

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BACHARELADO)

ANTONIA ROSA SANTOS SOUZA

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOPLÁSTICO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO
MANGUE A PARTIR DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO**

SÃO CRISTÓVÃO/ SE

2024.2

ANTONIA ROSA SANTOS SOUZA

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOPLÁSTICO POR BACTÉRIAS
ISOLADAS DO MANGUE A PARTIR DE FONTES ALTERNATIVAS
DE CARBONO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentada à
Universidade Federal de Sergipe, como
requisito para a obtenção do título de bacharel
em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius de
Aragão Batista

São Cristóvão

2024.2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me dar força, determinação e saúde para seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, meu pai e minha irmã, pelo amor incondicional, e por todo apoio durante esses quatro anos e meio. Vocês foram minha base e motivação para continuar.

Aos meus amigos, que me incentivaram e proporcionaram momentos de descontração ao longo dessa caminhada tornando essa jornada mais leve. Obrigada por estarem sempre ao meu lado!

Ao meu orientador, Professor Marcus Vinicius, por toda dedicação e ensinamento. Agradeço por ser esse excelente orientador, ao qual eu admiro e tenho como inspiração para a minha carreira profissional.

Aos meus colegas de curso, sou grata por todos os momentos compartilhados, pelas trocas de conhecimento, pelo apoio mútuo e pelas amizades construídas ao longo dessa jornada.

E, por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Meu sincero agradecimento!

RESUMO

Os polihidroxibutiratos (PHB) sintetizados por bactérias de mangue são acumulados no interior das células em resposta às condições de estresse do meio ambiente, visando reduzir os impactos causados pelos plásticos convencionais. Por esse motivo, é importante que através da bioprospecção possamos estudar a diversidade de bactérias, a fim de que seja possível realizar uma análise mais detalhada e precisa da síntese do PHB através das bactérias isoladas do mangue utilizando as fontes alternativas de carbono. Esse estudo teve como objetivo analisar a expressão do PHB por meio da bioprospecção de bactérias dos manguezais de Sergipe visando reduzir os custos da produção do bioplástico. Nesse contexto, a pesquisa adotou uma abordagem experimental, permitindo avaliar as características qualitativas e quantitativas das amostras coletadas nos manguezais da Praia Formosa Aracaju, em Sergipe e no Povoado Porto das Cabras na Barra dos Coqueiros. As bactérias em estudo foram isoladas em placas de Petri e identificadas por meio de testes bioquímicos, como coloração de Gram, catalase e urease. Além disso, o teste molecular foi realizado por meio da técnica de PCR para identificar as espécies em estudo. Para produção e extração do PHB, foram utilizadas como fontes alternativas de carbono, o bagaço da cana-de-açúcar, e as cascas de banana e de beterraba. A caracterização desse biopolímero ocorreu por meio de análises das amostras por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Entre os dez isolados bacterianos analisados, os testes bioquímicos identificaram cerca de seis bactérias gram-positivas e quatro gram-negativas. Além disso, todas as amostras apresentaram resultados positivos e negativos, respectivamente para catalase e urease. A partir do teste molecular, cinco amostras foram sequenciadas, permitindo a identificação de três cepas da espécie *Bacillus sp.* e duas da espécie *Aeromonas sp.* Entre as fontes de carbono utilizadas para síntese desse biopolímero, destacamos a casca da banana que resultou nas maiores concentrações de PHB nas bactérias. De modo geral, todas as bactérias apresentaram resultados que indicam a presença de PHB, por meio da vibração do grupo carbonila, metil e éster através da análise por FTIR. Pode-se concluir que a exploração dessas fontes será extremamente importante para as perspectivas futuras relacionadas às diversas aplicações comerciais desse bioplástico.

Palavras-chave: Polihidroxibutiratos (PHB); Bactérias de mangue; Bioplásticos; Fontes de carbono.

ABSTRACT

Polyhydroxybutyrates (PHB) synthesized by mangrove bacteria are accumulated inside the cells in response to environmental stress conditions, aiming to reduce the impacts caused by conventional plastics. For this reason, it is important that through bioprospecting we can study the diversity of bacteria, in order to enable a more detailed and accurate analysis of PHB synthesis by mangrove-isolated bacteria using alternative carbon sources. This study aimed to analyze PHB expression through the bioprospecting of bacteria from the mangroves of Sergipe, with the goal of reducing bioplastic production costs. In this context, the research adopted an experimental approach, allowing for the evaluation of qualitative and quantitative characteristics of samples collected in the mangroves of Praia Formosa in Aracaju, Sergipe, and in the community of Porto das Cabras in Barra dos Coqueiros. The bacteria under study were isolated in Petri dishes and identified through biochemical tests, such as Gram staining, catalase, and urease. In addition, molecular testing was carried out using the PCR technique to identify the species under study. For PHB production and extraction, alternative carbon sources such as sugarcane bagasse and banana and beet peels were used. The characterization of this biopolymer was performed through analysis of the samples using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Among the ten bacterial isolates analyzed, biochemical tests identified approximately six Gram-positive and four Gram-negative bacteria. Furthermore, all samples tested positive and negative, respectively, for catalase and urease. From the molecular test, five samples were sequenced, allowing the identification of three strains of the species *Bacillus* sp. and two of the species *Aeromonas* sp. Among the carbon sources used for the synthesis of this biopolymer, banana peel stood out, resulting in the highest PHB concentrations in the bacteria. Overall, all bacteria showed results indicating the presence of PHB, through the vibration of the carbonyl, methyl, and ester groups as observed in the FTIR analysis. It can be concluded that the exploitation of these sources will be extremely important for future prospects related to the various commercial applications of this bioplastic.

Keywords: Polyhydroxybutyrates (PHB); Mangrove bacteria; Bioplastics; Carbon sources.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| FIGURA 1 - MANGUEZAL DA PRAIA FORMOSA ARACAJU..... | 25 |
| FIGURA 2 - MANGUEZAL DO POVOADO PORTO DAS CABRAS..... | 25 |
| FIGURA 3 - CEPAS BACTERIANAS ISOLADAS EM PLACAS DE PETRI EM MEIO ÁGAR NUTRIENTE | 27 |
| FIGURA 4 - CÉLULA BACTERIANA SECA UTILIZADA PARA A EXTRAÇÃO DO PHB..... | 32 |
| FIGURA 5 - PHB EXTRAÍDO DE CÉLULAS BACTERIANAS APÓS A EVAPORAÇÃO DO CLOROFÓRMIO EM TEMPERATURA AMBIENTE..... | 33 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|-----------|
| GRÁFICO 1- CONCENTRAÇÃO DE PHB PRODUZIDO EM FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO..... | 31 |
| GRÁFICO 2- CONCENTRAÇÃO DE PHB PRODUZIDO POR DIFERENTES ESPÉCIES BACTERIANAS EM FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO..... | 32 |
| GRÁFICO 3- CONCENTRAÇÃO DE PHB PRODUZIDO POR BACTÉRIAS EM DIFERENTES LOCAIS DE COLETA..... | 33 |
| GRÁFICO 4- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1 A₂-BA EM FONTE DE CANA-DE-AÇÚCAR (CP152010.1)..... | 35 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| TABELA 1- RESULTADOS DOS TESTES BIOQUÍMICOS DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DO MANGUE..... | 27 |
| TABELA 2- IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES BACTERIANAS..... | 28 |
| TABELA 3- RESULTADOS DO PESO SECO DAS CÉLULAS BACTERIANAS, PESO DO PHB E CONCENTRAÇÃO DE PHB EM PORCENTAGEM APÓS A EXTRAÇÃO..... | 29 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 1.1 Justificativa..... | 12 |
| 1.2 Referencial Teórico..... | 12 |
| 1.2.1 Impactos socioambientais causados pelo plástico..... | 12 |
| 1.2.2 Diversidade de bactérias que produzem PHB..... | 14 |
| 1.2.3 Genes que atuam na produção do PHB..... | 16 |
| 1.2.4 Biossíntese do PHB..... | 17 |
| 1.2.5 Fontes alternativas de carbono para produção de PHB..... | 18 |
| 1.2.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)..... | 19 |
| 2 OBJETIVOS..... | 21 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 21 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 21 |
| 3 METODOLOGIA..... | 22 |
| 3.1 Coleta de amostras e Isolamento das bactérias..... | 22 |
| 3.2 Identificação bacteriana..... | 22 |
| 3.2.1 Coloração de Gram..... | 22 |
| 3.2.2 Teste de Catalase..... | 23 |
| 3.2.3 Teste Urease..... | 23 |
| 3.3 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA..... | 23 |
| 3.4 Pré-tratamento das fontes de carbono | 24 |
| 3.5 Métodos para produção e extração do PHB..... | 24 |
| 3.6 Cálculo de concentração do PHB..... | 25 |
| 3.7 Análise estatística..... | 25 |
| 3.8 Análise de PHB por espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR)..... | 25 |
| 4 RESULTADOS..... | 26 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 36 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 39 |
| 7 REFERÊNCIAS..... | 40 |
| APÊNDICES A-D..... | 46 |

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos de origem petroquímica possuem uma grande acessibilidade comercial e estão cada vez mais presentes em nosso cotidiano, sendo utilizados desde as indústrias automotivas até a medicina (Ahmady-Asbchin *et al.* 2020; Sharma, 2019). Sua descoberta ocorreu durante o período do século XX, por meio do inventor e empresário belga, Leo Baekeland, responsável por sintetizar o primeiro plástico (Palmeiro-S'anchez *et al.*, 2022).

Contudo, foi somente no período da Segunda Guerra Mundial que a produção desse material cresceu exorbitantemente. Logo, com os avanços nos setores industriais e baixos custos para produção, os plásticos substituíram diversos produtos ao longo dos anos e tornaram-se uma das principais problemáticas associadas à globalização (Adnan *et al.*, 2023; Palmeiro-Sánchez *et al.*, 2022).

Nesse contexto, juntamente à alta produção de plástico sintético, existe o consumo e a difícil degradação desses materiais o que torna o cenário ambiental preocupante. Em consequência disso, esses materiais possuem uma grande cadeia de polímeros estáveis, o que faz com que esses produtos se tornem cada vez mais duráveis (Roja *et al.*, 2019). Dessa maneira, esse material ao longo dos anos foi ganhando maior visibilidade levando ao progresso das indústrias (North; Halden, 2013).

A produção do plástico cresceu cerca de 22 vezes nos últimos 50 anos, fator pelo qual contribuiu para o crescimento da poluição, uma vez que a inserção desse material no cotidiano da humanidade está associada à versatilidade, leveza, e ao baixo teor de energia para ser produzido (Rysbek *et al.*, 2022; North;Halden, 2013). Essas características por sua vez, garantem a esse material um caráter descartável e de uso único, no qual colabora para produção de milhões de toneladas de plástico por ano (Akhlq *et al.*, 2023).

Nos últimos anos a produção de resíduos plásticos cresceu significativamente, devido à alta demanda da sua produção em diversos setores, principalmente em indústrias alimentícias e hospitalares. Entretanto, com o advento da pandemia da COVID-19, houve uma maior utilização de insumos com propriedades de origem petroquímica. A estimativa da manufatura aumentou, aproximadamente, 40% para embalagens e 370% para aplicações médicas (Silva *et al.*, 2021).

Contudo, juntamente a produção exacerbada dos plásticos sintéticos, existe o consumo e o descarte em grande escala o que torna o cenário ambiental mais preocupante. O descarte

inadequado desses resíduos é responsável por uma série de impactos ambientais, visto que acometem milhões de animais por ano, por ingestão e emaranhamento. Além disso, a saúde pública também é afetada, uma vez que os acúmulos desses resíduos são considerados grandes vetores de zoonoses (Bajt, 2021).

Em decorrência do longo período de degradação desses resíduos no meio ambiente, os plásticos recebem influência de fatores bióticos e abióticos, e à medida que ocorre o processo de degradação novos problemas vão sendo gerados, pois os plásticos vão formando partículas cada vez menores denominadas microplásticos e nanoplásticos. Essas partículas são consideradas altamente tóxicas e estão sendo encontradas com maior frequência em órgãos, como os pulmões e estômago (Bucci *et al.*, 2020).

Dentre as diversas alternativas de mitigação, inclui-se a incineração, reciclagem e o despejo em aterros sanitários. Entretanto, foi presumido que esses métodos não são eficazes em termos de sustentabilidade e eficiência. Desse modo, a produção de plásticos biodegradáveis tornou-se uma maneira viável e sustentável de tentar reverter os danos causados pelas ações antrópicas. Nesse sentido, muitas indústrias iniciaram uma busca intensiva pelo desenvolvimento dos plásticos biodegradáveis que apresentam características semelhantes aos plásticos convencionais, entretanto ainda não podem substituí-los totalmente devido aos altos custos de produção (Shen *et al.*, 2020).

Em detrimento a isso, métodos foram desenvolvidos com o objetivo de baratear os custos de produção utilizando fontes alternativas de carbono, como por exemplo o bagaço da cana-de-açúcar, uma fonte sustentável e renovável utilizada pelas bactérias para que realizem de maneira eficiente todo esse processo de produção do PHB. (Adnan *et al.*, 2023; Shen *et al.*, 2020).

PROBLEMA DE PESQUISA

Como as diferentes fontes alternativas de carbono podem influenciar no processo de síntese do PHB por meio de bactérias de manguezal?

HIPÓTESES

- A influência das diferentes fontes de carbono poderá apresentar alterações relevantes no desempenho das bactérias de manguezal na produção do PHB.
- Os impactos ocasionados por ações antrópicas no manguezal podem influenciar a produção de PHB pelas bactérias.

1.1 JUSTIFICATIVA

Considerando os impactos ambientais causados pelos plásticos de origem petroquímica e tendo em vista o elevado custo associado a produção de bioplásticos, torna-se necessário o desenvolvimento de alternativas para baratear este processo. Nesse sentido, é importante que através da bioprospecção possamos estudar a diversidade de bactérias, a fim de que seja possível realizar uma análise mais detalhada e precisa da síntese do PHB através das bactérias isoladas do mangue utilizando as fontes alternativas de carbono, com a intenção de que os produtos finais sejam mais viáveis. Sob essa perspectiva, essa medida sustentável não apenas beneficia o ecossistema local, promovendo o crescimento econômico, mas também assegura a proteção dessa região ambiental, além de impulsionar a inserção dos bioplásticos em diversos mercados econômicos.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Impactos socioambientais causados pelo plástico

O processo de globalização é um dos principais causadores da poluição causada pelo plástico no mundo. Isso se deve ao processo de modernização das indústrias produtoras deste material juntamente com a elevada taxa de consumo desses produtos buscando atender as demandas da população mundial. Em consequência disso, essas mudanças nos padrões de consumo acarretam diversos impactos ambientais devido às produções insustentáveis desse polímero e o seu acúmulo no meio ambiente (Oliveira; Sousa, 2019).

O plástico é um polímero convencional que representa a categoria de material mais produzido mundialmente e isso está intimamente relacionado à obsolescência programada. Em detrimento a isso, o índice de consumismo aumenta significativamente, uma vez que, essa técnica é utilizada por indústrias com o objetivo de reduzir o tempo de vida útil dos materiais e influenciar a população na compra de novos produtos (Oliveira; Sousa, 2019).

Por se tratar de um material de baixo custo de produção e com uma alta durabilidade, esses materiais ao longo dos anos foram ganhando maior visibilidade e acabou substituindo diversos tipos de materiais no mercado de consumo. Dessa maneira, o grande número de plásticos produzidos anualmente vem acarretando impactos socioambientais, uma vez que, o descarte inadequado desse material vem afetando os ecossistemas aquáticos e terrestres, pois a sua difícil degradação forma partículas menores denominadas microplástico e nanoplástico (Oliveira; Sousa, 2019; Arévalo, 2021).

Os prejuízos ambientais ocasionados pela difícil capacidade de degradação deste polímero sintético ocasionam uma preocupação ao se referir à sustentabilidade do planeta, uma vez que são produzidos anualmente cerca de 500 milhões de toneladas desses resíduos (Akhlq *et al.*, 2022). Contudo, esse cenário tornou-se ainda mais agravante com a pandemia da COVID-19 que afetou o planeta em escala global (Arévalo, 2021).

Nesse sentido, a pandemia acarretou diversos impactos significativos nos mais variados setores industriais, entretanto as empresas produtoras de plástico foram as que mais ganharam visibilidade. Diante do cenário que o mundo estava passando, as indústrias produtoras de plástico registraram um aumento significativo devido à alta demanda de compras online e pela necessidade de embalagens resistentes para o uso dos mais variados produtos essenciais. Além disso, a alta demanda por insumos hospitalares levou a uma grande produção e consumo de EPIs (Wang *et al.*, 2020; Arévalo, 2021).

Ademais, é válido ressaltar que as superproduções e o descarte incorreto desses materiais acarretaram uma série de impactos no meio ambiente ocasionados desde a primeira etapa de fabricação até o seu destino final (Nielsen *et al.*, 2020). Por se tratar de materiais de origem petroquímica, o processo de extração e refinamento desse material libera substâncias insolúveis em água. Em detrimento a isso, esses materiais ocasionam alterações no ambiente impactando de maneira direta as atividades fisiológicas e comportamentais dos organismos no ecossistema (Speight, 2016; Lyadova; Petrukhinaa, 2018).

Os plásticos apresentam uma vida útil relativamente curta, geralmente limitada a um único uso, sendo descartados predominantemente em aterros sanitários. Conseqüentemente, essa prática amplia a presença generalizada do plástico no ambiente, levando à sua disseminação nos oceanos, rios e solos, e, por conseguinte, intensificando a poluição ambiental (Chen *et al.*, 2021). Logo, as micropartículas resultantes da ação da luz solar, do vento e das ondas acarretam as preocupações ambientais cada vez maiores, visto que, são partículas que apresentam características tóxicas e bioacumuladoras afetando, por sua vez, todos os níveis de organização biológica (Bajt, 2021; Bucci *et al.*, 2020).

Diversos estudos estão sendo realizados acerca dos efeitos dos fragmentos desses plásticos no meio ambiente. Contudo, já foi possível concluir que essas nanopartículas estão presentes em alimentos, água e até mesmo no ar que respiramos. De certa forma, há uma presunção de que esses fragmentos estão provocando interferências na saúde em escalas subcelulares ou moleculares (Yee *et al.*, 2021). Além disso, os microplásticos também são prejudiciais para o ambiente marinho, visto que, o seu acúmulo nesse ecossistema ocasionou

diversas alterações fisiológicas devido à ingestão dessas micropartículas por esses animais (Bajt, 2021).

Diante do cenário preocupante que o meio ambiente tem apresentado, ações mitigadoras vêm sendo impulsionadas como iniciativas para reverter essa situação. Dentre as alternativas sustentáveis inclui-se a incineração, reciclagem e despejos em aterros sanitários. Entretanto, esses métodos não são tão eficazes em termos de sustentabilidade e eficiência, visto que, a incineração é uma prática comum e apesar de apresentar regulamentações legais, que incluem licenciamento e a presença de dispositivos para filtragem e emissão de gases, essa técnica ainda não é uma solução totalmente eficaz, pois a combustão dos resíduos libera moléculas de carbono na atmosfera (Nagy; Kuti, 2016; Shen *et al.*, 2020).

Outra alternativa sustentável utilizada é a reciclagem, contudo essa prática é muito dispendiosa devido ao elevado custo destinado às execuções dessa atividade. Por isso, é crucial realizar uma seleção cuidadosa de cada material destinado à reciclagem, a fim de que os métodos utilizados sejam apropriados para cada um, o que acrescenta ainda mais desafios ao processo de reciclagem (Faraca *et al.*, 2019). Por fim, destaca-se também os aterros sanitários que devido ao descarte inadequado desses materiais, geram o acúmulo de plásticos que podem contaminar os lençóis freáticos e gerar mais uma adversidade para a saúde (Shen *et al.*, 2020).

Considerando que o mundo tem buscado soluções para reverter os problemas relacionados à poluição causada por resíduos plásticos, uma alternativa que vem ganhando destaque na sociedade é a produção de plásticos biodegradáveis sendo bastante discutida por grandes empresas e instituições científicas. Esses plásticos caracterizam-se por apresentar características e funcionalidades semelhantes aos plásticos convencionais, entretanto estes configuram uma opção mais sustentável (Shen *et al.*, 2020).

1.2.2 Diversidade de bactérias no manguezal que produzem PHB

As bactérias são microrganismos que possuem características que as tornam capazes de produzir polihidroxibutirato (PHB). Entretanto, a escolha desses organismos unicelulares é de extrema importância, visto que, exercem uma influência direta na característica do biopolímero a ser formado. Esses microrganismos, por sua vez, estão presentes em diversos ambientes, como por exemplo, solos, rios, lagos e até mesmo em partículas de materiais orgânicos e inorgânicos que se acumulam no meio ambiente (Thatoi *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2016)

Dentre os ecossistemas presentes em nosso país, o manguezal é considerado um dos mais importantes, pois além de ocupar grande área do território brasileiro os mangues se caracterizam por apresentar uma grande quantidade de microrganismos, como por exemplo

fungos e bactérias. Esses por sua vez, apresentam uma alta atividade metabólica importante para o meio ambiente o que torna essa área importante para o desenvolvimento de atividades biotecnológicas (Santos *et al.*, 2014).

Além disso, os mangues são umas das áreas que apresentam a região do solo com grande riqueza de nutrientes e matéria orgânica (Santos *et al.*, 2014). Em detrimento a isso, as bactérias encontradas neste ecossistema tornam-se importantes para a produção do biopolímero. Elas, por sua vez, são capazes de se adaptar às diferentes condições de desequilíbrio que os manguezais se encontram, além de possuir uma excelente capacidade de absorver nutrientes e manter o fluxo de carbono nesses locais (Holguin *et al.*, 2001).

A biodiversidade das bactérias presentes nesse ecossistema é possível devido a grande variabilidade genética desses microrganismos que através da excelente capacidade reprodutiva torna possível a transmissão de novos genes adaptativos. A partir dessas características, esses microrganismos conseguem desenvolver mecanismos de resistência contra ataques de patógenos, o que garante uma boa adaptabilidade nesses locais. Em vista disso, essas bactérias tornam-se uma alternativa promissora para a produção do biopolímero, levando em consideração o alto índice de atividade metabólica que elas possuem (Holguin *et al.*, 2001).

Em síntese, é importante ressaltar que a atividade da população bacteriana nos ecossistemas tropicais é de extrema importância, uma vez que elas possuem uma alta capacidade de catalisar diversas reações bioquímicas. Essa característica, por sua vez, garante que essas bactérias sejam capazes de produzir produtos biológicos, como os plásticos biodegradáveis, por meio de atividades biotecnológicas (Holguin *et al.*, 2001). Com isso, esses microrganismos diferenciam-se por acumular PHB aerobicamente e anaerobicamente sob condições de estresse tanto em ambientes naturais, quanto em laboratório (Chee *et al.*, 2014; Roja *et al.*, 2019).

Diante da grande diversidade de bactérias presentes nesses ambientes, pode-se destacar algumas espécies de bactérias capazes de produzir esse biopolímero, dentre elas estão, *Alteromonas lipolytica*, *Bacillus megaterium*, *Halomonas campaniensis*, *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*, *Cupriavidus spp.*, arqueobactérias e methylobactérias (Mozejko-Ciesielska; Kiewisz, 2016).

No entanto, os estudos de Krishnan *et al.* (2021) e Lee *et al.* (2022) observaram que as *Bacillus spp.* caracterizam-se por acumular quantidades relativamente altas de PHB no interior de suas células quando submetidas a condições de estresse. Além disso, as *Aeromonas spp.* também tem mostrado eficiência na síntese desse biopolímero segundo Amir *et al.* (2022) e

devido a essa alta capacidade de armazenamento esses microrganismos tornam-se candidatos ideais para a aplicação dessas atividades biotecnológicas.

1.2.3 Genes que atuam na produção do PHB

A utilização de microrganismos para a síntese de PHB é essencial, visto que, esse biopolímero auxilia na reserva energética intracelular dessas bactérias, como também fornecem energia para as mesmas. Além desses microrganismos, existem genes que atuam na produção de enzimas as quais são cruciais para o desenvolvimento do PHB (Sudesh, 2000).

Nesse sentido, foi necessário realizar estudos que envolvessem a identificação e a caracterização dos genes relacionados com a biossíntese do PHB. Entretanto, foi apenas na década de 1970 que ocorreram grandes revoluções no ramo da biologia molecular com o objetivo de proporcionar novos estudos nessa área de produção. Logo, essa análise só foi possível décadas depois quando o gene responsável pela síntese das enzimas que produz o polihidroxialcanoato (PHA) foi clonado pela primeira vez em uma bactéria da espécie *Ralstonia eutropha* (Peoples; Sinskey, 1989).

Esse processo de síntese ocorre através de uma sequência de reações enzimáticas sendo a acetil-CoA seu principal precursor. Essas reações incluem as etapas de condensação, redução e polimerização (Soni *et al.*, 2023; Sharma, 2019). A primeira etapa dessa via ocorre quando a β -cetotiolase (codificada pelo gene *phbA*) através da reação de condensação reversível converte a acetil-CoA em acetoacetil-CoA. Em seguida, a acetoacetil-CoA redutase ligada ao NADPH (codificada pelo gene *phbB*) sofre redução e converte a acetoacetil-coA em 3-hidroxiacetil-CoA. Esse por sua vez, passa pelo processo de polimerização através da PHB sintase (codificada pelo gene *phbC*) e dá origem ao PHB (Chandani *et al.*, 2018).

Dentre os genes responsáveis pela produção do PHB, apenas o *phbC* mostrou-se mais eficaz para a biossíntese desse biopolímero. Isso ocorre, pois, esse gene apresenta uma alta especificidade na finalização da via metabólica a qual direciona as fontes de carbono exclusivamente para a síntese de PHB. Dessa forma, a expressão do *phbC* torna-se eficiente quando comparada a expressão dos genes *phbA* e *phbB*, visto que, esses não direcionam as fontes de carbono exclusivamente para a síntese do PHB, redirecionando-as para outras vias metabólicas da bactéria (Chou *et al.*, 2009; Paganelli *et al.*, 2020).

1.2.4 Biossíntese do PHB

O polihidroxiacetato, um dos primeiros polihidroxiácidos (PHA) a serem explorados, teve sua primeira extração realizada pelo biólogo francês Maurice Lemoigne em 1925. Contudo, apenas anos mais tarde, pesquisadores como Macrae e Wilkinson conseguiram confirmar que o PHB era uma molécula de reserva. Posteriormente, estudos sobre as vias metabólicas do PHB foram conduzidos para aprofundar a compreensão desse biopolímero (Akhlaq *et al.*, 2023; Palmeiro-Sánchez, 2016).

Os polihidroxiacetatos (PHA) constituem um tipo de plástico biodegradável com grande relevância no cenário socioeconômico. Esse modelo de bioplástico caracteriza-se por formar no interior das células bacterianas grânulos anfipáticos que garante uma ausência de toxicidade e alto poder de biodegradação nos mais variados tipos de ambiente (Rojas *et al.*, 2019; Thapa *et al.*, 2018). Além disso, os PHAs apresentam propriedades físicas e químicas que os tornam candidatos promissores para substituir os plásticos convencionais. Sua parcial cristalinidade, durabilidade, estabilidade química e termoplastia os posicionam como alternativas eficazes (Adnan *et al.*, 2023; Szuman *et al.*, 2016).

Durante o período do século XX, também se observou a síntese do PHB por diversos microrganismos, sendo mais comum em cianobactérias, certas espécies de microalgas, bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de bactérias fotossintéticas. Contudo, devido ao papel metabólico exemplar desses microrganismos, a síntese do PHB destaca-se especialmente nos gêneros *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Bacillus* e *Pseudomonas* (Akhlaq *et al.*, 2023; Palmeiro-Sánchez, 2016).

Nesse contexto, a síntese do PHB está intrinsecamente ligada ao metabolismo bacteriano. O processo de produção ocorre ao submeter esses microrganismos a uma condição de excesso de carbono e restrição de nutrientes, como fósforo ou nitrogênio. Dessa forma, as bactérias conseguem acumular esse polímero no interior das células e no citoplasma. Assim, para maximizar a eficácia desse processo de síntese, é essencial que esses microrganismos acumulem o polímero por meio da utilização econômica de fontes alternativas de carbono (Akhlaq *et al.*, 2023).

As principais fontes de carbono utilizadas para síntese desse biopolímero são provenientes de açúcares, ácidos graxos, ácido butírico, além de utilizarem substratos de carbono renováveis como milho, banana, beterraba e cana-de-açúcar, que sejam economicamente viáveis e acessíveis para a fermentação microbiana e produção do PHB (Brito *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2017; Fady Abd El-Malek *et al.*, 2020). É mediante o uso desses

elementos que se desencadeia a síntese da acetil-coA, molécula responsável pela formação deste biopolímero e de outros biomateriais (Muller-Santos *et al.*, 2021).

O ambiente que as bactérias colonizam influencia diretamente o acúmulo e a mobilização do PHB. Assim, o processo de síntese também está intrinsecamente ligado a esse fator, pois bactérias adaptadas a ambientes extremos, caracterizados por alta salinidade e altas temperaturas, geralmente acumulam PHB. Desta maneira, durante a fase estacionária ou de declínio, esses microrganismos conseguem converter essa fonte de carbono em acetil-coA, acumulando PHB para auxiliar na reserva de carbono e enfrentar a escassez de energia durante a sobrevivência. Por isso, tornou-se de extrema importância o aperfeiçoamento da conversão dessas fontes em acetil-coA, com o objetivo de atingir altos padrões de produção de PHB (Muller-Santos *et al.*, 2021; Yuan; Ching, 2016).

1.2.5 Fontes alternativas de carbono para a produção de PHB

Os plásticos biodegradáveis vêm ganhando visibilidade no mercado econômico, diante dos impactos que os plásticos de origem petroquímica têm acarretado para o meio ambiente. No entanto, os altos custos destinados a essa atividade têm inviabilizado a sua produção em larga escala e conseqüentemente a sua introdução no mercado econômico. Em detrimento a esse impasse, as fontes alternativas de carbono tornaram-se uma das principais estratégias para reverter esse cenário, uma vez que elas se caracterizam pela sua acessibilidade econômica (El-Kadi *et al.*, 2021; Akhlaq *et al.*, 2023).

A escolha da fonte ideal é de extrema importância, visto que elas são os fatores primordiais para a síntese do PHB. Dessa maneira, os resíduos de frutas, como as cascas e bagaços que na maioria das vezes são descartados por não possuírem valor são consideradas ótimas alternativas sustentáveis. Com isso, esses resíduos contribuem para o processo de fermentação devido ao alto teor de açúcar e ao seu baixo custo contribuindo para a redução de impactos no meio ambiente (Anderl *et al.*, 2021). Entre as fontes econômicas consideradas bastante promissoras e utilizadas nesse trabalho, destacam-se as cascas de frutas e vegetais como a banana e a beterraba, respectivamente, além do bagaço da cana-de-açúcar (Du *et al.*, 2012).

Diante disso, a casca da banana é considerada um substrato de grande relevância para a produção do PHB, uma vez que é uma fruta bastante consumida no Brasil, e seus resíduos, como a casca, geralmente são descartados. Nesse contexto, a aplicação desse subproduto na síntese desse biopolímero ganha destaque por contribuir para redução da quantidade de rejeitos que são destinados aos aterros sanitários, como também aprimora as tecnologias sustentáveis.

Além disso, ela caracteriza-se por ser rica em celulose e hemicelulose que facilmente são convertidas em glicose, permitindo armazenar esse biopolímero com grande eficácia no interior das células de diferentes cepas bacterianas (Naranjo *et al.*, 2014; Kulkarni *et al.*, 2015; Mishra; Panda, 2023).

Outrossim, a casca da beterraba caracteriza-se por compor uma vasta riqueza de fibras, proteínas, açúcares e compostos bioativos, como a betalaína responsável pela sua coloração avermelhada (Brwa Khalid Shakir; Simone, 2024). No entanto, embora alguns estudos tenham utilizado outros substratos da beterraba, como a polpa e o melão na produção do PHB (El-Kadi *et al.*, 2021; Marzo-Gago; Díaz; Blandino, 2023), a aplicabilidade da casca da beterraba como fonte de carbono ainda é pouco explorada. Em vista disso, considerando que a casca de diversos subprodutos, apresentam alto teor de glicose e são aplicados na biossíntese do PHB (El-Kadi *et al.*, 2021; Mourão *et al.*, 2021; Penkhrue *et al.*, 2020), a utilização da casca da beterraba nesse ramo biotecnológico torna-se uma alternativa promissora dentro desse ramo sustentável.

Além disso, o bagaço da cana-de-açúcar destaca-se como uma excelente fonte energética e, assim como a banana, possui uma grande relevância comercial, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde há uma grande comercialização do caldo de cana, além do uso da cana-de-açúcar para produção de açúcar em usinas. Em consequência disso, essas atividades comerciais resultam no descarte de toneladas de bagaço desse substrato, tornando-se um dos maiores resíduos agrícolas do mundo. Nesse sentido, a biomassa dessa fonte apresenta alto teor de polissacarídeos, o que garante a sua utilização como fonte sustentável para produção do PHB (Hassan; Ngo; Ball, 2024). Desse modo, o estudo de Khamberk; Thammasittirong; Thammasittirong, (2024) conseguiu observar a eficácia dessa fonte de carbono a partir das altas taxas de rendimentos desse biopolímero em *Bacillus spp.*

1.2.6 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia é uma técnica que estuda a inter-relação entre as radiações eletromagnéticas e a matéria, a partir dela é possível obter os níveis de energia, como também as transições das espécies atômicas e moleculares. Essa mudança na conformação energética só é possível devido à movimentação dos elétrons ao redor do núcleo, que permite obter diferentes estágios os quais são denominados de estados eletrônicos. Ao longo do tempo, a espectroscopia evoluiu significativamente e um marco importante foi a descoberta da radiação infravermelha no século XVIII, pelo astrônomo alemão William Herschel (Lima, 2021).

A partir dessa descoberta, foi possível obter novas possibilidades para o estudo dessas interações na região do infravermelho, uma vez que, possuem comprimentos de onda que variam de 0,78 a 1000 μm . Essa região, por sua vez, apresenta três dimensões distintas de comprimentos de ondas, entre elas podemos citar, a região no infravermelho próximo (NIR-Near Infrared), a radiação no infravermelho médio (MIR-Middle Infrared) e a região no infravermelho distante (FIR-Far Infrared). Por meio delas, é possível observar comprimentos de ondas distintos capazes de informar características químicas e físicas associadas a cada molécula (Lima, 2021).

Essa técnica por sua vez, permite analisar e caracterizar o PHB através dos grupos químicos da fase orgânica presentes nos compostos extraídos (Adnan *et al.*, 2021; Trakunjae *et al.*, 2021). A análise consiste em observar características do comprimento de onda que varia entre o alongamento e a vibração de deformação e cada uma delas corresponde aos grupos funcionais (Adnan *et al.*, 2022). Nesse caso, o PHB apresenta bandas específicas, como por exemplo a presença do grupo carbonila (C=O), como também do grupo éster e o grupo -CH que classificam a amplificação desse biopolímero (Trakunjae *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a produção do PHB por meio da bioprospecção de bactérias dos manguezais de Sergipe visando reduzir os custos da produção do bioplástico.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar e identificar bactérias provenientes de solo de manguezais para a produção de PHB.
- Induzir a produção do PHB através do processo de bioprospecção utilizando diferentes fontes alternativas de carbono.
- Realizar uma análise comparativa da produção de PHB através das bactérias coletadas nas diferentes áreas de manguezais.
- Analisar e comparar a produção do PHB em bactérias quando cultivadas em diferentes fontes alternativas de carbono.
- Realizar a análise estatística do tipo ANOVA para identificar se há diferenças significativas entre os grupos formados pelos distintos manguezais, tipos de fontes de carbono e gêneros bacterianos avaliados.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta de amostras e isolamento das bactérias

Ao longo deste estudo, foram utilizadas 10 amostras de solo de manguezais previamente coletadas em um estudo anterior realizado pelo grupo de pesquisa, sendo 3 localizadas na Praia Formosa Aracaju, no Bairro 13 de Julho (-10.931587, -37.046771) no município de Aracaju-SE e 7 no povoado Porto das Cabras, na Barra dos Coqueiros-SE (-10.810508, -36.955369) com a finalidade de isolar bactérias produtoras de PHB. A coleta das amostras de solo foi realizada utilizando um tubo de sucção a 15 cm de profundidade, as mesmas foram transferidas para um microtubo de 2 mL, a fim de mantê-las armazenadas. Posteriormente, essas amostras foram levadas para o Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e foram armazenadas em 4°C. Após esse processo de coleta, as amostras foram diluídas em 0,85% de solução salina e posteriormente as cepas foram incubadas em placas de petri contendo meio Triptona Soja e ágar durante 48h a 35°C. Logo após o crescimento das bactérias foram preparados meios de cultura com Nutrient Broth e ágar para o isolamento das colônias das bactérias identificadas.

3.2 Identificação bacteriana

Após isolar as bactérias foi necessário realizar testes bioquímicos, a fim de identificar o gênero das bactérias, como também analisar a integridade das colônias isoladas. Os testes realizados foram: coloração de gram, catalase e urease.

3.2.1 Coloração de Gram

A coloração de gram é um teste que permite caracterizar e classificar morfologicamente as bactérias de acordo com as características da parede celular. Desse modo, para a sua execução foi necessário realizar esfregaços das cepas nas lâminas e adicionar a ele corantes específicos, como violeta-de-metila durante 15 segundos e posteriormente foi realizada a lavagem da lâmina sob água corrente. Em seguida, foi adicionado a lâmina lugol durante 1 min, e após isso foi necessário lavar novamente sob água corrente e adicionar álcool etílico (99,5° GL) sobre a lâmina deixando secar para posteriormente ser visualizado no microscópio. Após todo esse processo, a análise das lâminas permitiu classificar as bactérias em dois grupos: Gram-positivos e Gram-negativos.

3.2.2 Teste de catalase

O teste da catalase consiste em verificar se as bactérias têm a capacidade de produzir a enzima catalase a partir do isolamento de cepas (Shoib *et al.*, 2020). Desse modo, para a realização desse teste foi necessário realizar esfregaços das bactérias em lâminas e em seguida aplicar 1 gota de peróxido de hidrogênio e observar se ocorreu a formação de bolhas, que são indicativos de resultados positivos.

3.2.3 Teste de Urease

O teste de Urease visa auxiliar na identificação de bactérias que são capazes de sintetizar a enzima urease através da inoculação de bactérias em meio constituído por Ureia, desse modo tornou-se possível classificar se a bactéria é negativa para esse teste observando se elas se não se enquadram nos gêneros *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (Shoib *et al.*, 2020). Logo, para esse procedimento foi realizado o crescimento dessas bactérias no meio de cultura contendo ureia as quais foram incubadas na estufa por 35°C. Dessa maneira, o microrganismo que possuir a urease conseguirá degradar a ureia aumentando o pH do meio que conseqüentemente à medida que se eleva altera a coloração do meio e através dessa análise visual torna-se possível determinar se as bactérias possuem ou não a presença da urease.

3.3 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

Para realizar a identificação da espécie bacteriana que está sendo estudada foi necessário realizar a extração do DNA dessas bactérias utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA), seguindo as instruções do fabricante. Para a PCR, foram utilizadas as instruções do protocolo a seguir: 3 µL de DNA genômico, 0,04 µL de Taq-polimerase, 2,75 µL de solução tampão, 0,5 µL de dNTPs e 1,10 µL de MgCl₂. Todos esses reagentes foram utilizados em uma concentração de 25 mM, juntamente com 20,86 µL de água ultrapura. O gene específico (16S) da bactéria a ser identificada foi amplificado utilizando 0,5 µL de cada primer, 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), ambos em uma concentração de 10 mM. As amostras foram submetidas a 35 ciclos de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; seguido de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 53°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. Após esse procedimento, visando analisar a eficiência da amplificação, foi realizada eletroforese em gel contendo 1% de agarose (Idris *et al.*, 2022; Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989). As amostras amplificadas posteriormente foram

purificadas utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA), cumprindo o protocolo do fabricante. Em seguida, o sequenciamento de cada amostra foi realizado uma vez, aplicando o método Sanger, responsável por sequenciar amostras de até 900 pares de base. Para a análise dos dados das sequências foi utilizado o software Staden Package composto pelos programas Trevo, Pregap4 e Gap4, que permitem, respectivamente, visualizar os arquivos, preparar os dados do sequenciamento e montar as sequências. Por fim, essas sequências foram inseridas no BLASTn, um programa de alinhamento local que utiliza o Genbank para comparar as sequências em estudo com aquelas armazenadas nesse banco de dados, a fim de identificar similaridades.

3.4 Pré-tratamento das fontes de carbono

As fontes alternativas de carbono testadas foram o bagaço da cana de açúcar, casca de banana e casca de beterraba. Desse modo, foi necessário realizar a hidrólise dessas fontes de carbono, visando extrair glicose, a qual foi adicionada ao meio de fermentação para produzir o PHB. O processo de hidrólise requer a utilização de um ácido, nesse caso foi utilizado ácido sulfúrico a 2%. Em seguida, a solução foi submetida a altas temperaturas (121°C) para garantir uma extração eficiente da glicose. E ao final desse processo foi importante ajustar o pH para 7.

3.5 Métodos para produção e extração do PHB

A produção do PHB consiste em realizar a fermentação das bactérias em meio a restrições de nutrientes. Para isso, as bactérias selecionadas foram inoculadas inicialmente em 5 mL de Nutrient Broth e incubadas por 24h a 37°C. Após esse procedimento, o inóculo ativo foi inoculado em 50 mL de meio de sal mineral (Extrato de levedura- 0,16 g/L; CaCl₂- 0,02 g/L; MgSO₄- 0,52 g/L; K₂HPO₄- 1,52 g/L; NaPO₄- 4g/L; glicose- 40g/L). Adicionaram-se também 0,1 mL de oligoelementos e 2 mL do hidrolisado da cana, banana e beterraba, e posteriormente a solução foi então incubada a 150 rpm a 37°C durante 48h na incubadora shaker. Após as 48h de incubação, 10 mL desse inóculo foram transferidos para tubos autoclavados, e os mesmos foram centrifugados durante 20 min a 3000 rpm. Os pellets de células foram lavados duas vezes com água destilada estéril e posteriormente a biomassa foi seca a 50°C durante 24h. Seguidamente, essa biomassa recebeu 5 mL de hipoclorito de sódio (4% v/v) e foi incubada a 50°C durante 2h. Em seguida, o material foi novamente centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm, sendo lavado sequencialmente com água destilada, acetona e metanol. Posteriormente, adicionou-se clorofórmio aquecido a 40°C durante 2h.

3.6 Cálculo da concentração do PHB

Foram adicionados 2mL de clorofórmio aquecido à biomassa celular, e para obter o PHB a solução foi deixada evaporar durante 24h à temperatura ambiente em placas de Petri esterilizadas. Após isso, o precipitado formado foi usado para determinar o peso do PHB em g/L. Desse modo, a concentração do PHB em porcentagem foi determinada pelo cálculo do peso do PHB em relação ao peso da célula seca obtido a partir da seguinte fórmula:

$$PHB (\%) = \frac{Peso\ do\ PHB\ (g/L)}{Peso\ da\ célula\ seca\ (g/L)} \times 100$$

3.7 Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram analisados por ANOVA de dois fatores a partir do software Graphpad considerando valores de p menores que 0,05 para avaliar o nível de significância. Além disso, foi realizado um teste Post-hoc (Teste de Tukey e Teste de Šídák's) para verificar se os grupos referentes aos diferentes manguezais, fontes de carbono e gêneros bacterianos apresentavam diferenças significativas entre si (Khamberk; Thammasittirong; Thammasittirong, 2024).

3.8 Análise de PHB por espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia por transformada de Fourier é uma técnica utilizada para analisar os compostos orgânicos, inorgânicos e poliméricos (Adnan *et al.*, 2022). Dessa maneira, as células bacterianas em estudo foram secas em estufa durante 24h, a fim de retirar toda umidade da amostra. Em seguida, as mesmas foram maceradas em um almofariz até obter a formação de um pó fino e logo após, foi triturada juntamente com brometo de potássio (KBr), uma substância responsável por diluir a amostra sólida e garantir a transparência à luz infravermelha. Os espectros foram analisados em uma faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, direcionando uma maior atenção para as bandas entre 1800 - 1600 cm⁻¹ que caracteriza o estiramento de carbonila (C=O), considerado de extrema importância para detectar o PHB.

4 RESULTADOS

4.1 Coleta de amostras e isolamento bacteriano

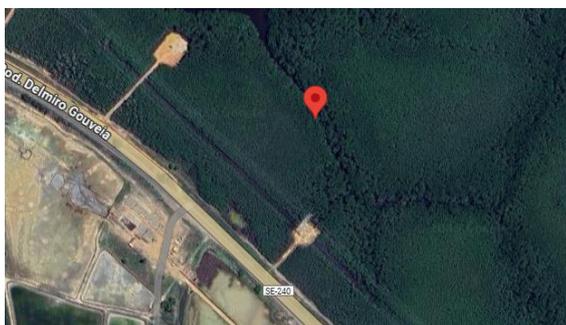
As coletas realizadas nos manguezais da Praia Formosa Aracaju (-10.931587, -37.046771) (Figura 1) e no povoado Porto das Cabras (-10.810508, -36.955369) (Figura 2) resultaram um total de 10 cepas bacterianas que foram designadas a partir do local de coleta por meio do sufixo 13 referente a Treze de Julho e o sufixo BA referente as bactérias coletadas no Povoado Porto das Cabras.

FIGURA 1 - MANGUEZAL DA PRAIA FORMOSA ARACAJU



Fonte: Google Maps

FIGURA 2 – MANGUEZAL DO POVOADO PORTO DAS CABRAS



Fonte: Google Maps

O isolamento das cepas bacterianas foi realizado repetidamente até a obtenção de uma única colônia (Figura 3), utilizando o meio de cultura Ágar Nutriente, específico para o crescimento das bactérias, permitindo selecionar as colônias que apresentaram um bom crescimento.

FIGURA 3 - CEPAS BACTERIANAS ISOLADAS EM PLACAS DE PETRI EM MEIO ÁGAR NUTRIENTE



Fonte: Acervo pessoal (2024)

4.2 Identificação bacteriana baseados nos testes bioquímicos

Os isolados bacterianos (10) obtidos foram submetidos a testes bioquímicos, a fim de identificar o gênero e a integridade das colônias. A tabela 1 apresenta os resultados dos testes bioquímicos das bactérias isoladas e de acordo com a Coloração de Gram, foi possível obter Coloração Gram-negativo em quatro cepas bacterianas (1A₁-BA; 1A₂-BA; 1B - BA; 2.1A₁-BA). E, cerca de seis cepas bacterianas apresentaram Coloração Gram-positiva (2.1A-BA; 2.1B1-BA; 2.1B2-BA; 1.1A₁-13; 1.1A₂-13; 2.1A-13). Já na Catalase e Urease, todas as cepas demonstraram resultados positivos e negativos, respectivamente.

TABELA 1 – RESULTADOS DOS TESTES BIOQUÍMICOS DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DO MANGUE

| Cepas | Coloração de Gram | Catalase | Urease |
|-----------------------|-------------------|----------|----------|
| 1A ₁ -BA | Gram-negativo | Positiva | Negativa |
| 1A ₂ -BA | Gram-negativo | Positiva | Negativa |
| 1B - BA | Gram-negativo | Positiva | Negativa |
| 2.1A-BA | Gram-positivo | Positiva | Negativa |
| 2.1A ₁ -BA | Gram-negativo | Positiva | Negativa |
| 2.1B1-BA | Gram-positivo | Positiva | Negativa |
| 2.1B2-BA | Gram-positivo | Positiva | Negativa |

| Cepas | Coloração de Gram | Catalase | Urease |
|-----------------------|-------------------|----------|----------|
| 1.1A ₁ -13 | Gram-positivo | Positiva | Negativa |
| 1.1A ₂ -13 | Gram-positivo | Positiva | Negativa |
| 2.1A-13 | Gram-positivo | Positiva | Negativa |

Fonte: Do autor.

4.3 Identificação bacteriana baseada nos testes moleculares

O DNA genômico foi extraído dos isolados bacterianos e foi realizada a amplificação por PCR do gene 16S rRNA seguida de eletroforese em gel de agarose, a fim de caracterizar os gêneros das cepas. Desse modo, a amplificação no padrão de bandas com cerca de 700 pb acompanhado do sequenciamento evidenciou na tabela 2, a identificação dos gêneros bacterianos de modo que as cepas 1A₁-BA; 1A₂-BA; 2.1A₁-BA classificadas como o gênero *Bacillus sp.* apresentaram índice de similaridade de (98,51%; 100%; 99,49%) respectivamente. Ademais, as cepas 2.1A-BA; 2.1A-13 classificadas como o gênero *Aeromonas sp.* mostraram índice de similaridade de (98,74%; 96,99%) respectivamente.

TABELA 2 – IDENTIFICAÇÃO DOS GÊNEROS BACTERIANOS

| Cepas | Gênero | Índice de similaridade (%) | E-value | Código da sequência |
|-----------------------|----------------------|----------------------------|-----------|---------------------|
| 1A ₁ -BA | <i>Bacillus sp.</i> | 98,51% | 9,00E-24 | <u>CP093150.1</u> |
| 1A ₂ -BA | <i>Bacillus sp.</i> | 100% | 0.0 | <u>CP152010.1</u> |
| 2.1A-BA | <i>Aeromonas sp.</i> | 98,74% | 0.0 | <u>CP061477.1</u> |
| 2.1A ₁ -BA | <i>Bacillus sp.</i> | 99,49% | 0.0 | <u>CP152032.1</u> |
| 2.1A-13 | <i>Aeromonas sp.</i> | 96,99% | 7,00E-178 | <u>CP077394.1</u> |

Fonte: Do autor.

4.4 Efeitos das diferentes fontes alternativas de carbono na produção do PHB

A tabela 3 mostra os resultados do peso celular seco, peso do PHB extraído e a sua concentração em porcentagem. Diante disso, as bactérias foram submetidas a três tipos fontes alternativas de carbono, sendo elas bagaço da cana-de-açúcar, casca de banana e casca de

beterraba. Desse modo, a fonte proveniente da casca da banana apresentou maiores concentrações de PHB nas cepas, 1B-BA, 2.1A-BA, 2.1B₂-BA, 1.1A₂-13 (100%, 100%, 50%, 100%). Outrossim, ao analisarmos a fonte resultante da casca da beterraba observou-se que a segunda maior concentração de PHB foram obtidas pelas cepas 1B-BA, 2.1B₂-BA, 1.1A₂-13, 2.1A-13 (100%, 30%, 100%, 25%). No entanto, a fonte provinda do bagaço da cana-de-açúcar evidenciou menores quantidades relativas de PHB nas cepas 1A₂-BA, 2.1A₁-BA, 2.1B₂-BA, 2.1A-13 (11,6%, 5,56%, 6,25%, 20%), com exceção da cepa 1.1A₁-13 (42,8%) que exibiu maior valor de PHB.

TABELA 3 - RESULTADOS DO PESO SECO DAS CÉLULAS BACTERIANAS, PESO DO PHB E CONCENTRAÇÃO DE PHB EM PORCENTAGEM APÓS A EXTRAÇÃO

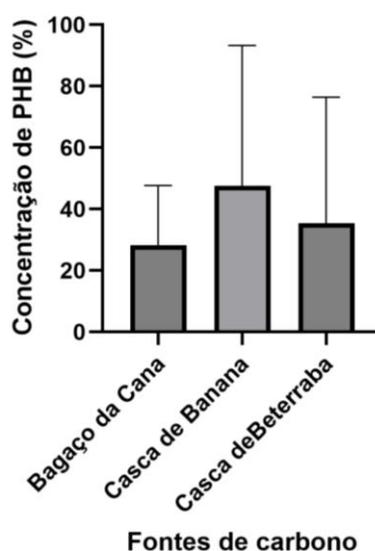
| Fontes de carbono | Peso da célula seca (g/L) | Peso do PHB (g/L) | Concentração de PHB (%) |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1A₂-BA | | | |
| Bagaço da cana-de-açúcar | 0,06 | 0,007 | 11,6% |
| Casca de banana | 0,07 | 0,007 | 10% |
| Casca de beterraba | 0,1 | 0,008 | 8% |
| 1B-BA | | | |
| Bagaço da cana-de-açúcar | 0,01 | 0,004 | 40% |
| Casca de banana | 0,02 | 0,02 | 100% |
| Casca de beterraba | 0,02 | 0,02 | 100% |
| 2.1A-BA | | | |
| Bagaço da cana-de-açúcar | 0,04 | 0,02 | 50% |
| Casca de banana | 0,01 | 0,01 | 100% |
| Casca de beterraba | 0,07 | 0,003 | 4,3% |
| 2.1A₁-BA | | | |

| | | | |
|---------------------------------|------|-------|-------|
| Bagaço da cana-de-açúcar | 0,09 | 0,005 | 5,56% |
| Casca de banana | 0,1 | 0,01 | 10% |
| Casca de beterraba | 0,2 | 0,03 | 15% |
| 2.1B₂-BA | | | |
| Bagaço da cana-de-açúcar | 0,08 | 0,005 | 6,25% |
| Casca de banana | 0,02 | 0,01 | 50% |
| Casca de beterraba | 0,1 | 0,03 | 30% |
| 1.1A₁-13 | | | |
| Bagaço da cana-de-açúcar | 0,07 | 0,03 | 42,8% |
| Casca de banana | 0,2 | 0,008 | 4% |
| Casca de beterraba | 0,3 | 0,003 | 1% |
| 1.1A₂-13 | | | |
| Bagaço da cana-de-açúcar | 0,02 | 0,01 | 50% |
| Casca de banana | 0,01 | 0,01 | 100% |
| Casca de beterraba | 0,01 | 0,01 | 100% |
| 2.1A-13 | | | |
| Bagaço da cana-de-açúcar | 0,03 | 0,006 | 20% |
| Casca de banana | 0,01 | 0,006 | 6% |
| Casca de beterraba | 0,08 | 0,02 | 25% |

Fonte: Do autor.

O gráfico 1 é resultante da análise de variância (ANOVA) de dois fatores que foi realizada com o intuito de avaliar diferenças estatisticamente significativas nas diferentes fontes de carbono utilizadas na síntese do PHB. Os resultados obtidos apresentaram um valor de $p = 0,01$ indicando um efeito significativo em pelo menos uma fonte de carbono, especificamente a casca da banana, que conforme ilustrado no gráfico, apresenta maiores concentrações em relação às demais. O teste de comparação múltipla de Tukey, por sua vez, resultou valores de $p > 0,05$ para todas as comparações individuais entre as fontes em estudo, esboçado no gráfico a partir das altas taxas de variações internas de cada fonte, demonstrando não haver diferenças significativas entre elas.

GRÁFICO 1- CONCENTRAÇÃO DE PHB PRODUZIDO EM FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO

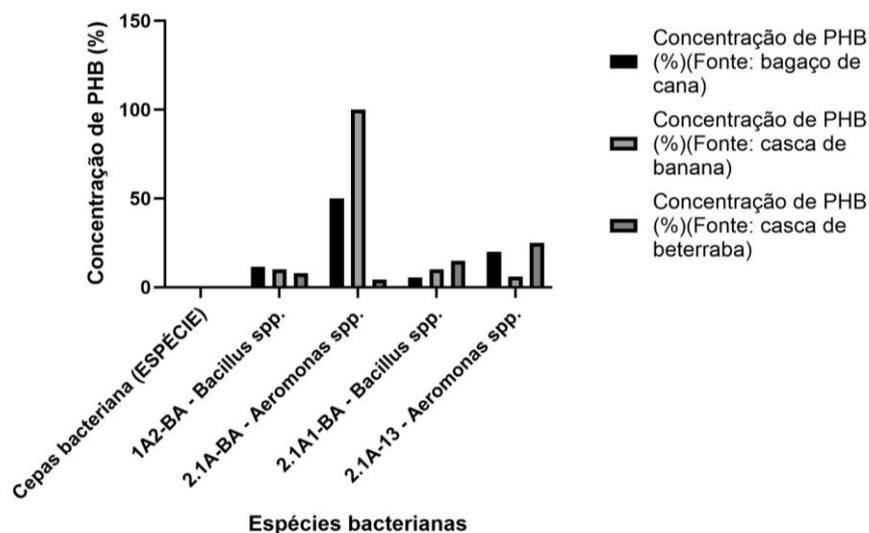


Fonte: Do autor.

O gráfico 2 é proveniente da análise de variância (ANOVA) de dois fatores entre as duas espécies de bactérias em estudo, na qual obteve valores de $p = 0,26$ indicando que essa variação não é estatisticamente significativa. Para complementar esses resultados, foi realizado o teste de comparação múltipla de Tukey, na qual foi obtido valores de $p > 0,05$, e apesar da cepa 2.1A-BA referente a espécie *Aeromonas spp.* apresentar altas concentrações de PHB nas

fontes providas da casca de banana e bagaço de cana, respectivamente, as cepas bacterianas não diferem significativamente nas concentrações de PHB.

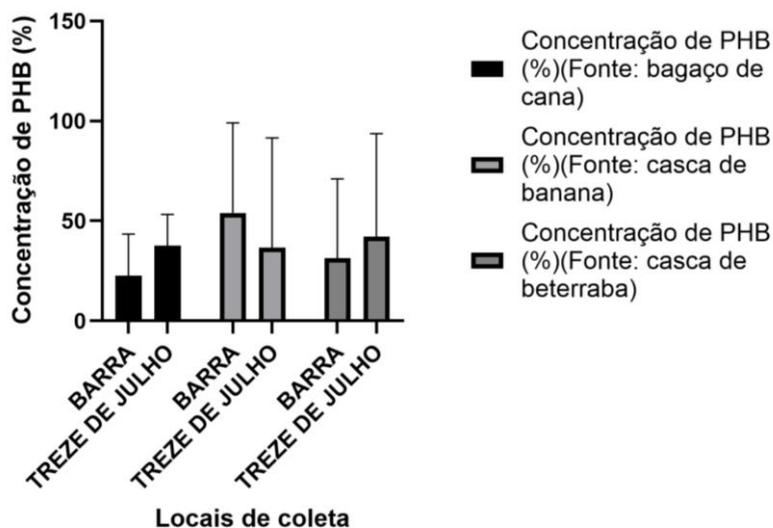
GRÁFICO 2- CONCENTRAÇÃO DE PHB PRODUZIDO POR DIFERENTES ESPÉCIES BACTERIANAS EM FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO



Fonte: Do autor.

O gráfico 3 apresenta resultados da análise de variância (ANOVA) de dois fatores, entre os locais de coleta, que apresentaram valores de $p > 0,05$, isso indica que não há diferença estatisticamente significativa nessas duas áreas analisadas. O teste de comparação múltipla de Šídák's, por sua vez, obteve valores de $p > 0,05$ e a grande variabilidade nos dados ilustradas no gráfico reforçam a ausência de evidências estatísticas significativas.

GRÁFICO 3- CONCENTRAÇÃO DE PHB PRODUZIDO POR BACTÉRIAS EM DIFERENTES LOCAIS DE COLETA



Fonte: Do autor.

A figura 4 ilustra as células bacterianas secas pesadas em grama por litro (g/L) para obter a concentração em porcentagem do PHB, através do peso do biopolímero em relação ao peso celular seco.

FIGURA 4 - CÉLULA BACTERIANA SECA UTILIZADA PARA A EXTRAÇÃO DO PHB



Fonte: Acervo Pessoal (2025)

A figura 5 demonstra o resultado da extração do PHB realizada em placas de Peri após a evaporação do clorofórmio em temperatura ambiente.

FIGURA 5 - PHB EXTRAÍDO DE CÉLULAS BACTERIANAS APÓS A EVAPORAÇÃO DO CLOROFÓRMIO EM TEMPERATURA AMBIENTE

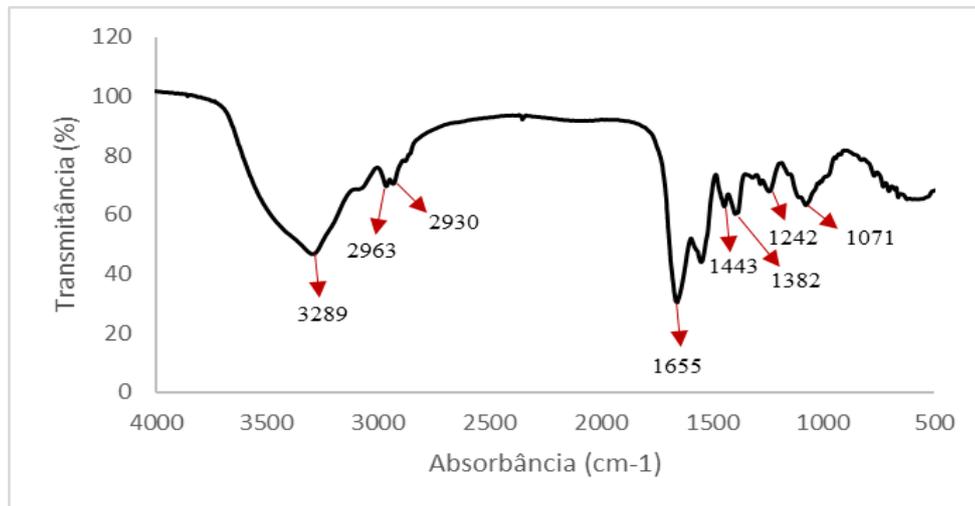


Fonte: Acervo Pessoal (2025)

4.6 Caracterização do PHB por Espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR)

A análise do PHB foi realizada a partir da técnica de Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR), um método que permite verificar a presença de grupos funcionais desse biopolímero extraído das células bacterianas. Ademais, os espectros de infravermelho (IR) foram avaliados dentro da faixa de absorvância de 4000-500 cm^{-1} . Com base nisso, obteve-se a formação dos seguintes picos: 3289 cm^{-1} referente ao estiramento da hidroxila OH; 2963-2930 cm^{-1} demonstra o estiramento do grupo CH característico do PHB; 1655 cm^{-1} caracteriza uma vibração do grupo carbonila (C=O) comprovando a presença desse biopolímero; 1443-1382 cm^{-1} relacionado ao grupo metil (CH₃) que indica uma compatibilidade com o PHB; 1242-1071 cm^{-1} registra o estiramento da ligação CO do grupo éster, compatível com o PHB (Gráfico 1). Os resultados dos gráficos das demais amostras encontram-se nos Apêndices (A-C).

GRÁFICO 4- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1 A₂-BA EM FONTE DE CANA-DE-AÇÚCAR (CP152010.1)



Fonte: Do autor.

5 DISCUSSÃO

Os manguezais são áreas de extrema importância devido à grande quantidade de nutrientes e recursos orgânicos. Esse ecossistema tornou-se bastante reconhecido ao apresentar um grande potencial para a reprodução de atividades biotecnológicas. Nesse contexto, Adnan *et al.* (2022) e Alarfaj *et al.* (2015) conseguiram observar em seus estudos que essas áreas apresentam condições favoráveis para produzir o PHB a partir de bactérias isoladas desses locais. Sendo assim, os resultados citados anteriormente em comparação com o presente estudo observaram que ambos apresentaram bactérias capazes de sintetizar PHB, reforçando a ideia de que esses microrganismos possuem uma notável capacidade de adaptação às condições de estresse características dos manguezais.

A análise estatística dos dados obtidos das diferentes áreas de manguezais em estudo, utilizando o teste ANOVA seguido do teste Šídák's, não revelaram diferenças significativas. Esse resultado pode estar associado ao pequeno número de amostras, que limita a obtenção de resultados mais precisos. No entanto, os estudos de Doan Van Thuoc; Quillaguamán (2013) identificaram diferenças significativas na produção de PHB através de uma espécie de *Bacillus* isolados de mangue. Isso ocorreu, pois os autores avaliaram outros fatores que influenciaram esse processo, como a otimização dos meios de cultura para favorecer a síntese desse biopolímero. Portanto, a ausência de diferenças significativas deste estudo pode estar ligada ao número reduzido de amostras e à falta de fatores adicionais para entender melhor as influências ambientais na síntese do PHB.

A avaliação das características bioquímicas das cepas bacterianas é uma das abordagens primitivas responsáveis pela identificação do gênero bacteriano. Nesse sentido, podemos inferir que a maioria das cepas isoladas demonstrou indícios significativos de que o grupo de bactérias estudado pertence ao gênero *Bacillus*. Esse gênero, caracteriza-se por apresentar grande capacidade de acumular PHB no interior de suas células, além de ser o grupo de bactérias constantemente mais pesquisado para esses tipos de experimentos (Shereen *et al.*, 2022). A partir desses testes, foi possível identificar também a presença de um segundo grupo bacteriano pertencente ao gênero *Aeromonas* que assim como as *Bacillus* também são consideradas fortes produtoras de PHB (Amir *et al.*, 2022). Esses achados corroboram com o presente estudo, no qual, também evidenciou a presença desses gêneros de bactérias.

Ademais, o teste molecular é considerado um método com alta precisão que permite especificar as cepas bacterianas por meio das suas características genéticas. Conforme, os

estudos de Krishnan *et al.* (2021) e Amir *et al.* (2022), foi possível analisar através do sequenciamento a existência de *Bacillus sp.* e *Aeromonas sp.*, respectivamente. Diante disso, os resultados colaboram com a ideia do presente estudo que apresentou os mesmos gêneros de bactérias citadas anteriormente, confirmando os dados obtidos nos testes bioquímicos.

Em detrimento a isso, a produção de PHB tem ganhado bastante notoriedade em diversas espécies bacterianas. Nessa perspectiva, os estudos de Mozejko-Ciesielska; Kiewisz, 2016, analisou detalhadamente o potencial dessas bactérias, considerando a capacidade metabólica específica de cada gênero e espécie. A partir disso, os autores avaliaram as taxas de produtividade em *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas spp.*, *Ralstonia eutropha*, *Bacillus spp.* e *Aeromonas spp.* que mostraram potencial promissor no acúmulo de PHB. Em particular, as *Aeromonas spp.* vem sendo amplamente utilizadas na engenharia genética visando aumentar os índices de produtividade. Desse modo, esses achados reforçam os resultados obtidos neste estudo, uma vez que as taxas de produtividade obtidas entre as *Bacillus spp.* e *Aeromonas spp.*, não apresentaram diferenças significativas.

Levando em conta que as fontes de carbono são de extrema importância para redução dos custos da produção do PHB, os estudos realizados observaram em seus experimentos que a casca da banana apresentou maior rendimento durante a síntese do PHB, assim como a casca da beterraba que obteve bons resultados em comparação com o bagaço da cana-de-açúcar (Mishra; Panda, 2023; Kadi *et al.*, 2021). De modo geral, ambos estudos partem do princípio da busca de fontes alternativas viáveis para ampliar a comercialização desse biopolímero de maneira mais sustentável, e apesar de não possuir nenhum estudo na literatura que utilize a casca da beterraba como fonte de carbono, os resultados obtidos a partir desse novo substrato foram similares ao do melão da beterraba citado por Kadi *et al.* (2021). Nesse sentido, esses estudos corroboram com as fontes e taxas de produtividade obtidas neste trabalho.

A caracterização desse biopolímero por FTIR é crucial, uma vez que é possível analisar a presença dos grupos funcionais que o descrevem. Desse modo, o espectro do PHB permitiu observar a formação de picos em 3289 cm⁻¹; 2963 cm⁻¹ e 2930 cm⁻¹; 1655 cm⁻¹; 1443 cm⁻¹ e 1382 cm⁻¹; 1242 cm⁻¹ e 1071 cm⁻¹, referentes respectivamente aos grupos OH, alongamento de C-H de grupos metil e metileno, vibração do éster (C=O), vibração C-H, estiramento C-O-C do éster. Esses resultados foram consolidados a partir dos estudos de Kadi *et al.* (2021), Krishnan *et al.* (2021) e Shah K R, (2012) que analisou bandas semelhantes, sendo o comprimento de 1624-1724 cm⁻¹, referente ao alongamento da carbonila (C=O) que caracteriza

o PHB. A variação nesse pico pode estar associada às alterações na estrutura do polímero ou ao método utilizado no cultivo bacteriano, portanto, os dados obtidos comprovam a presença do PHB.

6 CONCLUSÃO

A problemática da poluição ambiental ocasionada pelo acúmulo de plástico ainda se faz presente nos dias atuais, e esta, por sua vez, requer várias ações para atuar na proteção do meio ambiente. Nesse contexto, a síntese de bioplásticos por meio de bactérias a partir de fontes de carbono está sendo foco de diversas pesquisas e tornaram-se excelentes medidas para buscar reverter esse cenário. Com isso, os resultados obtidos neste estudo observaram que as espécies bacterianas *Bacillus spp.* e *Aeromonas spp.*, isoladas de amostras coletadas dos manguezais foram capazes de acumular PHB. Além disso, foi possível analisar também que as diferentes áreas de mangue aplicadas neste estudo não apresentaram fatores que influenciassem a produção do PHB, visto que o manguezal referente a localização na Praia Formosa Aracaju no Bairro Treze de Julho sofre com diversos impactos das ações antrópicas. Outrossim, as bactérias apresentaram um melhor acúmulo de PHB quando fermentadas em meio contendo hidrolisado extraído da casca da banana, que quando analisada de maneira isolada apresentou uma diferença bastante significativa em relação com as demais fontes. No entanto, a grande variação interna das fontes analisadas resultantes de uma comparação múltipla indica a ausência de diferenças significativas entre elas. A análise do PHB por FTIR, por sua vez permitiu identificar a sua produção em todas as bactérias aplicadas neste experimento e a partir da avaliação dos gráficos gerados foi possível inferir que não foi identificada nenhuma diferença nas características do PHB produzido pelas diferentes cepas, uma vez que os picos se formaram na mesma faixa de absorvância. Por fim, pode-se concluir que a exploração dessas fontes será extremamente importante para as perspectivas futuras relacionadas às diversas aplicações comerciais desse bioplástico.

7 REFERÊNCIAS

ADNAN, M. et al. Characterization and Process Optimization for Enhanced Production of Polyhydroxybutyrate (PHB)-Based Biodegradable Polymer from *Bacillus flexus* Isolated from Municipal Solid Waste Landfill Site. **Polymers**, v. 15, n. 6, p. 1407, 1 jan. 2023.

ADNAN, M. et al. Polyhydroxybutyrate (PHB)-Based Biodegradable Polymer from *Agromyces indicus*: Enhanced Production, Characterization, and Optimization. **Polymers**, v. 14, n. 19, p. 3982, 23 set. 2022.

AIDANA RYSBEK et al. Comparative Characterization and Identification of Poly-3-hydroxybutyrate Producing Bacteria with Subsequent Optimization of Polymer Yield. **Polymers**, v. 14, n. 2, p. 335–335, 15 jan. 2022.

AKHLAQ, S.; SINGH, D.; MITTAL, N.; SRIVASTAVA, G.; SIDDIQUI, S.; FARADI, S. A.; SIDDIQUI, M. H. Polyhydroxybutyrate biosynthesis from different waste materials, degradation, and analytic methods: a short review. *Polymer Bulletin*, 80:5965–5997, 2023.

ALARFAJ, A. A. et al. Extraction and Characterization of Polyhydroxybutyrates (PHB) from *Bacillus thuringiensis* KSADL127 Isolated from Mangrove Environments of Saudi Arabia. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 5, p. 781–788, out. 2015.

AMIR, M. et al. Isolation and optimization of extracellular PHB depolymerase producer *Aeromonas caviae* Kuk1-(34) for sustainable solid waste management of biodegradable polymers. *PLOS ONE*, v. 17, n. 4, p. e0264207–e0264207, 14 abr. 2022.

ANDLER, R. et al. Fruit residues as a sustainable feedstock for the production of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Journal of Cleaner Production**, v. 307, p. 127236, jul. 2021.

ARÉVALO, P. F. **La problemática del consumo de plásticos durante la pandemia de la covid-19**. 25 jan. 2021.

BAJT, O. From plastics to microplastic and organism. *FEBS Open Bio*, v. 11, p. 954-966, 2021.

BUCCI, K.; TULIO, M.; ROCHAMAN, C. M. What is known and unknown about the effects of plastic pollution: A meta-analysis and systematic review. *Ecological Applications*, v. 30, n. 2, 2020.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 6, n. 2, p. 127 - 139, set. 2011.

BRWA KHALID SHAKIR; SIMONE, V. Estimation of betalain content in beetroot peel powder. *Italian Journal of Food Science*, v. 36, n. 1, p. 53–57, 11 jan. 2024. MARZO-GAGO, C.; DÍAZ, A. B.; BLANDINO, A. Sugar Beet Pulp as Raw Material for the Production of Bioplastics. *Fermentation*, v. 9, n. 7, p. 655, 1 jul. 2023.

CHANDANI, N.; MAZUMDER, P. B.; BHATTACHARJEE, A. Biosynthesis of biodegradable polymer by a potent soil bacterium from a stress-prone environment. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, v. 6, n. 2, p. 54-60, 2018.

CHEN, Y. et al. Single-use plastics: Production, usage, disposal, and adverse impacts. *Science of The Total Environment*, v. 752, n. 752, p. 141772, 15 jan. 2021.

DHEYAB, A. S.; ALJUMAILI, O. I.; HUSSEIN, N. M. Study of Virulence Factors in Urease-Positive Bacteria Isolated from Urinary Tract Infections Clinical Specimens. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12:3, 1465-1472, 2018.

DOAN VAN THUOC; QUILLAGUAMÁN, J. Improving culture conditions for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Bacillus* sp. ND153, a bacterium isolated from a mangrove forest in Vietnam. *Annals of Microbiology*, v. 64, n. 3, p. 991–997, 7 nov. 2013.

Dos Santos Oliveria, J.L.; Alves de Sousa, C.A. **Plásticos no meio ambiente: características gerais e impactos socioambientais**. In: Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências. 2019.

DU, C. et al. Polyhydroxyalkanoates Production From Low-cost Sustainable Raw Materials. *Current Chemical Biology*, v. 6, n. 1, p. 14–25, 1 mar. 2012.

EL-KADI, S. M. et al. Biosynthesis of Poly-β-Hydroxybutyrate (PHB) from Different Bacterial Strains Grown on Alternative Cheap Carbon Sources. v. 13, n. 21, p. 3801–3801, 3 nov. 2021.

FADY ABD EL-MALEK et al. Polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Halomonas pacifica* ASL10 and *Halomonas salifodiane* ASL11 isolated from Mariout salt lakes. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 161, p. 1318–1328, 1 out. 2020.

GETACHEW, A.; WOLDESENBET, F. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, dez. 2016.

HASSAN, S.; NGO, T.; BALL, A. S. Valorisation of Sugarcane Bagasse for the Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates. **Sustainability**, v. 16, n. 5, p. 2200, 1 jan. 2024.

KHAMBERK, S.; THAMMASITTIRONG, S. N.-R.; THAMMASITTIRONG, A. Valorization of Sugarcane Bagasse for Co-Production of Poly(3-hydroxybutyrate) and Bacteriocin Using *Bacillus cereus* Strain S356. **Polymers**, v. 16, n. 14, p. 2015, 15 jul. 2024.

KRISHNAN, S. et al. Valorization of agro-wastes for the biosynthesis and characterization of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* sp. isolated from rice bran dumping yard. **3 Biotech**, v. 11, n. 4, 29 mar. 2021.

KULKARNI, S. O. et al. Production of copolymer poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Halomonas campisalis* MCM B-1027 using agro-wastes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 784–789, jan. 2015.

LEE, H.-J. et al. Finding of novel lactate utilizing *Bacillus* sp. YHY22 and its evaluation for polyhydroxybutyrate (PHB) production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 201, p. 653–661, mar. 2022.

LYADOV, A. S.; PETRUKHINA, N. N. Extraction and Refining of Heavy Crude Oils: Problems and Prospects. *Zhurnal Prikladnoi Khimii*, 91:12, p. 1683–1692, 2018.

MARZO-GAGO, C.; DÍAZ, A. B.; BLANDINO, A. Sugar Beet Pulp as Raw Material for the Production of Bioplastics. **Fermentation**, v. 9, n. 7, p. 655, 1 jul. 2023.

MISHRA, P.; PANDA, B. Polyhydroxybutyrate (PHB) accumulation by a mangrove isolated cyanobacteria *Limnothrix planktonica* using fruit waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 252, p. 126503, 1 dez. 2023.

MOURÃO, M.M et al. Characterization and Biotechnological Potential of Intracellular Polyhydroxybutyrate by *Stigeoclonium* sp. B23 Using Cassava Peel as Carbon Source. **Polymers**, v. 13, n. 5, p. 687–687, 25 fev. 2021.

MOŻEJKO-CIESIELSKA, J.; KIEWISZ, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiol. Res.*, 192, 271–282, 2016.

MÜLLER-SANTOS, M. et al. The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 45, n. 3, p. fuaa058, 5 maio 2021.

NAGY, A.; KUTI, R. The Environmental Impact of Plastic Waste Incineration. *AARMS – Academic and Applied Research in Military and Public Management Science*. Budapest, 15(3), pp. 231–237, 2016.

NIELSEN, T. D.; HASSELBALCH, J.; HOLMBERG, K.; STRIPPLE, J. Politics and the plastic crisis: A review throughout the plastic life cycle. *WIREs Energy Environ.*; 9:E 360, 2020.

NORTH, Emily J.; HALDEN, Rolf U. Plastics and Environmental Health: The Road Ahead. *Rev. Environ. Health*, v. 28, n. 1, p.1-8, 2013.

PAGANELLI, F. L.; DE MACEDO LEMOS, E. G.; ALVES, L. M. C. Polyhydroxybutyrate in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*: quantification and *phbC* gene expression. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 773–778, 5 ago. 2010.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 26, p. 15293–15297, 1 set. 1989.

PENKHRUE, W. et al. Response surface method for polyhydroxybutyrate (PHB) bioplastic accumulation in *Bacillus drentensis* BP17 using pineapple peel. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0230443, 19 mar. 2020.

RAMOS, F. D.; VILLAR, M. A.; DIAZ, M. S. Optimal Design of Poly (3-hydroxybutyrate) Production using alternative Carbon Sources. *Computer Aided Chemical Engineering*, v. 40, p. 877-882, 2017.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807–812, out. 2004.

ROJA, K. et al. Extraction and characterization of polyhydroxyalkanoates from marine green alga and cyanobacteria. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101358, nov. 2019.

SALMAN AHMADY-ASBCHIN et al. Production and optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Bacillus megaterium* as biodegradable plastic. **European Journal of Biological Research**, v. 10, n. 1, p. 26–34, 15 mar. 2020.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, C. M. et al. Anthropogenic activities on mangrove areas (São Francisco River Estuary, Brazil Northeast): A GIS-based analysis of CBERS and SPOT images to aid in local management. *Ocean & Coastal management*, v. 89, p. 39-50, 2014.

SILVA, A. L. P.; PRATA, J. C.; WALKER, T. R.; DUARTE, A. C.; OUYANG, W.; BARCELÒ, D.; ROCHA-SANTOS, T. Increased plastic pollution due to COVID-19 pandemic: Challenges and recommendations. *Chemical Engineering Journal*, v. 450, 2021.

SONI, S. et al. Cost effective media optimization for PHB production by *Bacillus badius* MTCC 13004 using the statistical approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 233, p. 123575–123575, 1 abr. 2023.

SUDESH, K.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, 25:10, 1503–1555, 2000.

SHARMA, N. Polyhydroxybutyrate (PHB) Production by Bacteria and its Application as Biodegradable Plastic in Various Industries. **Academic Journal of Polymer Science**, v. 2, n. 3, 4 fev. 2019.

Shah, Kamlesh. (2012). FTIR analysis of polyhydroxyalkanoates by a locally isolated novel *Bacillus* sp. AS 3-2 from soil of Kadi region, North Gujarat, India. *Journal of biochemical technology*. 3. 380-383.

SHEN, M.; SONG, B.; ZENG, G.; ZHANG, Y.; HUANG, W.; WEN, X.; TANNG, W. Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? *Environmental Pollution*, v. 263, 2020.

SHOAIB, M.; MUZAMMIL, I.; HAMMAD, M.; BHUTTA, Z. A.; YASEEN, I. A Mini-Review on Commonly used Biochemical Tests for Identification of Bacteria. *International Journal of research Publication*, 54:1, 2020.

SZUMAN, K.; KRUCIŃSKA, I.; BOGUŃ, M.; DRACZYŃSKI, Z. PLA/PHA-Biodegradable Blends for Pneumothermic Fabrication of Nonwovens *Autex Research Journal*, 2016.

THATOI, H.; BEHERA, B. C.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. *Annals of Microbiology*, 63, 1-19, 2013.

TRAKUNJAE, C. et al. Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production by newly isolated rare actinomycetes *Rhodococcus* sp. strain BSRT1-1 using response surface methodology. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1896, 21 jan. 2021.

T. PALMEIRO-SÁNCHEZ et al. Transient concentrations of NaCl affect the PHA accumulation in mixed microbial culture. **Journal of Hazardous Materials**, v. 306, p. 332–339, 1 abr. 2016.

WANG, E.; AN, N.; GAO, Z.; KIPROP, E.; GENG, X. Consumer food stockpiling behavior and willingness to pay for food reserves in COVID-19. *Food Secur.* 12, 739–747, 2020.

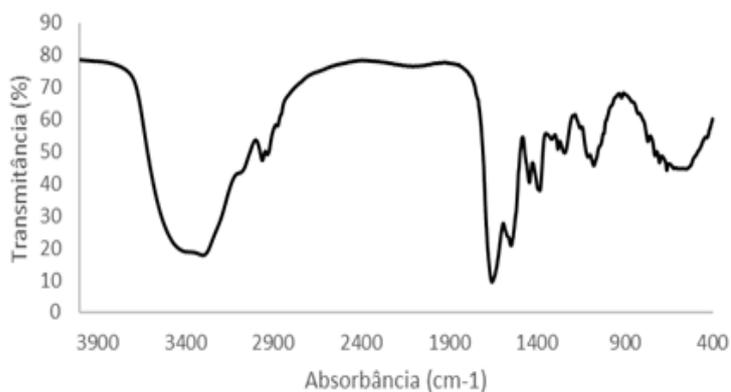
WU, H. et al. Enhanced production of polyhydroxybutyrate by multiple dividing *E. coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, 27 jul. 2016.

YEE, M. S. L.; HII, L. W.; LOOI, C. K.; LIM, W. M.; WONG, S. F.; KOK, Y. Y.; TAN, B. K.; WONG, C. Y.; LEONG, C. O. Impact of Microplastics and Nanoplastics on Human Health. *Nanomaterials* 2021, 11, 496, 2021.

YUAN, J.; CHING, C. B. Mitochondrial acetyl-CoA utilization pathway for terpenoid productions. *Metabolic Engineering*, 38: 303-309, 2016.

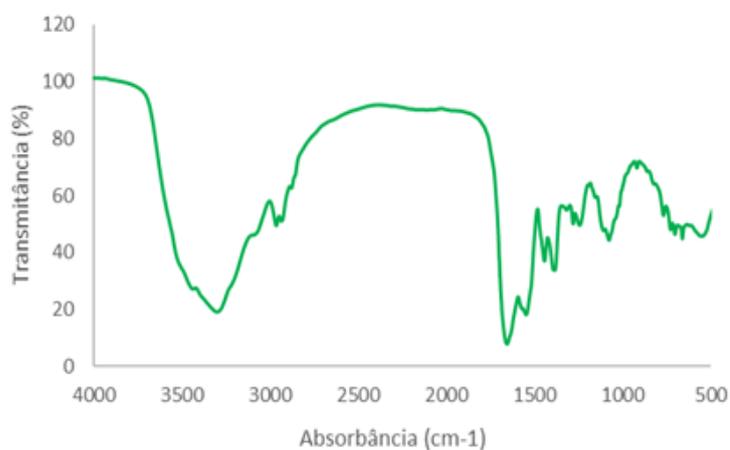
APÊNDICE A – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE DE CANA-DE-AÇÚCAR

GRÁFICO 1- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1.1 A1-13



Fonte: Do autor.

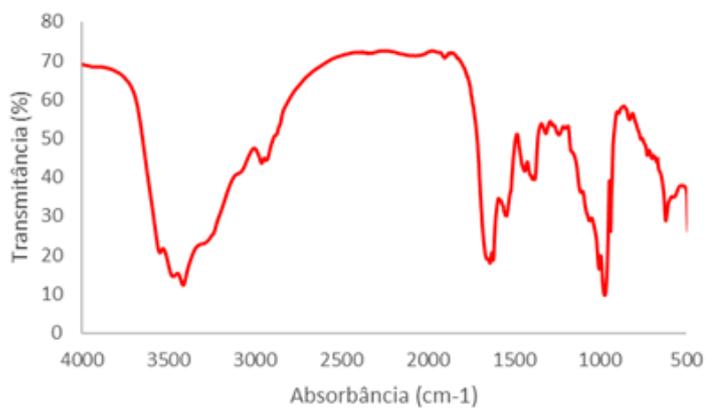
GRÁFICO 2 - CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1.1 A2-13



Fonte: Do autor.

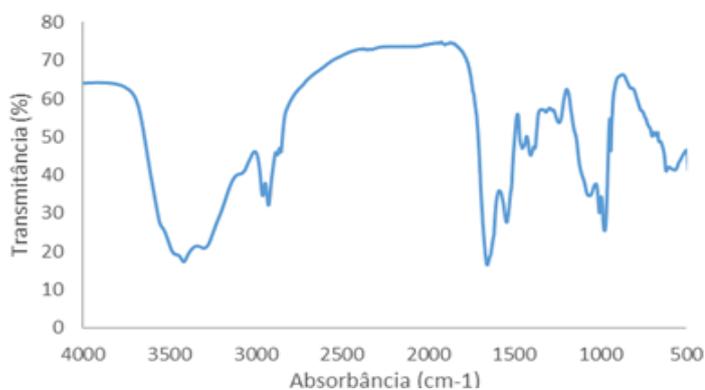
APÊNDICE A – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE DE CANA-DE-AÇÚCAR

GRÁFICO 3 - CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1B-BA



Fonte: Do autor.

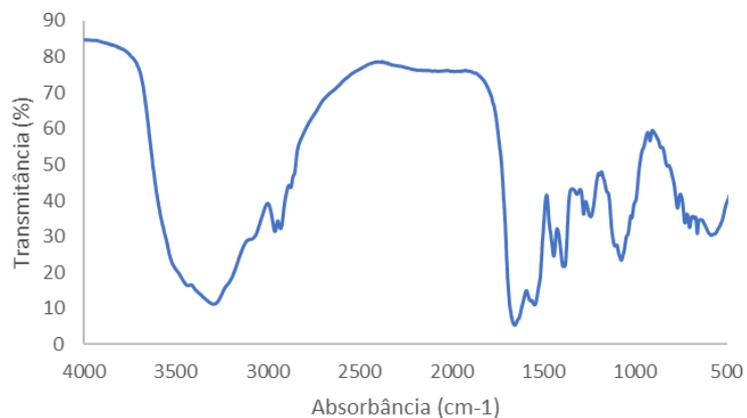
GRÁFICO 4 - CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 2.1 A-13



Fonte: Do autor.

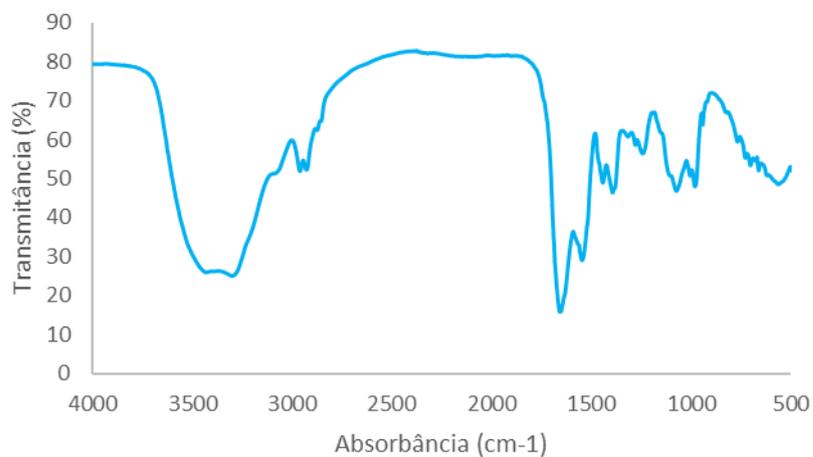
APÊNDICE A – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE DE CANA-DE-AÇÚCAR

GRÁFICO 5 - CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 2.1 A- BA



Fonte: Do autor.

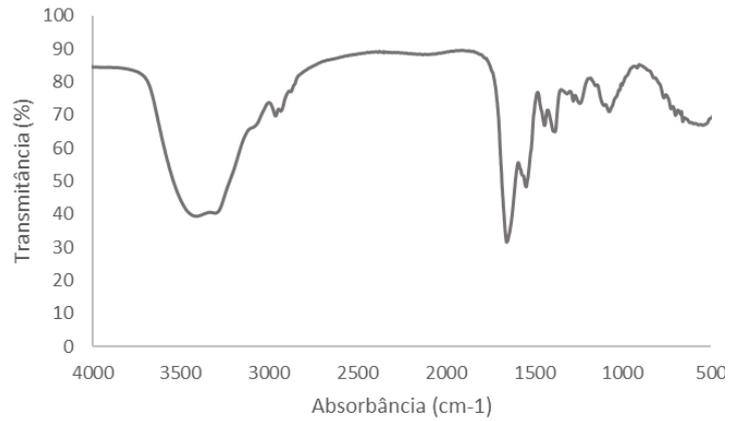
GRÁFICO 6 - CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 2.1 A₁- BA



Fonte: Do autor.

**APÊNDICE A – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

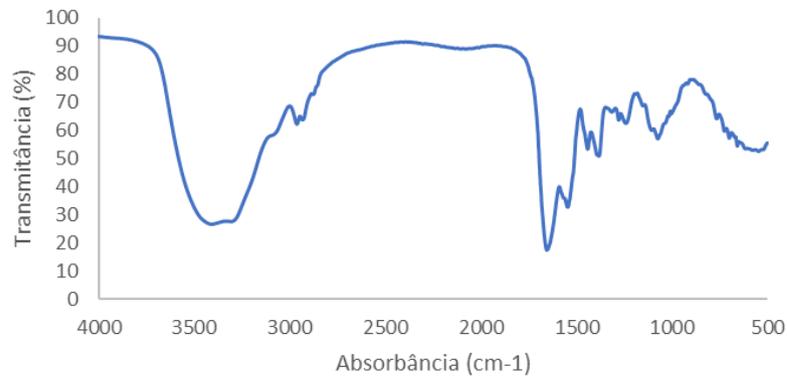
**GRÁFICO 7 - CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 2.1 B₂-BA**



Fonte: Do autor.

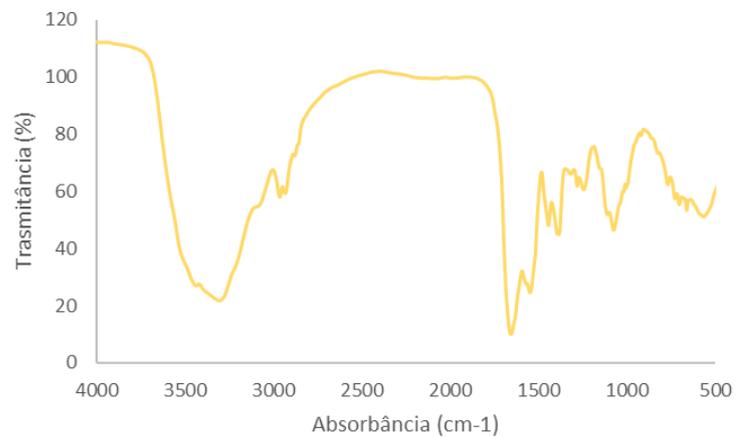
APÊNDICE B – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE DE CASCA DE BANANA

GRÁFICO 1- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1.1 A1-13



Fonte: Do autor.

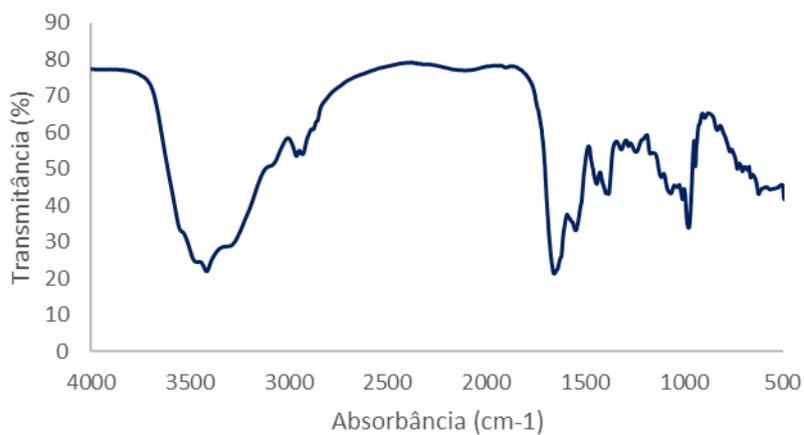
GRÁFICO 2- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1.1 A2-13



Fonte: Do autor.

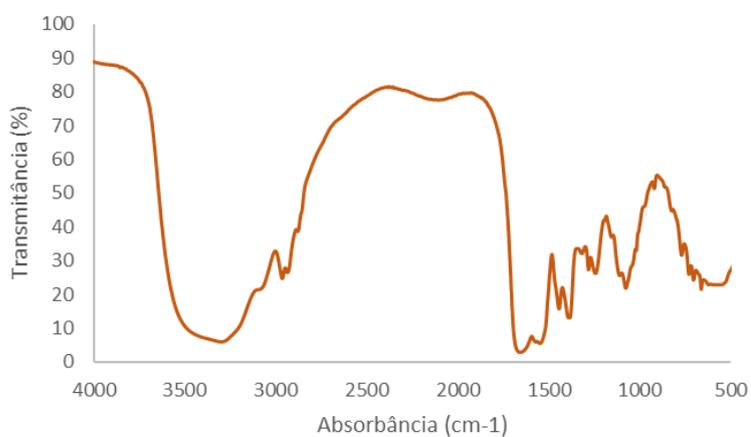
APÊNDICE B – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE DE CASCA DE BANANA

GRÁFICO 3- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1B-BA



Fonte: Do autor.

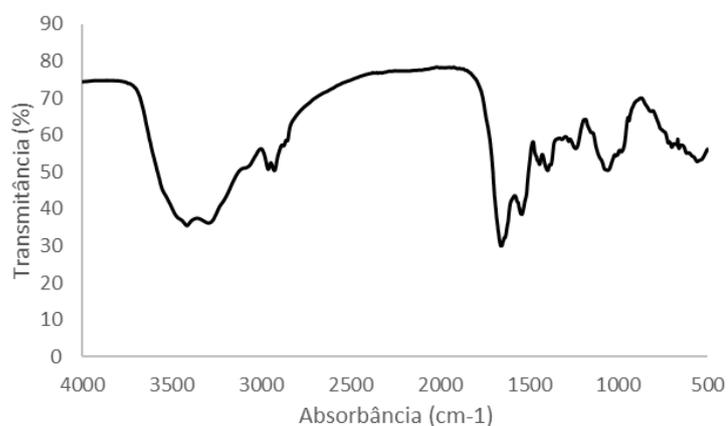
GRÁFICO 4- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1 A₂-BA



Fonte: Do autor.

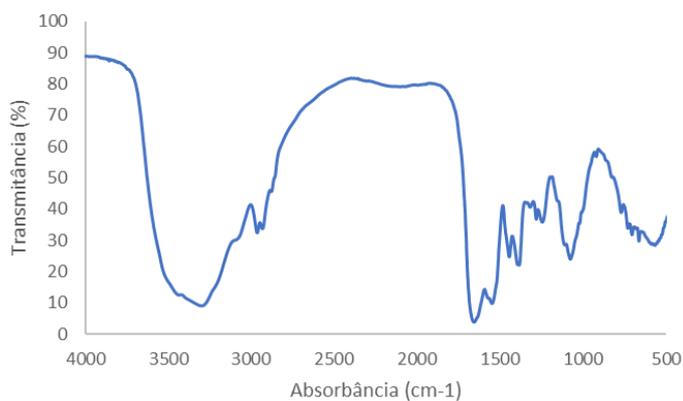
APÊNDICE B – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE DE CASCA DE BANANA

GRÁFICO 5 - CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 2.1 A-13



Fonte: Do autor.

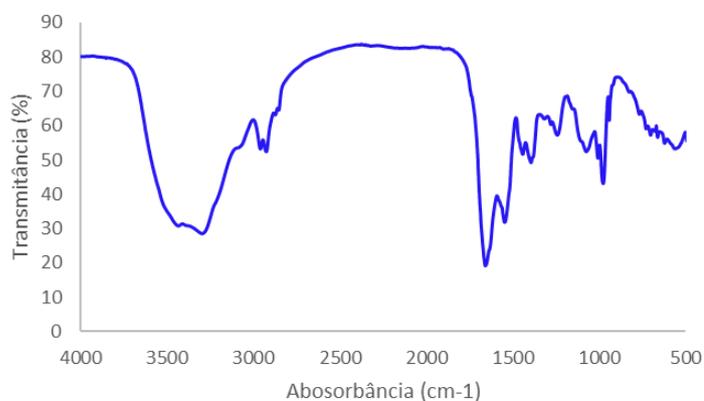
GRÁFICO 6- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 2.1 A- BA



Fonte: Do autor.

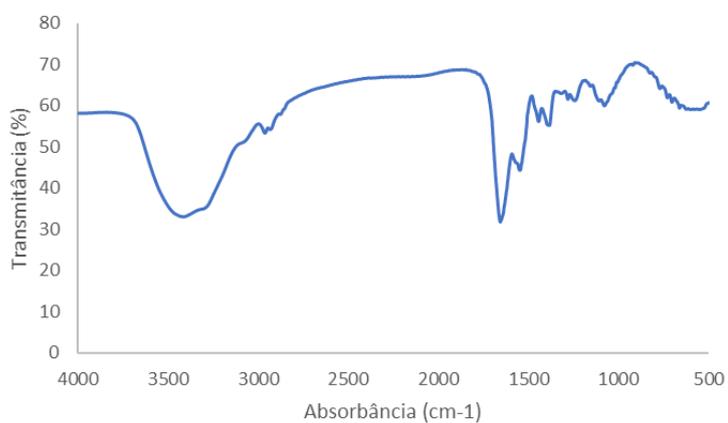
APÊNDICE B – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE DE CASCA DE BANANA

GRÁFICO 7 - CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 2.1 A₁- BA



Fonte: Do autor.

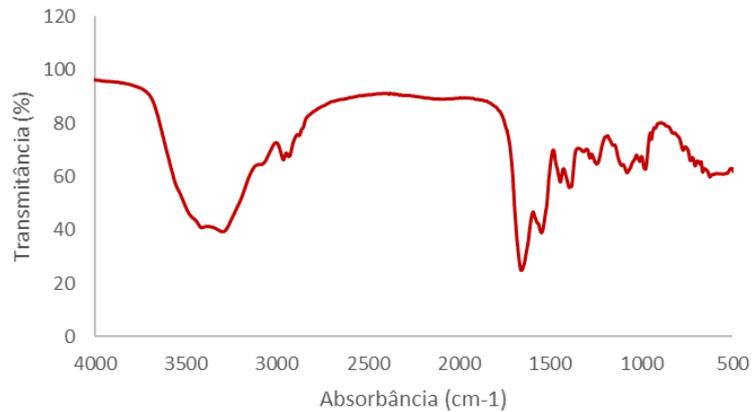
GRÁFICO 8 - CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 2.1 B₂-BA



Fonte: Do autor.

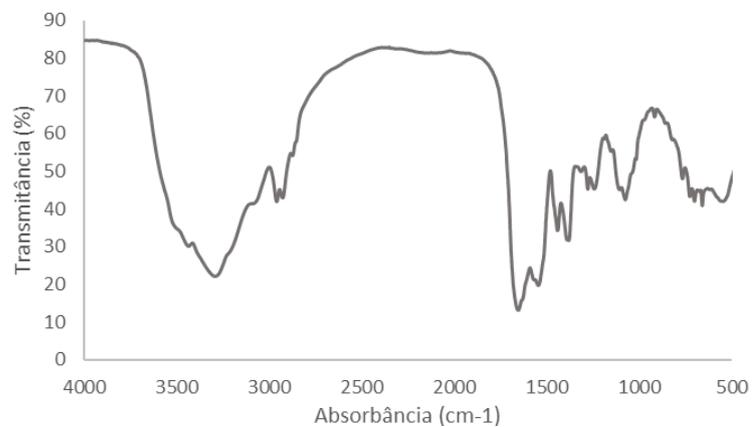
APÊNDICE C – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE DE CASCA DE BETERRABA

GRÁFICO 1- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1.1 A1-13



Fonte: Do autor.

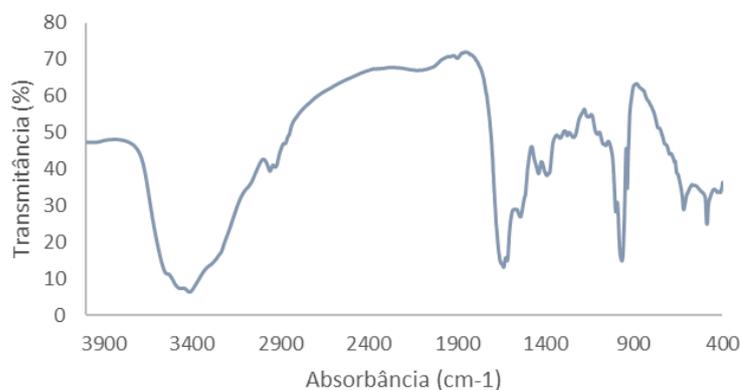
GRÁFICO 2- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1.1 A2-13



Fonte: Do autor.

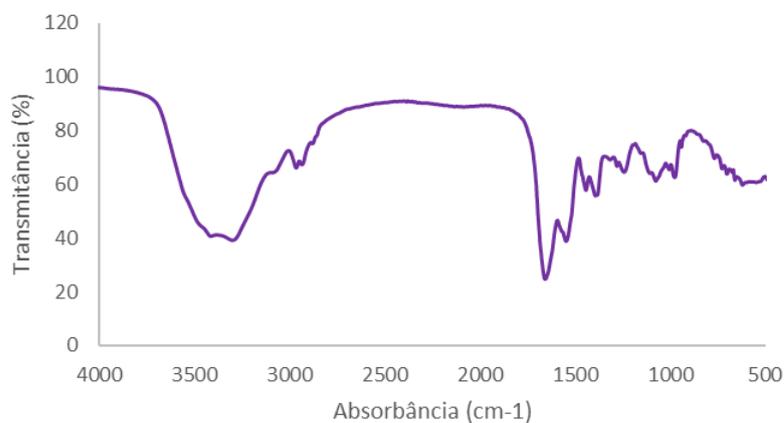
APÊNDICE C – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE DE CASCA DE BETERRABA

GRÁFICO 3- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1B-BA



Fonte: Do autor.

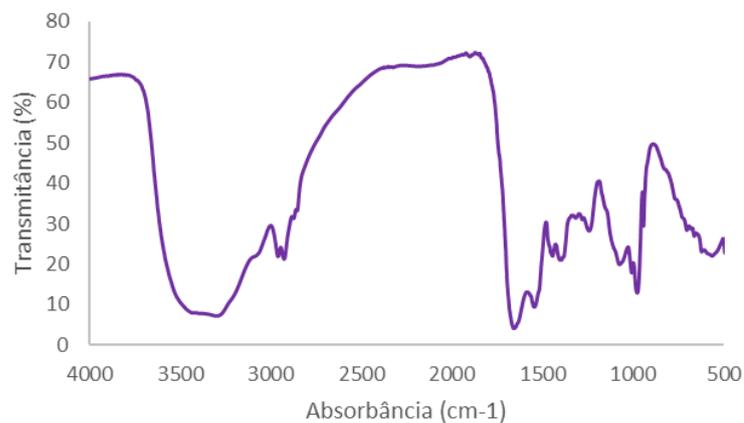
GRÁFICO 4- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 1 A₂-BA



Fonte: Do autor.

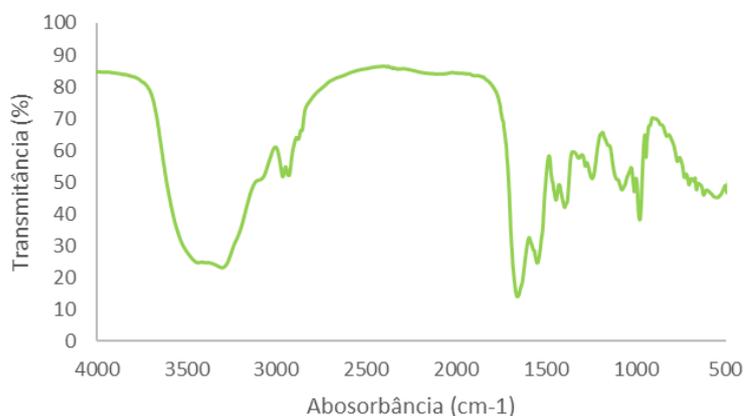
APÊNDICE C – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE DE CASCA DE BETERRABA

GRÁFICO 5 - CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 2.1 A-13



Fonte: Do autor.

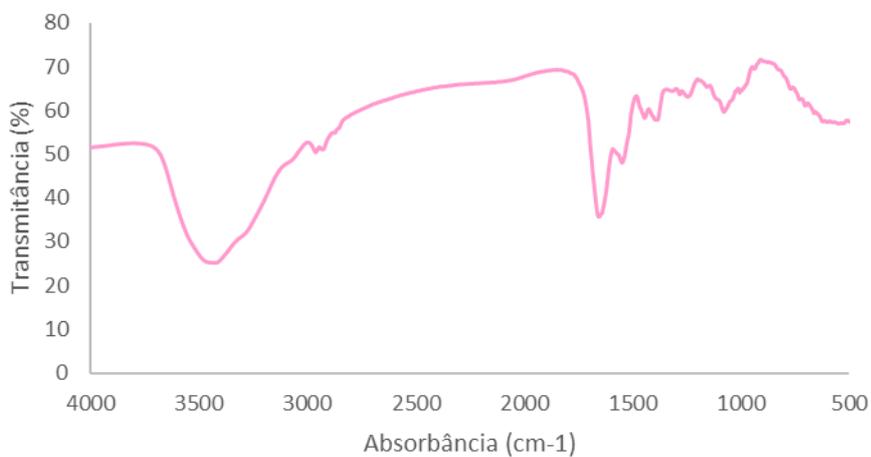
GRÁFICO 6- CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 2.1 A1- BA



Fonte: Do autor.

**APÊNDICE C – RESULTADO DA ANÁLISE DE FTIR DE BACTÉRIAS EM FONTE
DE CASCA DE BETERRABA**

**GRÁFICO 7 - CARACTERIZAÇÃO DE PHB POR ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER DA CEPA 2.1 B₂-BA**



Fonte: Do autor.

APÊNDICE D – RESULTADO DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

TABELA 1: RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DAS FONTES DE CARBONO

| Fonte de Variação | SS (Tipo III) | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor de P |
|-----------------------------------|---------------|----|-------|----------------------|------------|
| Fator linha (Fonte de carbono) | 19.713 | 7 | 2.816 | F (7, 14) = 4,181 | 0,0110 |
| Fator Coluna | 1.511 | 2 | 755,4 | F (2, 14) = 1,122 | 0,3533 |
| Resíduo | 9.430 | 14 | 673,6 | - | - |

Fonte: Do autor.

APÊNDICE D – RESULTADO DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

TABELA 2: RESULTADO DO TESTE DE COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS ENTRE AS DIFERENTES FONTES DE CARBONO APLICANDO TESTE DE TUKEY

| Comparação | Diferença Média | IC 95% da Diferença | Abaixo do Limite? | Resumo | Valor de P Ajustado |
|--|------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------|----------------------------|
| Bagaço da Cana vs. Casca de Banana | -19,22 | -53,19 a 14,74 | Não | ns | 3,291 |
| Bagaço da Cana vs. Casca de Beterraba | -7,136 | -41,10 a 26,83 | Não | ns | 8,482 |
| Casca de Banana vs. Casca de Beterraba | 12,09 | -21,88 a 46,05 | Não | ns | 6,301 |

Fonte: Do autor.

APÊNDICE D – RESULTADO DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

TABELA 3: RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DAS ESPÉCIES BACTERIANAS ISOLADAS DO MANGUE

| Fonte de Variação | SS (Tipo III) | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor de P |
|--------------------------|----------------------|-----------|-----------|---------------------|-------------------|
| Fator Linha | 3.534 | 3 | 1.178 | F (3, 6) = 1,704 | 0,2647 |
| Fator Coluna | 679,6 | 2 | 339,8 | F (2, 6) = 0,4916 | 0,6343 |
| Resíduo | 4.148 | 6 | 691,3 | - | - |

Fonte: Do autor.

APÊNDICE D – RESULTADO DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

TABELA 4: RESULTADO DO TESTE DE COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS ENTRE AS DIFERENTES ESPÉCIES BACTERIANAS ISOLADAS DO MANGUE APLICANDO TESTE DE TUKEY

| Comparação | Diferença Média | IC 95% da Diferença | Abaixo do Limite? | Resumo | Valor de P Ajustado |
|---|-----------------|---------------------|-------------------|--------|---------------------|
| 1A2-BA - Bacillus spp. vs. 2.1A-BA - Aeromonas spp. | -41,57 | -115,9 a 32,75 | Não | ns | 3,067 |
| 1A2-BA - Bacillus spp. vs. 2.1A1-BA - Bacillus spp. | -3,200 | -74,64 a 74,00 | Não | ns | >0,9999 |
| 1A2-BA - Bacillus spp. vs. 2.1A-13 - Aeromonas spp. | -7,133 | -81,45 a 67,18 | Não | ns | 9,861 |
| 2.1A-BA - Aeromonas spp. vs. 2.1A1-BA - Bacillus spp. | 41,25 | -33,07 a 115,6 | Não | ns | 3,120 |
| 2.1A-BA - Aeromonas spp. vs. 2.1A-13 - Aeromonas spp. | 34,43 | -39,88 a 108,7 | Não | ns | 4,422 |
| 2.1A1-BA - Bacillus spp. vs. 2.1A-13 - Aeromonas spp. | -6,813 | -81,13 a 67,50 | Não | ns | 9,878 |

Fonte: Do autor.

APÊNDICE D – RESULTADO DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

TABELA 5: RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS DIFERENTES LOCAIS DE COLETA

| Fonte de Variação | SS (Tipo III) | DF | MS | F (DFn, DFd) | Valor de P |
|--------------------------|----------------------|-----------|-----------|---------------------|-------------------|
| Interação | 1.148 | 2 | 573,8 | F (2, 18) = 0,3695 | 0,6962 |
| Fator Linha | 41,26 | 1 | 41,26 | F (1, 18) = 0,02657 | 0,8723 |
| Fator Coluna | 870,6 | 2 | 435,3 | F (2, 18) = 0,2803 | 0,7588 |
| Resíduo | 27.954 | 18 | 1.553 | - | - |

Fonte: Do autor.

APÊNDICE D – RESULTADO DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

TABELA 6: RESULTADO DO TESTE DE COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS ENTRE OS DIFERENTES LOCAIS DE COLETA APLICANDO TESTE DE ŠIDÁK'S

| Comparação | Diferença Média Prevista (LS) | IC 95% da Diferença | Abaixo do Limite? | Resumo | Valor de P Ajustado |
|--|-------------------------------------|------------------------|----------------------|--------|---------------------------|
| Grupo A - BARRA vs. TREZE DE JULHO | -14,92 | -90,64 a 60,80 | Não | ns | 9,409 |
| Grupo B - BARRA vs. TREZE DE JULHO | 17,33 | -58,39 a 93,06 | Não | ns | 9,116 |
| Grupo C - BARRA vs. TREZE DE JULHO | -10,54 | -86,26 a 65,18 | Não | ns | 9,777 |

Fonte: Do autor.