

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Modificação genética de *Pseudomonas* para a produção de
3-hidroxiácidos a partir da introdução do gene codificador de
tioesterases II.**

Vital Pegorin Oliveira

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo.

Orientador(a):

Prof. Dr José Gregório Cabrera Gomez

São Paulo

2023

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMO.....	2
1.INTRODUÇÃO.....	4
2. JUSTIFICATIVA.....	9
3. OBJETIVO.....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
6.CONCLUSÃO.....	17
7. REFERÊNCIAS.....	19
8. ANEXO.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS

3HA	(R)-3-hidroxialcanoato
MCL3HA	(R)-3-hidroxialcanoato de cadeia média
PHA	Polihidroxialcanoatos
LFM	Laboratório de Fisiologia de Microrganismos
<i>tesB</i>	Gene codificador da enzima tioesterase II
<i>TesB</i>	Enzima tioesterase II
CoA	Coenzima A
3HA-CoA	(R)-3-hidroxialcanoato ligado à coenzima A
ACP	Proteína carreadora de acila
3HA-ACP	(R)-3-hidroxialcanoatos ligado à proteína carreadora de acila
RL	Ramnolipídeo
LB	Lysogeny broth

RESUMO

PEGORIN-OLIVEIRA, V. **MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE PSEUDOMONAS PARA A PRODUÇÃO DE 3-HIDROXIALCANOATO A PARTIR DA INTRODUÇÃO DO GENE CODIFICADOR DE TIOESTERASE II**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Palavras chave: 3-hidroxiácido, 3-hidroxiálcanoato, Bioprodução, Biologia Molecular, Engenharia Metabólica.

INTRODUÇÃO: Os (R)-3-hidroxiálcanoatos (3HAs) são uma classe diversa de moléculas quirálicas de difícil obtenção e alto valor agregado, que podem ser produzidos por sínteses químicas, mas, principalmente, por vias biotecnológicas. Tão diversas quanto suas estruturas são suas aplicações, que podem variar de aditivos de combustível, precursores de síntese para bioplásticos, e produtos de interesse farmacêutico e hospitalar, como antimicrobianos, antitumorais e insumos para a alimentação de pacientes acamados. A produção industrial destes compostos, por sua vez, é limitada, e sua presença no mercado é quase nula. Mas a ampliação da sua produção pode servir como incentivo mercadológico para a estruturação de uma indústria de moléculas de alto valor agregado mais ecológica, e promover a circularização da economia. **OBJETIVO:** Modificar geneticamente bactérias do gênero *Pseudomonas* para a criação de uma nova via metabólica que produza 3HAs, com a introdução de genes codificadores da enzima tioesterase II (*tesB*) e a expressão das enzimas codificadas pelos mesmos. Com isso visa-se melhorar a compreensão dos mecanismos por trás da produção destes metabólitos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A construção dos plasmídeos ocorreu a partir da clonagem com enzimas de restrição de genes obtidos por PCR genômico em plasmídeos. Os plasmídeos foram inseridos em *E. coli* que apresentam capacidade conjugativa por eletroporação, e as *Pseudomonas* foram transformadas a partir da sua conjugação com estas *E. coli*. O cultivo das linhagens obtidas ocorreu em agitador rotativo por 72h e, ao final, foram analisados a formação de biomassa, a produção de polihidroxiálcanoatos (PHA), a produção de 3HAs e o pH do meio. **RESULTADOS:** A inserção do plasmídeo e a expressão da enzima TesB afetaram o metabolismo das bactérias, permitindo a produção de até 467,4 mg/L de 3HA, mas afetando seu crescimento e pH do meio. As características

dos monômeros produzidos também variaram de linhagem para linhagem, e dependeram das enzimas codificadas nos plasmídeos. CONCLUSÃO: A produção de 3HAs por esta via é possível, porém apresenta diversos pontos a serem levados em consideração quando se pensa nessa fabricação destes compostos, como a cepa de bactéria a ser utilizada, o meio de cultivo e a enzima a ser clonada.

1. INTRODUÇÃO

A busca por bioprodutos torna-se cada vez mais relevante no cenário mundial devido aos seus reduzidos impactos ao meio ambiente e variedades de compostos que podem ser produzidos. Esses compostos auxiliam a transição para uma economia circular e não dependente de petróleo, porém enfrentam dificuldades de serem produzidos industrialmente, devido ao baixo custo de fabricação de produtos obtidos de maneira tradicional, e das dificuldades de escalonamento e ajuste a um mercado já estabelecido (ASGHAR et al., 2022; MERAMO, et al., 2022).

Os 3HAs são bioprodutos de alto valor agregado, o que pode facilitar a viabilidade econômica de sua produção, e incentivar a construção de um mercado de moléculas ligadas à química fina que seja mais sustentável ecológica e economicamente. Atualmente, esta indústria é altamente poluente, e depende não apenas de matérias primas insustentáveis e não renováveis, como o petróleo, como também requer muita energia para a confecção e purificação dessas moléculas (YANG et al., 2023), com certa áreas deste setor, como a síntese de insumos farmacêuticos ativos, podendo produzir até 100 quilogramas de resíduo por quilograma de produto de interesse (CHATURVEDI et al., 2017).

A produção de uma indústria farmacêutica e de química fina sustentável e desvinculada do petróleo se mostra portanto necessária, e os 3HAs podem representar uma parte essencial da construção de uma economia descarbonificada de produtos refinados e de alto valor.

1.1 ESTRUTURA

Estruturalmente, os 3-hidroxiácidos são ácidos orgânicos de cadeia com número variável de carbonos e um grupo hidroxila inserido em seu terceiro carbono. Por possuir em uma única molécula tanto uma função álcool quanto uma função ácido carboxílico, ela pode ser esterificada, e polimerizada, como ocorre na natureza, gerando o PHA, um polímero versátil que é sintetizado por diferentes arqueias e bactérias como reserva de carbono (SURRENDRAN et al., 2020). A estrutura dos 3-hidroxiácidos e dos PHAs pode ser notada na Figura 1, e sua nomenclatura é apresentada na Tabela 1 (CESPEDES, L G., 2016).

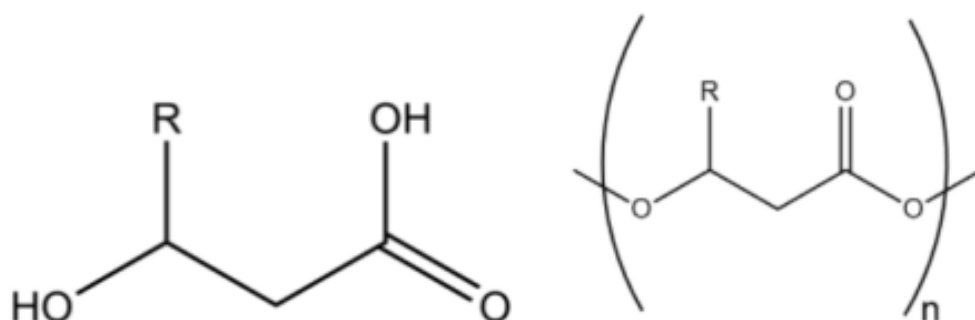


Figura 1 - Estrutura molecular dos 3-hidroxiácido (à esquerda) e de seu polímero, PHA (à direita)

GRUPO R	NOME DO COMPOSTO	SIGLA
metil	3-hidroxi butirato / ácido 3-hidroxi butanoico	3HB
propil	3-hidroxi hexanoato / ácido 3-hidroxi hexanóico	3HHx
pentil	3-hidroxi octanoato / ácido 3-hidroxi octanoico	3HO
heptil	3-hidroxi decanoato / ácido 3-hidroxi decanoico	3HD
nonoil	3-hidroxi dodecanoato / ácido 3-hidroxi dodecanoico	3HDd

Tabela 1 - nomenclatura e composição de diversos 3HAs

A estrutura de cada 3-hidroxiácido afeta suas características físico-químicas e biológicas, bem como as propriedades termoplásticas de seus respectivos polímeros e copolímeros, e, possuindo cerca de 150 estruturas moleculares caracterizadas, as aplicações destas moléculas podem ser tão diversas quanto sua variedade (YÁÑEZ, et al., 2020). A presença dos grupos hidroxila e da carboxila permite sua modificação por diversas reações químicas, o que torna estas moléculas poderosas precursoras para a síntese de compostos orgânicos mais complexos.

Os 3-hidroxiácidos obtidos por síntese biológica, especificamente, ainda possuem a característica de possuírem apenas uma quiralidade, geralmente sendo encontrados na forma do enantiômero (R), o que gera diversas consequências na interação destas moléculas com sistemas biológicos.

Devido à forma em que este composto é comumente encontrado em solução, o presente trabalho se refere a esta classe de moléculas como 3-hidroxiálcanoato (3HA), fazendo referência a sua forma desprotonada.

1.2 APLICAÇÕES

Os 3HAs possuem aplicações tanto na indústria química quanto na farmacêutica.

Entre as aplicações químicas deste composto se destacam a construção dos chamados “polímeros sob medida”, que são PHAs que podem ser sintetizados quimicamente a partir de seus monômeros, permitindo que a sua configuração, e portanto, suas propriedades, sejam definida com mais facilidade do que sua obtenção direta em processos microbianos (REN et al., 2010). Além disso, o fato dos 3HAs serem excretados no meio facilita os processos posteriores de purificação, podendo potencialmente baratear o custo de polímeros produzidos desta maneira (YAÑEZ, et al., 2020). Os polímeros sob medida também podem ser sintetizados por métodos biológicos, porém a possibilidade de sua síntese química parcial também existe.

Além da produção de bioplásticos, os 3HAs também foram aplicados como aditivos em biocombustíveis, podendo elevar o calor de combustão do etanol em até 30%. No mesmo estudo foi mostrado que o uso de (R)-3-hidroxialcanoatos de cadeia média (MCL3HAs) apresentou os melhores resultados para esta aplicação (ZAHANG et al., 2009).

No âmbito hospitalar, os 3HAs também possuem usos potenciais, principalmente o 3HB, que é biocompatível, pois também está presente no corpo humano, na forma de corpos cetônicos. Este composto se apresenta como uma alternativa viável para a alimentação parenteral hospitalar em caso de acidentes e, por possuírem boa difusão e penetração em todas as áreas do corpo, os corpos cetônicos apresentam uma alternativa viável para a nutrição hospitalar, podendo o 3HA, inclusive, ser administrado como oligômeros, evitando assim a alteração brusca da salinidade e pH do sangue após sua injeção (TASAKI et al., 1999). Em casos de acidentes e isquemias cerebrais, em que possa ocorrer a inibição da glicólise e o acúmulo de glutamato, que levam à morte celular dos neurônios, o uso de 3HB pode proteger e retardar a degeneração do cérebro (MASSIEU et al., 2003). Além de proteger os neurônios em caso de acidentes, em pacientes que apresentam doenças degenerativas e que possam causar danos ao cérebro, como epilepsia, Alzheimer e Parkinson, a administração de 3HAs pode também levar a uma maior sobrevivência das células neuronais e um retardo na perda de funções decorrentes dessas doenças (KASHIWAYA et al. 2000; TIEU et al. 2003).

O alto valor agregado dos 3HAs porém, decorre principalmente de sua estrutura facilmente manipulável e quiralidade (R), que o torna um precursor de síntese poderoso para diversos produtos de química fina e farmacêuticos. A sua aplicação na

química fina pode ocorrer no ramo agroindustrial, como na produção de viscosina (HIRAMOTO, M. et al., 1971), um biossurfactante que, entre outros usos, promove o crescimento de plantas e modula o desenvolvimento microbiano em plantas (ALSOHIM et al., 2014); bem como na produção de moléculas obtidas por produtos naturais, como sesquiterpenos triquinanos condensados lineares (MAROTTA; RIGHI; ROSINI, 1994) e (*R*)-2-benzilciclohexanonas (KATOH; SUGAI; OHTA, 1994); os 3HAs ainda podem servir como precursores para a síntese de δ -lactonas, utilizadas na culinária e até mesmo em perfumes (KAISER; DIETMAR LAMPARSKY, 1976). Vale destacar que, para estas sínteses, muitas vezes são utilizados 3HAs de cadeia média ou longa, que são de complicada obtenção, e não disponíveis comercialmente.

Além desses compostos, os 3HAs ainda fornecem um enorme potencial para a síntese de fármacos. A crescente resistência antimicrobiana é uma preocupação recorrente para sistemas de saúde, um estudo realizado durante 2018 demonstrou que cerca de 30% de uma vasta biblioteca de microrganismos isolados em hospitais brasileiros apresentam alguma resistência a antimicrobianos comuns na clínica (PILLONETTO et al., 2021), e o fórum econômico mundial indica que até 2050 as mortes causadas por microrganismos resistentes superarão as causadas por câncer (O'NEILL, 2015). Com isso em mente, a biotecnologia propõe diversas novas moléculas para o tratamento de doenças causadas por microrganismos, e certos 3HAs se demonstram naturalmente como agentes antimicrobianos, como o 3HO e os 3HAs de 9 e 11 carbonos (quando possuírem uma insaturação no último carbono de sua cadeia), que tem atividade contra bactérias do gênero *Listeria* (RUTH et al., 2007), ou até mesmo propriedades antifúngicas (NIHEI et al., 2005). Além de apresentarem potencial antimicrobiano direto, também podem servir para a síntese de compostos que possuam a mesma atividade, como pseudomicinas, betalactonas, globomicinas e sideróforos (REN et al., 2010) e outros compostos, que possam auxiliar na viabilidade de oferta de um arsenal mais amplo contra patógenos resistentes. Vale ressaltar também a baixa toxicidade destes compostos em células mamíferas e a falta da presença de mecanismos de resistência em microorganismos, devido ao seu mecanismo de ação diferente dos antimicrobianos normais, os tornam candidatos promissores para a criação de novos princípios ativos (RADIVOJEVIC et al., 2015).

Outras classes de fármacos também podem ser derivadas dos 3HAs, como inibidores da síntese de colesterol, antitumorais e imunomoduladores (REN et al., 2010). Em relação a fármacos peptídicos, os 3HAs podem apresentar função de

espaçadores, que podem aumentar a atividade dessas moléculas, ou alterá-las racionalmente (CHEN; WU, 2005); Os 3HAs podem ainda, após sua conversão química para β -aminoácidos (SANG et al., 2001), serem integrados nas cadeias peptídicas de diversos fármacos, tornando-os mais resistentes à degradação por peptidases (SEEBACH et al., 2001).

Por fim, os 3HAs quirais podem servir também como nanocarreadores para fármacos e outras substâncias, na forma de dendrímeros (SEEBACH et al., 1996) ou nanopartículas de PHA (PRAKASH et al., 2022).

1.3 MODOS DE OBTENÇÃO

A produção dos 3HAs em escala industrial tem se mostrado um grande desafio, principalmente por sua natureza enantiomericamente pura, e diversas estratégias para tal foram estabelecidas. A síntese química dessa substância é possível, porém limitada, devido à dificuldade de obter um produto enantiomericamente puro (CHEN; WU, 2005), e por vezes necessita de catalizadores metálicos e precursores sintéticos (ALBERICIO, 2008), o que pode ser prejudicial ao meio ambiente.

A produção biotecnológica destes compostos, portanto, se mostra como uma alternativa interessante. Uma via mista, em que o PHA é produzido e posteriormente degradado quimicamente já foi descrita anteriormente, e apesar de produzir um composto puro e com um rendimento significativo, a necessidade da produção inicial de PHA e a complexidade da reação para a sua subsequente polimerização se mostraram como fatores que elevam consideravelmente o preço da produção de 3HAs, tornando este método limitado quanto ao seu escalonamento (GUY et al., 2002).

Por outro lado, a engenharia metabólica apresentou melhores resultados, em que há produção de 3HAs direto no meio de cultivo. As primeiras técnicas de produção completamente *in-vivo* consistiam da despolimerização do PHA acumulado na célula: inicialmente se cultivava a bactéria em meios propícios para a síntese do polímero, e depois os mesmos organismos eram transferidos para um cultivo que incentivava a ação de PHA despolimerases (LEE et al., 1999), gerando 3HAs no meio. Estratégias subsequentes visaram à construção de vias metabólicas sintéticas em *Escherichia coli*, em que os genes codificadores de PHA sintases e depolimerases podiam ser induzidos e facilmente controlados, apesar do trabalho de clonagem e transformação de diversos plasmídeos em uma única bactéria (GAO; WU; CHEN, 2002; LEE; LEE, 2003). Outros estudos provaram também que bactérias contendo genes da síntese de

(R)-3-hidroxiálcanoato ligado à coenzima A (3HA-CoA), podem produzir 3HAs no meio, e que a inibição da síntese de ácidos graxos também favorece esta produção (ZHENG et al., 2004a).

Bons resultados foram obtidos também ao clonar tioesterases, como a enzima tioesterase II (*TesB*), capazes de romper a ligação entre os 3HAs e a CoA durante a síntese de PHA, evitando assim metabolismos desnecessários, permitindo assim a obtenção não apenas de grandes quantidades de 3HB (ZHENG et al., 2004b), que superam a marca de 12 g/L (LIU et al., 2007), como também a produção de MCL3HAs (como 3HHx, 3HO, 3HD, 3HDd e até mesmo 3HAs maiores) em quantidades significativas, principalmente quando genes relacionados à beta-oxidação foram deletados, o que permitiu a obtenção de até 360 mg/L de MCL3HAs em meio definido, utilizando ácido láurico como fonte de carbono (CHUNG et al., 2009; CHUNG et al., 2013).

Outras estratégias de engenharia metabólica ainda são desenvolvidas, como por exemplo o que ocorre com a expressão do gene codificador de propionil CoA transferase, que permite a produção simultânea de 3HAs e acetato, atingindo até 5,2g/L de 3HB (MATSUMOTO et al., 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos diversos estudos realizados na produção de 3HAs, muitos desafios permanecem na fabricação industrial destes compostos e a melhor compreensão do metabolismo envolvido neste processo é um passo necessário para que estas moléculas possam ser incluídas no mercado como produtos ativos ou precursores e aditivos para outros produtos. Visando assim a construção de um cenário economicamente favorável para a comercialização deste produto.

3. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo modificar geneticamente bactérias do gênero *Pseudomonas*, introduzindo o gene *tesB*, que codifica a enzima TesB (tioesterase II), de *P. putida* KT2440 e *E. coli* DH10B, e posteriormente analisar a produção de 3HAs por estas linhagens transgênicas. Com isso pretende-se compreender melhor o mecanismo de produção deste composto e colaborar para uma futura produção comercial destas moléculas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PLASMÍDEOS E PRIMERS

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 2, sendo que o pPS33pp foi previamente construído por outros pesquisadores do laboratório, e o pPS33ec foi construído neste trabalho.

Para a confecção do plasmídeo, foi realizado a extração do DNA genômico da bactéria *E. coli* DH10B com auxílio do kit Promega Wizard® HMW DNA Extraction, e uma reação de PCR com os primers 5'CCCAAGCTTTTAAAGAAGGAGATATACATTATGAGTCAG3' e 5'CGACTAGTCCTTAATTGTGATTACGCATCAC3', criando amplicons contendo o gene de interesse *tesB* e sequencias adequadas para a digestão pelas enzimas de restrição *HindIII* e *SpeI*. O vetor pPS33 (CALERO; JENSEN; NIELSEN, 2016) e o fragmento obtido foram então submetidos a um processo de clonagem por enzimas de restrição e ligase.

Plasmídeo	Características relevantes	Referências
pPS33pp	Sistema de expressão por arabinose (AraBAD), Gene de resistência à canamicina (Neo), Gene <i>tesB</i> de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	(TACIRO; DIAS. 2021) projeto PIPE
pPS33ec	Sistema de expressão por arabinose (AraBAD), Gene de resistência à canamicina (Neo), Gene <i>tesB</i> de <i>Escherichia coli</i> DH10B	este trabalho

Tabela 2 - Plasmídeos utilizados para a construção das linhagens produtoras de 3HAs

4.2 LINHAGENS

A linhagem *Pseudomonas sp.* LFM046, uma das escolhidas para a realização deste trabalho, foi isolada originalmente do solo canavial brasileiro e possui a capacidade de acumular PHA correspondendo a aproximadamente 60-70% de sua massa seca celular, com a composição deste polímero sendo de cerca de 70% 3HD e 25% de 3HO (GOMEZ. 2000). A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LFM634, por sua vez, foi isolada a partir de amostras retiradas do Parque Natural Municipal da Serra do Itapety, no estado de São Paulo, e possui a capacidade de acumular PHAs de cadeia média, bem como de produzir ramnolipídio (RL) (STRELEC, 2006). As mutações e cepas obtidas a partir destas bactérias podem ser encontradas na Tabela 3, e as vias metabólicas envolvidas podem ser vistas na Figura 2.

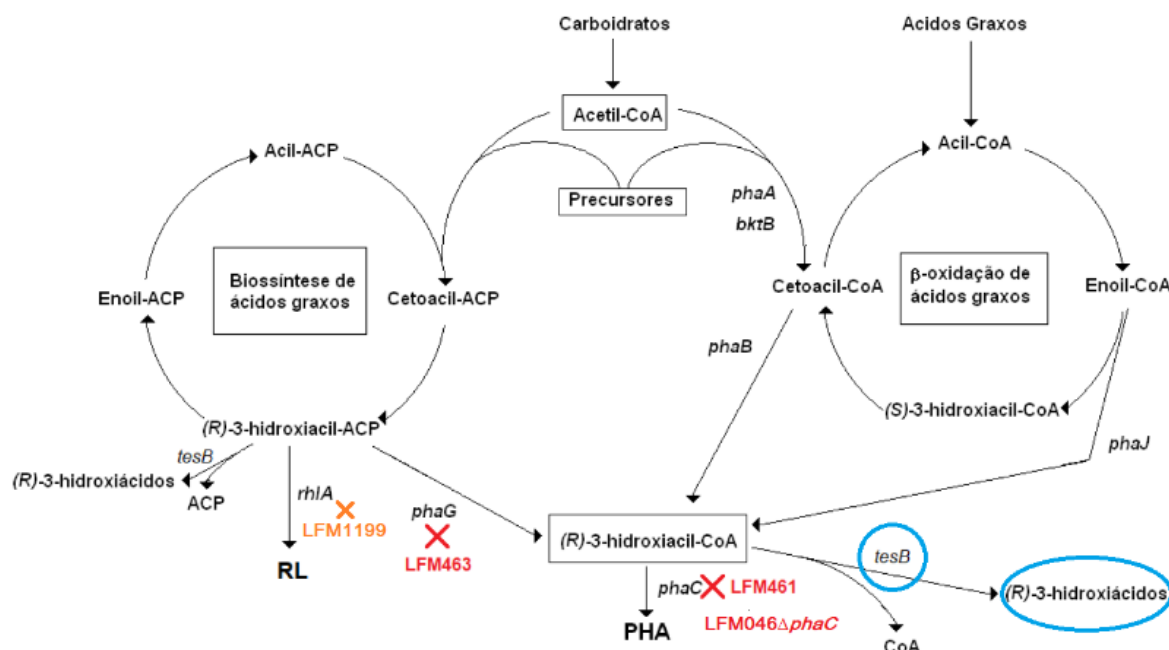


Figura 2 - vias metabólicas de relevantes para a produção de 3HAs, RL e PHA, em azul pode-se notar a via construída neste trabalho, com a inserção do gene *tesB*, em vermelho, pode-se notar as deleções realizadas em *Pseudomonas. sp.* LFM046, e em laranja, as realizadas em *P. aeruginosa* LFM634

Posteriormente, também foi incluída no estudo a bactéria *P. putida* KT2440 (BAGDASARIAN et al., 1981), uma *Pseudomonas* bem caracterizada e de uso comum, produtora de MCL3HA.

Para a construção das bactérias recombinantes contendo os plasmídeos citados na seção anterior, *E. coli* S17-1 foram transformadas por eletroporação, e cultivadas em conjunto com as *Pseudomonas* de interesse, o que permitiu a transferência horizontal de plasmídeos para estas bactérias, devido às propriedades conjugativas da bactéria *E. coli* S17-1 (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983).

Para a transformação das *Pseudomonas*, a *E. coli* S-17 contendo o plasmídeo e a *Pseudomonas* alvo foram cultivadas por 16 horas separadamente a 150 rpm e, respectivamente, 37°C e 30°C. Após isso, os meios foram misturados na proporção 2:1, e a mistura das bactérias foi centrifugada por 40 minutos a 550rpm, o sobrenadante foi descartado, a cultura foi ressuspensa em 200 µL de meio LB e incubada a 30°C por uma noite. Após a conjugação as bactérias foram semeadas e cultivadas a 30°C em placa de ágar cetrimida seletivo para *Pseudomonas* (Difco™ Cetrimide Agar Base) contendo canamicina. O processo foi repetido em uma nova

placa de ágar cetrimida com canamicina, garantindo assim que não ocorreria a presença de *Escherichia coli* e/ou *Pseudomonas* que não receberam o plasmídeo.

A transferência dos plasmídeos para as bactérias foi confirmada pela digestão dos plasmídeos extraídos da bactéria com auxílio do kit de extração plasmidial Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System.

A transferência dos plasmídeos para as linhagens *P. aeruginosa* LFM634 e *P. aeruginosa* LFM1199 não foi possível, pois estas demonstraram resistência natural a concentrações elevadas de até 1000 µg/L de canamicina, o que impossibilitou a seleção de colônias contendo o plasmídeo para experimentos posteriores.

As bactérias obtidas foram estocadas a -80°C, em solução contendo 25% de glicerol. Os ensaios realizados posteriormente ocorreram a partir destas preservações.

Cepas originais	Linhagens derivadas	Mutação	Método de mutação	Referências
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046		-	-	(GOMEZ. 200)
	<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046Δ <i>phaC1phaZ phaC2</i> (mencionada neste trabalho apenas como LFM046Δ <i>phaC</i>)	Deleção dos genes <i>phaC1</i> , <i>phaC2</i> e <i>phaZ</i>	Deleção por recombinação homóloga	(YÉPEZ. 2022) Não publicado
	<i>Pseudomonas</i> sp. LFM461	Inativação dos genes <i>phaC1</i> e <i>phaC2</i>	Luz UV	(GOMEZ. 200)
	<i>Pseudomonas</i> sp. LFM463	Inativação do gene <i>phaG</i>	Luz UV	(GOMEZ. 200)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFM634		-	-	(STRELEC. 2006)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LF1199	Inativação do gene <i>rhlA</i>	Transposon	(HONA. 2015)

Tabela 3 - Linhagens utilizadas transformadas no trabalho

4.3 ENSAIOS EM AGITADOR ROTATIVO

As cepas bacterianas foram pré inoculadas por 16 horas em meio LB (Lysogeny Broth), contendo 10 g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl a 30°C e 150 rpm, e, após isso, inoculada a 6% para um total de 25 ml de meio mineral para a produção de polihidroxialcanoatos modificado a partir de (RAMSAY et al. 1990), contendo 15 g/L de glicose como fonte de carbono e 1 g/L de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, 3,5 g/L Na₂HPO₄, 1,5 g/L K₂HPO₄, 1 ml/L de solução de elementos traço, 60 mg/L de solução citrato férrico de amônio, 10 mg/L CaCl₂ dihidratado e 0,2 g/L de MgSO₄ heptahidratado. Este meio de produção foi escolhido devido à similaridade

metabólica entre a produção de PHAs e 3HAs, além de ser bem definido, sem a presença de moléculas complexas que possam interferir de maneira inesperada no resultado.

O cultivo ocorreu por 72 horas, a indução da expressão dos genes presentes no plasmídeo foi realizada com arabinose 0,1% após 12 horas do inóculo.

4.4 ANÁLISES

A quantificação de 3HAs foi realizada por meio da técnica de propanólise (RIIS; MAI, 1988). Assim, 5 mL de sobrenadante de cada amostra foram colocados em tubo de vidro, congelados e então liofilizados. Após a liofilização, foi adicionado 100 µL de uma solução de ácido benzóico na concentração de 40,0 g/L de propanol como padrão interno, 2 mL de 1,2-dicloroetano e 2 mL de n-propanol. Os tubos foram vedados, agitados e mantidos em banho-maria a 95-100°C por 30 minutos. Após, os tubos são novamente agitados e mantidos em banho-maria a 95-100°C por mais 2 horas e meia, totalizando 3 horas de reação. Após resfriamento dos tubos, foram adicionados 4 mL de água destilada em cada tubo, os quais serão agitados por pelo menos 30 segundos e então centrifugados a 2000 rpm por 2 minutos para a separação de fases, recuperando-se a fase orgânica. Foram adicionados novamente 4 mL de água destilada e os passos de agitação e centrifugação foram repetidos mais uma vez para uma melhor limpeza da fase orgânica. Resíduos de água foram removidos utilizando sulfato de sódio (Na_2SO_4). A fase apolar (orgânica), contendo propil-ésteres, foi analisada por cromatografia gasosa. Cada 0,2 µL da fase orgânica foi analisada após a injeção fracionada (1:5) em cromatógrafo Agilent7890A equipado com uma coluna HP1, detectando-se os propil-ésteres por meio de ionizador de chama (FID). As temperaturas do injetor e detector foram 250°C e 300°C, respectivamente. Foi empregado um programa de temperatura da coluna para separar os propil-ésteres, que consistiu em 100°C por 3 minutos, aumentando até 180°C a uma razão de 6°C/min, mantendo essa temperatura por 5 minutos, a temperatura foi aumentada até 240°C a uma razão de 6°C/min, finalizando a análise. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a uma vazão de 0,6 mL/min. PHA produzidos por *P. oleovorans* ou *Pseudomonas sp.* LFM046 a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-co-3HV (Aldrich) foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração.

Os 3HA presentes intracelularmente também foram determinados por propanólise de 10 a 15 mg de células bacterianas liofilizadas e posterior análise por

cromatografia gasosa, podendo assim analisar também o acúmulo de PHA nas linhagens.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após os experimentos, como se pode notar na Tabela 4, as linhagens sem plasmídeo se comportaram como esperado e observado anteriormente em outros trabalhos do laboratório. As linhagens recombinantes obtidas com o plasmídeo a partir de *Pseudomonas sp.* LFM046 e *Pseudomonas sp.* LFM046 Δ *phaC*, apresentaram uma redução drástica no crescimento, atingindo baixos valores de massa seca celular. Na cepa *Pseudomonas sp.* LFM046 pPS33TesBpp, o acúmulo de PHA não ocorreu, diferenciando-se assim de sua contraparte selvagem. Houve também em ambas cepas recombinantes a presença de 3HAs no meio, como esperado, porém é possível que isto tenha interferido em seu crescimento, já que houve um redirecionamento do fluxo de carbono para a síntese deste metabólito, além de um possível efeito inibitório do crescimento, devido a fatores como a queda do pH. A produção de 3HAs na cepa *Pseudomonas sp.* LFM046 Δ *phaC* contendo o plasmídeo foi menor do que a presente em *Pseudomonas sp.* LFM046 contendo o mesmo vetor, os motivos para isto não foram descobertos até o momento, porém podem estar ligados ao fato de que a deleção do gene *PhaC* diminuiu o fluxo metabólico para o precursor da síntese dos 3HAs, o 3HA-CoA.

As linhagens obtidas a partir de *Pseudomonas sp.* LFM461 e *Pseudomonas sp.* LFM463 não foram afetadas drasticamente em seu crescimento celular, apresentando em certo grau até mesmo maior acúmulo de biomassa.

Era esperado que o mutante *Pseudomonas sp.* LFM461 possuísse características similares à *Pseudomonas sp.* LFM046 Δ *phaC*, porém suas características são claramente diferentes, como por exemplo, a sua produção de 3HAs foi mais de 2 vezes menor, indicando que inativação do gene *phaC* por luz UV realizada em *Pseudomonas sp.* LFM461 teve efeitos inespecíficos em seu metabolismo.

Por sua vez, *Pseudomonas sp.* LFM463 não produziu 3HB, gerando apenas uma quantidade pequena de MCL3HAs, e com alto desvio padrão, indicando que caso tenha ocorrido a produção destes compostos nesta bactéria, eles se apresentaram inconstantes. Este resultado pode ser proveniente do fato que *Pseudomonas sp.* LFM463 acumula (R)-3-hidroxiacanoatos ligado à proteína carreadora de acila

(3HA-ACP), e não produz 3HA-CoA, e, como demonstrado em outros estudos, a enzima TesB possui baixa afinidade pelos tioésteres ligados à proteína carregadora de acilas (SPENCER; GREENSPAN; CRONAN, 1978).

Pode-se notar ainda que a *P. putida* KT2440, quando contendo os plasmídeos construídos, também sofreu uma diminuição em seu acúmulo de biomassa, porém continuou a produzir PHA em pequenas quantidades. Estas linhagens se diferem das provenientes de *Pseudomonas* sp LFM046 também pelo fato de que não produziram 3HBs no sobrenadante, mas sim uma quantidade maior e estatisticamente mais relevante de MCL3HA.

Linhagem	MSC (g/L)	pH	PHA (mg/L)	3HB (mg/L)	MCL3HA (mg/)
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM046	3,62±0,39	6,42±0,03	993,2±0,1	0,0	0,0
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM046tesBpp	0,95±0,07	4,27±0,30	0,0	367,3±18,3	1,3±0,2
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM046tesBec	0,43±0,23	4,42±0,35	0,0	464,9±25,1	2,5±2,2
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM046ΔphaC	1,84±0,23	4,97 ± 0,08	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM046ΔphaC tesBpp	0,97±0,07	4,26±0,03	0,0	253,7±9,9	0,4±0,7
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM046ΔphaC tesBec	1,74±0,14	6,02±0,41	0,0	121,1±2,2	7,9±4,4
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM461	1,95±0,13	5,1±0,04	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM461tesBpp	2,78±0,11	5,34±0,12	0,0	98,6±28,5	1,1±0,8
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM461tesBec	2,65±0,18	4,96±0,13	0,0	321,6±45,0	2,2±0,8
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM463	1,87±0,23	4,83±0,07	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM463tesBpp	2,00±0,20	6,38±0,03	0,0	0,0	4,1±2,3*
<i>Pseudomonas. sp.</i> LFM463tesBec	1,63±0,64	6,02±0,08	0,0	0,0	2,4±1,7*
<i>P. putida</i> KT2440	2,74±0,33	6,32±0,08	270,0±0,0	0,0	0,0
<i>P. putida</i> KT2440tesBpp	1,73±0,37	5,92±0,14	50,0±0,0	0,0	4,7±0,6
<i>P. putida</i> KT2440tesBec	1,54±0,15	5,82±0,12	50,0±0,0	0,0	10,9±1,0

Tabela 4 - Crescimento celular, pH do mprodução de PHA, 3HB e MCL3HA em linhagens bacterianas expressando ou não os genes *tesB* de *E. coli* e *P. putida* em agitador rotativo.* indica que a presença deste composto é incerta, já que seus picos não se alinham perfeitamente com os padrões injetados no cromatógrafo gasoso, porém se localizam na mesma região.

Na Tabela 5 pode-se notar a composição dos MCL3HAs, e percebe-se que em nenhum dos casos houve a produção de 3HHx. Nas linhagens derivadas da *Pseudomonas sp* LFM046, houve uma grande predominância de 3HO, que se mostrou o único 3HA presente, exceto em *Pseudomonas sp.* LFM046 Δ phaCtesBec, que apresentou uma maior concentração de 3HDd. As linhagens modificadas a partir de *P. putida* KT2440tesBpp, por outro lado, apresentaram um perfil mais diverso de MCL3HAs; quando introduzido o gene codificador de *tesBpp*, houve uma grande produção de 3HD, e uma parte menor de 3HO, já quando o gene *tesBec* estava presente, a produção de 3HA de maior tamanho foi favorecida, com uma presença de 3HDd significativa no meio.

Linhagem	3HO (%)	3HD (%)	3HDd (%)
<i>Pseudomonas sp.</i> LFM046tesBpp	100,00	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i> LFM046tesBec	100,00	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i> LFM046 Δ phaCtesBpp	100,00	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i> LFM046 Δ phaCtesBec	20,66	-	79,34
<i>Pseudomonas sp.</i> LFM461tesBpp	100,00	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i> LFM461tesBec	100,00	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i> LFM463tesBpp	50,45	49,55	-
<i>Pseudomonas sp.</i> LFM463tesBec	100,00	-	-
<i>P. putida</i> KT2440tesBpp	16,84	83,16	-
<i>P. putida</i> KT2440tesBec	16,04	48,10	35,85

Tabela 5 - Fração molar de cada MCL3HA identificado

A partir dos dados apresentados, pode-se notar que a composição dos monômeros presentes no meio não está diretamente relacionada à proporção dos monômeros que produzem as cadeias de PHA das bactérias, pelo fato de que os 3HBs foram os obtidos em maior quantidade em bactérias que produzem exclusivamente PHA com monômeros de cadeia média.

Vale-se notar também que a enzima *TesB* obtida a partir de *E. coli* DH10B apresentou uma maior afinidade por tioésteres de maior cadeia, como é visível na diferença entre as proporções obtidas nas cepas que continham *tesBec* e as que

continham *tesBpp*. Este efeito não foi notado nas cepas derivadas da *Pseudomonas* sp. LFM463, podendo indicar que talvez haja uma maior afinidade (ainda que muito baixa) da enzima *TesBpp* por tioésteres 3HA-ACP do que a afinidade da enzima *TesBec* por este mesmo substrato.

Em todos os casos apresentados, as bactérias demonstraram uma produção de 3HAs significativamente abaixo do encontrado na literatura, como em (CHUNG et. al 2013), em que a produção de MCL3HAs atingiu de $3,24 \pm 0,15$ g/L de 3HDd em meio LB com a adição de 12g/L de ácido dodecanóico, com o uso de *Pseudomonas entomophila* portando o gene *tesB*; ou em (ZHENG et al., 2004b), em que foram obtidos $1,021 \pm 22$ g/L de 3HD a partir do cultivo de *E. coli* possuindo parte da via de síntese de PHAs e o gene *tesB* em plasmídeo, em um meio de cultivo LB com a adição de 0.5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Os motivos desta diferença continuam em aberto, porém uma possível hipótese é o uso do meio mineral para a produção de PHAs, que não foi desenhado com a fabricação de 3HAs em mente, apesar das semelhanças metabólicas de suas obtenções, além de não possuir ingredientes mais nutritivos, como extrato de levedura, peptona ou triptona. Esta redução na quantidade do produto pode decorrer também da diminuição da massa celular que ocorreu com a inserção do plasmídeo nas bactérias, devido ao efeito inibitório da produção dos 3HAs.

6. CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível notar que os mecanismos da produção de 3HAs pela construção de *Pseudomonas* manipuladas geneticamente para expressar tioesterases II é menos intuitiva do que aparenta.

A composição dos 3HAs não corresponde diretamente com a composição dos PHAs obtidos por estes microrganismos, indicando que outros fatores internos e específicos de cada bactéria regulam a estrutura dos 3HAs produzidos. Se pôde notar que *P. putida* não produziu 3HB, enquanto a linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM046 e suas derivadas produziram, possivelmente por gerar uma quantidade maior de 3HA-CoA. Isso indica que o contexto metabólico em que esta reação se insere impacta não só na quantidade de moléculas geradas, mas também nas características estruturais dos 3HAs obtidos.

A construção desta nova via metabólica ainda se mostrou danosa aos microrganismos que a expressam, o que afeta negativamente seu crescimento e o que,

potencialmente, pode ser compensado com a produção ocorrendo em um meio mais rico.

Estes achados levam a uma melhor compreensão das dificuldades envolvidas na escala molecular para a produção industrial dos 3HAs, e expande o campo de estudo ao mostrar que as *TesB* provenientes de diferentes bactérias possuem atividades significativamente diferentes em relação à produção destes compostos, como pode-se notar na clara diferença entre o comportamento da enzima proveniente de *E. coli* DH10B e *P. putida* KT2440.

Perspectivas futuras para esta área podem estar ligadas não apenas à otimização desta via metabólica, mas também à construção de uma biblioteca de enzimas com atividade de tioesterase, capaz de correlacionar a enzima aos substratos e produtos gerados por ela; bem como correlacionar diferentes espécies de microrganismos com os metabólitos de interesse industrial que possam ser gerados com a introdução de tioesterases exógenas em seu metabolismo.

7. REFERÊNCIAS

- ALBERICIO, F. Asymmetric Synthesis of α -Unsubstituted β -Hydroxy Acids. v. 5, n. 2, p. 151–161, 1 maio 2008.
- ALSOHIM, A. S. et al. The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, v. 16, n. 7, p. 2267–2281, 29 abr. 2014.
- ASGHAR, A. et al. Current challenges of biomass refinery and prospects of emerging technologies for sustainable bioproducts and bioeconomy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 20 jul. 2022.
- BAGDASARIAN, M. et al. Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, v. 16, n. 1-3, p. 237–247, dez. 1981.
- CALERO, P.; JENSEN, S. I.; NIELSEN, A. T. Broad-Host-Range ProUSER Vectors Enable Fast Characterization of Inducible Promoters and Optimization of p-Coumaric Acid Production in *Pseudomonas putida* KT2440. *ACS Synthetic Biology*, v. 5, n. 7, p. 741–753, 4 maio 2016.
- CESPEDES, L. G. Controle da composição do copolímero P3HB-co-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes *phaA* e *phaB* em *Pseudomonas* sp. LFM461. 2016 (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- CHATURVEDI, U. et al. Evolution and adoption of sustainable practices in the pharmaceutical industry: An overview with an Indian perspective. *Journal of Cleaner Production*, v. 168, p. 1358–1369, dez. 2017.
- CHEN, G.-Q.; WU, Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, n. 5, p. 592–599, 8 fev. 2005.
- CHUNG, A. et al. Microbial production of 3-hydroxydodecanoic acid by *pha* operon and *fadBA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442 harboring *tesB* gene. v. 83, n. 3, p. 513–519, 1 jun. 2009.
- CHUNG, A. et al. Production of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by β -oxidation and *phaC* operon deleted *Pseudomonas entomophila* harboring thioesterase gene. v. 17, p. 23–29, 1 maio 2013.
- GAO, H.-J.; WU, Q.; CHEN, G.-Q. Enhanced production of d-(-)-3-hydroxybutyric acid by recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 213, n. 1, p. 59–65, jul. 2002.
- GOMEZ, José Gregório Cabrera. Produção por "*Pseudomonas*" sp. de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes. 2000. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- GUY DE ROO et al. Production of chiral R-3-hydroxyalkanoic acids and R-3-hydroxyalkanoic acid methylesters via hydrolytic degradation of polyhydroxyalkanoate synthesized by pseudomonads. v. 77, n. 6, p. 717–722, 22 jan. 2002.
- HIRAMOTO, M.; OKADA, K.; NAGAI, S. The Structure of Viscosin, A Peptide Antibiotic. II.

Syntheses of D-and L-3-Hydroxyacylhexapeptides including the Proposed Structure of Viscosin and Its Optical Isomers. 1 jan. 1971.

HONNA, C.Y.. Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonasaeruginosa* afetados na biossíntese de ramnolipídeos. 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. doi:10.11606/D.42.2013.tde-26062014-112650.

KAISER, R.; DIETMAR LAMPARSKY. Das lacton der 5-hydroxy-cis-2,cis-7-decadiensaeure und weitere lactone aus dem absolue der blueten von polianthes tuberosa L. v. 17, n. 20, p. 1659–1660, 1 maio 1976.

KASHIWAYA, Y. et al. D-beta -Hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 10, p. 5440–5444, 9 maio 2000.

KATOH, O.; SUGAI, T.; OHTA, H. Application of microbial enantiofacially selective hydrolysis in natural product synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 5, n. 10, p. 1935–1944, out. 1994.

LEE, S. Y.; LEE, Y. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of Enantiomerically Pure (R)-(-)-Hydroxycarboxylic Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3421–3426, jun. 2003.

LEE, SY. LEE, Y. WANG, FL Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 65, n. 3, p. 363-368, 29 mai 1999.

LIU, Q. et al. Microbial production of R-3-hydroxybutyric acid by recombinant *E. coli* harboring genes of *phbA*, *phbB*, and *tesB*. v. 76, n. 4, p. 811–818, 4 jul. 2007.

MAROTTA, E.; RIGHI, P.; ROSINI, G. A new, effective route to methyl substituted 3,3a,4,6a-tetrahydro-2H-cyclopenta[b]furan-2-ones. v. 35, n. 18, p. 2949–2950, 1 maio 1994.

MASSIEU, L. et al. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience*, v. 120, n. 2, p. 365–378, ago. 2003.

MATSUMOTO, K. et al. Efficient (R)-3-hydroxybutyrate production using acetyl CoA-regenerating pathway catalyzed by coenzyme A transferase. v. 97, n. 1, p. 205–210, 18 maio 2012.

MERAMO, S.; FANTKE, P.; SUKUMARA, S. Advances and opportunities in integrating economic and environmental performance of renewable products. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, v. 15, n. 1, 22 dez. 2022.

NIHEI, K. et al. Enantioselective Synthesis of Four Isomers of 3-Hydroxy-4-Methyltetradecanoic Acid, the Constituent of Antifungal Cyclodepsipeptides W493 A and B. 1 jan. 2005.

O'NEILL, J. How to stop antibiotic resistance threatening global growth. Disponível em: <<https://www.weforum.org/agenda/2015/12/how-to-stop-antibiotic-resistance-threatening-global-growth/>>.

PILLONETTO, M. et al. The Experience of Implementing a National Antimicrobial Resistance Surveillance System in Brazil. *Frontiers in Public Health*, v. 8, p. 575536, 14 jan. 2021.

PRAKASH, P. et al. Advances in Polyhydroxyalkanoate Nanocarriers for Effective Drug Delivery: An Overview and Challenges. *Nanomaterials*, v. 12, n. 1, p. 175–175, 5 jan. 2022.

RADIOJEVIC, J. et al. Polyhydroxyalkanoate-based 3-hydroxyoctanoic acid and its derivatives as a platform of bioactive compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 1, p. 161–172,

23 set. 2015.

RAMSAY, B. A. et al. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 7, p. 2093–2098, 1990.

REN, Q. et al. Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, n. 1, p. 41–52, 15 abr. 2010.

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

RUTH, K. et al. Efficient production of (R)-3-hydroxycarboxylic acids by biotechnological conversion of polyhydroxyalkanoates and their purification. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 1, p. 279–286, 1 jan. 2007.

SANG HYUN PARK; SEUNG HWAN LEE; SANG YUP LEE. Preparation of Optically Active β -Amino Acids from Microbial Polyester Polyhydroxyalkanoates. v. 2001, n. 11, p. 498–499, 1 nov. 2001.

SEEBACH, D. et al. Synthesis and Enzymatic Degradation of Dendrimers from (R)-3-Hydroxybutanoic Acid and Trimesic Acid. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 35, n. 2324, p. 2795–2797, dez. 1996.

SEEBACH, D; ALBERT, M; ARVIDSSON, P; RUEPING, M; SCHREIBER, J. rom the biopolymer PHB to biological investigations of unnatural β - and γ -peptides. V. 55, n4, p 345-353, 1 dez. 2001.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology*, v. 1, n. 9, p. 784–791, nov. 1983.

SPENCER, A. K.; GREENSPAN, A. D.; CRONAN, J. E. Thioesterases I and II of *Escherichia coli*. Hydrolysis of native acyl-acyl carrier protein thioesters. *Journal of Biological Chemistry*, v. 253, n. 17, p. 5922–5926, set. 1978.

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

SURENDRAN, A. et al. Can Polyhydroxyalkanoates Be Produced Efficiently From Waste Plant and Animal Oils? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, 17 mar. 2020.

TACIRO, Marilda; DIAS, Felipe. Processo 20/15321-0 - Hidroxiácidos, Engenharia metabólica - BV FAPESP. Disponível em: <<https://bv.fapesp.br/pt/bolsas/194748/construcao-de-linhagem-capaz-de-excretar-hidroxiacidos/>>. Acesso em: 4 ago. 2023.

TASAKI, O. et al. The Dimer and Trimer of 3-Hydroxybutyrate Oligomer as a Precursor of Ketone Bodies for Nutritional Care. v. 23, n. 6, p. 321–325, 1 nov. 1999.

TIEU, K. et al. D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 6, p. 892–901, 1 set. 2003.

YAÑEZ, L. et al. Beyond Intracellular Accumulation of Polyhydroxyalkanoates: Chiral Hydroxyalkanoic Acids and Polymer Secretion. v. 8, 3 abr. 2020.

YANG, K. et al. Quantifying the energy-material-pollution nexus in a typical fine chemical industry: A sustainable development-oriented support for collaborative emission reduction. *Science of The Total Environment*, v. 905, p. 166826–166826, 1 dez. 2023.

ZHENG, Z. et al. Production of 3-hydroxydecanoic acid by recombinant *Escherichia coli* HB101 harboring phaG gene. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 85, n. 2, p. 93–101, fev. 2004a.

ZHENG, Z. et al. Thioesterase II of *Escherichia coli* Plays an Important Role in 3-Hydroxydecanoic Acid Production. v. 70, n. 7, p. 3807–3813, 1 jul. 2004b.

ZHANG, X. et al. Application of (R)-3-Hydroxyalkanoate Methyl Esters Derived from Microbial Polyhydroxyalkanoates as Novel Biofuels. v. 10, n. 4, p. 707–711, 27 fev. 2009.

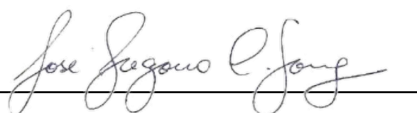
7. ANEXOS

28.11.2023



Data e assinatura do aluno(a)

28.11.2023



Data e assinatura do orientador(a)