

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA,  
EXTENSÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS TECNOLÓGICOS E  
AMBIENTAIS**

**Márcia Féldreman Nunes Gonzaga**

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE  
POLIHIDROXIALCANOATO (PHA) E ESTUDOS PARA SUA PRODUÇÃO E  
APLICAÇÃO**

**Sorocaba/SP**

**2023**

**Márcia Féldreman Nunes Gonzaga**

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE  
POLIHIDROXIALCANOATO (PHA) E ESTUDOS PARA SUA PRODUÇÃO E  
APLICAÇÃO**

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais (PPGPTA) da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Processos Tecnológicos e Ambientais.  
Orientador: Prof. Dr. Fabio Marcio Squina.

**Sorocaba/SP**

**2023**

### Ficha Catalográfica

G651s Gonzaga, Márcia Féldreman Nunes  
Seleção de microrganismos produtores de polihidroxialcanoato (PHA) e estudos para sua produção e aplicação / Márcia Féldreman Nunes Gonzaga. – 2023.  
153 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Marcio Squina  
Tese (Doutorado em Processos Tecnológicos e Ambientais) –  
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2023.

1. Biopolímeros. 2. Lignina. 3. Poli-Hidroxialcanoatos. 4. Sustentabilidade. I. Squina, Fabio Marcio, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

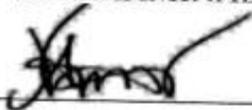
**Márcia Féldreman Nunes Gonzaga**

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE  
POLIHIDROXIALCANOATO (PHA) E ESTUDOS PARA SUA PRODUÇÃO E  
APLICAÇÃO**

Tese aprovada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor no Programa de  
Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e  
Ambientais (PPGPTA) da Universidade de  
Sorocaba.

Aprovada em: 24/02/2023

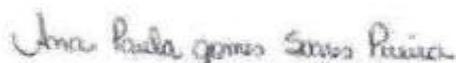
BANCA EXAMINADORA



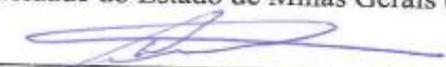
Prof. Dr. Fabio Marcio Squina  
Universidade de Sorocaba (UNISO)



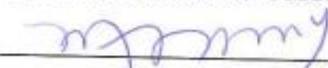
Prof. Dr. Luis Henrique Romano  
Centro Universitário Amparense Instituição (UNIFIA)



Prof. Dra. Ana Paula Gomes Soares Pereira  
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG)



Prof. Dr. Daniel Bertoli Gonçalves  
Universidade de Sorocaba (UNISO)



Prof. Dra. Valquiria Miwa Hanai Yoshida  
Universidade de Sorocaba (UNISO)

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a minha família que acreditaram em mim em todos os momentos desta caminhada.

Minha mãe: Durvalina Nunes Gonzaga; meu filho: Wesley Luis Féldreman da Mata; meus irmãos: Maikon Nunes, Célia Nunes Gonzaga e Glaucia Joelma Fernandes.

## **Epígrafe**

O ser humano é infinito no saber...

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por conceder-me sua graça e força, onde tornou possível concretizar o término desta tese de doutorado.

Imensa gratidão ao Orientador Prof. Dr. Fabio Marcio Squina, pelos ensinamentos no decorrer desta caminhada, seus direcionamentos contribuiriam significativamente para o meu desempenho como pesquisadora. Sem suas orientações eu não teria chegado até aqui!

Meu obrigado à Universidade de Sorocaba; Reitor de Campus; Pró-Reitoria da Pós-Graduação; Ao Administrador e Gestor do setor de Recursos Humanos e Desenvolvimento de Pessoas, pelo recurso aprovado em bolsa de estudo, apoiando minha capacitação docente e permitindo-me concretizar este sonho.

Ao acolhimento e ensinamentos do Coordenador do Programa de Pós-Graduação Stricto-Sensu em Processos Tecnológicos e Ambientais: Prof. Dr. Daniel Bertoli Gonçalves, pelas aulas ministradas e participação na banca como avaliador desta tese.

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação e defesa: Prof. Dr. Luis Henrique Romano, Profa. Dra. Ana Paula Gomes Soares Pereira, Prof. Dr. Daniel Delgado Queissada, Profa. Dra. Valquiria Miwa Hanai Yoshida, foi uma honra o aceite, participação e apontamentos de cada um de vocês para o aperfeiçoamento desta pesquisa.

Ao apoio da FAPESP, Processos: 07/53883-6; 15/50590-4; 20/05784-3; 20/11019-8; 21/08564-7; 20/15483-0 e pelos equipamentos de multiusuário e apoio dos bolsistas de iniciação científica: Bruno Botega Foltran, Murilo Antônio Ramos, Isabela Anne Furlanes Rodrigues.

Ao meu grande amigo companheiro de trabalho de longo tempo na área acadêmica e companheiro de estudo durante os ensaios laboratoriais deste doutoramento, o Prof. Dr. Rodrigo Boscarol, sua ajuda foi fundamental!

À empresa de fabricação de embalagens de material plástico: “**J&E PLASTICOS**”. ND Plásticos Indústria e Comércio de plástico Ltda, que fica situada em São Carlos-SP, por ter acreditado no meu projeto e parceria, desenvolvendo um molde/ embalagem da amostra de resina PHB exportada.

Ao corpo docente do Colegiado de Enfermagem da UNISO em especial ao Coordenador do Curso, Prof. Irineu César Panzeri Contini e amigos companheiros de trabalho de longa data na área acadêmica Prof<sup>a</sup> Sheilla Sieldler Tavares e Prof. Clayton Almeida Gonçalves.

Aos amigos acadêmicos da Bahia, que me acompanharam nesta trajetória, em momentos distantes e momentos presentes: Hozana Dias Ferreira, Hortência Ferreira, Jaldemir Batista Bezerra e Maique Bezerra Batista.

Aos amigos: Prof. Kayo Augusto Pacher, que me convidou por algumas vezes em participar das suas aulas práticas de microbiologia. E ao Prof. Luis Carlos Pompeu amigo que me acompanhou na trajetória desta caminhada!

E um agradecimento especial ao médico espanhol, o Dr. Antonio Miguel Carrión Sanches, pela sua participação como ouvinte na minha defesa, mesmo estando em outro continente. Você foi minha inspiração para os esforços e alcançar esta titulação.

Estas duas páginas, são curtas para o meu todo, expressar em agradecimentos.

## RESUMO

No início do século 20, ocorreu uma explosão no desenvolvimento tecnológico e industrial, que afetou também o uso de plástico na sociedade. O uso em larga escala, aliado à baixa degradação do plástico, induziram a consequências danosas ao meio ambiente, gerando problemas ecológicos como o acúmulo do material em aterros sanitários e a poluição de oceanos. Além do caráter ambiental, a produção de plástico convencional, desenvolvido a partir de recursos de petróleo, também se faz como um crescente problema no mundo. O presente trabalho teve por objetivo, triar cepas microbianas com capacidade de produção de PHA a partir de amostras do solo; avaliar o uso de lignina como fonte de carbono para os microrganismos visando a produção de biopolímeros em larga escala. Avaliar as características físico-químicas do biopolímeros produzidos. A produção biopolímeros sustentáveis em larga escala é esperada no Brasil, sendo vantajoso, à medida que favorece o crescimento e o desenvolvimento econômico e industrial do país. Para os ensaios, foram planejados experimentos observando o comportamento de diferentes cepas isoladas, identificando as classes e gêneros destes microrganismos, através do sequenciamento da região rDNA 16S e da região ITS, posteriormente, foi utilizado a *epifluorescência* por uso de corantes dos microrganismos com concentrações distintas de fonte de carbono, utilizando os corantes de *Nile Blue A* e *Sudan Black B*. Os métodos espectrofotométricos foram utilizados na determinação qualitativa dos poliésteres das células bacterianas, o ensaio ácido crotônico convertido atingiu o pico confirmatório de hidrolização, o que confirma que as condições cultivadas em e acréscimo de substratos de carbono fornecidos foram adequadas. Os picos referentes do espectro de FTIR O espectro de FTIR representa o trecho característico de monômeros, os resultados confirmaram a produção de PHA biogênicos extraídos na presente pesquisa, sendo comparável com o espectro de FTIR para os polímeros de PHA. Outros fatores podem ser considerados à busca pelo aumento nesta produção como, por exemplo, induzir estresse ao microrganismo produtor, explorar largamente a aplicação da lignina como recurso flexível sustentável como fonte de carbono. Outra sugestão, é a utilização novos processos de extração do biopolímero por solventes não tóxicos, favorecendo a sustentabilidade e viabilidade econômica para a indústria.

**Palavras-chave:** biopolímeros; lignina; substratos de cultivo; resinas de PHB.

## ABSTRACT

At the beginning of the 20th century, there was an explosion in technological and industrial development, which also affected the use of plastic in society. The large-scale use, combined with the low degradation of plastic, induced harmful consequences to the environment, generating ecological problems such as the accumulation of material in landfills and ocean pollution. In addition to the environmental character, the production of conventional plastic, developed from petroleum resources, is also a growing problem in the world. This study aimed to screen microbial strains with capable of PHA production from soil samples; Evaluate the use of lignin as a carbon source for microorganisms aiming at the production of biopolymers on a large scale. To evaluate the physicochemical characteristics of the produced biopolymers. The production of sustainable biopolymers on a large scale is expected in Brazil, being advantageous, as it favors the country's economic and industrial growth and development. For the tests, experiments were planned observing the behavior of different strains isolated, identifying the classes and genera of these microorganisms, through the sequencing of the 16S rDNA region and the ITS region, subsequently, *epifluorescence* was used by using dyes of microorganisms with different concentrations of carbon source, using the dyes of *Nile Blue A* and *Sudan Black B*. Spectrophotometric methods were used in the qualitative determination of the polyesters of bacterial cells, the converted crotonic acid assay reached the confirmatory peak of hydrolization, which confirms that the conditions cultivated in and addition of carbon substrates provided were adequate. The referring peaks of the FTIR spectrum The FTIR spectrum represents the characteristic stretch of monomers, the results confirmed the production of biogenic PHA extracted in the present research, being comparable with the FTIR spectrum for the PHA polymers. Other factors can be considered to the search for increase in this production, for example, induce stress to the producer microorganism, explore widely the application of lignin as a sustainable flexible resource as a source of carbon. Another suggestion is the use of new biopolymer extraction processes by non-toxic solvents, favoring sustainability and economic viability for the industry.

**Keywords:** biopolymers; lignin; culture substrates; PHB resins.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Aplicação e industrialização de PHA .....	35
<b>Figura 2</b> - Composição monomérica dos PHA: (a) estrutura química geral; (b) representação do grupo de cadeias de PHA.....	36
<b>Figura 3</b> – Processo de formação dos grânulos de PHA .....	39
<b>Figura 4</b> - Fotos dos tubos de centrífuga, tipo Falcon do pré-inóculo após 30h .....	53
<b>Figura 5</b> - Fotos do equipamento para processos de liofilização.....	54
<b>Figura 6</b> - Resultados do teste de Gram das linhagens denominadas THs obtidas a partir da seleção de microrganismos em estudo.....	60
<b>Figura 7</b> - Resultados do teste de Gram das linhagens denominadas BRs obtidas a partir da seleção de microrganismos em estudo. A figura nº 6 é a cepa cedida para o estudo, denominada <i>P. Putida</i> .....	60
<b>Figura 8</b> - (A) (B) Imagem do gel de agarose das linhagens isoladas do solo e selecionadas em estudo.....	62
<b>Figura 9</b> - Resultado de BLASTn ( <a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> ) e parâmetros de busca utilizados visando a identificação taxonômica da linhagem BR4.....	65
<b>Figura 10</b> - Resultados do teste por método de coloração das cepas de THs e <i>Arthrobacter</i> por <i>Sudan Black B</i> e <i>Nile Blue A</i> com diferentes concentrações de glicerol e glicose .....	66
<b>Figura 11</b> - Resultados de teste de coloração com o <i>Sudan Black B</i> e <i>Nile Blue A</i> nas linhagens denominadas “BRs” em estudos estriadas em placas de petri individuais comparando as mesmas fontes de carbono utilizadas: a glicose e glicerol .....	67
<b>Figura 12</b> - Imagens amplificadas por microscopia (MET) com os grânulos de PHA das cepas denominadas (BR4) <i>Pseudomonas</i> , e cepa de (TH1) <i>Klebsiella</i> sp .....	69
<b>Figura 13</b> - Gráfico da curva padrão do ácido crotônico, mostrando a absorbância por comprimento de onda .....	70
<b>Figura 14</b> - Curva calibração crotônico .....	71
<b>Figura 15</b> - Gráfico do Resultado de FTIR – PHA – cepa <i>P. putida</i> .....	72
<b>Figura 17</b> - Cultivo de <i>Arthrobacter</i> realizado em concentração 0,05mg/mL de lignina .....	74
<b>Figura 18</b> - Cultivo de <i>Arthrobacter</i> realizado Cultivo de <i>Arthrobacter</i> realizado em concentração 0,5mg/mL de lignina .....	74
<b>Figura 19</b> - Biomassa suspensa em cultivo de <i>Arthrobacter</i> em concentração 0,25mg/mL de lignina.....	75

<b>Figura 20</b> - Bactérias TH1 e BR4, respectivamente, no dia seguinte após a inoculação em cultivo de concentração de 0,25mg/mL, ao lado de um tubo de controle .....	76
<b>Figura 21</b> - Bactérias BR4 e TH1, respectivamente, no dia seguinte após a inoculação em cultivo de concentração de 0,05mg/mL, ao lado de um tubo de controle .....	76
<b>Figura 22</b> - Biomassa de <i>Arthrobacter</i> e TH1 em meio de concentração 0,8 mg/mL .....	77
<b>Figura 23</b> - Biomassa de <i>Arthrobacter</i> , (TH1) <i>Klebsiella</i> sp e (BR4) <i>P. putida</i> em meio de concentração 0,8mg/mL de lignina .....	77
<b>Figura 24</b> - Resultado da separação cromatográfica.....	78
<b>Figura 25</b> - Gráfico das análises feitas no espectro de UV, apresentando as curvas de crescimento.....	79
<b>Figura 26</b> - Análise do alinhamento de sequência obtido por BLASTn ( <a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> ) visando a identificação da cepa <i>P. putida</i> .....	96
<b>Figura 27</b> - Análise no software <i>Geneious</i> Visando a identificação da cepa BR1 – <i>Mycolicibacterium</i> .....	98
<b>Figura 28</b> - Análise no software <i>Geneious</i> Visando a identificação da cepa BR2: <i>Pseudomonas</i> (igual a BR4) .....	99
<b>Figura 29</b> - Análise no software <i>Geneious</i> Visando a identificação da cepa BR3: <i>Pseudomonas</i> (igual a BR5) .....	100
<b>Figura 30</b> - Análise no software <i>Geneious</i> Visando a identificação da cepa BR4 – <i>Pseudomonas</i> (igual a BR2) .....	101
<b>Figura 31</b> - Análise no software <i>Geneious</i> Visando a identificação da cepa BR5 – <i>Pseudomonas</i> (igual a BR3) .....	102
<b>Figura 32</b> - Análise no software <i>Geneious</i> Visando a identificação da cepa BR6 – <i>Trichosporon</i> (fungo) .....	103
<b>Figura 33</b> - Análise no software <i>Geneious</i> Visando a identificação da cepa BR7 - <i>Gordonia</i> .....	104
<b>Figura 34</b> - Análise no software <i>Geneious</i> Visando a identificação da cepa TH1 - <i>Klebsiella</i> .....	106
<b>Figura 35</b> - Análise no software <i>Geneious</i> Visando a identificação da cepa TH2 - <i>Microbacterium</i> .....	108
<b>Figura 36</b> - Análise no software <i>Geneious</i> Visando a identificação da cepa TH3: <i>Isoptericola</i> .....	110
<b>Figura 37</b> - Análise no software <i>Geneious</i> Visando a identificação da cepa TH4 – <i>Candida</i> (fungo) .....	111

<b>Figura 38</b> - Análise no <i>software Geneious</i> Visando a identificação da cepa TH5 - <i>Bacillaceae</i> .....	113
<b>Figura 39</b> - Análise no <i>software Geneious</i> Visando a identificação da cepa TH6 - <i>Bacillus</i>	115
<b>Figura 40</b> - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR1.....	116
<b>Figura 41</b> - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR2.....	117
<b>Figura 42</b> - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR3.....	118
<b>Figura 43</b> - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR4.....	119
<b>Figura 44</b> - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR5.....	119
<b>Figura 45</b> - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR6.....	120
<b>Figura 46</b> - Resinas de PHB industrial da Biocycle .....	122
<b>Figura 47</b> - Equipamento de calorimetria diferencial de varredura.....	125
<b>Figura 48</b> - Resultado do teste DSC (Fig. A) e (Fig. B) que é o gráfico da amostra referencial .....	126
<b>Figura 49</b> - Protótipos desenvolvidos .....	128

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Estrutura da tese .....	26
<b>Quadro 2</b> - Substituição do grupo e alguns PHA mais conhecidos.....	36
<b>Quadro 3</b> - Concentração, reagentes e primers específicos utilizados .....	48
<b>Quadro 4</b> - Descrição das propriedades da resina de PHA .....	124

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

3HA	3-hidroxiacil
Anti-HIV	Anti- vírus da imunodeficiência humana
BHS	Meio mineral
cm	centímetros
Coopersucar	Cooperativa dos Produtores de Cana-de-açúcar do Estado de São Paulo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria de varredura diferencial
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de <i>Fourier</i>
g	Gramma
h	Hora
HBME	Hidroxibutirato Éster Metílico
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas da USP
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
KBR	Brometo de potássio
LB	Luria Bertani
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
min.	Minutos
mm	Milímetros
MPa	Megapascal
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
ONU	Organização das Nações Unidas
P&G	<i>Procter and Gamble</i>
P3HB	Poli-3-hidroxibutirato
PA	Concentração padrão
PB	Pares de bases
PCL	Policaprolactona
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> [reação em cadeia da polimerase]
PE verde	Polietileno verde
PET	Polietileno tereftalato
PHA	Polihidroxialcanoato

PHA-lcl	Hidroxialcanoatos classificados de comprimento de cadeia longa
PHA-mcl	Hidroxialcanoatos de comprimento de cadeia média
PHA-scl	Hidroxialcanoatos de cadeia lateral de cadeia curta
PHB	Polihidroxibutirato
PHBISA	PHB Industrial S/A
PLA	Ácido polilático
PP	Polipropileno
PVC verde	Policloreto de vinila verde
s	Segundos
TB	<i>Terrific broth</i>
TPS	Amido termoplástico
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1 Definição do problema .....	22
1.2 Objetivo Geral .....	24
1.2.1 Objetivos específicos.....	24
1.3 Justificativa.....	24
1.4 Estrutura do Trabalho .....	25
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
2.1 Produção Biotecnológica e Bioeconômica de Bioplástico .....	27
2.2 A busca por fontes sustentáveis de biopolímeros.....	31
2.3 Polihidroxicarboxilatos – PHA .....	32
2.3.1 Propriedades físico-químicas dos PHA .....	35
2.3.2 Bactérias e a capacidade de síntese de PHA.....	37
2.3.3 Polímero polihidroxibutirato – PHB.....	40
2.3.4 Polihidroxibutirato (P3HB) .....	41
2.3.5 Espécies do Gênero <i>Pseudomonas</i> .....	41
2.3.6 Aplicação de correntes de lignina como recurso considerável flexível.....	42
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
3.1 Procedimentos Iniciais.....	44
3.1.1 Coleta das amostras do solo para o desenvolvimento de consórcios microbianos.....	44
3.1.2 Preparo do cultivo e inoculação das cepas de <i>P. putida</i> e <i>Arthrobacter</i> , no caldo Luria Bertani (LB).....	45
3.1.3 Semeadura na placa de Petri e manutenção das cepas.....	45
3.1.4 Desenvolvimento dos consórcios microbianos.....	45
3.1.5 Isolamento dos microrganismos dos consórcios microbianos.....	46
3.1.6 Teste de coloração de Gram e identificação morfológica de bactérias .....	46
3.1.7 Amplificação do material biológico por reação de cadeia polimerase – PCR .....	47

3.1.8 Análise de amostra de DNA por método em eletroforese em gel de agarose 1% .....	48
3.1.9 Análise por sequenciamento de DNA .....	49
3.2 Estoque das cepas e consórcios microbianos .....	50
3.3 Análise qualitativa .....	50
3.3.1 Cultivo dos meios de cultura “ <i>Sudan Black B</i> ” e “ <i>Nile Blue A</i> ” .....	50
3.3.2 Análise por microscópio eletrônico de transmissão (MET) .....	51
3.4 Produção da biomassa bacteriana em frascos agitados .....	52
3.4.1 Preparo do meio de cultivo TB e inoculação da colônia .....	52
3.4.2 Preparo do meio M9 mineral e inoculação do pré-inóculo .....	53
3.4.3 Centrifugação.....	53
3.4.4 Liofilização.....	54
3.4.5 Retestagem de Gram a partir do material centrifugado.....	55
3.4.6 Extração do PHA a partir de solventes.....	55
3.5 Caracterização de PHA por métodos espectrofotométricos .....	56
3.5.1 Espectroscopia UV-visível .....	56
3.5.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	57
3.5.3 Análise de por HPLC (UltiMate LPG-3400SD, Thermo Scientific).....	58
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
4.1 Resultado do teste de coloração de gram das linhagens avaliadas no estudo.....	59
4.2 Resultado por análise de eletroforese .....	62
4.3 Resultados do produto purificado.....	63
4.4 Resultado das análises de sequenciamento microbiano das amostras das linhagens de trabalho.....	63
4.5 Resultados da coloração de colônias <i>Sudan Black B</i> e <i>Nile Blue A</i> .....	65
4.6 Resultado da análise por microscópio eletrônico de transmissão (MET) .....	68
4.7 Resultados da caracterização físico-química do biopolímeros.....	69
4.7.1 Resultados Quantitativo de PHA produzidos por espectroscopia UV- VIS da linhagem de <i>P. putida</i> .....	70

4.7.2 Resultado da X e Y – e resultado do teste gravimétrico.....	71
4.7.2 Resultado do FTIR – Produção de PHA: <i>P. putida</i> .....	71
4.8 Experimentos a partir da degradação dos compostos fenólicos da lignina .....	72
4.8.1 Condições do cultivo no meio de Cultura com Lignina .....	73
4.8.2 Inoculação da cepa de <i>Arthrobacter</i> em meio contendo Lignina na concentração de 0,5mg/mL .....	73
4.8.3 Inoculação cepa de <i>Arthrobacter</i> em meio de Lignina na concentração de 0,25mg/mL e 0,05mg/mL .....	73
4.8.4 Experimento com lignina com cepas de TH1 e BR4 na concentração de 0,25mg/mL e 0,05mg/mL .....	75
4.8.5 Experimento com lignina com cepas de TH1 e BR4 na concentração de 0,6mg/mL .....	76
4.8.7 Avaliação do consumo de fragmentos de lignina por extração com solvente Orgânico. ....	77
4.8.8 Resultado da análise dos fragmentos da lignina por HPLC.....	78
4.8.9 Curva do crescimento das cepas bacterianas em meios com lignina.....	79
4.8.10 Estoque das linhagens das cepas adaptadas ao cultivo em meio de lignina .....	80
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>81</b>
5.1 Contribuições.....	82
5.2 Trabalhos futuros .....	82
5.3 Restrições e limitações no projeto .....	83
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>96</b>
Anexo A – Resultados do sequenciamento das bactérias.....	96
Anexo B – Resultados das árvores filogenéticas do sequenciamento .....	116
Anexo C – Embalagens produzidas por PHB.....	121
Anexo D- Artigo: análise de mercado do composto derivado da biomassa vegetal lignocelulósica-álcool coniferol .....	129
Anexo E – Artigo: Estudo das oportunidades do mercado industrial relacionados a utilização de bioplásticos microbianos em substituição a plásticos derivados do petróleo.....	142

## 1. INTRODUÇÃO

Os plásticos convencionais são polímeros produzidos com materiais sintéticos, tendo o petróleo como base. O papel de destaque destes polímeros é notado em seu largo uso ao redor do mundo, possuindo distintos fins. Apesar de sua extensa propagação, se observa que estes plásticos são recalcitrantes, sendo muito resistentes à degradação química ou física; característica que provoca preocupação quanto às questões ambientais e sociais, dado que não são biodegradáveis e causam acúmulo crescente no meio ambiente (NOVELLI; RENE, SAYAVEDRA, 2021; VERLINDEN *et al.*, 2007,).

No início do século 20, ocorreu uma explosão no desenvolvimento tecnológico e industrial, que afetou também o uso de plástico, inserido na vida cotidiana, na sociedade. O uso em larga escala, aliado à baixa degradação do plástico, induziram a consequências danosas ao meio ambiente, gerando problemas ecológicos como o acúmulo do material em aterros sanitários e a poluição de oceanos. Além do caráter ambiental, a produção de plástico convencional, desenvolvido a partir de recursos de petróleo, também se faz como um crescente problema no mundo (FRIDOVICK-KEIL, 2020; MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019).

Entre alternativas ao plástico de compostos petrolíferos, pode se citar o bioplástico, definido como material plástico moldável feito de compostos de origem biológica ou derivados por microrganismos encontrados na natureza, tais como: as bactérias, fungos, algas e até mesmo plantas modificadas. O bioplástico é obtido através de recursos renováveis e, em alguns casos, é biodegradável (AMORIM, 2019; FRIDOVICK-KEIL, 2020).

Estudos para a substituição dos polímeros plásticos tradicionais, têm incentivado, pesquisas sobre desenvolvimento de biopolímeros de polihidroxialcanoato (PHA), sintetizados por bactérias de gêneros diferentes, encontradas no solo, em iodo ativado e até em ambiente de alto mar dentre outros ambientes (CHEN, 2010).

O termo PHA é utilizado para se referir à família de poliésteres de origem microbiana, produzidos biotecnologicamente a partir de fontes renováveis. Os PHA são acumulados por microrganismos como materiais de reserva de carbono e de energia, com potencial de utilização no desenvolvimento de polímeros de origem biológica que podem ser usados para produzir os bioplásticos. Este tipo de bioplástico vem sendo pesquisado há mais de 70 anos, apontado como um material semelhante, em composição, aos plásticos derivados de petróleo, sendo, entretanto, sustentável, biocompatível, não-tóxico e biodegradável, dessa forma, considerado promissor (CHEN; WANG, 2017).

A taxonomia estabelece as relações entre estes grupos de microrganismos e subsidia referências de linguagem universal em estudos biológicos. Se trata de um termo derivado do grego com objetivo principal de classificar e diferenciar os organismos vivos. Existem em média mais de 100 milhões de organismos vivos (TORTORA *et al* 2012), e mais de 300 tipos de microrganismos possuem a capacidade de sintetizar biopolímeros de PHA, porém poucas cepas são efetivamente empregadas na sua produção (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

Estudos sobre a biodiversidade de solo, subsidiam que os diversos organismos habitantes fazem parte da fração viva do solo, e há uma parte essencial destes microrganismos, tanto no processo de ciclagem de nutrientes como em degradação de compostos (BRADY *et al.*, 2013; MIRANSARI, 2013). Os microrganismos são ubíquos e podem ser isolados no solo, na água e até mesmo em ambientes extremos como águas termais (HORNINK, 2015).

Historicamente, no século XIV, Louis Pasteur realizou diferentes tipos de fermentações em microrganismos do solo, onde teve como resultado a transformação do etanol em ácido acético. Esses experimentos foram considerados importantes, intitulado seu Instituto como o pioneiro da microbiologia do solo (AZEVEDO *et al.*, 2018).

A seleção de amostras de solos, acontecem por técnicas de fermentação, onde cultivava-se, e faz o isolamento das colônias, subsequentemente analisa-se os ácidos nucleicos (DNA ou RNA) (AZEVEDO *et al.*, 2018). O processo de fermentação, é considerado promissor para obtenção de biopolímeros da família de polihidroxialcanoatos (PHA). Fato que justifica a aplicação das condições de cultivos para favorecer essa produção (CHANPRATEEP, 2010).

Neste campo, se busca a identificação de microrganismos que tenham alto potencial em aplicação biotecnológica, ou seja, selecionar novas cepas, afim de conhecer as características microbianas e potencializar suas aplicações (HORNINK, 2015).

Agregou-se nesta pesquisa, cultivos microbiológicos com adição de lignina, como meio de fonte de energia, ou seja, carbono natural, sendo este recurso considerável flexível e sustentável, minimizando o emprego de reagentes na produção de bioplástico (SANTOS; VETORIN, 2021).

Com apoio de recursos da FAPESP, realizou-se desfechos operacionais, com amostras de resinas de (PHB) provindas por importação de uma indústria que desenvolve bioplástico na China.

## **1.1 Definição do problema**

As questões ligadas ao descarte do plástico levaram à proposição de alternativas para reduzir os danos causados, como: (a) a redução do volume produzido, (b) o reaproveitamento

e (c) a reciclagem deste material proveniente de fonte de matéria-prima não renováveis, buscando reduzir os impactos ambientais causados pelo problema agravado pela resistência do tempo de degradação e a decomposição dos plásticos (BRITO *et al.*, 2011). Também pode ser citado o processo de incineração de plásticos, que provoca a liberação de CO<sub>2</sub> na atmosfera rapidamente, e como consequência, contribui para a ocorrência do fenômeno conhecido por efeito estufa (NOVELLI; RENE; SAYAVEDRA, 2021).

Com a percepção da importância da correta gestão desse material, nos últimos anos, houve considerável crescimento nas pesquisas sobre produção de plásticos a partir de fontes não renováveis, reforçando a evidente necessidade em se mudar a matéria-prima de sua fabricação e consequentemente o tempo de decomposição, em vias da redução dos problemas ambientais gerados (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2018).

Essa problemática também relacionada, com o fato do plástico convencional, ser produzido a partir de matéria-prima do petróleo, sendo este recurso, previsto como finito, além da preocupação em encontrar novas reservas de petróleo (AMORIM, 2019; SPINOLA, 2018), incluindo implicações dos custos da extração do petróleo, cujo processo é complexo (AMORIM, 2019).

O valor do preço do barril de petróleo, apresenta dados históricos de aumento gradual a cada década com possibilidade de ser este um recurso finito (AMORIM, 2019; SPINOLA, 2018), Campbell e Laherrère, (1988), contextualiza em seu artigo publicado a história da produção do petróleo "*The End of Cheap Oil*" (O Fim do Petróleo Barato), apontando o declínio gradual da produção do petróleo, com estimativas de finais de reservas em 2050.

Os bioplásticos produzidos por Polihidroxialcanoatos (PHA) são possíveis candidatos a substitutos ideais de plásticos produzidos a partir de recursos não renováveis, dada a sua facilidade de descartabilidade (VIEGAS, 2005), sendo este fator, um destaque comparativo ao plástico produzido com derivados de petróleo, que podendo levar centenas de anos para a decomposição (FONSECA, 2014).

Este tipo de biopolímero, em processo de decomposição, se misturam a outros materiais constituintes do lixo, podendo se misturar as matérias orgânicas não causando resistência para sua degradação em aterros sanitários, dessa forma não afetando sua capacidade de armazenamento a longo prazo, podendo até ser aproveitados como fertilizantes (FONSECA, 2014; VIEGAS, 2005).

Porém, os recursos necessários para esta aplicação ainda são limitantes, devido ao alto custo para execução do procedimento, (exemplo o custo de energia, tratamento de água,

solventes químicos utilizados), bem como a competição de mercado com os outros polímeros de fontes não renováveis (DELGADO *et al.*, 2015; FONSECA, 2014).

Com isso, a pesquisa desenvolvida e descrita ao longo desta tese buscou viabilizar experimentos com cepas potencialmente produtoras de PHA encontradas no solo, fornecendo subsídios para continuidade de trabalhos que visem aplicações para mercado de comprometidos com o meio ambiente e a sociedade.

## **1.2 Objetivo Geral**

Triar cepas microbianas com capacidade de produção de PHA a partir de amostras do solo.

### **1.2.1 Objetivos específicos**

- Avaliar o uso de lignina como fonte de carbono para os microrganismos visando a produção de biopolímeros em larga escala;
- Avaliar as características físico-químicas do biopolímeros produzidos;

## **1.3 Justificativa**

O atual trabalho se justifica pela importância do plástico à humanidade, atualmente, cuja elevada produção se relaciona a severas questões ambientais. Quanto a isto, observa-se recentes inovações no campo de desenvolvimento tecnológico as quais permitiram novas possibilidades da criação do bioplástico. Esta tese representa a procura e postulação por opções diante da estagnação do ritmo de inovações em polímeros sintéticos. Considera-se, principalmente, as vantagens da adoção de biopolímeros produzidos por microrganismos produtores de PHA.

A produção biopolímeros sustentáveis em larga escala é esperada no Brasil, sendo vantajoso, à medida que favorece o crescimento e o desenvolvimento econômico e industrial do país. Além disto, o Brasil, devido à sua biodiversidade de reservas naturais, apresenta grande possibilidade para o uso de tecnologias que atendam às exigências de sustentabilidade, sem altas demandas de reconversões de infraestrutura (; KRUGLIANSKAS; PINSKY, 2017).

A respeito da temática em questão, a literatura aponta para um alto investimento em pesquisas sobre a avaliação de cepas de microrganismos produtoras de PHA no país (LÍCIO, 2011). Subsequentemente para viabilizar a produção destes biopolímeros é necessário encontrar estratégias para o uso de substratos de baixo custo para os cultivos microbianos, eficiente destas origens de bactérias (RODRIGUEZ-PEREZ *et al.*, 2018).

De Paula *et al.* (2017), em seu trabalho, citam que as cotações de PHB pela empresa americana Telles, com valores de US\$ 2/kg e os custos para os cultivos, incluindo a compra de matéria-prima, alcançaram a média de 40% do preço total. Isto justificaria a necessidade de insumos de cultivo, tais como fontes de nutrientes, carbonos e outros de baixo custo para viabilizar os custos de produção de PHA.

Em documento elaborado e traduzido para o Brasil sobre a plataforma da Agenda 2030, da Organização das Nações Unidas (ONU), elencam-se os objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS), os quais abrangem questões sociais, ambientais, saúde, educação entre outros, enfatizando meio de reciclagem, prevenção, reuso de embalagens (AGÊNCIA BRASIL, 2015). Fator que compreende a ação global para proteger o planeta, e relevância do tema quanto à necessidade no desenvolvimento de biopolímeros, e investimento em pesquisas científicas com apoio governamental e por meio de empresas privadas (GONZAGA; SQUINA, 2022).

Sendo assim, nos pautamos na importância deste estudo, na proposição de meios para o desenvolvimento sustentável à produção de bioplástico, considerando o contexto nacional, bem como a conjuntura ambiental.

#### **1.4 Estrutura do Trabalho**

O presente trabalho foi dividido em cinco capítulos (Quadro 1), onde é apresentado o texto introdutório à proposta da pesquisa, trata da definição do problema, os objetivos, a justificativa e a estrutura do trabalho, exposta no atual tópico; o Capítulo 2 se volta à compilação do referencial teórico tomado para construção da tese, havendo contextualização sobre a produção global de plástico e bioplástico, com a exibição de revisão da literatura sobre os principais conceitos trabalhados; no Capítulo 3, foram abordados os materiais e procedimentos tomados no cerne da pesquisa, sendo feita, nesta seção, a exibição dos passos metodológicos adotados para atingir os objetivos propostos; o Capítulo 4 se baseia na exposição, análise e na discussão dos principais resultados encontrados; e, por fim, o Capítulo 5 relata as conclusões elaboradas através do processo de pesquisa, explicitando e propondo possibilidades futuras à investigação científica na área.

O Quadro 1, exhibe a estrutura da tese.

**Quadro 1** - Estrutura da tese

<p><b>Capítulo 1</b> Introdução</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Definição do problema</li> <li>• Objetivos</li> <li>• Justificativa</li> <li>• Estrutura do trabalho</li> </ul>
<p><b>Capítulo 2</b> Revisão de Literatura</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contextualização sobre a produção global de plástico</li> <li>• Exibição de revisão da literatura acerca dos conceitos de polímeros</li> <li>• Apresentação dos biopolímeros trabalhados</li> <li>• Aplicação de lignina proposto como recurso considerável flexível e sustentável na produção de bioplástico produção de PHA</li> </ul>
<p><b>Capítulo 3</b> Material e Método</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exibição dos passos e procedimentos para a realização dos objetivos propostos pela pesquisa</li> </ul>
<p><b>Capítulo 4</b> Resultados e Discussão</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Principais resultados encontrados pela pesquisa proposta</li> <li>• Análise e discussão dos achados</li> </ul>
<p><b>Capítulo 5</b> Considerações Finais</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conclusões do processo de pesquisa</li> <li>• Passos futuros à investigação científica na área</li> <li>• Observações finais</li> </ul>

**Fonte:** Elaboração própria.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O atual capítulo se desenvolve através da elucidação acerca dos polímeros, sua crescente produção global e os problemas ambientais relacionados, além de exibir os principais conceitos e conclusões elaboradas dentro da literatura da área. Foram feitas a apresentação dos principais polímeros trabalhados, suas características, produção operacional, vantagens de desvantagens de uso; impactos de resíduos plásticos no meio ambiente, como também a exposição de outros métodos de recursos considerados flexível e sustentável, através de uma revisitação da literatura.

### 2.1 Produção Biotecnológica e Bioeconômica de Bioplástico

O principal problema em relação ao plástico advém da grande demanda de produção e da gestão dos resíduos, ou o descarte dos produtos (GONZAGA; SQUINA, 2022).

Nos últimos 10 anos se notou um considerável incremento na produção de plásticos a partir de fontes não renováveis em todo o mundo. As pesquisas pontuaram para aumento do consumo em média de 230 para 320 milhões de toneladas de plástico sendo estas depositadas no meio ambiente (OLIVEIRA, 2010), que aproximadamente 50% deste volume é voltado à produtos que são descartados dentro de um ano após sua compra (SHARMA; SINGH, 2016).

O que acarreta consequências ambientais como a contaminação do solo e a água subterrânea através de lixiviação, poluição nos rios como a criação de vetores, obstrução de rede de esgoto, causando alagamentos e enchentes, destruindo casas, impactando a saúde de pessoas, conseqüentemente, os microplásticos, são transportados para o oceano atingindo a fauna marítima entres outros desequilíbrios dos ecossistemas (SINGH; SHARMA, 2016; OLIVEIRA, 2010).

Inseridos no contexto do uso do plástico de forma desenfreada pela sociedade, além de causar sérios danos ambientais na diversidade biológica e alterações de nichos ecológicos, de difícil mensuração (BELO BITENCOURT *et al.*, 2021; MATIAS *et al.*, 2022). Abrangendo também impactos secundários de forma não intencional. Estes são citados como, a poluição visual, entupimento de boca de lobos, formação de esgotos, redução da drenagem de água ocasionando enchentes locais. Outra consequência é o transporte dos resíduos plásticos para o oceano. Estes impactos acometem diretamente as cadeias alimentares de toda biosfera, incluindo dos seres humanos, ocasionando diversas enfermidades, inclusive cânceres (BELO BITENCOURT *et al.*, 2021; MATIAS *et al.*, 2022).

Os fatos apresentados evidenciam a necessidade emergente de tomada de decisão pelos órgãos competentes de produção e gestão de produtos e embalagens plásticas, visando o desenvolvimento sustentável, pois estes materiais são resistentes à degradação, intensificando danos no meio ambiente (MATIAS *et al.*, 2022).

O tempo de degradação do plástico é muito elevado, sendo em média entre 40 e 50 anos, período em que, pode ser estendido, dependendo do tipo de compostos utilizados como matéria-prima na fabricação, por exemplo, a garrafa PET (polietileno tereftalato) que pode chegar até 200 anos para se degradar na natureza (COUTINHO *et al.*, 2004).

Micán e colaboradores (2017), referenciam em seu artigo que a estimativa de decomposição total do plástico tradicional, pode levar até “500 anos”, o autor dá como exemplo o polipropileno, este tipo de polímero é composto pelo monômero de propileno. Comparativo muito significativo, quanto ao parâmetro de decomposição de um bioplástico orgânico, desenvolvido com padrões reconhecidos pelo ecossistema, onde se confirma, sua capacidade de decomposição num período médio de semanas, realizando um tratamento para decomposição muito menos agressivo, contraposto aos necessários para o tratamento dos polímeros convencionais.

Um estudo feito em 2013, na Arábia Saudita apontou que a produção de plástico anual global era 300 milhões de toneladas, em média, havendo um aumento anual de cerca de 5%. O fato agravante é dado que o processo de reciclagem é de alto custo, e não eficiente para total degradação. Destaca-se que, além dos pontos discutidos, este material não-biodegradável atinge diretamente o meio ambiente devido ao acúmulo de lixo (MADKOUR *et al.*, 2013).

O crescimento da demanda da produção de plástico, impulsionada pelo aumento da população, toca todas as áreas de mercado de produção ou serviços, no contexto da sociedade global. Assim, envolve saúde, produção de alimento, água, energia e outras matérias-primas para bens de consumo, necessários para manter o progresso e a qualidade de vida. Como uma solução viável para a promoção de desenvolvimento sustentável, apresentam-se os processos de biotecnologia (ERBAS; MEMIS, 2012).

Ao considerar-se as questões intrusivas ao meio ambiente, observa-se a necessidade de se estudar a substituição dos plásticos sintéticos pelos plásticos biodegradáveis. Alguns desafios são apontados pelas indústrias quanto à produção de bioplástico, relacionados à viabilidade econômica; à competitividade em relação ao plástico sintético, pontuada a relevância da redução dos custos para a produção (QUINES *et al.*, 2015).

Entre as novas possibilidades trazidas pela biotecnologia, se destaca a biotecnologia ambiental, que abrange uma ampla gama de possibilidades de interesse para identificação de cepas microbianas frente aos metabólitos produzidos (HORNINK, 2015).

No Brasil, o interesse da biotecnologia microbiana, iniciou em 1940 e foi entendida com a possibilidade da utilização do sistema celular no desenvolvimento de produtos de veículo econômico ou social. Na década de 70, as indústrias iniciaram a tecnologia de processos de fermentações com DNA (AZEVEDO *et al.*, 2018).

Os plásticos de PHA de origem microbiana, podem representar substitutos promissores, tendo propriedades semelhantes a plásticos sintéticos, como o polipropileno, mas com capacidades elevadas quanto à biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de possuir propriedades mecânicas análogas como elasticidade, versatilidade e flexibilidade (KUMAR; SHAH, 2021).

A decomposição dos polímeros biodegradáveis, depende da constituição do material e do ambiente envolvido, tendo como possibilidade de serem decompostos com a ação natural, sob ação de biodegradação em condições favoráveis de microrganismos no solo, o tempo médio de degradação pode ter variação entre alguns meses, ou algumas semanas podendo ultrapassar um ano. O processo dependerá do tipo de resina que foi adicionada na composição (BRITO *et al.*, 2011; COUTINHO *et al.*, 2004; DE PAULA *et al.*, 2017).

Estes biopolímeros são estratégias aceita e estimulada, para o desenvolvimento sustentável por processos biotecnológicos, a partir de diferentes resíduos agroindustriais ou desenvolvidos a partir de resíduos domésticos, através de processos fermentativos produzidos, pelos próprios microrganismos, podendo ser convertidos em biomassa que pode conter alguns dos componentes de interesse como trigo, milho, cana-de-açúcar, arroz, melaço, batata, polpa de fruta mista, lipídeos, proteínas de soja entre outros (BRITO *et al.*, 2011; BIOPLASTICS EUROPEAN, 2016; GIRONI; PIEMONTE, 2011).

Gironi e Piemonte (2011), descrevem em seu artigo que o mercado sugere a comercialização de alguns tipos biopolímeros que são baseados em ésteres celulósicos como por exemplo os termoplásticos (TPS): o ácido polilático (PLA); policaprolactona (PCL); poliglicolatos (PGA) e polihidroxiburato (PHB), estas linhagens são recombinantes com amido, lignina, fermentações dentre outros.

No ano de 2018, as pesquisas apontam que a produção de biopolímeros atingiram 2,11 milhões de toneladas, incluindo 1,4% de bioplástico a partir de PHA, fato que fortalece grande esforço investigativo para as indústrias na triagem de cepas produtoras (MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2018).

Entretanto, para que ocorra a viabilidade econômica à produção biotecnológica, são necessários estudos sobre substituição de componentes de meios de cultivos por compostos com bases biológicas, de resíduos de baixo custo (PLEISSNER; VENUS, 2016). O que reforça a importância da produção com cultivos em processos de ampla escala.

A biotecnologia industrial surgiu em vias de promover a criação de produtos químicos e sustentáveis, incluindo os polímeros biológicos, dado que o uso excessivo de petróleo levou à uma crise energética mundial e comprometendo também os recursos ambientais (CHEN, WANG, 2017). A crise energética está relacionada nos processos de crescimento econômico de industrialização, provenientes de recursos petroquímicos e seus derivados, incluindo as refinarias (GUEDES, 2015; SOUZA, 2006).

Neste sentido, houve a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em meados dos anos 70, incentivando a produção sustentável de bioenergia, provindo da cana-de-açúcar, afim de favorecer a garantia em processos de alta tecnologias, que aumentavam o consumo energético, para garantir a demanda do barril de petróleo processado (AZEVEDO *et al.*, 2018; GUEDES, 2015).

Ainda, na perspectiva do desenvolvimento de PHA utilizando recurso considerado de baixo custo para a produção de biopolímeros, considerou-se o referencial dos autores Santos e Vetorin, (2021) na agregação da lignina nos cultivos microbianos como fonte de energia natural, não utilizando reagentes químicos (SANTOS; VETORIN, 2021).

O potencial uso de derivados de lignina, através das vias catabólicas de suas moléculas aromáticas como fonte de carbono. No entanto, alguns organismos como exemplo a *P. putida*, que são encontrados na natureza desenvolveram essas vias metabólicas, permitindo a utilização com moléculas de lignina como fonte de energia (LINGER *et al.*, 2014).

O uso de correntes heterogêneas, enriquecidas com lignina e organismos de várias espécies, representam um recurso flexível para uma economia de energia sustentável, em estudos de polihidroxialcanoatos com monômeros de cadeia média (ml-PHA) e de cadeia curta (scl-PHA) (LINGER *et al.*, 2014; RAJESH *et al.*, 2019).

A integração dos derivados a base de lignina demonstra a viabilidade de produtos com alto potencial para aplicações em diversos campos comerciais, prospectando também, estratégias de desenvolvimento de biomassa de lignina residual como amplo recurso em biorrefinarias com intenção internacional (LINGER *et al.*, 2014; RAJESH *et al.*, 2019).

## 2.2 A busca por fontes sustentáveis de biopolímeros

Os plásticos são polímeros não naturais com ampla aplicabilidade. O termo plástico deriva do grego “*plastiko*”, que significa maleável, observado que a maleabilidade é uma das características dos moldes de termoplásticos, os quais têm a possibilidade de ter o formato modificado por ação de solventes químicos e aquecimento (BASTOS, 2007).

O químico Jöns Jacob Berzel criou o termo polímero em 1832, buscando explicar as moléculas orgânicas em seus elementos e propriedades químicas (SILVEIRA *et al.*, 2016). As macromoléculas são formadas por mais de uma centena de átomos, ou seja, por unidades de repetição (monômeros), ligadas entre si, denominadas “polímeros”: termo que deriva da junção entre as palavras gregas “*polis*”, que significa muitas, e “*meros*”, que significa partes. Os polímeros são desenvolvidos a partir de estruturas de unidades químicas monoméricas repetidas (BASTOS, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2016).

No século XX, surgiu o primeiro polímero totalmente sintético, o que foi acompanhado da produção de uma grande diversidade de plásticos desenvolvidos e adotados largamente pela sociedade moderna. A amplificação de aplicações, de polímeros em meados passados, justifica-se devido à disponibilidade de petróleo a preços baixos e a resistência e durabilidade do produto em degradação natural (BASTOS, 2007).

Os polímeros podem ser considerados (1) sintéticos, desenvolvidos por meio de insumos químicos, ou (2) naturais, oriundos de ciclos de organismos vivos, através de processos metabólicos complexos (BASTOS, 2007; FARIAS *et al.*, 2016).

Há diversos processos metabólitos de interesse produzidos por microrganismos, que têm variadas aplicações. A produção dos biopolímeros atraiu indústria e pesquisadores devido à biodegradabilidade do material produzido, que era não tóxico e possuía biocompatibilidade e diversidade química (ABREU *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2014).

Brito e colaboradores (2011), exemplificam os “polímeros verdes”, que foram produzidos pela indústria Braskem, se tratando de um tipo de polímero que não é biodegradável, porém geram menor impacto ambiental, quando, comparados aos polímeros convencionais. Assim, os primeiros polímeros verdes foram sintetizados com recursos de matérias-primas de fontes fósseis, (petróleo, carvão mineral e gás natural) modificados a partir de fontes renováveis, desenvolvidas com avanços tecnológicos decorrentes (BRITO *et al.*, 2011).

Como exemplos de polímeros verdes, pode se citar o polietileno verde (PE verde) e o policloreto de vinila verde (PVC verde), ambos não são biodegradáveis, embora sejam classificados como biopolímeros por serem provenientes de fontes renováveis (cana-de-

açúcar), em detrimento da utilização de fontes fósseis (como o petróleo) (BRITO *et al.*, 2011), não se trata de um produto novo (BASTOS, 2007), é um tipo de polímero é denominado como termoplástico, por não terem a capacidade de transformar sua estrutura quando aquecidos e/ ou resfriados (BRITO *et al.*, 2011).

No Brasil, no ano de 2004, foi desenvolvido a resina termoplástica composta por PE verde no Centro de Tecnologia e Inovação da Braskem, a partir do etanol, ano em que a empresa também recebeu a assinatura inédita de “**Declaração de Produção mais limpa**”, certificada pela ONU (BRASKEM, 2022, BRITO *et al.*, 2011).

Este polímero ameniza a emissões de gases, reduzindo assim o efeito estufa, o PE, recebeu o certificado por um laboratório internacional, renomado, o laboratório Beta Analytic, atestando que o produto contém 100% de matéria-prima renovável (BRASKEM, 2022; BRITO *et al.*, 2011).

Algumas empresas também tiveram experiências ligadas à produção destes polímeros. A inglesa *Imperial Chemical Industrie* produziu embalagens de PHA para serem usadas como frascos de xampu, com o nome comercial de Biopol, em meados dos anos 70. A empresa *Procter and Gamble* (P&G) desenvolveu um PHA-mcl específico com o nome de Nodax, tendo certificações de compostabilidade industrial e doméstica com biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia em solo, água doce e água salgada (MIREL PLASTICS, 2021).

A empresa americana Metabolix produz matérias-primas sustentáveis a partir de fontes renováveis, transformando açúcares naturais em PHA eficientes, na recuperação dos polímeros em seus *pellets*, produzindo os bioplásticos. Empresas chinesas também iniciaram a produção de bioplástico em grande escala no final desta mesma década (DANIMER SCIENTIFIC, 2021; MIREL PLASTICS, 2021).

### 2.3 Polihidroxicanoatos – PHA

Polihidroxicanoato (PHA) é o termo utilizado para designar a família de poliésteres de origem microbiana (MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019). Há um vasto número de microrganismos capazes de acumular PHA, em especial os pertencentes ao reino monera, onde cerca de 300 espécies de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas são capazes de acumular biopolímeros (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; SPÍNOLA, 2018; VIEGAS, 2005).

As cepas produtoras de PHA, são encontradas na natureza, como no solo, na água, efluentes, água do mar, com capacidade de armazenar energia sob a forma de grânulos insolúveis de polímero biodegradável em suas células (BRITO *et al.*, 2011; MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019; SPÍNOLA, 2018; VIEGAS, 2005).

Este biopolímero foi descoberto pelo bacteriólogo francês Lemogine em 1926, quando visualizou inclusões no citoplasma de uma bactéria, a *Azotobacter chroococcum*. Estudos biotecnológicos confirmam a capacidade de produzir PHA em larga escala, a partir de uma grande variedade de cepas microbianas com aplicação de meios de cultura, ao isolamento do microrganismo. As cepas produtoras acumulam os polímeros, para a sua condição de crescimento e produção de bioplásticos de PHA (MICÁN *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2014).

O PHA é comercializado como matéria-prima, em forma de *pellets* ou em pó, tendo múltiplas aplicações como: na área médica, visto em películas de revestimento; em cirurgias cardiovasculares, aplicados em suturas cirúrgicas do pericárdio e esterno; e em materiais osteossintéticos, não formando adesões entre os tecidos humanos (MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019; VIEGAS, 2005).

Sua estrutura e variedade são diferenciadas em sua composição por múltiplas unidades de monômeros de ácidos hidroxialcanóicos, sendo distinguidos conforme os números de átomos de carbono, nas unidades monoméricas, constituídas no comprimento de sua cadeia lateral, ou seja, de átomos de carbono ou do radical (R), e sua estrutura pode ser modificada por meio natural, químico ou físico, conforme o nutriente a ser aplicado (DELGADO; CORDOBA, 2015; LEE, 1996).

O número de carbonos (n) determina a identidade da unidade polimerizada, sendo dividida em três grupos: os hidroxialcanoatos de cadeia lateral de cadeia curta (PHA – scl), que são constituídos de três a cinco átomos de carbono na cadeia (C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>). Os hidroxialcanoatos de comprimento de cadeia média (PHA – mcl) variam, em média, de seis a 14 monômeros de átomos de carbono que formam os monômeros (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>), e os hidroxialcanoatos classificados de comprimento de cadeia longa (PHA – lcl), cujos monômeros contém mais de 14 átomos. Há mais de 150 tipos de monômeros distintos e variados pelos números encontrados no grupo de poliésteres naturais (CHOONUT; SANGKHARAK, 2019; DELGADO; CORDOBA, 2015; LI *et al.*, 2016; WANG; CHEN, 2017).

Steinbuchel e Valentin (1995), classificam como PHA de cadeia longa, aqueles que são estruturados com monômeros com mais de 17 átomos de carbono, além deste referencial teórico, não foram identificados outros PHA produzidos, classificados com mais de 16 átomos de carbono.

Apesar dos elementos relatados, o polímero apresenta alta resistência à solventes, como gorduras e óleos e raios UV e permeável, porém tem baixa resistência a ácidos e bases (PINZÓN, 2015). Isto difere especialmente dos biopolímeros de cadeia média (PHA-mcl), que são altamente elásticos (VIEGAS, 2005).

Os materiais de PHA desenvolvidos para este fim são considerados materiais mais relevantes quando comparados aos PHA de 1ª geração. Estes tornam-se mais viáveis devido as instalações, proveniente de onde a matéria-prima pode ser gerada, uma vez que também podem ser utilizados nas linhas de produção existente. Como um exemplo, se cita a PHB Industrial S/A (PHBISA), situada no estado de São Paulo. Para realizar a hidrólise da sacarose, a empresa utiliza a cepa de *Cupriavidus necator* a partir da cana-de-açúcar, produzindo o polímero comercializado sob a marca *Biocycle*, juntamente com o Instituto de Ciências Médicas da Universidade de São Paulo (USP) (MIRANDA *et al.*, 2017).

A PHBISA, especializada na produção de PHB, atua em processos de produção de cana-de-açúcar e na conversão térmica do bagaço da cana através de processo fermentativo hidrolisado para o bioetanol para gerar energia elétrica (MIRANDA *et al.*, 2017).

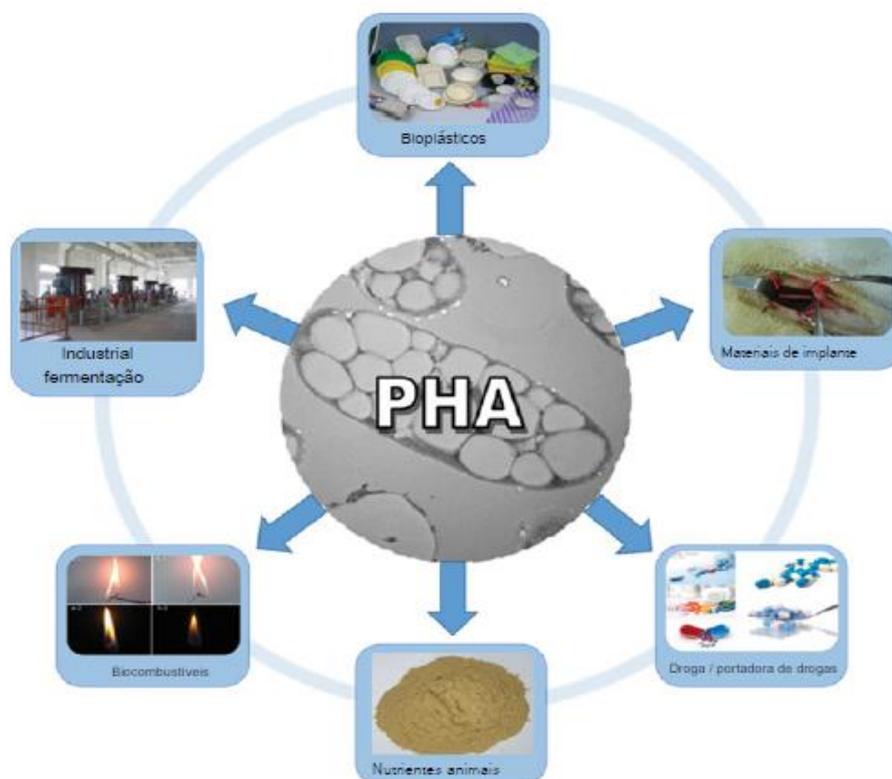
Além da produção do biopolímero, também há preocupação com a degradação do composto após seu descarte. A completa degradação do PHA pode ocorrer em água e dióxido de carbono em condições aeróbicas, dependendo da escolha do substrato, bem como da situação, do tempo e da temperatura exposta (HARDING *et al.*, 2007).

Os materiais biológicos são viáveis em aplicações de desenvolvimento de embalagens plásticas biodegradáveis, em desenvolvimento de artigos médicos e, atualmente, há pesquisas que apontam o grande potencial da utilização ativa de biopolímeros na indústria farmacêutica, sendo considerado útil como encapsulamento farmacêuticos específicos como medicamentos anti-HIV (antirretrovirais), antibióticos, anticancerígenos, incluindo-se também o desenvolvimento de biocombustíveis e aditivos alimentares (TAN *et al.*, 2014; WANG; CHEN, 2017).

Há materiais de PHA provenientes de resíduos industriais ricos em carbono, considerados de 2ª e 3ª geração. Como exemplo a lignoceluloses abundantes, óleos de cozinhas e óleos vegetais, hidrolisados de plantas, cafés, melações dentre outros. Fazendo a seleção desta matéria-prima produz-se PHA para fins alimentícios (MIRANDA *et al.*, 2017).

A Figura 1 expõe as possibilidades distintas de aplicações do PHA, conforme mencionado no estudo.

**Figura 1** - Aplicação e industrialização de PHA



**Fonte:** Retirado de Wang e Chen (2017).

### 2.3.1 Propriedades físico-químicas dos PHA

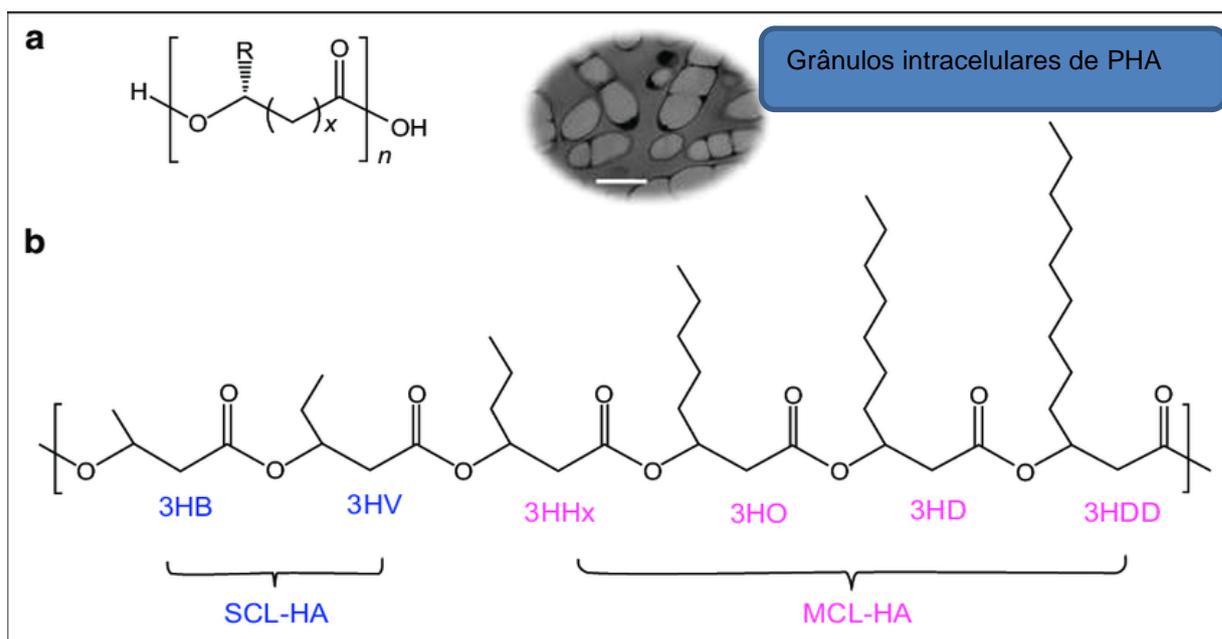
As propriedades físico-químicas que determinam as estruturas das unidades monoméricas e o tamanho dos grânulos, presentes nos diferentes PHA, dependem das espécies bacterianas utilizadas e da fonte de carbono alimentada, além das condições de cultivo às quais os microrganismos produtores são submetidos (DE PAULA *et al.*, 2017; VIEGAS, 2005).

O número crescente de repetição dos monômeros de PHA se dá conforme a modificação contínua da forma natural, entretanto, também é possível utilizar métodos para a criação de organismos geneticamente modificados (OGM) a partir do código genético dos produtores naturais para a obtenção de cepas com capacidades similares, ou mesmo com características e aplicabilidades superiores aos naturais (TAN *et al.*, 2014).

As propriedades termomecânicas dos biopolímeros variam de acordo com a sua composição monomérica, conforme citação na (Figura 2, letra a), e as diferentes composições do grupo de cadeia (Figura 2, letra b). As cadeias constituídas por átomos, desenvolve as características de materiais distintos: cristalinos, rígidos, quebradiços ou elastômeros. Alguns biopolímeros são resistentes a solventes e o ponto de fusão varia, aproximadamente, entre 120 °C e 180 °C, a depender do biopolímero. (DE PAULA *et al.*, 2017; DU; YU, 2002).

O valor n dependerá do grupo onde determinam a identidade das unidades monoméricas constituintes dos polímeros, e isto influenciará em suas propriedades físicas (DELGADO; CORDOBA, 2015; OLIVEIRA, 2010). O quadro 2 apresenta as substituições do grupo e alguns tipos de PHA conhecidos.

**Figura 2** - Composição monomérica dos PHA: (a) estrutura química geral; (b) representação do grupo de cadeias de PHA.



Fonte: Retirado de Li *et al.* (2016).

A estrutura da cadeia é modificada de acordo com o microrganismo e o substrato de carbono escolhidos, em um processo de produção.

**Quadro 2** - Substituição do grupo e alguns PHA mais conhecidos

Átomos de Carbono ou Grupo radical R	Nome do Polímero	Abreviação
CH <sub>3</sub>	poli(3-hidroxi butirato)	PHB
CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	poli(3-hidroxi valerato)	PHV
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	poli(3-hidroxi hexanoato)	PHHx

Fonte: Dados adaptados de ANDLER; DIAS (2013); DELGADO; CORDOBA (2015).

### 2.3.2 Bactérias e a capacidade de síntese de PHA

Cientistas estão empenhados em desenvolvimento de novos bioplásticos com características adequadas para se tornarem viáveis, levando em consideração a utilização de substratos de baixo custo, como a utilização de produtos naturais como, resíduos agrícolas e ou alimentares; com microrganismos com capacidade eficiente no acúmulo de PHA (ANDRADE; RIBEIRO, 2021; DALSSASSO, 2019).

Estudos sobre as bactérias produtoras e sua capacidade de síntese de PHA, como por exemplo a sacarose, a qual se tem fácil acesso, já que é encontrada em melaços providos da cana-de-açúcar, elemento abundante no território brasileiro (MIRANDA *et al.*, 2017).

Os PHA mais pesquisados em destaque são os poli-3-hidroxi-butarato (P3HB) e os copolímeros de 3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato (PHBV). Sua origem se dá partir de distintos processos envolvidos, bem como o tipo de substrato utilizado e o microrganismo em metabolização, obtendo os tipos de polímeros e copolímeros. Os PHA são considerados termoplásticos biodegradáveis produzidos biotecnologicamente, tendo características de substâncias isômeras puras, não apresentam toxinas, são insolúveis em água, além de serem biocompatíveis. Cita-se também um grupo de cepas produtoras de PHA, que inclui as bactérias que incorporam apenas hidroxialcanoatos de cadeia média (PHA-mcl) (C<sub>6</sub> a C<sub>16</sub>), como, por exemplo, as espécies do gênero das *Pseudomonas*, e também se relatam experimentos positivos com polihidroxialcanoatos de cadeias longas (PHA-lcl) (VIEGAS, 2005).

O processo de síntese destes PHA ocorre por bactérias com reservas intracelulares de carbono e energia, com possibilidades de serem produzidos biotecnologicamente em alta quantidade e qualidade, utilizando variadas fontes renováveis de carbono. Este tipo de composição de bioplástico é pesquisado há mais de 70 anos, tratando-se de um material biológico importante (WANG; CHEN, 2017).

Choonut e Sangkharak (2019) descrevem, em seu estudo, sobre as cepas produtoras de PHA, como proposta alternativa em produção de novos tipos de biocombustíveis, como o éster metílico de hidroxialcanoato (HAME) e o hidroxibutarato éster metílico (HBME), candidatos a substituir o combustível fóssil atualmente em uso e os seus derivados. Os ésteres metílicos são ácidos graxos de cadeia longa e suas estruturas químicas são semelhantes ao biodiesel.

Os ésteres metílicos são distintos do petróleo. A composição do petróleo apresenta teores de nitrogênio e enxofre com oxigenação muito baixa, fator contribuinte para poluição ambiental durante a queima. Já o HAME e o HBME apresentam alto teor de oxigenação sem

nitrogênio e enxofre, reduzindo a fumaça do escapamento, encurtando também a duração da combustão (CHOONUT; SANGKHARAK, 2019).

Para o desenvolvimento biológico de PHA, faz-se importante combinações diversas de monômeros, sendo a enzima relacionada à classe de PHA sintase, que catalisa a incorporação de monômeros à cadeia polimérica em formação, sendo esta capacidade observada quando o organismo é produtor da enzima em questão. Os experimentos se iniciam com o isolamento do microrganismo a fim de desenvolver linhagens bacterianas distintas, com a capacidade de desenvolver composições monoméricas de maneira controlada (LÍCIO, 2011).

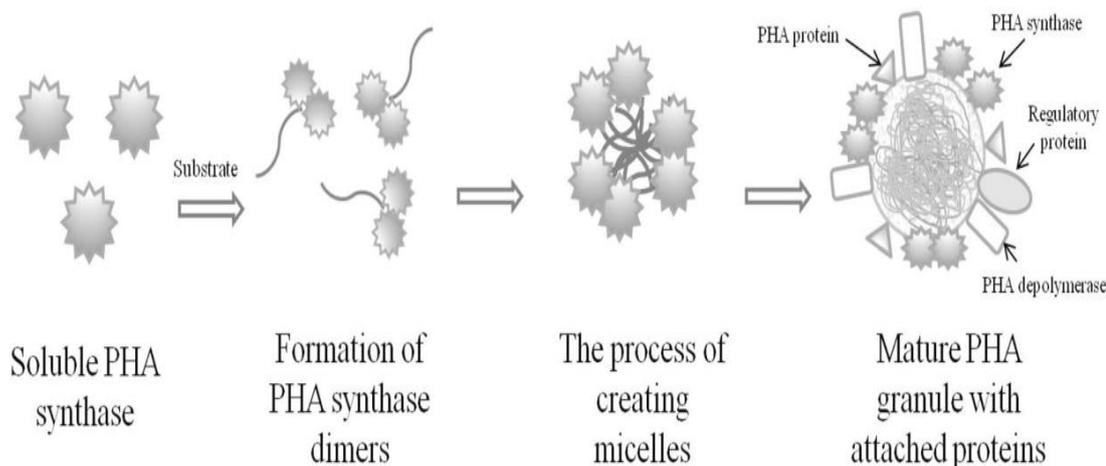
Um estudo sobre o isolamento de bactérias produtoras de PHA revela a produção de polímeros de amostras de solo de canavial em 75 linhagens de cepas bacterianas, sendo importante destacar que alguns dos organismos eram capazes de sintetização de PHA a partir de fontes de carbono de baixo custo (LÍCIO, 2011). Spínola (2018), em seu estudo relata que atualmente, há mais de 300 espécies de microrganismos diferentes documentadas, com capacidade de produção de PHA.

Miranda e colaboradores (2017), relataram acerca das funções das células em relação ao stress do meio ambiente, exemplificando a temperatura, a exposição a oxidantes, a irradiação de ultravioleta (UV) e os solventes orgânicos enquanto elementos que podem promover a formação de grânulos de PHA. Os grânulos de PHA podem ser utilizados também como crioprotector muito potente contra os efeitos adversos dos ciclos de congelação-descongelação (MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019).

A sintetização acontece em forma de inclusões insolúveis no interior do citoplasma do PHA, onde são circuncidados pelos carbonossomos funcionais a partir de uma membrana muito complexa de lipídeos e proteínas, sob condições de acúmulos de fonte de carbono em excesso onde correspondentemente, limita o crescimento de fonte de fosfato e nitrogênio (ABREU *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2017).

Há uma fracção PHA amorfas nestes grânulos citoplasmáticos formando um núcleo hidrófobo conforme apresentado na Figura 3 (MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019).

As estruturas podem ser visualizadas com o uso de microscópico eletrônico. A proteína PhaP é abundante no grânulo de PHA, tendo função regulatória. As proteínas são anfifílicas, e a sua parte hidrofóbica está exposta ao citoplasma do PHA (ABREU *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2017).

**Figura 3** – Processo de formação dos grânulos de PHA

**Fonte:** Retirado de MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.* (2019).

Estudos sobre a biossíntese do biopolímero indicaram que o acúmulo de inclusões de poliésteres insolúveis no citoplasma bacteriano e dependendo da espécie, acumula até 90% de inclusão correspondente ao seu peso seco (ABREU *et al.*, 2013; KUNASUNDARI; SUDESH, 2011; MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019; SPÍNOLA, 2018). Biotecnologicamente o favorecimento da produção do polímero varia de acordo com a fonte carbono e energia oferecida, sob limitação de nitrogênio, fosfato ou oxigênio (LEE, 1996; STEINBUCHER; FUCHTENBUSCH, 1998; VIEGAS, 2005). Ressalta-se, também, que a síntese de formação dos *Pseudomonas* envolve duas vias metabólicas para gerar precursores de MCL-PHA. Cada via utiliza um substrato distinto para fornecer precursores de 3-hidroxiacil (3HA), os quais sintetizarão os PHA-mcl (LU, *et al.*, 2009; VIEGAS, 2005).

A produção de variações distintas das combinações de monômeros e microestruturas do PHA determina propriedades físicas, mecânicas e térmicas diferentes, que resultam em matérias-primas com diferentes características, produzindo materiais que variam de embalagens de bioplástico de transportadores de drogas a emulsificação de cosméticos. O alcance da superfície de biopoliéster, por exemplo, ocorre por inúmeros fosfolipídios e proteínas onde resultam a síntese, degradação e a regulação do seu processo, conferindo as propriedades características do composto (WANG; CHEN, 2017).

Mícan *et al.* (2017), em estudo, analisam o panorama da produção de bioplástico, descrevendo suas propriedades estruturais a fórmula geral dos PHA, suas cadeias de monômeros, condições de produção dentro de experimentos em laboratório, bem como processos de fermentação, meio de cultivos e substratos utilizados em alguns grupos de

microrganismos como a *Ralstonia eutropha*. Viegas (2005), destaca a *Ralstonia Eutropha* como uma espécie de alta capacidade de acúmulo, correspondendo em cerca de 90% de acúmulo.

O isolamento e identificação de espécies produtoras podem auxiliar na redução de custos, uma vez que as cepas produtoras mais eficientes podem otimizar o processo produtivo, tendo maior rendimento. Partir de gêneros já reconhecidos como potenciais produtores apontados pela literatura favorece a busca por novos candidatos. A semelhança com os produtores já conhecidos pode ir além da identificação biomolecular, e tecnológica, mas não as torna obsoleta, sendo um ponto importante para a bioprospecção inicial.

### **2.3.3 Polímero polihidroxibutirato – PHB**

O polímero polihidroxibutirato (PHB) é um protótipo da família dos PHA, desenvolvido pela primeira vez nos anos 50 (VIEGAS, 2005). Trata-se de um homopolímero biodegradável, composto de uma classe de termoplástico chamado de polihidroxialcanoato, possuindo propriedades e características similares às do polipropileno, com alto potencial de substituir a esse polímero, derivado de petróleo, o que permitiria uma produção sustentável (COUTINHO *et al.*, 2004).

O PHB possui características de cristalinidade, baixa elasticidade, além de ser frágil e rígido, o que dificulta a moldagem por injeção e/ ou resistência à tração (MIRANDA *et al.*, 2017; WANG, CHEN, 2017). Assim, ele é diferente do PHA especialmente quanto à sua temperatura negativa, ou “friabilidade”.

Lopes *et al.* (2011), em pesquisa experimental de PHB com a *Burkholderia sacchari* utilizando misturas de glicose, xilose e arabinose, relataram que a cepa em questão consome primeiramente a glicose como fonte de carbono e atrasa o uso de pentoses, com isto, o processo é prolongado através da combinação de substratos.

No Brasil, iniciou-se a tecnologia de produção industrial de poli(hidroxibutirato) (PHB) na década de 90, por processos fermentativos da sacarose, pela bactéria *Ralstonia eutropha* pela Coopersucar, Usina da Pedra em Serrana – SP, que se trata de uma empresa de comercialização global de etanol e açúcar, em junção com o Instituto de pesquisas, Tecnológicas (IPT) e o Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB), tendo a capacidade de produção deste biopolímeros com o menor custo do mundo, devido seus benefícios de atrelamento com a Usina, possuindo abundância de energia, solventes para extração, etc. Todavia, mesmo tendo a capacidade estrutural, o preço do produto final, ainda é superior aos preços dos polímeros desenvolvidos pela indústria petroquímica. A embalagem de PHB pode

ser injetada nas mesmas máquinas sopradoras que injetam embalagens de plásticos convencionais (FONSECA, 2014; TELLES; SARAN; UNÊDA-TREVISOLLI, 2011).

### **2.3.4 Polihidroxibutirato (P3HB)**

O poli(3-hidroxibutirato) (P3HB) foi o primeiro PHA a ser identificado e é de interesse da indústria desde a década de 1960, sendo o PHA mais conhecido, especialmente por conta de suas propriedades plásticas, as quais aguçam o interesse industrial. Seus diversos monômeros são compostos pela repetição do monômero 3-hidroxibutirato (3-HB) são de propriedades mecânicas e térmicas e podem ser agregados aos PHA produzidos por bactérias e modulados conforme essa composição (LICIO, 2011; SPÍNOLA, 2018).

O PHB é cristalino e amorfo, com boas características físicas e mecânicas são especiais, sendo um termoplástico com temperatura de fusão igual a 179 °C, com resistência à tração entre os 38 e os 30 MPa (SPÍNOLA, 2018).

O P3HB pode ser utilizado na fabricação de produtos de higiene e limpeza, na área de cosmética, nos produtos agrícolas, além de possuir biocompatibilidade para absorção pelo organismo humano, sendo utilizado pela indústria farmacêutica e médica na fabricação de medicamentos e cápsulas de revestimento, próteses ósseas, e mesmo fios de suturas empregados em materiais de suturas de cirurgias cardiovasculares entre o coração e o esterno – estes materiais fazem aderência no organismo, sendo liberados gradualmente na corrente sanguínea (COUTINHO *et al.*, 2004; VIEGAS, 2005).

### **2.3.5 Espécies do Gênero *Pseudomonas***

O gênero *Pseudomonas* faz parte da família *Pseudomonadaceae*, estes consistem em em forma de cocos ou bastonetes gram-negativos aeróbicos, sendo comumente são encontrados no meio ambiente, incluindo relacionadas a animais, plantas, solo e água, no solo. Estas espécies produzem pigmentação solúveis e fluorescentes quando são observados por luz ultravioleta (TORTORA *et al.*, 2012).

Deste gênero, existe mais de 60 espécies de variedades naturais sendo conhecido por possuir ubiquidade no meio ambiente – apresentando grande adaptação a condições físicas diversas. A literatura aponta que as espécies de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. testoteroni*, apresentam eficiência com capacidade média de 67% de rendimento de polímero, sendo as mais utilizadas (DE PAULA *et al.*, 2017; VIEGAS, 2005).

Para a produção de bioplástico, se utiliza fontes de carbono como o glicerol, os ácidos graxos, os ácidos orgânicos e os aminoácidos (FERNANDES, 2014), seguindo o método denominado regime “Fartura e Fome” (FF) (SILVA, 2014).

As cepas de *P. putidas* mais utilizadas para a síntese de PHA são as relacionadas às estruturas de cadeia média (PHA-mcl). Na primeira fase de cultivo, o desenvolvimento da bactéria procede quando estas células consomem o substrato de carbono rapidamente, crescendo. Posteriormente, as bactérias passam por período de fome. As condições descritas sejam realizadas cíclica e continuamente, de maneira repetida, ocorre a síntese de PHA (TORRES-CERNA *et al.*, 2017).

### **2.3.6 Aplicação de correntes de lignina como recurso considerável flexível**

Durante muitas décadas, estudos e experimentos são realizado, afim de valorizar os polissacarídeos de origens vegetais, associado a celulose e a hemicelulose (LINGER *et al.*, 2014) As ligninas são macromoléculas fenólicas sendo como principais componentes das paredes celulares das plantas, composta por três unidades fenilpropanóides monoméricas, sendo o guaiacil, siringil, vanilina e siringaldeído, conectadas por ligações C-C e C-O, suas constituições podem variar entre uma espécie de planta entre outras (LINGER *et al.*, 2014; MENDONZA- AZABACHE; ZAVALITA -RODRÍGUEZ, 2018; MORAES *et al.*, 2018).

O polímero possui uma fonte renovável de produtos aromáticos e bioderivados fenólicos interessante para a indústria química, podendo substituir o uso de derivados do petróleo (MORAES *et al.*, 2018). O processo de despolimerização da lignina é complexo, e pode envolver rotas metabólicas que possuem várias enzimas expressas por um mesmo microrganismo ou um conjunto de microrganismos, tais como algumas espécies de fungos e bactérias com capacidade de ação conjunta de seu repertório enzimático (MORAES *et al.*, 2018). Entretanto o processo de biocatálise é considerado uma excelente opção ser de aporte específico de baixa necessidade de energia, visando no custo e efetividade do método (RAJESH *et al.*, 2019).

Pesquisas apontam como desafio a viabilidade da bioconversão de lignina em PHA, sendo essencial a triagem seletiva da cepa apropriada, para realizar a conversão de lignina para processos biorrefinários. Alguns extensos estudos, resultaram em destaque uma diversidade de bactérias como a *Ralstonia eutropha*. As bactérias pertencentes do gênero de *Pseudomonas*, como *P. oleovorans* e, *P. corrugata* foram reconhecidos na produção de PHA. A valorização do uso da lignina como substituto de fonte de carbono industrializado no desenvolvimento do biopolímero, tem se mostrado como recurso promissor e sustentável (RAJESH *et al.*, 2019).

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante do mundo, ficando atrás apenas da celulose, este polímero orgânico, corresponde a 95% da biomassa vegetal total, sendo denso em energia de alta resistência (LINGER *et al.*, 2014; RAJESH *et al.*, 2019; RAVI *et al.*, 2019). Os seus principais componentes estão presentes nas paredes celulares das plantas. É formado por moléculas de fenilpropano, que é muito resistente à degradação enzimática, se tornando uma barreira para a água. O processo de catabolismo ocorre a partir de vias superiores que atuam como um funil biológico, convertendo essas correntes de lignina em substratos heterogêneos (LINGER *et al.*, 2014; MENDONZA- AZABACHE; ZAVALETA-RODRÍGUEZ, 2018).

Linger e colaboradores (2014) referem que a importância de produção de lignina residual é de urgência crescente pois favorecerá a economia mundial de combustível. O pré-tratamento desta biomassa em escala, pode contribuir no desenvolvimento de monômeros derivados de PHA-mcl, sendo os pilotos a serem utilizados na produção de bioplásticos, precursores químicos ou combustíveis (RAJESH *et al.*, 2019).

A lignina e biopolímeros derivados, são de grande interesse industrial, devido seu potencial de aplicação nos diversos campos comerciais, incluindo os setores biocombustíveis, alimentícios, cosméticos entre outros (MORAES *et al.*, 2018; PEREIRA, 2009).

Os estudos conjugam a relevância para a biotecnologia, agregando ao estudo da lignificação, despertando o conhecimento científico e tecnológico, fundamentando para que as pesquisas da lignina acompanhem a evolução dos processos biotecnológicos (PEREIRA, 2009).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este capítulo se baseia na explanação da execução da pesquisa e do desenho metodológico que fora adotado durante o processo de construção.

Assim, serão abordados os passos e procedimentos tomados para a realização dos objetivos propostos em pesquisa.

#### **3.1 Procedimentos Iniciais**

Nesta etapa, serão exibidos os procedimentos metodológicos adotados para a execução dos ensaios laboratoriais.

Para a identificação de novas linhagens de amostras de solos, de interesse para este estudo, foi realizado prévio estudo teórico, a fim de aplicar as recomendações de testes biomoleculares que permitem a caracterização taxonômica da cepa.

Para segurança, maior observância e métodos comparativos e confirmatórios, os ensaios, foram realizados em duplicatas.

Foram planejados experimentos para investigar o comportamento de diferentes cepas e as suas características físico-químicas, em relação à produção de bioplástico.

##### **3.1.1 Coleta das amostras do solo para o desenvolvimento de consórcios microbianos**

As amostras de solo foram obtidas na zona da mata paulistana, em propriedade rural no município de Salto de Pirapora “Latitude = 23°37’51” S / Longitude = 47°40’45” W” (WGS-84).

Esta propriedade tem sido utilizada historicamente para descarte de polímeros não recicláveis, com descarte de polímeros de forma inadequada nesta região, onde descartava-se neste solo, entulhos em geral, como: plásticos, garrafas, sacolas, pneus velhos, madeiras.

Em tempos modernos, esta região foi limpa, destinando estes resíduos para o local apropriado, hoje, este solo é relativamente úmido e possui vegetação secundária.

A amostra de solo foi coletada da superfície do solo com uma pá de jardinagem, e foi armazenado 8 g desta amostra do solo no biofreezer (-80 °C) em um tubo Falcon de 50mL e sendo utilizado 2 g para fazer o cultivo.

Outras cinco amostras de microrganismos utilizadas estudo, foram isolados a partir de solo coletado na região do Município de Sumaré, nas seguintes coordenadas geográficas: (22°82’55” 18”, 47°07’74” 04”). A fins de identificação, os microrganismos isolados desse

consórcio foram denominados como TH1, TH2, TH3, TH4, TH6, antes da confirmação por procedimentos de testes biomoleculares.

### **3.1.2 Preparo do cultivo e inoculação das cepas de *P. putida* e *Arthrobacter*, no caldo Luria Bertani (LB)**

O preparo do cultivo em meio de LB, foi realizado conforme descrição de Sambrook *et al.* (1989). A composição por g/L do meio de cultura preparada consiste em tripton: 10,0 (g/l); extrato de levedura: 5,0 0 (g/l); cloreto de sódio: 5,0 0 (g/l);

Foram preparados 5 mL do meio de cultivo LB sem a adição de ágar em tubo Falcon, sendo denominado como “o caldo”. Esta solução foi autoclavada a 121°C por 20min, sendo resfriada em seguida, em ar ambiente até 60 °C para a manipulação.

Com auxílio de uma alça para microbiologia estéril, foi inoculada a cepa neste caldo.

As cepas estavam em condições de armazenamento. O tubo de Falcon com a solução e inóculo foi adicionado em uma incubadora rotativa *shaker* sob agitação de 180 rpm à 30 °C por 48h.

### **3.1.3 Semeadura na placa de Petri e manutenção das cepas**

Diferenciou-se o protocolo de preparo do meio cultivo LB sólido, com o meio de cultivo LB em caldo, apenas com acréscimo de 1,5% de ágar no preparo para o meio de cultivo sólido em placas de Petri. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min, sendo resfriada em ar ambiente até 60 °C para manipulação.

Após o resfriamento foi procedida a semeadura do microrganismo no cultivo de LB sólido, por técnica em estriamento por esgotamento na placa de Petri de 90x15mm. Conforme descrição de Tórtora *et al* (2012). As colônias foram acondicionadas em uma estufa regulada em 30 °C por 24h, observando o crescimento e diferenciação das cepas.

Após 24h, do cultivo a manutenção das cepas, procedeu com o repique em meio LB sólido, na mesma composição mencionada, fazendo a semeadura em tubos de ensaios em posição ligeiramente inclinados, fazendo o repique a cada 15 dias.

### **3.1.4 Desenvolvimento dos consórcios microbianos**

Os consórcios microbianos são desenvolvidos por diversas comunidades microbianas por processos de fermentação, podendo ser utilizados em estudos para identificação e degradação composta de uma matéria (LIMA, 2014).

O desenvolvimento do consórcio foi feito em duplicata em Erlenmeyer de 125mL com 1 g de solo com o acréscimo de 50mL de meio mineral , se seguindo recomendação do

fabricante (BUSHNELL; HAAS, 1941 e adaptação RAMSAY *et al.*, 1994) *Bushnell Haas Broth* da Himedia, composição: MgSO<sub>4</sub>: 0.20 g/L; CaCl<sub>2</sub>: 0.02 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.00 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1.00 g/L; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 1.00 g/L; FeCl<sub>3</sub>: 0.05 g/L, com acréscimo de 0,1% de triptona, 0,1% de glicose e 0,5g PET.

A cada 10 dias foi feito um novo cultivo nesta mesma composição acrescentando apenas 1 mL e 1 pellet de PET do cultivo antigo. As sobras dos cultivos foram centrifugadas e a biomassa foi armazenada em -20 °C. O procedimento foi repetido 10 vezes, totalizando 100 dias de cultivo.

### **3.1.5 Isolamento dos microrganismos dos consórcios microbianos**

Sete amostras de microrganismos foram isoladas a partir do consórcio microbiano.

As linhagens isoladas desses consórcios microbianos foram denominadas BR1, BR2, BR3, BR4, BR5, BR6 e BR7.

Para o isolamento destes novos microrganismos em estudo, se utilizou placas de Petri 90x15mm com 15mL de meio de cultura LB com acréscimo de 1,5% de ágar. O meio de cultura foi autoclavado e despejado nas placas de Petri e, após solidificado, se realizou o estriamento por esgotamento, com uma alça de inoculação de 1µl isolando o total de 12 cepas distintas, incubando as placas na estufa bacteriológica a 30 °C por 48h. As colônias apresentaram diferentes crescimentos, variando em aspecto; sendo fungos, bactérias ou leveduras (TORTORA *et al.*, 2012).

Prosseguindo o experimento em novos cultivos, foi iniciada uma nova linha de pesquisa das cepas coletadas do solo, utilizando como cultivo o meio comercial *Bushnell Haas Broth* (Sigma-Aldrich) como fonte de nutrientes mínimos, na concentração sugerida pelo fabricante (3,27 g/L), com o acréscimo de 0,1% glicose e a porção de 3 *pellets* de cada amostra de PET, suspendendo o uso de 0,1% de triptona.

Neste meio de cultivo, se observou o crescimento de bactéria e posteriormente, foram realizados os testes biomoleculares.

### **3.1.6 Teste de coloração de Gram e identificação morfológica de bactérias**

O teste de coloração de Gram é uma técnica simples e rápida que possibilita a visualização da característica de exposição da parede celular sob reação da aplicação de corantes e soluções. O teste, que serve para identificação da morfologia das bactérias, permite saber se estas são Gram positiva ou Gram negativa (TORTORA *et al.*, 2012). No escopo da pesquisa, o teste foi repetido em algumas etapas ao longo dos procedimentos de análise.

A técnica é realizada através de um esfregação bacteriano fixado numa lâmina por ação do calor. Como reagentes, utilizou-se: cristal violeta, iodo, etanol-acetona, safranina, água destilada, óleo de imersão, solução salina e a colônia da bactéria em estudo (BRASIL, 2001; TORTORA *et al.*, 2012;).

O esfregação das células da bactéria fixado em lâmina foi submetido ao corante cristal violeta. Após aguardar um minuto de tempo de reação, o corante foi escorrido e a lâmina foi coberta com lugol. Após a espera de mais um minuto, a amostra da lâmina foi lavada em água destilada e descorada com etanol-cetona 1:1 por 30s, sendo lavada mais uma vez em água corrente e coberta posteriormente com o corante Safranina. Após o processo, foi colocada para a secagem por 2 min e observada no microscópio (BRASIL, 2001; TORTORA *et al.*, 2012).

### 3.1.7 Amplificação do material biológico por reação de cadeia polimerase – PCR

A amplificação do material biológico foi realizada com a reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction*). A técnica de PCR foi realizada em um termociclador eletrônico da marca Apollo ATC 201 PCR (HEATHER *et al.*, 2015).

Os Primers específicos foram utilizados para amplificar a região 16S rRNA, região de identificação do gênero das cepas bacterianas (LANE, 1991; ROMANO, 2014). Os primers utilizados às análises foram os primers universais A amplificação da região ITS dos isolados foi feita com os primers universais ITS1 (5'-TCCGTTGGTGAACCAGCG G-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), conforme referencial teórico WHITE *et al.*, (1990).

Para o preparo, tomou-se uma alíquota com a diluição dos *primers* reagentes externos e a amostra de DNA, que se trata do lisado bacteriano, ou seja, a bactéria que foi desenvolvida a partir destes reagentes. Acrescido a Enzima Taq DNA Polimerase, também denominada apenas Taq, que age na extensão da cadeia complementar (rastreamento): e Tampão 10X Taq (tampão PCR buffer) e Água miliq.

Os fragmentos de DNA foram amplificados em Termociclador em 36 ciclos sob as seguintes condições:

Estágio 1 → O 1º ciclo foi programado para atingir a temperatura a 94 °C, mantendo esta temperatura por 30 min. Neste processo, ocorre a desnaturação inicial da dupla fita do DNA, ou seja, são separadas;

Estágio 2 → Após a separação das fitas, ocorre o processo de anelamento, onde os primers se ligam aos sítios específicos na fita simples a temperatura programada foi de 57 °C por 30min;

Estágio 3 → Extensão por 2h à 72 °C, sendo esta temperatura considerada a ideal para o funcionamento da taq Polimerase, onde se introduz os nucleotídeos que complementarão a cadeia que está sendo sintetizada, completando assim as fitas simples, tornando-as duplas.

As demais proporções e concentrações de reagentes utilizados encontram-se dispostas no Quadro 3.

**Quadro 3** - Concentração, reagentes e primers específicos utilizados

<b>Solução</b>	<b>50 µl reagentes</b>	<b>Concentração final</b>
10X <i>Standard Taq Reaction Buffer</i>	5 µl	1X
10 mM <i>dNTPs</i>	1 µl	200 uM
10 µM <i>Forward Primer (8F)</i>	1 µl	0.2 µM (0,05-1 µM)
10µM <i>Reverse Primer (907)</i>	1 µl	0.2 µM (0,05-1 µM)
<i>Template DNA</i>	<i>variable</i>	<1,000 ng
<i>Taq DNA Polymerase</i>	<i>0.25 µl</i>	<i>1.25 unts/50µl PCR</i>
<i>Nuclease-free water</i>	<i>To 50 µl</i>	-

**Fonte:** Elaboração própria.

### 3.1.8 Análise de amostra de DNA por método em eletroforese em gel de agarose 1%

A análise realizada pelo método de eletroforese permite a purificação e a visualização de fragmentos de DNA e RNA das macromoléculas de acordo com seu tamanho e peso molecular, no qual são submetidas, mediante a um campo elétrico. A corrida eletroforética carrega as partículas negativamente em direção ao eletrodo positivo e os fragmentos menores atravessam mais rapidamente em comparação aos fragmentos maiores: o tempo de migração varia de acordo com o tamanho dos fragmentos (POSSIK, 2010).

Para realizar o procedimento, foi utilizado o tampão de corrida o gel de agarose (polissacarídeo) a 1%, que partiu da solução de estoque 50X, TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA a 0,5 mol com pH 8.0. Adaptação de Fernandes (2014); Sambrook e Russel, (2001).

Quanto ao preparo da solução, se procedeu: foi pesado 242g de Tris base, diluído em 700mL de água deionizada, acrescido 57,1mL de ácido acético 100% e adicionado 100mL de solução estoque EDTA 0,5 mol, sendo ajustado o volume final da solução para 1L. Adaptado de Sambrook e Russel, (2001).

A partir desta, a solução, foi diluída na porcentagem calculada para 1%, sendo ajustado novamente o pH a 8,0 com hidróxido de sódio, (NaOH), aquecendo 40 mL da solução no microondas durante 60s, agitando continuamente, repetindo o processo até que a agarose se dissolveu completamente, deixando a solução esfriar <60°C, posteriormente foi acrescido 3 µL de brometo de etídeo, agitando cuidadosamente. Este gel de agarose foi vertido na cuba do

equipamento, eliminando a formação de borbulhas com uma ponteira, em seguida foi inserido o pente de plástico próprio do equipamento, para criar os poços e aguardado média de 20min para o gelificar. Posteriormente colocando o tampão de eletroforese, retirando da forma as placas e o pente, cobrindo o gel em média de 1 mm. As amostras foram adicionadas nos pocinhos de formas ordenadas (POSSIK, 2010).

Foi utilizado o marcador padrão de peso molecular DNA “Ladder” entre 100 pb e 1000 pb. (Ladder-1kb), que permite a visualização das bandas comparando com o marcador de peso molecular de DNA da escala padrão (GOMES FREITAS *et al.*, 2017; HORNINK, 2015). Neste caso, foi aplicado o marcador Genedire X 6D 1Kb plus DNA Ladder.

A programação da corrida do gel utilizada foi de  $V= 080$  Volts,  $I= 400$  mA,  $P= 009$  w. O tempo de corrida foi de 50min. Foi utilizado o equipamento transiluminador de luz UV para visualizar ácidos nucleicos (DNA ou RNA) separados pela corrida de eletroforese (GREEN; SAMBROOK, 2012; FERNANDES 2014).

O procedimento por método de eletroforese foi repetido com as demais linhagens de microrganismos resultantes da amplificação por PCR, utilizando o mesmo kit.

### **3.1.9 Análise por sequenciamento de DNA**

Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pelo mesmo par de oligonucleotídeos (HORNINK, 2015). Foi utilizada a plataforma Geneious Prime para a realização do alinhamento das sequências de DNA, além da construção da árvore filogenética das linhagens estudadas, servindo assim como comparativo e, portanto, ferramenta para identificação das bactérias (HORNINK, 2015).

As bandas do gel de agarose foram cortadas e purificadas utilizando o Kit DNeasy PowerSoil, seguindo as orientações do fabricante, sendo encaminhado para sequenciamento, no laboratório Exxtend Solução em Oligos Ltda, situado no município de Paulínia/SP.

Conforme instrução da empresa especialista, foram enviados ao laboratório amostras de (1) tubo primer Forward: 3  $\mu$ L; (2) 1 tubo primer Reverse: 3  $\mu$ L na concentração de 10 pmol/ $\mu$ L (=10  $\mu$ M), e 20  $\mu$ L da amostra do produto de PCR purificado para cada primer. Os tubos foram separados e devidamente rotulados.

As fotos do gel de agarose com as amostras, foram enviadas com a descrição do volume injetado e marcador que foi utilizado, juntamente com o formulário de envio preenchido com as combinações dos primers e tamanho dos fragmentos (EXXTEND, 2022).

A análise por sequenciamento permite a identificação exata da sequência de nucleotídeos em uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico), identificando as quatro

bases de fragmentos: Adenina, Guanina, Citosina e Timina. Esta sequência é a base onde estão contidas as informações sobre a bioquímica e as propriedades hereditárias do gene ou genotipagem de SNPs além da identificação de espécies (EXXTEND, 2022; HEATHER *et al.*, 2015).

Foi utilizada a plataforma *Geneious Prime* para a realização do alinhamento das sequências de DNA, além da construção da árvore filogenética das linhagens estudadas, servindo assim como comparativo e, portanto, ferramenta para identificação das bactérias (HORNINK, 2015).

### **3.2 Estoque das cepas e consórcios microbianos**

As cepas bacterianas estavam em condições de armazenamento no freezer à -22 °C, em microtubo, em meio de cultura LB, sem a adição de ágar com acréscimo de glicerol, à 30%. Para reforçar a margem de segurança da preservação das linhagens de cepas utilizadas nesta pesquisa, estocamos algumas amostras no ultrafreezer (-80 °C), utilizando como referencial teórico, Tórtora e colaboradores (2012). *Pag. 170 - Preservação de culturas bacterianas.*

### **3.3 Análise qualitativa**

#### **3.3.1 Cultivo dos meios de cultura “Sudan Black B” e “Nile Blue A”**

A análise por coloração é normalmente utilizada para corar colônias e distinguir entre linhagens que acumulam e não acumulam PHA. Trata-se de um método qualitativo eficiente com o objetivo de detectar a presença de (PHA) nas colônias de bactérias cultivadas nas placas, sendo este método altamente sensível para visualizar em vias de comparação a coloração do grânulo por ação dos corantes (GODBOLE, 2016; LÍCIO, 2011; SHAH; KUMAR, 2021). Foram utilizados corantes lipofílicos como o “Sudan Black B” e coloração por “Nile Blue A” (SALGAONKAR *et al.*, 2013; SPIEKERMANN *et al.*, 1999).

O meio de cultura foi preparado utilizando como fonte de nutrientes mínimos o meio mineral da marca *Bushnell Hass Broth* (Sigma-Aldrich) na concentração sugerida pelo fabricante: 0,327g em 100 mL. Conforme o rótulo, a composição é MgSO<sub>4</sub>: 0,20g/L; CaCl<sub>2</sub>: 0,02g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,00g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,00g/L; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 1,00g/L; FeCl<sub>3</sub>: 0,05g/L. Foi acrescido 1,5% de ágar para a solidificação.

A partir deste meio de cultura, foram acrescidas fontes de carbonos distintas e com concentrações variadas, sendo: o glicerol e glicose nas concentrações específicas: glicose 2%, glicose 0,1%; glicerol 2% e glicerol 0,1%.

As amostras foram preparadas em duplicatas, adicionadas 8 mL da solução nas placas de petri 60X15 mm. A semeadura foi procedida por método de estriamento por esgotamento (TORTORA *et al.*, 2012) e sequencialmente acondicionadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 48h.

O preparo da solução de corantes *Sudan Black B* se iniciou a partir do preparo da solução estoque nas seguintes proporções: foi pesado 0,01 g do pó de *Sudan Black B* para 100 mL de etanol PA e esta solução foi aquecida em banho maria, em equipamento específico para o laboratório, por 60 min na temperatura de 60 °C. A temperatura foi confirmada com o termômetro periodicamente. Posteriormente foi aguardado o resfriamento e adicionada esta solução no balão volumétrico, a fim do uso da solução dissolvida à solução alcoólica à 96%, na concentração de 0.5 µg/mL (SALAMEH, 2004). A solução foi armazenada em frasco âmbar bem fechado, tendo validade de até um ano.

Para o preparo do estoque do corante *Nile Blue A*, foi pesado 0,01 g de pó de *Nile Blue A* para 100 mL de acetona PA.

Os passos foram repetidos com o corante *Sudan Black B*. Assim, a solução foi dissolvida e colocada em banho-maria por 60 min mantendo a temperatura de 60 °C. A temperatura foi averiguada com o uso periódico do termômetro. O estoque foi armazenado em frasco âmbar fechado, tendo validade de até um ano.

Após as 48h de incubação das colônias nas placas em meio rico em nutrientes com a adição de fontes de carbonos descritas, foi adicionado 40 µL do corante *Sudan Black B* que estava preparado em solução de estoque. As placas foram mantidas com essa solução, sem perturbação, por 20 min sendo o excesso de corante decantado cuidadosamente. Em seguida, foram enxaguadas com etanol PA. Posteriormente, o método foi repetido adicionando os 40 µL do corante *Nile Blue A*, partindo também da solução em estoque.

A confirmação por teste comparativo da observância dos grânulos de PHA foi realizada no transiluminador e no equipamento Gel Documentador da Bio Rad sob luz branca e luz UV (SALGAONKAR *et al.*, 2013).

### **3.3.2 Análise por microscópio eletrônico de transmissão (MET)**

Foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão (MET) para visualização em emissões de RX das amostras selecionadas neste ensaio. Foi escolhida esta técnica devido à sua capacidade de alta resolução, que permite melhor visualização da estrutura dos grânulos, favorecendo na identificação de sua forma e tamanho – os distintos parâmetros que indicam a regularidade da forma (OLIVEIRA, 2010).

As amostras escolhidas para este método comparativo foram as cepas denominadas (TH1) *Klebsiella sp.*, a *P. putida* e a BR4 que estavam cultivadas em meio mineral (segundo recomendação do fabricante Sigma e adaptação de RAMSAY *et al.*, 1994). De acordo com a literatura, estas cepas se destacaram, se mostrando mais promissoras em capacidade de produção de PHA nos experimentos e nas análises realizadas.

O microscópico MET incide em feixes de elétrons muito finos que são direcionados à amostra, ampliando a imagem das microestruturas, em qualidade superior aos microscópios ópticos. Os feixes atravessam a amostra do experimento e têm a capacidade de aumentar a imagem cerca de 500.000 vezes, sendo este recurso, muito utilizado nas pesquisas de compostos poliméricos permitindo avaliar as fases dos copolímeros (OLIVEIRA, 2010).

### **3.4 Produção da biomassa bacteriana em frascos agitados**

Para esta etapa do bioprocessamento, foi utilizado o método de pré-inóculo e inóculo em frascos agitados. Os meios de cultivos demandam reagentes distintos, essenciais ao bom crescimento das cepas e dos microrganismos, devendo conter fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais.

A produção da biomassa foi planejada em sete etapas:

1. Preparação do meio de cultura concentrado - *Terrific Broth* (TB) que é o cultivo - Pré – Inóculo;
2. Inoculação da colônia;
3. Incubação em temperatura de 30 °C na rotação de 160 rpm por 30h;
4. Preparo do Meio (M9) Mínimo, e incubar o pré-inóculo neste meio por mais 72h, para acumulação do PHA;
5. Centrifugação;
6. Descartar o sobrenadante;
7. Liofilização do material.

#### **3.4.1 Preparo do meio de cultivo TB e inoculação da colônia**

No primeiro dia, ou seja, dia um (1) do ensaio, foi utilizado para a linhagem indicada para o bioensaio de meio de cultura concentrado, denominado de pré-inóculo.

A preparação do pré-inóculo procedeu em cultivos em frascos agitados foram elaborados em 50 mL de meio nutritivo denominado meio *terrific broth*. que é um meio de cultura com composição nutricional rica para o crescimento de bactérias com maior concentração, Triptona 12,0g/L; glicerol 4,0mL; extrato de levedura 24,0 g/L, realizado em

frascos em Erlenmeyer de 250mL, inoculando Colônias frescas de *P. putida* nesse pré cultivo e, acondicionando por 24h em incubadora, sob agitação de 140 rpm. Os cultivos em Erlenmeyer, foram retirados e transferidos em duplicata para tubos 50mL em capela de fluxo laminar. Prosseguindo para a centrifugação a 6600 rpm, obtendo os *pellets*, que são a biomassa bacteriana precipitada descartando o sobrenadante.

### 3.4.2 Preparo do meio M9 mineral e inoculação do pré-inóculo

Sequencialmente a biomassa foi transferida para 100mL do meio M9, contendo 5 ml de tampão  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 1M e pH 6.8, e 0,39 g/L de  $\text{MgSO}_4$  (MUNIR; JAMIL, 2018), acrescentando 10% v/v de glicerol. Esse cultivo foi mantido sob agitação no *Shaker* à 140 rpm durante 72h.

### 3.4.3 Centrifugação

Após 30h estes cultivos foram retirados e transferidos em capela de fluxo laminar em duplicatas para tubos 50 mL e centrifugados a 6.000 rpm, obtendo-se *pellets*, ou seja, a biomassa bacteriana precipitada, descartando o sobrenadante, prosseguindo para a etapa da liofilização.

A Figura 4 ilustra dos tubos de centrífuga com pré-inóculo cultivado, pós o processo de centrifugação. A figura (a) apresenta os *pellets* com sobrenadantes e a figura (b) apresenta os mesmos *pellets* com o descarte dos sobrenadantes.

**Figura 4** - Fotos dos tubos de centrífuga, tipo Falcon do pré-inóculo após 30h



(A) *pellets* com sobrenadantes após o processo de centrifugação

(B) os mesmos *pellets* com o descarte do sobrenadante.

**Fonte:** Acervo próprio.

### 3.4.4 Liofilização

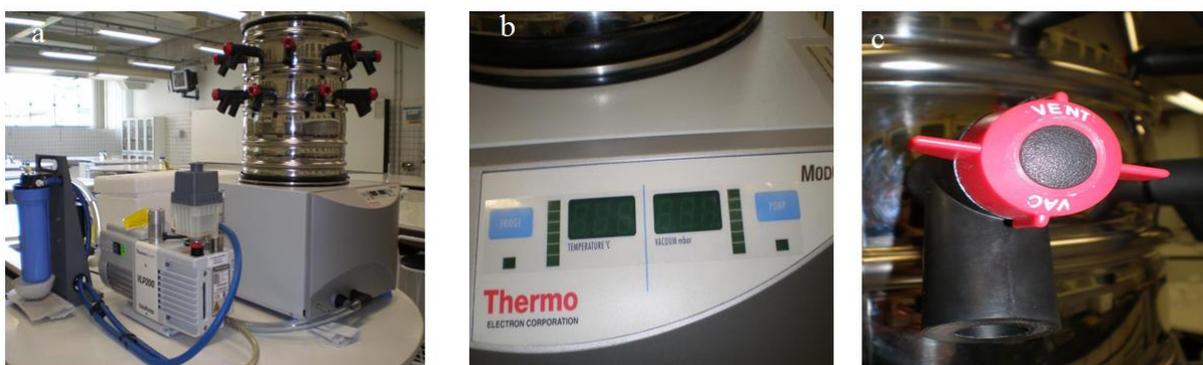
O processo de liofilização ou secagem a frio (*freeze dry*) é um procedimento de secagem por sublimação que remove a água da biomassa. Este processo é utilizado como pré-tratamento na produção de biopolímeros, facilitando na etapa posterior, de extração por solventes orgânicos. Trata-se de um processo nobre de conservação de materiais biológicos, envolvendo os dois métodos mais confiáveis de conservação (TERRONI *et al.*, 2013).

No processo de liofilização inicial, o material estava armazenado em um ultrafreezer, mantido na temperatura abaixo de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e foi acondicionado nas bombas de alto vácuo interna no liofilizador à uma pressão negativa, procedendo do estado sólido para o estado gasoso na remoção da água da biomassa (processo de sublimação), que estabiliza o produto (TERRONI *et al.*, 2013), mantendo a sua estrutura úmida, preservando a capacidade de ser reconstituída por adição de um meio líquido simples, como a água, resultando, assim, em material liofilizado sem alteração de tamanho, cor ou tamanho.

Para o início do procedimento, deve-se fechar a válvula do liofilizador *drain* (no sentido horário), verificar se todas as torneiras estão com VET para cima, e apertar a tecla *fridge*, permitindo a temperatura alcançar  $-41\text{ }^{\circ}\text{C}$ , onde a luz do painel acionará a cor verde (protocolo Lafinau). As fotos do equipamento estão ilustradas nas figuras (9).

O material genético utilizado nesta tese foi liofilizado no equipamento: liofilizador *ModulyOD Thermo Fisher*, N° de Série – R23T-659559-RT FDA 20529.por 24h.

**Figura 5** - Fotos do equipamento para processos de liofilização



**Fonte:** Imagens retiradas durante realização do procedimento, exibindo equipamento adquirido com recursos da FAPESP no laboratório Lafinau. Processo 07/53883-6.

### 3.4.5 Retestagem de Gram a partir do material centrifugado

Após o procedimento de liofilização foi realizado a retestagem por método de Gram, do material bacteriano, (TORTORA *et al.*, 2012) a fim de confirmação e verificação de possibilidades de contaminantes na amostragem, com o intuito de observar novamente as características das cepas em processo, possibilitando assim maior controle e sequenciando os próximos passos dos experimentos.

### 3.4.6 Extração do PHA a partir de solventes

O processo deste ensaio foi realizado a partir de métodos químicos com solventes orgânicos (RAMSAY *et al.*, 1994), para modificar a permeabilidade da membrana celular e posteriormente solubilizar a massa residual (CORRÊA, 2014). Esta técnica é utilizada por sua simplicidade, permitindo a extração do biopolímero em alto grau de pureza, tendo elevada porcentagem de recuperação.

O protocolo foi desenvolvido realizando os seguintes passos: primeiramente, foi pesado o tubo de centrifuga, tipo Falcon de 50mL, para adicionar a amostra. No tubo, foi adicionado 425 mg de biomassa bacteriana liofilizada e macerada previamente, sendo adicionado no tubo: 11 mL de (HCL); 45 mL de Propanol (1:4 v/v) e 57 mL de 1,2-dicloroetano. Esta solução foi aquecida a 100 °C no equipamento de extração *Soxhlet* durante 3h. Após 3h, o equipamento foi desligado e aguardou-se o resfriamento da solução, atingindo a temperatura ambiente, A solução foi colocada num *becker* e acrescido 113mL de água destilada, agitada com um bastão. Após alguns minutos, as fases desta solução foram separadas: a fase orgânica foi recuperada, e esta, se divide nesta solução, ficando no inferior do tubo, conforme adaptação de Corrêa (2014); (SHAH; KUMAR, 2021; SPÍNOLA, 2018). O sistema de filtração adotado foi usado a *stericup*, adicionando o filtro de membrana 0.45 micrometro e concentrando a solução no rotavapor obtendo desta reação 5 mL de solução (DUTT TRIPATHI *et al.*, 2016). Foram adicionados 10 volumes de etanol a frio (v/v) que correspondeu a 50 mL de volume final.

O material foi centrifugado em 6.500 rpm por 15 min. Sequencialmente, foi retirada a solução etanol e dicloroetano, cuidadosamente, utilizando uma micropipeta de 1000 uL, secando esta biomassa em temperatura ambiente. Após a etapa da secagem, foi adicionado 3 mL de clorofórmio na parede do tubo da centrífuga a qual continha o precipitado da solução. Este polímero bacteriano foi analisado em espectro UV obtendo a leitura de 265 nm.

### 3.5 Caracterização de PHA por métodos espectrofotométricos

#### 3.5.1 Espectroscopia UV-visível

Os métodos Espectrofotométricos são largamente utilizados na determinação quantitativa do teor de poliésteres das células bacterianas liofilizadas e extraídas por solventes, medindo o peso do poliéster isolado, sendo assim o equipamento de espectroscopia de absorção ultravioleta visível - UV-vis medem e comparam a composição de PHA sendo este um fator importante, devido os procedimentos biotecnológicos realizados quantificando o rendimento e na eficiência de recuperação (GODBOLE, 2016).

A absorção no ultravioleta é visualizada quando um feixe monocromático atravessa o meio absorvente. O resultado final dependerá da resolução espectral do precursor óptico, do número máximo de picos expressos no equipamento, da capacidade de alcance num intervalo, bem como da radiação, do coeficiente de absorção e concentração da substância química da análise em questão (MARTINHO, 1994).

O equipamento (espectrofotômetro de UV-vis) irá fornecer a absorbância da amostra num dado comprimento de onda, com isto o equipamento foi padronizado em curva de calibração com concentrações distintas, para obter-se constante de absorvidade da amostra, identificando quantitativamente a concentração da amostra (*crotonic acid*) através da função do primeiro grau, pois essa constante multiplicada pelo caminho óptico (comprimento da cubeta 10mm) dará o coeficiente angular (a) da função  $f(x)$ , com o auxílio da utilização do *excel*, e o valor da absorbância será substituído pelo y da função  $F(x)$  e o (b) da função é tido como erro experimental, após essas substituições terá como incógnita o (x) na qual será calculado a concentração em mols, gramas (NEVES, 2015).

$$y = ax + b$$

$$y = \text{absorbância}$$

$$a = \text{absortividade} \times \text{caminho óptico (tamanho da cubeta 10mm)}$$

$$x = \text{concentração da amostra}$$

$$b = \text{erro experimental (NEVES, 2015)}.$$

Para realizar a análise, primeiramente obteve-se a mistura do PHA com ácido sulfúrico: o polímero seco foi misturado em tubo com 3 mL de ácido sulfúrico 36N, passado no vórtex, sendo aquecido por 20 min no equipamento específico laboratorial de banho-maria à 100 °C. Nesta etapa, o polímero de PHA hidrolisa em seus monômeros (MOJAVERYAZDI *et al.*, 2014; SHAH; KUMAR, 2021). Neste processo, os grânulos são convertidos em ácido crotonico biológico via desidratação, alterando sua cor, que passa a ficar em tom marrom escuro. A

solução padrão de ácido crotônico deve ser resfriada, preparada em concentrações diferentes para fazer comparativo na curva (SHAH; KUMAR, 2021).

Preparo: Pesou-se 6mg de ácido crotônico que foi diluído em 1mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentração estoque: 6mg/mL = 0,006g (6mg) que corresponde a 1000ul; 2).

A partir da solução estoque 1 foi preparada uma nova diluição partido de 30ul do estoque e adicionando 2,970 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0,18 mg (ou 180ug) Adicionado 3 mL Concentração 60ug/mL, 60ug = 1000ul = 30ul. 3).

A partir da diluição para concentração padrão, que corresponde (60ug/mL), foram preparadas diluições, para o volume final de 3 mL afim de realizar as leituras no espectrofotômetro, partindo das diluições em microlitros progressivas de 30, 35, 40 e 45ul\*: novas diluições: 0,030mL + 2,970ml; 0,040mL + 2,960ml, etc.

Em seguida, essa nova diluição (Vf= 3mL). Para a calibração do equipamento, foi utilizado o ácido sulfúrico puro como amostra controle, ou seja, o branco, após ter sido zerado o equipamento foi utilizado uma cubeta de quartzo de 700ul para realizar a leitura delimitando a faixa de absorvância entre 200 a 300 nm, para medição (MOJAVERYAZDI *et al.*, 2014).

Para se obter a confirmação de presença do PHA, um pico deve ser obtido entre 230-240 nm (MOJAVERYAZDI *et al.*, 2014; SHAH; KUMAR, 2021).

### **3.5.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Trata-se de um equipamento voltado ao método analítico quantitativo, feito através de espectroscopia de uma ampla gama de irradiação de ondas infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR), (GODBOLE, 2016; GOMAA, 2014).

Para a análise de espectroscopia por FTIR foi utilizado o equipamento *IRAffinity- 1S* da *SHIMADZU*, pertencente ao Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LaBNUS) que está situado do Parque Tecnológico de Sorocaba.

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é um método utilizado de forma rápida e permite a identificação de grupos químicos específicos e, desta forma, confirma a produção de PHA pelo microrganismo bacteriano (OLIVEIRA, 2010).

Tomando por base o método por KBr, trata-se de um sal de cor branco, cristalino (GOMAA, 2014). Para realizar análise, foi aplicado o protocolo laboratorial, sendo preparado, adicionando 2 mg da amostra de biopolímero extraído e dissolvido em clorofórmio + 300 mg de brometo de potássio (KBr) no intervalo de 400nm a 4000nm.

Esta mistura foi adicionada para secagem em estufa à 70 °C por 15 min, e a partir desta homogeneização, a mistura foi levada para prensa hidráulica para formar as pastilhas e serem

adicionadas ao equipamento de FTIR para determinação do monômero (recomendação protocolo LaBNUS e referencial: GOMAA (2014).

### **3.5.3 Análise de por HPLC (UltiMate LPG-3400SD, Thermo Scientific)**

O equipamento utilizado permite realizar a técnica de cromatografia líquida de alto desempenho e analisar os componentes que absorvem em duas fases; uma fase móvel e outra fase estacionária. O procedimento cromatográfico tem como objetivo separar, identificar e quantificar, os compostos de uma amostra química analítica, detectando a variedade de acordo com suas propriedades físico-químicas de volatilidade e polaridade (BLUM, 2014; SILVA; COLINS, 2011).

Foi realizada para a identificação de compostos fenólicos da lignina, visando avaliar o consumo de fragmentos de lignina pelo microrganismo no meio de cultura com as três bactérias BR4, TH1 e *Arthrobacter*, onde foi possível observar, na primeira linha, o meio de controle e os picos aparentes, os quais representam fragmentos de lignina presentes no meio de cultivo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O capítulo 4 tratará da exposição dos principais resultados encontrados durante o processo de pesquisa, exibindo os achados e conclusões obtidos através das análises propostas. Os resultados também serão discutidos textualmente, ao longo do capítulo.

A totalidade de microrganismos utilizados neste experimento foram de 14 colônias diferenciadas entre si.

- Uma amostra foi isolada a partir da cepa gentilmente cedida pelo Prof. Tim Bugg da Universidade de Warwick do Reino Unido, denominada como *P. putida*; - Esta cepa foi cedida para dar início a pesquisa para meios comparativos na capacidade de produção de bioplástico.
- Sete microrganismos foram isolados a partir do solo, denominados antes da identificação como BR1, BR2, BR3, BR4, BR5, BR6 e BR7; - Coleta realizada para dar início aos consórcios, a fim de estudar a capacidade destes microrganismos na degradação de PET e produção de PHA, selecionando novas linhagens
- Cinco microrganismos foram isolados a partir de amostras selecionadas pelo grupo, denominados antes da identificação como TH1, TH2, TH3, TH4, TH6. – O cultivo destes microrganismos visava como interesse, realizar experimentos de adaptação das cepas afim de desenvolver uma rota de bioconversão/ valorização de lignina.
- Uma amostra da cepa *Arthrobacter*, derivado de pesquisas do grupo do Profº Fabio Marcio Squina.

### 4.1 Resultado do teste de coloração de gram das linhagens avaliadas no estudo

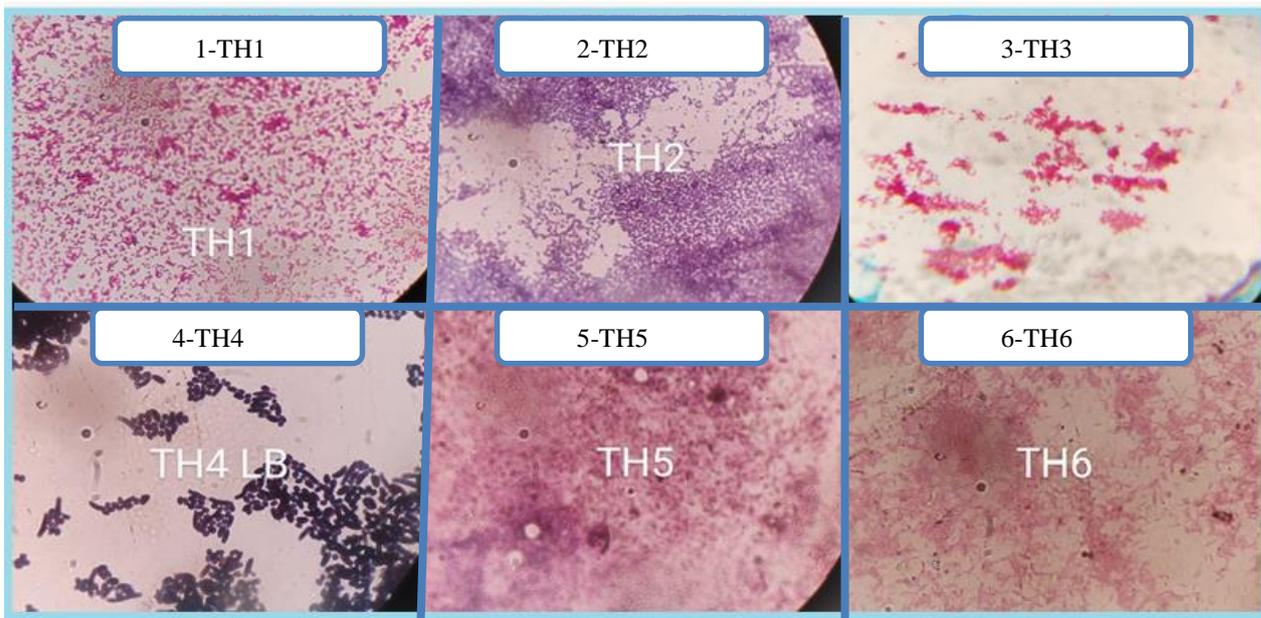
Os resultados para os testes de coloração de Gram feitos a partir das linhagens obtidas permitiram evidenciar características comuns apresentadas, estando de acordo com o referencial teórico de autores especializados na área.

Pode-se observar semelhanças e distinções entre as duas classes de bactérias, em relação às cores e ao formato morfológico, identificadas a partir do processo de coloração com agentes químicos num esfregaço bacteriano.

O processo descorante acontece na lavagem com a solução de álcool-acetona, que descolore a cor púrpura de apenas algumas das espécies, permitindo diferenciá-las. As bactérias reagentes que retém a corante púrpura / violácea são classificadas como Gram-positivas; possuem uma parede celular de peptidoglicano mais espessa. As bactérias que perdem a cor violeta são classificadas como Gram-negativas, estas rompem as camadas externas, devido ter

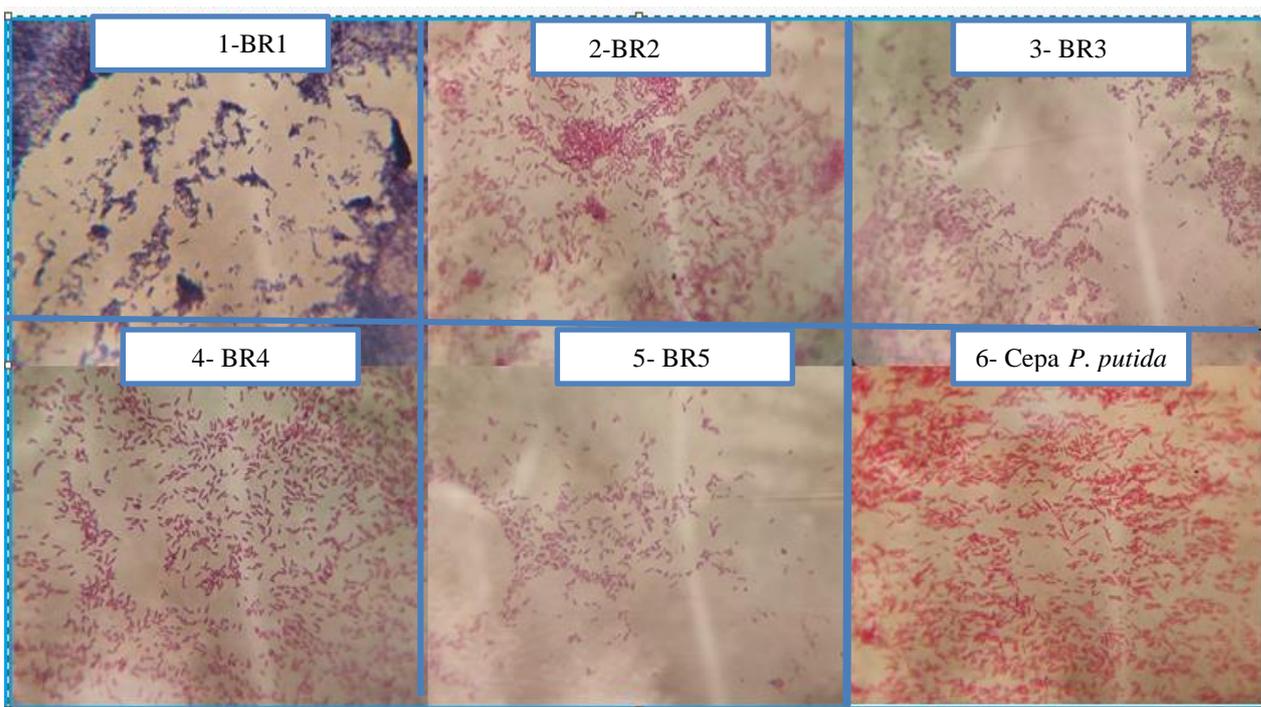
a camada mais fina durante a descoloração preservando sua cor de vermelha ou rosa escuro (BRASIL, 2001; TORTORA *et al.* 2012).

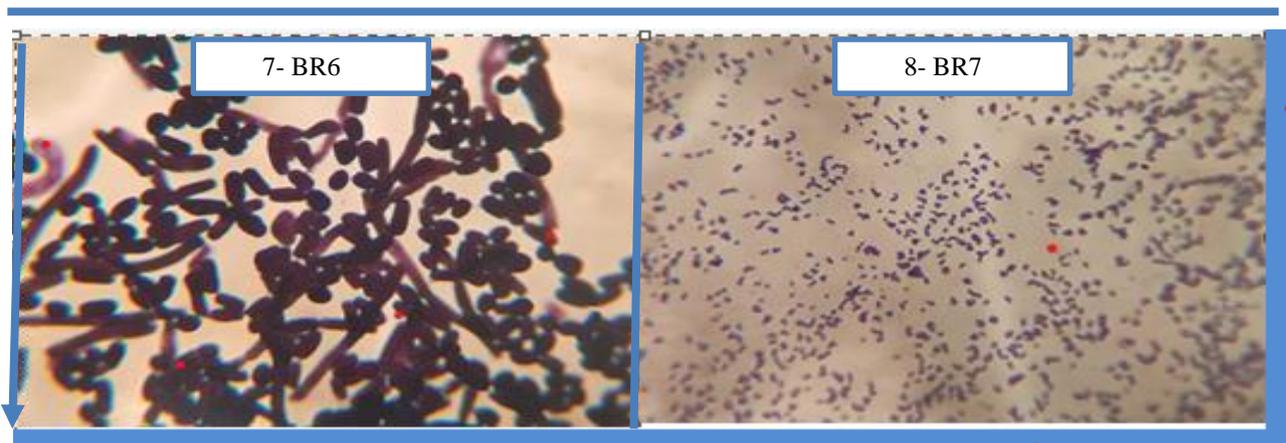
**Figura 6** - Resultados do teste de Gram das linhagens denominadas THs obtidas a partir da seleção de microrganismos em estudo



**Fonte:** Acervo do grupo de pesquisa.

**Figura 7** - Resultados do teste de Gram das linhagens denominadas BRs obtidas a partir da seleção de microrganismos em estudo. A figura nº 6 é a cepa cedida para o estudo, denominada *P. putida*





**Fonte:** Acervo do grupo de pesquisa.

As cepas denominadas TH1, BR2 e BR4 (Encontram-se nos resultados da Fig. 6 e 7), também foram reconhecidas como Gram-negativa, pois apresentaram as mesmas características de similaridade citada na linhagem cedida, a *P. putida* (Figura 7), ou seja, não retiveram o corante cristal violeta durante o processo.

O resultado do teste de coloração da bactéria cedida pelo Dr. Tim, a *P. putida* é uma bactéria Gram-negativa caracterizada morfológicamente em bacilos com a forma de bastonetes, de coloração rosa/avermelhada.

Para melhor visualização da apresentação de resultados das linhagens isoladas identificadas no teste de coloração de Gram, foi desenvolvido o quadro abaixo:

**Quadro 4** - Resultados das linhagens isoladas identificadas no teste de coloração de Gram – Interpretação com leitura no livro de TORTORA *et al.*(2012).

Amostra	Resultado do teste coloração	Morfologia
BR1	Gram positiva	Bacilos
BR2	Gram negativa	Bacilos
BR3	Gram negativa	Bacilos
BR4	Gram negativa	Bacilos
BR5	Gram negativa	Bacilos
Cepa <i>P. putida</i>	Gram negativa	Bacilos
BR6	Gram positiva	Fungos
BR7	Gram positiva	Cocos
TH1	Gram negativa	Bacilos
TH2	Gram positiva	Bacilos
TH3	Gram negativa	Bacilos
TH4	Gram positiva	Cocos
TH5	Gram negativa	Bacilos
TH6	Gram negativa	Bacilos

**Fonte:** elaboração própria.

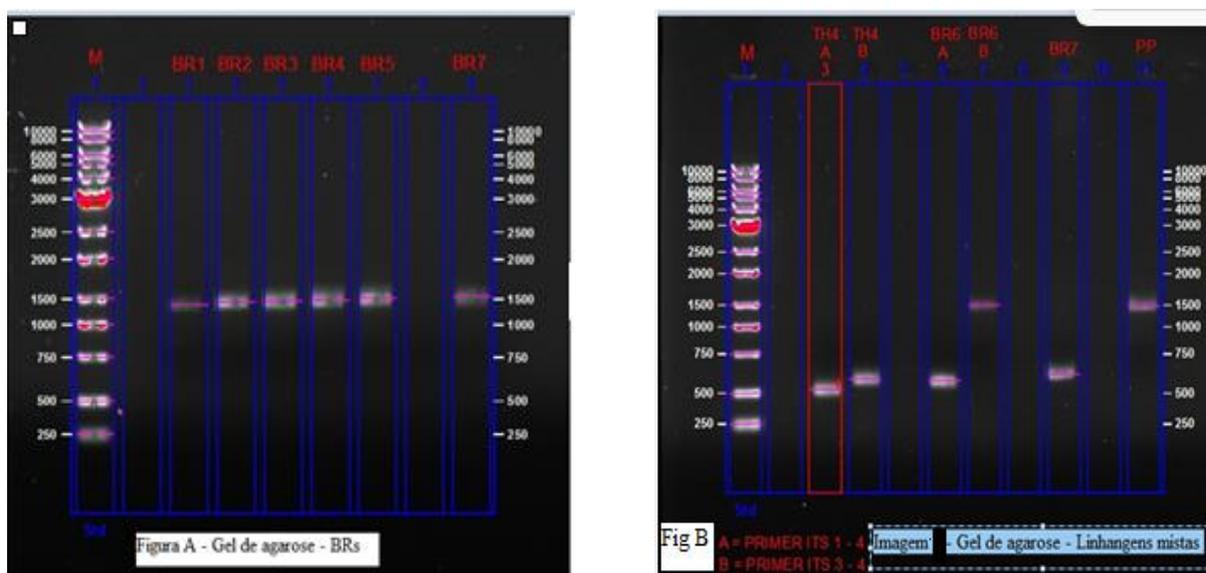
É esperado que as cepas selecionadas para o estudo, possuam alta capacidade em velocidade específica para a produção de PHA, acumulando, ao menos 60% de seu peso seco, sendo este um critério importante na seleção de todas as bactérias, sendo elas Gram-positivas ou Gram-negativas. Esta alta capacidade de produção, reduz o uso dos substratos, reduzindo assim o custo na produção do biopolímero, sendo este rentável às indústrias investidoras (VIEGAS, 2005).

## 4.2 Resultado por análise de eletroforese

A análise em eletroforese determinou os tamanhos das bandas sob visualização em um transiluminador sob luz UV, em uma escala de DNA padrão, a fim de se comparar a migração diferencial (POSSIK, 2010).

As bandas tratadas foram analisadas em gel de agarose 1% m/v e mensuradas em *Nanodrop*. Os fragmentos da separação eletroforética apresentaram o tamanho esperado de (~600 pb; ~1500 pb), conforme comparado no equipamento de transiluminador e sequencialmente purificadas com o kit “*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (PROMEGA, MADISON, WI)”, seguindo as orientações do fabricante.

**Figura 8** - (A) (B) Imagem do gel de agarose das linhagens isoladas do solo e selecionadas em estudo



**Fonte:** Imagens do acervo do grupo de pesquisa.

- A) Imagem do gel de agarose 1% com o resultado da extração de DNA das cepas BR1; BR2; BR3; BR4; BR5 e BR7 e marcador (M) (GD 1Kb plus DNA ladder RTU, GeneDireX). A linha definida das bandas da amostra tem aproximadamente ~ 1500 (bp).

B) Imagem do Gel de Agarose 1% com resultado da extração do DNA das cepas TH4 em duplicata; BR6 em duplicata; BR7 e *P. putida* (PP) o marcador utilizado: (M) (GD 1Kb plus DNA ladder RTU, GeneDireX).

As linhas definidas das bandas desta amostra foram: TH4 amostra A ~500 (bp) a amostra em duplicata da cepa de TH4 (A), ficou correspondente em média de ~ 550 (bp) e TH4 (B) ~ 600 (bp); A amostra de BR6 (A), apresentou a linha definida em média ~ 600 (bp); A amostra de BR6 (A), apresentou a linha definida em média ~1500 (bp); A cepa BR7 apresentou a linha definida em média de ~ 650 (bp); e a *P. putida* ~ 1500 (bp).

### 4.3 Resultados do produto purificado

Os testes confirmaram a genotipagem da molécula de DNA por processo de sequenciamento de nucleotídeo em empresa especializada.

Com base nas análises dos resultados, foi possível realizar a identificação de sequenciamento e a comparação do RNA ribossomal a nível de gênero 16S, que é um componente da subunidade 30S dos ribossomos dos procariotas das espécies bacterianas, e estas, apresentam aproximadamente 1500 pares de base. O rRNA 16S possui regiões hipervariáveis, fator que se encaixa nas espécies de *Pseudomonas*, possuem gêneros bacterianos muitos diversos, que divergiram ao longo da evolução, sendo identificada no rRNA 16S (HORNINK, 2015).

O gene codificador analisa a procedência gênica e a análise da estrutura filogenética estabelece a maior relação entre eles, devido seu nível de similaridade, identificando assim, o gênero e espécie de linhagens (HORNINK, 2015; ROMANO, 2015).

Observou-se que algumas cepas isoladas se tratavam de fungos, então foi feito o PCR da região do Espaço Interno Transcrito (ITS), que se trata de outra técnica utilizada para a caracterização de fungos a nível de gênero (WHITE *et al.*, 1990).

### 4.4 Resultado das análises de sequenciamento microbiano das amostras das linhagens de trabalho

Sobre as bactérias isoladas, o sequenciamento indicou a presença de 4 microrganismos do gênero *Pseudomonas*, 1 do gênero *Mycolicibacterium* e 1 do gênero *Gordonia*, 1 *Klebsiella*, 1 *Microabcterium*, *Isoptericola*, 1 *Candida*, 1 *Bacillaceae*, 1 *Bacillus*, conforme detalhamento de cada isolado observado no quadro 5: BR1 – *Mycolicibacterium*, BR2 – *Pseudomonas* (igual a BR4), BR3 – *Pseudomonas* (igual a BR5), BR4 – *Pseudomonas* (igual a BR2), BR5 –

*Pseudomonas* (igual a BR3), BR6 – *Trichosporon* (fungo), BR7 – *Gordonia* (bactéria), TH1 – *Klebsiella* (bactéria), TH2 – *Microbacterium* (bactéria), TH3 – *Isoptericola* (bactéria), TH4 – *Candida* (fungo), TH5 – *Bacillaceae* (bactéria), TH6 – *Bacillus* (bactéria). (TORTORA *et al.*, 2012)

**Quadro 5** - Organismos isolados a partir de ensaios de degradação de PET, com a identificação de gênero após sequenciamento 16S e da região do Espaço Interno Transcrito (ITS)

Nome da cepa	Gênero	Microrganismo
BR1	<i>Mycolicibacterium</i>	Bactéria
BR2	<i>Pseudomonas</i>	Bactéria
BR3	<i>Pseudomonas</i>	Bactéria
BR4	<i>Pseudomonas</i>	Bactéria
BR5	<i>Pseudomonas</i>	Bactéria
BR7	<i>Gordonia</i>	Bactéria
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas</i>	Bactéria
TH1	<i>Klebsiella</i>	Bactéria
TH2	<i>Microabcterium</i>	Bactéria
TH3	<i>Isoptericola</i>	Bactéria
TH5	<i>Bacillaceae</i>	Bactéria
TH6	<i>Bacillus</i>	Bactéria
TH4	<i>Candida</i>	Fungo
BR6	<i>Trichosporon</i>	Fungo

Fonte: Elaboração própria.

Os resultados das análises genéticas das linhagens obtidas a partir do cultivo no solo indicaram a presença de diferentes microrganismos e até mesmo semelhanças entre as cepas estudadas que apresentavam características ou padrão de crescimento distintos.

Os resultados permitiram a identificação das espécies de bactérias e respectivamente seu gênero.

O banco de dados do grupo de pesquisa permitiu identificar os gêneros das cepas BR6 e TH4, tratando-se de *Trichosporon sp.* e *Candida sp.*, respectivamente. Esses microrganismos não se mostraram promissores para produção de PHA nos ensaios realizados.

Após a identificação foram realizadas análises dos cromatogramas com a intenção de identificar os gêneros dos microrganismos isolados. Foi utilizado o programa *Geneious Prime* para a realização do alinhamento e das árvores filogenéticas das cepas. As figuras da identificação das árvores filogenéticas se encontram nos anexos do trabalho.

**Figura 9** - Resultado de BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e parâmetros de busca utilizados visando a identificação taxonômica da linhagem BR4

Your search is limited to records that include: *Pseudomonas putida* KT2440 (taxid:160488)

Job Title: **C1A2R02.ab1 (908 bp)**

RID: [N4HC07HM014](#) Search expires on 09-05 21:47 pm [Download All](#) ▾

Program: **BLASTN** [Citation](#) ▾

Database: **nt** [See details](#) ▾

Query ID: **lc|Query\_39165**

Description: **C1A2R02.ab1 (908 bp)**

Molecule type: **dna**

Query Length: **908**

Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

**Filter Results**

**Organism** *only top 20 will appear*  exclude  
 Type common name, binomial, taxid or group name  
[+ Add organism](#)

**Percent Identity**  to

**E value**  to

**Query Coverage**  to

[Filter](#) [Reset](#)

**Descriptions** | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

**Sequences producing significant alignments** [Download](#) ▾ [Manage Columns](#) ▾ Show  [?](#)

select all 1 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudomonas putida KT2440 complete genome</a>	878	6142	85%	0.0	83.94%	<a href="#">AE015451.2</a>

**Standard Nucleotide BLAST**

BLASTn programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [Blast...](#) [Reset page](#) [Bookmark](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#)

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#)

Or, upload file  No file chosen [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database:  Standard databases (nr etc.)  r(RNA)ITS databases  Genomic + transcript databases  Betacoronavirus

Organism:  [?](#)

Organism:   exclude [?](#)

Exclude:  Models (MMXP)  Uncultured/environmental sample sequences

**BLAST results will be displayed in a new format by default**  
 You can always switch back to the Traditional Results page.

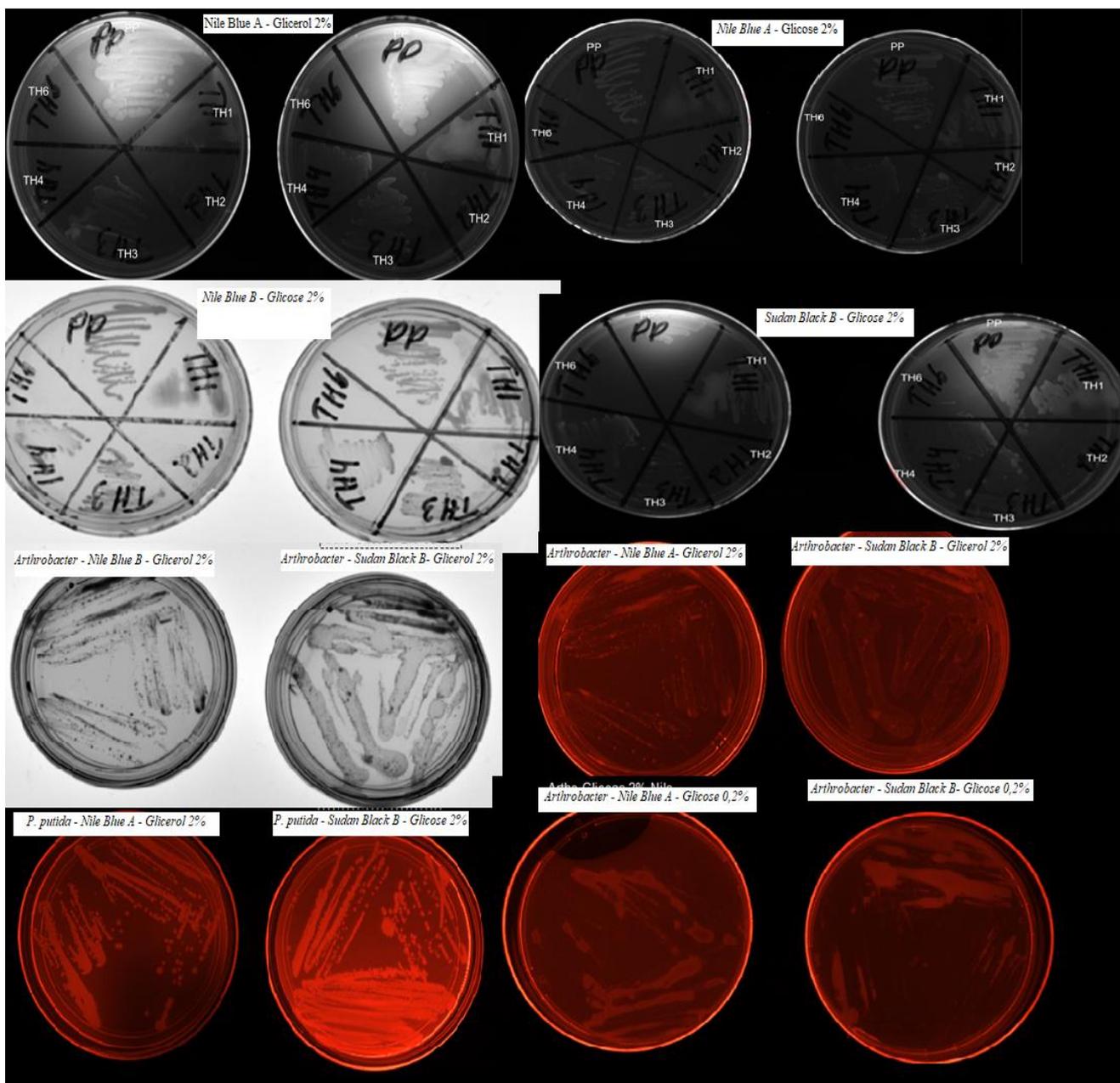
Fonte: Empresa especialista em sequenciamento - programa *Geneious Prime*

#### 4.5 Resultados da coloração de colônias *Sudan Black B* e *Nile Blue A*

Os resultados de coloração por *Sudan Black B* e *Nile Blue A*, exibe fluorescência em luz com irradiação ultravioleta, destacando as cepas que possuem grânulos com capacidade em produção de PHA. Onde resultou maior destaque em aplicação de *Nile Blue A*.

As imagens contidas na figura 10 a seguir representam os resultados obtidos na análise por coloração por *Sudan Black B* e *Nile Blue A*, em diferentes concentrações de glicerol e glicose das cepas denominadas THs, e *Arthrobacter*, antes dos resultados de sequenciamento.

**Figura 10** - Resultados do teste por método de coloração das cepas de THs e *Arthrobacter* por *Sudan Black B* e *Nile Blue A* com diferentes concentrações de glicerol e glicose



Dados produzidos através do equipamento *BIO RAD – Gel Doc – EZ imager*.

Teste realizado por método de coloração por *Sudan Black B* e *Nile Blue A* nas distintas concentrações de glicerol e glicose, realizado com as linhagens utilizadas denominadas antes do resultado do sequenciamento como TH1, TH2, TH3, TH4, TH6, *Arthrobacter*, comparando com a cepa *P. putida* sob luz branca do equipamento *BIO RAD – Gel Doc – EZ imager*.

**Fonte:** Elaboração própria.

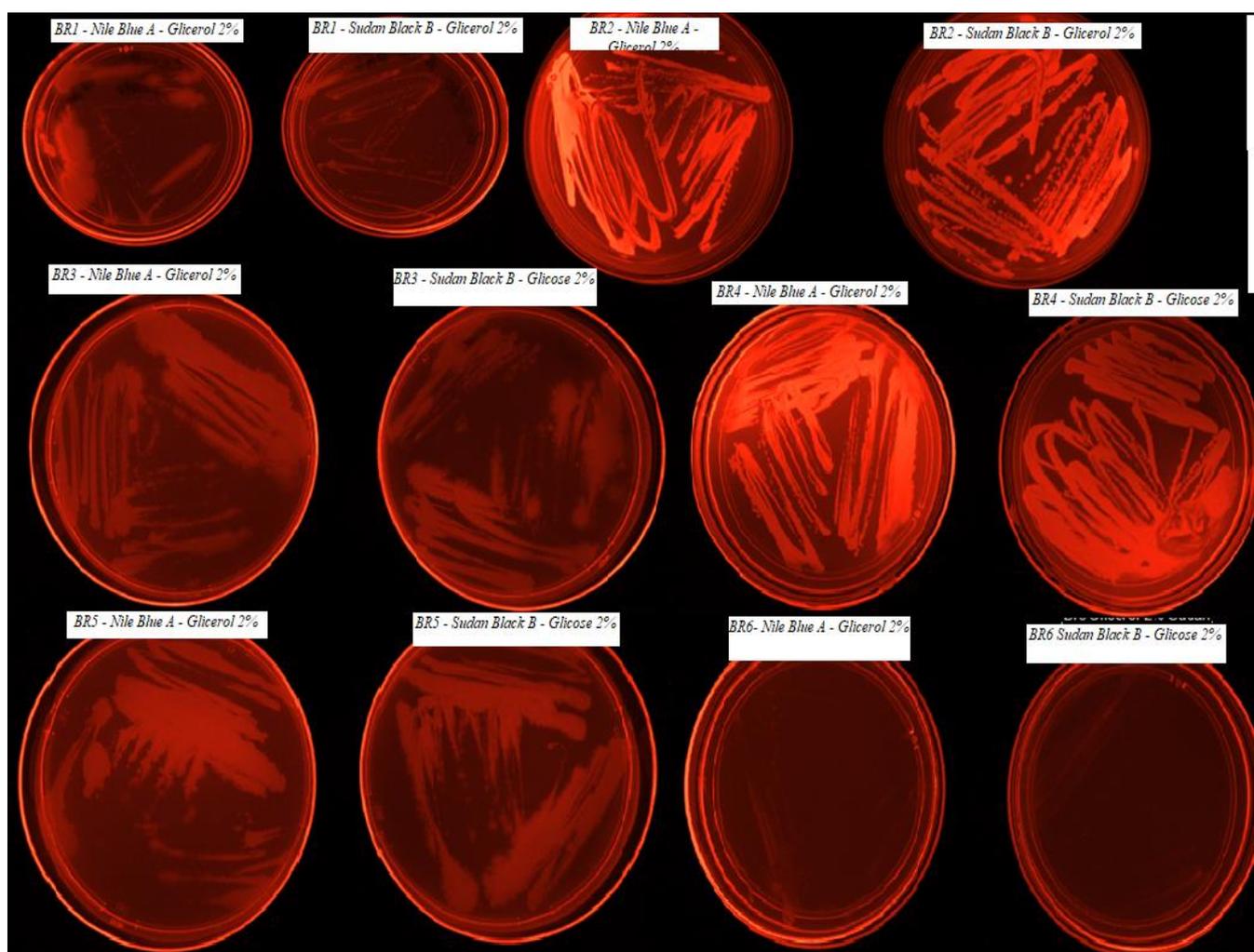
No *screening* realizado neste trabalho, foi possível evidenciar diferença na visualização dos grânulos citoplasmáticos (PHA) produzidos pelas linhagens de microrganismos em estudos, denominadas THs, e a cepa de *P. putida*, a partir do glicerol e da glicose, usados como fontes de carbono. Isto pode ser observado na Figura 10, considerando-se que as imagens que

representam as cepas de *P. putida* possuem maior fluorescência, tanto nos cultivos que utilizaram o glicerol e para os resultados dos cultivos que tiveram a glicose como fonte de carbono. Neste comparativo, foi observado também que, entre as linhagens estudadas, denominadas THs, a cepa TH1 se destacou.

Análise referenciadas em estudo sobre o destaque na fluorescência das cepas produtoras de PHA (GODBOLE, 2016; MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019; SHAH; KUMAR, 2021).

Na avaliação sobre o melhor corante entre o *Sudan Black B* e *Nile Blue A*, devido à diferença significativa na intensidade da fluorescência emitida sob luz UV, foi possível observar que, comparativamente, a melhor fonte de carbono foi o glicerol, enquanto o melhor corante foi o *Nile Blue A*.

**Figura 11** - Resultados de teste de coloração com o *Sudan Black B* e *Nile Blue A* nas linhagens denominadas “BRs” em estudos estriadas em placas de petri individuais comparando as mesmas fontes de carbono utilizadas: a glicose e glicerol



Dados produzidos através do equipamento – BIO RAD – Gel Doc – EZ imager.

Fonte: Elaboração própria.

No *screening* realizado nesse trabalho, foi possível evidenciar diferença na quantidade dos PHA produzidos pelas linhagens de estudos, denominadas BRs e a cepa de *P. putida* a partir do glicerol e da glicose, usados como fontes de carbono. Isto pode ser observado na Figura 11, considerando-se que as imagens que representam as cepas de *P. putida* possuem maior fluorescência, tanto nos cultivos que utilizaram o glicerol, e para os resultados dos cultivos que tiveram a glicose como fonte de carbono. Neste comparativo, foi observado também que, entre as linhagens denominadas BRs que estavam sendo estudadas, as cepas BR2 e BR4 se destacavam como promissoras para a produção de PHA, conforme referencial teórico estudados: (GODBOLE, 2016; MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019; SHAH; KUMAR, 2021).

Após testes biomoleculares e sequenciamento, foi identificado que as cepas em destaque na fluorescência se tratavam de *P. putida*. Apontando a importância de maior observação destas cepas como escolhas no andamento do projeto.

Na avaliação comparativa neste experimento entre os corantes: *Sudan Black B* e *Nile Blue A*, relacionado com a diferença na intensidade da fluorescência emitida sob luz UV, possibilitou a confirmação que a melhor fonte de carbono foi o glicerol, enquanto o melhor corante foi o *Nile Blue A*.

#### **4.6 Resultado da análise por microscópio eletrônico de transmissão (MET)**

Para esta análise, foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão (MET), modelo *Zeiss EM 900*, na *facility* do Departamento de Fitopatologia e Nematologia ESALQ/USP.

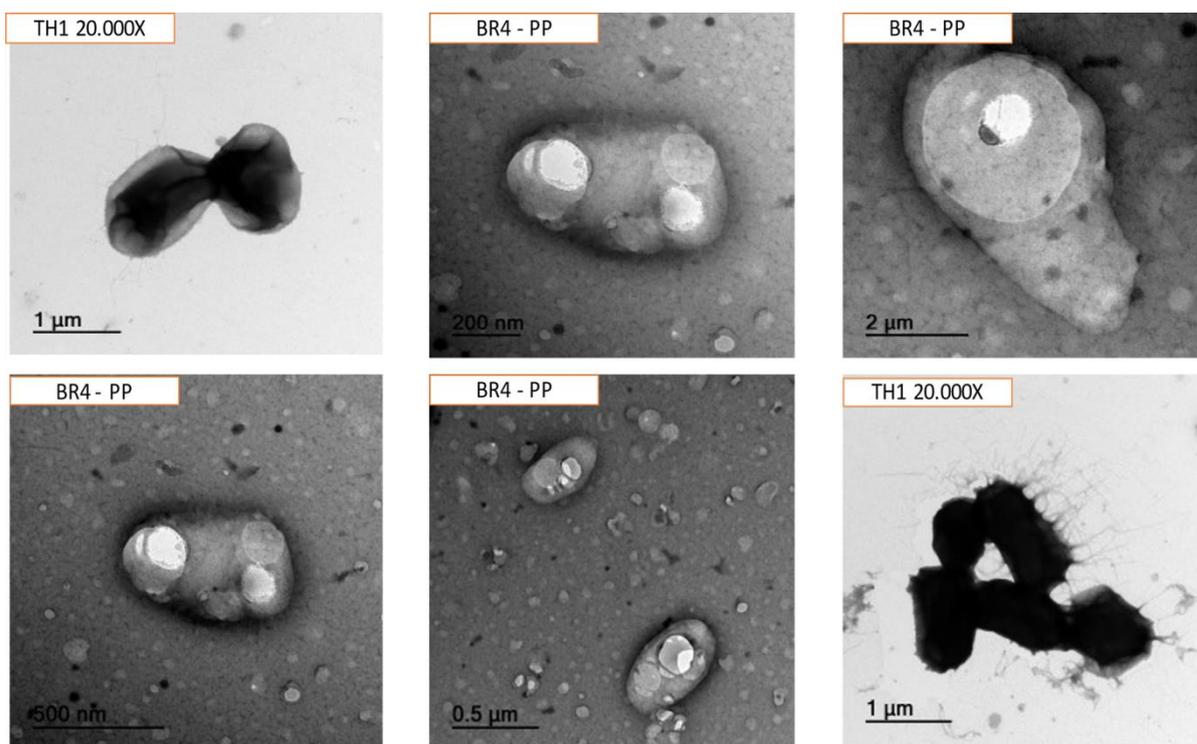
A microscopia eletrônica permitiu a transmissão na ampliação X 40.000, apresentando maiores entendimentos moleculares, onde identificou nitidamente a estrutura da superfície grânulos intracelulares do PHA, confirmando a produção dos biopolímeros microbianos intracelularmente.

O PHA acumula em forma de grânulos intracelulares nas cepas bacterianas, fenômeno possibilitado quando o ambiente possui carência de diversos nutrientes, exceto carbono (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2018), sendo localizado no citoplasma da célula, podendo ser visualizado por um microscópio de luz de contraste de fase devido à sua alta refração.

As imagens comparativas, evidencia a presença dos grânulos nas cepas denominadas (BR4), ou seja, *P. putida*.

As imagens da cepa (TH1) *Klebsiella sp*, revelaram que não há inclusão de formação de grânulos no interior do seu corpo, sendo assim, esta cepa não se mostrou promissora para a produção de PHA. (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

**Figura 12** - Imagens amplificadas por microscopia (MET) com os grânulos de PHA das cepas denominadas (BR4) *Pseudomonas*, e cepa de (TH1) *Klebsiella sp*



Fonte: Acervo próprio - Imagens retiradas pelo grupo de pesquisa.

#### 4.7 Resultados da caracterização físico-química do biopolímeros

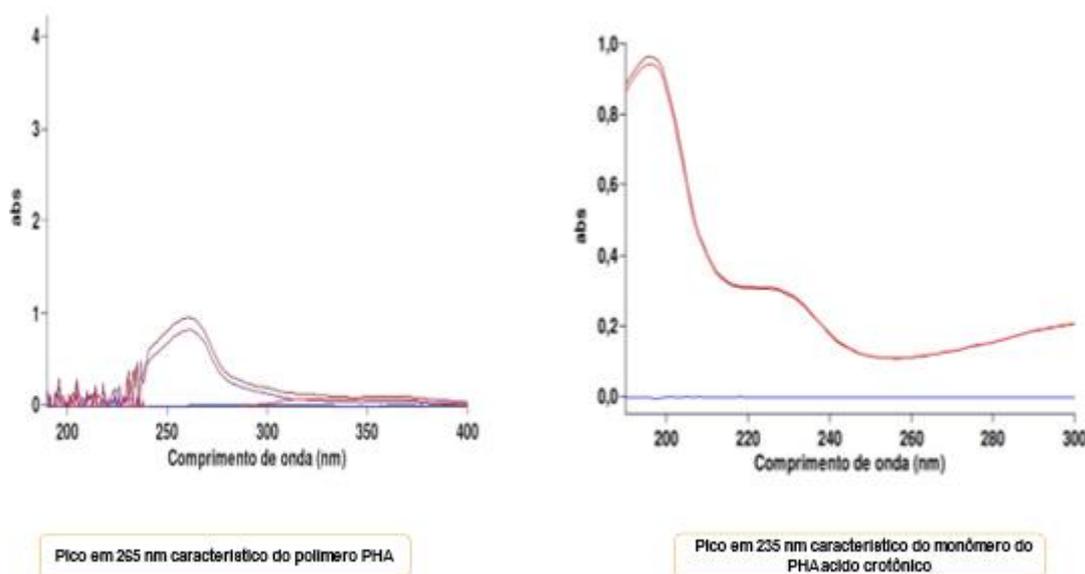
Os biopolímeros foram determinados quanto às suas características físicas e químicas, ressaltando-se que as características do material obtido influenciam diretamente na qualidade das aplicações, para caracterização das ligações químicas da amostra extraída, utilizamos a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (OLIVEIRA, 2010; TANIKKUL *et al.*, 2020). Preparou-se o ensaio com tratamento em ácido sulfúrico convertendo o monômero em ácido biocrotônico, para estimar as ondas absorvidas do PHB, por teste UV-Vis (FARID *et al.*, 2015), subsequente foi analisado as propriedades térmicas da amostra de resina de PHB, exportada da China, através do equipamento de Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) (SPINOLA, 2018).

#### 4.7.1 Resultados Quantitativo de PHA produzidos por espectroscopia UV- VIS da linhagem de *P. putida*

A análise o comprimento de ondas absorvidas, com finalidade de estimar a quantidade de PHA produzido foi estimada pelo teste UV-VIS, no equipamento *Agilent Technologies Cary 60 UV-vis*, o ácido crotônico, foi de escolha alternativa para este ensaio, por se tratar de um ácido carboxílico insaturado geralmente produzido a partir da oxidação do crotonaldeído. “composto à base de petróleo”. A adição de ácido crotônico com plásticos hidrofóbicos os tornariam mais hidrofílicos, que seriam mais adequados a aplicações biomédicas na produção de plásticos e polímeros (FARID *et al.*, 2015).

A leitura por espectrofotômetro UV Vis, confirmou o pico correspondente a produção de PHA. O fator da absorbância do equipamento foi ajustado entre 200 e 300 nm, para realizar a medição e validação de um pico obtido, onde a linha do gráfico de cor vermelha é referência como amostra de controle sendo utilizado o ácido sulfúrico como o “branco”. A partir do comparativo deste, obteve-se o pico em 230nm.

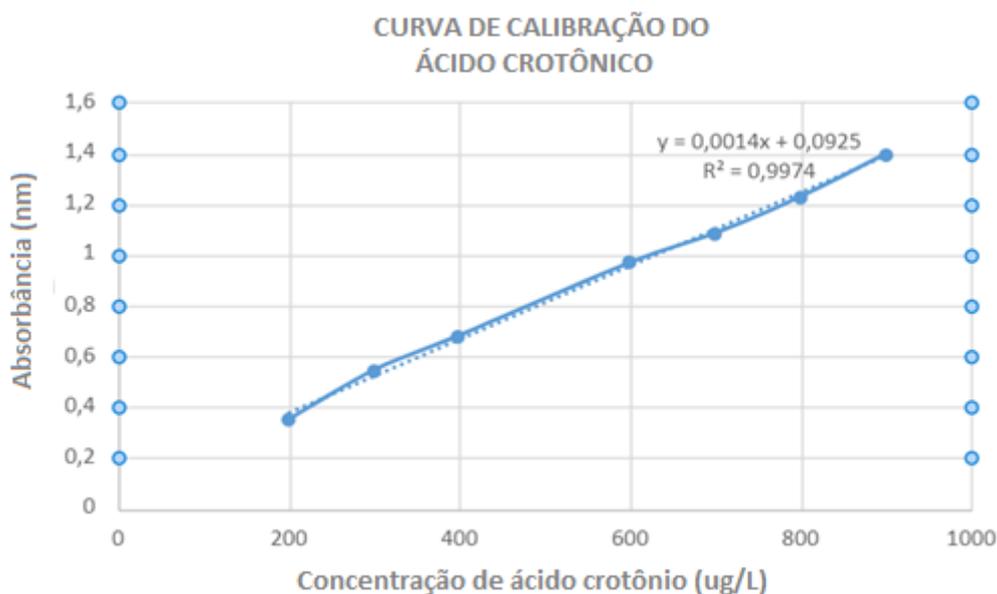
**Figura 13** - Gráfico da curva padrão do ácido crotônico, mostrando a absorbância por comprimento de onda



O pico característico do ácido crotônico, mencionado em artigos, é identificado em 235nm pela análise no espectro de UV- VIS (NARAYANKUMAR; KRISHNASWAMY; SHAJI, 2019).

A fim de descobrir o rendimento de cada cultivo, utilizou-se as medidas da absorbância e concentração para calcular a curva de calibração. Aplicando a fórmula  $y = 0,0014x + 0,0925$ . Na fórmula, y é o valor da absorbância, enquanto o x representa a concentração de ácido crotônico (ug/L).

**Figura 14** - Curva calibração crotônico



#### 4.7.2 Resultado do teste gravimétrico

Substituindo a incógnita  $y$  pelo valor da absorbância, o resultado da quantificação de PHA produzido, em equivalentes de ácido crotônico, foi 30,8 µg em cultivo com sacarose (média de dois cultivos), e 23,5 µg em cultivo com glicerol, utilizando o protocolo descrito anteriormente e utilizando de 450mg e biomassa liofilizada. Nesses cultivos, a quantidade determinada de polímero obtida (análise gravimétrica) após o protocolo de extração foi 67,9mg e 88,7mg, a partir de 450mg e biomassa liofilizada, respectivamente.

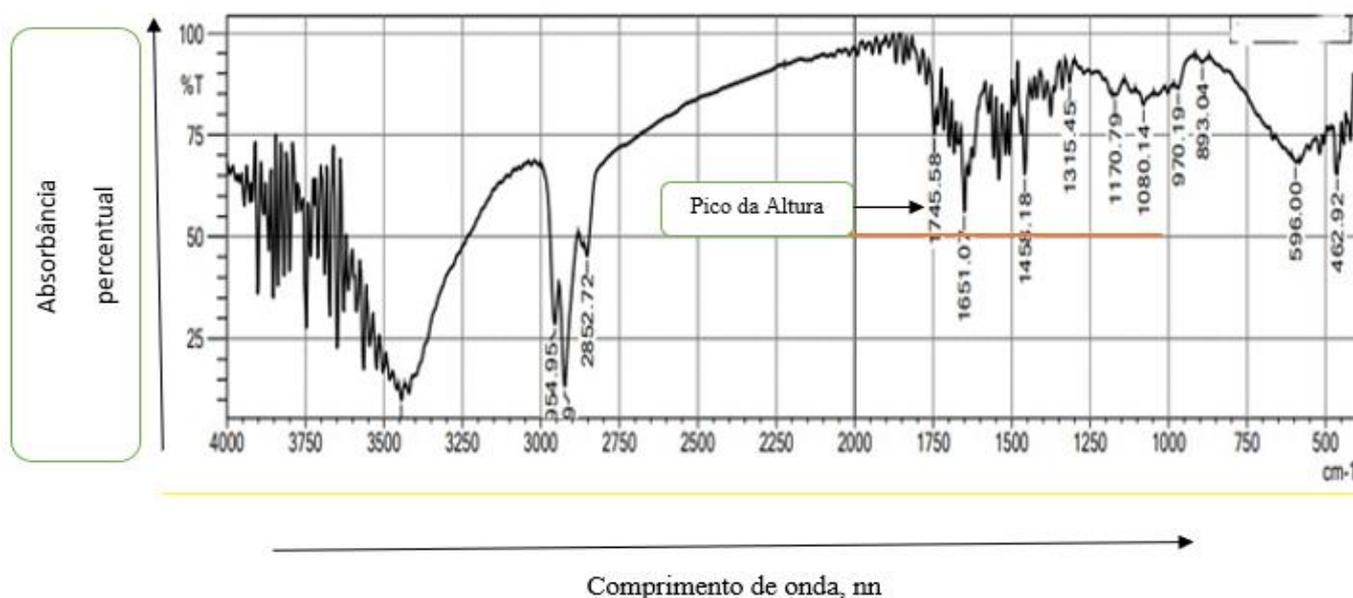
#### 4.7.2 Resultado do FTIR – Produção de PHA: *P. putida*

Procedeu-se o protocolo de análise, com o material (bactéria *P. putida*) provinda Inglaterra; em comparativo com as cepas que se destacavam que através de teste biomoleculares se identificaram como *P. putida*, sendo elas: (1) a cepa de *P. putida* provinda da Inglaterra, e a cepa de BR4 – identificada como, *Pseudomonas sp.* As amostras foram extraídas do clorofórmio e transformadas em pastilhas sólidas, com a adição do brometo de potássio (KBR) (GODBOLE, 2016; GOMAA, 2014).

Dessa forma, foi possível observar, dos resultados obtidos, utilizando o protocolo de extração, picos característicos do espectro de FTIR, indicando que a produção de PHA foi bem-sucedida. Os picos do espectro de FTIR são referentes ao grupo da carbonila (1745 cm<sup>-1</sup>),

grupos ésteres de alongamento assimétrico e simétrico ( $1170\text{ cm}^{-1}$ ) e na região espectral em ( $1080\text{ cm}^{-1}$  à  $893\text{ cm}^{-1}$ ), grupo metil ( $2852\text{ cm}^{-1}$ ,  $2924\text{ cm}^{-1}$ ,  $2924\text{ cm}^{-1}$ ), de acordo com Tanikkul *et al.* (2020), no entanto, foram obtidos picos de baixa intensidade de PHA (resultado) quando comparados às características deste composto, pela literatura, como pode ser observado nas figuras 19 (A; B) que está a seguir.

**Figura 15** - Gráfico do Resultado de FTIR – PHA – cepa *P. putida*



**Fonte:** Resultado laboratorial da amostra do autor.

#### 4.8 Experimentos a partir da degradação dos compostos fenólicos da lignina

Com o objetivo desenvolvimentos de processos biocatalíticos de conversão de lignina visando o desenvolvimento de uma rota de bioconversão/ valorização de lignina, foi realizado experimentos de adaptação de três cepas bacterianas ao crescimento em meio contendo lignina como fonte de carbono.

Os experimentos foram iniciados a partir de seleção de três cepas que foram estudadas pelo grupo de pesquisa. A escolha partiu após resultados de procedimentos biotecnológicos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, onde, estes microrganismos destacavam-se como mais promissoras em relação aos objetivos desta pesquisa. Sendo as cepas de *Arthrobacter*, a *Klebsiella sp.* (TH1) e a cepa de *P. putida* (a BR4) ambas denominadas por estas siglas sendo confirmado anteriormente, a genotipagem por testes biomoleculares.

Estas linhagens foram cultivadas em meio mínimo contendo lignina de “processo *organosolv*” como fonte de carbono. No período compreendido nesse relatório, as bactérias

utilizadas foram expostas a meios com diferentes concentrações de lignina, realizando aumento gradativo dessas concentrações, adaptando-as ao ambiente, tornando favorável o consumo da lignina presente.

Modificações na composição do meio de cultura foram realizadas visando aumentar a produção de biomassa, com a introdução do meio mínimo M9, e novas fontes de carbono,

Os novos testes, voltados ao crescimento da bactéria, com e sem derivados de lignina, foram realizados a fim de verificar a eficiência das novas condições de cultivo (LINGER *et al.*, 2014).

#### **4.8.1 Condições do cultivo no meio de Cultura com Lignina**

Primeiramente foi necessária a preparação de uma solução de 200 mL de hidróxido de sódio 0,1M, produzido com 200 mL de água deionizada e 0,8g de NaOH. Em seguida, preparou-se um estoque de lignina *organosolv*, dissolvendo 1g da lignina em 50 mL da solução de NaOH. O primeiro meio de cultura realizado possuía 100 mL em cada tubo e levados para autoclavar.

#### **4.8.2 Inoculação da cepa de *Arthrobacter* em meio contendo Lignina na concentração de 0,5mg/mL**

Como inóculo inicial, utilizou-se 10 colônias cepa de *Arthrobacter*, em cada tubo com meio contendo lignina, e incubado *shaker* sob agitação em 120 rpm, mantendo a temperatura em 30 °C, por 72h, conforme adaptação SHAH e KUMAR (2021). Foi realizado o repique neste meio mais uma vez, mas a adaptação direta no meio de concentração 0,5mg/mL de lignina não se mostrou promissória, ou seja, não apresentou diferenciação ou crescimento de biomassa.

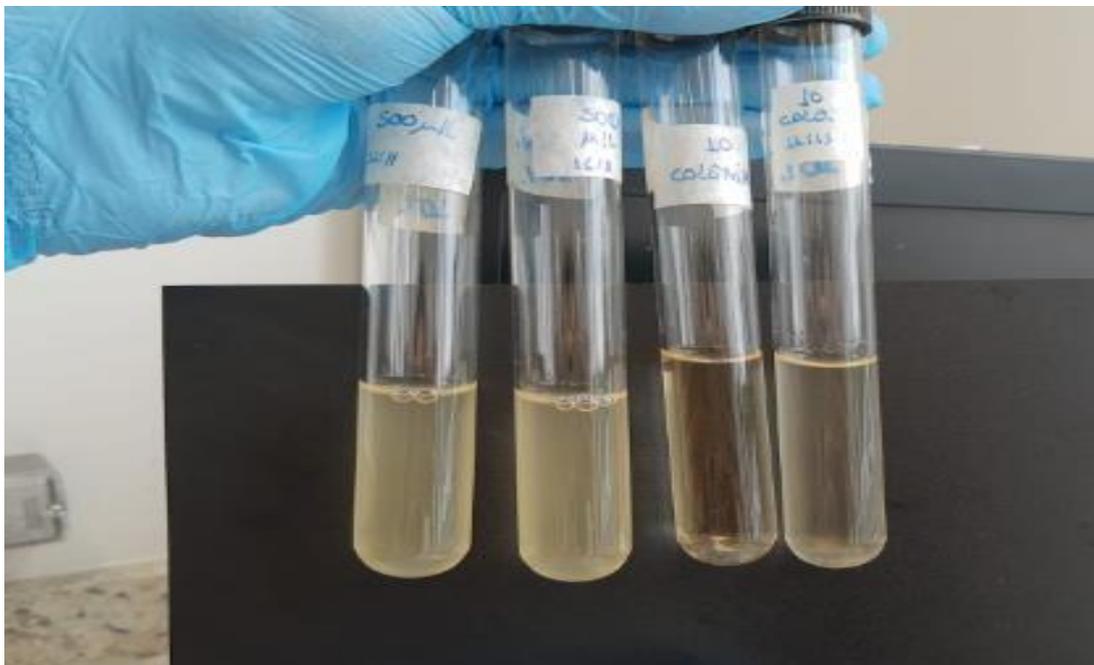
#### **4.8.3 Inoculação cepa de *Arthrobacter* em meio de Lignina na concentração de 0,25mg/mL e 0,05mg/mL**

Foi inoculado 10 colônias frescas em meio contendo lignina na concentração de 0,25mg/mL e 0,05mg/mL, utilizando como inóculo 500 µl do cultivo contendo 0,5mg/mL de lignina. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

A partir deste cultivo, foi observado o comportamento das cepas que apresentavam destaque em crescimento e realizou-se os repiques para uma passagem cruzada. Essa passagem consistiu em coletar 500 µl do cultivo de concentração 0,25mg/mL e adicioná-lo em um tubo com meio de concentração 0,05mg/mL e 500 µl do cultivo de concentração 0,05mg/mL em meio fresco de concentração 0,25mg/mL. Também houve repique mantendo a concentração inicial de lignina no meio. Os resultados desse experimento foram positivos, apresentando crescimento de biomassa e turbidez do meio.

Para certificar desenvolvimento das bactérias, foi realizada análise de UV no espectrofotômetro, comparando o crescimento em um cultivo com 10 colônias.

**Figura 16** - Cultivo de *Arthrobacter* realizado em concentração 0,05mg/mL de lignina



À esquerda estão os tubos inoculados com 500 µl e à direita tubos inoculados com 10 colônias frescas.

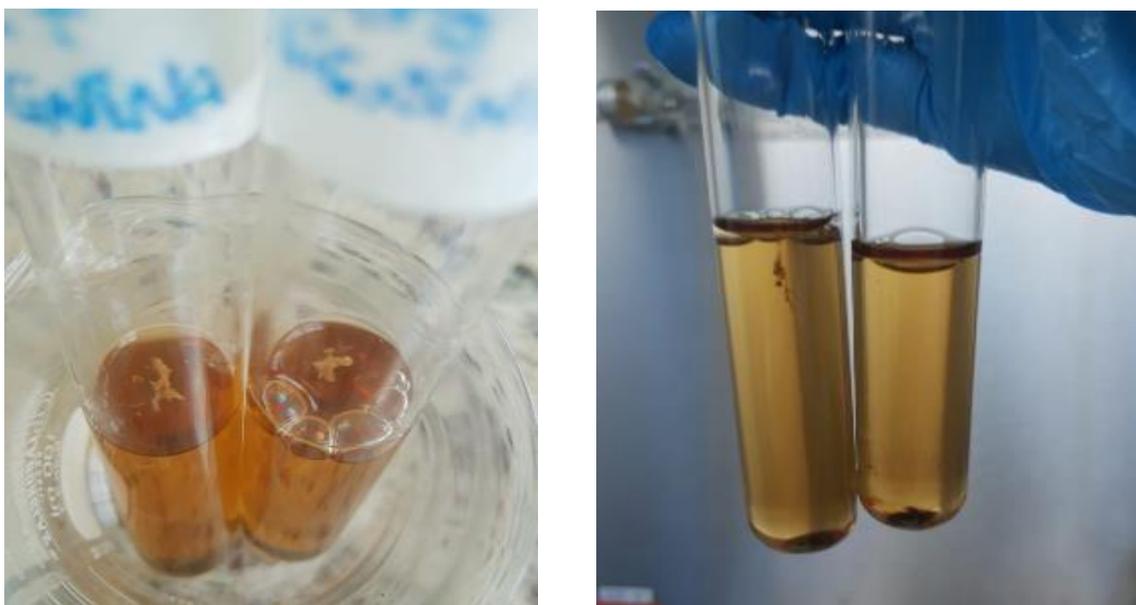
**Figura 17** - Cultivo de *Arthrobacter* realizado em concentração 0,5mg/mL de lignina



À esquerda estão os tubos inoculados com 500 µl e à direita tubos inoculados com 10 colônias frescas.

No experimento, em meio contendo lignina na concentração de 0,25mg/mL e 0,05mg/mL, foi utilizado como inóculo 500 µl do cultivo contendo 0,5mg/mL de lignina, bem como uma inoculação com 10 colônias frescas. Os cultivos foram realizados em duplicata. Para o quarto repique, foram selecionados os melhores cultivos desses meios e para uma passagem cruzada. Essa passagem consistiu em coletar 500 µl do cultivo de concentração 0,25mg/mL e adicioná-lo em um tubo com meio de concentração 0,05mg/mL e 500 µl do cultivo de concentração 0,05mg/mL em meio fresco de concentração 0,25mg/mL. Também houve repique mantendo a concentração inicial de lignina no meio. Os resultados desse experimento foram positivos, apresentando crescimento de biomassa e turbidez do meio.

**Figura 18** - Biomassa suspensa em cultivo de *Arthrobacter* em concentração 0,25mg/mL de lignina



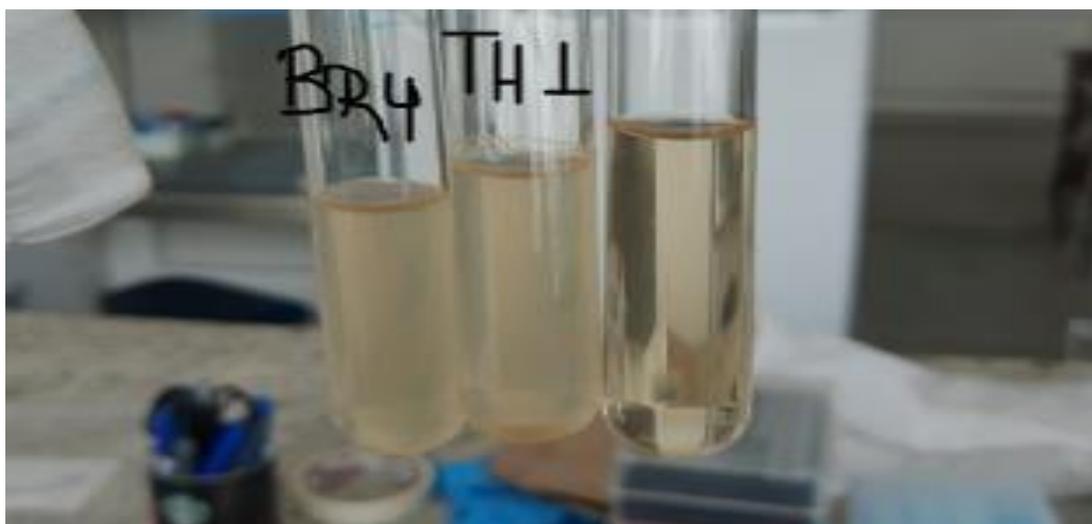
#### **4.8.4 Experimento com lignina com cepas de TH1 e BR4 na concentração de 0,25mg/mL e 0,05mg/mL**

Com o bom resultado da *Arthrobacter*, foram iniciados testes com outras duas novas bactérias, *TH1* e *BR4*. Utilizando as mesmas concentrações anteriores de 0,25mg/mL e 0,05mg/mL, a inoculação foi realizada em duplicata, partindo de 10 colônias, em tubos com 6 mL de meio de cultura. Ambas as bactérias mostraram adaptação excelente, apresentando crescimento de biomassa no dia seguinte após o cultivo (figuras 18 e 19).

**Figura 19** - Bactérias TH1 e BR4, respectivamente, no dia seguinte após a inoculação em cultivo de concentração de 0,25mg/mL, ao lado de um tubo de controle



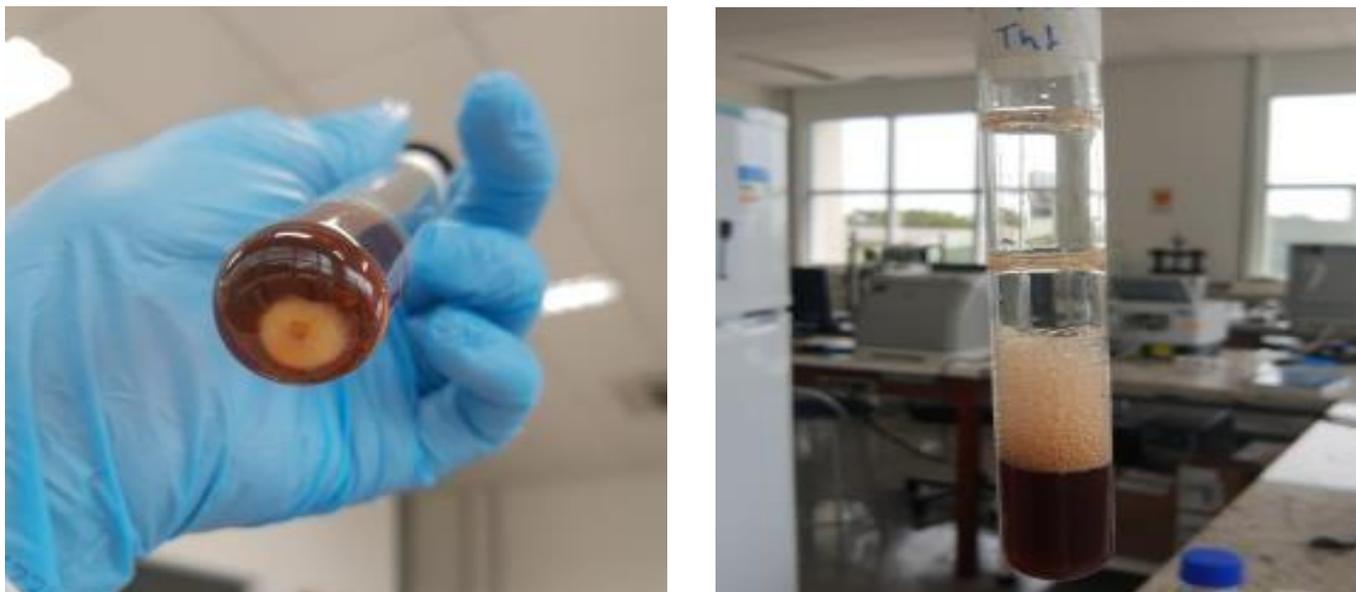
**Figura 20** - Bactérias BR4 e TH1, respectivamente, no dia seguinte após a inoculação em cultivo de concentração de 0,05mg/mL, ao lado de um tubo de controle



#### **4.8.5 Experimento com lignina com cepas de TH1 e BR4 na concentração de 0,6mg/mL**

Logo em seguida, fez-se aumento da concentração de lignina no meio, subindo-a para 0,6mg/mL, e repicando as bactérias dos meios anteriores para este. Notou-se que a TH1 e BR4 que estavam em meio de concentração 0,5mg/L de lignina, se adaptaram ao novo meio mais concentrado no teor de lignina.

**Figura 21** - Biomassa de *Arthrobacter* e TH1 em meio de concentração 0,8 mg/mL



Dois repiques foram realizados nesta concentração, e então houve aumento para 0,8mg/mL na concentração de lignina. Neste meio novo, o repique foi realizado em triplicata. O crescimento das bactérias apresentou-se promissor após troca do meio.

**Figura 22** - Biomassa de *Arthrobacter*, (TH1) *Klebsiella sp* e (BR4) *P. putida* em meio de concentração 0,8mg/mL de lignina



#### 4.8.7 Avaliação do consumo de fragmentos de lignina por extração com solvente Orgânico

Uma extração com solvente orgânico foi realizada para posterior análise de por HPLC (*UltiMate LPG-3400SD, Thermo Scientific*); visando avaliar o consumo de fragmentos de lignina pelo microrganismo. Para essa extração, foram selecionados um cultivo de cada uma das três bactérias. A partir de cada cultivo, foi coletado 1mL de meio e pipetado em microtubo

de centrifuga de 1,5mL (eppendorf), essas extrações foram realizadas em duplicata. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 1 minuto e 30s à 12,000 xg em eppendorf, havendo a formação de um pellet, com cautela, foram pipetados 400 µl do meio para um novo eppendorf e nele foi adicionado 400 µl de acetato de etila, em sequência os eppendorfs foram agitados. Após isto, foram centrifugados novamente por 1 minuto e 50s a 12,000 xg. Resultando em uma fase orgânica, na área superior, com o solvente (acetato de etila) e outra, na área inferior, com o meio. Adaptação baseado no artigo de SHAH e KUMAR (2021).

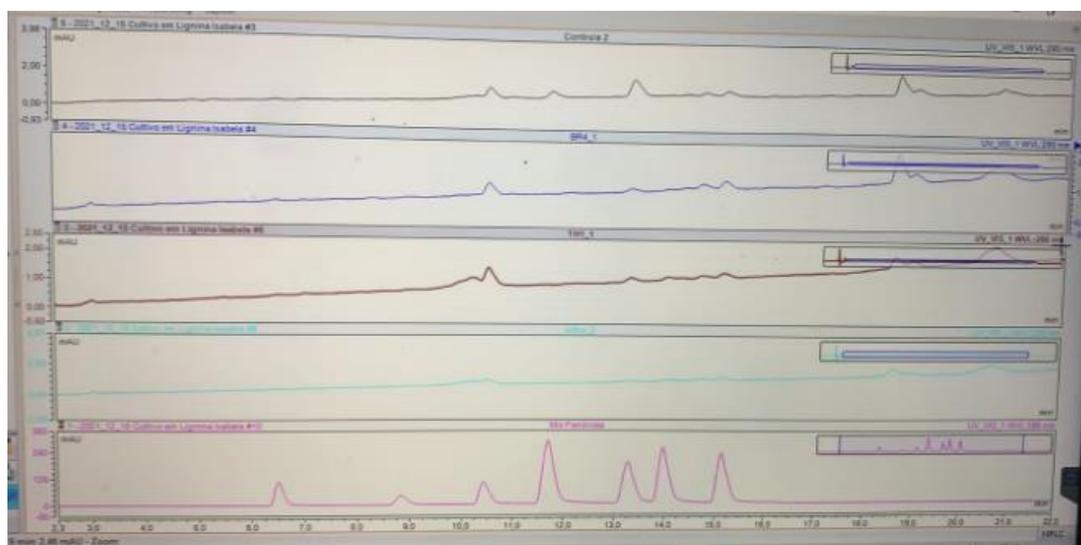
Ao final, pipetou-se a fase com o acetato de etila em outros novos eppendorfs e levados à capela, com as tampas abertas, para secar todo o solvente. O processo de secagem durou 5h30min.

#### 4.8.8 Resultado da análise dos fragmentos da lignina por HPLC

Os cromatogramas das bactérias *BR4*, *TH1* e *Arthrobacter*, respectivamente, apontam o desaparecimento dos picos, indicando a degradação dos compostos.

Este experimento piloto foi importante, pois auxiliou ao estabelecimento de metodologia analítica à licores de lignina.

**Figura 23** - Resultado da separação cromatográfica



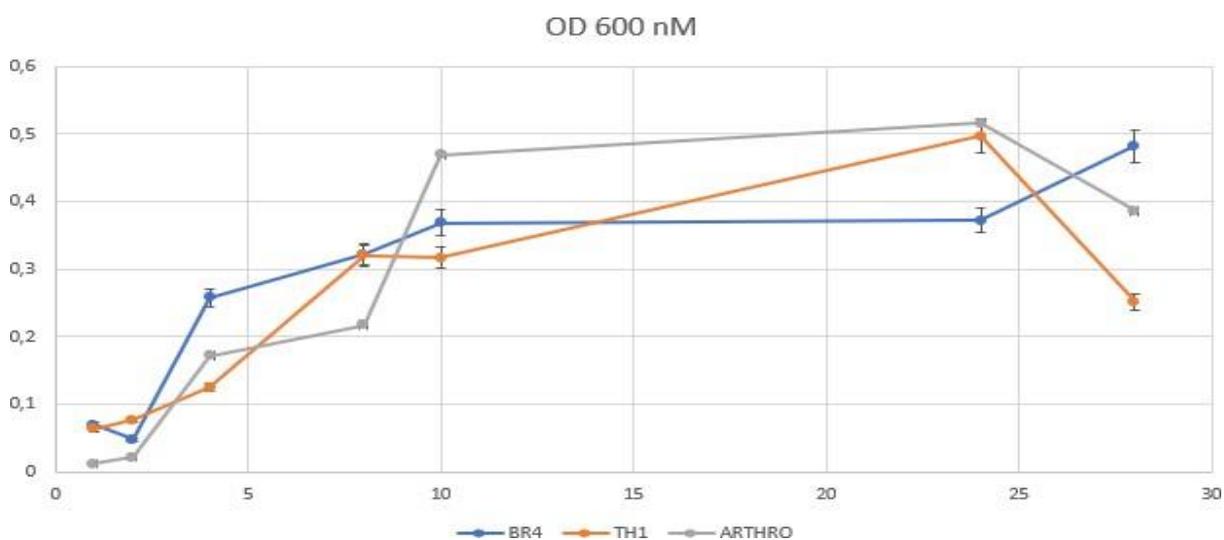
**Legenda:** A linha 1 refere-se ao controle; linha 2, em azul, é o resultado para BR4; linha 3, em vermelho, refere ao resultado da TH1; linha 4 em azul claro o resultado da *Arthrobacter*; e a última linha em rosa é um padrão utilizado para definir cada pico presente. Os eixos Y e X desses cromatogramas correspondem a (unidades de mili-absorbância) por tempo (minutos), respectivamente.

#### 4.8.9 Curva do crescimento das cepas bacterianas em meios com lignina

A fim de identificar as fases de crescimento das bactérias, foi executada uma análise da curva no espectrofotômetro UV/vis onde se define as variações de absorvância por um tempo determinado. A medida a absorvância do meio, o comprimento de foi 600nm.

Um pré cultivo foi realizado com 72h de antecedência. Para a análise, foram usados nove *erlenmeyers* de capacidade 125mL para fazer 60 mL de meio, sendo uma triplicada de cada bactéria, com concentração 0,6mg/mL de lignina *organosolv* no meio mínimo (M9). A inoculação dos meios iniciou às 8h, utilizando 3 mL do pré cultivo em cada *erlenmeyer*. Após o cultivo, as análises seguiram de 1h em 1h e depois a cada 2h. No dia seguinte, houve continuação das análises, começando a partir das 8h da manhã e ocorrendo periodicamente a cada 4h.

**Figura 24** - Gráfico das análises feitas no espectro de UV, apresentando as curvas de crescimento



**Legenda:** Em azul: *BR4*; em laranja: *THI*; em cinza: *ARTHROBACTER*. Os eixos Y e X desses cromatogramas corresponde a unidades de absorvância a ( $OD_{600}$ ) por tempo (horas), respectivamente.

***BR4*:** 8h às 9h (*fase lag*); 9h às 11h (*fase exponencial*); 11h às 13h; (*fase exponencial*); 13h às 15h (*fase exponencial*); 15h às 17h (*fase estacionária*); 17h às 19h (*fase estacionária*); 19h às 8h (*fase exponencial*).

***THI*:** 8h às 9h (*fase lag*); 9h às 11h (*fase exponencial*); 11h às 13h (*fase exponencial*); 13h às 15h (*fase estacionária*); 15h às 17h (*fase lag*); 17h às 19h (*fase lag*); 19h às 8h (*fase de declínio*).

***Arthrobacter*:** 8h às 9h (*fase lag*); 9h às 11h (*fase exponencial*); 11h às 13h (*fase exponencial*); 13h às 15h (*fase exponencial*); 15h às 17h (*fase estacionária*); 17h às 19h (*fase estacionária*); 19h às 8h (*fase de declínio*).

Ao analisar os dados apresentados no gráfico percebe-se que o crescimento dos microrganismos fim de se obter informações da fase exponencial da bactéria, a leitura da absorbância do meio de cultivo (M9), o comprimento de foi 600nm (MADIGAN *et al.*, 2016).

(**BR4**): A curva de crescimento do isolado da cepa (**BR4**) *P. putida* indicou que a bactéria fez um leve declive nos primeiros 60min que foi cultivado, representando a adaptação das células do microrganismo absorvendo este novo meio de cultivo permanecendo em seu período da fase lag, evoluindo subsequente nas 4h seguintes onde a bactéria reagiu na com maior metabolização celular, ou seja, entrando em sua fase exponencial, e subsequente se mantendo na fase estacionária por um período médio de 12h.

(**TH1**): O isolado do bacilo, antes dos testes biomoleculares denominada (**TH1**) *Klebsiella sp*, indicou o início de sua fase exponencial, acontece nos primeiros 60min cultivo, permanecendo assim em média de 4h seguidas, entrando em fase estacionário por mais 1h, aumentando gradualmente em tempo médio de 6h, iniciando posteriormente, sua fase de declive.

(**Arthrobacter**): Esta cepa iniciou sua fase de *lag* nos primeiros 60min, fazendo sua metabolização primária em ascendente exponencial por média de 4h; aumentando gradualmente por mais 5h, entrando em seu período de declive.

#### **4.8.10 Estoque das linhagens das cepas adaptadas ao cultivo em meio de lignina**

O primeiro passo, foi o preparo da solução estoque da “lignina *organosolv*”, na concentração de 0,25mg de pó de lignina por mL de água deionizada, e partir desta solução foi ajustado o pH em 7,5 com adição de solução de hidróxido de sódio com auxílio de pHmetro.

Para o estoque das cepas adaptadas com o cultivo de lignina, foi utilizado como meio o glicerol à 60%, adicionando 4mL do estoque de lignina e 6 mL de glicerol. Esta mistura foi autoclavada e em seguida, distribuídas em tubo criogênico com rosca externa (2 mL) estéreis acrescentando alíquotas de 1mL das cepas que se mostravam mais promissoras neste estudo, sendo elas: *Arthrobacter*, a *Klebsiella sp*, (**TH1**) e *P. putida* (**BR4**), e armazenadas no freezer -80°C.

Em relação às bactérias, inoculou uma colônia em meio contendo lignina (0,25mg/mL) e incubou em *shaker* à 30 °C 100 rpm por 48h. Retirou 1mL dessa cultura e colocou em um tubo criogênico previamente preenchido com a solução de glicerol 60%, e agitado o tubo no vórtex por aproximadamente 20s, em sequência o tubo criogênico foi armazenado no freezer - 80 °C.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises realizadas neste estudo a partir de diversas bactérias isoladas a partir da coleta nos solos, permitiram identificar novas linhagens de estudo e identificações de microrganismos, as cepas pertencentes ao gênero *P. putida* apresentaram maior destaque por sua eficiência para a produção de PHA. As linhagens estudadas nesta pesquisa confirmam o quanto esta cepa é produtora. Exemplificando as cepas que foram denominadas: BR2, BR4 pois estas foram confirmadas que também eram pertencentes ao gênero.

De acordo com os resultados obtidos, pode se afirmar que foram isoladas linhagens de microrganismos identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, bem como o destaque de diversas bactérias isoladas de solos apresentam eficiência para a produção de PHA, como foi demonstrado nesta pesquisa, os dois isolados foram capazes de produzir altos teores de polímero a partir de fontes de carbono utilizadas como a glicose e o glicerol.

Os meios de cultura utilizados foram assimilados pelos microrganismos testados, compreendendo a preferência pelo consumo de glicerol como fonte de carbono para a produção de PHA, enquanto o melhor corante foi o *Nile Blue A*, entretanto, outros fatores podem ser considerados à busca pelo aumento nesta produção como, por exemplo, deve colocar-se que os elementos que podem induzir estresse ao microrganismo produtor, com alta capacidade. O cálculo médio de acúmulo neste estudo, foi de 78% polímeros em seu peso seco.

A caracterização química-física por espectro UV-vis a partir do ensaio ácido crotônico convertido em biocrotônico com a cepa (BR4) *P. putida*, atingiu o pico determinado de hidrolização conforme literatura referenciais, o que confirma que as condições de cultivos em e acréscimo de substratos de carbono fornecidos foram adequadas

O espectro de FTIR representa o trecho característico de monômeros, os resultados confirmaram a produção de PHA biogênicos extraídos na presente pesquisa, sendo comparável com o espectro de FTIR para os polímeros de PHA.

As resinas de PHB no estudo confirmaram a capacidade de produzir embalagens a partir da resina de PHB, sem necessidade de investimento em equipamentos operacionais específicos, viabilizando o desenvolvimento de biopolímeros, pois sua aplicação é um nicho amplo crescente.

Em relação ao uso de lignina comercial como fonte de carbono o estudo confirmou a possibilidade do acúmulo de PHA na linhagem da (BR4) *P. putida*, em meios contendo glicerol e sacarose como fonte de carbono. Se mostrando favorável com as bactérias testadas, realizando

aumento gradativo dessas concentrações, adaptando-as ao ambiente, tornando favorável o consumo da lignina presente.

### **5.1 Contribuições**

O bioplástico desenvolvido a partir de PHA seria um substituto ideal de plásticos convencionais, não só devido sua descartabilidade rápida, e sim por sua rápida capacidade de decomposição no meio ambiente, sem deixar resíduos tóxicos.

Outras atividades foram realizadas envolvendo a organização e o funcionamento do laboratório. Primeiramente foi realizado a organização geral do inventário, na plataforma digital *QUARTZY*, e a cada aquisição de produtos novos, o inventário era atualizado.

Foram realizadas cotações com diversas empresas e revendedores a fim de auxiliar na compra de reagentes, consumíveis e equipamentos para o laboratório

Também aconteceram atividades e treinamentos com os alunos de graduação e pós-graduação integrantes do laboratório com a intenção de auxiliar nos projetos de pesquisas e para a aprendizagem de técnicas e métodos de pesquisa.

### **5.2 Trabalhos futuros**

O Brasil possui uma grande diversidade climática, o que favorece desenvolvimento de vários microrganismos naturais, permitindo a seleção de várias cepas, por meio de cultivos visando sua capacidade de acúmulo em PHA. Também por meio da celulose que possuem a capacidade de bioconversão em substrato para a matéria-prima.

A produção em larga escala de biopolímeros sustentáveis poderia impulsionar crescimento e desenvolvimento econômico e industrial do país, pois há vasta vantagens em nosso país, por possuímos a maior biodiversidade mundial, bem como capacidade tecnológica para a produção de biopolímeros.

O nosso país está entre os maiores produtores de cana-de-açúcar, reforçando para a importância de investimentos e pesquisa em subprodutos industriais, considerados resíduos, tais como melaços de cana-de-açúcar fermentado, papel, azeites com a utilização de culturas mistas, tendo a capacidade de produção sem a adição de solventes orgânicos. Fator relevante para sugestões de estudos futuros para testagem de outras fontes de carbono, assim como diferentes condições de cultivo para aumentar a produtividade das cepas de trabalho.

Estudos sobre a aplicação da lignina como recurso flexível sustentável como fonte de carbono, devem ser explorados, podendo este recurso ser uma alternativa como recurso de

menor custo, tanto para produção de biopolímeros, bem como o desenvolvimento para o combustível sustentável.

Outro fator importante para sugestão é a utilização novos processos de extração do biopolímero por solventes não tóxicos, além de aplicação com extração por solventes com viabilidade mais econômica para a indústria.

### **5.3 Restrições e limitações no projeto**

Conforme embasamento teórico científico nesta pesquisa em conjuntura com as atividades práticas neste projeto, o destaque limitante para a produção dos biopolímeros a partir de PHA em larga escala ainda é o elevado custo, tanto em investimento dos reagentes, solventes orgânicos, gastos energéticos incluindo recursos humanos e tempo na produção.

Porém as vantagens apontadas da produção e uso do PHB, solucionaria questões do meio ambiente, contribuindo também com a geração de empregos no campo e indústria.

De qualquer forma, há uma forte pressão da sociedade e políticas públicas em relação a sustentabilidade, neste sentido há necessidade de realização de pesquisas sobre bioplásticos, pois a substituição dos polímeros convencionais está num futuro bem próximo.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, H. M. L. C. de. Obtenção e identificação de grânulos de polihidroxialcanoatos (PHA) presentes em biomassa de um reator descontínuo sequencial (SBR) com tratamento de águas residuais. 2013. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biológicos) - **Instituto Superior de Engenharia de Coimbra**, Coimbra, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.26/14135>. Acesso em: 14 fev.2020.
- AMORIM, Daniel Penido de Lima. Bioplásticos: benefícios sustentáveis e ascensão da produção. **Revista Metropolitana de Sustentabilidade - RMS**, São Paulo, [2318-3233] v.9, n.1, p. 98-112, Jan./Abr., 2019. Disponível em: <http://orcid.org/0000-0002-2844-3079>. Acesso em: 14 fev.2020.
- ANDLER, Rodrigo; DÍAZ-BARRERA, Alavaro. Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. **Ingenerare**, v. 27, p. 29-36, 2013. Disponível em: [https://handbook.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/TECNOLOGICAS\\_20/Ingenieria%20de%20Medio%20Ambiente/Andler\\_diaz\\_29,36.pdf](https://handbook.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/TECNOLOGICAS_20/Ingenieria%20de%20Medio%20Ambiente/Andler_diaz_29,36.pdf). Acesso em: 03 mar. 2020.
- ANDRADE, Priscyla Lima; BEZERRA, Égla da Silva. Desenvolvimento de bioplásticos à base de cascas de bananas e de ovos. **Editora Científica Digital**. 2021. Cap. 14. Pág. 216-229. DOI: 10.37885/210705567. Acesso em: 20 jan. 2022.
- AZEVEDO, João Lúcio; PAMPHILE, João Alencar; QUECINE- VERDI Maria Carolina; LACAVA, Paulo Teixeira. (org.). Biotecnologia microbiana ambiental. Maringá: **Eduem**, 2018. Disponível em: <http://old.periodicos.uem.br/~eduem/novapagina/?q=node/687>. Acesso em: 05 jan. 2023.
- BASTOS, Valéria Delgado. Biopolímeros e polímeros de matérias-primas renováveis alternativos aos petroquímicos. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 28, p. 201–234, dez. 2007. Disponível em: <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/11834>. Acesso em: 18 jul. 2022.
- BIOPLASTIC. In: BRITANNICA online **encyclopedia**. 2020. Disponível em: <https://www.britannica.com/technology/bioplastic>. Acesso em: 21 fev. 2019.
- BITENCOURT- BELLO, Isabela Cristina *et al.* Microplásticos, seus Impactos no Ambiente e Maneiras Biodegradáveis de Substituição. **Revista Internacional de Ciências**, e-ISSN 2316-7041 Rio de Janeiro, v. 11, n. 02, p. 214 - 228, mai-ago 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.12957/ric.2021.54481>. Acesso em: 03 mar. 2023.
- BRADY, N.; WEIL, R. Elementos da natureza e propriedades dos solos. Ponta Grossa: **Atena**, 2013. v. 3. DOI: 10.22533/at.ed.691182702. Disponível em: <https://sistema.atenaeditora.com.br/catalogo/ebook/elementos-da-natureza-e-propriedades-do-solo-3>. Acesso em:25.nov.2021
- BRASKEM. História: Implantação do Programa de Inovação Braskem (PIB). Liderança regional no mercado de resinas termoplásticas (PE) (PP) (PVC). **Braskem**. 2004. Disponível em: <https://www.braskem.com.br> .Acesso em: jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Técnica de coloração de Gram**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2001. Disponível em: [https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/115\\_03gram.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf). Acesso em: 27 jul. 2021.

BRASIL – ONU. Organização das Nações Unidas no Brasil - Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Complexo Sérgio Vieira de Mello- Setor de Embaixadas 2015. Traduzido pelo **Centro de Informação das Nações Unidas para o Brasil** (UNIC Rio), última edição em 13 de outubro de 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs> . Acesso em: 14 fev. 2020.

BRITO, Gustavo Figueiredo *et al.* Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista eletrônica de materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011. Recuperado em 28 de agosto de 2014. Disponível em: <<http://cct.ufcg.edu.br/revista/index.php/REMAP/article/viewFile/222/204>>. Acesso em: 20 dez. 2021.

BUGNICOURT, Elodie; CINELLI, Patrizia; ALVAREZ, Vera; LAZZERI, Andrea Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging; **Express Polymer Letters**, 8(11), 791–808. DOI: Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>. Acesso em: 18 agosto 2022.

BUENO, Paulo Agenor Alves *et al.* Microbiological indicators of recovery soil quality in a agroforestry system. **Acta Brasiliensis**, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 40-44, may 2018. ISSN 2526-4338. Available at: <<http://www.revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/96>>. doi: <https://doi.org/10.22571/2526-433896>. Acesso em: 08 set 2020.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41 p. 653-673, 1941. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jb.41.5.653-673.1941>. Acesso em: 12 abr. 2020.

CAMPBELL, Colin; LAHERRÈRE, Jean. The end of cheap oil. **Scientific American**, vol. 278, no. 3, 1998, pp. 78–83. *JSTOR*, Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/26057708> Accessed 13 May 2023.

CHANPRATEEP Suchada. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **J Biosci Bioeng**. 2010 Dec;110(6):621-32. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.07.014. Epub 2010 Aug 17. PMID: 20719562.

CHOONUT, Aophat; SANGKHARAK, Kanokphorn. Biofuel from Polyhydroxyalkanoates (PHAs). **ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports**, v. 22, n. 2, p. 1-8, 2019. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/343083324\\_Biofuel\\_from\\_Polyhydroxyalkanoates\\_PHAs](https://www.researchgate.net/publication/343083324_Biofuel_from_Polyhydroxyalkanoates_PHAs). Acesso em: 7 jan.2023.

CORRÊA, Mariana Pacheco. Extração do biopolímero P(3HB) com solvente renovável. 2014. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. 2014. Disponível <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/110069/000950942.pdf?sequence=1>. Acesso em: 12 agosto 2021.

COSTA, Ana Carolina Perini. Análise da substituição de polímeros convencionais por polímeros biodegradáveis– um estudo de caso. 2013. **Centro Universitário Eurípides de**

**Marília**, SP: [s.n.], 2013. 63 f. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11077/1035> . Acesso em: 05 mar. 2020.

COUTINHO, B. C.; MIRANDA, G. B.; SAMPAIO, G. R.; SOUZA, L. B. S. de; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável). **HOLOS**, [S. 1.], v. 3, p. 76–81, 2007. DOI: 10.15628/holos.2004.49. Disponível em: <https://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/49>. Acesso em: 13 maio. 2023.

DALSASSO, Raul Remor. Produção de polihidroxibutirato a partir de vinhaça e melão de cana-de-açúcar por *Cupriavidus necator* DSM 545. 2019. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, **Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos**, Florianópolis, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/211603>. Acesso em: 20 dez. 2021.

DANIMER SCIENTIFIC. A Biotechnology Company. **Danimer scientific**. Disponível em: <<https://danimerscientific.com/>>. Acesso em: jul. 2021.

DE PAULA, Fabrício Coutinho *et al.* (2016). Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated *Pandoraea* sp. **Journal of King Saud University - Science**. 29. 10.1016/j.jksus.2016.07.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.07.002> Acesso em: 15 jan. 2022.

DELGADO, Ana; Cordoba, Alexis. (2015). Polihidroxialcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. **Informador técnico**, v. 79, n. 1, p. 83-101, 2015. DOI: 79. 83. 10.23850/22565035.139. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/316003800\\_Polihidroxialcanoatos\\_PHA's\\_producidos\\_por\\_bacterias\\_y\\_su\\_posible\\_aplicacion\\_a\\_nivel\\_industrial/citation/download](https://www.researchgate.net/publication/316003800_Polihidroxialcanoatos_PHA's_producidos_por_bacterias_y_su_posible_aplicacion_a_nivel_industrial/citation/download) . Acesso em: 15 mar. 2020.

DU, Guocheng; YU, Jian. Metabolic analysis on fatty acid utilization by *Pseudomonas oleovorans*: mcl-poly (3-hydroxyalkanoates) synthesis versus  $\beta$ -oxidation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 325-332.2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00084-5). Acesso em: 18 abr. 2020.

ERBAS, Bahar Celikkol; MEMIS, Selin Arslanhan. An economic valuation of a biotechnology R&D project in a developing economy. **Electron. J. Biotechnol.** Valparaíso, v. 15, n. 3, p.1, mayo 2012. Disponible en <[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S071734582012000300001&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071734582012000300001&lng=es&nrm=iso)>. accedido en 13 mayo 2023.

EUROPEAN BIOPLASTICS. What are bioplastics? **European Bioplastics**. Disponível em: <http://www.european-bioplastics.org/bioplastics> Acesso: 03 jan. 2023

EXXTEND: SOLUÇÃO EM OLIGOS. **Exxtend**. Paulínia, SP. Disponível em: <https://www.exxtend.com.br> Acesso em: 14 dez. 2022.

FARID, Nur Falia Shazana Manja *et al.* Non-solvent-based pretreatment of poly (3-hydroxybutyrate) for improved bio-based crotonic acid production. **RSC Advances**, v. 5, n. 42, p. 33546-33553, 2015. Disponível em: DOI: [10.1039/C5RA03017J](https://doi.org/10.1039/C5RA03017J) . Acesso em: 18 out. 2022.

FERNANDES, Ana Flavia Tonelli. Caracterização fenotípica e molecular de linhagens da *Pseudomonas* spp envolvidas na biodegradação da atrazina. 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2014. Disponível em: doi:10.11606/D.60.2014.tde-09042014-104656. Acesso em: 08 nov. 2021.

FONSECA, Camila Chuluck. **Produção e utilização do biopolímero poli(hidroxibutirato) (PHB) em embalagens alimentícias** (2014). Trabalho de Conclusão de Curso – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013. Disponível em: <https://sistemas.eel.usp.br>. Acesso em 10 nov 2022.

FRANSSON, Åke; BÄCKSTRÖM, Gunnar. Automated differential scanning calorimetry at low temperatures. **International journal of thermophysics**, v. 6, n. 2, p. 165-175, 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00500029>>. Acesso em: 19 out. 2022.

GREEN, Michael R; Hughes, Howard; Sambrook, Joseph; MacCallum, Peter (2012). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 4.ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2012.

GODBOLE, Suchitra (2016). Methods for identification, quantification and characterization of polyhydroxyalkanoates-a review. **International Journal of Bioassays**, v. 5(04) 4957. Disponível em: DOI: 10.21746/ijbio.2016.04.005. [https://www.researchgate.net/publication/304612344\\_Methods\\_for\\_identification\\_quantification\\_and\\_characterization\\_of\\_polyhydroxyalkanoates](https://www.researchgate.net/publication/304612344_Methods_for_identification_quantification_and_characterization_of_polyhydroxyalkanoates) Acesso em 02 fev 2022.

GOMAA, Eman Zakaria. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p.1. Feb 2014. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100020> Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151689132014000100020&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151689132014000100020&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 10 jun. 2021.

GOMES FREITAS, Denize *et al.* Bacteriological water quality in school's drinking fountains and detection antibiotic resistance genes. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 1-5, 2017. Disponível em: DOI: 10.1186/s12941-016-0176-7. Disponível em: <https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-016-0176-7>. Acesso em: 03 mar. 2020.

GONZAGA, Márcia Féldreman Nunes; SQUINA, Fabio Marcio. bioplásticos microbianos em substituição a plásticos derivados do petróleo. Study of industrial market opportunities related to the use of microbial bioplastics to replace petroleum-based plastics. **Brazilian Journal of Development**, 8(5), 33331–33348. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n5-048>. Acesso em: 22 fev. 2023.

GUEDES, Fernanda Pires Domingues Cardoso (2015). Avaliação de Alternativas para Redução do Uso Final de Energia no Setor de Refino de Petróleo Brasileiro e Estimativa de Custos de Abatimento de Emissões de Gases de Efeito Estufa. Dissertação (mestrado). Rio de Janeiro Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, da **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2015. XX, 192 p.: il.; 29,7 cm. Disponível em: <http://www.ppe.ufrj.br/index.php/pt/publicacoes/dissertacoes/2015/362-avaliacao-de>

[alternativas-para-reducao-do-uso-final-de-energia-no-setor-de-refino-de-petroleo-brasileiro-e-estimativa-de-custos-de-abatimento-de-emissoes-de-gases-de-efeito-estufa](#). Acesso em: 03 mar. 2023.

HARDING, Kevin Graham *et al.* Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid using life cycle analysis. **Journal of biotechnology**, v. 130, n. 1, p. 57-66, 2007. Disponível em: Doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.02.012. Acesso em: 09 maio 2021.

HEATHER James M; CHAIN, Benjamim (2015). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, 2016 Jan;107(1):1-8. PMID: 26554401 PMCID: PMC4727787 Disponível em: Doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003PMID. Acesso em: 09 mar. 2021.

HORNINK, Karina Regueira (2015). Isolamento e identificação de bactérias com potencial para realizar biorremediação de cobre. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo (USP)**. 2015. Doi. 10.11606/D.87.2016.tde-07032016-112408. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-07032016-112408/pt-br.php>. Acesso em: 22 nov. 2022.

KHANNA, Shilpi; SRIVASTAVA, Ashok K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607-619, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>. Acesso em: 02 mai. 2020.

KOURMENTZA, Constantina *et al.* Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. **Bioengineering**, v. 4, n. 2, p. 55, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>>. Acesso em: 24 maio 2020.

KUNASUNDARI, Balakrishnan.; SUDESH, Kumar. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620-634, 2011. Corpus ID: 27454770. Disponível em: DOI [10.3144/expresspolymlett.2011.60](https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60). Acesso em: 09 mar. 2020.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M (ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1991. p. 115-175.

LEE, Sang Yup. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960105\)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P). Acesso 14 mai. 2023.

LI, Zibiao; YANG, Jing; LOH, Xian Jun. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. **NPG Asia Materials**, v. 8, n. 4, p. e265-e265, 2016 DOI: 10.1038/am.2016.48. Disponível em <https://www.nature.com/articles/am201648>. Acesso em: 09 nov. 2021.

LÍCIO, Daniela Carolina Pinto (2011). Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase. 2011. Dissertação de Mestrado - **Universidade de São Paulo (USP)**. Instituto de Ciências Biomédicas São Paulo. DOI 10.11606/D.87.2011.tde-09022012-105548 Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-09022012-105548/en.php>. Acesso em: 04 mar. 2020.

LIMA, Milena Tavares. Análise funcional de um consórcio microbiano de solo e prospecção de genes envolvidos na desconstrução da biomassa. 2014. iii, 45 p. Dissertação (mestrado) - **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/121846>>. Acesso em: 22 jun. 2021.

LINGER, Jeffrey G.; Vardon DR, Guarnieri MT, Karp EM, Hunsinger GB, Franden MA, Johnson CW, Chupka G, Strathmann TJ, Pienkos PT, Beckham GT. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U S A. 111(33):12013-8. Doi: 10.1073/pnas.1410657111. Epub 2014 Aug 4. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1410657111>. Acesso em: 09 nov. 2022.

LOPES, Mateus Schreiner Garcez *et al.* PHB biosynthesis in catabolite repression mutant of *Burkholderia sacchari*. **Current microbiology**, v. 63, n. 4, p. 319-326, 2011. Disponível em: DOI <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9981-6>. Acesso em: 19 nov. 2022.

LU, Jingnan, Tappel, Ryan C. and Nomura, Christopher T. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). **Polymer Reviews**, v. 49, n. 3, p. 226-248, 2009. DOI:10.1080/15583720903048243. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15583720903048243>. Acesso em: 09 dez. 2022.

MACHADO Míriam Lúcia Chiquetto. *et al.* Study of mechanical and thermal properties of the polymer Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and PHB/wood flour composites. **Polímeros**. 2010, v. 20, n., p. 65-71. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-14282010005000011>. Acesso em: 20 jul. 2022.

MADIGAN, Michael T. *et al.* *Microbiologia de Brock*. 14. ed. **Porto Alegre**: Artmed, 2016.

MADKOUR, Mohamed H. *et al.* PHA recovery from biomass. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 9, p. 2963-2972, 2013. doi: 10.1021/bm4010244. Epub 2013 Aug 6. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bm4010244>. Acesso em: 12 set 2021.

MALAGÓN MICÁN, Martha Lucía; LÓPEZ LÓPEZ, Sonia Marcela.; MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, Ángela Tatiana. Síntesis de bioplásticos a partir de microorganismos. *Semilleros: Formación Investigativa*. 3(1), 127-135 **Retrieved from**. Disponível em: <http://hdl.handle.net/20.500.11839/6446> .2017. Acesso em: 30 mar. 2021.

MARTINHO, José Manuel Gaspar. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível. **Bol. da Soc.Port. Química**, v. 52, p. 44-46, 1994. Disponível em: [https://web.ist.utl.pt/ist10984/PDF/1994/Quimica%2052\\_44-48\\_1994.pdf](https://web.ist.utl.pt/ist10984/PDF/1994/Quimica%2052_44-48_1994.pdf). Acesso: 28 mar. 2022.

MATIAS, Tális Pereira; Leonel, Juliana; Imperador, Adriana Maria (2022). A systemic environmental impact assessment on tourism in island and coastal ecosystems. **Environmental Development**, v. 44. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2022.100765> Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211464522000677?casa\\_tokn=meVaABCnnSEAAAAA:NiFtFzFj8k2p\\_OgPkWzTbNsF32Skhr3RLLw7M0VOnYek4h462rBvuTsa4E7yizEXKQXdbAnWNP](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211464522000677?casa_tokn=meVaABCnnSEAAAAA:NiFtFzFj8k2p_OgPkWzTbNsF32Skhr3RLLw7M0VOnYek4h462rBvuTsa4E7yizEXKQXdbAnWNP). Acesso em: 13 mar. 2023.

MENDOZA AZABACHE, Mariela Estefani; ZA VALETA RODRÍGUEZ, Michelle Alejandra. A Influencia del tipo de pretratamiento con un líquido iónico o un alcóxido en el rendimiento de azúcares obtenidos por hidrólisis enzimática de la paja de arroz. 2018. Tese (Título Profesional de Ingeniero Químico) - Facultad de Ingeniería Química, **Universidad Nacional de Trujillo**, Trujillo, 2018. Disponível em: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe> <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/10529>. Acesso em: 18 nov. 2022.

MENDONÇA, Tatiane Teixeira *et al* (2013). Exploring the potential of Burkholderia sacchari to produce polyhydroxyalkanoates. **Journal of applied microbiology**, v. 116, n. 4, p. 815-829, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.12406>. Acesso em: 04 mai. 2020.

MIRANDA De Sousa Dias, Miguel, Martin Koller, Dario Puppi, Andrea Morelli, Federica Chiellini, and Gerhart Braunegg. 2017. "Fed-Batch Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate) from Sucrose and 4-Hydroxybutyrate Precursors by Burkholderia sacchari Strain DSM 17165" **Bioengineering** 4, no. 2: 36. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020036>. Acesso em: 05 mar. 2020.

MIRANSARI, Mohammad. Soil microbes and the availability of soil nutrients. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 35, no. 11, p.3075-3084, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1338-2>. Acesso em: 08 mar. 2020.

MIREL Bioplastics by Telles. *In*: SOURCEWATCH. EUA: **Center for Media and Democracy**, 2019. Disponível em: [https://www.sourcewatch.org/index.php?title=Mirel\\_Bioplastics\\_by\\_Telles#Resources](https://www.sourcewatch.org/index.php?title=Mirel_Bioplastics_by_Telles#Resources). Acesso em: 10 jul. 2021.

MOJAVERYAZDI, Farzaneh Sabbagh *et al*. Importance of glucose and pseudomonas in producing degradable plastics. **Jurnal Teknologi**, v. 69, n. 5, 2014. Disponível em: <<https://journals.utm.my/jurnalteknologi/article/view/3194>>. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/42920493.pdf> Acesso em: 10 jun. 2021.

MORAES, Eduardo C.; ALVAREZ, Thabata. M.; PERSINOTI, Gabriela. *F et al*. Análises ômicas de consórcio lignolítico revelam novos genomas e vias envolvidas na modificação e valorização da lignina. **Biotechnol Biofuels.**, v 11, n. 75, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1073-4>. Acesso em: 23 jun 2022.

MOZEJKO-CIESIELSKA, Justina; SZACHERSKA, Karolina; MARCINIAK, Paulina. Pseudomonas species as producers of eco-friendly polyhydroxyalkanoates. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, n. 6, p. 1151-1166, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01422-1>. Acesso em: 28 mar. 2020.

NARAYANKUMAR, Narayankumar, Neethu K. Shaji, Veena gayathri Krishnaswamy Polyhydroxybutyrate production by Bacillus marcorestinum using a Cheaper substrate and its electrospun blends with polymer. **bioRxiv**, p. 680124, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/680124>. Acesso em: 09 mar. 2021.

NEVES, Luis Carlos. Tutorial: Como usar o Espectrofotômetro e como criar uma curva de calibração Abs no Excel. **Apostila de Espectrofotômetro**. 2015. Disponível em: <https://littlebabsi.wordpress.com/tag/espectrofotometro>. Acesso em 04 de março, 2023.

NOVELLI, Laura De Donno; SAYAVEDRA, Sarah Moreno; RENE, Eldon R. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 331, p. 124985, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124985>. Acesso em 04 mar. 2022.

OLIVEIRA, Claudio Fernando de. Production of Polyhydroxybutyrate: Bioprospecting for *Beijerinckia* sp. Collection of bacteria from the Laboratory of Biopolymers CDTec - UFPel. 2010. 96 f. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, 2010. Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br/handle/123456789/1276>. Acesso em 25 maio 2021.

OLIVEIRA-FILHO, Edmar Ramos *et al.* Production of Polyhydroxyalkanoates Copolymers by Recombinant *Pseudomonas* in Plasmid-and Antibiotic-Free Cultures. **Microbial Physiology**, v. 28, n. 5, p. 225-235, 2018. DOI: 10.1159 / 000495752. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000495752>. Acesso em 12 mar. 2020.

PEREIRA, Regina Paula Willemen. Sistemas modelos de formação de lignina utilizando recursos sintéticos e celulares de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden). 2009. 172 f. Tese de Doutorado. **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica - RJ, 2009. Disponível em: <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/tede/489>. Acesso em: 31 jul. 2022.

PIEMONTE, Vincenzo; Fausto Gironi (2011). Bioplastics and Petroleum-based Plastics: Strengths and Weaknesses, Energy Sources Part A: **Energy, recovery and Environmental Effect**, 2011, 33, 1949-1959 v. 33, n. 21, p. 1949-1959, 2011. Disponível em: DOI: [10.1080/15567030903436830](https://doi.org/10.1080/15567030903436830). Acesso em 05 mar. 2020.

PINSKY, V.; KRUGLIANSKAS, I. Inovação tecnológica para a sustentabilidade: aprendizados de sucessos e fracassos. **Estudos avançados**, v. 31, p. 107-126, 2017 Doi.10.1590/s0103-40142017.3190008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=0103-4014&script=sci\\_serial](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=0103-4014&script=sci_serial). Acesso em: 10 jun. 2021.

PINZÓN, Diana Carolina Tusso. 2015 Caracterização do gene PHA sintase de bactérias isoladas a partir de amostras de solo. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo**, 2015. DOI:10.11606/D.42.2015.tde-10122015-085901. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-10122015-085901/en.php>. Acesso em 16 mar. 2020.

**PLÁSTICO biodegradável de açúcar não consegue chegar ao mercado.** 2012. Disponível em: <https://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=plasticobiodegradavel-acucar&id=010175120807#.ZGKFsbnMLrc>. Acesso em 04 abr.2022.

PLEISSNER, D Daniel; VENUS, Joachim. Utilization of protein-rich residues in biotechnological processes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2133-2140, 2016. DOI: 10.1007/s00253-015-7278-6 Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7278-6>. Acesso em 14 mar. 2020.

POP, Mihai Alin *et al.* Structural changes during 3D printing of bioderived and synthetic thermoplastic materials. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 17, p. 47382, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.47382>. Acesso em 04 nov. 2020.

POSSIK, Patrícia Abrão; Corrêa Elisete Marcia. **A análise de DNA por eletroforese.** In: NAOUM, Paulo Cesar. **Eletroforeses: hemoglobinopatias, proteínas séricas, lipoproteínas,**

DNA. São Paulo: Santos, 2010. p. 422-436. Disponível em: [https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/livros/aceso\\_gratuito/Livro\\_completo%20-%20Eletroforese.pdf](https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/livros/aceso_gratuito/Livro_completo%20-%20Eletroforese.pdf). Acesso em 06 jul.2022.

QUINES, Luci K. M *et al.* Métodos de extração de Poli-Hidroxialcanoatos a partir de biomassa bacteriana. **Química Nova**, v. 38, p. 1207-1218, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150129>. Acesso em 22 abr. 2020.

RAJESH, Banu.; Kavitha, S.; Yukesh Kannah, R.; Poornima Devi, T.; Gunasekaran, M.; Kim, Sang-Hyoun; Kumar, Gopalakrishnan (2019). **A review on biopolymer production via lignin valorization**. *Bioresource Technology*, v.- 290 p. 121790 Doi:10.1016/j.biortech.2019.12179. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241931020X>. Acesso em 12 nov. 2022.

RAMSAY, Juliana A. Edward William Berger, Richard A. Voyer, C. Chavarie; Bruce A Ramsay. "Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnology Techniques**, v. 8, n. 8, p. 589-594, 1994. Disponível em: DOI:10.1007/BF00152152. Acesso em 11 nov. 2021.

RAVI, Krithika *et al.* Bacterial conversion of depolymerized Kraft lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, 12, 56 (2019). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1397-8>. Acesso em 04 abr. 2022.

RODRIGUEZ-PEREZ, Santiago *et al.* Challenges of scaling-up PHA production from waste streams: A review. **Journal of environmental management**, v. 205, p. 215-230, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301479717309581> Acesso em 12 jun. 2020.

ROMANO, Luis Henrique. Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos Isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* e Identificação da Produção de Metabólitos de Interesse Biotecnológico. 2014. 136 f. Tese (Doutorado em Multidisciplinar) - **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 2015.134 f. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/277?show=full#:~:text=https%3A//repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/277>. Acesso em 09 mar. 2020.

SALAMEH, Mamdouh G. Oil Crises, Historical Perspective. **Encyclopedia of Energy**, v. 4, p. 633– 648, 2004. In: Petter Henke. IEA and Oil: Track record analysis and assessment of oil supply scenarios in WEO 2000-2013. Uppsala University, Disciplinary Domain of Science and Technology, Earth Sciences, Department of Earth Sciences, Natural Resources and Sustainable Development. (**Globala energisystem**). 2014. Disponível em: <http://uu.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A725939&dswid=-2900>. Acesso em: 03 mar. 2023.

SALGAONKAR, Bhakti.; MANI, K.; BRAGANCA, J. M. Characterization of polyhydroxyalkanoates accumulated by a moderately halophilic salt pan isolate *Bacillus megaterium* strain H16. **Journal of Applied Microbiology**, (2013).114(5), 1347–1356. Disponível em <https://doi.org/10.1111/jam.12135>. Acesso em: 02 abr. 2021.

SAMBROOK, Joseph; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SAMBROOK, Joseph; RUSSEL, Davi William. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3.ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SHAH, Shreya; KUMAR, Anil. Correction to: Production and characterization of polyhydroxyalkanoates from industrial waste using soil bacterial isolates. **Braz J Microbiol.** 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00467-6>. Acesso em 08 maio 2022.

SILVA, Carla Grazieli Azevedo da; COLLINS, Carol H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, p. 665-676, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000400020>. Acesso em: 18 nov. 2022.

SILVA, Rafael Alexandre Neto da. Produção de biopolímeros por culturas microbianas mistas selecionadas. 2014. Mestrado em Engenharia do Ambiente. **Universidade de Aveiro**. 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10773/15800> Acesso em: 14 mar. 2020.

SILVEIRA, Silveira de Farias, S., Maria Costa Siqueira, S., Híade Silva Cristino, J., & Marçal da Rocha, J. (2016). Biopolímeros: uma alternativa para promoção do desenvolvimento sustentável. **Revista geonorte**, 7 (26), 61–77. Recuperado de [www.periodicos.ufam.edu.br/index.php/revista-geonorte/article/view/2759](http://www.periodicos.ufam.edu.br/index.php/revista-geonorte/article/view/2759) . Acesso em: 24 jan 2022.

SINGH, Raghuwar D; SHARMA, Vinod P. Integrated plastic waste management: environmental and improved health approaches. **Procedia Environmental Sciences**, v. 35, p. 692-700, 2016. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.068> . Acesso em: 03 mar. 2022.

SOUZA, Fernando Rocha. 2006 Impacto do Preço do Petróleo na Política Energética Mundial. XI, 160 p. 29,7 cm. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, COPPE (COPPE/UFRJ), M.Sc., Planejamento Energético, 2007. Disponível em: <http://antigo.ppe.ufrj.br/ppp/production/tesis/souzafr.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2023.

SPIEKERMANN, Patricia *et al.* A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Archives of microbiology**, v. 171, n. 2, p. 73-80, 1999. Disponível em: DOI: 10.1007/s00203005068. PMID: 9914303. Acesso em 17 out. 2020.

SPÍNOLA, João Pedro Pestana. Bioplásticos como plataforma de baixo custo para testes de diagnóstico colorimétricos. 2018. Dissertação de Mestrado. **Faculdade de Ciências e Tecnologia** (FCT) 2018. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10362/89830> . Acesso em: 19 out 2020.

STEINBÜCHEL, Alexander; VALENTIN, Henry. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology letters**, v. 128, n. 3, p. 219-228, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00125-O](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00125-O). Acesso em 11 nov. 2022.

STEINBUCHER, Alexander; FUCHTENBUSCH, Bernd. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 10, p. 419-427, 1998. Oct;16(10):419-27. doi: 10.1016/s0167-7799(98)01194-9. PMID: 9807839. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01194-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01194-9). Acesso em 17 nov. 2022.

TAN, Giin-Yu Amy, Chia-Lung Chen, Ling Li, Liya Ge, Lin Wang, Indah Mutiara Ningtyas Razaad, Yanhong Li, Lei Zhao, Yu Mo, and Jing-Yuan Wang. 2014. "Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review" **Polymers** v.6, n.3: p.706-754. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym6030706>. Acesso em 27 mar. 2020.

TANIKKUL, Pinanong; SULLIVAN, Geraint L; SARP, Sarper; PISUTPAISAL, Nipon. Biosynthesis of medium chain length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) from palm oil. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, (2020). 2, 100045 doi10.1016/j.cscee.2020.100045. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666016420300438>. Acesso em 14 abr. 2021.

TELLES, M. R.; SARAN, L. M.; UNÊDA-TREVISOLLI, S. H. Produção, propriedades e aplicações de bioplástico obtido a partir da cana-de-açúcar. **Ciência & Tecnologia**, [S. l.], v. 2, n. 1, 2011. Disponível em: <https://citec.fatecjab.edu.br/index.php/citec/article/view/65>. Acesso em: 16 jan. 2023.

TERRONI, Henrique Cesar *et al.* Liofilização. **Revista Científica Unilago**. 2013. Disponível em: <https://www.terroni.com.br>. Acesso em 11 jun. 2020.

TOLEDO, K. **Plástico biodegradável de açúcar está pronto para escala industrial**. 2012. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/plastico-biodegradavel-de-acucar-esta-pronto-para-escala-industrial/15994/>. Acesso em: 19 jan 2021.

TORRES-CERNA, Carlos Emilio *et al.* Batch cultivation model for biopolymer production. (2016) **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 31, n. 1, p. 89-99, 2017. DOI: 10.15255/CABEQ.2016.952. Disponível em <http://hdl.handle.net/10033/620961> Acesso em:

TORTORA, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. Microbiologia. 10 Ed. **Porto Alegre: Artmed**, 2012.

TRIPATHI, A. D. *et al.* (ed.). Recovery and characterization of polyhydroxyalkanoates. In: Kpiller, M. (ed.). Recent advances in biotechnology: microbial biopolyester production: performance and processing. **Sharjah, U.A.E: Bentham Books**, 2016. v. 2. p. 266-302 Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/310774120\\_Recovery\\_and\\_Characterization\\_of\\_Polyhydroxyalkanoates](https://www.researchgate.net/publication/310774120_Recovery_and_Characterization_of_Polyhydroxyalkanoates). Acesso em 22 jan. 2021.

VELHO, Lea; VELHO, Paulo. The development of a sugar-based plastic in Brazil: The role of government schemes in fostering public sector research-industry relations. In: **Technology Transfer Society Conference**, 2006, Atlanta, Georgia, USA. In Telles, 2011. Produção, propriedades e aplicações de bioplástico obtido a partir da cana-de-açúcar. **Ciência & Tecnologia**, [S. l.], v. 2, n. 1, 2011. Disponível em: <https://citec.fatecjab.edu.br/index.php/citec/article/view/65>. Acesso em: 16 jan. 2023.

VERLINDEN, Rob AJ *et al.* Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1437-1449, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x.PMID: 17578408. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>. Acesso: 18 fev 2020.

VIEGAS, Cristhiene Paiva Rohden *et al.* Estudo da produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) por *Chromobacterium violaceum*. (2005). Dissertação (mestrado) - **Universidade Federal de Santa Catarina**, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. 2005 Disponível em: <http://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/101917>. Acesso em: 14 dez. 2021.

WANG, Y.; CHEN, Guo-Qiang. Polyhydroxyalkanoates: sustainability, production, and industrialization. *In*: TANG, Chuanbing; RYU, Chang Y. Sustainable polymers from biomass. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017. p. 11-33. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9783527340200.ch2>. Acesso em: 12 mar .2023.

WENG, Caihong; PENG, Xiaowei.; HAN, Yejun. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. **Biotechnology for Biofuels** v. 14, n. 1, p. 1-22, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01934-w>. Acesso em: 1 dez. 2022

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *In*: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, Academic Press, New York, 315-322. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>. Acesso em 19 abr. 2020.

ZELLER, Mark Ashton; HUNT, Ryan; JONES, Alexander; SHARMA, Suraj. Bioplastics and their thermoplastic blends from *Spirulina* and *Chlorella* microalgae. **Journal of Applied Polymer Science**, 130(5), 3263–3275. doi:10.1002/app.39559. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.39559> Acesso em: 12 mai. 2020.

## ANEXOS

## Anexo 1 – Resultados do sequenciamento das bactérias

Sequenciamento 16S PP: *P. putida*

```

CACNGACVCACGTGBCGGTKCACTTAKTGCGTTAGCTGCGCVACT-
AAAATCTCAAGGATCCAACGGCTAGMTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC
CTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGG
TGTTCTTCTATMTCTACGCATTTACCAGTACACAGGAAATCCACCACCCTCTACCGTACTCTA
GCTTGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAACAAACCA
CCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTG
GCACAGAGTTAGCCGGTGTATTCTGTGCGGTAACGWCAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGCC
TTCCTCCAACCTAAANGTGCTTT-ACAATCC-GAAGACCTT-CTTCACACAN--
CGCGGGGTGGCTRGATCWBGNCTTYCRYAATKGBCCAATATKCCCCACTGCTGCSTHHGGTAGG
AGKCWKGWCMGWGTCTCRGTTCCAGYSTGRSTGATSMTTCTWCASWGSARWGAYAGAKYRCCG
CCKWGGGKGAGYGRWAWYTCYGYTRWAKMGSTRAWAYGMSTAGAKYTMGKYWWGGWAACW
CCMGYGSCGAAGGCSACCWSCTGKMCYSMYAYTGACACTKACGGYGCKAAASCCTGGGKGRGCA
AACAGGSWTTMGCMTMCCCTTGGTAGYCYWCGCCKKAAACSAKKYMMCTYASCSYTGATCTK
KGARATTTWKYGSSCMSMYAACRAMAATTWAKCTKACGCYGGSRGYACSGCCSCWARKTTAY

```

**Figura 25** - Análise do alinhamento de sequência obtido por BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) visando a identificação da cepa *P. putida*

Pseudomonas putida KT2440 complete genome					
Sequence ID: <a href="#">AE015451.2</a> Length: 6181873 Number of Matches: 7					
Range 1: 171473 to 172236 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <span style="float: right;">▼ Next Match ▲ Previous Match</span>					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
878 bits(475)	0.0	648/772(84%)	8/772(1%)	Plus/Minus	
Query 27		TGCGKTAGATGSGCGATTGAAATCTCGAGGCTTCCAACGACTAGTTGACATCGYTTACGG			86
Sbjct 172236		TGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATCCAACGGCTAGTTGACATCGTTACGG			172177
Query 87		MGCGGCCTACCAGGGKATCTAACTCTGTTGATCCCAAGGTTTTAGCGCCTAAGTGCTAG			146
Sbjct 172176		CGTGGACTACCAGGGTATCTAACTCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAG			172117
Query 147		TATCGGWCCAGGGGACGCCTTCGCCTTGGGTGTTCCCTTCTATATCTACGGRTTTCACC			206
Sbjct 172116		TATCAGTCCAGGTGGTTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTCACC			172057
Query 207		GGTTCRYGGGAAATTCACCACCTCTACCGKACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCWGW			266
Sbjct 172056		GCTACACAGGAAATTCACCACCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGCAGT			171997
Query 267		TCCCAGGTTGAGCTCGGASMTTYMCATACTACTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTAC			326
Sbjct 171996		TCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAACAAACCACCTACGCGCGCTTAC			171937
Query 327		GCCCAGGAATCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGGCRCTGCTGGCRCAGAGT			386
Sbjct 171936		GCCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGGCGCTGCTGGCACAGAGT			171877
Query 387		TAGGCGGTGCTTATTCGTGTCGGTAACGWCAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGCCCTTC			446
Sbjct 171876		TAGGCGGTGCTTATTCGTGTCGGTAACGWCAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGCCCTTC			171817
Query 447		CTCCCAACTTAAAGTGCTTTACWATCYGAAGACCTTCTTCACACACGCGSATGGCTGGA			506
Sbjct 171816		CTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGCGCATGGCTGGA			171757
Query 507		TCAGGCTTTCGCCCATTTGTCCWATATTCCSCACTGCTGCTCSTYGWAGAGTCTGKACCG			566
Sbjct 171756		TCAGGCTTTCGCCCATTTGTCCAAATATTCCCCACTGCTGCTCSCGTTAGGAGTCTGGACCG			171697

Fonte: Elaboração própria através do site BLASTn NCBI

**Sequenciamento 16S BR1: *Mycolicibacterium***

```
TACTTCATGCRGTMGCTACGGCACGGANCCCTTCGAAGGRTACT-  
NCNNCKAGTRSCGAMCGNNNNNGGYGWGGACTACCTGGGTNATCTRNYCCTGTT  
CGYTNSSMYAMGCYTTTCGCTMCTCAGCGTCWRWTACYGMMYATGAKCMYCGSC  
TTCNNNGYCRCCGGTGNAAGCTTTTSCBCCTGATATN---CTGCG-CATWYCACC--  
GCTRCASSRGAATKCCAGTCTMCCCTGNNCAGTACT-  
CTAGTCTGCCCCGTATCGBCCGCMCGCCACAGTTAAGCTGTGAGTTTTTCAC-RAA--  
CAACGCGACAAACCACCTACGAGCTCTTTACGCCSAGTAATTCCGGACAACGCTC  
GGACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGYCCTTCTTCTGC  
ACATAACCGTCACTTGCGCTTCGTCTGTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCC  
GCCATCCCTCACGCGGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATGTRCAGATATTCC  
CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGWATCTCAGTCCNCAGTGT-  
GGCCGGTCACNCCTCTCA-GGACGGCTACCCGTNCGTCGCCTTGGTAGGMTAT-  
TACCCACCAACAAGCTGATAGAGCCTCGGGCCCAGTCACACACGNCGCAAAAG  
CTTTGCGACCTACTSGACCANTGAAGKCCGATGATCATATT-CAGAATTNAG-  
AGCCAGB-ATTCCCAGGKCTTTATCCMMTAAGTGCAGGGCCAGACTCAWCCCA-  
CGTGNNTTACTCASMCTKGKGTKCGYCACTCBAGCTTACCCCNCSAAGGCCSTT  
TCCGTTAWCGA-CTTGYATGTGWASYCTTAAGCACGCCGCCA-GCYKTCNG
```







Figura 29 - Análise no software Geneious Visando a identificação da cepa BR4 – *Pseudomonas* (igual a BR2)

Hit Table	Query Centric View	Distances	Info																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Bit-Score</th> <th>E Value</th> <th>Grade</th> <th>Hit start</th> <th>Hit end</th> <th>Name</th> <th>Description</th> <th>Modified</th> <th>% Pairwise I...</th> <th>% Identical Sites</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>439.505</td><td>3.44e-123</td><td>99.2%</td><td>746</td><td>494</td><td>NR_024707</td><td><i>Pseudomonas savastanoi</i> strain ATCC 13522 16S ribosom...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.4%</td><td>98.4%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>764</td><td>512</td><td>NR_169411</td><td><i>Pseudomonas qingdaonensis</i> strain J3 16S ribosomal RNA...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>771</td><td>519</td><td>NR_157778</td><td><i>Pseudomonas wadenswilerensis</i> strain ID2 16S ribosomal ...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>715</td><td>463</td><td>NR_149823</td><td><i>Pseudomonas versuta</i> strain L10.10 16S ribosomal RNA, p...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>717</td><td>465</td><td>NR_146827</td><td><i>Pseudomonas cerasi</i> strain 58 16S ribosomal RNA, partial ...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>771</td><td>519</td><td>NR_136501</td><td><i>Pseudomonas donghuensis</i> strain HYS 16S ribosomal RNA...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>716</td><td>464</td><td>NR_117826</td><td><i>Pseudomonas corrugata</i> 16S ribosomal RNA, partial sequ...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>718</td><td>466</td><td>NR_117824</td><td><i>Pseudomonas cichorii</i> 16S ribosomal RNA, partial sequence</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>718</td><td>466</td><td>NR_117820</td><td><i>Pseudomonas syringae</i> strain ICMP 3023 16S ribosomal R...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>750</td><td>498</td><td>NR_117186</td><td><i>Pseudomonas marincola</i> strain AB251f 16S ribosomal RNA...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>744</td><td>492</td><td>NR_114192</td><td><i>Pseudomonas japonica</i> NBRC 103040 = DSM 22348 16S ri...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>751</td><td>499</td><td>NR_108461</td><td><i>Pseudomonas asturiensis</i> strain LPPA 221 16S ribosomal R...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>744</td><td>492</td><td>NR_042543</td><td><i>Pseudomonas mohinii</i> strain IpA-2 16S ribosomal RNA, part...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>744</td><td>492</td><td>NR_042542</td><td><i>Pseudomonas moorei</i> strain RW10 16S ribosomal RNA, par...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>719</td><td>467</td><td>NR_041592</td><td><i>Pseudomonas marincola</i> strain KMM 3042 16S ribosomal ...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>746</td><td>494</td><td>NR_028985</td><td><i>Pseudomonas congelans</i> strain P 538/23 16S ribosomal R...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> <tr><td>434.997</td><td>1.46e-121</td><td>99.0%</td><td>746</td><td>494</td><td>NR_025550</td><td><i>Pseudomonas cannabina</i> strain CFBP 2341 16S ribosomal ...</td><td>26 Jul 2021 6:12 pm</td><td>98.0%</td><td>98.0%</td></tr> </tbody> </table>	Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Modified	% Pairwise I...	% Identical Sites	439.505	3.44e-123	99.2%	746	494	NR_024707	<i>Pseudomonas savastanoi</i> strain ATCC 13522 16S ribosom...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.4%	98.4%	434.997	1.46e-121	99.0%	764	512	NR_169411	<i>Pseudomonas qingdaonensis</i> strain J3 16S ribosomal RNA...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	771	519	NR_157778	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i> strain ID2 16S ribosomal ...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	715	463	NR_149823	<i>Pseudomonas versuta</i> strain L10.10 16S ribosomal RNA, p...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	717	465	NR_146827	<i>Pseudomonas cerasi</i> strain 58 16S ribosomal RNA, partial ...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	771	519	NR_136501	<i>Pseudomonas donghuensis</i> strain HYS 16S ribosomal RNA...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	716	464	NR_117826	<i>Pseudomonas corrugata</i> 16S ribosomal RNA, partial sequ...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	718	466	NR_117824	<i>Pseudomonas cichorii</i> 16S ribosomal RNA, partial sequence	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	718	466	NR_117820	<i>Pseudomonas syringae</i> strain ICMP 3023 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	750	498	NR_117186	<i>Pseudomonas marincola</i> strain AB251f 16S ribosomal RNA...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	744	492	NR_114192	<i>Pseudomonas japonica</i> NBRC 103040 = DSM 22348 16S ri...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	751	499	NR_108461	<i>Pseudomonas asturiensis</i> strain LPPA 221 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	744	492	NR_042543	<i>Pseudomonas mohinii</i> strain IpA-2 16S ribosomal RNA, part...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	744	492	NR_042542	<i>Pseudomonas moorei</i> strain RW10 16S ribosomal RNA, par...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	719	467	NR_041592	<i>Pseudomonas marincola</i> strain KMM 3042 16S ribosomal ...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	746	494	NR_028985	<i>Pseudomonas congelans</i> strain P 538/23 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	434.997	1.46e-121	99.0%	746	494	NR_025550	<i>Pseudomonas cannabina</i> strain CFBP 2341 16S ribosomal ...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%	Selected sequences are only summaries		DC																																																																																																																													
Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Modified	% Pairwise I...	% Identical Sites																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
439.505	3.44e-123	99.2%	746	494	NR_024707	<i>Pseudomonas savastanoi</i> strain ATCC 13522 16S ribosom...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.4%	98.4%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	764	512	NR_169411	<i>Pseudomonas qingdaonensis</i> strain J3 16S ribosomal RNA...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	771	519	NR_157778	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i> strain ID2 16S ribosomal ...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	715	463	NR_149823	<i>Pseudomonas versuta</i> strain L10.10 16S ribosomal RNA, p...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	717	465	NR_146827	<i>Pseudomonas cerasi</i> strain 58 16S ribosomal RNA, partial ...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	771	519	NR_136501	<i>Pseudomonas donghuensis</i> strain HYS 16S ribosomal RNA...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	716	464	NR_117826	<i>Pseudomonas corrugata</i> 16S ribosomal RNA, partial sequ...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	718	466	NR_117824	<i>Pseudomonas cichorii</i> 16S ribosomal RNA, partial sequence	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	718	466	NR_117820	<i>Pseudomonas syringae</i> strain ICMP 3023 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	750	498	NR_117186	<i>Pseudomonas marincola</i> strain AB251f 16S ribosomal RNA...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	744	492	NR_114192	<i>Pseudomonas japonica</i> NBRC 103040 = DSM 22348 16S ri...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	751	499	NR_108461	<i>Pseudomonas asturiensis</i> strain LPPA 221 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	744	492	NR_042543	<i>Pseudomonas mohinii</i> strain IpA-2 16S ribosomal RNA, part...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	744	492	NR_042542	<i>Pseudomonas moorei</i> strain RW10 16S ribosomal RNA, par...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	719	467	NR_041592	<i>Pseudomonas marincola</i> strain KMM 3042 16S ribosomal ...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	746	494	NR_028985	<i>Pseudomonas congelans</i> strain P 538/23 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
434.997	1.46e-121	99.0%	746	494	NR_025550	<i>Pseudomonas cannabina</i> strain CFBP 2341 16S ribosomal ...	26 Jul 2021 6:12 pm	98.0%	98.0%																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Sequence View	Virtual Gel	Text View	Download	Info																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>← → ☰ Extract</span> <span>R.C.</span> <span>Translate</span> <span>Add/Edit Annotation</span> <span>Allow Editing</span> <span>Annotate &amp; Predict</span> <span>Save</span> </div> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>10</th> <th>20</th> <th>30</th> <th>40</th> <th>50</th> <th>60</th> <th>70</th> <th>80</th> <th>90</th> <th>100</th> <th>110</th> <th>120</th> <th>130</th> <th>140</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. NR_116172</td> <td>752</td> <td>753</td> <td>743</td> <td>733</td> <td>723</td> <td>713</td> <td>703</td> <td>693</td> <td>683</td> <td>673</td> <td>663</td> <td>653</td> <td>643</td> <td>633</td> <td>623</td> </tr> <tr> <td>2. NR_114226</td> <td>744</td> <td>735</td> <td>725</td> <td>715</td> <td>705</td> <td>695</td> <td>685</td> <td>675</td> <td>665</td> <td>655</td> <td>645</td> <td>635</td> <td>625</td> <td>615</td> <td>605</td> </tr> <tr> <td>3. NR_114224</td> <td>744</td> <td>735</td> <td>725</td> <td>715</td> <td>705</td> <td>695</td> <td>685</td> <td>675</td> <td>665</td> <td>655</td> <td>645</td> <td>635</td> <td>625</td> <td>615</td> <td>605</td> </tr> <tr> <td>4. NR_112073</td> <td>755</td> <td>746</td> <td>736</td> <td>726</td> <td>716</td> <td>706</td> <td>696</td> <td>686</td> <td>676</td> <td>666</td> <td>656</td> <td>646</td> <td>636</td> <td>626</td> <td>616</td> </tr> <tr> <td>5. NR_024910</td> <td>764</td> <td>755</td> <td>745</td> <td>735</td> <td>725</td> <td>715</td> <td>705</td> <td>695</td> <td>685</td> <td>675</td> <td>665</td> <td>655</td> <td>645</td> <td>635</td> <td>625</td> </tr> <tr> <td>6. NR_024662</td> <td>776</td> <td>767</td> <td>757</td> <td>747</td> <td>737</td> <td>727</td> <td>717</td> <td>707</td> <td>697</td> <td>687</td> <td>677</td> <td>667</td> <td>657</td> <td>647</td> <td>637</td> </tr> <tr> <td>7. NR_135703</td> <td>707</td> <td>698</td> <td>688</td> <td>678</td> <td>668</td> <td>658</td> <td>648</td> <td>638</td> <td>628</td> <td>618</td> <td>608</td> <td>598</td> <td>588</td> <td>578</td> <td>568</td> </tr> <tr> <td>8. NR_134794</td> <td>750</td> <td>741</td> <td>731</td> <td>721</td> <td>711</td> <td>701</td> <td>691</td> <td>681</td> <td>671</td> <td>661</td> <td>651</td> <td>641</td> <td>631</td> <td>621</td> <td>611</td> </tr> <tr> <td>9. NR_115336</td> <td>764</td> <td>755</td> <td>745</td> <td>735</td> <td>725</td> <td>715</td> <td>705</td> <td>695</td> <td>685</td> <td>675</td> <td>665</td> <td>655</td> <td>645</td> <td>635</td> <td>625</td> </tr> <tr> <td>10. NR_102854</td> <td>744</td> <td>735</td> <td>725</td> <td>715</td> <td>705</td> <td>695</td> <td>685</td> <td>675</td> <td>665</td> <td>655</td> <td>645</td> <td>635</td> <td>625</td> <td>615</td> <td>605</td> </tr> <tr> <td>11. NR_024924</td> <td>755</td> <td>746</td> <td>736</td> <td>726</td> <td>716</td> <td>706</td> <td>696</td> <td>686</td> <td>676</td> <td>666</td> <td>656</td> <td>646</td> <td>636</td> <td>626</td> <td>616</td> </tr> <tr> <td>12. NR_148251</td> <td>738</td> <td>729</td> <td>719</td> <td>709</td> <td>699</td> <td>689</td> <td>679</td> <td>669</td> <td>659</td> <td>649</td> <td>639</td> <td>629</td> <td>619</td> <td>609</td> <td>599</td> </tr> <tr> <td>13. NR_145562</td> <td>756</td> <td>747</td> <td>737</td> <td>727</td> <td>717</td> <td>707</td> <td>697</td> <td>687</td> <td>677</td> <td>667</td> <td>657</td> <td>647</td> <td>637</td> <td>627</td> <td>617</td> </tr> <tr> <td>14. NR_125523</td> <td>764</td> <td>755</td> <td>745</td> <td>735</td> <td>725</td> <td>715</td> <td>705</td> <td>695</td> <td>685</td> <td>675</td> <td>665</td> <td>655</td> <td>645</td> <td>635</td> <td>625</td> </tr> <tr> <td>15. NR_119340</td> <td>712</td> <td>703</td> <td>693</td> <td>683</td> <td>673</td> <td>663</td> <td>653</td> <td>643</td> <td>633</td> <td>623</td> <td>613</td> <td>603</td> <td>593</td> <td>583</td> <td>573</td> </tr> <tr> <td>16. NR_116992</td> <td>756</td> <td>747</td> <td>737</td> <td>727</td> <td>717</td> <td>707</td> <td>697</td> <td>687</td> <td>677</td> <td>667</td> <td>657</td> <td>647</td> <td>637</td> <td>627</td> <td>617</td> </tr> <tr> <td>17. NR_116904</td> <td>744</td> <td>735</td> <td>725</td> <td>715</td> <td>705</td> <td>695</td> <td>685</td> <td>675</td> <td>665</td> <td>655</td> <td>645</td> <td>635</td> <td>625</td> <td>615</td> <td>605</td> </tr> <tr> <td>18. NR_116763</td> <td>744</td> <td>735</td> <td>725</td> <td>715</td> <td>705</td> <td>695</td> <td>685</td> <td>675</td> <td>665</td> <td>655</td> <td>645</td> <td>635</td> <td>625</td> <td>615</td> <td>605</td> </tr> </tbody> </table>						1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	1. NR_116172	752	753	743	733	723	713	703	693	683	673	663	653	643	633	623	2. NR_114226	744	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605	3. NR_114224	744	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605	4. NR_112073	755	746	736	726	716	706	696	686	676	666	656	646	636	626	616	5. NR_024910	764	755	745	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	6. NR_024662	776	767	757	747	737	727	717	707	697	687	677	667	657	647	637	7. NR_135703	707	698	688	678	668	658	648	638	628	618	608	598	588	578	568	8. NR_134794	750	741	731	721	711	701	691	681	671	661	651	641	631	621	611	9. NR_115336	764	755	745	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	10. NR_102854	744	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605	11. NR_024924	755	746	736	726	716	706	696	686	676	666	656	646	636	626	616	12. NR_148251	738	729	719	709	699	689	679	669	659	649	639	629	619	609	599	13. NR_145562	756	747	737	727	717	707	697	687	677	667	657	647	637	627	617	14. NR_125523	764	755	745	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	15. NR_119340	712	703	693	683	673	663	653	643	633	623	613	603	593	583	573	16. NR_116992	756	747	737	727	717	707	697	687	677	667	657	647	637	627	617	17. NR_116904	744	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605	18. NR_116763	744	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605
	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
1. NR_116172	752	753	743	733	723	713	703	693	683	673	663	653	643	633	623																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
2. NR_114226	744	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
3. NR_114224	744	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
4. NR_112073	755	746	736	726	716	706	696	686	676	666	656	646	636	626	616																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
5. NR_024910	764	755	745	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
6. NR_024662	776	767	757	747	737	727	717	707	697	687	677	667	657	647	637																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
7. NR_135703	707	698	688	678	668	658	648	638	628	618	608	598	588	578	568																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
8. NR_134794	750	741	731	721	711	701	691	681	671	661	651	641	631	621	611																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
9. NR_115336	764	755	745	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
10. NR_102854	744	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
11. NR_024924	755	746	736	726	716	706	696	686	676	666	656	646	636	626	616																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
12. NR_148251	738	729	719	709	699	689	679	669	659	649	639	629	619	609	599																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
13. NR_145562	756	747	737	727	717	707	697	687	677	667	657	647	637	627	617																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
14. NR_125523	764	755	745	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
15. NR_119340	712	703	693	683	673	663	653	643	633	623	613	603	593	583	573																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
16. NR_116992	756	747	737	727	717	707	697	687	677	667	657	647	637	627	617																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
17. NR_116904	744	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
18. NR_116763	744	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605																																																																																																																																																																																																																																																																																																					

Fonte: Elaboração própria através do site BLASTn NCBI

### Sequenciamento 16S BR5: *Pseudomonas* (igual a BR3)

TGACSTTGTAGC-  
GGTATAGCTGCGGACTGATATCTCAAGGATCCCAACGACTAGTCGACATCGTT  
TACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCT  
CAGTGTACAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATC  
TACGCATTTACCCGCTACACAGGAAATTCCACCACCTCTACCGTACTCTAGACA  
GGCAGTTATGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCATCTTAC  
CAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACACCTTC  
GTATTACCGCGMTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCT



**Figura 31** - Análise no *software Geneious* Visando a identificação da cepa BR6 – *Trichosporon* (fungo)

Hit Table	Query Centric View	Distances	Info						
Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Modified	% Pairwise L...	% Identical Sites
✓ 104.98	7.58e-23	61.9%	409	314	NR_073341	Trichosporon asahii CBS 2479 ITS region; from TYPE mat...	26 Jul 2021 6:15 pm	85.1%	78.1%
✓ 100.472	9.23e-22	59.2%	411	316	NR_111353	Trichosporon insectorum ATCC MYA-4361 ITS region; fro...	26 Jul 2021 6:15 pm	84.0%	77.1%
✓ 100.472	9.23e-22	59.2%	409	314	NR_073263	Trichosporon japonicum CBS 8641 ITS region; from TYPE ...	26 Jul 2021 6:15 pm	84.0%	77.1%
✓ 100.472	9.23e-22	59.2%	409	314	NR_073249	Trichosporon coremiiforme CBS 2482 ITS region; from TY...	26 Jul 2021 6:15 pm	84.0%	77.1%
✓ 100.472	9.23e-22	59.2%	409	314	NR_073242	Trichosporon aquatile CBS 4828 ITS region; from TYPE ma...	26 Jul 2021 6:15 pm	84.0%	77.1%
✓ 100.472	9.23e-22	59.2%	409	314	NR_073241	Trichosporon asteroides CBS 2481 ITS region; from TYPE ...	26 Jul 2021 6:15 pm	84.0%	77.1%
✓ 95.963	3.93e-20	36.0%	407	312	NR_073243	Trichosporon inkin CBS 5585 ITS region; from TYPE mate...	26 Jul 2021 6:15 pm	83.0%	76.0%
✓ 92.356	4.78e-19	36.0%	408	314	NR_155872	Trichosporon aquatile CBS 5973 ITS region; from TYPE m...	26 Jul 2021 6:15 pm	83.0%	77.1%
✓ 92.356	4.78e-19	36.0%	406	312	NR_073254	Trichosporon ovoides CBS 7556 ITS region; from TYPE m...	26 Jul 2021 6:15 pm	83.0%	76.0%
✓ 83.34	2.48e-16	32.7%	289	346	NR_155872	Trichosporon aquatile CBS 5973 ITS region; from TYPE m...	26 Jul 2021 6:15 pm	91.8%	89.7%
✓ 83.34	2.48e-16	32.7%	291	348	NR_111353	Trichosporon insectorum ATCC MYA-4361 ITS region; fro...	26 Jul 2021 6:15 pm	91.8%	89.7%
✓ 83.34	2.48e-16	32.7%	289	346	NR_073341	Trichosporon asahii CBS 2479 ITS region; from TYPE mat...	26 Jul 2021 6:15 pm	91.8%	89.7%
✓ 83.34	2.48e-16	32.7%	257	314	NR_073334	Trichosporon lactis CBS 9051 ITS region; from TYPE mate...	26 Jul 2021 6:15 pm	91.8%	89.7%
✓ 83.34	2.48e-16	32.7%	256	313	NR_073333	Trichosporon caseorum CBS 9052 ITS region; from TYPE ...	26 Jul 2021 6:15 pm	91.8%	89.7%
✓ 83.34	2.48e-16	32.7%	289	346	NR_073263	Trichosporon japonicum CBS 8641 ITS region; from TYPE ...	26 Jul 2021 6:15 pm	91.8%	89.7%
✓ 83.34	2.48e-16	32.7%	287	344	NR_073254	Trichosporon ovoides CBS 7556 ITS region; from TYPE m...	26 Jul 2021 6:15 pm	91.8%	89.7%
✓ 83.34	2.48e-16	32.7%	289	346	NR_073249	Trichosporon coremiiforme CBS 2482 ITS region; from TY...	26 Jul 2021 6:15 pm	91.8%	89.7%

Selected sequences are only summaries

Sequence View	Virtual Gel	Text View	Download	Info
← → ⊖ Extract	R.C.	Translate	Add/Edit Annotation	Allow Editing
↻ Annotate & Predict	Save			

```

1. NR_073341      1      10      20      30      40      50      60      70
409      400      390      380      370      360      350      340
A G A C A T T A A T G T C A A A C T T G C T A A C T C T T T T A A G G C G A G C G A T C A G A A T C G C A G A C G C C A A A T C C A A T C C A T T A G G ,
2. NR_111353     1      10      20      30      40      50      60      70
411      402      392      382      372      362      352      342
A G A C A T T A A T G T C A A A C T T G C T A A C T C T T T T A A G G C G A G C G A T C A G A G A T C G C A G A C G C C A A A T C C A A T C C A T T A G G ,
3. NR_073263     1      10      20      30      40      50      60      70
409      400      390      380      370      360      350      340
A G A C A T T A A T G T C A A A C T T G C T A A C T C T T T T A A G G C G A G C G A T C A G A G A T C G C A G A C G C C A A A T C C A A T C C A T T A G G ,
4. NR_073249     1      10      20      30      40      50      60      70
409      400      390      380      370      360      350      340
A G A C A T T A A T G T C A A A C T T G C T A A C T C T T T T A A G G C G A G C G A T C A G A G A T C G C A G A C G C C A A A T C C A A T C C A T T A G G ,
5. NR_073242     1      10      20      30      40      50      60      70
409      400      390      380      370      360      350      340
A G A C A T T A A T G T C A A A C T T G C T A A C T C T T T T A A G G C G A G C G A T C A G A G A T C G C A G A C G C C A A A T C C A A T C C A T T A G G ,
6. NR_073241     1      10      20      30      40      50      60      70
407      398      388      378      368      358      348      338
A G A C A T T A A T G T C A A A C T T G C T A A C T C T T T T A A G G C G A G C G A T C A G A G A T C G C A G A C G C C A A A T C C A A T C C A T T A G G ,
7. NR_073243     1      10      20      30      40      50      60      70
408      399      389      379      369      359      349      339
A G A C A T T A A T G T C A A A C T T G C T A A C T C T T T T A A G G C G A G C G A T C A G A G A T C G C A G A C G C C A A A T C C A A T C C A T T A G G ,
8. NR_155872     1      10      20      30      40      50      60      70
406      397      387      377      367      357      347      337
A G A C A T T A A T G T C A A A C T T G C T A A C T C T T T T A A G G C G A G C G A T C A G A G A T C G C A A C G C C A A A T C C A A T C C A T T A G G A ,
9. NR_073254     1      10      20      30      40      50      60      70
289      280      270      260      250      240      230      220
A G A C A T T A A T G T C A A A C T T G C T A A C T C T T T T A A G G C G A G C G A T C A G A G A T C G A A C G C C C A A A T C C A A T C C A T T A G G A ,
10. NR_155872    1      10      20      30      40      50      60      70
407      398      388      378      368      358      348      338
G C A T G C C T G T T T C A G T G T C A T G A A A T C T C A A C C A C T A G G G T T T C C T A A T G G A T T G G A T
291      300      310      320      330      340      348
11. NR_111353    1      10      20      30      40      50      60      70
289      280      270      260      250      240      230      220
G C A T G C C T G T T T C A G T G T C A T G A A A T C T C A A C C A C T A G G G T T T C C T A A T G G A T T G G A T
296      265      275      285      295      305      313
12. NR_073341    1      10      20      30      40      50      60      70
289      280      270      260      250      240      230      220
G C A T G C C T G T T T C A G T G T C A T G A A A T C T C A A C C A C T A G G G T T T C C T A A T G G A T T G G A T
257      266      276      286      296      306      314
13. NR_073334    1      10      20      30      40      50      60      70
289      280      270      260      250      240      230      220
G C A T G C C T G T T T C A G T G T C A T G A A A T C T C A A C C A C T A G G G T T T C C T A A T G G A T T G G A T
296      288      298      308      318      328      338      346
14. NR_073333    1      10      20      30      40      50      60      70
289      280      270      260      250      240      230      220
G C A T G C C T G T T T C A G T G T C A T G A A A T C T C A A C C A C T A G G G T T T C C T A A T G G A T T G G A T
297      296      306      316      326      336      344
15. NR_073263    1      10      20      30      40      50      60      70
289      280      270      260      250      240      230      220
G C A T G C C T G T T T C A G T G T C A T G A A A T C T C A A C C A C T A G G G T T T C C T A A T G G A T T G G A T
289      298      308      318      328      338      346
17. NR_073249    1      10      20      30      40      50      60      70
289      280      270      260      250      240      230      220
G C A T G C C T G T T T C A G T G T C A T G A A A T C T C A A C C A C T A G G G T T T C C T A A T G G A T T G G A T

```

Fonte: Elaboração própria através do *site BLASTn NCBI*

### Sequenciamento 16S BR7: *Gordonia*

```

CGMTATCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCGTTATACCCAGAGCCCGCTTCCCCCG
GGTCCCTCAACCTGCACTTTCCCGCACCCGGATTCCAGTCCCCCTGAGACCCAGCT
CCCCGTATCGCCTGCACGCCTGCAATTGAGTTGCAGAATTTACAGACGACGCGA
CAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAGTAATTCCGGACAACGCTCGCACCCTA
CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTGCTTCTTCTCCAGGTACCGT
CACTTCCGCTTCGTCCCTGGGGGATTAGGTTTACAACCCGAAGGCCCGCCTCCCTC
ACGCGG

```

**Figura 32 - Análise no software Geneious Visando a identificação da cepa BR7 - *Gordonia***

Hit Table	Query Centric View	Distances	Info																						
Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Modified	% Pairwise I...	% Identical Sites																
431.39	2.44e-120	94.7%	749	389	NR_152024	Gordonia hongkongensis strain HKU50 16S ribosomal RNA, ...	26 Jul 2021 6:14 pm	89.3%	89.2%																
431.39	2.44e-120	94.7%	749	389	NR_152023	Gordonia hongkongensis strain HKU50 16S ribosomal RNA, ...	26 Jul 2021 6:14 pm	89.3%	89.2%																
431.39	2.44e-120	94.7%	734	374	NR_146040	Gordonia didemni strain B204 16S ribosomal RNA, partial s...	26 Jul 2021 6:14 pm	89.3%	89.2%																
422.373	1.26e-117	94.4%	747	387	NR_159202	Gordonia phthalatica strain QH-11 16S ribosomal RNA, part...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.8%	88.6%																
422.373	1.26e-117	94.4%	754	394	NR_159081	Gordonia phthalatica strain QH-11 16S ribosomal RNA, com...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.8%	88.6%																
422.373	1.26e-117	94.4%	749	389	NR_152022	Gordonia hongkongensis strain HKU50 16S ribosomal RNA, ...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.8%	88.6%																
422.373	1.26e-117	94.4%	728	368	NR_119121	Gordonia terrae strain ATCC 25594 16S ribosomal RNA, par...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.8%	88.6%																
422.373	1.26e-117	94.4%	700	340	NR_118598	Gordonia terrae strain DSM 43249 16S ribosomal RNA, part...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.8%	88.6%																
422.373	1.26e-117	94.4%	714	354	NR_116859	Gordonia neofelifaecis strain AD-6 16S ribosomal RNA, part...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.8%	88.6%																
422.373	1.26e-117	94.4%	742	382	NR_044120	Gordonia lacunae strain B52 16S ribosomal RNA, partial se...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.8%	88.6%																
422.373	1.26e-117	94.4%	730	370	NR_037022	Gordonia terrae strain 3612 16S ribosomal RNA, partial seq...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.8%	88.6%																
422.373	1.26e-117	94.4%	746	386	NR_028735	Gordonia amicalis strain IEGM 16S ribosomal RNA, partial s...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.8%	88.6%																
422.373	1.26e-117	94.4%	748	388	NR_028734	Gordonia desulfuricans strain 213E 16S ribosomal RNA, par...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.8%	88.6%																
417.864	1.54e-116	94.3%	728	368	NR_119117	Gordonia rubripincta strain ATCC 14352 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.5%	88.4%																
417.864	1.54e-116	94.3%	699	339	NR_118597	Gordonia hydrophobica strain DSM 44015 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.5%	88.4%																
417.864	1.54e-116	94.3%	739	379	NR_104572	Gordonia rubripincta strain N4 16S ribosomal RNA, parti...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.5%	88.4%																
417.864	1.54e-116	94.3%	723	363	NR_104508	Gordonia humi strain CC-12301 16S ribosomal RNA, partial ...	26 Jul 2021 6:14 pm	88.5%	88.4%																

Sequence View	Virtual Gel	Text View	Download	Info																	
1. NR_152024	749	740	730	720	710	700	690	680	670	660	650	640	630	620	610	600	590	580	570	560	550
2. NR_152023	749	740	730	720	710	700	690	680	670	660	650	640	630	620	610	600	590	580	570	560	550
3. NR_146040	734	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605	595	585	575	565	555	545	535
4. NR_159202	747	738	728	718	708	698	688	678	668	658	648	638	628	618	608	598	588	578	568	558	548
5. NR_159081	754	745	735	725	715	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605	595	585	575	565	555
6. NR_152022	749	740	730	720	710	700	690	680	670	660	650	640	630	620	610	600	590	580	570	560	550
7. NR_119121	728	719	709	699	689	679	669	659	649	639	629	619	609	599	589	579	569	559	549	539	529
8. NR_118598	700	691	681	671	661	651	641	631	621	611	601	591	581	571	561	551	541	531	521	511	501
9. NR_116859	714	705	695	685	675	665	655	645	635	625	615	605	595	585	575	565	555	545	535	525	515
10. NR_044120	742	733	723	713	703	693	683	673	663	653	643	633	623	613	603	593	583	573	563	553	543
11. NR_037022	730	721	711	701	691	681	671	661	651	641	631	621	611	601	591	581	571	561	551	541	531
12. NR_028735	746	737	727	717	707	697	687	677	667	657	647	637	627	617	607	597	587	577	567	557	547
13. NR_028734	748	739	729	719	709	699	689	679	669	659	649	639	629	619	609	599	589	579	569	559	549
14. NR_119117	728	719	709	699	689	679	669	659	649	639	629	619	609	599	589	579	569	559	549	539	529
15. NR_118597	699	690	680	670	660	650	640	630	620	610	600	590	580	570	560	550	540	530	520	510	500
16. NR_104572	739	730	720	710	700	690	680	670	660	650	640	630	620	610	600	590	580	570	560	550	540
17. NR_104508	723	714	704	694	684	674	664	654	644	634	624	614	604	594	584	574	564	554	544	534	524
18. NR_104507	729	720	710	700	690	680	670	660	650	640	630	620	610	600	590	580	570	560	550	540	530
19. NR_044445	742	733	723	713	703	693	683	673	663	653	643	633	623	613	603	593	583	573	563	553	543
20. NR_043330	733	724	714	704	694	684	674	664	654	644	634	624	614	604	594	584	574	564	554	544	534
21. NR_026488	739	730	720	710	700	690	680	670	660	650	640	630	620	610	600	590	580	570	560	550	540
22. NR_025468	729	720	710	700	690	680	670	660	650	640	630	620	610	600	590	580	570	560	550	540	530
23. NR_025165	749	740	730	720	710	700	690	680	670	660	650	640	630	620	610	600	590	580	570	560	550
24. NR_026254	732	723	713	703	693	683	673	663	653	643	633	623	613	603	593	583	573	563	553	543	533
25. NR_115020	720	711	701	691	681	671	661	651	641	631	621	611	601	591	581	571	561	551	541	531	521

Fonte: Elaboração própria através do site *BLASTn NCBI*.

**Sequenciamento 16S TH1: *Klebsiella***

```
CACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTT
CGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTA
CCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCCAGGTTGAGC
CCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTA
ATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAG
CCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCGGTGAGGTTATTAACCTCACCGCCTT
CCTCCCCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCASACRCGCGGCNNA
TGGSTGCRTCAKGTCTGSGNNNNTGCCTGATGGWGS GGKATW----
ACTRCTGGATACGGTAGCTAATWCYGCATARYGTCTCAGGACCNNAGTGKGGGA
CCTTCTGGNNTCATGCTCTCAGATGTGCCAGMTAGGGATCRKCKGGTAGGTGAG
--GTAACGGCTCACCTASTMGMYGATCCCTAKCTGG-NNCNTCTGAKAGGATGA---
CCN-AG-----CCACACTGGACCTGMGACRCGATGCAG-
ACTANCTACSGGAGGCAGYAGTGGGGAATATTGCWCAATCAGGCAG---
CGCAGRCATGATKCAGCCRT—
GCCGCGTGTGWGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAA
GGCGGTGAGGTTAATAACCTCACCGATTGACGTTACCCCGCAGAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCC
```

**Figura 33** - Análise no software *Geneious* Visando a identificação da cepa TH1 - *Klebsiella*

Hit Table										
Query Centric View	Distances	Info								
Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Modified	% Pairwise I...	% Identical Sites	
✓	793.867	0	73.2%	784	331	NR_025635	Klebsiella varicola strain F2R9 16S ribosomal RNA...	26 Jul 2021 6:15 pm	98.8%	98.2%
✓	784.85	0	73.0%	826	373	NR_117686	Klebsiella pneumoniae strain DSM 30104 16S ribo...	26 Jul 2021 6:15 pm	98.4%	97.8%
✓	784.85	0	73.0%	826	373	NR_117685	Klebsiella pneumoniae strain DSM 30104 16S ribo...	26 Jul 2021 6:15 pm	98.4%	97.8%
✓	784.85	0	73.0%	826	373	NR_117684	Klebsiella pneumoniae strain DSM 30104 16S ribo...	26 Jul 2021 6:15 pm	98.4%	97.8%
✓	784.85	0	73.0%	820	367	NR_117682	Klebsiella pneumoniae strain DSM 30104 16S ribo...	26 Jul 2021 6:15 pm	98.4%	97.8%
✓	784.85	0	73.0%	804	351	NR_112009	Klebsiella pneumoniae strain JCM1662 16S riboso...	26 Jul 2021 6:15 pm	98.4%	97.8%
✓	782.145	0	72.9%	807	354	NR_119278	Klebsiella pneumoniae strain ATCC 13883 16S ribo...	26 Jul 2021 6:15 pm	98.2%	97.6%
✓	780.342	0	72.8%	821	368	NR_114506	Klebsiella pneumoniae strain ATCC 13883 16S ribo...	26 Jul 2021 6:15 pm	98.1%	97.6%
✓	778.538	0	72.8%	830	376	NR_036794	Klebsiella pneumoniae strain DSM 30104 16S ribo...	26 Jul 2021 6:15 pm	98.1%	97.6%
✓	776.735	0	72.8%	809	356	NR_113240	Klebsiella pneumoniae strain JCM 1662 16S riboso...	26 Jul 2021 6:15 pm	98.0%	97.1%
✓	774.03	0	72.7%	809	356	NR_113702	Klebsiella pneumoniae strain NBRC 14940 16S ribo...	26 Jul 2021 6:15 pm	97.9%	97.1%
✓	773.128	0	72.7%	796	343	NR_114715	Klebsiella pneumoniae strain DSM 30104 16S ribo...	26 Jul 2021 6:15 pm	97.8%	97.1%
✓	771.325	0	72.6%	809	356	NR_134062	Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumon...	26 Jul 2021 6:15 pm	97.7%	97.1%
✓	771.325	0	72.6%	826	373	NR_117683	Klebsiella pneumoniae strain DSM 30104 16S ribo...	26 Jul 2021 6:15 pm	97.7%	97.1%
✓	771.325	0	72.6%	821	368	NR_114507	Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis AT...	26 Jul 2021 6:15 pm	97.7%	97.1%
✓	771.325	0	72.6%	807	354	NR_037084	Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis str...	26 Jul 2021 6:15 pm	97.7%	97.1%
✓	766.816	0	72.5%	809	356	NR_134063	Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoni...	26 Jul 2021 6:15 pm	97.5%	96.9%

Selected sequences are only summaries

Sequence View													
Virtual Gel	Text View	Download	Info										
←	→	Extract	R.C.	Translate	Add/Edit Annotation	Allow Editing	Annotate & Predict	Save					
1. NR_025635	1	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
2. NR_117686	784	765	745	725	705	685	665	645	625	605	585	565	545
3. NR_117685	826	807	787	767	747	727	707	687	667	647	627	607	587
4. NR_117684	826	807	787	767	747	727	707	687	667	647	627	607	587
5. NR_117682	826	807	787	767	747	727	707	687	667	647	627	607	587
6. NR_112009	820	801	781	761	741	721	701	681	661	641	621	601	581
7. NR_119278	804	785	765	745	725	705	685	665	645	625	605	585	565
8. NR_114506	807	788	768	748	728	708	688	668	648	628	608	588	568
9. NR_036794	821	802	782	762	742	722	702	682	662	642	622	602	582
10. NR_113240	830	811	791	771	751	731	711	691	671	651	631	611	591
11. NR_113702	809	790	770	750	730	710	690	670	650	630	610	590	570
12. NR_114715	809	790	770	750	730	710	690	670	650	630	610	590	570
13. NR_134062	796	777	757	737	717	697	677	657	637	617	597	577	557
14. NR_117683	809	790	770	750	730	710	690	670	650	630	610	590	570
15. NR_114507	826	807	787	767	747	727	707	687	667	647	627	607	587
16. NR_037084	821	802	782	762	742	722	702	682	662	642	622	602	582
17. NR_134063	807	788	768	748	728	708	688	668	648	628	608	588	568
18. NR_125539	809	790	770	750	730	710	690	670	650	630	610	590	570
19. NR_041750	795	776	756	736	716	696	676	656	636	616	596	576	556
20. NR_148649	821	802	782	762	742	722	702	682	662	642	622	602	582
21. NR_146667	789	770	750	730	710	690	670	650	630	610	590	570	550
22. NR_119276	818	799	779	759	739	719	699	679	659	639	619	599	579
23. NR_044978	807	788	768	748	728	708	688	668	648	628	608	588	568
24. NR_160476	832	813	793	773	753	733	713	693	673	653	633	613	593

**Fonte:** Elaboração própria através do site *BLASTn NCBI*

**Sequenciamento 16S TH2: *Microbacterium***

GGAATAGGACCCCAACAAGTTCCTCAACGTTTACGGGGTGGACTACCAGGGTAT  
CTAAGCCTGTTTGCTCCCCACCCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCCAGAGA  
TCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAG  
GAATTCCAATCTCCCCTACCGCACTCTAGTCTGCCCCGTACCCACTGCAGGCCCGA  
GGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTAC  
GCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC  
GTAGTTAGCCGGCGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTAA  
AAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGC  
TTTCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTG  
TCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTGCACGCCTT  
GGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCATCCCCAACCGA  
AAAATCTTTCCAAACGCAGACCATGCGGTCACGTACATATCCAGTATTAGACGC  
CGTTTCCAGCGCTTATCCAGAGTCAGGATCA-  
GTGGCGMACGGGTGAGTMACACGTGMGCAANCTGMYCCTGACTCTGGGRYAAG  
CKCTGGAAACGGCGT-  
CTAATACTGGATATGTGACGTGACCGCATGGTCTGCGTTTGGAAAGATTTTTCGG  
TTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGG  
CGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC  
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAG  
CCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTT  
TAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTA  
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG  
CGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCTGCTGTGAAATCCCGAGGCTCAAC  
CTCGGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAAT  
TCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGG  
CAGATCTCTGGGCCGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAG  
GCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCC  
ATTCCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGG

**Figura 34** - Análise no *software Geneious* Visando a identificação da cepa TH2 - *Microbacterium*

Hit Table	Query Centric View	Distances	Info						
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>						
Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Modified	% Pairwise I.	% Identical Sites
1,370.94	0	76.1%	86	861	NR_025548	Microbacterium paraoxydans strain CF36 16S ribos...	26 Jul 2021 6:17 pm	99.3%	98.7%
1,340.29	0	75.7%	69	843	NR_114986	Microbacterium maritipicum strain DSM 12512 16S...	26 Jul 2021 6:17 pm	98.5%	97.9%
1,340.29	0	75.7%	91	865	NR_042351	Microbacterium maritipicum strain DSM 12512 16S...	26 Jul 2021 6:17 pm	98.5%	97.9%
1,336.68	0	75.7%	56	830	NR_044931	Microbacterium oxydans strain DSM 20578 16S ribo...	26 Jul 2021 6:17 pm	98.4%	97.8%
1,326.76	0	75.5%	63	837	NR_026163	Microbacterium testaceum strain DSM 20166 16S r...	26 Jul 2021 6:17 pm	98.1%	97.6%
1,325.86	0	75.5%	69	844	NR_117001	Microbacterium yannicii strain G72 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:17 pm	98.0%	97.4%
1,322.25	0	75.4%	55	830	NR_026437	Microbacterium resistens strain DMMZ 1710 16S ri...	26 Jul 2021 6:17 pm	97.9%	97.3%
1,322.25	0	75.5%	65	839	NR_026162	Microbacterium liquefaciens strain DSM 20638 16S ...	26 Jul 2021 6:17 pm	98.0%	97.4%
1,320.45	0	75.5%	56	830	NR_119269	Microbacterium luteolum strain DSM 20143 16S rib...	26 Jul 2021 6:17 pm	98.0%	97.2%
1,316.84	0	75.3%	82	857	NR_042481	Microbacterium thalassium strain DSM 12511 16S r...	26 Jul 2021 6:17 pm	97.7%	97.2%
1,316.84	0	75.3%	73	848	NR_042262	Microbacterium oleivorans strain BAS69 16S riboso...	26 Jul 2021 6:17 pm	97.7%	97.2%
1,315.04	0	75.5%	72	847	NR_116483	Microbacterium ginsengiterrae strain DCY37 16S ri...	26 Jul 2021 6:17 pm	98.0%	97.4%
1,312.34	0	75.3%	46	821	NR_116502	Microbacterium azadirachtae strain AI-S262 16S rib...	26 Jul 2021 6:17 pm	97.6%	97.0%
1,312.34	0	75.3%	54	829	NR_026468	Microbacterium esteraromaticum strain DSM 8609 ...	26 Jul 2021 6:17 pm	97.6%	97.0%
1,309.63	0	75.3%	67	841	NR_119270	Microbacterium saperdae strain DSM 20169 16S rib...	26 Jul 2021 6:17 pm	97.6%	96.9%
1,307.83	0	75.2%	58	833	NR_117294	Microbacterium radiodurans strain GIMN 1.002 16S...	26 Jul 2021 6:17 pm	97.5%	96.9%
1,307.83	0	75.2%	65	840	NR_044440	Microbacterium insulae strain DS-66 16S ribosomal ...	26 Jul 2021 6:17 pm	97.5%	96.9%

Selected sequences are only summaries

Sequence View	Virtual Gel	Text View	Download	Info													
<input checked="" type="checkbox"/>																	
← → ⊞ Extract	R.C.	Translate	Add/Edit Annotation	Allow Editing													
		Annotate & Predict	Save														
1. NR_025548	1	25	50	75	100	125	150	175	200	225	250	275	300	325	350	375	400
2. NR_114986	86	110	135	160	185	210	235	260	285	310	335	360	385	410	435	460	485
3. NR_042351	69	93	118	143	168	193	218	243	268	293	318	343	368	393	418	443	468
4. NR_044931	91	115	140	165	190	215	240	265	290	315	340	365	390	415	440	465	490
5. NR_026163	56	80	105	130	155	180	205	230	255	280	305	330	355	380	405	430	455
6. NR_117001	63	87	112	137	162	187	212	237	262	287	312	337	362	387	412	437	462
7. NR_026437	69	93	118	143	168	193	218	243	268	293	318	343	368	393	418	443	468
8. NR_026162	55	79	104	129	154	179	204	229	254	279	304	329	354	379	404	429	454
9. NR_119269	65	89	114	139	164	189	214	239	264	289	314	339	364	389	414	439	464
10. NR_042481	56	80	105	130	155	180	205	230	255	280	305	330	355	380	405	430	455
11. NR_042262	82	106	131	156	181	206	231	256	281	306	331	356	381	406	431	456	481
12. NR_116483	73	97	122	147	172	197	222	247	272	297	322	347	372	397	422	447	472
13. NR_116502	46	70	95	120	145	170	195	220	245	270	295	320	345	370	395	420	445
14. NR_026468	54	78	103	128	153	178	203	228	253	278	303	328	353	378	403	428	453
15. NR_119270	67	91	116	141	166	191	216	241	266	291	316	341	366	391	416	441	466
16. NR_117294	58	82	107	132	157	182	207	232	257	282	307	332	357	382	407	432	457
17. NR_044440	65	89	114	139	164	189	214	239	264	289	314	339	364	389	414	439	464
18. NR_025405	63	87	112	137	162	187	212	237	262	287	312	337	362	387	412	437	462
19. NR_024637	47	71	96	121	146	171	196	221	246	271	296	321	346	371	396	421	446
20. NR_024636	50	74	99	124	149	174	199	224	249	274	299	324	349	374	399	424	449
21. NR_042983	50	74	99	124	149	174	199	224	249	274	299	324	349	374	399	424	449
22. NR_135869	36	60	85	110	135	160	185	210	235	260	285	310	335	360	385	410	435
23. NR_158084	71	95	120	145	170	195	220	245	270	295	320	345	370	395	420	445	470
24. NR_044334	83	107	132	157	182	207	232	257	282	307	332	357	382	407	432	457	482

Fonte: Elaboração própria através do *site BLASTn NCBI*.

**Sequenciamento 16S TH3: *Isoptericola***

GGRTCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCTCCACTTCGGG  
 ATAAGCCTTGGAACGGGGTCTAATACCGGATATGAGCCTGCATCGCATGGTGTG  
 GGTGAAAGTTTTTCGGTGGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGG  
 GGTGATGGCCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCC  
 AACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA  
 TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCT  
 TCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAG  
 AAGATGCGSRCCTAACTACGTGCCA-GCAGCCGC--  
 TNAYACSTAGTGCGCAANCGTTNTACGGCAT-N--  
 GGACKACCAGRGTATCKAATCCTGTNNGTCGCGNCN---NNN---  
 TCCCSATGCTTTCGCTC---  
 CTCAGCGTCAGTTGCGGCCCAGAGACYWGMSTKCGCCATCGG-NN-TG---  
 TTCCTCCTGATAKCTGCGCATTSCACCGMTANCACCAGGAATTCCAGTCWCCSMT  
 ACCGCACTCTAGTCT---  
 GCCCGTACCYGATGCWNAGCCCGAGSKTGAGCCTCGGGATTTACACCAGACGC  
 GA-  
 CAGACCGCCTACGAGCTCTTTACGYCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTA  
 CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTA—  
 GCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTGCCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGT  
 TTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCC  
 CATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGT  
 CCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGACGCCTTGGTAGGC  
 CATCACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCATCCCCACCGAAAACTT  
 TCCAACCCACACCATGCGATGCAGGCTCATATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAA  
 GGCTTATCCCGAAGTGGAGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTACCCGTTTCGCCAC  
 TGATCCACCCAGCAAGCTGGGCTTCACCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCC  
 GCCAGCGTTCGTCCTGAGCAG

**Figura 35** - Análise no software *Geneious* Visando a identificação da cepa TH3: *Isoptericola*

Hit Table	Query Centric View	Distances	Info
Bit-Score	E Value	Grade	Hit start Hit end Name Description Modified % Pairwise I... % Identical Sites
1,258.23	0	81.3%	813 1 NR_156060 Krasilnikovella muralis strain T6220-5-2b 16S r... 26 Jul 2021 6:21 pm 94.5% 93.0%
1,257.33	0	81.4%	833 15 NR_151863 Isoptericola cucumis strain AP-38 16S ribosom... 26 Jul 2021 6:21 pm 94.2% 92.7%
1,251.92	0	81.4%	835 15 NR_148257 Isoptericola rhizophila strain BKS 3-46 16S ribo... 26 Jul 2021 6:21 pm 94.1% 92.6%
1,242	0	80.9%	804 1 NR_025439 Isoptericola variabilis strain MX5 16S ribosoma... 26 Jul 2021 6:21 pm 94.4% 93.0%
1,240.2	0	81.2%	836 16 NR_115102 Krasilnikovella flava strain CC 0387 16S riboso... 26 Jul 2021 6:21 pm 93.8% 92.4%
1,230.28	0	80.6%	794 1 NR_117941 Isoptericola nanjingensis strain H17 16S riboso... 26 Jul 2021 6:21 pm 94.7% 93.2%
1,214.05	0	80.0%	798 15 NR_116470 Isoptericola jiangsuensis strain CLG 16S riboso... 26 Jul 2021 6:21 pm 94.5% 93.2%
1,207.74	0	80.7%	813 1 NR_043779 Isoptericola dokdonensis strain DS-3 16S riboso... 26 Jul 2021 6:21 pm 93.2% 91.7%
1,204.13	0	79.9%	801 15 NR_164914 Promicromonospora viridis strain NEAU-JGR1 1... 26 Jul 2021 6:21 pm 94.0% 92.7%
1,196.92	0	79.9%	798 16 NR_029089 Xylanibacterium ulmi strain XIL08 16S ribosom... 26 Jul 2021 6:21 pm 93.9% 92.6%
1,196.02	0	79.8%	801 15 NR_113177 Promicromonospora thailandica strain 57F-02 ... 26 Jul 2021 6:21 pm 93.8% 92.4%
1,193.31	0	80.6%	837 15 NR_116696 Isoptericola chiayiensis strain 06182M-1 16S ri... 26 Jul 2021 6:21 pm 92.6% 91.1%
1,186.1	0	79.6%	777 1 NR_024956 Xylanibacterium pachnodae strain VPCX2 16S r... 26 Jul 2021 6:21 pm 93.9% 92.5%
1,181.59	0	79.6%	801 15 NR_148779 Promicromonospora alba strain 1C-HV12 16S ri... 26 Jul 2021 6:21 pm 93.4% 92.0%
1,179.79	0	79.6%	778 1 NR_169493 Antribacter gilvus strain CFH 30434 16S riboso... 26 Jul 2021 6:21 pm 93.8% 92.4%
1,179.79	0	79.6%	802 16 NR_042622 Promicromonospora kroppenstedtii strain RS16... 26 Jul 2021 6:21 pm 93.4% 92.1%
1,171.67	0	80.1%	810 1 NR_146662 Cellulosimicrobium marinum strain RS-7-4 16S ... 26 Jul 2021 6:21 pm 92.3% 90.8%

Selected sequences are only summa

Sequence View	Virtual Gel	Text View	Download	Info
Extract	R.C.	Translate	Add/Edit Annotation	Allow Editing
1. NR_156060	1	25 789 764 739 714 689 664 639 614 589 564 539 514 489 464 439 414 389		
2. NR_151863	833	809 784 759 734 709 684 659 634 609 584 559 534 509 484 459 434 409		
3. NR_148257	835	811 786 761 736 711 686 661 636 611 586 561 536 511 486 461 436 411		
4. NR_025439	804	780 755 730 705 680 655 630 605 580 555 530 505 480 455 430 405 380		
5. NR_115102	836	812 787 762 737 712 687 662 637 612 587 562 537 512 487 462 437 412		
6. NR_117941	794	770 745 720 695 670 645 620 595 570 545 520 495 470 445 420 395 370		
7. NR_116470	813	788 763 738 713 688 663 638 613 588 563 538 513 488 463 438 413 388		
8. NR_043779	801	777 752 727 702 677 652 627 602 577 552 527 502 477 452 427 402 377		
9. NR_164914	798	774 749 724 699 674 649 624 599 574 549 524 499 474 449 424 399 374		
10. NR_029089	801	777 752 727 702 677 652 627 602 577 552 527 502 477 452 427 402 377		
11. NR_113177	837	813 788 763 738 713 688 663 638 613 588 563 538 513 488 463 438 413 388		
12. NR_116696	777	753 728 703 678 653 628 603 578 553 528 503 478 453 428 403 378 353		
13. NR_024956	801	777 752 727 702 677 652 627 602 577 552 527 502 477 452 427 402 377		
14. NR_148779	778	754 729 704 679 654 629 604 579 554 529 504 479 454 429 404 379 354		
15. NR_169493	778	754 729 704 679 654 629 604 579 554 529 504 479 454 429 404 379 354		
16. NR_042622	802	778 753 728 703 678 653 628 603 578 553 528 503 478 453 428 403 378		
17. NR_146662	810	786 761 736 711 686 661 636 611 586 561 536 511 486 461 436 411 386		
18. NR_126237	823	799 774 749 724 699 674 649 624 599 574 549 524 499 474 449 424 399		
19. NR_109446	799	775 750 725 700 675 650 625 600 575 550 525 500 475 450 425 400 375		
20. NR_074544	803	779 754 729 704 679 654 629 604 579 554 529 504 479 454 429 404 379		
21. NR_136455	782	758 733 708 683 658 633 608 583 558 533 508 483 458 433 408 383 358		
22. NR_041020	819	795 770 745 720 695 670 645 620 595 570 545 520 495 470 445 420 395		
23. NR_114320	790	766 741 716 691 666 641 616 591 566 541 516 491 466 441 416 391 366		
24. NR_119095	815	791 766 741 716 691 666 641 616 591 566 541 516 491 466 441 416 391 366		
25. NR_149077	810	786 761 736 711 686 661 636 611 586 561 536 511 486 461 436 411 386		

Fonte: Elaboração própria através do site *BLASTn NCBI*.

### Sequenciamento IST TH4: *Candida* (fungo)

```
GAGGTCGATTTGGAAGAAGTTTTGGAGTTTGTACCAATGAGTGGAAAAACCTAT
CCATTAGTTTATACTCCGCCTTTCTTTCAAGCAWGCCTGTTTGAGCGTCATYKCTC
--CCTCAAACCTCGGGTTTGRGTGNNAGMGATNACGCTNNNNNAGGYTTGCNN-
TTGAAA-N—
GAAAGGCGGAGTRTAARCTAATGGATAGGTTTTTCCACTCATTGGTACAAACTC
CAAACCTTCTTCAAATTCGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA
GCATATCAATA
```

Figura 36 - Análise no software Geneious Visando a identificação da cepa TH4 – *Candida* (fungo)

Hit Table	Query Centric View	Distances	Info					
Bit-Score	E Value	Grade	Hit start Hit end	Name	Description	Modified	% Pairwise I...	% Identical Sites
289.825	1.10e-78	81.7%	315 511	NR_130673	Candida parapsilosis ATCC 22019 ITS region; from TYPE...	22 Jun 2021 1:59 pm	92.6%	90.3%
269.087	3.60e-72	80.8%	308 503	NR_159741	Candida hyderabadensis NRRL YEAST Y-27953 ITS regio...	22 Jun 2021 1:59 pm	90.8%	88.3%
264.578	4.38e-71	80.1%	346 546	NR_165186	Candida metapsilosis CBS 10907 ITS region; from TYPE ...	22 Jun 2021 1:59 pm	89.4%	87.1%
236.626	2.13e-62	77.3%	284 461	NR_130661	Candida orthopsilosis ATCC 96139 ITS region; from TYP...	22 Jun 2021 1:59 pm	90.3%	87.8%
223.101	1.34e-58	77.4%	288 473	NR_159750	Candida margitis CBS 14175 ITS region; from TYPE mat...	22 Jun 2021 1:59 pm	87.7%	85.3%
209.575	2.96e-54	77.9%	326 513	NR_111471	Candida jiufofengensis ATCC MYA-4593 ITS region; from ...	22 Jun 2021 1:59 pm	86.4%	84.2%
207.772	1.03e-53	78.0%	327 516	NR_132875	Candida cetoniae CBS 12463 ITS region; from TYPE mat...	22 Jun 2021 1:59 pm	85.9%	83.8%
197.854	5.34e-51	77.3%	325 512	NR_111473	Candida pseudojiufofengensis ATCC MYA-4595 ITS regio...	22 Jun 2021 1:59 pm	85.2%	83.3%
188.837	2.77e-48	73.9%	322 525	NR_111722	Candida theae ATCC MYA-4746 ITS region; from TYPE ...	22 Jun 2021 1:59 pm	80.4%	78.2%
171.705	7.43e-43	76.2%	326 521	NR_132909	Nematodospora valgi CBS 12562 ITS region; from TYPE ...	22 Jun 2021 1:59 pm	81.7%	79.9%
158.179	4.69e-39	68.1%	470 328	NR_130673	Candida parapsilosis ATCC 22019 ITS region; from TYPE...	22 Jun 2021 1:59 pm	85.3%	83.4%
143.752	1.03e-34	73.4%	337 543	NR_111472	Candida oxycetoniae ATCC MYA-4594 ITS region; from ...	22 Jun 2021 1:59 pm	77.7%	75.0%
139.244	4.39e-33	63.5%	439 351	NR_130661	Candida orthopsilosis ATCC 96139 ITS region; from TYP...	22 Jun 2021 1:59 pm	96.7%	96.7%
139.244	4.39e-33	73.8%	342 549	NR_111593	Lodderomyces elongisporus ATCC 11503 ITS region; fro...	22 Jun 2021 1:59 pm	76.8%	74.7%
136.539	1.53e-32	66.7%	462 321	NR_159741	Candida hyderabadensis NRRL YEAST Y-27953 ITS regio...	22 Jun 2021 1:59 pm	82.6%	80.8%
135.637	5.35e-32	71.9%	298 488	NR_160326	Lodderomyces beijungensis CBS 14171 ITS region; from ...	22 Jun 2021 1:59 pm	76.7%	74.8%
133.834	1.87e-31	73.1%	323 509	NR_111344	Candida bohiensis ATCC MYA-4363 ITS region; from T...	22 Jun 2021 1:59 pm	76.5%	74.3%
132.932	1.87e-31	61.4%	505 413	NR_165186	Candida metapsilosis CBS 10907 ITS region; from TYPE ...	22 Jun 2021 1:59 pm	92.5%	92.5%
126.62	2.77e-29	73.3%	309 504	NR_111403	Candida chauioidis ATCC MYA-4356 ITS region; from TY...	22 Jun 2021 1:59 pm	75.8%	73.6%
121.21	1.18e-27	72.9%	314 511	NR_151799	Candida gigantensis CBS 9896 ITS region; from TYPE m...	22 Jun 2021 1:59 pm	76.1%	73.8%
116.702	1.44e-26	72.0%	286 495	NR_164020	Candida kantuleensis DMKU XE11 ITS region; from TYP...	22 Jun 2021 1:59 pm	73.3%	71.0%

Selected sequences are only summaries

Sequence View	Virtual Gel	Text View	Download	Info		
← → ↺ Extract	R.C.	Translate	Add/Edit Annotation	Allow Editing	Annotate & Predict	Save
1. NR_130673	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110	315 324 334 344 354 364 374 384 394 404 414 424	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCCCTGGGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGGTTTCCTTGAAAGAAAGCCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTTTCCACTC			
2. NR_159741	315 324 334 344 354 364 374 384 394 404 414 424	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCCCTGGGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGGTTTCCTTGAAAGAAAGCCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTTTCCACTC				
3. NR_165186	284 293 303 313 323 333 343 353 363 373 383 393	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCCCTGGGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGGTTTCCTTGAAAGAAAGCCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTTTCCACTC				
4. NR_130661	288 297 307 317 327 337 347 357 367 377 387 397	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCCCTGGGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGGTTTCCTTGAAAGAAAGCCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTTTCCACTC				
5. NR_159750	326 335 345 355 365 375 385 395 405 415 425 435	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCCCTGGGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGGTTTCCTTGAAAGAAAGCCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTTTCCACTC				
6. NR_111471	327 336 346 356 366 376 386 396 406 416 426 436	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCCCTGGGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGGTTTCCTTGAAAGAAAGCCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTTTCCACTC				
7. NR_132875	325 334 344 354 364 374 384 394 404 414 424 434	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCCCTGGGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGGTTTCCTTGAAAGAAAGCCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTTTCCACTC				
8. NR_111473	322 331 341 351 361 371 381 391 401 411 421 431	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCCCTGGGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGGTTTCCTTGAAAGAAAGCCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTTTCCACTC				
9. NR_111722	326 335 345 355 365 375 385 395 405 415 425 435	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCCCTGGGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGGTTTCCTTGAAAGAAAGCCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTTTCCACTC				
10. NR_132909	470 461 451 441 431 421 411 401 391 381 371 361	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCAATGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGGTTTCCTTGAAAGAAAGCCGGAGTATAAACTAATGGATAGGTTTCAACCACTC				
11. NR_130673	337 346 356 366 376 386 396 406 416 426 436 446	GAGGTCGAAATTTGGAAGAAATTTGGAGTTTGACCAATGAGTGGAAAAAACCATCCATTAGTTTATACCTCCGCTTTCTTCAAGCAACCCGAGGATATCGCTCAACCAACCC				
12. NR_111472	439 430 420 410 400 390 380 370 360 350 340 330	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCCCTAAGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGTTTATGGTTTGGTTGAAAGAAAGAAAGAGATTTGAAACCAATGATTTAGGTAC				
13. NR_130661	342 351 361 371 381 391 401 411 421 431 441 451	GAGGTCGAAATTTGGAAGAAATTTGGAGTTTGACCAATGAGTGGAAAAAACCATCCATTAGTTTATACCTCCGCTTTCTTCAACCA				
14. NR_111593	462 453 443 433 423 413 403 393 383 373 363 353	GCATGCCGTTTGAGCGCTATTTCCTCCCTCAAACCCCTGGGGTTGGTGTGAGCGATACCTGGGTTTCCTTGAAAGTTAGGAGGATTTTATAACAAATGATAGGTTCAACCA				

Fonte: Elaboração própria através do site BLASTn NCBI

Sequenciamento 16S TH5: *Bacillaceae*

CMGTCTCTCGGCSSTRWMTGTATTGTASTKAACGTCGGCACTAAGGGTATCGAA  
 WMCCCTAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC  
 CTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTATAGGCCAGAAAGCCGC  
 CTTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACACCGCTACACGTGGAATT  
 CCGCTTTCCTCTCCTACACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGA  
 GCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGCCAA  
 TAATTCCGGACAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT  
 AGCCGGGGCTTTCGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCTTATTCAAACGGCACT  
 TGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACAATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGC  
 GTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA  
 GGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGCT  
 ACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCAGG  
 CCCATCTGTAAGTGGTAGC--N-----N-N-NT-CNTGCA-N-CGAG-GAGTGATA-G-KC-  
 -NNNG--TT--CNN-  
 GGNNGCTTGTGGATCTAGCGGCCGAACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCT  
 GTAAGACGGGGATAACTSCGGGA-----  
 NAACCGGAGCTAATRCCRGMTAAACCTTTAKCTCGCATGAGCTGAAGTTGAAAG  
 GTGGMGCAAKCTACSWCTTACAG--ATGG-  
 GCCTRCGGSTCAYTAGCTAGTTS GTGAGSTANCNGCTCAMCAAGGCGACGATGCG  
 TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCYMSACTGGNATGACTGAGACACGGC-  
 CCAGACTCCKACGTGAGGCAGCAGTAGGGAA-  
 TCTTCGGCAATGGACGAAAGTYTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGT  
 TTTTCGGATTGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGC  
 GGCACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  
 GCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAAWTTATTGGGCGTAAAGCGCG  
 CGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCSGTGGAGGGT  
 CATTGGAAACTGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCACGTGTAG  
 CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGS  
 YCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCST  
 GRTAGTCCACSCCGTAAACGATGAGTGCTAGGKTTAGGGTTTCGATACCTTTAGT  
 GCCGACGTAAACACATAGCACTCCGCCWRAGAAGTACGGCCCCGCARGGYTRAAA  
 CTCRAKKGAAATKTGSARCGGYA

Figura 37 - Análise no software Geneious Visando a identificação da cepa TH5 - Bacillaceae

Hit Table	Query Centric View	Distances	Info						
Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Modified	% Pairwise I...	% Identical Sites
1,196.92	0	73.0%	102	944	NR_040851	Bacillus mannanilyticus strain AM-001 16S ribosomal RNA, partial s...	26 Jul 2021 6:17 pm	92.5%	90.5%
1,196.92	0	72.9%	76	912	NR_036860	Bacillus horti strain K13 16S ribosomal RNA, partial sequence	26 Jul 2021 6:17 pm	92.7%	90.7%
1,118.47	0	69.7%	890	237	NR_040851	Bacillus mannanilyticus strain AM-001 16S ribosomal RNA, partial s...	26 Jul 2021 6:17 pm	97.9%	97.7%
1,109.46	0	69.6%	854	208	NR_036860	Bacillus horti strain K13 16S ribosomal RNA, partial sequence	26 Jul 2021 6:17 pm	98.1%	97.8%
1,104.95	0	71.7%	68	901	NR_152058	Tepidibacillus decaturrensis strain Z9 16S ribosomal RNA, partial se...	26 Jul 2021 6:17 pm	90.5%	88.5%
1,102.24	0	71.5%	1	828	NR_151903	Tepidibacillus infernus strain MBL-TLP 16S ribosomal RNA, partial s...	26 Jul 2021 6:17 pm	90.5%	88.5%
1,087.82	0	71.5%	74	912	NR_114065	Virgibacillus halodentrificans strain NBRC 102361 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:17 pm	89.9%	88.0%
1,087.82	0	71.5%	86	924	NR_112055	Virgibacillus halodentrificans strain ATCC 49067 16S ribosomal RN...	26 Jul 2021 6:17 pm	89.9%	88.0%
1,086.91	0	71.5%	74	912	NR_042967	Virgibacillus halodentrificans strain DSM 10037 16S ribosomal RN...	26 Jul 2021 6:17 pm	89.8%	88.0%
1,073.39	0	71.3%	69	901	NR_026139	Bacillus pseudofirmus strain DSM 8715 16S ribosomal RNA, partial...	26 Jul 2021 6:17 pm	89.8%	87.9%
1,070.68	0	71.3%	64	895	NR_118833	Bacillus sporothermodurans strain M215 16S ribosomal RNA, parti...	26 Jul 2021 6:17 pm	89.9%	87.9%
1,066.18	0	71.2%	1	834	NR_115933	Bacillus coahuilensis m4-4 16S ribosomal RNA, partial sequence	26 Jul 2021 6:17 pm	89.5%	87.5%
1,065.27	0	71.2%	63	900	NR_025308	Virgibacillus proomii strain LMG 12370 16S ribosomal RNA, partial ...	26 Jul 2021 6:17 pm	89.2%	87.2%
1,064.37	0	71.1%	41	872	NR_159907	Bacillus manuscensis strain Ma50-6 16S ribosomal RNA, partial seq...	26 Jul 2021 6:17 pm	89.4%	87.5%
1,061.67	0	71.1%	84	923	NR_134761	Melghiribacillus thermohalophilus strain Nari2A 16S ribosomal RN...	26 Jul 2021 6:17 pm	89.0%	87.0%
1,061.67	0	71.0%	41	876	NR_134703	Bacillus oleivorans strain J228 16S ribosomal RNA, partial sequen...	26 Jul 2021 6:17 pm	89.3%	87.2%
1,060.77	0	71.1%	71	902	NR_112634	Bacillus smithii strain NBRC 15311 16S ribosomal RNA, partial sequ...	26 Jul 2021 6:17 pm	89.5%	87.5%

Selected sequences are only summaries [Download](#)

Sequence View	Virtual Gel	Text View	Download	Info
← → ↺ Extract	R.C.	Translate	Add/Edit Annotation	Allow Editing
		↺ Annotate & Predict	Save	

Fonte: Elaboração própria através do site BLASTn NCBI

Sequenciamento TH6: *Bacillus*

CGGTCTACTCGGCGCTRWGCTGTATTGTASKKAACGTCGGCACTAAGGGTATCGA  
 AWMCCCTAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT  
 CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTATAGGCCAGAAAGCCG  
 CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAAT  
 TCCGCTTTCCTCTCCTACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTG  
 AGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCCA  
 ATAATTCCGGACAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGGCTGCTGGCACGTAGT  
 TAGCCGGGGCTTTCCTCGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCTTATTCAAACGGCAC  
 TTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACAATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGG  
 CGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGT  
 AGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGC  
 TACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACTTCAGTCGAGCKAGYKAATGMGCSGC  
 AGGNCCWTC--  
 TGKAAGNNTGTGGAGCTAGCGGCGAACGGGTGAGYAACANCKYAKGCGASCTGC  
 CTGTA-  
 AGACGGKAATARCTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGWCAAACCTTTAGCTCG  
 C-NATGAG--NCTGA--AGTTGAAAGGTGGNN-  
 CGCAAGCTACCACTTACAGATGGGCCTGCGSNCG---  
 CAYTAGCTAGACGGTGNAKGTA—  
 ACGGCTACCAAGGCGACRATGCGTAGCCGACCTGAGAAGTGATCGGCCACACT  
 GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGG  
 CAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGA  
 TTGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAAGGCGSCMCCT  
 TGACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT  
 ACGTAGGGGGCAAGCKTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGSSGTT  
 TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCMCGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGG  
 AGACTTGAGTGTAGARAGGAAAGCGGAWTTCACGTGTAGCGTGAAATGCGTAG  
 AGATGTGAGAACMCCAkkGCGAGGCGGCTTTCCTGGCCTWAACCTGACGCTGAGCG  
 CGAAGCGKGGGAGMAACAGGATARWACCTGGTAKCCACCKAACRTGATSTAGT  
 GTAGGKTTTCGWACTTAGKSCRMGTACMATAGCMTCCGCTGGRAKMGSCSCAGKT  
 AAAYWRARAWTTSRSG

Figura 38 - Análise no software Geneious Visando a identificação da cepa TH6 - *Bacillus*

Hit Table									
Query Centric View	Distances	Info							
Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Modified	% Pairwise I...	% Identical Sites
1,065.27	0	70.2%	888	244	NR_040851	Bacillus mannanilyticus strain AM-001 16S riboso...	26 Jul 2021 6:26 pm	96.7%	96.0%
1,060.77	0	70.2%	854	213	NR_036860	Bacillus horti strain K13 16S ribosomal RNA, partia...	26 Jul 2021 6:26 pm	96.8%	96.0%
1,006.66	0	69.2%	845	201	NR_026139	Bacillus pseudofirmus strain DSM 8715 16S ribos...	26 Jul 2021 6:26 pm	94.7%	94.0%
994.041	0	69.0%	850	207	NR_025446	Bacillus halodurans strain DSM 497 16S ribosoma...	26 Jul 2021 6:26 pm	94.4%	93.7%
988.631	0	68.8%	847	213	NR_136775	Bacillus caseinilyticus strain JCM 30246 16S riboso...	26 Jul 2021 6:26 pm	94.6%	93.9%
985.024	0	68.8%	880	242	NR_075008	[Bacillus] selenitireducens MLS10 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:26 pm	94.3%	93.6%
978.712	0	68.7%	771	134	NR_115933	Bacillus coahuilensis m4-4 16S ribosomal RNA, pa...	26 Jul 2021 6:26 pm	94.1%	93.4%
977.811	0	68.6%	875	241	NR_041571	Bacillus polygوني strain YN-1 16S ribosomal RNA, ...	26 Jul 2021 6:26 pm	94.2%	93.6%
977.811	0	68.6%	856	222	NR_026141	[Bacillus] clarkii strain DSM 8720 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:26 pm	94.2%	93.6%
975.105	0	68.7%	772	128	NR_151903	Tepidibacillus infernus strain MBL-TLP 16S riboso...	26 Jul 2021 6:26 pm	93.6%	92.9%
975.105	0	68.6%	865	225	NR_146035	Bacillus lindianensis strain 12-3 16S ribosomal RN...	26 Jul 2021 6:26 pm	93.8%	93.2%
974.204	0	68.7%	837	190	NR_116389	Bacillus marmarensis DSM 21297 strain GMBE 72...	26 Jul 2021 6:26 pm	93.8%	93.1%
974.204	0	68.6%	768	131	NR_115934	Bacillus coahuilensis m4-4 16S ribosomal RNA, pa...	26 Jul 2021 6:26 pm	93.9%	93.3%
973.302	0	68.6%	830	191	NR_159290	Bacillus populi strain FJAT-45347 16S ribosomal R...	26 Jul 2021 6:26 pm	93.8%	93.1%
972.4	0	68.6%	864	226	NR_028620	Bacillus akibai strain 1139 16S ribosomal RNA, par...	26 Jul 2021 6:26 pm	93.9%	93.0%
969.695	0	68.5%	800	163	NR_043083	Bacillus seohaeneensis strain BH724 16S ribosom...	26 Jul 2021 6:26 pm	93.8%	93.1%
968.794	0	68.6%	845	200	NR_152058	Tepidibacillus decaturensis strain Z9 16S ribosom...	26 Jul 2021 6:26 pm	93.5%	92.7%

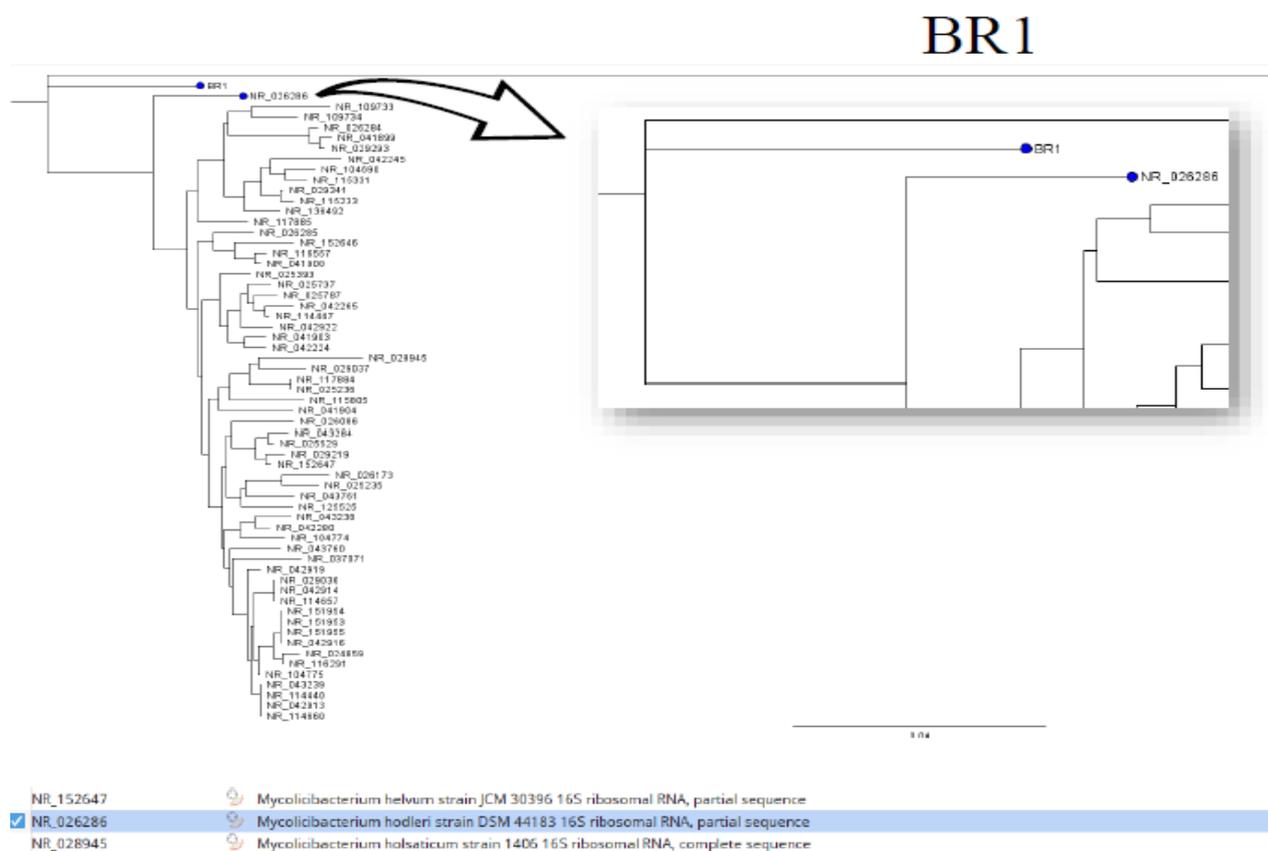
Selected sequences are only summar...

Sequence View																		
Virtual Gel	Text View	Download	Info															
1. NR_040851	1	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340
2. NR_036860	888	869	849	829	809	789	769	749	729	709	689	669	649	629	609	589	569	549
3. NR_026139	854	835	815	795	775	755	735	715	695	675	655	635	615	595	575	555	535	515
4. NR_025446	845	826	806	786	766	746	726	706	686	666	646	626	606	586	566	546	526	506
5. NR_136775	850	831	811	791	771	751	731	711	691	671	651	631	611	591	571	551	531	511
6. NR_075008	847	828	808	788	768	748	728	708	688	668	648	628	608	588	568	548	528	508
7. NR_115933	880	861	841	821	801	781	761	741	721	701	681	661	641	621	601	581	561	541
8. NR_041571	771	752	732	712	692	672	652	632	612	592	572	552	532	512	492	472	452	432
9. NR_026141	875	856	836	816	796	776	756	736	716	696	676	656	636	616	596	576	556	536
10. NR_151903	856	837	817	797	777	757	737	717	697	677	657	637	617	597	577	557	537	517
11. NR_146035	772	753	733	713	693	673	653	633	613	593	573	553	533	513	493	473	453	433
12. NR_116389	865	846	826	806	786	766	746	726	706	686	666	646	626	606	586	566	546	526
13. NR_115934	837	818	798	778	758	738	718	698	678	658	638	618	598	578	558	538	518	498
14. NR_159290	768	749	729	709	689	669	649	629	609	589	569	549	529	509	489	469	449	429
15. NR_028620	830	811	791	771	751	731	711	691	671	651	631	611	591	571	551	531	511	491
16. NR_043083	864	845	825	805	785	765	745	725	705	685	665	645	625	605	585	565	545	525
17. NR_152058	800	781	761	741	721	701	681	661	641	621	601	581	561	541	521	501	481	461
18. NR_114065	845	826	806	786	766	746	726	706	686	666	646	626	606	586	566	546	526	506
19. NR_112055	861	842	822	802	782	762	742	722	702	682	662	642	622	602	582	562	542	522
20. NR_042967	873	854	834	814	794	774	754	734	714	694	674	654	634	614	594	574	554	534
21. NR_026142	861	842	822	802	782	762	742	722	702	682	662	642	622	602	582	562	542	522
22. NR_117286	860	841	821	801	781	761	741	721	701	681	661	641	621	601	581	561	541	521
23. NR_116989	611	592	572	552	532	512	492	472	452	432	412	392	372	352	332	312	292	272
24. NR_115200	836	817	797	777	757	737	717	697	677	657	637	617	597	577	557	537	517	497
25. NR_044704	855	836	816	796	776	756	736	716	696	676	656	636	616	596	576	556	536	516

Fonte: Elaboração própria através do site BLASTn NCBI.

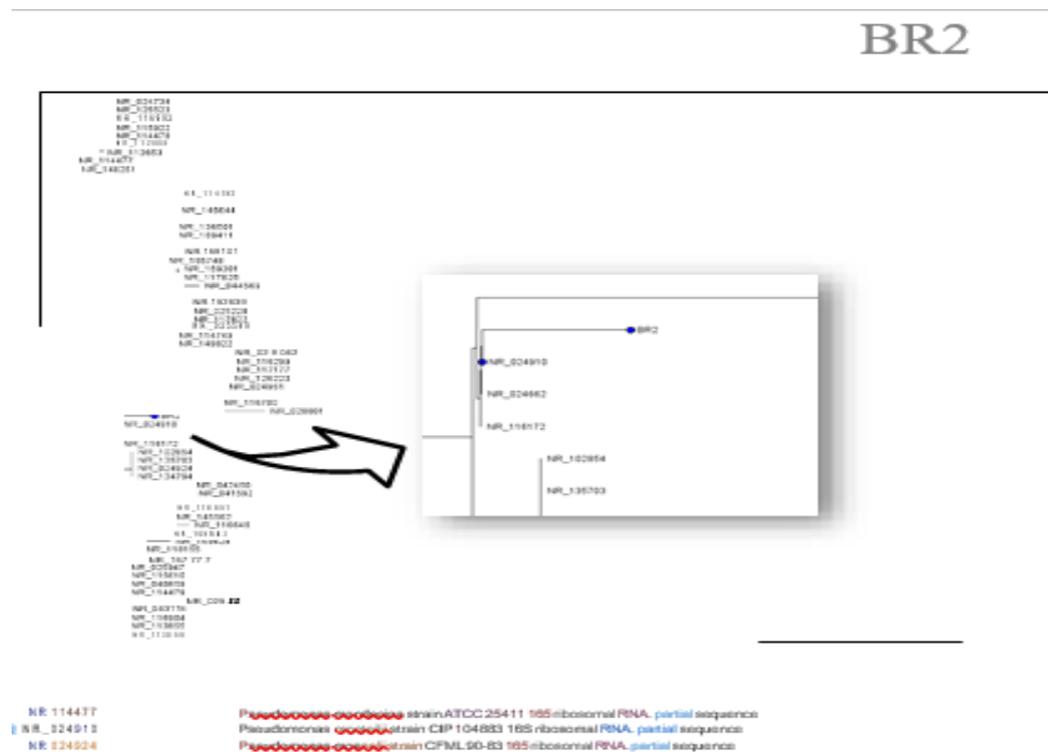
## Anexo 2 – Resultados das árvores filogenéticas do sequenciamento

Figura 39 - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR1



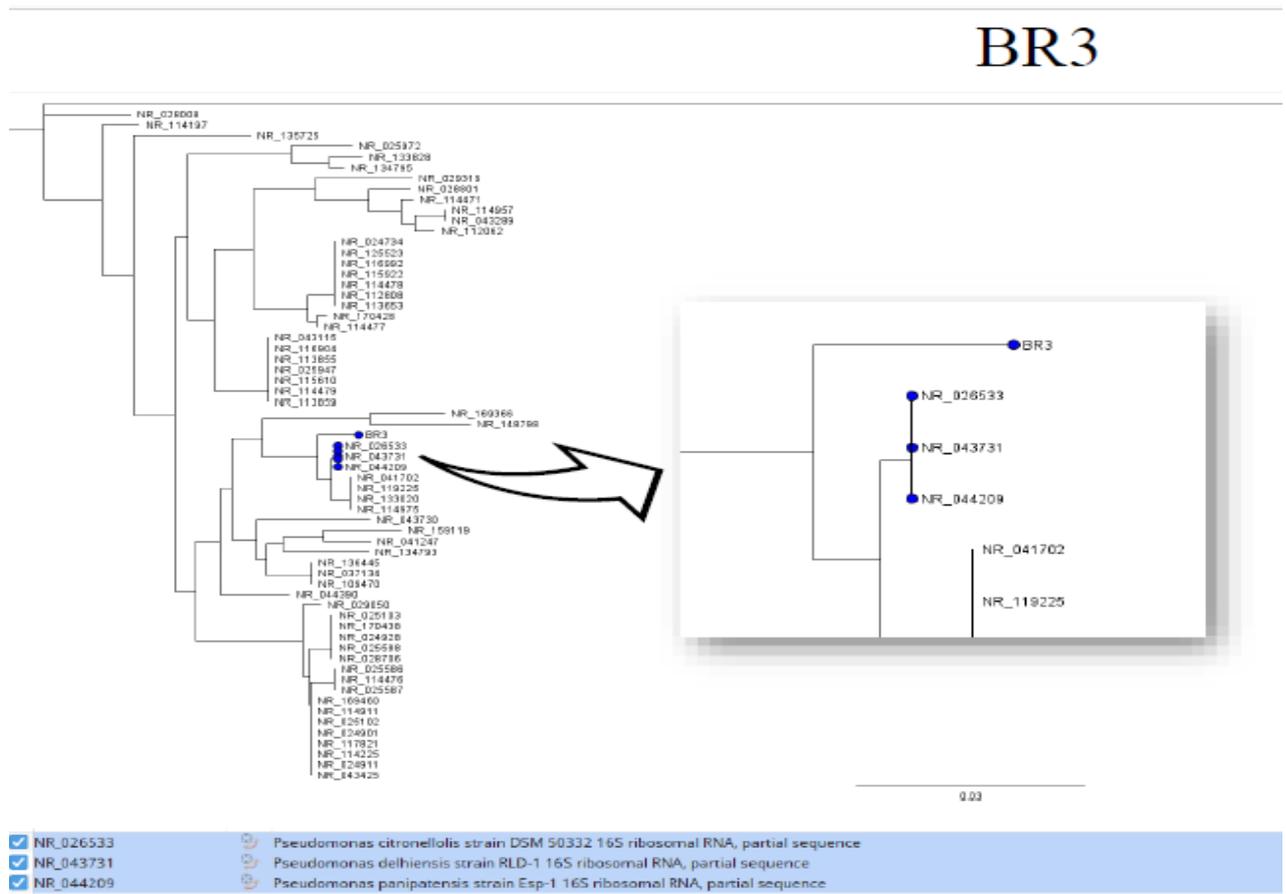
Fonte: Elaboração própria através do *site BLASTn NCBI*.

Figura 40 - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR2



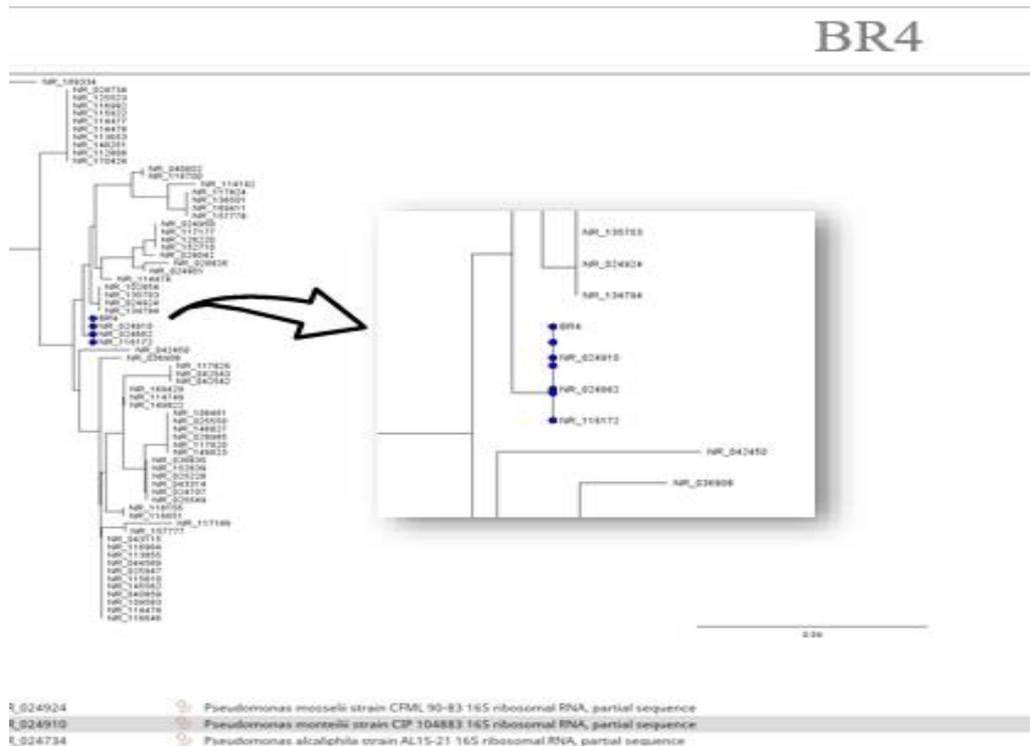
Fonte: Elaboração própria através do site *BLASTn NCBI*.

**Figura 41** - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR3



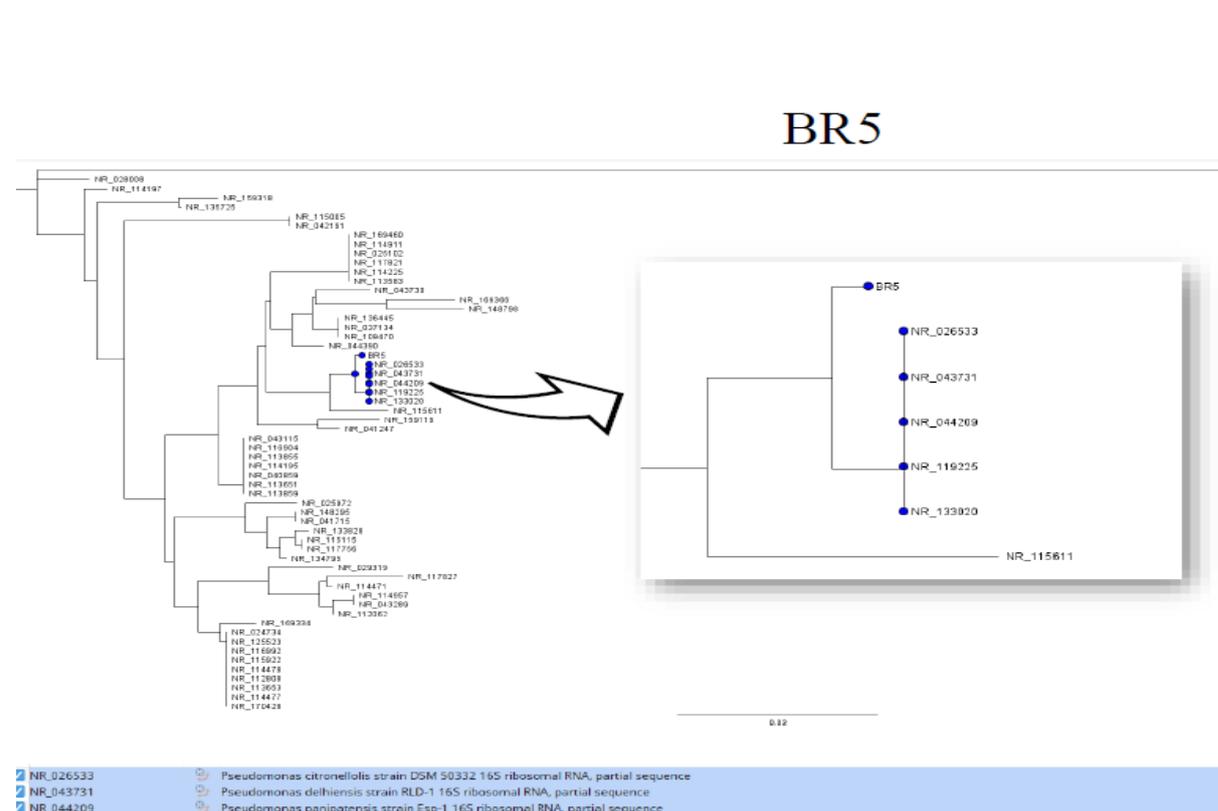
**Fonte:** Elaboração própria através do *site BLASTn NCBI*.

Figura 42 - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR4

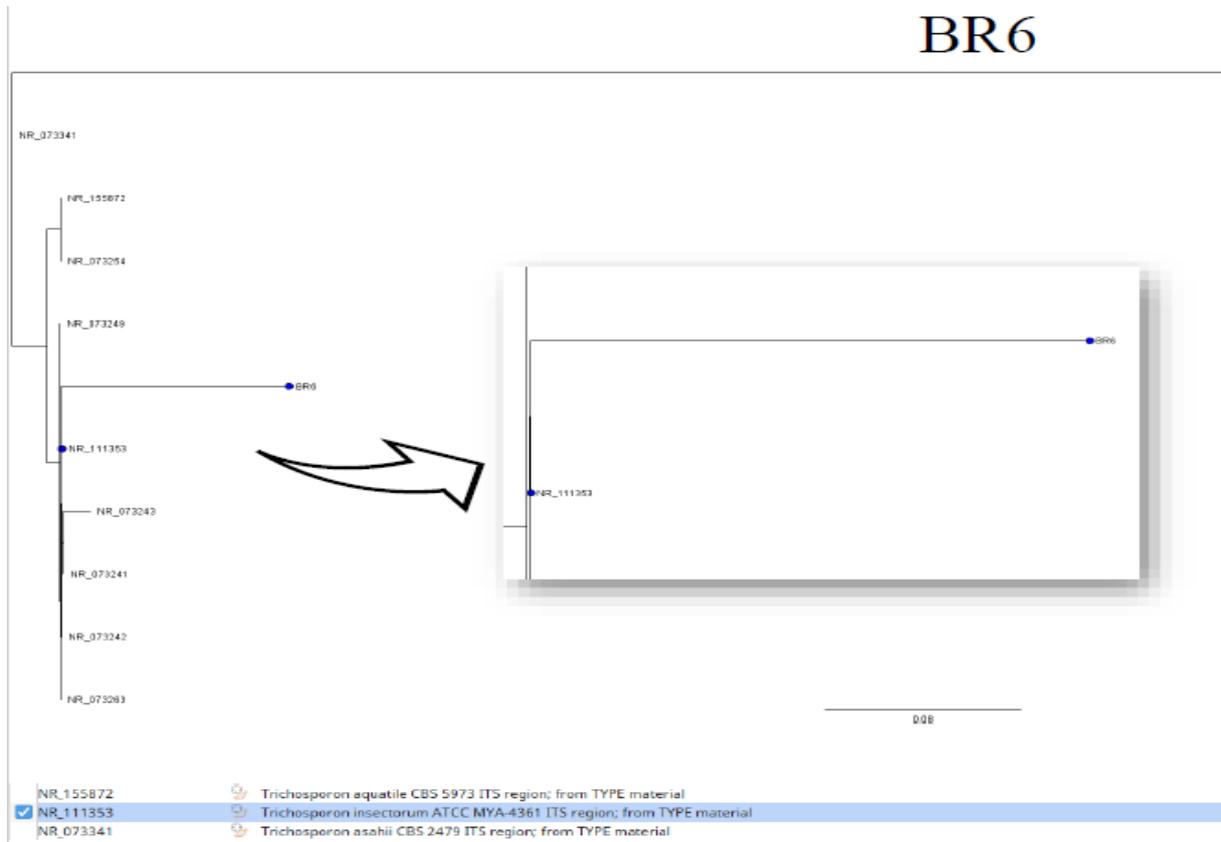


Fonte: Elaboração própria através do site BLASTn NCBI.

Figura 43 - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR5



**Figura 44** - Resultado do sequenciamento - árvore filogenética BR6



**Fonte:** Elaboração própria através do *site BLASTn NCBI*.

### **Anexo 3 - Embalagens produzidas por PHB**

Embalagem é um recipiente destinado a contenção, armazenamento, conservação e transporte de um produto. Os requisitos técnicos relacionados as propriedades das embalagens dependem do tipo de produto a ser embalado, associado às necessidades adequadas para este fim. A matéria-prima selecionada para o desenvolvimento de embalagens para fins alimentícios ou farmacêuticos deverá seguir os critérios de protocolos da Anvisa, constando a garantia e controle de qualidade devidamente assinada (BRASIL, 2010; FONSECA, 2014).

O PHB é um material que possui características físicas de rigidez, instabilidade térmica a alto ponto de fusão ( $T_f = 180\text{ °C}$ ) e temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de cerca de  $5\text{ °C}$ , possui alta cristalinidade e apresentam resistências a impactos e tração. Sendo estas características muito semelhantes à de polímeros convencionais, estas embalagens podem ser utilizadas em micro-ondas e freezer (FONSECA, 2014; COSTA, 2013). Além disso, tais materiais podem ser moldados por injetora, sopros, rotomoldagem, termoprensagem e extrusão para fabricação de peças termoformadas, como tampas de frascos, brinquedos, canetas, frascos de alimentos ou para produtos cosméticos. Para a indústria automobilística pode ser aplicado por métodos em extrusora (PLÁSTICO, 2012; COSTA, 2013).

Kloss (2007) em sua tese, apresenta uma relação de produtores industriais de polímeros biodegradáveis, aplicações e materiais envolvidos na produção. (1) Bayer produzidas de Poliéster de amida com aplicações em filmes e chapas; (2) Biotec. Desenvolvido a partir de amido bioplástico, também citada nas mesmas aplicações da Bayer, (3) Novamont, utilizando Amido /policaprolactona (PCL), sendo aplicado na função de manta protetora em vasos/plantações; (4) PHB Industrial que utilizam os processos de produção de Polihidroxibutirato (PHB) a partir de bactérias, sendo os produtos resultantes, utilizados em embalagens, tubetes de reflorestamento, dentre outras aplicações produzidas por método operacional através de injeção, não deixando de ressaltar a empresa (5) Basf que utiliza como material a combinação da Ecoflex com combinado de um polímero vegetal a base de milho, injetando a matéria-prima resultante em sacolas plásticas em frascos para cosméticos.

A usina de açúcar e álcool (Coopersucar), que é destaque no Brasil, desenvolveu o biopolímero de PHB, denominado comercialmente como Biocycle. A constituição deste biopolímero procede por duas etapas, sendo a primeira por processo fermentativo, a partir da metabolização do açúcar para acumular o polímero e subsequente, a segunda etapa pelo processo de extração e purificação com adição de álcool, para o processo de secagem onde se

obtem o produto sólido para o posteriormente realizar o processamento para embalagens (VELHO, 2006; FONSECA, 2014).

A Figura 46 mostra as resinas de produção de PHB industrial da empresa Coopersucar nomeada comercialmente por Biocycle.

**Figura 45-** Resinas de PHB industrial da Biocycle



Fonte: <https://agencia.fapesp.br/plastico-biodegradavel-de-acucar-esta-pronto-para-escala-industrial> (2012)

Em um estudo de caso exploratório aplicado sobre embalagens convencionais e embalagens biodegradável na região de Marília/ São Paulo, enfatizou que a entrada no mercado industrial de polímeros biodegradáveis será inevitável, pois há uma forte pressão social, relacionado ao meio ambiente e sustentabilidade. O apontamento da indústria é que deverão ter estudos de adaptação de aditivos e pigmentos para a produção operacional dos polímeros biodegradáveis. Este mesmo estudo, apresenta uma análise realizada através do site da empresa, de PHB citada acima, “a Biocycle”. A Usina apresenta vantagens significantes, quanto ao comparativo com outras indústrias, devido a utilização da sacarose, proveniente da cana-de-açúcar, sendo esta matéria-prima, o recurso utilizado pela indústria. No entanto, a usina aponta que as questões relacionadas a objeção na produção deste tipo de biopolímeros, são os custos elevados no processo envolvido (COSTA, 2013).

Bugnicourt *et al* (2014) em seu estudo descreve as características diferenciadas de PHA se tratando de um material de qualidade em suas propriedades de barreira e resistência mecânica, quando comparadas a outros tipos de bioplásticos como o PLA. O processamento e adição de aditivos sob medida do PHB, apresentam a processabilidade por extrusão ou moldagem mais aprimorados, destacando-os no adentramento comerciais como de embalagens

alimentícias. Na área da saúde o biopolímero de PHB tem maior indicação, devido seu monômero ser compatível com o sangue e tecidos, tendo a capacidade de metabolização normal no sangue humano, sua estrutura é mais flexível e transparente, sendo interessante em aplicações de suturas cirúrgicas em tecidos, vasos sanguíneos e implantes, sendo reabsorvidos pelos órgãos e tecidos (BUGNICOURT *et al.*,2014).

Outro fator relevante de impacto ambiental vantajoso na produção de polímeros biodegradáveis, está relacionado com a degradação desta matéria-prima.

O ciclo de vida final da embalagem produzida de PHB, é a degradação por meios de microrganismos vivos, transformando a matéria-prima em água, gás carbônico e ricos nutrientes para o solo. Caso a embalagem seja descartada fora do ambiente apropriado para o descarte, a degradação ocorrerá em período médio de alguns meses ou poucos anos para degradação completa, ou seja, período relativamente importante em comparativo com as embalagens provenientes do petróleo, cuja degradação acontecerá em média de centenas de anos (COSTA, 2013; FONSECA, 2014).

### **Desenvolvimento de protótipos com matéria-prima de PHA importada**

Nesta etapa, ampliamos a pesquisa com recursos da FAPESP, onde foram importados amostras de resinas de PHA da empresa fabricante profissional e exportador de matérias-primas denominada: Hebei BaoXiangHang Plastication products Co.,Ltd China, cujo predecessor da indústria, é a planta de plástico Hebei Shenghe, com o objetivo de desenvolver frascos pilotos, injetando as amostras exportadas que se encontravam em formatos de esferas, em máquinas operacionais tipos sopradoras, em colaboração com a empresa parceira: ND Plásticos Indústria e Comércio que atua no mercado com desenvolvimento de plásticos convencionais.

O objetivo deste teste foi avaliar a capacidade deste tipo de resina de PHA no modelamento um protótipo desenvolvido e a partir deste protótipo, realizar testes manipulativos, afim de avaliar as características físicas e químicas, assim como estabilidade, durabilidade e biodegradabilidade do bioplástico.

A amostra da matéria-prima (PHB) para teste primário foi importada da China e desenvolvida em uma Máquina Sopradora (Rogeflex 1lt) Himaco da Marca Oriente, em parceria com a Indústria e Comércio de plástico Ltda. A ND Plásticos fica localizada na cidade de São Carlos – São Paulo. O modelamento do protótipo foi feito a partir do molde disponível de uso cotidiano, ou seja, pré-forma já definida da ND Plásticos, através do processo de fabricação por uma máquina que recebe pré-formas para Injeção e Sopro, com capacidade para 2L, rosca de 60 mm.

Para o processo do material biodegradável, foi realizado o ajuste do cabeçote de temperatura no cabeçote da máquina para 170 °C (SPINOLA; 2018). A peça escolhida para molde foi de um frasco pequeno e um frasco maior, semelhante a uma embalagem de xampu, com a pretensão de realizar o teste do biopolímero importado, em vias de verificar a aplicabilidade dos potes em amostras de fórmulas de cremes de manipulação para uso fácil e/ou corporal, avaliando a durabilidade e/ou fragilidade, estabilidade térmica, possível degradação e resistência do frasco para uso final pelo consumidor.

O quadro 4 expõe a descrição das propriedades da resina de PHB, conforme fornecido pela empresa.

**Quadro 4** - Descrição das propriedades da resina de PHA

Resina de PHA - exportada da China				
Propriedades	Métodos de teste	Condições do teste	Unidade	Valor do teste
Gravidade específica	ASTM D-792	23°C	g/cm <sup>3</sup>	1.27
Coeficiente de fluxo	ASTM D-1238	190°C/2.16K	g/10min	out/30
Resistência à tração	ASTM D-638	23°C,50mm/min	Kgf/cm <sup>2</sup>	680
Alongamento	ASTM D-638	23°C,50mm/min	%	12.5
Força de impacto	ASTM D-256	23°C, Notched 1/8"	Kg-cm	8.5
Força de flexibilidade	ASTM D-790	23°C,15mm/min	Kgf/cm <sup>2</sup>	620-650
Distorção de temperatura	ASTM D-648	1820kpa	°C	70

**Fonte:** Dados fornecidos pela empresa.

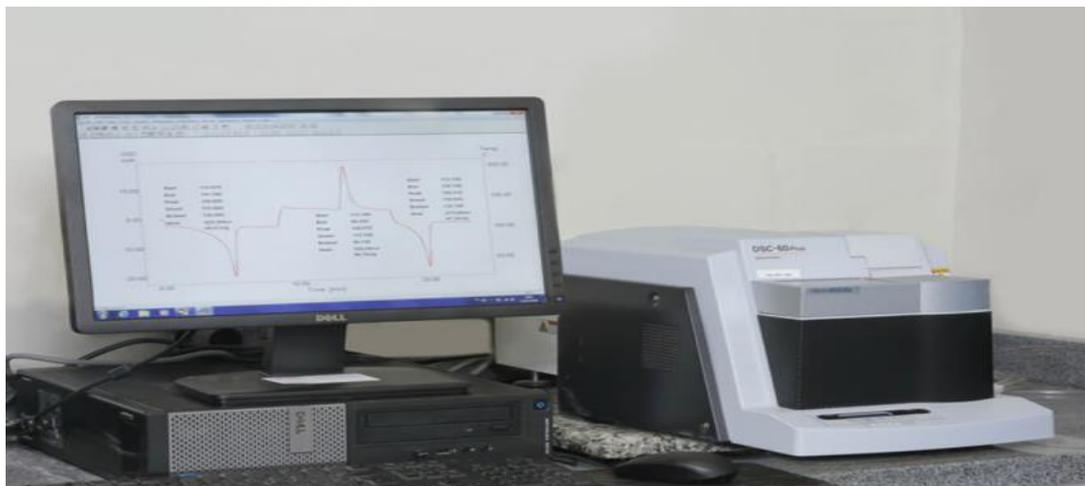
### Calorimetria Varrimento Diferencial

Foi utilizado o equipamento de calorimetria diferencial de varrimento DSC-60/SHIMADZU para avaliar as variações das propriedades térmicas do “biopolímero exportado, revelando suas propriedades termodinâmicas, medindo as taxas de calor com a emissão dos sinais analógicos que correspondem às funções lineares. Este método de ensaio apresenta a consistência em aquecer uma amostra, afim de determinação da Temperatura de Fusão (T<sub>m</sub>) foi realizada a partir da análise de taxa de temperatura partindo de 10 °C até 400 °C, seguindo as etapas de aquecimento/ resfriamento/ aquecimento, o intervalo de tempo no equipamento, se seguindo em valores constantes, de 10 °C/ min, em atmosfera de nitrogênio, (vazão de 50,0 mL/min) calculando-se as médias, procedido de varreduras para comparação (FRANSSON; BÄCKSTRÖM, 1985; MACHADO *et al.*, 2010).

As medidas são: a absorção, estabilidade térmica, entropia e ainda o grau de cristalinidade de um polímero através da quantificação do calor associado à fusão do polímero. (A) e temperatura (T), respectivamente (FRANSSON; BÄCKSTRÖM 1985; SPÍNOLA, 2018).

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do polímero de PHB é de aproximadamente  $5\text{ }^\circ\text{C}$  e a temperatura de fusão ( $T_m$ ), de  $175\text{ }^\circ\text{C}$  (MACHADO *et al.*, 2010). O equipamento utilizado para fazer o DSC está ilustrado na Figura 47.

**Figura 46** - Equipamento de calorimetria diferencial de varredura



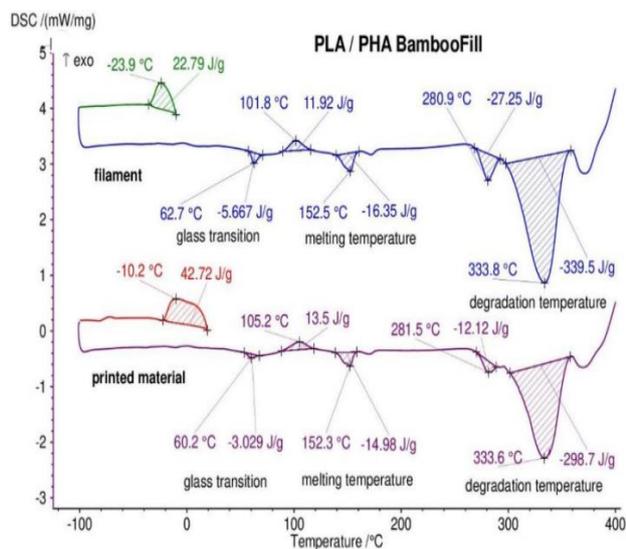
**Fonte:** Imagem do acervo do grupo de pesquisa: equipamento para realização de calorimetria diferencial de varrimento (DSC-60/SHIMADZU).

Para meios comparativos e dois suportes de amostras, foi adicionado os grânulos de resina (PHA) provindo da China, sendo este o material de referência em análise, repetindo a testagem com o segundo material onde intencionalmente se aderiu a amostragem (vazio) que foi denominado como material inerte. Afim de registrar as informações sobre as transições do calor envolvido, identificando assim, as propriedades termodinâmicas da amostra inerte (SPÍNOLA, 2018).

O teste de (DSC) possibilitou verificar as transições térmicas da amostra, determinando a temperatura de fusão alcançada, e variações calorífica da amostra em estudo, propriedades termodinâmicas e o grau de cristalização da matéria-prima (SPINOLA,2018).

A caracterização em termos de propriedades térmicas com avaliação da temperatura de fusão ( $T_m$ ) (Figura 20 DSC), parâmetro interligado ao potencial de aplicações T do polímero, conforme ilustrado o PHA obtido na **figura 20**: consta o teste (**fig. A**) e (**fig. B**), que se trata do gráfico do autor referencial POP *et al* (2018).

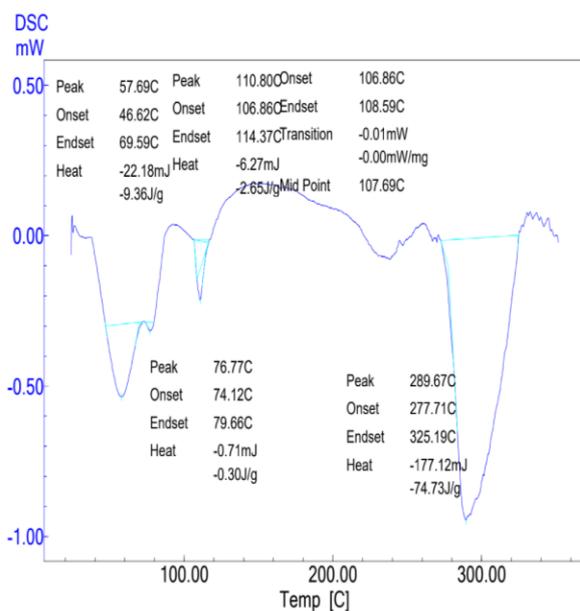
**Figura 47** - Resultado do teste DSC (Fig. A) e (Fig. B) que é o gráfico da amostra referencial



Fonte: Autor - resultado do teste DSC (Fig. A)

Fonte: gráfico da amostra referencial (Fig. B)

DSC thermograms for PLA/PHA/BambooFill filament and print samples. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



**1º parâmetros** relatorial obtido: [Detector: DSC-60] Pico= 57,69 C; Início = 46,62 C; Endset = 69,59 C; Calor -22,18mJ; -9,36 J/g

**2º parâmetros** relatorial obtido: [Detector: DSC-60]; Célula: Alumínio; Peso da amostra: 2,370 [mg]; Peso molecular: 0,00; [Pico DSC] = 76,77C; Início = 74,12 C; Endset = 79,66 C; Calor -0,71mJ -0,30 J/g.

**3º parâmetros** relatorial obtido: [Detector: DSC-60] = 110,80C; Início = 106,86 C; Endset = 114,37 C; Calor -6,27mJ; -2,65 J/g

**4º parâmetros relatorial obtido:** [Detector: DSC-60] Pico = 106,86 C; Início = 108,59 C; Endset = - 0.01 C; Calor -0.00mJ; -107,69 J/g

**5º parâmetros relatorial obtido:** [Detector: DSC-60] Pico = 289,67 C; Início = 277,71 C; Endset = 325,19 C; Calor; -177,12mJ; -74,73 J/g

O grau de cristalinidade ( $X_c$ ) do polímero foi determinada a partir da relação entre a.g entalpia de fusão da amostra ( $\Delta H_m$ ) e a entalpia de fusão de P(3HB) 100 % cristalino, 142 J.g (TSUJI; IKADA, 1996), sendo calculado a partir da Equação:

$\Delta H_m$  = entalpia de fusão da amostra (J.g)

$\Delta H_c$  = entalpia de cristalização da amostra (J.g)

$\Delta H_m^0$  = entalpia de fusão considerando o polímero 100 % cristalino (J.g)

Para P(3HB)  $\Delta H_m^0$  = 142 J.g (TSUJI; IKADA, 1996).

Através do ensaio de DSC os valores obtidos, a temperatura vítrea ( $T_g$ ) foi atingida no pico de 57,69 °C, a temperatura de fusão ( $T_m$ ) é de 106.86 °C, se mantendo em temperatura de cristalização  $T_c$  até 110,80 °C; O pico endotérmico, que corresponde a temperatura de gradação do biopolímero em 289,67 °C, confirmando a temperatura de fusão média do bioplástico de PHB, conforme referenciado por Machado, 2010. Não foi possível observar o pico exotérmico no gráfico entre a transição vítrea.

### **Protótipo resultante de PHB do molde por sopro**

Foi desenvolvido um frasco, tipo xampu, com tampa, pesando 33,43 g; e um frasco pequeno tipo embalagem para álcool em gel, que pesou, em média, 10,55 g.

A tampa desenvolvida e utilizada para os frascos foi de resina comum, PP.

Os resultados da testagem operacional pelo processo de sopro confirmaram a fabricação das resinas de PHB no molde no protótipo escolhido, sob mesmas condições de fabricação do polímero não renovável, não necessitando de molde específico escolhido.

As características do protótipo desenvolvido, também são as mesmas de outros polímeros a base de petróleo, mantendo a transparência, flexibilidade a impacto e rigidez na superfície.

A propriedade mecânica se mostrou boa em relação à impactos de queda livre de aproximadamente 2 metros de distância, comportando 30 mL de solução, em média. A tampa adotada para o frasco é um polímero comum (Figura 49).

**Figura 48** - Protótipos desenvolvidos

Fonte: autoria própria

## Anexo 4 – Artigo: análise de mercado do composto derivado da biomassa vegetal lignocelulósica-álcool coniferol

**Autores:** Claudinéia Moreira de Almeida; Fabio Marcio Squina;  
Márcia Féldreman Nunes Gonzaga



**Environmental Scientiae**

Dez 2020 a Mai 2021 - v.3 - n.1



ISSN: 2674-6492

This article is also available online at:  
[www.cognitionis.inf.br](http://www.cognitionis.inf.br)

Topic: **Inovação Tecnológica**

Received: **28/01/2021**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Approved: **20/04/2021**

**Claudinéia Moreira de Almeida**  
Universidade de Sorocaba, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/7338747610701598>  
[claudineiamoreiradealmeida@hotmail.com](mailto:claudineiamoreiradealmeida@hotmail.com)

**Fabio Marcio Squina**  
Universidade de Sorocaba, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/4022004227543012>  
[fabio.squina@prof.uniso.br](mailto:fabio.squina@prof.uniso.br)

**Márcia Féldreman Nunes Gonzaga**   
Universidade de Sorocaba, Brasil  
<http://lattes.cnpq.br/3025221287848363>  
<https://orcid.org/0000-0002-8208-6914>  
[marcia.feldreman@gmail.com](mailto:marcia.feldreman@gmail.com)



DOI: 10.6008/CBPC2674-6492.2021.001.0005

### Referencing this:

ALMEIDA, C. M.; SQUINA, F. M.; GONZAGA, M. F. N. Análise de mercado do composto derivado da biomassa vegetal lignocelulósica-álcool coniferol. *Environmental Scientiae*, v.3, n.1, p.46-57, 2021. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2674-6492.2021.001.0005>

**Resumo:** Uma excelente oportunidade para o Brasil se destacar na economia e na produção científica é aproveitar os recursos renováveis que o país dispõe, como a biomassa lignocelulósica, nesse contexto, as transformações biotecnológicas são apropriadas do ponto de vista ecológico e ambiental, permitindo transformação de recursos naturais renováveis em produtos com altos valores comerciais. E um composto digno de representar esses materiais lignocelulósicos é o álcool coniferol (AC), que é uma biomassa vegetal lignocelulósica sintetizado pela via bioquímica do fenilpropanóide nas plantas, sendo promissor para o desenvolvimento econômico e mitigação de impactos ambientais, ainda, é um composto com alto valor de mercado. **Objetivos:** Visando contribuir para impulsionar a realização dos propósitos relacionados ao desenvolvimento sustentável, desenvolvimento econômico e mitigação de impactos ambientais, o objetivo dessa pesquisa foi analisar o potencial mercadológico do composto químico (biomassa lignocelulósica) AC e seus derivados. **Método:** Trata-se de uma revisão integrativa da literatura. Preliminarmente foi realizada pesquisa bibliográfica em livros, artigos científicos e em documentos publicados em bases de dados online. Sequencialmente foi realizada coleta de dados sobre as empresas que vendem o AC, nas próprias plataformas das empresas fornecedoras. Esses dados foram estudados no intuito de obter informações relevantes sobre as empresas que já vendem os compostos e/ou seus derivados, especificação do produto, a quantidade que fornecem dos produtos e quais os preços que estão praticando no mercado, como também, o país que as empresas estão localizadas, endereço, e-mail e telefone. **Conclusão:** O mercado do AC parece ser restrito, não há evidências concretas na literatura de aplicações claras do uso direto do coniferílico e nem de produtos que o utilizam em suas formulações. Laboratórios de pesquisa são os principais consumidores do AC e/ou seus derivados. Todavia, existem descrições de transformações químicas do coniferol que resultam em compostos com alto valor agregado do produto. Sendo assim, existe uma abrangente oportunidade de negócio, tratando-se de exploração na cadeia de valor de moléculas derivadas do coniferol. Por exemplo, para síntese de princípios ativos e fragrâncias a partir desse composto. **Palavras-chave:** Biomassa lignocelulósica; Álcool coniferol; Bioeconomia; Desenvolvimento sustentável; Lignina.

**Abstract:** An excellent opportunity for Brazil to stand out in the economy and scientific production is to take advantage of the renewable resources that the country has, such as lignocellulosic biomass. In this context, biotechnological transformations are appropriate from an ecological and environmental point of view, allowing transformation of natural resources renewables in products with high commercial values. And a compound worthy of representing these lignocellulosic materials is alcohol coniferol (CA), which is a lignocellulosic plant biomass synthesized by the biochemical pathway of phenylpropanoid in plants, which is promising for economic development and mitigation of environmental impacts. It is also a compound with high market value. **Objectives:** Aiming to contribute to the achievement of purposes related to sustainable development, economic development and mitigation of environmental impacts, the objective of this research was to analyze the market potential of the chemical compound (lignocellulosic biomass) CA and its derivatives. **Method:** This is an integrative literature review. Preliminarily, bibliographical research was carried out in books, scientific articles and documents published in online databases. Sequentially, data was collected on the companies that sell the AC, on the supplier companies' own platforms. These data were studied in order to obtain relevant information about companies that already sell the compounds and/or their derivatives, product specification, the quantity of products they supply and what prices they are practicing in the market, as well as the country that companies are located, address, email and telephone. **Conclusion:** The CA market seems to be restricted, there is no concrete evidence in the literature of clear applications of the direct use of coniferylic, nor of products that use it in their formulations. Research laboratories are the main consumers of AC and/or its derivatives. However, there are descriptions of chemical transformations of coniferol that result in compounds with high added value for the product. Thus, there is a wide-ranging business opportunity, dealing with exploration in the value chain of molecules derived from coniferol. For example, for the synthesis of active ingredients and fragrances from this compound. **Keywords:** Lignocellulosic biomass; Coniferol alcohol; Bioeconomy; Sustainable development; Lignin.

## INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios globais consiste em modificar o presente modelo econômico de desenvolvimento, os quais estão apoiados e fundamentados no uso do petróleo, gás e carvão (fontes fósseis) e que desconsideram a preservação do meio ambiente (FOLEY et al., 2011). Para tanto, será necessário pensar em inovações tecnológicas, visando uma produção e consumo de fontes mais limpas e seguras, isto é, ser capaz de garantir um sistema econômico mais sustentável (AQUILANI et al., 2018).

A ONU acredita que a população global cresça 16% chegando a 8,6 bilhões até 2030 (AGÊNCIA EFE, 2017). E associado ao aumento populacional e os desafios que essa demanda gerou, devido as utilizações exageradas dos recursos naturais, a dependência dos recursos fósseis, e a crescente urbanização de que resulta sua degradação, existem incertezas em uma escala global relacionadas às mudanças climáticas, necessitando uma mudança de paradigma para o desenvolvimento mundial (FOLEY et al., 2011).

E esse modelo contemporâneo deverá preservar a biodiversidade, tencionando diminuir a poluição, como também o desperdício de água e as emissões de gases do efeito estufa (FOLEY et al., 2011), e isso deve ser apoiado no uso sustentável de recursos obtidos a partir de fontes renováveis (HEIJMAN, 2016).

Existem diversos tipos de biomassas, as de natureza lignocelulósica destacam-se dentre elas, pois são formadas por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, entremeados por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina. E essa última se encontra unida por ligações covalentes e de hidrogênio (SANTOS, 2011).

O vocábulo em latim *lignum* quer dizer madeira, de onde se originou a palavra lignina, que é um polímero derivado de unidades fenilpropanóides denominado C6 C3, podendo ser designada de unidades C9, sendo um dos componentes essenciais dos tecidos de gimnospermas e angiospermas, são originárias da polimerização desidrogenativa do álcool coníferílico e ocorrem em vegetais e tecidos vasculares, atua no transporte de água, nutrientes e metabólitos, também é encarregada de proteger os tecidos contra o ataque de microrganismos e nos vegetais é responsável pela resistência mecânica (SALIBA et al., 2001).

A lignina é a maior fonte de polímeros aromáticos de natureza fenólica, e ocupa a posição de segunda fonte de macromolécula orgânica vegetal mais abundante da natureza de matéria-prima natural, atrás da celulose, e está presente em todos os vegetais, apresentada estruturalmente como uma macromolécula fenólica amorfa, de estrutura complexa, heterogênea, tridimensional, com alto teor de carbono. A estrutura da lignina é fundamentada em três diferentes precursores: álcool sinapílico, álcool p-cumarílico, e o álcool coníferílico (SOUTO et al., 2015).

Nesse segmento, essa molécula, lignina, apresenta aplicações como, por exemplo, na produção de produtos aromáticos, adesivos e como substitutos fenólicos em resinas, essas características mostram que a lignina pode se tornar uma valiosa matéria-prima renovável para a indústria química brasileira (SANTOS, 2011).

Porquanto, para o país, uma extraordinária oportunidade para se destacar na economia e na produção científica é aproveitar os recursos renováveis que o Brasil dispõe, nesse contexto, as biotransformações são apropriadas do ponto de vista ecológico e ambiental, e se mostram como ferramentas importantes para a transformação de recursos naturais em produtos com altos valores comerciais.

À vista disso, neste trabalho, avaliamos o potencial de mercado do composto álcool coniferol o qual pode ser produzido a partir de lignina de biomassa vegetal. Porém, este composto não é commodity (produzido em larga escala para atender mercados globais), sendo assim, não é fácil conseguir informações comerciais do mercado dessa substância. Diante disso, a pesquisa bibliográfica e coleta de dados são importantes para análise desse composto, e o desenvolvimento de tecnologias para produção de composto químico (através de rotas biotecnológicas) a partir de resíduos agrícolas, podem trazer vantagens econômicas, ambientais e sociais para o nosso país.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Foi utilizado o método de pesquisa exploratória (entre os meses de janeiro a julho de 2021), e para subsidiar o referencial teórico, inicialmente foi realizada uma pesquisa bibliográfica em livros, artigos científicos e em documentos publicados nos principais motores de busca (GoogleScholar e Web of Science Platform), os quais contêm artigos e livros com informações relevantes sobre o AC e seus derivados.

Sequencialmente foi realizada coleta de dados sobre as empresas que vendem o AC e seus derivados, nas próprias plataformas das empresas fornecedoras e em ferramentas de busca via web. Elencando as empresas, especificação do produto, a quantidade que fornecem dos produtos e quais os preços que estão praticando no mercado, como também, o país que as empresas estão localizadas, endereço, e-mail e telefone. E para a averiguação sobre a análise tecnológico do composto, foram realizadas pesquisas sobre as patentes depositadas do AC e/ou seus derivados. E foram utilizados os termos: Coniferil, coniferyl, coniferyl alcohol, coniferílico, álcool coniferyl, no resumo da descrição da invenção e a presença do termo em qualquer parte do documento, em todos os países, em sites de busca e bancos de dados econômicos e mercadológicos da PATFT e ESPACENET.

## **REVISÃO TEÓRICA**

O Brasil se encontra em uma posição privilegiada, conta com vantagens comparativas capazes de proporcionar oportunidades excelentes com o desenvolvimento da bioeconomia, tendo a maior diversidade genética vegetal do planeta em seus diferentes biomas encontradas no Pantanal, Mata Atlântica, Cerrado, Amazônia, Pampa e Caatinga, totalizando 42.730 espécies (SILVA et al., 2018).

O país detém um dos maiores estoques da biodiversidade do mundo, possui pluralidade de clima, intensa radiação solar, água em abundância, gigantesca condição de regeneração atmosférica e

absorção, precursor na produção em larga escala de bicompostíveis de biomassa com ênfase na indústria canavieira (etanol), podendo assumir a liderança no aproveitamento integral das biomassas, e têm capacidade para ser o mais importante receptor de recursos de investimentos no segmento de produção e uso de bioenergia proveniente do mercado de carbono, ainda, conforme as pesquisas científicas se intensificam os resultados apresentam-se disponíveis para a sociedade, e os recursos naturais existentes em suas regiões tornam-se gradativamente conhecidos (ASSUNÇÃO, 2010).

Os cultivos de grãos (soja, milho, arroz e trigo) e o de cana-de-açúcar se destacam na agricultura brasileira, e as principais biomassas residuais de origem vegetal disponíveis são: a palha e o bagaço da cana, a palha do arroz, talo com folhas do milho e a palha do trigo (SANTOS, 2011).

É muito importante essa variedade, sendo uma fonte valiosa para a obtenção de diversos produtos essenciais para o setor produtivo como: biocompostíveis, antioxidantes, óleos, corantes, óleos vegetais, gorduras e fitoterápicos, os quais são matérias-primas em diversas indústrias como as de limpeza e higiene, alimentos, bebidas, cosméticos e farmacêuticos (SILVA et al., 2018).

Nesse universo, as biomassas assumem posição estratégica na era pós-petróleo, uma vez que elas representam a grande fonte de materiais renováveis a serem utilizadas, e com a Química Verde, procura-se delinear e concretizar um novo estilo de fazer a Química Industrial, a qual pode ser conceituada como o projeto, o desenvolvimento, a produção e o uso de produtos químicos e processos que a torne tão compatível quanto possível com o ambiente e a biosfera, mais precisamente com a saúde e o bem estar dos seres humanos, e de modo a garantir a sustentabilidade da civilização no futuro (ASSUNÇÃO, 2010).

Existem diversos tipos de biomassas, as de natureza lignocelulósica destacam-se dentre elas, pois são formadas por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, entremeados por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina. E essa última (lignina) se encontra unida por ligações covalentes e de hidrogênio (SANTOS, 2011).

A lignina é a maior fonte de polímeros aromáticos de natureza fenólica, e ocupa a posição de segunda fonte de macromolécula orgânica vegetal mais abundante da natureza de matéria-prima natural, atrás da celulose, e está presente em todos os vegetais, apresentada estruturalmente como uma macromolécula fenólica amorfa, de estrutura complexa, heterogênea, tridimensional, com alto teor de carbono. A estrutura da lignina é fundamentada em três diferentes precursores: álcool sinapílico, álcool p-cumarílico, e o álcool coniferílico (SOUTO et al., 2015).

Nesse segmento, essa molécula, lignina, apresenta diversas aplicações como, por exemplo, na produção de produtos aromáticos, adesivos e como substitutos fenólicos em resinas, essas características mostram que a lignina pode se tornar uma valiosa matéria-prima renovável para a indústria química brasileira (SANTOS, 2011).

Nos últimos anos o foco em debates tem sido sobre bioeconomia sustentável e inovadora no qual está em uma ascensão global de forma expressiva em diversos países, na generalidade, diversas

nações dão ênfase ao elaborarem suas estratégias de bioeconomia na exploração dos recursos biológicos renováveis (biomassas), no uso de conhecimentos científicos e tecnológicos e no desenvolvimento, e tendo como alicerce a promoção do desenvolvimento sustentável (MCTIC, 2018).

Para a agricultura brasileira, a bioeconomia tem sido vista como uma oportunidade de utilizar e aprimorar todo o seu potencial de produção de alimentos, fibras, energia e novos produtos, possibilitando um fortalecimento das relações entre as atividades do setor primário, como as atividades da indústria de transformação, a dos serviços e a agricultura, tornando-as segmentos de um mesmo processo e contribuindo para o desenvolvimento econômico (IPEA, 2017)

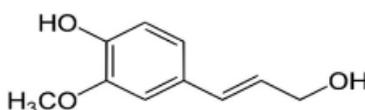
O álcool coniferol é promissor para o desenvolvimento econômico e mitigação de impactos ambientais, e trata-se de um composto (sólido, cristalino e incolor), é monolignól intermediário na biossíntese de eugenol, estilbeno e cumarina, através da via bioquímica fenilpropanóide, quando copolimerizado com compostos aromáticos relacionados, forma lignina ou lignanas (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022).

Sendo um composto com alto valor de mercado, o coniferol é sintetizado pela via bioquímica do fenilpropanóide nas plantas, este composto, é muito utilizado para elucidar estruturas químicas e vias biosintéticas, incluindo compostos derivados de ligninas e lignanas, como intermediário metabólico (LV et al., 2018).

O coniferol, em produção biotecnológica como resíduos agroindustriais, tem como alternativa promissora para o fornecimento desse composto o baixo custo dos seus precursores. Dependente de fenilpropanóide, a via de síntese do coniferol, haja vista que oito enzimas são envolvidas, incluindo duas enzimas do citocromo P450, difíceis de expressar ativamente em microrganismos procarióticos (WANG et al., 2013).

O AC tem efeito terapêutico para o tratamento do câncer e da artrite, e a silibina usada como hepatoprotetora (TONG et al., 2018). Ademais, o coniferol têm potencial material de partida para a indústria de fragrâncias cosméticas (TRAMONTINA et al., 2020), pois é precursor dos aromas florais, acetato de coniferil, álcool di-hidroconiferílico, e iso-eugenol de *Petunia axillaris* (KONDO et al., 2007). E a fórmula molecular do AC está descrita na figura.

**Figura 1:** Estrutura química do álcool coniferol. Fonte: Sigma Aldrich (2021).

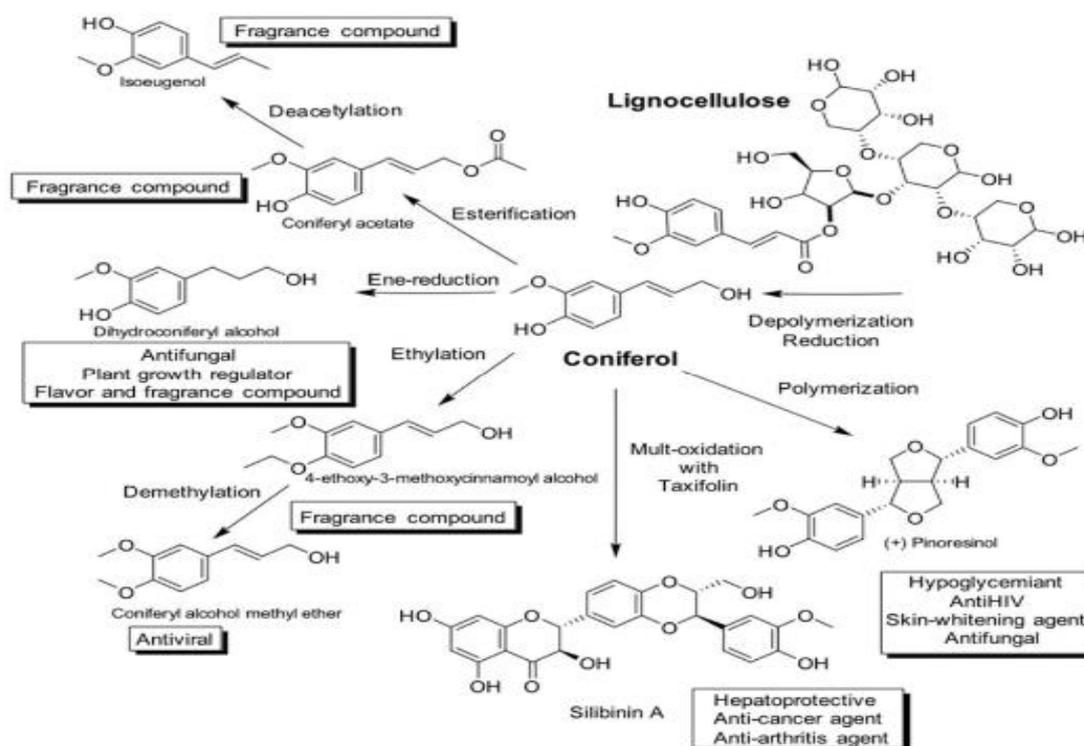


**Fonte:** Sigma Aldrich (2021).

O farmacêutico Holzminden Wilhelm Kubel identificou pela primeira vez o glicósido do álcool coniferol em 1866, no entanto, somente em 1874 a produção teve sucesso pela primeira vez (TIEMANN, et al., 1874). Desde os estudos fundamentais de Freudenberg, o AC tornou-se o bloco de construção preferido para a síntese de modelos de lignina. A justificativa para tanto é que o álcool coniferílico glicósido pode ser usado por plantas superiores para formar lignina (HOUTMAN, 1999).

A produção biocatalítica do coniferol, diretamente da biomassa lignocelulósica apresenta conversão eficiente a partir do ácido ferúlico. Isso foi observado seguindo o tratamento enzimático da lignocelulose para liberar e converter ácido ferúlico em coniferol, utilizando a feruloyl esterase de *Clostridium thermocellum* (XynZ), a ácido carboxílico redutase de *Nocardia Iowensis* (NiCAR) e a aldo-ceto redutase de *Coptotermes gestroi* (CgAKR-1). Um processo de biodegradação-biotransformação é representado nesse sistema, oferecendo-se, com isso, o potencial de agregar valor aos resíduos agroindustriais, trata-se de uma estratégia inédita para a produção de produtos químicos finos de alto valor dentro do contexto de uma biorrefinaria de biomassa vegetal (TRAMONTINA et al, 2020). A figura apresenta a atividade e uso de compostos derivados da biomassa vegetal por meio do bloco de construção coniferol intermediário.

**Figura 2:** Coniferol como plataforma para produtos químicos de alto valor.



**Fonte:** Tramontina et al. (2020).

Quanto ao seu potencial farmacológico, o álcool coniferílico não foi diretamente encontrado como principal ativo de fármacos em comercialização, entretanto, foi observado que ele é um intermediário para a obtenção de compostos químicos, os quais são princípios ativos de alguns fármacos. Como, por exemplo, ele pode ser usado para fornecer a podofilotoxina que se tornou em produtos químicos com mais demanda desde a descoberta de sua propriedade antimetabólica (GORDALIZA et al., 2004).

O AC pode ser usado para obter o pinosinol, e esse por sua vez é o terceiro maior componente do azeite de oliva (SPERRY et al., 2010). Na indústria cosmética, o AC pode ser encontrado na composição da máscara em gel e em perfumes, por apresentar um odor balsâmico, e pode ser utilizado como fixador ou solvente em fragrâncias (TRIANA et al., 2019).

Outro derivado do coniferol, o aldeído de coniferol, em meio aquoso é sugerido para a imitação do aroma de bordo, baunilha e todo tipo de caramelo (por apresentar gosto de caramelo), e tem um odor balsâmico. E o álcool coniferílico fornece, por redução, o eugenol, que pode ser usado como modificador em fragrâncias de cravo, de ylang ylang, madressilva, de tuberosa e narciso, e ainda é usado nas composições aromáticas da baunilha, chocolate e creme-caramelo. E o eugenol também é um componente do medicamento Pulparthrol, sob a forma de solução de uso dentário, indicado para o tratamento de canais e gengivites (ARCTANDER, 1969).

Além de tudo, o eugenol é o principal constituinte do óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*; Myrtaceae), usado como um anestésico odontológico e como flavorizante (SPERRY et al., 2010). Bem como, está presente em alguns enxaguantes bucais, desodorantes, eau de parfum (junto com o isoeugenol), pasta de dente (junto com o isoeugenol e a vanilina) e aromatizante em produtos de limpeza (GORDALIZA et al., 2004).

E o eugenol é dos principais precursores da vanilina, o qual é um aromatizante amplamente utilizado em alimentos, bebidas, perfumes e fármacos (DAUGSCH et al., 2005).

No entanto, apesar de ter sido localizado um bom número de aplicações dos AC e seus derivados, existem poucos estudos sobre as possíveis modificações estruturais que podem ser feitas com esse composto.

### **Busca por patentes**

Para o parecer sobre a análise tecnológica do composto AC, foram efetuadas buscas de patentes utilizando os termos: Coniferil, coniferyl, coniferyl alcohol, coniferílico, álcool coniferyl, no resumo da descrição da invenção e a presença do termo em qualquer parte do documento, em todos os países, em sites de busca e bancos de dados econômicos e mercadológicos da PATFT e ESPACENET. O quadro exibe a quantidade de patentes, as plataformas que foram localizadas.

**Quadro 1:** Quantidade de patentes, plataformas.

<b>TERMO</b>	<b>QUANTIDADE</b>	<b>PORTAL</b>
<b>Coniferyl</b>	1.306	PATFT
<b>Coniferyl alcohol</b>	241	PATFT
<b>Coniferil</b>	9	ESPACENET
<b>Coniferilico</b>	4	ESPACENET
<b>Coniferyl</b>	3.560	ESPACENET
<b>Alcool coniferyl</b>	144	ESPACENET

**Empresas que praticam relações comerciais**

Foram localizadas 12 empresas que comercializam o composto e/ou seus derivados. Os produtos são vendidos em diferentes quantidades e especificações, e os valores são diferentes entre as empresas nas mesmas quantidades.

**Quadro 2:** Empresas fornecedoras do álcool coniferol.

MedChemexpress MCE USA <a href="https://www.medchemexpress.com/">https://www.medchemexpress.com/</a> Tel:609-228-6898 / Fax:609-228-5909 E-mail: sales@medchemexpress.com End.:1 Deer Park Dr, Suite Q, MonmouthJunc-tion, NJ 09952	Álcool coniferol,98%	5mg	\$ 50
		10mg	\$ 80
		20mg	\$140
PiChemicals China <a href="http://www.pipharm.com/catalog_products/list">http://www.pipharm.com/catalog_products/list</a> Tel: +86 21 58953700 +86 21 58953706 E- mail: info@pipharm.com End.: Edificio B, 633 E Shan Road, Xangai 200127	Álcool coniferol, 99%	1g	\$ 345,00
AbaChemScene EUA <a href="https://www.chemscene.com/">https://www.chemscene.com/</a> Tel:732-484-9848-Fax:888-484-5008 E-mail:sales@chemscene.com End.: 1 Deer Park Dr, Suite Q, MonmouthJunction, NJ 08852	Álcool coniferol,98%	5mg	\$50,00
		10mg	\$80,00
		20mg	\$140,00
Targetmol EUA <a href="https://www.targetmol.com/contact-us">https://www.targetmol.com/contact-us</a> Tel: (781) 999-4286 / (781) -999-5354 E-mail: sales@targetmol.com End.: 36 Washington Street, Wellesley Hills, MA 02481	Álcool coniferol,97%	1mg	\$50,00
Key Organics Ltd Reino Unido <a href="https://www.keyorganics.net/">https://www.keyorganics.net/</a> Tel: 44 (0) 1840 212137 E-mail: enquiries@keyorganics.net End.: Propriedade industrial de Highfield Road Camelford, Cornwall PL32 9RA	Álcool coniferol,95%	1mg	\$ 40,00
TimTec LLC Flórida <a href="http://www.timtec.net">http://www.timtec.net</a> Tel: 302-292-8500 F: 302-292-8520 E-mail: info@timtec.net End.: 9270 Bay Plaza BoulevardSuite 606 / 608A	Álcool coniferol,95%	1mg	\$ 79,00
		10mg	\$ 264,00
		20mg	\$ 392,00
Cayman Chemical Company EUA <a href="https://www.caymanchem.com/contact/cc">https://www.caymanchem.com/contact/cc</a> Fax (734) 971-3640 Tel: (800) 364-9897/ (734) 971-3335 End.: Cayman Chemical 1180 EastEllsworth Road Ann Arbor, Michigan 48108	Álcool coniferol,98%	500mg	\$ 310,34
		100mg	\$ 88,50
Angene International Limited London England <a href="https://www.angenechemical.com/">https://www.angenechemical.com/</a> Tel: +44 (0) 1223 333333	Álcool coniferol,98%	1g	\$ 293,00
		100mg	\$ 54,00
Fischer Scientific Estados Unidos <a href="https://www.fishersci.com/us/en/home.html">https://www.fishersci.com/us/en/home.html</a> Tel: 1-800-766-7000/1-877-885-2081	Álcool coniferol, 98%	0,25	\$ 121,00
		1g	\$ 339,00

E o quadro traz a relação das empresas que já vendem os compostos (e/ou seus derivados), especificação do produto, a quantidade que fornecem dos produtos e quais os preços que estão praticando no mercado, como também, o país que as empresas estão localizadas, endereço físico, endereço eletrônico, e-mail e telefone.

## CONCLUSÃO

Conclui-se com base nas patentes, nos fatos e dados apresentados pelo estudo, que existem oportunidades comerciais que justifique investir na produção biotecnologia do composto álcool coniferol e seus derivados, tanto em âmbito nacional quanto em nível internacional.

Em análise nas amostras de patentes não foi localizado nenhum depósito que impossibilitasse o uso da tecnologia em questão para a produção do AC, o que viabilizaria a exploração de sua aplicação como uma estratégia de contorno para bloqueios legais devido a alguma patente que descreva seu modo de produção.

Também, foi identificado diferentes aplicações como: obtenção de fenóis, obtenção de álcoois, microrganismos produtores de enzimas e os produtos das reações enzimáticas, e muitas patentes tem relação com a lignina as quais descrevem métodos de obtenção de coniferol através da despolimerização da lignina. E apesar de terem sido encontradas diversas patentes sobre o AC (e/ou seus derivados), essa quantidade pode ser considerada pequena levando em conta que a busca foi realizada em todos os portais disponíveis. Além disso, averiguando algumas patentes, foi possível observar que elas se repetem devido à semelhança entre as palavras e as mesmas patentes são localizadas em plataformas diferentes, e se fosse averiguar em pormenores, o total de patentes diminuiria consideravelmente. E observando o cenário de competidores principais foi verificado que poucos países fornecem o composto (e seus derivados) e somente foram localizadas 12 empresas fornecedoras.

O mercado do álcool coniferol parece ser restrito, não há evidências concretas na literatura de aplicações claras do uso direto de coniferol e nem de produtos que o utilizam em suas formulações. Todavia, existem descrições de transformações químicas do coniferol que resultam em compostos com alto valor agregado do produto.

Os apontamentos da pesquisa, indicam que é viável investir na produção biotecnologia desse composto, evidenciando que é uma excelente oportunidade para o Brasil se destacar na economia e na produção científica aproveitando os recursos renováveis que o país já dispõe, transformando recursos naturais renováveis em produtos com altos valores comerciais. Com isso, contribuindo para impulsionar a realização dos propósitos relacionados ao desenvolvimento sustentável, desenvolvimento econômico e mitigação de impactos ambientais e trazendo vantagens econômicas, ambientais e sociais para o nosso país.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA EFE. ONU diz que população mundial chegará a 8,6 bilhões de pessoas em 2030. Agência Brasil, Brasília. 2017.

AQUILANI, B.; SILVESTRI, C.; IAPPOLO, G.. The challenging transition to bio-economies: Towards a new framework integrating corporate sustainability and value co-creation. *Journal of Cleaner Production*, v. 172, p. 4001-4009, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.153>

ARCTANDER, S.. *Perfume and Flavor Chemicals*. 3 ed. 1969.

ASSUNÇÃO, F. C. R.. Química verde no Brasil: 2010-2030. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G.. Production of vanillin: A biotechnological opportunity. São Paulo, Química Nova, v.28, n.4, p.642-645, 2005. DOI: <http://doi.org/10.1590/s0100-40422005000400017>

FOLEY, J. A.; RAMANKUTTY, N.; BRAUMAN, K.A.; CASSIDY, E. S.; GERBER, J.S.; JOHNSTON, M.; MUELLER, N.D.; O'CONNELL, C.; RAY, D. K.; WEST, P. C.; ALZER, C.; BENNETT, E. M.; CARPENTER, S. R.; HILL, J.; MONFREDA, C.; POLASKY, S.; ROCKSTRÖM, J.; SHEEHAN, J.; SIEBERT, S.; TILMAN, D.; ZAKS, D. P. M.. Solutions for a cultivated planet. Nature, v.478, n.7369, p.337-342, 2011. DOI: <http://doi.org/10.1038/nature10452>

GORDALIZA, M.; GARCÍA, P. A.; CORRAL, J. M. M.; CASTRO, M. A.; GÓMEZ-ZURITA, M. A.. Podophyllotoxin: Distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. Toxicon, v.44, n.4, p.441-459, 2004. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.008>

HEIJMAN, W.. How big is the bio-business? Notes on measuring the size of the Dutch bio-economy. NJAS: Wageningen Journal of Life Sciences, v.77, p.5-8, 2016. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.njas.2016.03.004>

HOUTMAN, C. J. What factors control dimerization of coniferyl alcohol? De Gruyter, v.53, n.6, p.585-589, 1999. DOI: <http://doi.org/10.1515/HF.1999.097>

IPEA. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Brasil 2035: cenários para o desenvolvimento. Brasília: ASSECOR, 2017.

KONDO, M.; OYAMA-OKUBO, N.; SAGAE, M.; ANDO, T.; MARCHESI, E.; NAKAYAMA, M.. Metabolic regulation of floral scent in *Petunia axillaris* lines: Biosynthetic relationship between dihydroconiferyl acetate and iso-eugenol. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v.71, n.2, p.458-463, 2007. DOI: <http://doi.org/10.1271/bbb.60507>

LV, Y.; CHENG, X.; WU, D.; DU, G.; ZHOU, J.; & CHEN, J.. Improving bioconversion of eugenol to coniferyl alcohol by in situ eliminating harmful H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bioresource Technology, v.267, p.578-583, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.104> MCTIC. Plano de Ação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Bioeconomia. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos CGEE, 2018

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 1549095, Coniferyl Alcohol. 2022.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D.. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. Ciência Rural, v.31, n.5, p.917-928, 2001. DOI: <http://doi.org/10.1590/s0103-84782001000500031>

SANTOS, M. F. R. F.. Elaboração do technology roadmap para biorrefinaria de produtos da lignina no Brasil. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SIGMA ALDRICH. Coniferyl Alcohol. 2021.

SILVA, M. F. O.; PEREIRA, F. S.; MARTINS, J. V. B.. A Bioeconomia Brasileira em Números. BNDES Setorial, v.47, p.277-332, 2018.

SOUTO, F.; CALADO, V.; PEREIRA JUNIOR, N.. Fibras de carbono a partir de lignina: Uma revisão da literatura. Rio de Janeiro, Revista Matéria, v.20, n.1, p.100-114, 2015. DOI: <http://doi.org/10.1590/S1517-707620150001.0012>

SPERRY, J. B.; SMITH, A. B.. Chemical Synthesis of Diverse Phenolic Compounds Isolated From Olive Oils. *Olive Oils. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 2010. DOI: <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00160-1>

TIEMANN, F.; HAARMANN, W.. Ueber das Coniferin und seine Umwandlung in das aromatische Princip der Vanille. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, v.7, n.1, p.608-623, 1874. DOI: <http://doi.org/10.1002/cber.187400701193>

TONG, W. W. T.; ZHANG, C.; LIU, D. H.; WANG, C.; LI, J.; HE, X. K.; XU, W. D.. Silibinin alleviates inflammation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and has a therapeutic effect on arthritis in rats. *Scientific Reports*, v.8, n.1, p.1-12, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-018-21674-6>

TRAMONTINA, R.; GALMAN, J.L.; PARMEGGIANI, F.; DERRINGTON, S. R. BUGG, T. D. H.; TURNER, N. J.; SQUINA, F. M.; DIXON, N.. Consolidated production of coniferol and other high-value aromatic alcohols directly from lignocellulosic biomass. *Green Chemistry*, v.22, n.1, p.144-152, 2020. DOI: <http://doi.org/10.1039/c9gc02359c>

TRIANA, D.; TAFDILLA, M. A.; ANTIKA, L. D.; ERNAWATI, T.. Conversion Eugenol to Vanillin: Evaluation of Antimicrobial Activity. In: *INTERNATIONAL SUMMIT ON SCIENCE TECHNOLOGY AND HUMANITY*. Proceedings. December, p.594-602, 2019.

WANG, Y.; CHANTREAU, M.; SIBOUT, R.; HAWKINS, S.. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Frontiers in Plant Science*, v.4, n.220, p.1-14, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00220>

## Anexo 5 – Artigo: Estudo das oportunidades do mercado industrial relacionados a utilização de bioplásticos microbianos em substituição a plásticos derivados do petróleo



Brazilian Journal of Development | 33331  
ISSN: 2525-8761

### Estudo das oportunidades do mercado industrial relacionados a utilização bioplásticos microbianos em substituição a plásticos derivados do petróleo

#### Study of industrial market opportunities related to the use of microbial bioplastics to replace petroleum-based plastics

DOI:10.34117/bjdv8n5-048

Recebimento dos originais: 21/03/2022

Aceitação para publicação: 29/04/2022

#### **Márcia Féldreman Nunes Gonzaga**

Mestrado em Comunicação e Cultura

Instituição: Universidade de Sorocaba

Endereço: Rod. Raposo Tavares, km 92,5 - Vila Artura, Sorocaba - SP

E-mail: marcia.feldreman@gmail.com

#### **Fabio Marcio Squina**

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

Instituição: Universidade de Sorocaba

Endereço: Rod. Raposo Tavares, km 92,5 - Vila Artura, Sorocaba - SP

E-mail: fabio.squina@prof.uniso.br

### RESUMO

Nos últimos 10 anos, houve em todo o mundo um considerável crescimento na produção de plásticos a partir de fontes não renováveis, em substituição de matérias derivados de petróleo, que apresentam efeitos nocivos ao meio ambiente. Várias empresas apostaram no desenvolvimento dos bioplásticos, como por exemplo os polihidroxialcanoatos (PHA), devido a características como estabilidade, durabilidade, biodegradabilidade e não toxicidade. Neste artigo, apresentamos uma pesquisa qualitativa com abordagem descritiva de caráter exploratória sobre esse tema. Para realizar a pesquisa, foram utilizadas publicações do portal de periódicos da Capes, a plataforma *ScienceDirect*, as bases de dados *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE) e *U.S. National Library of Medicine* (PUBMED). Nota-se a tendência de substituição dos polímeros desenvolvidos de origem petroquímica por bioplástico microbianos. Para viabilizar economicamente a produção de bioplástico microbianos, faz-se necessário pesquisas à utilização de substratos com baixo custo para a fermentação microbiana, redução do tempo de processo e utilização de materiais de baixa toxicidade (ou atóxicos) à extração dos polímeros. A produção de bioplásticos microbianos é um tema de grande relevância e interesse de indústrias, do governo e do mundo todo. Porém o processo de extração de bioplásticos produzidos por cepas bacterianas ainda é considerado de alto custo. O uso comercial de bioplásticos produzidos por cepas bacterianas sem dúvidas terá um grande potencial a ser utilizado como substituto alternativo a plásticos derivados de petróleo. Por fim, as diversas percepções debatidas ao decorrer dos

trabalhos analisados permitem inferir que, em relação à produção de biopolímeros sustentáveis, visando fabricação em larga escala pela indústria, ainda há uma grande trajetória a se percorrer.

**Palavras-chave:** biopolímeros, bioplástico microbiano, polihidroxicanoatos, extração de pha.

#### **ABSTRACT**

In the last ten years, there has been considerable growth worldwide in the production of plastics from non-renewable sources for replacement materials produced from petroleum derivatives, which have harmful effects on the environment. Several companies have invested in developing bioplastics, such as polyhydroxyalkanoates (PHA), due to stability, durability, biodegradability, and non-toxicity. This is a qualitative research with a descriptive exploratory approach on this topic. To carry out the research, publications from the Capes journal portal, the ScienceDirect platform, the Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE), and the U.S. National Library of Medicine (PUBMED) databases were used. There is a tendency to substitute polymers developed from petrochemicals for microbial bioplastics. It is necessary to research using low-cost substrates for microbial fermentation, reducing process time, and using low toxicity (or non-toxic) materials for polymer extraction to make microbial bioplastics economically viable. The topic, the production of microbial bioplastics, is of great relevance and interest to industries, the government, and the world. However, the extraction process of bioplastics from bacterial strains is still considered of high cost. The commercial use of bioplastics will undoubtedly have great potential as an alternative substitute for petroleum-based plastics. However, the various perceptions discussed during the analyzed works allow us to infer that, concerning the production of sustainable biopolymers, aiming at large-scale manufacturing by the industry, there is still a long way to go.

**Keywords:** biopolymers, microbial bioplastic, polyhydroxyalkanoates, pha extraction

## 1 INTRODUÇÃO

No início do século 20, ocorreu uma explosão no desenvolvimento e uso de plástico na vida cotidiana (JUDITH *et al.*, 2020). Os plásticos desenvolvidos à base de petróleo são utilizados extensivamente no cotidiano, sendo parte essencial da sociedade moderna, substituindo matérias-primas como madeira, metal e outras aplicações industriais e médicas, devido às suas características de estabilidade e durabilidade (MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019). Por conta do uso em larga escala e pela baixa degradação do plástico, houve consequências ao meio ambiente, como o acúmulo do material em aterros sanitários e a poluição de oceanos. Além de gerar impactos do meio ambiente, a produção de plástico convencional, desenvolvido a partir de recursos de petróleo, também se faz como um crescente problema no mundo, devido ao fato do petróleo ser um recurso que está se esgotando: com os níveis atuais de consumo, espera-se que todas as fontes de petróleo conhecidas no planeta estarão esgotadas antes do fim do século 21 (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2018; JUDITH *et al.*, 2020).

O grande problema em relação ao plástico advém da gestão dos resíduos, ou ao descarte destes produtos, observado que são produzidas mais de 300 toneladas de plástico e que aproximadamente 50% deste volume se volta a produtos que são descartados dentro de um ano após sua compra – o que acarreta em consequências ambientais à nível global (SINGH *et al.*, 2016). A Agenda 2030 da ONU (Organização das Nações Unidas) traça aconselhamentos determinados como Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), os quais abrangem questões sociais, ambientais, da educação, saúde, dentre outros, destacados na plataforma, conforme apontado em seu objetivo nº 12.5, texto que enfatiza quanto à geração de resíduos, a reciclagem e o consumo, meio de reciclagem, prevenção e reuso de embalagens (ONU, 2018).

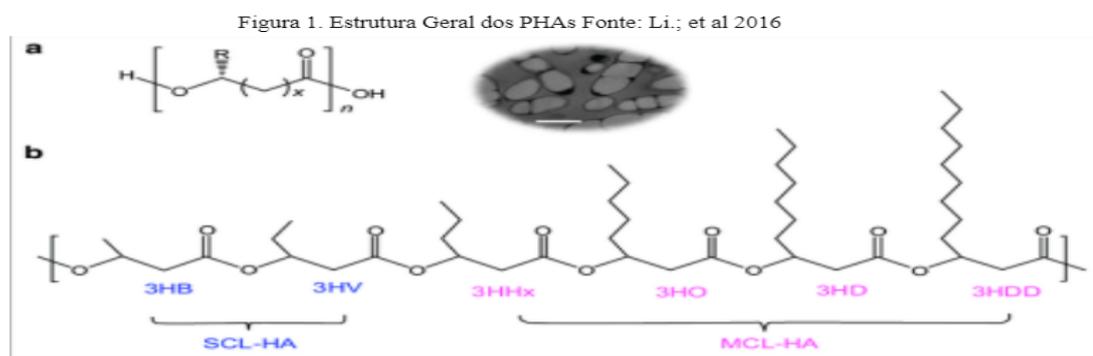
O Brasil é um país com alto potencial para contribuir com a sustentabilidade por possuir muitas reservas naturais, grande biodiversidade e variações climáticas consideráveis. Nos anos recentes, tem-se evidenciado o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis, se tornando necessário desenvolver inovações tecnológicas para a substituição dos plásticos sintéticos pela produção de plásticos biodegradáveis (MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019; QUINES *et al.*, 2015). Especialistas pesquisadores de áreas multidisciplinares, tais como químicos, bioquímicos, biólogos moleculares, microbiologistas, engenheiros químicos e médicos, apostam no desenvolvimento de biopolímeros produzidos por fontes renováveis. (CHEN, 2010; MENDONÇA *et al.*, 2013). O bioplástico pode ser definido como material plástico moldável feito de compostos químicos derivados ou sintetizados por micróbios, tal qual as bactérias ou plantas, sendo obtido por recursos renováveis e, em alguns casos, são biodegradáveis (JUDITH *et al.*, 2020).

O termo polihidroxialcanoato (PHA) é utilizado para se referir à família de poliésteres de origem microbiana, produzidos biotecnologicamente a partir de fontes renováveis. Os PHA são acumulados por microrganismos como materiais de reserva de carbono e de energia. Este tipo de bioplástico vem sendo pesquisado há mais de 70 anos, tratando-se de um material biológico importante,

semelhante à composição dos plásticos derivados de petróleo, entretanto, sendo sustentável e biodegradável e considerado promissor (WANG; CHEN, 2017).

O PHA, além de ser biocompatível e biodegradável, não são tóxicos, sendo comercializado por muitas empresas, como matéria-prima em forma de pellets ou em pó, e estes são provenientes de microrganismos e suas propriedades, são semelhantes aos polímeros sintéticos. São comercializados para aplicações como por exemplo nas áreas médicas, como películas e suturas, também em frascos para cosméticos, possibilitando, assim, novas tecnologias para vários campos da indústria. (MOZEJKO-CIESIELSKA et al., 2019)

Com descrito na figura abaixo, a fórmula geral do PHA é composta por múltiplas unidades, ou seja, unidades de ácidos: o hidroxialcanoatos de cadeia lateral curta (PHA – scl), constituídos de 3 a 5 monômeros C6 C14; Os hidroxialcanoatos de cadeia média (PHA - mcl) que variam, em média 6 a 14 monômeros de carbono; Os hidroxialcanoatos de cadeia longa (PHA – lcl), cujo os monômeros contém mais de 14 átomos (DELGADO 2015.; LI.; et al 2016.; CHOONUT 2019). Os materiais moldáveis desenvolvidos de PHAs incluem plásticos biodegradáveis para fins de embalagem que não agridem o meio ambiente, fibras, implantes biodegradáveis e biocompatíveis, transportadores de liberação controlada para drogas ou fármacos, biocombustíveis, na fermentação industrial, etc (Chen, 2010).



Legenda:

a. A estrutura identificada como "a", apresenta a estrutura química geral dos PHAs. b. A estrutura identificada como "b", é a representação do grupo de cadeias de PHAs.

Os desafios apontados pelas indústrias de biopolímeros estão relacionados à competição com os plásticos derivados do petróleo. Para tornar estes plásticos mais competitivos, nota-se a necessidade da redução dos custos para sua produção, que estes possuam características superiores ou semelhantes às apresentadas por alguns dos tipos de plásticos convencionais e possuem aplicações com alto valor agregado, como é o caso do uso para aplicações médicas (QUINES *et al.*, 2015). Assim o presente trabalho se justifica pela importância de conscientização da sociedade quanto ao tema, bem como para reforçar quanto à necessidade de investimento em pesquisas científicas com apoio governamental e por meio de empresas privadas, apostando em inovações no desenvolvimento tecnológico das indústrias. Além disso, a produção em larga escala de biopolímeros sustentáveis poderia impulsionar crescimento e desenvolvimento econômico e industrial do país.

## MATERIAL E MÉTODO

A partir da problemática levantada, o objetivo da pesquisa foi realizar um estudo teórico com abordagem em método descritivo e exploratório, baseado na busca de pesquisas elaboradas por outros autores especializados no assunto, trazendo o conhecimento científico sobre a produção e aplicação de bioplásticos microbianos. Para realizar a pesquisa, foram utilizadas publicações do portal de periódicos da Capes, a plataforma *ScienceDirect* e as bases de dados *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE) e *U.S. National Library of Medicine* (PUBMED). O levantamento dos artigos científicos nas bases de dados aconteceu no ano de 2021. A busca de artigos se deu a partir das palavras-chave: *Production biopolymers*, *Microbial bioplastic*, *Polyhydroxyalkanoates* (PHA). Quanto ao critério para seleção dos artigos, optou-se por investigar as publicações internacionais e nacionais, analisando, em seguida, a pertinência, relevância e elegibilidade para o tema.

Na coleta e análise dos dados foi construído um quadro investigativo dos artigos, sobrepondo as seguintes etapas: (1) identificação do tema; (2) identificação dos principais objetivos; e (3) interpretação dos resultados encontrados nos artigos. Foram excluídos os estudos que não abordassem a temática relacionada ao objetivo desta revisão. Para seleção dos artigos, foi realizada pesquisa pelas palavras-chave em cada uma das bases de dados – etapa que caracterizou a primeira fase da seleção. A segunda fase foi determinada por meio da leitura dos títulos e resumos e a terceira fase foi composta pela leitura dos artigos completos. Ao final da busca, foram selecionadas 22 produções científicas para o desenvolvimento da introdução e resultados desta pesquisa. O fluxograma da busca nas bases de dados encontra-se nesta revisão integrativa.

**Quadro 1** – Estratégias de busca detalhada no portal de periódicos Capes, ScienceDirect, BVS – Bireme: bases de dados Medline, PubMed, respectivamente

<p>Production of biopolymers from poli-hidroxiálcanoatos</p> <p>(Production of biopolymers) AND (Polyhydroxyalkanoates (PHA)) OR (bioplastic) AND (bioplastic microbial) AND (fulltext:"1") AND db:( "CAPES" OR "SCIENCEDIRECT" OR "ELSEVIER" " MEDLINE" OR "PUBMED") AND la:( "pt" OR "en" OR "es") AND year cluster:( "2010" OR "2011" OR "2012" OR "2013" OR "2014" OR "2015" OR "2016" OR "2017" OR "2018" OR "2019" OR "2020").</p> <p>"Polyhydroxyalkanoates (PHA)" [MeSH Terms] OR (" Polyhydroxyalkanoates" (PHA) [All Fields] AND "biopolymers" [MeSH Terms]) OR "biopolymers" [All Fields]) AND "production Polyhydroxyalkanoates (PHA) " [MeSH Terms] OR "production Polyhydroxyalkanoates (PHA)" [All Fields])) OR "biopolymers Polyhydroxyalkanoates" [MeSH Terms] OR "biopolymers Polyhydroxyalkanoates" [All Fields]) "cepas Polyhydroxyalkanoates " [MeSH Terms] OR "cepas Polyhydroxyalkanoates" [All Fields], "Bioplastic" [MeSH Terms] OR "Bioplastic" [All Fields].</p>
---

Quadro 2 – Artigos Seleccionados

Título	Ano e País de Origem	Autor	Revista ou periódico (ISSN)	Tipo de estudo	Objetivos do estudo	Resultados principais
Production of Polyhydroxyalkanoates Copolymers by Recombinant <i>Pseudomonas</i> in Plasmid- and Antibiotic-Free Cultures	2018 Brasil	OLIVEIRA-FILHO et al.	Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology DOI: 10.1159/000495752	Pesquisa experimental	Descrever a integração de 3 estratégias distintas para integrar na genes heterólogos em cromossomos bacterianos de <i>Pseudomonas</i> spp	O autor descreveu a inserção de três genes heterólogos codificantes de PHA sintase provenientes de <i>R. eutropha</i> H16, <i>Aeromonas</i> sp. TSM81 e <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC7966 nas cepas de <i>Pseudomonas</i> LFM046 e LFM461. Foram testadas a produção de PHA usando glicose como única fonte de carbono em culturas sem adição de antibióticos.
Purification of Poly (3-hydroxybutyrate) Produced by Fatty Acid Fermentation Using Organic Polar Solvents	2018 Colômbia	RAMOS et al.	<i>The Italian Association of Chemical Engineering</i> ISBN 978-88-95608-64-8; ISSN 2283-9216 DOI: 10.3303/CET1867112	Pesquisa experimental	Avaliar a aplicação de diferentes processos de purificação a fim de se obter um polímero de alta pureza	Os materiais obtidos na purificação do clorofórmio apresentavam propriedades mecânicas pobres, aparência ruim e eram amarelados e com forte odor gerado pelo óleo remanescente
Comparação de diferentes Síntesis de bioplásticos a partir de microorganismos	2018 Brasil 2017 Colômbia	BISSACOT MICÁN et al.	LUME - Repositório <i>Semilleros: Formación Investigativa</i> ISSN 2463-0454	Revisão de literatura Revisão bibliográfica	Reunir estudos de O artigo analisa o panorama geral da produção de bioplásticos, e as propriedades dos PHA e as condições para sua produção tais como: tempo, agitação, PH, temperatura, substratos e meios cultivos, e os diversos microorganismos	Diversos estudos têm como objetivo de A conclusão do estudo, descreve que é necessário avaliar o microrganismo a ser estudado, fazendo comparativos com vários outros tipos para obter um melhor rendimento e produção de bioplásticos
by Mixed Microbial Cultures from Sludge					mista, usando carbonato de dimetila e 1-butanol, respectivamente	rendimentos de extração possam ser obtidos com clorofórmio ou diclorometano como solventes, dentre outros.

PHA Recovery from Biomass	2013 Arábia Saudita	MADKOUR <i>et al.</i>	<i>Biomacromolecules</i>	Revisão bibliográfica	Estudo geral sobre os diferentes processos que resultam na liberação de moléculas de poliéster ou os grânulos de PHA, e avaliar processos que descrevem sobre a adequação de uso em larga escala na indústria	A recuperação de PHA a partir da biomassa produzida é uma etapa muito importante em todo o processo de produção. A recuperação não requer apenas a liberação do poliéster, incluem também todo o processo do pré tratamento e tratamento da biomassa, incluindo também a fase de recuperação.
Polyhydroxyalcanoates: sustainability, production, and industrialization	2017 Alemanha	WANG <i>et al.</i>	<i>Sustainable Polymers from Biomass GmbH &amp; Co. KGaA</i>	Revisão bibliográfica	Estudo teórico sobre aspectos de sustentabilidade dos PHAS	A síntese de biopolímero em bactérias é favorável a sustentabilidade ao meio ambiente, mas apresentam como principal barreira o alto custo da produção
Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalcanoate (PHA) Production	2017 Dinamarca	KOURMEN TZA <i>et al.</i>	<i>Bioengineering</i>	Revisão de literatura	de Apresentar etapas do processo geral de produção de poli-hidroxialconato	Os processos biotecnológicos, assim como recursos microbianos, ainda estão sendo desenvolvidos e pouco explorados
Methods for identification, quantification and characterization of polyhydroxyalcanoates-a review	2016 Índia	GODBOLE	<i>International Journal of Bioassays</i> 5.4 4977-4983	Revisão de literatura	de Realizar uma análise do processo de identificação e caracterização e quantificação dos grânulos de PHA a partir de coloração por Sudan Black e azul do Nilo bem como, Métodos Espectrofotométricos	Técnicas simples e rápida com o uso do microscópico acoplados com coloração com Nilo Azul e Sudan Preto são utilizadas para a identificação de microrganismos produtores de PHA
Biofuel from Polyhydroxyalcanoates (PHAs).	2019 Tailândia	Choonut, Aophat & Sangkharak, Kanokphorn.	<a href="https://www.researchgate.net/publication/343083324">https://www.researchgate.net/publication/343083324</a>	Revisão de literatura	de O autor realizou uma pesquisa sobre as propriedades dos PHAs como biocombustíveis	O autor conclui que a alta demanda por biocombustíveis tem estimulado fontes renováveis, onde refere que a aplicação de polihidroxialconatos (PHAs) como fonte de biocombustível demonstra ser muito promissora, porque não exige PHAs altamente purificados resultando em redução de custos
Integrated Plastic Waste Management: Environmental and Improved Health Approaches	2016 Índia	P. Singh, V.P Sharma	Published by Elsevier Procedia Environmental Sciences doi: 10.1016/j.proenv.2016.07.068		O autor descreve sobre a poluição por plásticos, e sendo estes fatos resultantes em perdas econômicas. renováveis	Como discussão o autor menciona que biopolímeros apresentam sustentabilidade ambiental

<i>Pseudomonas</i> Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates	2019 Polônia	MOZEJKO-CIESIELSKA <i>et al.</i>	<i>Journal of Polymers and the Environment</i>	Estudo Teórico		Fornecer uma visão geral das tendências recentes para a produção de PHAs com foco no desenvolvimento de estratégias de fermentação, utilização de diferentes fontes de carbono.	Em vias da melhoria da produtividade dos PHAs, os processos de otimização usando o modo contínuo de operação precisam ser implementados. Além disso, aponta-se para o desenvolvimento de uma cascata de biorreator de múltiplos estágios que poderia resultar na produção de blocos de copolíesteres com propriedades únicas
Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future	2016 Singapura	Li <i>et al.</i>	<i>NPG Asia Materials</i> / doi:10.1038 / am.2016.48	Revisão de literatura	de	O autor faz uma revisão de literatura sobre modificação de PHA e estratégias e funcionalização	Em sua discussão final o autor descreve que PHAs modificados são promissores na área médica.
Métodos de extração de polihidroxialcanoatos a partir de biomassa bacteriana	2015 Brasil	QUINES <i>et al.</i>	Química Nova	Revisão de literatura	de	Apresentar estratégias tecnológicas utilizadas nos processos de extração de PHA produzidos por cepas, incluindo fases de recuperação e purificação do biopolímeros	O autor conclui que métodos químicos, tais como uso de solventes são muito utilizados na recuperação do PHA; O uso de digestores químicos, os métodos físicos e biológicos podem ser combinados utilizados na extração
Estudo da Produção de Polihidroxialcanoatos (PHAs) por <i>Chromobacterium violaceum</i>	2005 Brasil	Viegas, Cristhiene Paiva Rohde	Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Viegas	Pesquisa experimental		O objetivo do estudo foi de avaliar a produção de copolímeros: polihidroxibutirato o P[3HB e hidroxivalerato: co-3HV] por <i>C. violaceum</i> .	O estudo definiu as condições de cultivo à produção de biopolímero com potencial biotecnológico a partir desse microrganismo.

## 2.DISSCUSSÃO TEÓRICA

A análise da literatura na área permitiu tecer variadas observações acerca do bioplástico, referindo-se às possibilidades do seu uso e implicações pertinentes. Observa-se que os artigos investigados tomaram metodologias distintas, e por isto, os resultados encontrados variaram desde exposições técnicas e teóricas acerca do bioplástico, PHA (CHEN, 2010; JUDITH *et al.*, 2020; MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019; PINSKY *et al.*, 2017), análises de diferentes processos existentes para sua produção (DE SOUZA REIS *et al.*, 2020; MADKOUR *et al.*, 2013), à exploração de técnicas e métodos para a identificação, estimativa quantitativa e caracterização de PHA em vias de uma produção mais econômica (GODBOLE, 2016).

De acordo com as colocações dos autores, os PHA identificam-se enquanto biopolímeros versáteis, tendo variadas aplicações nas indústrias farmacêutica, da biomedicina, alimentos, embalagens e outras, sendo biodegradáveis, podendo ser produzidos de forma sustentável e ecológica, desenvolvidos com matérias-primas renováveis ou resíduos industriais (DELGADO *et al.*, 2015). É evidente que os PHA e tecnologias relacionadas formam uma cadeia de valor industrial (CHEN, 2010).

Desta maneira, o desenvolvimento de PHA é justificado por ao menos três pontos: a escassez de petróleo para materiais plásticos, a redução de emissões de CO e proteção ambiental (CHEN 2010).

A dificuldade no custo de produção do PHA afeta a sua aplicação como alternativa biodegradável aos plásticos convencionais. Pesquisas em desenvolvimento na área de bioprocessos e novos recursos bacterianos, pode contribuir na produção economicamente viável de PHAs.

Podem ser realizados diferentes processos, que fazem uso de bactérias, para a produção de PHA. Neste âmbito, tem se investigado a adoção de culturas puras, pelo seu potencial em valorizar subprodutos residuais como matéria-prima de baixo custo. Há expectativa de que as ferramentas de biologia sintética auxiliem no aumento da eficiência da produção de PHA, bem como pesquisas na produção de PHA utilizando culturas microbianas mistas (MMC) e diversos substratos de resíduos, com o objetivo de reduzir os custos nos processos operacionais. (KOURMENTZA *et al.*, 2017).

O bioplástico produzido deve possuir robustez, ser biocompatível com opções de tratamento de superfície, permitindo redução do atrito e do desgaste (SINGH *et al.*, 2015). Os monômeros que devem ser explorados para usos médicos, até agora são apenas, os PHAs de cadeia curta, constituída por 3-hidroxi-butilirato (3HB) e seus derivados foram estudados, mais monômeros devem ser testados para eficácia médica. As proteínas de ligação à superfície PHA, (PhaP) dentre outras, podem ser desenvolvidas em um sistema de purificação de proteína ou em ferramentas de distribuição de drogas ou fármacos específicos. Mais aplicações baseadas nessas proteínas devem ser desenvolvidas (CHEN., 2010, p. 18).

Os PHA são desenvolvidos por vários tipos de cepas de bactérias e são acumulados como grânulos, na presença em excesso de uma fonte de carbono, como exemplo a glicose, ácidos graxos, ácidos láuricos e sacarose (GODBOLE, 2016; WANG *et al.*, 2017). Estes PHA são produzidos por bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas, sintetizadas espontaneamente com armazenagem intracelular de carbono e de energia. A acumulação de grânulos no citoplasma bacteriano pode chegar em até 90% do peso seco da célula (MADKOUR *et al.*, 2013; MENDONÇA *et al.*, 2013; MARTÍNEZ *et al.*, 2016; MOZEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2019).

Micán e colaboradores (2017), em pesquisa desenvolvida na Universidade de Colômbia, realizaram estudos sobre a produção de PHA com três espécies de *Pseudomonas* e substratos de baixo custo apresentam viabilização econômica para o processo tecnológico. Para os autores, para tornar a produção de biopolímeros competitiva do ponto de vista ambiental, tecnológico e econômico, devem ser utilizados resíduos agroindustriais como o amido de tubérculos, como batata e mandioca na produção de PHA, para que estes sejam reaproveitados. O autor concluiu que atualmente as correntes

ainda não são valorizadas pelo setor industrial que poderiam ser utilizadas para a produção de biopolímeros (MICÁN *et al.*, 2017).

Oliveira-Filho e colaboradores (2019) obtiveram sucesso em aumentar o potencial industrial da *Pseudomonas sp.* Cepa LFM461 através da produção de copolímeros de polihidroxialcanoatos (PHA) contendo P3HB (polihidroxi-butilirato) e (PHA de cadeia média) P3HAMcl (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2019).

A nível mundial, uma das cepas mais pesquisadas é a *Ralstonia eutropha*, em específico a do tipo de poli-hidroxi-butilirato (PHB), devido à sua capacidade de produzir grandes quantidades de PHA, obtendo uma porcentagem de 80% do peso seco da bactéria (DELGADO *et al.*, 2015). Este é o microrganismo conhecido com a maior produção de PHA, sintetizando poliéster quando o nitrogênio de sua fonte nutricional é limitado (MICÁN *et al.*, 2017). Apesar disto, se faz importante avaliar outros tipos de microrganismos e elaborar-se outros estudos com foco na melhoria do desempenho e em realizar uma maior produção de bioplástico (MICÁN *et al.*, 2017).

Em todo o mundo, várias empresas vêm apresentando projetos de produção e industrialização de bioplástico a partir de PHA. Historicamente, tem-se Lemoigne, no ano de 1926, que apresentou estudos com o poli-3-hidroxi-butilirato ou P(3HB). Citações posteriores sobre o tema são encontradas nas décadas mais recentes. A partir de 1980, na Áustria, notou-se a produção do P(3HB), ainda em baixa escala, ocorrendo até o ano de 1995; no Reino Unido, os projetos foram citados no período entre 1981 a 1988 pela empresa ICI; nos EUA, a empresa Proctor & Gamble (P&G) apresentou projetos de PHA na variedade de poli (3-hidroxi-butilirato- co -3-hidroxi-hexanoato PHBHHx, em escala média proposta de 1000 t/a, entre 1980 e 2005 (WANG *et al.*, 2017).

Há grandes vantagens ambientais no uso de plásticos desenvolvidos por microrganismos, quando em comparação aos plásticos desenvolvidos a partir de matérias-primas tradicionais com bases petroquímicas, porém, o custo final acaba por ser elevado, não ficando acessível à população. (DELGADO *et al.*, 2015).

São necessários mais estudos para tentar aumentar a competitividade, bem como reduzir o custo do processo industrial promovendo também a agilidade na produção apresentando como resultado final qualidade nas características e propriedades mecânicas deste bioplástico.

Embora o polihidroxi-butilirato (P3HB) ou seja, este tipo de plástico biodegradável, tenha algumas propriedades úteis, como insolubilidade em água, resistência à umidade e boa impermeabilidade ao oxigênio, eles têm alguns defeitos inerentes. Por exemplo, P3HB tem um alto ponto de fusão (T<sub>m</sub>) superior a 170 ° C e uma temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) de 4 ° C, é um material altamente cristalino e, portanto, frágil e rígido com baixa elasticidade e a moldagem por injeção também é muito difícil. (WANG *et al.*, 2017).

Atualmente este tipo de bioplástico, são os mais estudados e de maior interesse pelas indústrias por motivo de suas características serem bem similares aos tipos de plásticos da indústria petroquímica (DELGADO *et al.*, 2015).

A produção de um material de baixo custo inclui o uso de substratos com baixo preço, como por exemplo resíduos agrícolas e resíduos de alimentos, tais como a lignina, sucrose, ácidos graxos e vegetais que podem ser utilizados como fonte de carbono (WANG *et al.*, 2017, VIEGAS 2005).

Os métodos de extração de PHA das cepas bacterianas enfocam a necessidade de diminuir os custos dos reagentes utilizados, redução do tempo no processo, e nas substituições de produtos químicos tóxicos por produtos de baixa toxicidade e/ou preferencialmente atóxicos. O produto final deve apresentar propriedades biocompatíveis, além de ser biodegradável, apresentando um processo favorável para aplicação em grande escala na indústria, com critérios minuciosos de não comprometer o meio ambiente (QUINES *et al.*, 2015).

Os procedimentos de pré-tratamento aplicados na produção de PHA, são métodos biológicos, químicos ou físicos que são aplicados para que ocorra o enfraquecimento da estrutura das células, protegendo os grânulos de PHAs. (KOURMENTZA *et al.*, 2017).

Por exemplo, o processo de liofilização é o procedimento de secagem que remove a água da biomassa, utilizado tradicionalmente como pré-tratamento, facilitando a extração. Este procedimento apresenta importantes características para os passos posteriores, porém é considerada alto custo para a indústria. (KOURMENTZA *et al.*, 2017).

O processo de purificação tem objetivo de rompimento e liberação espontânea da parede celular dos PHAs, bem como a purificação e o rendimento do grânulo orgânico. No processo de tratamento e extração e recuperação, pesquisadores descrevem a aplicação de combinação de solventes orgânicos tais como: clorofórmio, cloreto de metileno e acetona e álcool e adição de detergentes como como dodecil sulfato de sódio. Outros solventes orgânicos utilizados são o hipoclorito de sódio, dicloroetano e diclorometano, acetona. Métodos mecânicos apresentam alta eficiência quando são combinados com métodos químicos (QUINES *et al.*, 2015).

A escolha dos solventes orgânicos polares como o metanol em vez do clorofórmio no tratamento da produção de PHB é um método viável, devido à remoção de grande quantidade de resíduos do processo fermentativo e pelo fato do gasto de energia para a recuperação na destilação ser considerado relativamente baixo. A partir do objetivo de avaliar a aplicação de diferentes tratamentos para processos de purificação a fim de se obter um polímero de alta pureza, a investigação de Ramos e colaboradores (2018) concluiu que, apesar de terem começado do mesmo material, os materiais resultantes de diferentes extrações eram polímeros com diferentes pontos de fusão, temperaturas de degradação e índices de cristalinidade. Por exemplo, os materiais obtidos na purificação do clorofórmio apresentavam propriedades mecânicas pobres, aparência ruim, sendo amarelados e possuíam forte odor gerado pelo óleo remanescente (RAMOS *et al.*, 2018).

A utilização de extração de PHA com solventes orgânicos é a mais adotada devido à praticidade na sua aplicação, devido à baixa degradação dos polímeros e à elevada pureza do produto extraído. O método que utiliza solventes tóxicos pode ser visto como contraditório, pois os biopolímeros resultantes

gerariam impacto ambiental iguais ou similares aos causados por polímeros derivados de petróleo (QUINES *et al.*, 2015).

Observa-se que as pesquisas que analisam diferentes metodologias para a recuperação e purificação de PHAs, utilizam métodos químicos em pelo menos uma das etapas do processo. Este método tem sido utilizado principalmente na etapa de recuperação ou como pré-tratamento (BISSACOT, 2018).

Os métodos químicos que não usam de agentes tóxicos se mostram como alternativa promissora, pois não geram impactos ambientais e alcançaram percentuais altos de recuperação e pureza. Reforça-se para a recuperação biológica combinada com métodos químicos, pois a técnica carece de estudos. Ainda, a combinação deste com métodos mecânicos ou químicos auxiliaria no rompimento celular e na recuperação polimérica, obtendo-se percentuais mais elevados de pureza e recuperação (BISSACOT, 2018).

Embora os PHA sejam reconhecidos como candidatos à produção de plásticos biodegradáveis, ainda apresentam limitação para sua produção em alta escala, seu alto preço em comparação aos plásticos convencionais, sendo necessário, para isto, buscar uma alternativa ecologicamente correta e economicamente justificada para produzi-lo (DELGADO *et al.*, 2015). Observa-se que os processos de manufatura comercial são prejudicados por conta do alto valor. Elenca-se melhorias na engenharia metabólica e genética, que têm produzido cepas de micróbios, com melhora significativa no rendimento e na capacidade de produção e ainda consigam reduzir os custos gerais (JUDITH *et al.*, 2020).

Enfim, a maioria dos textos abordou o problema dos altos custos dos bioplásticos. Nota-se preocupação com a viabilidade comercial do processo, tendo que o plástico produzido a partir de combustíveis fósseis ainda é consideravelmente mais barato. Também deve citar-se a necessidade do desenvolvimento de mais estudos com o tema em busca da redução dos custos e melhoria dos processos de produção (BISSACOT, 2018).

#### **4 CONCLUSÕES**

O tema é de grande relevância e interesse de indústrias, do governo e do mundo todo, pois há estimativas descritas na problemática de escassez de petróleo em um período próximo, porém o processo para realizar a extração ainda é considerado de alto custo. O uso comercial de bioplásticos produzidos por cepas bacterianas sem dúvida terá um grande potencial a ser utilizado como substituto alternativo a plásticos derivados de petróleo, estimulando pesquisas nessa temática. Alguns fatores que podem ser observados, quanto à limitação do uso dos biopolímeros, se referem à toxicidade média ou alta dos solventes químicos adotados, tendo que o objetivo final da fabricação do bioplástico é que este polímero seja biocompatível e biodegradável ecologicamente. Além disto, outros fatores intrínsecos à produção limitam o uso desses biopolímeros, como o longo período de produção e os custos dos processos fermentativos microbianos. Por fim, as diversas percepções debatidas ao decorrer dos

trabalhos analisados permitem inferir que, em relação à produção de biopolímeros sustentáveis, visando fabricação em larga escala pela indústria, ainda há uma grande trajetória a se percorrer.

## REFERÊNCIAS

BISSACOT, E. P. Comparação de diferentes metodologias para purificação de polihidroxicanoatos: uma revisão bibliográfica. Lume - Repositório digital da UFRGS. 2018.

CHEN, G.. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. In: Plastics from bacteria. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 17-37. DOI:10.1007/978-3-642-03287\_5\_2. Choonut, Aophat & Sangkharak, Kanokphorn. Biofuel from Polyhydroxyalkanoates (PHAs). (2019).

DELGADO, A. C. L.; CORDOBA, A. M.. Polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. Informador técnico, v. 79, n. 1, p. 93-101, 2015. DOI: 79. 83. 10.23850/22565035.139.

DE SOUZA REIS, G. A.; MICHELS, H. A. M.; FAJARDO, G. L.; LAMOT, I.; DE BEST, J. H.. Optimization of green extraction and purification of PHA produced by mixed microbial cultures from sludge. Water, v. 12, n. 4, p. 1185, 2020.

GODBOLE, S.. Methods for identification, quantification and characterization of polyhydroxyalkanoates-a review. International Journal of Bioassays, v. 5, n. 4, p. 2016, 2016. DOI: 10.21746/ijbio.2016.04.005. 2016.

JUDITH L.; FRIDOVICK-KEIL. Bioplastic. Britannica Online Encyclopedia. Data de publica: 2 set. 2020.

KOURMENTZA, C.; PLÁCIDO, J.; VENETSANEAS, N.; BURNIOL-FIGOLS, A.; VARRONE, C.; GAVALA, H. N.; REIS, M. A. M. Recent advances and challenges towards sustainable polihidroxicanoato (PHA) production. Bioengineering, v. 4, n. 2, p. 55, 2017. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>.

LI, Z.; YANG, J.; LOH, X. J. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. NPG Asia Materials, 8(4), 2016. e265–e265. doi:10.1038/am.2016.48.

MADKOUR, M. H.; HEINRICH, D.; ALGHAMDI, M. A.; SHABBAJ, I. I.; STEINBÜCHEL, A.. PHA recovery from biomass. Biomacromolecules, v. 14, n. 9, p. 2963-2972, 2013. <https://doi.org/10.1021/bm4010244>.

MARTÍNEZ, V.; HERENCIAS, C.; JURKEVITCH, E.; PRIETO, M. A.. Projetando uma bactéria predatória como um agente matador proficiente para recuperação de produtos biológicos intracelulares: O caso dos polihidroxicanoatos. Sci. Rep., 6, 24381. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep24381>.

MENDONÇA, T. T.; GOMEZ, J. G.; BUFFONI, E.; SÁNCHEZ RODRIGUEZ, R. J.; SCHRIPSEMA, J.; LOPES, M. S.; SILVA, L. F. Exploring the potential of Burkholderia sacchari to produce polyhydroxyalkanoates. J Appl Microbiol. 2013. Apr;116(4):815- 29. doi: 10.1111/jam.12406. Epub 2013 Dec 13. PMID: 24279348.

MICÁN, M. L. M.; LÓPEZ, S. M. L.; HERNÁNDEZ, Á. T. M. Síntesis de bioplásticos a partir de microorganismos. 2017.

MOZEJKO-CIESIELSKA, J.; SZACHERSKA, K.; MARCINIAK, P.. *Pseudomonas* species as producers of eco-friendly polyhydroxyalkanoates. Journal of Polymers and the Environment, v. 27, n.

6, p. 1151-1166, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01422-1>.

OLIVEIRA-FILHO, E. R.; GUAMÁN, L. P.; MENDONÇA, T. T.; LONG, P. F.; TACIRO, M. K.; GOMEZ, J. G. C.; SILVA, L. F. Production of Polyhydroxyalkanoates Copolymers by Recombinant *Pseudomonas* in Plasmid-and Antibiotic-Free Cultures. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, v. 28, n. 5, p. 225- 235, 2018. DOI: 10.1159 / 000495752.

ONU – Organização das Nações Unidas. *Objetivos de Desenvolvimento Sustentável*. 2018.

PINSKY, V.; KRUGLIANSKAS, I. Inovação tecnológica para a sustentabilidade: aprendizados de sucessos e fracassos. *Estud. av.*, São Paulo, v. 31, n. 90, p. 107-126, May 2017. <https://doi.org/10.1590/s0103-40142017.3190008>.

QUINES, L. K. M.; SCHMIDT, M.; ZANFONATO, K.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. Métodos de extração de Poli-Hidroxiálcanoatos a partir de biomassa bacteriana. *Química Nova*, v. 38, n. 9, p. 1207-1218, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150129>.

RAMOS, A. F.; ESPINOSA, A.; MENDEZ, D.; CABEZA, I.; MORENO-SARMIENTO, N. Purification of Poly (3-hydroxybutyrate) Produced by Fatty Acid Fermentation Using Organic Polar Solvents. *Chemical Engineering*, v. 67, 2018.1.

SINGH, P.; SHARMA, V. P. Integrated plastic waste management: environmental and improved health approaches. *Procedia Environ Sciences* 35:692–700. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.068>.

VIEGAS, Cristhiene Paiva Rohden. Estudo da produção de polihidroxiálcanoatos (PHAs) por *Chromobacterium violaceum*. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. 2005. <http://repositorio.usfsc.br/handle/123456789/101917>

WANG, Y.; CHEN, G.. Polyhydroxyalkanoates: sustainability, production, and industrialization. *Sustainable polymers from biomass*. Wiley VCH, Weinheim, Germany, v. 14, 2017. <https://doi.org/10.1002/9783527340200.ch2>.