontes renováveis de carbono (KRUEGER, 2009).

Em 2000, a empresa brasileira PHB Industrial S.A. começou a produção em maior escala do bioplástico, denominado BioCycle[®], o qual é produzido a partir de sacarose extraída da cana-de-açúcar. Os estudos de fermentação para a produção de polímero iniciaram-se em 1992, e em 1995 foi implantada uma planta piloto para testar a rota de produção desenvolvida em laboratório, com capacidade de 5 toneladas/ano. Já em 2000, a estrutura foi adequada para a produção de 50 toneladas/ano, e a próxima etapa da empresa é o desenvolvimento e implantação de 30.000 toneladas/ano (BOIN et al., 2009; KRUEGER, 2009).

2.6 Poli-hidroxitirato (PHB)

Segundo Brito et al., (2011) o mais conhecido dentre os polímeros dessa família é o poli-3-hidroxitirato (P(3HB)), que é acumulado por bactérias pertencentes aos mais diferentes gêneros. O P(3HB) despertou interesse industrial já na década de 60, quando foram descobertas suas propriedades termoplásticas semelhantes às do polipropileno (CH'N e SUDESH, 2013; BOIN et al., 2009).

O poli-3-hidroxi-butirato, constituído por monômeros de 3-hidroxi-butirato, é o PHA melhor caracterizado e acumulado com maior frequência por bactérias (CHEN et al., 2011; CHEN, 2010; MACHADO et al., 2010; MATSUDA, 2009). É produzido através de culturas bacterianas, com frequente utilização da bactéria *Cupriavidus necator*. A biossíntese deste polímero permite um processo cíclico sustentável através de fontes renováveis e seus copolímeros são poliésteres biodegradáveis sendo totalmente degradado a CO₂ e água por uma enorme quantidade de fungos e bactérias (RAICHER, 2011).

Segundo Roa et al., (2010) o P(3HB) é um material altamente cristalino e duro, é quebradiço e tem qualidades elásticas muito pobres. Os copolímeros são mais dúcteis, mais fáceis de moldar e mais resistentes, quando comparados com o homopolímero P(3HB). As misturas de P(3HB) com outros polímeros biodegradáveis, tais como polilactatos e poli(ε-caprolactona), contornam os problemas de rigidez e fragilidade excessivas do P(3HB), possibilitando seu uso (MATSUDA, 2009; FINKLER, 2006; CARASHI et al., 2002).

Algumas propriedades dos biopolímeros P(3HB), P(4HB) e copolímeros P(3HB-co-3HV) são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades dos Polímeros

P(3HB-co-3HV)	Ponto de Fusão (°C)	Rigidez (GPa)	Resistência à Pressão (MPa)	Resistência ao Impacto (J/m)
3% mol de HV	170	2,9	38	60
9% mol de HV	162	1,9	37	95
14% mol de HV	150	1,5	35	120
20% mol de HV	145	1,2	32	200
25% mol de HV	137	0,7	30	400
P(3HB)	179	3,5	40	50
P(4HB)	53	149	104	---
Polipropileno	170	1,7	34,5	45
Poliestireno	110	3,1	50	21

Fonte: Raicher (2011).

A incorporação de unidades de 3HV, obtendo-se o copolímero P3HB-co-3HV, permite a obtenção de materiais com propriedades melhores (MATSUDA, 2009; ROA et al., 2010). O P3HB-co-3HV com baixa incorporação de 3HV é duro e

quebradiço, assemelhando ao poliestireno; com uma média incorporação de 3HV, tem flexibilidade e dureza semelhantes às do polipropileno e com altos níveis de incorporação das unidades de 3HV, o polímero assemelha ao polietileno (Tabela 2) (TAJIMA et al., 2011; RAICHER, 2011).

Vários estudos importantes têm sido realizados na tentativa de reduzir a fragilidade desse material. Alguns desses estudos baseiam-se na obtenção de copolímeros com unidades de hidroxivalerato, que apresentam menor cristalinidade e melhores propriedades mecânicas que o P(3HB). Outros estudos baseiam-se na mistura física com diversos outros polímeros biodegradáveis e sintéticos (RAICHER, 2011).

O PHB pode ser usado na fabricação de embalagens para produtos de limpeza e de higiene, cosméticos e produtos farmacêuticos. Além disso, por ser biocompatível e facilmente absorvido pelo organismo humano, pode ser empregado na área médica-farmacêutica, prestando-se à fabricação de fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas que liberam gradualmente medicamentos na corrente sanguínea (BORSCHIVER, et al., 2008; CARASCHI et al., 2002).

Algumas dessas propriedades são comparadas com as propriedades do polipropileno (PP) na Tabela 3 (RAICHER, 2011).

Tabela 3 - Principais características dos polímeros poli-3-hidroxi-butarato, polihidroxi-octanoato e polipropileno

Característica	P(3HB)	PHO	PP
Ponto de Fusão	180 °C	61 °C	176 °C
T _g	5 °C	-35 °C	-10 °C
Densidade	1.18 – 1.25 g/cm ³	1.02 g/cm ³	0.905 g/cm ³
Cristalinidade	70%	25%	70%
Permeabilidade ao oxigênio	45	---	1700
	(cm ³ /m ² /dia)	(cm ³ /m ² /dia)	(cm ³ /m ² /dia)
Transmissão de vapor	60-70(g/cm ² /dia)	3,5	40
Módulo de Young	3500MPa	8MPa	1700MPa
Tensão de Cisalhamento	40MPa	9MPa	38MPa
Resistência à ruptura	5%	380%	400%
Peso molecular	1-8.10 ⁻⁵	---	2.2-7.10 ⁻⁵

Fonte: Raicher (2011).

Observa-se que a introdução de hidroxivalerato (HV) na cadeia polimérica provoca enorme impacto sobre as propriedades finais do material, o que pode justificar o uso do co-monômero para ajuste de grades. Em particular, observa-se que a introdução de cerca de 10% de HV resulta em um material muito parecido com o polipropileno (FACCIN et al., 2012; MATSUDA, 2009).

2.7 Poli-hidroxitirato-co-hidroxivalerato (PHB-co-HV)

Apesar de ser biodegradável e termoplástico, as propriedades do homopolímero PHB fazem com que seja quebradiço, o que limita suas aplicações. A inserção de unidades de 3-hidroxivalerato (HV), compostas por cinco átomos de carbono dá origem ao copolímero PHB-co-HV, com propriedades tais que lhe conferem maior maleabilidade (SHAMALA et al., 2012; SILVA et al., 2007). Embora existam linhagens bacterianas capazes de sintetizar PHB-co-HV a partir de carboidratos, elas apresentam baixa eficiência. Assim, processos de produção do copolímero economicamente viáveis são conseguidos apenas com o uso de precursores como ácido propiônico (RAICHER, 2011; SILVA et al., 2007).

Em relação ao processamento, o PHB e o PHBV são os dois tipos mais conhecidos de PHAs, outros tipos estão ainda em estágio de desenvolvimento e suas tecnologias de processamento industrial não são bem conhecidas (BRITO et al., 2011). A Tabela 4 apresenta alguns dos produtores do PHA distribuídos em diferentes partes do mundo.

Tabela 4 – Produtores comerciais do PHA

Nome Comercial	Fornecedor	Origem	Website
Biopol	Monsanto – Metabolix	EUA	www.monsanto.com
Mirel	Metabolix/ADM	EUA	www.metabolix.com
Biocycle	PHB Industrial S/A	Brasil	www.biocycle.com.br
Enmat	Tianan	China	www.tianan-enmat.com
Biomer L	Biomer	Alemanha	www.biomer.de
Nodax	Procter & Gamble	EUA	www.pg.com

Fonte: Brito et al., (2011).

2.8 Diversidade bacteriana na produção de Polihidroxicanoatos

Os PHAs são acumulados naturalmente por inúmeras bactérias, incluindo grupos taxonômicos diferentes como bactérias fototróficas, arqueobactérias, bactérias gram-positivas e negativas, bactérias aeróbias e anaeróbias (FACCIN, 2012).

São conhecidos mais de 300 microrganismos sintetizadores de PHAs, mas são poucos os efetivamente empregados na sua produção, incluindo *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas* sp., e *Escherichia coli* recombinantes (CHEN, 2010; KRUEGER, 2009). Os microrganismos empregados na produção de PHAs devem ser eficientes em cultivos com alta densidade celular, acumular alta concentração de polímero em um período relativamente curto, resultando em alta produtividade, um fator indispensável para diminuir os custos de produção deste biopolímero (MACAGNAN, et al., 2012).

Os microrganismos produtores de PHAs podem ser divididos em 2 grupos, baseados nas condições de cultura: os dependentes ou não dependentes de limitação de nutrientes para a produção de PHAs. Em ambos os grupos, o excesso de carbono é necessário. Dos que apresentam limitação de nutrientes, tem como representantes, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans* e *Chromobacterium violaceum*. Pertencentes ao outro grupo, citam-se *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e *Escherichia coli* recombinante, os quais acumulam polímeros durante a fase de crescimento (FACCIN, 2012; KRUEGER, 2009; FONSECA, 2003).

Grande parte da diversidade microbiana, sobretudo de arqueobactérias e eubactérias, nunca foram isoladas e cultivadas em laboratórios pelas técnicas microbiológicas convencionais. Este é um dos principais fatos que fazem acreditar que importantes produtos ainda virão da bioprospecção de microrganismos (STRELEC, 2006).

Atualmente existem pelo menos 75 gêneros diferentes de microrganismos já conhecidos produtores de poli-3-hidroxi-butirato P(3HB) (FINKLER, 2006). *Ralstonia eutropha*, atualmente denominada *Cupriavidus necator* (LEE et al., 2011) é o organismo mais usado para a sua produção porque cresce facilmente e acumula

grande quantidade de biopolímero (acima de 80 % do peso seco). A fisiologia e a bioquímica das reações para síntese de P(3HB) são bem compreendidas para diferentes microrganismos (KHAN et al., 2013; FINKLER, 2006). A bactéria *Cupriavidus necator* possui uma única enzima PHA sintase, que incorpora hidroxialcanoatos (HAs) de comprimento de cadeia curta (3 a 5 átomos de carbono). *Pseudomonas oleovorans* possui duas isoformas de PHA sintases, que incorporam preferencialmente compostos alifáticos insaturados e substitutos de 3HA de comprimento de cadeia médio (6 a 14 átomos de carbono). A PHA sintase de *Thiocapsa pfennigii* apresenta a mais diversificada faixa de substratos que podem ser transformados em PHA, ou seja, menor especificidade, dentre as PHA sintases investigadas (MATIAS e RODRIGUEZ, 2011; FINKLER, 2006).

Vários outros microrganismos como *Bacillus megaterium*, *Azotobacter beijerinckii*, *Rhizobium*, *Nocardia*, *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes latus*, sintetizam PHAs (KRUEGER, 2009; FACCIN, 2012). Os microrganismos que também acumulam P(3HB) em alguma quantidade são dos gêneros: *Actinomycetes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Chlorogloea*, *Chromatium*, *Derxia*, *Ferrobacillus*, *Hyphomicrobium*, *Lampropaedia*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Sphaerotilus*, *Spirillum*, *Streptomyces*, *Vibrio* e *Zoogloea*, além das linhagens selvagens de cianobactérias, como *Synechococcus* sp MA19 (FACCIN, 2012; FINKLER, 2006).

2.9 Aplicações de Biopolímeros

A contribuição que microrganismos têm dado para o desenvolvimento de biotecnologias abrange diversas aplicações, como: a produção de compostos químicos (etanol, ácido acético, biogás, plásticos biodegradáveis, indústria de alimentos e farmacêutica, etc.); produtos para a agricultura (bioinseticidas, inoculantes agrícolas, etc.); enzimas para diversos setores industriais, com destaque para a indústria de detergentes e alimentícia; compostos de interesse médico e veterinário (antibióticos, antitumorais, imunossupressores, inibidores enzimáticos, antiparasitários, etc.) (STRELEC, 2006).

A composição monomérica, ao lado da massa molecular e da distribuição de massas moleculares do polímero, é responsável pelas propriedades físicas e mecânicas destes materiais. Uma vez que PHA apresentam propriedades termoplásticas, diversas aplicações podem ser mencionadas desde a produção de embalagens para produtos de higiene, vasilhames para fertilizantes, vasos para mudas de plantas, brinquedos, cosméticos, produtos farmacêuticos e médicos, como fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas para liberação controlada de fármacos, entre outros (CHEN, et al., 2011; MATSUDA, 2009).

Podem ser citadas ainda, como aplicações dos PHAs, a formulação de biocompósitos para o desenvolvimento de dispositivos com uma resistência mecânica semelhante ao osso natural, tal que ele possa ser integrado à estrutura óssea como um desafio atual no desenvolvimento dos mesmos para uso ortopédico e odontológico (PEREIRA et al., 2013); o uso de um biopolímero na forma de gel para o tratamento de olhos eviscerados, vem sendo utilizado como modelo experimental em coelhos (CORDEIRO-BARBOSA et al., 2012).

Roa e colaboradores (2010), afirmam que o fato de o PHA ser obtido de fontes renováveis, facilmente biodegradado em solos de compostagem, biorreabsorvível e biocompatível, pode ser usado em implantes médicos ou como substrato para crescimento celular.

Os polihidroxialcanoatos foram inicialmente utilizados para a produção de garrafas, filmes e fibras para embalagens biodegradáveis e como filmes envoltórios de adubo para agricultura (FINKLER, 2006; FONSECA, 2003). Todavia, sendo biomateriais, podem ser usados de forma direta, como suplemento, ou de modo a substituir as funções dos tecidos vivos do corpo humano, uma vez determinada a sua biocompatibilidade com o hospedeiro. Combinados a outros biomateriais podem ser utilizados em enxerto de ossos para preencher os defeitos ou substituir os ossos fraturados (MATSUDA, 2009) ou em placas de ligação e suturas cirúrgicas (YANG et al., 2004).

Podem ser aplicados como matriz em materiais retardantes para a liberação controlada de drogas, hormônios, herbicidas, inseticidas, flavorizantes e fragrâncias na medicina, agricultura, indústria farmacêutica e indústria de alimentos (FALCONE

et al., 2007; FONSECA, 2003) ou atuarem como matéria-prima para a síntese de enantiômeros químicos puros e na produção de tintas (BRITO et al., 2011; SILVA et al., 2007). Os polihidroxicanoatos apresentam ainda potencial para aplicações terapêuticas. Polímeros contendo monômeros na forma 4-hidroxi-butarato, P(4HB), são empregados na forma de sais de sódio como anestésico (CH'N e SUDESH, 2013).

Uma das aplicações mais comuns dos PHAs é a produção de embalagens e frascos para diferentes produtos, sobretudo cosméticos. Por causa de suas propriedades, o P(3HB) e copolímeros como P(3HB-co-3HV) têm sido também utilizados para a produção de frascos para o transporte de líquidos, gases e vapores (BRITO et al., 2011; CHEN, 2010). No Brasil, a Plasvale juntamente com a PHB Industrial tem iniciado estudos de produção de potes com tampa a partir de PHB (SILVA et al., 2007). Essas aplicações normalmente requerem alta rigidez e alto brilho, sendo que as características ecologicamente corretas do P(3HB), como biodegradabilidade e obtenção a partir de recursos renováveis, conferem ao produto embalado um diferencial mercadológico importante.

As propriedades de P3HB-co-3HHx (poli-hidroxi-butarato-co-hidroxi-hexanoato) também conferem maior biocompatibilidade, tornando-o promissor para aplicações como suporte ou molde para uso em engenharia de tecidos. Seu uso tem sido reportado na confecção de tecidos cartilagosos híbridos (YE et al., 2009; YANG et al., 2002), em culturas de células ósseas (YANG et al., 2004), válvulas aórticas híbridas (WU et al., 2007), como moldes para crescimento de células musculares em estruturas microtubulares uniaxiais (CHEN et al., 2011) ou em tecidos cardiovasculares (SUN et al., 2009). A utilização deste copolímero com associações visando aumentar a biocompatibilidade tem sido descrita. Exemplos recentes são a associação ao malato (Ma-P3HB-co-3HHx (LI et al., 2007) ou à hidroxiapatita mostrando-se promissor para a reconstrução óssea (XI et al., 2008). Em outro trabalho divulgado, observa-se o desenvolvimento de uma membrana porosa contendo uma resina de poliésteres alifáticos, entre os quais estão contemplados os polímeros contendo 3-hidroxi-hexanoato. Estas membranas porosas apresentam potencial aplicação no campo de artigos absorventes, como fraldas. Nestes artigos,

estas membranas porosas são amplamente empregadas como revestimento para prevenir o encharcamento durante o uso (WANG et al., 2006).

Os PHAs também podem ser usados para a preparação de microcápsulas ou nanocápsulas para aplicações médicas e farmacológicas. Isto permite que o princípio ativo seja liberado lentamente, prolongando sua ação (FALCONE et al., 2007). Uma outra aplicação muito interessante dos PHAs é na engenharia tissular, para a fabricação de próteses e outros componentes médicos, em concordância com suas propriedades biocompatíveis (GUMEL et al., 2012). Para estes tipos de aplicação, cinco propriedades são requeridas: biocompatibilidade, manutenção do crescimento celular, capacidade de organizar as células na forma prevista e desejada ao redor da prótese, permitir o desenvolvimento tissular e não gerar produtos tóxicos durante a degradação (MATSUDA, 2009; FINKLER, 2006).

2.10 Biodegradação dos polihidroxialcanoatos

Uma importante característica dos PHAs é a sua biodegradabilidade. Na natureza, vários microrganismos podem degradar PHAs pelo uso de PHA hidrolases e PHA depolimerases. As atividades destas enzimas podem variar e dependem da composição do polímero, sua forma física (amorfa ou cristalina), das dimensões das amostras e das condições ambientais (SILVA et al., 2007).

Polímeros biodegradáveis podem ser definidos como aqueles que sofrem degradação macromolecular *in vivo*, por ação de enzimas, microrganismos ou células (VILLANOVA et al., 2010). O termo biodegradação descreve os processos envolvendo quebra de cadeia e modificações da massa molar e da solubilidade do polímero (BRITO et al., 2011). Processos biológicos, físicos e químicos, podem atuar na biodegradação.

A biodegradabilidade dos polímeros é um atributo explorado na modulação da liberação de fármacos, uma vez que é altamente desejável que um material introduzido no organismo desapareça depois de cumprida sua função, sem a necessidade de intervenções para sua retirada. Os produtos de degradação

formados são metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs, ou são excretados na urina (RAICHER, 2011).

O tempo de degradação do produto formado por P(3HB) é da ordem de poucos meses quando submetidos à digestão anaeróbica (Figura 7), e a anos quando lançados à água do mar (MADISON e HUISMAN, 1999 apud FINKLER, 2006).



Figura 7: Embalagens de P(3HB-co-3HV) degradada em lodo ativado aeróbico durante 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas.

Fonte: Madison e Huisman (1999) apud Finkler (2006).

A biodegradação dos polímeros, conforme observado na Figura 8, ocorre por dois mecanismos distintos, dependendo da natureza do polímero e do ambiente: pode ocorrer tanto na presença como na ausência de oxigênio, biodegradação aeróbica e anaeróbica respectivamente (BRITO et al., 2011; RAICHER, 2011).



Figura 8: Duas réguas utilizadas em um teste caseiro de biodegradabilidade durante 6 meses.

Fonte: Raicher (2011).

2.11 Caracterização do Ambiente Amazônico

A bacia amazônica de formação terciário-quadernária é a maior do mundo, drenando aproximadamente 1/4 da América do Sul, cerca de 6.217.220 km², escoando cerca de 1/5 de água doce do planeta e estendendo-se desde as porções da Cordilheira Andina (MIGUEIS, 2011).

Abrange terras do Brasil, na sua maior parte, Bolívia, Colômbia, Equador, Guianas, Peru, Suriname e Venezuela, além de um território (Guiana Francesa) (NORONHA, 2010). De acordo com Migueis (2011), a bacia amazônica possui os dois maiores arquipélagos fluviais do mundo, Arquipélago de Mariuá, com mais de 700 ilhas localizadas no rio Negro e o Arquipélago de Anavilhanas, também no rio Negro, com aproximadamente 400 ilhas; o maior conjunto de rios do planeta, aproximadamente 1.700 rios; a maior reserva biológica inundada de várzea do mundo, a Reserva Mamirauá; a maior ilha flúvio-marinha do mundo, a ilha de Marajó na foz do rio Amazonas; e o maior rio do mundo, o Rio Amazonas, tanto em volume quanto em extensão.

Para Noronha (2010), vários fatores contribuem para a existência de tamanha rede hidrográfica. Um deles é a quantidade de chuvas que ocorrem na região aliada à sua localização. Cortada pela linha do Equador acaba se beneficiando do verão que ocorre nos dois hemisférios. Quando é verão no norte, os rios desse hemisfério (margem esquerda do Rio Amazonas) é quem ficam cheios, devido ao aumento no índice de precipitação nesta estação. O mesmo ocorrerá ao sul quando for verão. A Bacia Amazônica está sujeita ao regime de interferência, e, portanto, têm contribuintes dos hemisférios Norte e Sul, coincidindo a cheia de um hemisfério com a vazante do outro (SOUZA E CASTELLÓN, 2012).

Souza e Castellón (2012), afirmam que os fenômenos ecológicos que ocorrem nos ecossistemas aquáticos tropicais, e em particular na região Amazônica, são influenciados pela grande oscilação do nível das águas que propiciam um dinâmico processo de interação entre os ecossistemas aquáticos e terrestres. Por outro lado, os processos geológicos, como o intemperismo, erosão, transporte de sedimentos, entre outros, estão associados à precipitação e evapotranspiração,

intensos na Amazônia, contribuem para a formação da densa rede de drenagem perene na região. Dentre esses ecossistemas, os igarapés são microssistemas fundamentais das bacias de drenagem e representam um sistema muito complexo de diferentes habitats e, devido ao seu pequeno volume de água, tornam-se vulneráveis aos impactos ambientais naturais ou induzidos. O desmatamento e a poluição alteram a sua hidrologia e hidroquímica e as comunidades animais e vegetais são atingidas.

A Bacia Amazônica possui uma grande variedade de corpos d'água. Há águas de rios que nascem em diferentes tipos de terreno e por isso, apresentam composições físico-químicas, químicas e biológicas diferentes (SOUZA E CASTELLÓN, 2012). Sendo assim, a limnologia amazônica é riquíssima em rios que apresentam características próprias quanto à coloração em função dos diversos tipos de terrenos que são drenados e moldados. Assim, encontramos os rios de águas brancas: são águas de rios que tem sua origem nos Andes, são turvas, ricas em nutrientes, pouco ácidas a neutras. Exemplo os Rios Amazonas, Purus, Madeira e Juruá etc.; águas pretas: os rios que apresentam essa coloração, nascem em terrenos de rochas cristalinas; são escuras e transparentes, pobres em nutrientes dissolvidos e são muito ácidas. Exemplo os Rios Negro, Urubu etc.; e águas claras: são rios que apresentam água cristalina ou de cor esverdeada, transparentes, com composição química variável. Exemplos clássicos são o Rio Xingu (água cristalina) e, o mais famoso dos exemplos, Rio Tapajós (águas esverdeadas) (SOUZA E CASTELLÓN, 2012).

Neste estudo, o trabalho foi desenvolvido no Rio Madeira, rio classificado como rio de água branca ou barrenta, que de acordo com Migueis (2011), os rios de águas brancas apresentam as seguintes características: são originados das regiões andinas e subandinas que datam do Mesozóico; apresentam-se em forma de meandros pelas planícies aluviais, formando os “sacados” e “lagos de ferradura”; riqueza em sais minerais, nutrientes e matéria orgânica obtida dos solos eutróficos de suas cabeceiras; grande desenvolvimento da fauna e flora aquáticas (peixes, insetos, animais, plantas aquáticas submersas, limnoplânctons); grande concentração de sedimentos argilosos em suspensão responsáveis pelos sedimentos nas várzeas, restingas e lagos ribeirinhos; água rica em sais minerais

dissolvidos com alta percentagem de cálcio e magnésio, cujo pH em torno de 6,5 a 7, ou seja, quase neutra ou pouco ácida; presença de ilhas de várzeas de solos férteis e eutróficos, formados pela sedimentação e colmatagem, com renovação e reciclagem de nutrientes e matéria orgânica por meio dos ciclos das cheias e vazantes, com alta produtividade agrícola.

Segundo Noronha (2010), o Rio Madeira é considerado o mais importante afluente da margem direita do rio Amazonas. Tem seus formadores que nascem nos Andes e nos Planaltos Andinos (Rio Beni e Madre de Dios) e Planalto Central (Rio Guaporé). Apresenta uma extensão, da confluência dos rios Mamoré e Guaporé com o Rio Beni, de 1.425 km. Sua bacia drena uma área aproximada de 1,5 milhão de Km², dos quais 7% no Peru, 45% na Bolívia e 48% no Brasil (Acre, Amazonas, Mato Grosso e Rondônia).

Navegável o ano todo, com largura variável entre 40 a mais de 1.700 metros, embora no período da vazante, pelo aparecimento das pedras e pelo assoreamento, merece ser dragado evitando acidentes com embarcações, principalmente no período noturno. Deságua no rio Amazonas a 50 km a montante do município de Itacoatiara. Seu nome vem das árvores que descem o rio que porque são arrancadas das margens nas cheias, expondo o perigo para a navegação. (MIGUEIS, 2011).

Essa alta complexidade do rio Madeira se aplica também a populações de microrganismos que habitam essas águas, sobretudo as bactérias com potencial biotecnológico para a produção de inúmeras substâncias, tais como; antimicrobianos, biopolímeros, e outros.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial de produção de biopolímeros por bactérias isoladas do Rio Madeira isoladas no município de Autazes/AM.

3.2 Específicos

Reativar bactérias do Rio Madeira buscando conhecer a biodiversidade existente;

Selecionar dentre os isolados, bactérias capazes de produzir biopolímeros;

Estudar a variabilidade genética das bactérias do Rio Madeira; e

Avaliar os tipos de biopolímeros produzidos pelas bactérias do Rio Madeira.

CAPÍTULO I

POTENCIAL DE BACTÉRIAS DO RIO MADEIRA NA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS

Potencial de bactérias do rio madeira na produção de biopolímeros

Ferreira¹, E.M.; PROCOPIO¹, R.E.L.; PROCÓPIO², A.R.L.

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - Univ. do Estado do Amazonas, Brasil, Manaus.

²Instituto de Ciências Biológicas, FAMETRO, Brasil, Manaus.

Resumo

Grandes problemas ambientais ocorrem devido ao uso excessivo de plásticos derivados do petróleo, principalmente devido sua rápida descartabilidade, e lenta degradação, afetando a qualidade de vida da população atual, surgindo a necessidade de se buscarem alternativas para substituição deste material. Apresentam-se como solução os polihidroxicanoatos (PHAs), uma grande família de poliésteres, intracelulares, acumulados na forma de grânulos por diversas bactérias a partir de substratos de fontes renováveis, como reserva de carbono e/ou energia, sob limitação de um nutriente essencial ao seu crescimento. O objetivo deste trabalho é selecionar bactérias capazes de produzir PHA, da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Programa de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, da Universidade do Estado do Amazonas – MBT/UEA. Inicialmente, 140 isolados coletados no Rio Madeira localizado no município de Autazes/AM em 2010, foram reativados e purificados em meio Nutriente Agar e induzido a produção de PHAs em Meio Mineral. Para a seleção de linhagens com potencial de produção de biopolímeros, dos 140 isolados corados com Sudan Black, 47 mostraram-se positivos para a coloração dos polihidroxicanoatos. Destes, 08 isolados foram selecionados, por apresentarem maiores alterações morfológicas da célula quando visualizados em microscópio, sugerindo potencial para produção de biopolímeros. Para elucidar qualitativamente os PHAs produzidos pelos 08 isolados, foi utilizada a massa celular liofilizada realizando a metanólise para a extração do biopolímero. Em seguida, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa. Como resultados, dos 08 isolados identificados com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA, foram encontradas espécies pertencentes à três gêneros: *Bacillus*, *Brevibacterium* e *Lysinibacillus*, sendo o gênero *Bacillus* o mais significativo, além de apresentarem características desejáveis para a produção de PHA, como o curto tempo de geração, crescem facilmente até alcançar um alta densidade celular, utilizam fonte de carbono e nitrogênio de baixo custo. Todos os isolados identificados são Gram-positivas, oferecendo a vantagem da falta de LPS e proteínas de excreção, o que os tornam bons candidatos como produtores de PHA para aplicações biomédicas. A análise cromatográfica revelou um polímero constituído principalmente de monômeros 3-hidroxi-butirato (HB). Vale ressaltar, que sobre o gênero *Brevibacterium* existem pouquíssimos trabalhos publicados relatando a produção de biopolímeros e quanto ao gênero *Lysinibacillus*, não foi relatado nada sobre a produção de biopolímeros, até o momento. Estes resultados demonstram a importância de trabalhos de bioprospecção com o objetivo de detectar bactérias produtoras de PHA.

Palavras-chave:

Biopolímeros. Polihidroxicanoatos. Rio Madeira. *Bacillus* sp. Polihidroxi-butirato.

1 INTRODUÇÃO

Com a maior conscientização global em relação à segurança do meio ambiente, houve uma preocupação com a disposição final de resíduos (BRITO et al., 2011; SILVA et al., 2007). Neste contexto, os polímeros petroquímicos aparecem como protagonistas. A cada ano o consumo de polímeros que são materiais versáteis de grande qualidade para aplicação nos mais variados produtos, aumenta (KHAN et al., 2013). No entanto, a dificuldade da correta disposição final deste tipo de material vem cada vez mais se tornando um problema, sobretudo quando pensamos em produtos e embalagens descartáveis (RODRIGUEZ, 2012).

Os polihidroxicanoatos (PHA) são uma classe de biopolímeros que surgem como alternativa a polímeros petroquímicos em algumas aplicações (LEE et al., 2012; POBLETE-CASTRO et al., 2012; KAWASHIMA et al., 2012). Eles são poliésteres sintetizados por microrganismos e são completamente biodegradáveis. A diversidade de PHA existente possibilita uma variada gama de propriedades, podendo apresentar características que vão de termoplásticos a elastômeros e tendo, assim, potencial para utilização em muitas aplicações (FACCIN, 2012; SILVA et al., 2007). Além disso, os PHA são obtidos a partir de fontes renováveis, em geral, fontes provenientes da agricultura (THOMSON et al., 2013; RODRIGUEZ, 2012; BOIN et al., 2009)

Devido à sua biocompatibilidade, os PHAs encontram atualmente maior mercado na área médica, mercado este que se dispõe a pagar um preço maior em função das excelentes características de aplicação (CHEN, et al., 2011; STRELEC, 2006). Neste campo, além da biocompatibilidade, os PHAs contam com a biodegradabilidade que possibilita a reabsorção do material pelo corpo possibilitando aplicações em fios de sutura, próteses e liberação controlada de medicamentos (GUMEL et al., 2012; RAICHER, 2011; MATSUDA, 2009).

Em aplicações mais gerais, o grande entrave da utilização dos PHA ainda é o custo de produção (GAMAL et al., 2013; BRITO et al., 2011; NEVES, 2009; FALCONE et al., 2007). Neste sentido, o objetivo deste estudo foi a busca de novos microrganismos com potencial de produção de biopolímeros de importância comercial na indústria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de Coleta dos Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste estudo são 140 isolados, pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Programa de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, da Universidade do Estado do Amazonas MBT/UEA, que foram coletados em 2010 no Rio Madeira, em três pontos: margem esquerda, região central e margem direita, com três repetições para cada ponto de coleta, no município de Autazes-AM, conforme figura 1.

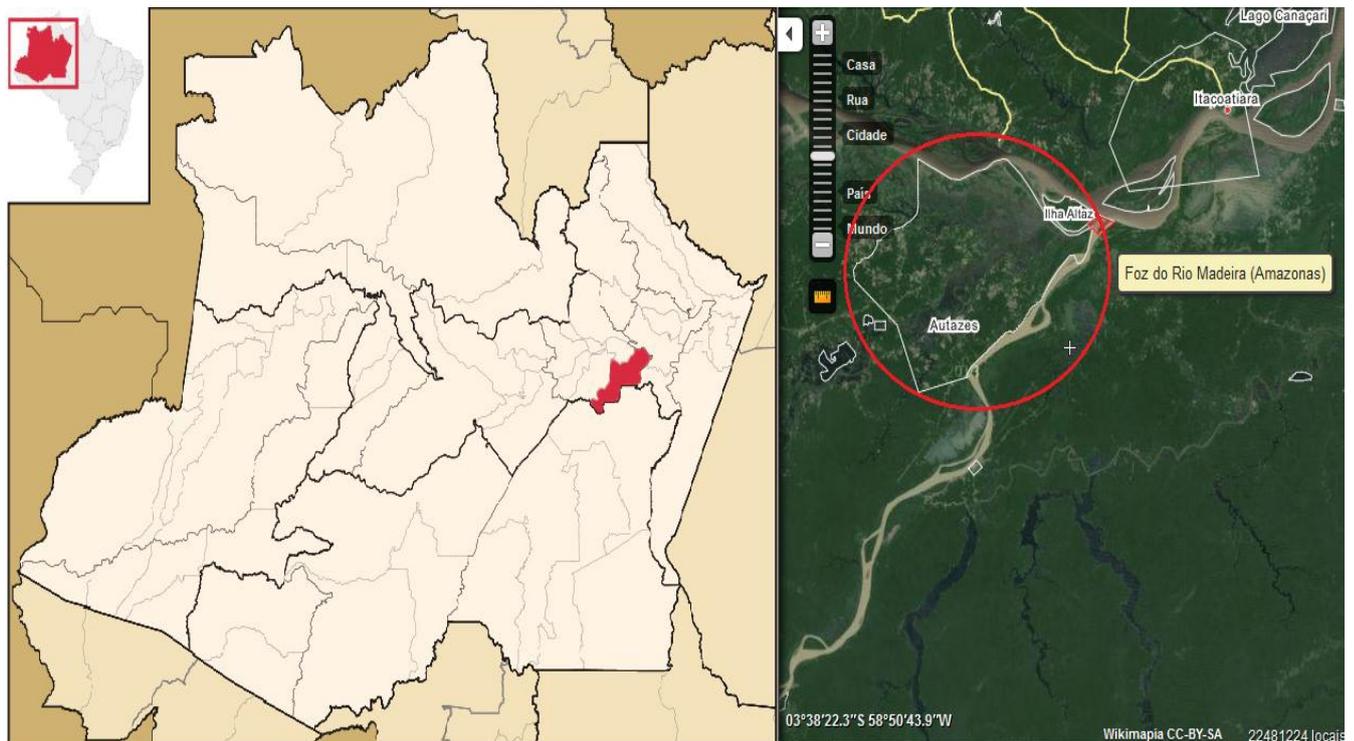


Figura 1: Localização do Município de Autazes/AM e Foz do Rio Madeira.
Fonte: Adaptado wikimapia.org (2014)

2.2 Reativação e Purificação dos Microrganismos

Os microrganismos preservados em óleo mineral foram reativados em meios sólidos de Nutriente Agar (NA), sendo composto por 5 g/L de peptona; 3 g/L de extrato de carne e Meio Mineral (MM) que consistiu em 40 g/L de glicose; 1,5 g/L de KH_2PO_4 ; 3,50 g/L de Na_2HPO_4 ; 0,2 g/L de composto de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,06 de citrato férrico amoniacal; 0,05 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1 mL de solução de elementos traço preparado de acordo com o método descrito por Ramsay et al., (1990), onde a composição é idêntica à dos meios líquidos, acrescidos de 10 g/L de ágar-ágar e, posteriormente, foram esterilizados em autoclave, por 20 min, a 121°C, 1 atm.

Cada isolado do Rio Madeira, através do método de esgotamento por estrias cruzadas, foi cultivado em meio NA e incubado a 28°C por 24-48 horas, para reativação. Posteriormente, foi feita a purificação em meio NA e microrganismos foram cultivados a 28° C por 3 dias.

2.3 Seleção das linhagens produtoras de biopolímeros: Teste qualitativo

Para detectar bactérias produtoras de PHA, foi realizada uma seleção qualitativa em meio mineral sólido (MM), onde cada um dos isolados foi incubado em meio mineral contendo excesso de fonte de carbono (glicose 40g/L) e limitado na fonte de nitrogênio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,05g/L] e incubados a 28° C por por 3 dias. Após esse período de incubação, os isolados foram corados com Sudan Black (0,02% m/v em etanol 96%) por 30 minutos e descorados com etanol 96% por 15 minutos (MATSUDA, 2009; STRELEC, 2006). Em seguida, foi realizada a preparação de lâminas para visualização em microscópio óptico.

De acordo com coloração de Sudan Black dos 140 isolados, 47 mostraram-se positivos para a coloração, sendo selecionados 08 isolados por apresentarem maiores alterações morfológicas da célula quando visualizados em microscópio óptico, sugerindo maior capacidade de produção de biopolímeros.

Com estes 08 isolados foi utilizada a técnica de Coloração de Gram e coloração apenas com Safranina para serem visualizados em microscópio óptico com câmera fotográfica acoplada; para possíveis registros de imagens.

Estes isolados foram crescidos em Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio de caldo nutriente e adicionado um inóculo de bactéria, deixando crescer por 5 dias, de acordo com Kichise et al., (1999) e Matsusaki et al., (2000). Após o crescimento, o meio de cultura foi centrifugado por 20 minutos a 4000g e, em seguida, toda a massa bacteriana foi colocada no meio mineral líquido suplementado com glicose e o nitrogênio como fator limitante, para produção de biopolímeros. Após o crescimento, o meio de cultura foi centrifugado por 15 minutos a 10.000g para então serem congelados e liofilizados.

2.3.1 Preparo das bactérias para microscopia

Em frascos de Erlenmeyer de 250mL contendo 200mL de meio mineral foram adicionados 20 μ L de uma solução de 0,5mg de Nile Blue e 0,5mg de Nile Red em 1mL de dimetilsulfóxido. As placas foram incubadas a 28°C durante 6 dias para produção de biopolímeros. Também foram feitos meios líquidos contendo os corantes acima citados. Em seguida, foram feitas lâminas das colônias produtoras de biopolímeros para então serem observadas em microscópio com epifluorescência (TANAMOOL et al., 2013).

2.4 Extração e Purificação de biopolímeros: Teste quantitativo

Cerca de 20 mg da massa bacteriana liofilizada foram utilizados para extração do biopolímero, sendo transferidos para tubos de rosca, aos quais foram adicionados 2 mL de clorofórmio. Os tubos foram fechados fortemente e as amostras agitadas no vortex para então serem aquecidas por 3 horas a 100°C. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro de celulose com poro de 0,4 μ m (Milipore) para a remoção de detritos celulares. Os biopolímeros foram precipitados

em metanol 5:1 v/v de clorofórmio, agitando-os vigorosamente por 30 segundos e posteriormente deixou-se secar em temperatura ambiente (JAMIL et al., 2007).

2.5 Análise do biopolímero em Cromatografia Gasosa

As amostras de biopolímeros são dissolvidos em 2 mL de metanol acidificado, ou seja, contendo 3% (v / v) de H₂SO₄, e 1 mL de clorofórmio em um tubo de ensaio com tampa de rosca. As amostras são, em seguida, mantidas a 100°C durante 60 min. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, 1 mL de água Mili-Q esterilizada foi adicionada à totalidade da amostra, e em seguida, agitada durante 10 min, para formação de fase (BRAUNEGG et al., 1978).

Após a separação, a fase aquosa (superior) foi descartada e a fase orgânica (inferior) utilizada para análise. Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra (“split” 1:20) em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrofotômetro de massa, Modelo QP2010, Marca Shimadzu, com gás de arraste Hélio e grau de pureza 5.0 (LÜTKE-EVERSLOH et al., 2001).

2.6 Caracterização Genética

2.6.1 Extração do DNA Genômico

A identificação dos isolados foi realizada de acordo com o proposto por Sambrook et al., (1989). Os isolados bacterianos foram cultivados em 10 mL de meio de cultivo NA e incubados por 48 horas a 28°C. Após esse período, a suspensão bacteriana foi recolhida em tubos de 2 mL e centrifugada por 6 minutos a 12000 rpm, utilizando centrífuga *Eppendorf Mini plus*. Em seguida, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 500 µL de TE (Tris-HCl 1M pH 7,5, 10mL; EDTA 0,5M pH 8,0, 2mL; água destilada, 1000mL), sendo adicionado 30 µL de SDS 10% e 0,5g de sílica, e agitado no vortex por 10 minutos.

Após a agitação, foram adicionados 200 µL de fenol saturado e 350 µL de Clorofil (Clorofórmio e álcool isoamílico 24:1 v/v), sendo em seguida

homogeneizadas e centrifugadas (12000 rpm por 10 min). A fase superior foi transferida para um novo tubo, acrescentando-se 350 µL de Clorofil, sendo centrifugadas novamente (12000 rpm por 10 min). Transferiu-se o DNA sobrenadante para outro tubo limpo e, posteriormente, a esta suspensão foram adicionados 50 µL de NaCl 5M e 750 µL de álcool isopropílico. A solução foi homogeneizada por inversão e posteriormente incubada no congelador por 1 h para precipitação mais rápida, e em seguida centrifugou-se em centrífuga resfriada a 4° C por 12 min a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado com 200 µL de etanol 70%. Depois de seco a 37°C, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q e estocado a –20°C (SAMBROOK et al., 1989).

2.6.2 Amplificação do gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA foi amplificado por PCR usando os primers universais 27F(5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'). As condições de PCR foram: desnaturação inicial programada para 95°C durante 5 min; seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 min, pareamento a 55°C durante 1 min, e alongamento para 72°C durante 1 min e 30 seg, e uma extensão final de 72°C durante 10 min. O produto da amplificação de DNA foi purificado (kit de PCR GFX, Amersham Pharmacia Biotech®) e sequenciado (PROCÓPIO et al., 2012).

2.6.3 Análise da árvore filogenética

As identificações bacterianas foram realizadas na comparação das sequências obtidas do gene 16S rRNA dos isolados. Para isso, após amplificação, os produtos de PCR foram purificados com o DNA Gel/PCR Extraction Kit®. As amostras foram sequenciadas no Cento de Estudos do Genoma – ICB/USP utilizando sequenciador ABI (Applied Biosystems). Após o recebimento das sequências, as mesmas foram alinhadas no Programa BioEdit e comparadas pelo programa CLUSTALW2 (versão 1.8), para então serem submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequências depositadas no banco de dados GenBank através do programa BLAST “*Basic Local Alignment Search Tools*” (TANAMOOL et al., 2013).

A árvore filogenética baseada no gene 16rRNA foi construída pelo método *neighbor-joining* e o algoritmo “Jukes-Cantor”. A robustez de ramos individuais foi estimada em 1000 repetições de *bootstrapping* com o programa de Análise Genética de Evolução Molecular MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e seleção de linhagens bacterianas produtoras de PHA

Neste trabalho, os princípios que nortearam a estratégia de isolamento tinham como finalidade buscar uma área pouco estudada do ponto de vista da diversidade microbiana, principalmente em relação à produção de biopolímeros.

Os resultados dos isolamentos cultivados em meios sólidos estão ilustrados na figura 2.

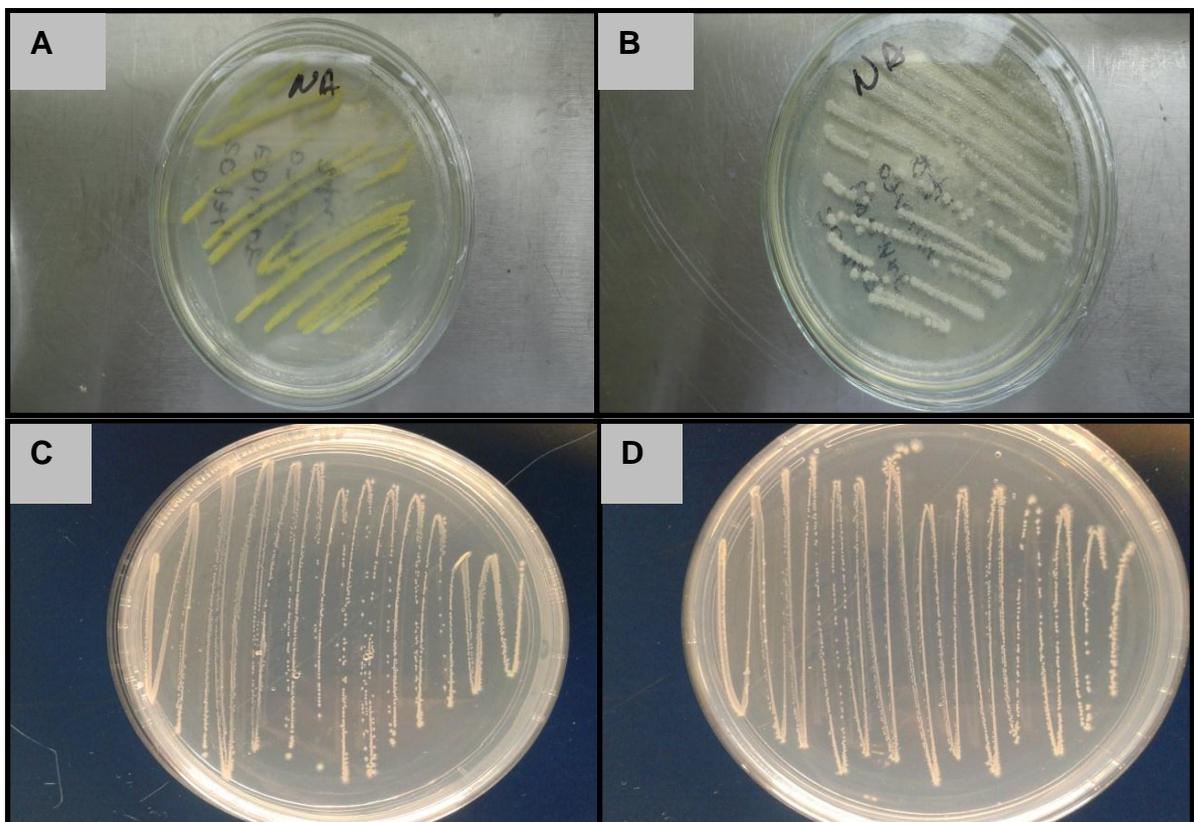


Figura 2: Isolados reativados e purificados em meio NA (A e B). Isolados em meio MM com coloração Nile Blue e Nile Red (C e D), respectivamente, para produção de polímeros.

No presente estudo foram isoladas 140 bactérias (Quadro 1) coletadas no Rio Madeira, no município de Autazes. Dos 140 isolados corados com Sudan Black, para seleção de linhagens produtoras de polímeros, 47 mostraram-se positivos para a coloração com um índice de 33,5% de bactérias produtoras de polímeros, conforme apresentadas no Quadro 1, sendo selecionados 08 isolados por apresentarem maiores alterações morfológicas da célula quando visualizados em microscópio óptico, sugerindo assim, maior capacidade de produção de biopolímeros.

Quadro 1 - Seleção de linhagens produtoras de PHA

Nº Isolado	Resultado para produção de PHA	Nº Isolado	Resultado para produção de PHA	Nº Isolado	Resultado para produção de PHA
20152	Positivo	20207	Negativo	20238	Negativo
20155	Positivo	20156	Negativo	20210	Negativo
20157	Negativo	20159	Negativo	20195	Positivo
20158	Negativo	20189	Negativo	20180	Positivo
20160	Positivo	20193	Positivo	20191	Negativo
20162	Negativo	20202	Negativo	20192	Negativo
20163	Negativo	20166	Negativo	20201	Negativo
20164	Negativo	20196	Negativo	20179	Negativo
20167	Negativo	20186	Negativo	20230	Negativo
20168	Positivo	20208	Negativo	20198	Negativo
20170	Positivo	20169	Negativo	20234	Negativo
20172	Negativo	20190	Negativo	20249	Negativo
20173	Negativo	*20194	Positivo	20150	Positivo
20174	Positivo	20187	Negativo	20185	Positivo
20175	Positivo	20205	Negativo	*20161	Positivo
20176	Positivo	20181	Negativo	20204	Positivo
20177	Positivo	20183	Negativo	20217	Negativo
20182	Positivo	20203	Positivo	20218	Negativo
20184	Negativo	20199	Negativo	20228	Negativo
20197	Positivo	20209	Negativo	20211	Negativo
20200	Positivo	20206	Negativo	20231	Negativo
20216	Negativo	20236	Negativo	20178	Positivo
*20226	Positivo	20224	Negativo	20235	Positivo
20239	Negativo	20151	Negativo	20254	Negativo

Nº Isolado	Resultado para produção de PHA	Nº Isolado	Resultado para produção de PHA	Nº Isolado	Resultado para produção de PHA
20252	Negativo	20273	Negativo	20275	Positivo
20244	Negativo	20255	Negativo	20188	Negativo
20220	Positivo	20257	Positivo	20285	Negativo
*20261	Positivo	20277	Positivo	20282	Negativo
*20223	Positivo	20250	Positivo	20268	Positivo
20240	Negativo	*20229	Positivo	20288	Negativo
20269	Negativo	20265	Negativo	20264	Positivo
20249	Negativo	20243	Negativo	20245	Positivo
20248	Positivo	20222	Positivo	20290	Negativo
20241	Negativo	20292	Negativo	20242	Negativo
20287	Positivo	20276	Negativo	20212	Negativo
20256	Negativo	20284	Negativo	20286	Negativo
20281	Positivo	20294	Positivo	20237	Negativo
*20154	Positivo	20227	Negativo	20165	Negativo
20289	Negativo	20266	Negativo	20251	Negativo
20272	Negativo	20279	Positivo	20293	Positivo
20300	Negativo	20274	Negativo	20253	Positivo
20291	Negativo	20246	Negativo	20214	Negativo
20259	Negativo	20250	Positivo	20153	Negativo
20258	Negativo	20271	Negativo	20270	Positivo
20263	Positivo	20278	Negativo	20262	Negativo
20280	Negativo	20283	Negativo	20247	Negativo
20177	Negativo	20267	Negativo	*20171	Positivo
Total de Lâminas analisadas					140
Total de linhagens produtoras de PHA					47
* Bactérias selecionadas					8

De acordo com Spiekermann e colaboradores (1999), a bioprospecção de bactérias produtoras de PHAs pode ser realizada pela avaliação da presença de corpos lipofílicos nas células, através do teste colorimétrico de Sudan Black, que é ligeiramente solúvel em solvente orgânico e insolúvel em água; ao ligar-se a estruturas hidrofóbicas confere coloração negra azulada, visível em microscópio óptico (MACAGNAN, et al., 2012; MATSUDA, 2009).

Embora tenha sido possível identificar apenas 47 cepas, este número se torna expressivo em se tratando da região Amazônica que não possui estudos relacionados à produção de biopolímeros por bactérias de água doce. Trabalhos similares identificaram bactérias em outros biomas, como em amostras de solo de canalial, onde foram obtidas 75 linhagens produtoras de biopolímeros (GOMEZ, 1994, 1996). Estudos mais detalhados revelaram uma linhagem bacteriana promissora para a produção industrial destes polímeros (GOMEZ et al., 1997; SILVA et al., 2000) e que se tratava de uma espécie nova ainda não descrita (BRÄMER et al., 2002).

Isolados bacterianos produtores de PHA foram encontrados em amostras de solo e areia de diversos ambientes no Estado do Rio Grande do Sul (MATIAS et al., 2001). A análise da região 16S foi comparado ao banco de dados do *Ribosomal DataBase Project* (RDP), e possíveis representantes dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Streptacidiphilus*, *Streptoalloteichus* e *Burkholderia* foram identificados (MATIAS et al., 2009).

A linhagem *Cupriavidus* USMAA1020 foi isolada em um estudo de diferentes amostras de solo, lama, sedimento e água na Península da Malásia, e apresentou a capacidade de acumular mais de 50% da massa seca celular de copolímero P3HB-co-4HB, ainda não reportada para a espécie (AMIRUL et al., 2009).

A linhagem *Zobellella denitrificans* MW1 foi isolada a partir de lodo de esgoto em estudo com amostras de diferentes ambientes da Alemanha e Egito. Após 96 h de cultivo, foi observada a produção de, aproximadamente, 87% da massa seca celular de P3HB, em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono e alta concentração salina (IBRAHIM & STEINBÜCHEL, 2009). Também é relatado por Lício (2011), que dos 1.200 isolados provenientes de amostras de lodo de esgoto doméstico, 161 isolados foram considerados como produtores de PHA em pelo menos uma das fontes de carbono avaliadas (glicose ou octanoato).

Na busca por microrganismos capazes de produzir polihidroxialcanoatos (PHAs) utilizando glicerol em meios de cultivo, foram avaliadas 107 linhagens de microrganismos através da reação com o corante Sudan Black B. Entre os quais, estavam 76 isolados obtidos de solo de Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica) e

31 de solo de Mangue. Além disso, foram também avaliadas 7 linhagens de *P. aeruginosa* provenientes de solos contaminados com hidrocarbonetos e manipueira (PAULA, 2012).

A linhagem *Bacillus* sp. MA3.3 foi isolada a partir de solo de mangue em um trabalho com amostras de diferentes ambientes brasileiros. A ausência de uma camada de lipopolissacarídica nesta linhagem Gram-positiva representa uma vantagem para aplicações em que a biocompatibilidade do polímero é um fator essencial, como na área médica (LICIO, 2011; SINGH et al., 2009). Valores maiores que 60% da massa seca celular de P3HB foram obtidos quando fornecido glicose ou xilose como fontes de carbono, tornando a linhagem uma candidata à produção de PHA usando resíduos lignocelulósicos como substratos (LOPEZ et al., 2009).

Com estes 08 isolados foi utilizada a técnica de Coloração de Gram, após 08 dias de incubação em meios NA e MM, para serem visualizados em microscópio óptico com câmera fotográfica acoplada; conforme figura 3.

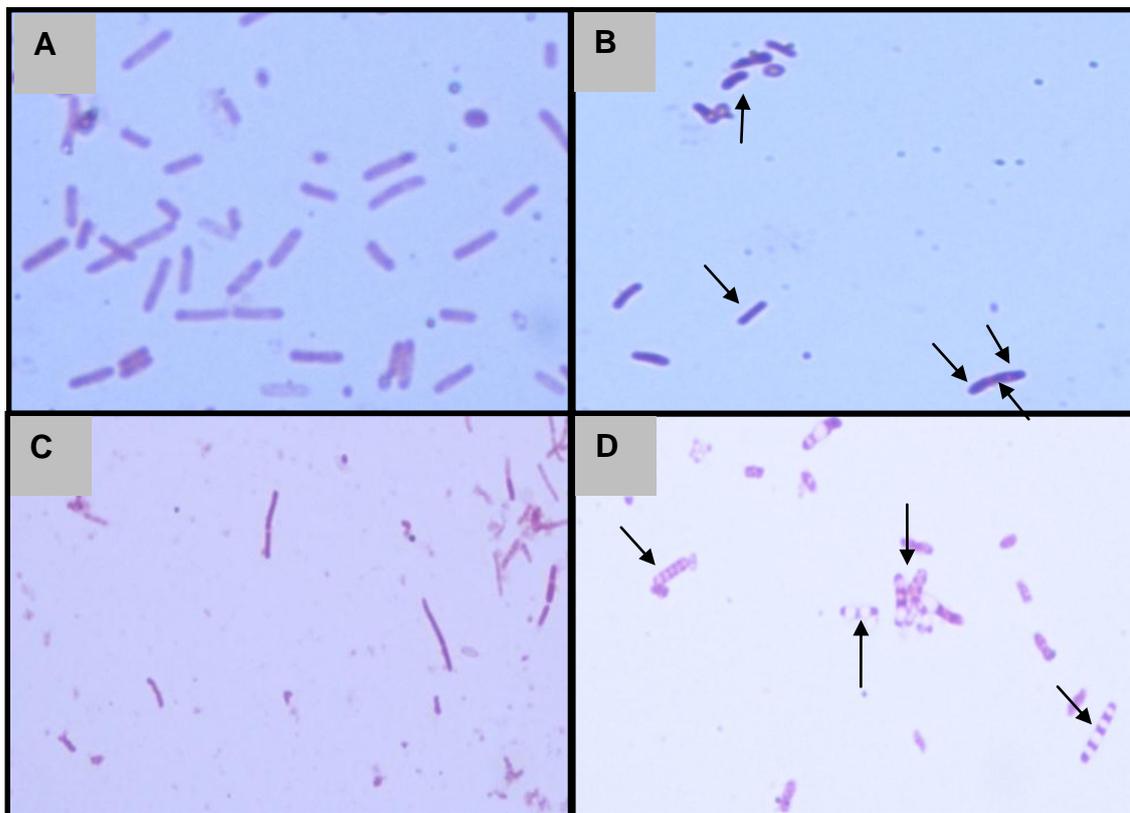


Figura 3: Esfregaços corados com Gram e visualizados em lente de imersão em microscopia óptica 1000x. A- Meio NA (UEA 20223); B- Meio MM (UEA 20223); C- Meio NA (UEA 20229), D- Meio MM (UEA 20229).

Como já mencionado, o corante Sudan Black atua por difusão simples, corando corpos lipofílicos como os grânulos de PHAs, gerando uma coloração negra azulada, a qual possibilita sua visualização em microscópio óptico e indica resultado positivo (LELLIOT & STEAD, 1987). Assim, pode-se inferir que 33,5% das bactérias analisadas são potencialmente produtoras de PHAs, apresentando pontos negros azulados com diferentes distribuição, dimensão e intensidade. A observação dos grânulos mais intensos e alterações mais expressivas na morfologia do isolados ocorreram nas lâminas UEA 20.223; UEA 20.194; UEA 20.161; UEA 20.171; UEA 20.226; UEA 20.261; UEA 20.154 e UEA 20.229.

Quanto à disposição dos grânulos nas células, as amostras corresponderam ao relatado na literatura para os gêneros bacterianos analisados, ou seja, todos os isolados positivos apresentaram no mínimo dois grânulos distribuídos um em cada pólo da célula (MACAGNAN, et al., 2012). Esta distribuição é encontrada em grande parte das células no estágio inicial de acúmulo de PHAs. Já a presença de um terceiro grânulo, também observado em nossas análises, normalmente ocorre na região central do bacilo (JENDROSSEK, 2007). Isto se confirma nas imagens ilustradas na Figura 4, onde os isolados foram cultivados em meio mineral contendo corantes Nile Blue e Nile Red, e após 10 dias de incubação foram corados com safranina e os biopolímeros foram visualizados em microscópio óptico com câmera fotográfica acoplada, não sendo possível o registro de imagens em epifluorescência.

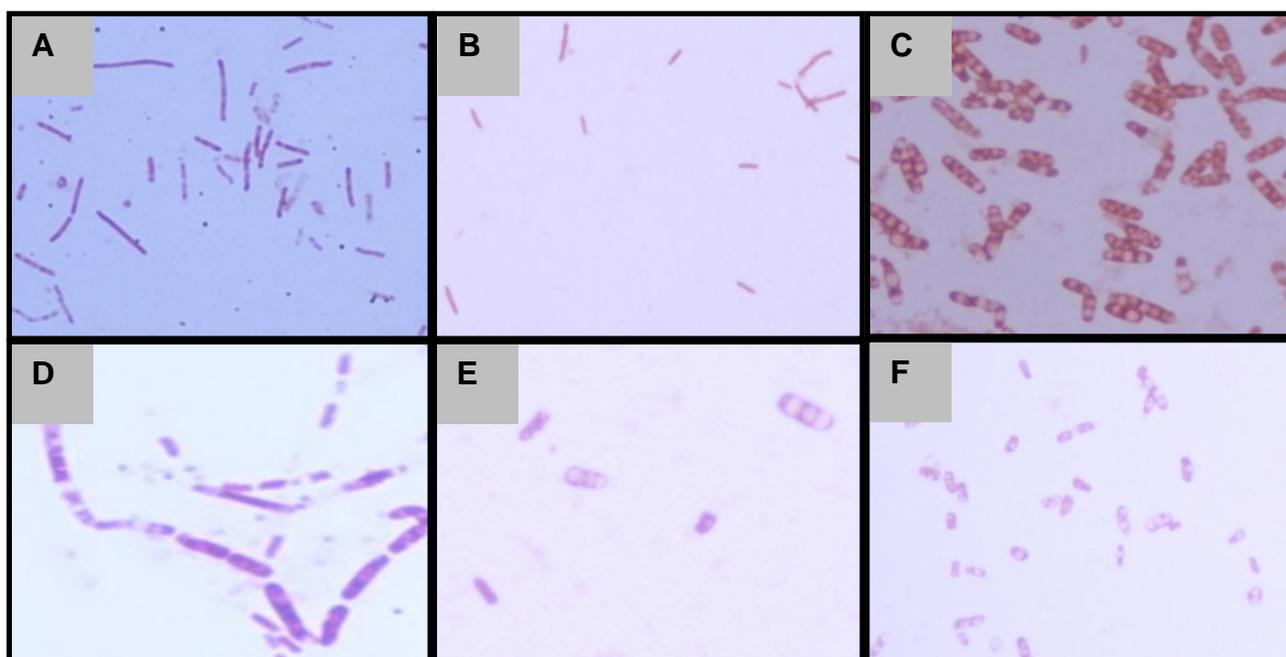


Figura 4: Esfregaços corados com Safranina e visualizados em lente de imersão em microscopia óptica.

A- Meio NA (UEA 20171); B- Meio MM com Nile Blue (UEA 20171); C- Meio MM com Nile Red (UEA 20171); D- Meio NA (UEA 20261); E- Meio MM com Nile Blue (UEA 20261); F- Meio MM com Nile Blue (UEA 20261).

3.2 Caracterização molecular dos isolados selecionados

A técnica de identificação molecular utilizando a amplificação da região ribossomal 16S do DNA bacteriano permitiu identificar três gêneros. As sequências obtidas foram comparadas com sequências do banco de dados público GenBank através do programa BLASTn (www.ncbi.nih.gov), para a identificação com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA, e os resultados podem ser observados na tabela 5.

Tabela 1 - Identificação das bactérias isoladas no Rio Madeira, município de Autazes/AM, com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA.

Código da Coleção	Gêneros cuja sequência apresentou maior similaridade através de BLASTn	Máximo de Identidade (%)	Score	Valor E	Acesso no Genbank com maior similaridade
UEA 20223	<i>Bacillus</i> sp.	99%	917-917	0.0	HM4440045.1
UEA 20194	<i>Bacillus</i> sp.	99%	883-883	0.0	HM566575.1
UEA 20161	<i>Bacillus</i> sp.	99%	1062-11.670	0.0	CP010852.1
		99%	856-11.917	0.0	CP010088.1
		99%	856-11.101	0.0	CP009605.1
UEA 20171	<i>Lysinibacillus</i> sp.	98%	699-699	0.0	KM242566.1
UEA 20226	<i>Brevibacterium</i> sp.	99%	743-743	0.0	HM584237.1
		99%	743-743	0.0	HQ188605.1
UEA 20261	<i>Bacillus</i> sp.	99%	883-883	0.0	HM566575.1
UEA 20154	<i>Bacillus</i> sp.	99%	1062-11.670	0.0	CP010852.1
		99%	856-11.917	0.0	CP010088.1
		99%	856-11.101	0.0	CP009605.1
UEA 20229	<i>Bacillus</i> sp.	99%	1062-11.670	0.0	CP010088.1
		99%	856-11.917	0.0	CP010852.1
		99%	856-11.101	0.0	CP009605.1

As análises dos segmentos do gene 16S rRNA sequenciados dos 8 isolados selecionados apontam grande identidade destas com as sequências depositadas no banco de dados GenBank. Foram apresentadas na tabela as indicações do banco de dados que obtiveram 99% de identidade com os segmentos do gene 16S rRNA sequenciados. Os segmentos dos isolados UEA 20161, UEA 20154 e UEA 20229

obtiveram o mesmo grau de similaridade com os mesmos segmentos das espécies do banco de dados, assim como os segmentos dos isolados UEA 20194 e UEA 20261.

O valor do *score* dá uma indicação se o alinhamento é bom ou não, sendo o seu valor positivamente correlacionado com a qualidade deste alinhamento, ou seja, quanto maior, melhor (AMARAL et al., 2007). Sendo assim, observa-se que todos os isolados apresentam *score* com valor igual ou superior quando comparados com as sequências encontradas no banco de dados do GenBank. O *score* fornece informação sobre o grau de homologia entre a sequência em questão e a sequência que introduzimos. Quanto maior o valor, melhor será o grau de homologia.

De acordo com Amaral et al., (2007), o *e-value* é uma das expressões mais utilizadas na análise de sequências e representa o valor estatístico (probabilidade) que indica se o alinhamento é real ou foi obtido meramente pelo acaso no banco de dados (falso positivo). Em outras palavras, é o número esperado de falsos positivos que obteriam *score* igual ou maior que o reportado em um determinado alinhamento entre a sequência de entrada e uma do banco. Fundamentalmente, quanto menor o *e-value*, menores as chances do resultado ser consequência do acaso.

Pode-se perceber então que, quanto menor o *e-value*, ou seja, mais próximo de zero, maior a confiabilidade da predição, conseqüentemente, mais significativo é o alinhamento, conforme demonstrados em todos os isolados.

3.3 Identificação e diversidade das bactérias utilizando gene 16S rRNA

Dentre os microrganismos produtores de PHA, foram encontrados em amostras de água doce no Rio Madeira, município de Autazes/AM, espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Brevibacterium*.

Atualmente, na “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*” organizada pelo pesquisador J.P. Euzéby há citação de 265 espécies e de 7

subespécies para o gênero *Bacillus*, 19 espécies e nenhuma subespécie para o gênero *Lysinibacillus*, e 50 espécies e nenhuma subespécie para o gênero *Brevibacterium*, conforme o site ww.bacterio.cict.fr.

O gênero *Bacillus* que pertence à família *Bacillaceae*, é extremamente heterogêneo, tanto geneticamente quanto fenotipicamente (tipo respiratório, metabolismo dos açúcares, composição da parede, etc). Os estudos do rRNA 16S e 23S confirmaram essa heterogeneidade e mostraram que o gênero *Bacillus* pode ser dividido em muitos gêneros (GOMES, 2013).

Em 1991, Ash e colaboradores, utilizando análise sequencial do rRNA 16S de 51 espécies classificaram e caracterizaram em 5 grupos filogenéticos. A organização foi iniciada em 1992 para criação do gênero *Alicyclobacillus* que agrupou três espécies acidófilas e termófilas. Posteriormente, foram propostos e validados outros gêneros incluindo: *Aneurinibacillus* (1996), *Brevibacillus* (1996), *Gracilibacillus* (1999), *Geobacillus* (2001), *Marinibacillus* (2001), *Paenibacillus* (1994), *Salibacillus* (1999), *Ureibacillus* (2001), *Virgibacillus* (1998) e *Lysinibacillus* (2007), todos com pelo menos, uma espécie, inicialmente incluída no gênero *Bacillus*. O gênero *Amphibacillus* (1990), *Filobacillus* (2001), *Jeotgalibacillus* (2001) e *Halobacillus* (1996) são igualmente constituídos de bacilos Gram positivos, esporulados, aeróbios ou aero-anaeróbios (GOMES, 2013).

Dentre os microrganismos produtores de PHA, os *Bacillus* são encontrados comumente no ambiente, porém, diante da variedade de espécies existentes, ainda são pouco explorados. *Bacillus* apresentam características desejáveis para a produção de PHA, como o curto tempo de geração, crescem facilmente até alcançar uma alta densidade celular, utilizam fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo, são capazes de secretar grande quantidade de enzimas, e são bons “hospedeiros” para expressão de genes heterólogos (LAW et al., 2003).

Membros do gênero *Bacillus*, assim como vários outros microrganismos produtores de PHA, produzem também copolímeros contendo unidades de 3HB e 3HV, quando cultivadas em diferentes substratos como glicose, melão, ácido propiônico, entre outros (GOMES, 2013; KRUEGER, 2009).

A síntese de PHB por *Bacillus cereus* linhagem T inicia-se após o término da fase logarítmica, atingindo o acúmulo máximo até a formação do esporo, e ocorre degradação durante o processo de esporulação (VALAPPIL et al., 2007b). Já em *B. megaterium*, durante a fase estacionária, os grânulos de polímeros decaem em tamanho e número por célula (MCCOOL et al., 1996).

Slepecky e Law (1961) verificaram as condições e a relação entre a produção de polímero e a formação de esporos em duas linhagens da bactéria *B. megaterium*, sendo uma formadora de esporo e outra que não esporula (*B. megaterium* KM). Quando a linhagem que esporula é cultivada em meio que favorece a formação de polímero, não há praticamente formação de esporo, e a produção e utilização do polímero seguem a cinética similar da linhagem que não forma esporos, porém com rendimento menor. Em meio favorável à formação de esporos, e menor quantidade de polímero é produzida e uma rápida utilização deste polímero precede a esporulação.

Informações genéticas de *B. megaterium* têm sido utilizadas para o desenvolvimento de uma linhagem capaz de autorromper-se, em resposta à exaustão de substrato, durante a produção de PHB (HORI et al., 2002). Além disso, genes de *B. megaterium*, para a produção de PHB, estão sendo inseridos com sucesso em *B. subtilis* (LAW et al., 2003).

Certas propriedades únicas do *Bacillus subtilis* como a falta da camada de lipopolissacarídeos, a expressão de genes de autólise sobre a conclusão do processo de biossíntese de PHA, o uso de biorresíduos como ração lhe permitam competir como candidato em potencial para a produção comercial de PHA (SINGH et al., 2009).

Em relação ao gênero *Brevibacterium* existem pouquíssimos estudos referentes à produção de PHA. Dentre eles, destaca-se a atividade anti-aderente usando poli-hidroxibutirato (PHB) produzidos por uma cepa de *Brevibacterium casei* marinho MSI04 para conter surtos contra patógenos de vibriões de camarão em viveiros na Índia. A maior atividade anti-aderente foi de até 96% registrado contra *V. vulnificus* e *V. fischeri*, seguido por 92% contra *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* e 88% de inibição foi registrado contra *V. harveyi*. Vale ressaltar que este é o

primeiro estudo a informar sobre a atividade anti-adesiva de PHB contra patógenos vibrio proeminentes na carcinicultura (KIRAN et al., 2014).

Estudos revelaram que a estirpe de *Brevibacterium casei* SRKP2 apresenta grande potencial de produção de PHB a partir de resíduos industriais de laticínios (PANDIAN et al., 2009). Deepak e colaboradores (2009) relataram que, nanopartículas de PHB encontradas nesta mesma linhagem de *Brevibacterium casei* SRKP2, resultou em um aumento de 20% na atividade da nattokinase, uma potente enzima fibrinolítica, encontrada no natto, comida tradicional japonesa que é produzida por *Bacillus subtilis* var. *natto*, e tem uma dupla função de hidrolisar trombos no sangue *in vivo* e também está envolvido na conversão de plasminogênio em plasmina.

Outro estudo revela que muitos dos genes que codificam várias enzimas são diretamente ou indiretamente envolvidos na síntese de PHA (CHEN, 2010), destacando a Cyclohexanona monooxygenase produzida por *Brevibacterium epidermidis* HCU. A identificação de dois agrupamentos de genes envolvidos na oxidação ciclohexanona em *Brevibacterium* HCU estirpe de *S. Epidermidis* foi descrito por Brzostowicz et al. (2002).

Para o gênero *Lysinibacillus* nada foi relatado até o momento em relação à produção de PHA. No entanto, no trabalho de Costa (2012), foram isoladas 217 bactérias de esponjas coletadas dos municípios de Parintins e Manaus. Deste total, foram identificadas 30 cepas de bactérias do município de Parintins, destacando a presença do gênero *Lysinibacillus*, numa frequência de 13,6%, associados às esponjas de água doce, com funções simbióticas.

Todos os isolados identificados neste estudo são constituídos de bacilos gram-positivos. De acordo com Singh et al., (2009), uma revisão sobre a natureza tóxica de lipopolissacarídeos (LPS), fator de virulência presente na membrana celular externa da maioria das bactérias gram-negativas, revela que LPS induz uma reação imunogênica forte (STEWART, 2006), e esse recurso não é desejável para aplicações biomédicas com PHAs (VALAPPIL et al., 2007a; CHEN & WU, 2006). A purificação de subprodutos incluindo PHA é complicada devido à presença de endotoxinas (WESTERS et al., 2004). No entanto, em bactérias gram-positivas, a

camada lipopolissacarídica é ausente, contribuindo assim, como bactérias com uma melhor chance de atuarem como produtoras de PHA para aplicações biomédicas (LICIO, 2011; SINGH et al., 2009; VALAPPIL et al., 2007a).

3.4. Análise filogenética

Neste trabalho foi sequenciado o gene 16s rRNA de 8 isolados produtores de biopolímeros proveniente do Rio Madeira, mostrando a presença de três gêneros, *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Brevibacterium* sendo o gênero *Bacillus* o mais significativo. Sugerindo ser o gênero mais representativo em ambientes aquático de água doce capaz de produzir biopolímero (Figura 5).

A diversidade do grupo de *Bacillus* é alta, mostrando uma diversidade genética entre isolados do mesmo gênero. O isolado UEA 20.171 mostrou maior relação filogenética com o gênero *Lysinibacillus*, do banco de dados do Genbank, como mostra a Figura 5. No entanto, o UEA 20.223, quando analisada a relação filogenética do isolado depositado no Genbank, pode-se observar maior proximidade com o grupo de *Bacillus badius*.

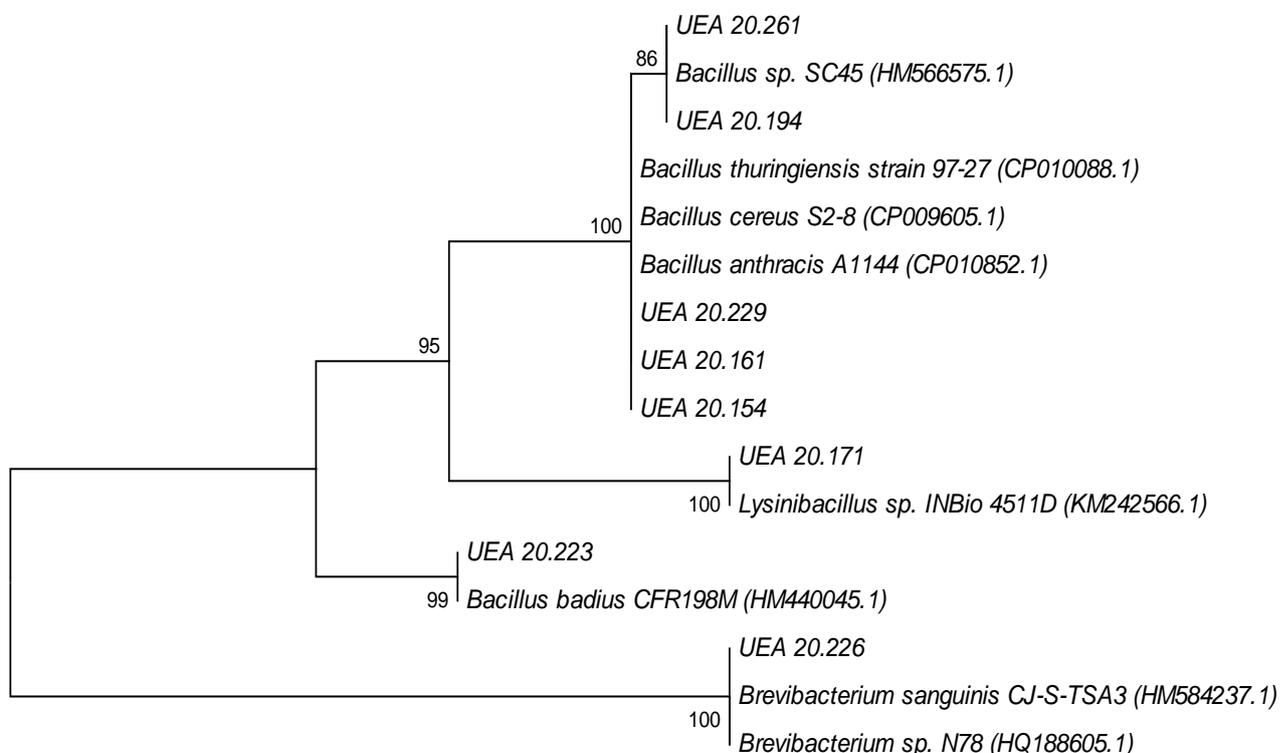


Figura 5: Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16s rRNA, mostrando a relação filogenética entre os 8 isolados identificados.

Atualmente, os genes rRNAs podem ser considerados uma das mais importantes moléculas para o estudo de filogenia e ecologia microbiana, pois permitem uma avaliação da biodiversidade microbiana em diferentes nichos ecológicos (HEYNDRICKX et al., 1996; LOUWS et al., 1999). Também, por meio de análises das sequências, pode ser realizada a identificação de microrganismos ao nível de gênero e possivelmente ao nível de espécie, como também pode permitir correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHÈNEBY et al., 2000).

Outros trabalhos também mostraram a capacidade dos *Bacillus* produzirem poli-3-hydroxibutirato – PHB (LEE et al., 2004; TAKAKU et al., 2006), sendo o mais promissor dos biopolímeros existindo na forma de grânulos amorfos semicristalino dentro das bactérias (JENDROSSEK & HANDRICK, 2002).

Segundo Di Cello e colaboradores (1997), é comum observar uma alta variabilidade genética em microrganismos que possuem capacidade de colonizar diferentes habitats. O gênero *Bacillus* é reconhecido por ser um gênero metabolicamente versátil, capaz de sobreviver em diferentes habitats.

3.5 Análise do biopolímero em Cromatografia Gasosa

A determinação do tipo de polihidroxialcanoatos foi realizada através de cromatografia gasosa, utilizando cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrofotômetro de massa (modelo CG2014, da marca Shimadzu). As amostras metanolizadas foram injetadas (1 µL) no equipamento utilizando Hélio como gás de arraste e grau de pureza 5.0.

A figura 6 apresenta os cromatogramas referentes às análises de PHA produzidos a partir de glicose pelos isolados selecionados neste estudo.

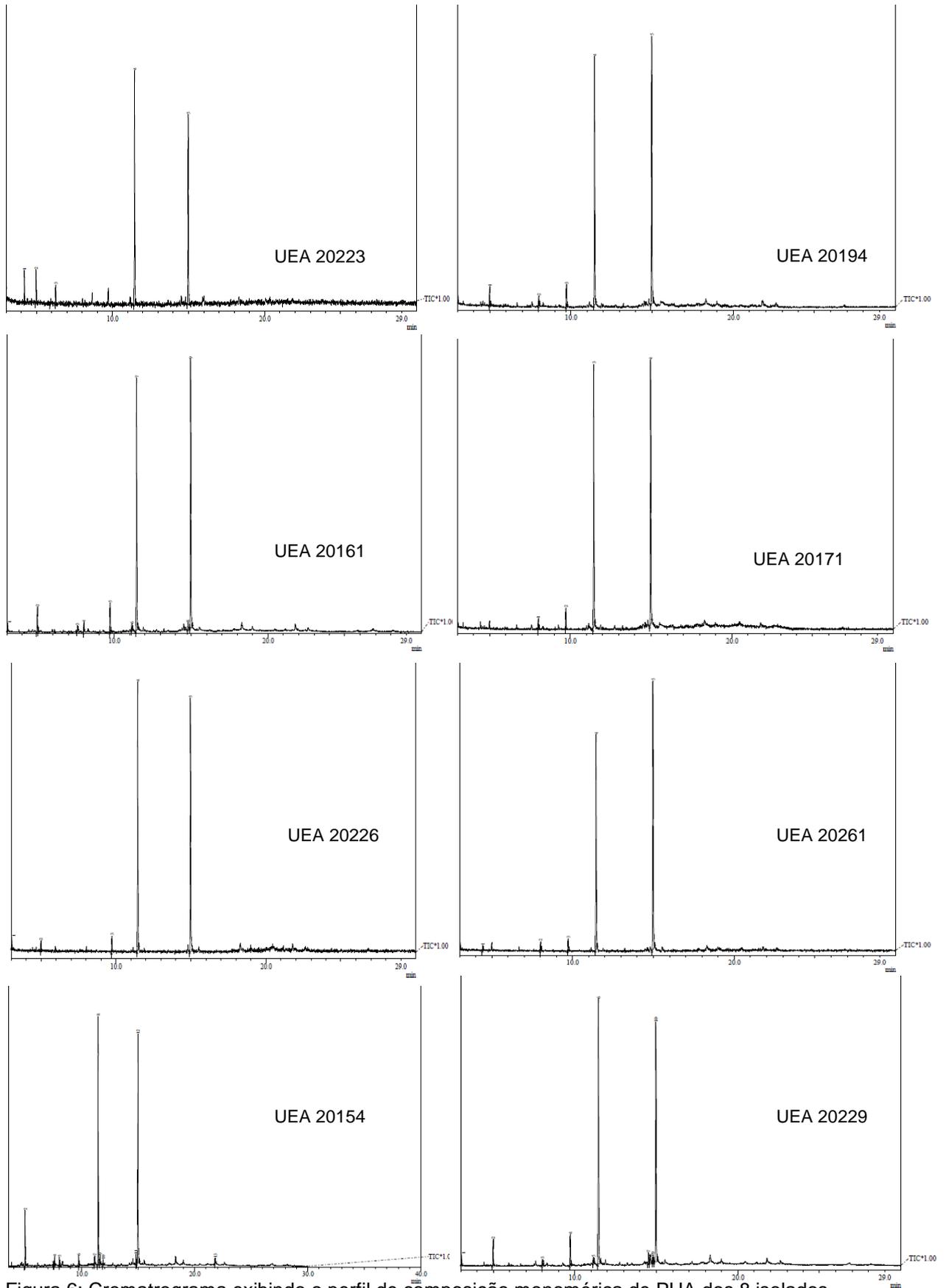


Figura 6: Cromatograma exibindo o perfil de composição monomérica de PHA dos 8 isolados.

Pelos cromatogramas pode-se observar por meio de coincidência dos picos num tempo de retenção de aproximadamente 12 e 15 minutos, que obteve-se o mesmo tipo de polímero em todos os isolados selecionados, sendo o P(3HB). As regiões anteriores a 10 minutos são provavelmente impurezas do solvente, visto que aparecem em todas as amostras. Apesar de ainda não ter sido analisado o padrão do biopolímero, de acordo com a cromatografia apresentado por Lutke-Eversloh et al., (2001) na figura 7 e análise no banco de dados, todas as bactérias produziram PHB.

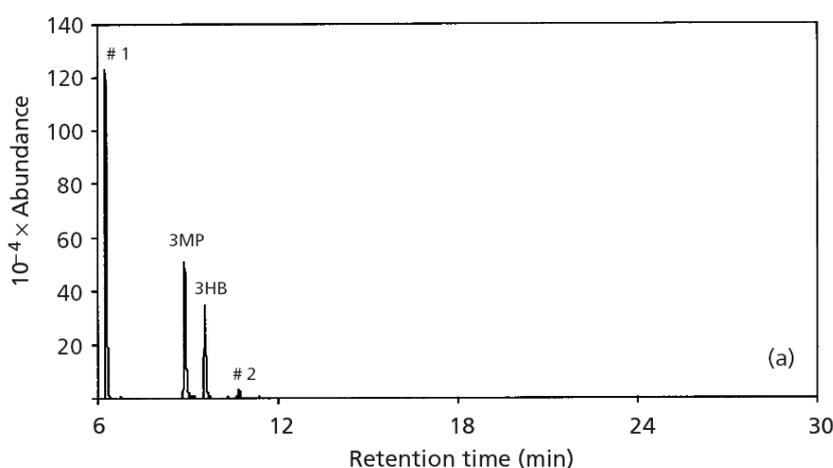


Figura 7. Bipolímero de *Ralstonia eutropha*.
Fonte: Lutke-Eversloh et al., (2001).

No trabalho de Valappil e colaboradores (2007a), são relatadas algumas espécies de *Bacillus* estudadas quanto à sua capacidade de acumular PHA. Dentre elas destaca-se a linhagem *B. thurigiensis* DSM2046 que na presença do acetato como fonte de carbono, produz cerca de 47,6% de massa de PHB.

Sabe-se que um dos fatores limitantes para a comercialização de PHA é o custo do substrato para sua produção, por isso é possível observar inúmeras pesquisas com a utilização de substratos de baixo custo, como é o caso do uso de melaço de cana para a produção de P(3HB) por *B. megaterium*, apresentando um rendimento de 46,2% de P(3HB) sobre o peso seco da biomassa (GOUDA et al., 2001). Omar e colaboradores (2001) cultivaram *B. megaterium* utilizando como fonte de carbono xarope de tâmaras e melaço de beterraba, e obtiveram um acúmulo de

52% e 50%, respectivamente. Além disso, verificaram que o acúmulo de P(3HB) neste microrganismo está associado ao crescimento celular.

Já *Bacillus* sp. JMa5 cultivado em melaço acumulou 35% de P(3HB) sobre o peso seco (WU et al., 2001). Borah e colaboradores (2002) estudaram a influência das condições nutricionais e do ambiente para o acúmulo de P(3HB) em *B. mycooides*, o que indicou que sacarose, extrato de carne e sulfato de amônio são elementos importantes para o crescimento e acúmulo de polímero, obtendo rendimento de 69,4% de P(3HB) sobre o peso seco da biomassa. *B. cereus* acumulou 40,3% de polímero (75% de 3HB e 25% de 4HB) quando crescido em meio com frutose (VALAPPIL et al., 2007c).

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste estudo, os métodos empregados permitiram isolar e purificar de 140 isolados bacterianos de água doce do Rio Madeira, no município de Autazes/AM, 47 cepas produtoras de biopolímeros, sendo selecionadas 08 por apresentarem maiores alterações morfológicas da célula quando visualizados em microscópio óptico, sugerindo maior capacidade de produção de biopolímeros.

Através da extração de DNA dos isolados bacterianos foi possível o sequenciamento das amostras pelo gene 16 rRNA. Análises das sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA possibilitaram a identificação de três gêneros. São eles: *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Brevibacterium*, sendo o gênero *Bacillus* o mais significativo. Sugerindo ser o gênero mais representativo em ambientes aquático de água doce capaz de produzir biopolímero.

Em nosso conhecimento, não tinha sido ainda relatada a produção de biopolímeros pelo gênero *Lysinibacillus*, representado neste estudo pela cepa UEA 20171 (*Lysinibacillus* sp.). Este resultado é importante já que o objetivo deste trabalho é a busca por novas linhagens com potencial comercial para produção de biopolímero. Está sendo realizado o crescimento do *Lysinibacillus* UEA-20171 em biorreator para quantificar a produção de biopolímero por esta bactéria.

Todos os isolados identificados são gram-positivos. Certas propriedades únicas de bactérias gram-positivas, como a falta da camada lipopolissacarídica permitam competir como candidato em potencial para a produção comercial de PHA, principalmente na indústria biomédica.

Com os dados da cromatografia constatou-se tratar do mesmo polímero, o poli-hidroxi-butilato (PHB), porém seria necessária a realização de outras análises tais como GPC (determinação da massa molar) e Ressonância Magnética Nuclear, a fim de definir melhor os polímeros obtidos no que diz respeito a sua estrutura, e assim justificar as alterações nos valores encontrados.

Como continuidade do trabalho, ensaios mecânicos e biológicos com o gênero *Lysinibacillus* seriam de grande interesse, para melhor caracterizar o polímero obtido a partir de fontes de carbono alternativas, para assim definir as áreas em que este polímero mostraria melhor desempenho.

Os poucos resultados mencionados demonstram a importância de trabalhos mais sistemáticos de bioprospecção com o objetivo de detectar bactérias produtoras de PHA da biodiversidade brasileira, sobretudo, na região Amazônica.

Sugere-se pesquisas com foco em novas linhagens selvagens, linhagens recombinantes, culturas mistas, purificação eficiente, uso de substratos mais baratos, dentre outras alternativas para a diminuição dos custos de produção de plásticos biodegradáveis.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPLAST. *Indústria brasileira de transformação de material plástico: perfil 2012*. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br/site/estatisticas>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

AMARAL, A.M.; REIS, M.S.; SILVA, F.R. O programa BLAST: guia prático de utilização. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

AMIRUL, A.A.; AHMAD, R.M.Y.; SUDESCH, K.; AZIZAN M.N.M.; MAJID, M.I.A. Isolation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) producer from Malaysian environment using γ -butyrolactone as carbone source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. vol 25, p. 1199-1206. 2009.

ASH, C.; FARROW, JAE.; WALLBANKS, S.; COLLINS, MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 13, p. 202-206, 1991.

ASIEDU, Y.; GU, P. Product life cycle cost analysis: state of the art review. *International Journal of Production Research*, v. 36, n. 4, p. 883-908, 1998. <http://dx.doi.org/10.1080/002075498193444>

BOIN, E. A. S. F.; GODÓI, F. C. DE; ROCHA, S. C. DOS S. Análise da fluidodinâmica do polihidroxibutirato (phb) em leite fluidizado pulsado rotativo. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA. 8., Uberlândia/MG. 2009

BORAH, B.; THAKUR, P.S.; NIGAM, J.N. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 92, p. 776-783, 2002.

BORSCHIVER, S.; ALMEIDA, L. F. M.; ROITMAN, T. Monitoramento Tecnológico e Mercadológico de Biopolímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 18, n. 3, p. 256-261, 2008.

BRÄMER, C.O.; SILVA, L.F. GOMEZ, J.C.G.; PRIEFERT, H.; STEINBÜCHEL, A. Identification of the 2-methylcitrate pathway involve in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101 and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. *Applied and Environmental Microbiology*. vol 68, n. 1. p. 271-279. 2002.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 6, n. 1. p. 29-37. 1978.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P. ; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.6, n. 2, p.127-139, 2011. ISSN 1809-8797.

BRZOSTOWICZ, P.C.; BLASKO, M.S.; ROUVIÈRE, P.E. Identification of two gene clusters involved in cyclohexanone oxidation in *Brevibacterium epidermidis* strain HCU. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:781–789. 2002.

CARASCHI, J. C.; RAMOS, U. M., LEÃO, A. L. Compósitos biodegradáveis de polihidroxibutirato (PHB) reforçado com farinha de madeira: propriedades e degradação. *Acta Scientiarum Maringá*, v. 24, n. 6, p. 1609-1614, 2002.

CH'N, D. H-E.; SUDESH, K. Densitometry based microassay for the determination of lipase depolymerizing activity on polyhydroxyalkanoate. *AMB Express*, v. 3, n. 22. 2013. <http://dx.doi.org/10.1186/2191-0855-3-22>.

CHEN, G.Q.; GAO, X.; YUAN, X.X.; SHI, Z.Y.; GUO, Y.Y.; SHEN, X.W.; CHEN, J.C.; WU, Q. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *E. coli* containing an optimized PHA synthase gene. *Microb Cell Fact.*, v. 11, n. 130. 2012. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-11-130>.

CHEN, G.Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, vol. 26, p. 6565-6578. 2006.

CHEN, G-Q. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, Microbiology Monographs, v. 14, 2010. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-03287_5_2.

CHEN, G-Q.; CAI, L.; TAN, D., AIBAI DULA, G.; DONG, X-R.; CHEN, J-C.; TIAN, W-D. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. *Microbial Cell Factories*, v. 10, n.88, 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-10-88>.

CHÈNEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HÈNAULT, C.; GERMON, J.C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. *FFMS Microbiology Ecology*, vol. 34, p. 121-128. 2000.

CORDEIRO-BARBOSA, F. DE A.; AGUIAR, J. L. DE A.; LIRA, M. M. DE M.; FILHO, N. T. DE P.; BERNARDINO-ARAÚJO, S. Uso de um biopolímero na forma gel para o tratamento de olhos eviscerados: modelo experimental em coelhos. *Arq. Bras. Oftalmol.*, v. 75, n.4, p. 267-272, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27492012000400010>.

COSTA, G.C. M. DA. *Microbiota Bacteriana associada às esponjas de água doce da Amazônia*. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Estado do Amazonas – UEA. Manaus, 2012.

DEEPAK, V.; PANDIAN, S.B.R.K.; KALISHWARALAL, K.; GURUNATHAN, S. Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. *Bioresource Technology*, vol. 100, p. 6644-6646. 2009.

DI CELLO, F.; PEPI, M.; BALDI, F.; FANI, R. Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species,

Acinetobacter venetianus. *Research in Microbiology* v. 3, n. 148, p. 237–249. doi:10.1016/S0923-2508(97)85244-8. 1997.

FACCIN, D.J.L. *Avaliação de condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por Bacillus megaterium e modelagem do bioprocesso*. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

FALCONE, D.M. B.; AGNELLI, J. A. M.; FARIA, L. I. L. de. Panorama setorial e perspectivas na área de polímeros biodegradáveis. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, n. 1, p. 5-9, 2007.

FINKLER, L. *Produção de polihidroxicanoatos por Cupriavidus necator usando ácido acrílico como fonte de carbono*. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/COPPE, Rio de Janeiro, 2006. 144 p.

FONSECA, G. G. *Produção de polihidroxicanoatos por Escherichia coli recombinante*. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

GAMAL, R. F.; ABDELHADY, H. M.; KHODAIR, T. A.; EL-TAYEB, T. S.; HASSAN, E. A.; ABOUTALEB, K. A. Semi-scale production of PHAs from waste frying oil by *Pseudomonas fluorescens* S48. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 539-549, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013000200034>.

GOMES, M.J.P. Tópicos em bacteriologia veterinária: gênero *Bacillus* spp. Rio Grande do Sul: FAVET-UFRGS, 2013.

GOMEZ, J.G.C. *Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos*. 1994. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, São Paulo, 1994.

GOMEZ, J.G.C.; FONTOLAN, V.; ALLI, R.C.P.; RODRIGUES, M.F.A.; BUENO NETTO, C.L.; SILVA, L.F.; SIMÕES, D.A. Production of P3HB-co-3HV by soil isolate bacteria able to use sucrose. *Revista de Microbiologia*. vol 28, n. 1., p. 43-48. 1997.

GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, R.C.P.; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L.; OLIVEIRA, M.S.; SILVA, L.F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalcanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol 45, p. 785-791. 1996.

GOUDA, M.K.; SWELLAM, A.E.; OMAR, S.H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, vol.156, p. 201–207, 2001.

GUMEL, A.M.; ANNUAR, M.S.; HEIDELBERG, T. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates copolymers produced by *Pseudomonas putida* Bet001

isolated from palm oil mill effluent. *PLoS One.*, v. 7, n. 9. 2012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0045214>.

HEYNDRICKX, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; HOSTE, B.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K.; DE VOS, P.; LOGAN, N.A.; ALI, N.; BERKELEY, R.C.W. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1966) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1984) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended description of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int J Syst Bacteriol*, vol. 46, p. 270–279. 1996.

HORI, K.; KANEKO, M.; TANJI, Y.; XING, X.H.; UNNO, H. Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol.59, p. 211-216, 2002.

IBRAHIM, M.H.A.; STEINBÜCHEL, A. *Zobellella denitrificans* strain MW1 a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. *Journal of Applied Microbiology*. vol 108, p. 214-225. 2009.

JAMIL, N.; AHMED, N. ; EDWARDS, D. H. Characterization of biopolymer produced by *Pseudomonas* sp.CMG607w of marine origin. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 53, p. 105-109. 2007.

JENDROSSEK, D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 1186-1196, 2007.

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

JIN, H.; NIKOLAU, B.J. Role of genetic redundancy in polyhydroxyalkanoate (PHA) polymerases in PHA biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol*. v. 194, n. 20, p. 5522-5529. 2012.

KAWASHIMA, Y.; CHENG, W.; MIFUNE, J.; ORITA, I.; NAKAMURA, S.; FUKUI, T. Characterization and functional analyses of R-specific enoyl coenzyme A hydratases in polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha*. *Appl Environ Microbiol.*, v. 78, n. 2, p. 493-502. 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.06937-11>.

KHAN, A. B.; KHATTAK, M. I.; TARAR, O. M.; HABIB, F.; JAMIL, K.; YASMIN, A. ; PARVEZ, S. Separation of polyhydroxyalkanoates-producing bacterial strains using pha synthase gene and their evaluation for pha deposition. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Curitiba, v.56, n.4, p. 645-652, July/Aug. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132013000400015>

KICHISE, T.; FUKUI, T.; YOSHIDA, Y.; DOI, Y. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 25, p. 69-77, 1999.

KIRAN, G.S.; LIPTON, A.N.; PRIYADHARSHINI, S.; ANITHA, K.; SUÁREZ, L.E.C.; ARASU, M.V.; CHOI, K.C.; SELVIN, J.; AL-DHABI, N.A. Antiadhesive activity of polyhydroxy butyrate biopolymer from a marine *Brevibacterium casei* MSI04 against shrimp pathogenic vibrios. *Microbial Cell Factories*, vol. 13, p. 114-125. 2014.

KRUEGER, C.L. *Seleção de linhagens de Bacillus produtoras de polihidroxialcanoatos a partir de resíduo do processamento de mandioca*. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

LAW, K.H.; CHENG, Y.C.; LEUNG, Y.C.; LO, W.H.; CHUA, H.; YU, H.F. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for polyhydroxyalkanoates synthesis. *Biochemical Engineering Journal*, vol.16, p. 203-208, 2003.

LEE, J. H.; ASHBY, R. D.; NEEDLEMAN, D. S.; LEE, K-T.; SOLAIMAN, D. K. Y. Cloning, sequencing, and characterization of lipase genes from a polyhydroxyalkanoate (PHA)-synthesizing *Pseudomonas resinovorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 96, p. 993-1005, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4133-x>.

LEE, S.Y. Review: bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering.*, v. 49, p. 1-14. 1996.

LEE, S.Y.; PARK, J.M.; KIM, T.Y. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Ralstonia eutropha* H16 for polyhydroxyalkanoate synthesis, lithoautotrophic growth, and 2-methyl citric acid production. *BMC Syst Biol.*, v. 5, n. 101. 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-5-101>.

LEE, T.; LIN, J.; WANG, S.; SHAW, G. Phaq, a new class of poly-hydroxybutyrate (phb)-responsive repressor, regulates phaq and phap (phasin) expression in *Bacillus megaterium* through Interaction with PHB. *Journal of Bacteriology*, vol. 186, n. 10, p.3015-3021, 2004.

LELLIOT, R.A.; STEAD, D.E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants, *Methods in plant pathology*, 2, *British Society for Plant Pathology*, 1987.

LI, X.T.; SUN, J.; CHEN, S.; CHEN, G.Q. In vitro investigation of maleated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for its biocompatibility to mouse fibroblast L929 and human microvascular endothelial cells. *J. Biomed. Materials.*, 2007. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.31890>.

LICIO, D.C.P. *Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase*. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, São Paulo, 2011.

LOPEZ, M.S.G.; ROCHA, R.C.S.; ZANOTTO, S.P.; GOMEZ, J.G.C. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. vol 25, p. 1751-1756. 2009.

LOUWS, F.S.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.*, vol. 37, p. 81-125. 1999.

LÜTKE-EVERSLOH, T.; BERGANDER, K.; LUFTMANN, H; STEINBÜCHEL, A. Identification of a new class of biopolymer: bacterial synthesis of a sulfur-containing polymer with thioester linkages. *Microbiology.*, vol. 147,n. 1, p. 11-19. 2001.

RAMSAMACAGNAN, K. L.; RODRIGUES, A. A.; MOREIRA, A. da S.; MOURA, A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Bioprospecção de bactérias potencialmente produtoras de polihidroxicanoatos. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 21./ MOSTRA CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 4., 2012, Rio Grande do Sul. *Anais...* Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Pelotas, 2012.

MACHADO, A.R.T.I; MARTINS, P.F.Q.I; FONSECA, E.M.B.I; REIS, K.C.II. Compósitos biodegradáveis a base de polihidroxibutirato-hidroxivalerato (PHB-HV) reforçados com resíduos do beneficiamento do café. *Revista Matéria*, v. 15, n. 3, p. 400-404, 2010.

MATIAS, F.; BONATTO, D.; PADILLA, G.; RODRIGUES, M.F.A.; HENRIQUES, J.A.P. Polyhydroxyalkanoates production by Actinobacteria isolated from soil. *Canadian Journal of Microbiology.* vol 55, p. 790-800. 2009.

MATIAS, F.; LISBÔA, M.P.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J.A.P. Analysis and characterization of new PHA-producing actinomycetes strains from different types of soils. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia: Foz do Iguaçu. 2001. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia. P. 251. 2001

MATIAS, F.; RODRIGUES, M. F. de A. Novos produtos PHA usando fontes de carbono não relacionados. *Braz. J. Microbiol.*, v.42, n. 4, São Paulo, out. / dez., 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000400017>.

MATSUDA, T. S. *Isolamento de bactérias produtores de polihidroxicanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais*. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, São Paulo, 2009.

MATSUSAKI, H.; ABE, H.; TAGUCHI, K.; FUKUI, T.; DOI, Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene phaC1 from *Pseudomonas* sp. 61-3. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, v.53, n. 401-409, 2000.

MCCOOL, G.J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M.C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, 138, p. 41-48, 1996.

MIGUEIS, R. *Geografia do Amazonas*. Manaus: Valer, 2011.

MINAYO M.C. *O desafio do conhecimento: pesquisa qualitativa em saúde*. Rio de Janeiro: Abrasco, 2007.

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

NORONHA, M.C. *Amazonas e seu espaço geográfico*. São Paulo: Ática, 2010.

OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOB, I.; STEINBÜCHEL, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters*, vol.23, p. 1119-1123, 2001.

PANDIAN, S.B.R.K.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; MUNIYANDIA, J.; RAMESHKUMAR, N.; GURUNATHAN, S. Synthesis of PHB nanoparticles from optimized medium utilizing dairy industrial waste using *Brevibacterium casei* SRKP2: A green chemistry approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 74, p. 266-273. 2009.

PAULA, F. C. *Polihidroxicanoatos (PHAs): Bioprospecção de micro-organismos e produção a partir de glicerol*. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2012.

PEREIRA, P. P.; RODRIGUEZ, R. J. S.; BARROS JUNIOR, L. P. Formulação de biocompósitos de polihidroxibutirato (phb) diamantados para o desenvolvimento de dispositivos ortopédicos. CONGRESSO FLUMINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLOGIA. 5., Campos dos Goytacazes/RJ. 2013.

POBLETE-CASTRO, I.; ESCAPA, I. F.; JÄGER, C.; PUCHALKA, J.; LAM, C. M. C.; SCHOMBURG, D.; PRIETO, M. A.; SANTOS, V. A.P. M. DOS. The metabolic response of *P. putida* KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single- and multiple-nutrient-limited growth: highlights from a multi-level omics approach. *Microbial Cell Factories*, v. 11, n. 34, March, 2012. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-11-34>.

PROCÓPIO, A.R.L.; PROCÓPIO, R.E.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; MELO, I.S. Diversity of propanil-degrading bacteria isolated from rice rhizosphere and their potential for plant growth promotion. *Genet. Mol. Res.* Vol. 3, n. 11, p. 2021-2034. 2012. doi: 10.4238/2012.

RAICHER, G. *Análise econômica da produção de polímeros biodegradáveis no contexto de uma biorefinaria a partir de cana-de-açúcar*. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, São Paulo, 2011.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATILLE, P.; RAMSAY, J.A. Production of poly-B-hydroxybutyric-co-B-hydroxyvaleric acids. *App. Env. Microbiol.*, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

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

ROA, J. P. B.; MANO, V. ; FAUSTINO, P. B.; FELIX, E.B.; SILVA, M. E. S. R. e; FILHO, J. D. S. Síntese e caracterização do copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co- ϵ -caprolactona) a partir de poli(3-hidroxi-butirato) e poli(ϵ -caprolactona). *Polímeros*, v. 20, n. 3, p. 221-226, 2010.

RODRIGUEZ, J.K.B. Produção de poli-hidroxi-alcanoatos por linhagens recombinantes de *Escherichia coli*. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

ROZO, Y. P. G. *Bioprospecção de genes relacionados à biossíntese de polímeros biodegradáveis a partir de uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica*. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, São Paulo, 2011.

RYAN, W. J.; O'LEARY, N.D.; O'MAHONY M.; DOBSON, A. D. GacS-dependent regulation of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Pseudomonas putida* CA-3. *Appl Environ Microbiol.*, v.79, n.6, p. 1795-802, March, 2013. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02962-12>.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

SHAMALA, T. R.; VIJAYENDRA, S.V.N.; JOSHI, G.J. Agro-industrial residues and starch for growth and co-production of polyhydroxyalkanoate copolymer and α -amylase by *Bacillus sp.* Cfr-67. *Braz. J. Microbiol.*, v.43, n.3, p. 1094-1102, São Paulo, julho / set., 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000300036>.

SHRIVASTAV, A.; KIM, H-Y.; KIM, Y-R. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed Research International.*, v. 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/581684>.

SILVA, L. F. DA; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. DA C. Produção biotecnológica de poli-hidroxi-alcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Quim. Nova*, v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007.

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

SINGH, M.; PATEL, S.K.S.; KALIA, V.C. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories*, vol. 38, n. 8. 2009. [doi:10.1186/1475-2859-8-38](http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-8-38)

SLEPECKY, R.A.; LAW, J.H. Synthesis and degradation of poly-3-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, vol.82, p. 37-42, 1961.

SOUZA, L.A.G.; CASTELLÓN, E.G. *Desvendando as fronteiras do conhecimento na região amazônica do alto Rio Negro*. Projeto Fronteira, Manaus: INPA, 2012.

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

STEWART, I; SCHLUTER, P.J.; SHAW, G.R. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environmental Health*, vol 5, p. 5-7. 2006. doi:10.1186/1476-069X-5-7

STRELEC, T. *Isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes ramnolipídios e polihidroxicanoatos e avaliação da relação metabólica no processo de síntese*. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan, São Paulo, 2006.

SUN, M.; ZHOU, P.; PAN, L.F.; LIU, S.; YANG, H.X. Enhanced cell affinity of the silk fibroin-modified PHABHHX material. *J. Mater. Sci.*, v. 20, p. 1743-1751. 2009.

TAJIMA, K.; HAN, X.; SATOH, Y.; ISHII, A.; ARAKI, Y.; MUNEKATA, M., TAGUCHI, S. In vitro synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) incorporating lactate (LA) with a block sequence by using a newly engineered thermostable PHA synthase from *Pseudomonas* sp. SG4502 with acquired LA-polymerizing activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 94, p. 365–376, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3840-z>.

TAJIMA, K.; HAN, X.; SATOH, Y.; SATOH, T.; MATSUMOTO, K.; KAKUCHI, T.; TAGUCHI, S.; DAIRI, T. MUNEKATA, M. Chemo-enzymatic synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) incorporating 2-hydroxybutyrate by wild-type class I PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 92, p. 509-517, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3362-8>.

TAKAKU, H.; KIMOTO, A.; KODAIRA, S.; NASHIMOTO, M.; TAKAGI, M. Isolation of a Gram-positive poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-degrading bacterium from compost, and cloning and characterization of a gene encoding PHB depolymerase of *Bacillus megaterium* N-18-25-9. *FEMS Microbiol Lett*, vol. 264, p. 152-159. 2006.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; AND KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* V.28, p. 2731-2739. 2011.

TANAMOO, V.; IMAI, T.; DANVIRUTAI, P.; KAEWKANNETRA, P. Biopolymer generation from sweet sorghum juice: screening, isolation, identification, and

fermentative polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus aryabhatai*. *Turk J Biol*, vol. 37, p. 259-264. 2013. doi:10.3906/biy-1205-62

THOMSON, N. M.; SAIKA, A.; USHIMARU, K.; SANGIAMBUT, S.; TSUGE, T.; SUMMERS, D. K.; SIVANIAH, E. Efficient production of active polyhydroxyalkanoate synthase in *E. coli* by co-expression of molecular chaperones. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 79, n. 6, p. 1948-1955, March, 2013. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02881-12>

TORREGO-SOLANA, N.; MARTIN-ARJOL, I.; BASSAS-GALIA, M.; DIAZ, P.; MANRESA, A. Hydroxy-fatty acid production in a *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 PHA synthase mutant generated by directed mutagenesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 93, p. 2551–2561, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3646-z>

VALAPPIL, S.P.; BOCCACCINI, A.R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol.91, p.1-17, 2007a.

VALAPPIL, S.P.; MISRA, S.K.; BOCCACCINI, A.R.; KESHAVARZ, T.; BUCKE, C.; ROY, I. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterized *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology*, vol.132, p. 251-258, 2007b.

VALAPPIL, S.P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G.J.; HERNIMAN, J.M.; BOCCACCINI, A.R.; BUCKE, C.; ROYA, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *Journal of Biotechnology*, vol.127, p. 475–487, 2007c.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 20, n.1, p. 51-64, 2010.

VOAIDES, C.; GROPOSILA, D.; CIUCA, M.; LUPESCU, I.; POP, A.; CORNEA, C.P. PHAs accumulation in *Pseudomonas putida* P5 (wild type and mutant) in lipid containing media. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 15, n. 4, p. 5467-5473, 2010.

WANG Y, R. L.; CHUA, H.; YU, P.H.F. Cloning and expression of the PHA synthase genes *phaC1* and *phaC1AB* into *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.22, p. 559–563, 2006.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W.J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1694, p. 299-310. 2004.

WIKIMAPIA. Disponível em: <<http://wikimapia.org/>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.H.; CHEN, J.; HO, K.P.; CHEN, G.Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol.80, p. 111–118, 2001.

WU, S.; LIU, Y.L. CUI, B.; QU, X.H. CHEN, G.Q. Study on decellularized porcine aortic valve/poly poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) hybrid heart valve in sheep model. *Artif. Organs*, v. 30, n. 9, p. 690-697. 2007.

XI, J.; ZHANG, L.; ZHENG, Z.A.; CHEN, G.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Composite scaffolds poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-hydroxyapatite preparation and evaluation of porous. *J. Biomater. Appl.*, 2008. <http://dx.doi.org/10.1177/0885328207075425>, 22:293.

YANG, M.; ZHU, S.; CHEN, Y.; CHANG, Z.; CHEN, G.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHAN, X. Studies on bone marrow stromal cells affinity of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Biomaterials*, v. 25, p. 1365-1373. 2004.

YANG, X.S.; ZHAO, K.; CHEN, G. K. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. *Biomaterials*, v. 23, n. 5, p. 1391-1397. 2002.

YE, C.; HU, P.; MA, M.; XIANG, Y.; LIU, R.; SHANG, X. PHB/PHBHHX scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, v. 30, p. 4401-4406. 2009.