

Uma visão heurística sobre o estudo de polímeros biodegradáveis da família dos *Polihidroxicanoatos* no Brasil

Aluno: Jefferson Gonçalves Pinheiro Silva

Professor Dr. Orientador: Oscar João Abdounur

RESUMO

O impacto ambiental de produtos de origem petroquímica, como os plásticos, tem levado à busca por materiais similares que sejam ambientalmente corretos e possam ser produzidos a partir de fontes renováveis. Uma alternativa são os polihidroxicanoatos (PHA), uma família de poliésteres termoplásticos ou elastoméricos, biodegradáveis e biocompatíveis, acumulados por algumas bactérias. A incorporação e a modulação de monômeros variáveis à estrutura dos PHA apresentam potencial para o desenvolvimento de novos materiais para aplicações médicas. Diversos estudos relacionados a esse biopolímero têm sido desenvolvidos no Laboratório de Bioprodutos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Esse relatório se concentra numa análise breve sobre o estudo de PHA sob uma perspectiva heurística.

Palavras chave: Polímeros biodegradáveis; Polihidroxicanoatos; Heurística.

ABSTRACT

The environmental impact of products of petrochemical origin, such as plastics, has led to the search for similar materials that are environmentally correct and can be produced from renewable sources. An alternative is the polyhydroxyalkanoates (PHA), a family of thermoplastic or elastomeric polyesters, biodegradable and biocompatible, accumulated by some bacteria. The incorporation and modulation of variable monomers to the PHA structure present potential for the development of new materials for medical applications. Several studies related to this biopolymer have been developed at the Bioproducts Laboratory of the Institute of Biomedical Sciences at the University of São Paulo (ICB-USP). This report focuses on a brief analysis of the study of PHA from a heuristic perspective.

Keywords: Biodegradable polymers; Polyhydroxyalkanoates; Heuristic.

1 INTRODUÇÃO

Nas décadas passadas, o termo *heurística* era compreendido como a área do conhecimento que estudava métodos e modo a encontrar ou estabelecer soluções para um problema (TONETTO et al., 2006). Em termos literários, a palavra é compreendida como um substantivo e também pode ser utilizada como adjetivo, isso porque ela qualifica alguns tipos de processos em várias áreas do conhecimento e, embora não seja possível identificar um significado único do que pode ser caracterizado como heurístico, em geral, conserva-se a idéia de que se trata de inferências não demonstrativas (plausíveis) que economizam recursos (PAZ, 2019). Há heurística surgiu na área de exatas, onde costuma ser identificada com um “atalho de pensamento” de modo a permitir que se chegue a uma solução sem estabelecer uma prova justificada. O conhecimento heurístico vem sendo utilizado nas ciências naturais, sociais e na filosofia (FONSECA, 2016).

Entre as ciências naturais, destacam-se as Ciências biológicas ou simplesmente Biologia. A Biologia pode ser definida como a ciência natural que estuda os organismos vivos, desde sua estrutura mais básica até a mais derivada, além dos componentes abióticos que cerca esses organismos. Dentre as áreas de estudo dentro da Biologia, a Microbiologia destaca-se pela alta influência que exerce na sociedade (ERNST, 2005). A Microbiologia é uma área dentro da Biologia que busca compreender os microrganismos, ou seja, seres vivos em escala micrométrica e que só podem ser vistos pelos seres humanos com o auxílio de um microscópio. A Microbiologia pode ser estudada por área, sendo saúde, ambiental e industrial as principais áreas. Adicionalmente, o objeto de estudo da microbiologia são os seguintes microrganismos: bactérias (bacteriologia), vírus (virologia) e fungos (micologia). A microbiologia industrial, mais especificamente a bacteriologia industrial, tem crescido rapidamente, devido a facilidade em se trabalhar com bactérias (NELSON, 1998). As bactérias podem ser utilizadas para a fabricação de produtos alimentícios, na área cosmética, para a produção de fármacos, e na fabricação de bioprodutos. Bioprodutos são definidos como material e ou objetos de base biológica derivados de recursos renováveis e ambientalmente corretos. Dentre os materiais cotidianos, o plástico é o mais

utilizado e um dos mais danosos ao meio ambiente. O desenvolvimento de pesquisas para alternativas sustentáveis ao plástico de origem petroquímica vêm sendo estudadas.

Entre as alternativas, destacam-se os polihidroxicanoatos (PHA). Os PHA são poliésteres acumulados por algumas espécies de bactérias quando existe abundância de carboidrato e ausência de outro nutriente essencial a sua multiplicação. Os PHA possuem propriedades físicas e químicas similares aos plásticos convencionais. Dependendo de sua composição podem ser apresentar características termoplásticas ou elastoméricas. O laboratório de Bioprodutos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) tem estudado esse tipo de material há mais de três décadas. O presente trabalho tem como proposta revisar as principais metodologias envolvidas no estudo de PHA sob um ponto de vista heurístico.

1.1 UMA VISÃO GERAL SOBRE OS PHA

Nas décadas recentes, devido ao impacto ambiental do uso de plásticos de origem petroquímica, de difícil degradação, diversas alternativas vêm sendo estudadas para se produzirem materiais dotados das mesmas propriedades, que sejam menos danosos ao meio ambiente. Uma dessas alternativas são os polihidroxicanoatos (PHA), que constituem uma classe de ésteres poliméricos, presentes tanto em procariotos quanto em eucariotos, porém, a quantidade detectada nesses últimos é considerada baixa, quando comparada à capacidade em que os procariotos têm em acumular até 80% de sua biomassa na forma de PHA (SILVA et al., 2001, SILVA et al., 2007, SILVA et al., 2014). O poli β -hidroxibutirato (PHB) foi o primeiro tipo de PHA descoberto, em 1923 por Lemoigne (GOMEZ, 1994), tendo sido inicialmente utilizado como um dado adicional na identificação bacteriana. A partir da década de 1980, suas propriedades termoplásticas foram detectadas e, com isso, surgiu o interesse na sua produção em maior escala (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995). O acúmulo de PHA por bactérias ocorre em forma de grânulos citoplasmáticos (Figura 1).

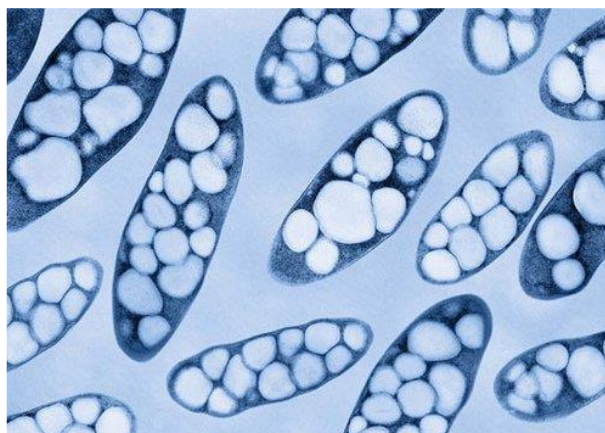


Figura 1. Células bacterianas com grânulos intracelulares de PHA (extraído de <http://2009.igem.org/Team:Duke>).

Nos microrganismos, os PHA constituem uma reserva de carbono, energia e equivalentes redutores, tendo sido reportado seu envolvimento em processos de resistência à pressão osmótica, a proteção da célula contra a dessecação e a ação dos raios ultravioleta (UV) (BRANDL et al, 1990). Para que o microrganismo seja capaz de acumular o biopolímero de modo mais expressivo, em geral, é necessário que no meio de cultivo haja excesso da fonte de carbono e a limitação simultânea de ao menos um nutriente essencial a sua multiplicação, como nitrogênio, fósforo, oxigênio e etc. (LAFFERTY et al., 1988; BRANDL et al., 1990).

Além de serem termoplásticos, ou seja, poderem ser conformados e moldados sob ação do calor (SILVA et al., 2004), PHA são biocompatíveis e assim podem ser empregados em procedimentos cirúrgicos, sem que haja rejeição do órgão ou tecido, e na produção de cápsulas para liberação controlada de fármacos (SILVA et al., 2001), entre outras aplicações médico-farmacêuticas. São biodegradáveis por fungos e bactérias, quando descartados no meio ambiente, liberando como produtos CO_2 e água (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995). Em meio intracelular, a degradação ocorre por meio de enzimas denominadas PHA *despolimerases* e é realizada em todos os microrganismos que possuem a capacidade de acumular esse polímero naturalmente (GOMEZ, 1994). Uma vantagem industrial e ambiental

dos PHA é que podem ser produzidos a partir de matérias-primas de baixo custo econômico e de fontes renováveis, como carboidratos, óleos vegetais e até mesmo a partir de resíduos agroindustriais (SILVA et al., 2007, SILVA et al., 2014).

Diversos estudos foram realizados para buscar no meio ambiente bactérias com bom potencial de produção de PHA, destacando-se no nosso grupo de pesquisas a bactéria *Burkholderia sacchari*, isolada no Brasil a partir de solo de canavial (GOMEZ et al., 1996, BRÄMER et al., 2001, ALEXANDRINO et al., 2015) sendo capaz de produzir até 80% da biomassa na forma de PHA. Esta bactéria mostrou-se promissora para uso industrial, sendo alvo de patente (SILVA;GOMEZ.,2013), tendo sido utilizada em estudos recentes e proposta como plataforma biológica para a expressão de genes de outras vias envolvidos na produção de PHA, visando obter PHA com composição monomérica variável, o que implica na diversificação de propriedades físico-químicas e, portanto, ampliando suas aplicações, diretamente dependentes dessa composição monomérica, como apresentado mais adiante (GOMEZ et al., 1996, SILVA et al., 2000, BRÄMER et al., 2001, 2002, SILVA et al., 2004, PEREIRA et al., 2009; LOPES et al 2009; 2011, MENDONÇA et al., 2013; SILVA et al., 2015; MENDONÇA et al., 2016, NASCIMENTO et al., 2016).

Os monômeros constituintes dos PHA podem ser hidroxialcanoatos dotados de estrutura química de cadeia curta (SCL), contendo 3-5 átomos de carbono, ou ainda, monômeros de cadeia média (MCL), com 6-12 carbonos. Copolímeros contendo mais de um monômero diferente podem ser formados a depender da especificidade da PHA sintase, enzima responsável pela esterificação dos monômeros.

Quatro classes de PHA sintases foram descritas e, de modo geral, têm especificidade ou para monômeros SCL ou MCL, sendo difícil incorporar percentuais equivalentes de ambos (MADISON; HUISMAN, 1999; RHEM 2003). Este aspecto é relevante, já que, a variedade da composição monomérica determina as propriedades mecânicas do polímero e, conseqüentemente suas aplicações. A partir de carboidratos como xilose ou

sacarose, o PHA produzido é o 3HB cristalino e quebradiço, com limitadas aplicações (SUDESH et al., 2000). A inserção de outros monômeros na cadeia, como 3-hidroxicaproato (3HV), 4-hidroxiacetato (4HB), ou especialmente monômeros de cadeia média (mcl-HA) com 6 (3-hidroxi-hexanoato, 3HHx) ou mais átomos de C confere maior elasticidade aos PHA. O copolímero P (3HB-co-3HHx) exibe uma flexibilidade adequada para muitos usos, com propriedades mecânicas similares ao polietileno de baixa densidade, tornando-se mais flexível com o aumento do teor de 3HHx. Atualmente, várias empresas estão investindo na produção deste copolímero. A Kaneka no Japão e Bélgica produzem a AONILEX®, a base de 3HB-co-HHx. A Meredian, Ga, USA, inaugurou uma das maiores matrizes de produção de PHA, principalmente dos copolímeros (PHB-co-HHx), P(3HB-co-3HO, 3HO:3-hidroxi-octanoato) e (3HB-co-3HOD, 3HOD: 3-hidroxi-decanoato), com uma capacidade anual de cerca de 300.000 toneladas.

O uso de 3HB-co-3HHx tem sido reportado na área médica (tecidos cartilagosos, suporte para a proliferação de células ósseas e musculares) (LIZARRAGA-VALDERRAMA et al., 2015). 3HB-co-3HHx é naturalmente produzido por bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas*, (*A. caviae* e *A. hydrophila*) a partir de óleos vegetais ou ácidos graxos com uma incorporação de 5 a 25 % molar de 3HHx (DOI et al., 1995; Lu et al., 2005). No entanto, a porcentagem (m/m) em copolímero é geralmente baixa e a separação das células é difícil devido à elevada viscosidade do meio decorrente da fonte de C utilizada. *B. sacchari* demonstrou ser capaz de acumular cerca de 60 % de PHB a partir de hidrolisados lignocelulósicos (SILVA et al., 2004; CESÁRIO et al., 2014) e de sintetizar 3HB-co-3HHx a partir de glicose e ácido hexanóico (MENDONÇA et al., 2012, MENDONÇA et al., 2013, MENDONÇA et al., 2014) com uma incorporação de cerca de 2 % de 3HHx. De modo a aumentar a incorporação dos monômeros de 3HHx na cadeia polimérica, foram construídos recombinantes de *B. sacchari* com genes de *A. hydrophila* ou genes de *Ralstonia eutropha* envolvidos na síntese de PHA, tendo-se obtido 10 a 15 vezes maior teor de HHx no copolímero, modulando o teor de 3HHx no

PHA (MENDONÇA, 2009; MENDONÇA et al., 2012; MENDONÇA et al., 2013 a, b; TAVARES et al., 2012; MENDONÇA et al., 2017).

Em projeto finalizado no nosso laboratório em colaboração com a empresa ChainCraft, B. V. (<http://www.chaincraft.nl/home-en/>) foi desenvolvido um processo em que, a partir de resíduos agro-alimentícios, uma mistura de ácidos graxos de cadeia média (MCFA) foi especialmente desenhada para alimentar os recombinantes construídos, que foram testados nessa mistura de MCFA em presença de glicose (Mendonça et al., artigo em preparação). No Brasil, com o desenvolvimento de etanol de 2ª geração e a incapacidade de leveduras fermentarem a xilose a etanol de modo eficiente, há a perspectiva de haver grandes quantidades de xilose disponíveis para gerar outros produtos (SILVA et al., 2015). Embora diversas iniciativas tenham sido anunciadas, dados científicos ainda são escassos. Biopolímeros da família dos PHA tem sido um dos bioprodutos modelo de estudo empregando diversos derivados de biomassa.

2 METODOLOGIAS EMPREGADAS NO ESTUDO DE PHA

O presente tópico tem como objetivo realizar uma discussão breve a cerca das visões de Karl Popper, Imre Lakatos e George Pólya no que diz respeito à ciência, método científico e os procedimentos comumente empregados durante estudos envolvendo PHA. Não serão explorados os resultados obtidos em cada um dos procedimentos e nem a metodologia aprofundada de cada técnica.

2.1 Karl Popper e a falseabilidade

O método é a estratégia a ser seguida pelo pesquisador, compreendendo desde a formulação de uma hipótese até sua confirmação. O método, através de um conjunto de etapas, buscará a “verdade”. A verdade é será validade pelo método científico, visto que ela nunca será alcançada. Para ser considerada uma pesquisa científica, o método utilizado também deverá ser científico, ou seja, deve se elaborar os estudos de modo que outros pesquisadores também possam explorar o estudo, identificando e destacando

aquilo que já foi observado e refutando análises equivocadas. Os métodos seguidos no estudo de PHA são os métodos de procedimentos. Nesse tipo de metodologia, aplicam-se procedimentos técnicos (FONSECA, 2016). Possivelmente, Lemoigne (1923) ao realizar a primeira observação dos grânulos de PHA tenha utilizado um pensamento indutivista a cerca de sua descoberta. O método indutivista, proposto por Francis Bacon, é um modelo de argumentação com o objetivo de se chegar a uma conclusão partindo de um raciocínio particular. Logo, ao observar o grânulo de PHA, seria natural pensar que ele estaria presente em todos os tipos de bactérias. Segundo o levantamento que realizei, não consegui verificar se de fato Lemoigne (1923) fez uma observação indutivista a cerca de sua descoberta, porém, assim como todas as bactérias possuem membrana plasmática, material genético e ribossomos, seria natural inferir que todas tem a capacidade de sintetizar essa molécula.

Independentemente da inferência de Lemoigne (1923) sobre seu achado, posteriormente, observou-se que o estudo de PHA estava mais vinculado ao método *hipotético-dedutivista*, proposto por Karl Popper (POPPER, 1972). O método hipotético-dedutivista derruba o mito do observacionismo, ou seja, conjecturas. As conjecturas são definidas como a ação ou efeito de inferir ou deduzir que algo é provável, com base em presunções e evidências incompletas. Com isso, Karl Popper propôs que os problemas devem partir primeiramente de uma hipótese científica para depois ser submetida a estudos.

Podemos iniciar o estudo de PHA com o seguinte questionamento “Todas as bactérias acumulam PHA?”, pelo método indutivista a resposta seria sim, afinal, se encontramos PHA em uma determinada espécie de bactérias, provavelmente encontraremos em outras. Seguindo o método hipotético dedutivista a resposta é não. A resposta para essa pergunta pode ser obtida aplicando o procedimento de técnico metodológico de *screening*. O método de *screening* consiste em verificar, por meio de análises qualitativas, se bactérias são ou não capazes de acumular PHA. Esse tipo de experimento pode ser

utilizado aplicando vários tipos de corantes que possuam afinidade pelos grânulos de PHA. Para isso, as linhagens devem ser cultivadas em meio sólido em meio mínimo e com o excesso no fornecimento na fonte de carbono. O corante *Sudan-Black* é amplamente utilizado nesse procedimento, porém, o método apenas indica a possibilidade das linhagens avaliadas em acumular PHA ou não, de modo que a quantidade e o tipo de biopolímero requerem técnicas mais sofisticadas de análise (Figura 2).

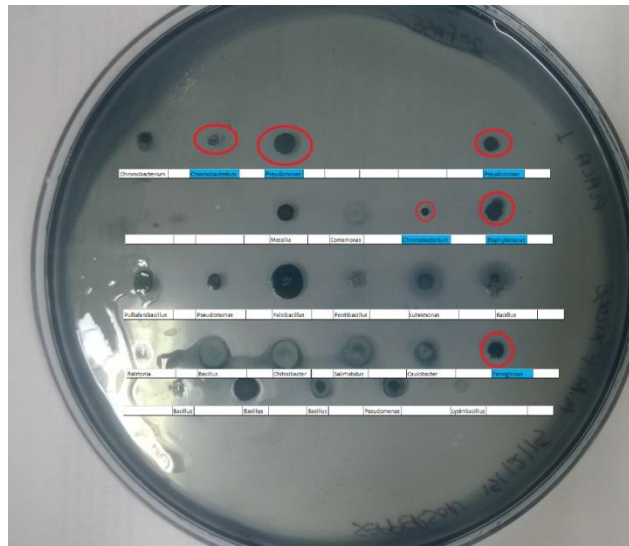


Figura 2: Cultivo para a avaliação de linhagens bacterianas potencialmente acumuladoras de PHA através da coloração por Sudan Black. Os círculos em vermelho indicam os resultados mais interessantes. **Fonte:** Acervo pessoal

Ainda do ponto de vista de Karl Popper, toda pesquisa inicia-se com um problema. A partir desse problema é elaborada uma hipótese a fim de se obter uma solução para este. Uma vez que a hipótese é elaborada, ela precisa ser comprovada. Ou seja, retornando a abordagem de *screening* utilizada para verificar a presença de grânulos de PHA em bactérias, a hipótese seria “Todas as bactérias acumulam PHA?”. A hipótese poderia ser sim ou não, a comprovação pelo técnica de *screening* demonstraria que não. Porém, uma teoria só é científica, segundo Popper, se ela for passível de ser falseada pelos fatos. Diante disso, seria os estudos sobre PHA científicos sob o ponto de vista de Popper? Sim, pois o teste de *screening* é passível de ser falseado, assim

como todas as outras etapas envolvendo a pesquisa no campo dos PHA, tendo em vista que os corantes podem se aderir a outras estruturas que não sejam necessariamente os grânulos de PHA, além disso, outros fatores, tais como o preparo da solução pode interferir no resultado e falsas respostas podem ser geradas. E como obter respostas mais precisas sobre o estudo de PHA? Bem, procedimentos mais refinados devem ser utilizados, tais como procedimentos que envolvam o uso de biologia molecular, bioinformática e bioengenharia.

2.2 Imre Lakatos: Núcleo duro e o cinturão

Simpatizante de Karl Popper, Imre Lakatos desenvolveu sua exposição sobre ciência como uma tentativa de resolver a crítica ao falsificacionismo do mestre (GUIMARÃES, 2017). Seu desejo esteve em avançar no reconhecimento dos elementos que fundam o diagrama de pesquisa científica e sua inscrição histórica e, portanto, avaliá-lo à luz de sua tese central. Nessa direção, o planejamento de pesquisa baseada em Lakatos é uma base que fornece orientação para a comunidade científica, porque permite que a pesquisa e seus resultados, sejam avaliados de maneira constante e, ainda, apontam o direcionamento para os pesquisadores atuais e àqueles que irão a eles se juntar. É formado por quatro elementos estruturantes básicos, a considerar: núcleo duro, cinturão protetor, heurística negativa e a heurística positiva (LAKATOS, 1974)

O núcleo duro é a característica que define a pesquisa científica de Lakatos e assume a forma de um pressuposto teórico universal que constitui a base no qual a pesquisa evolui. O núcleo confere a unidade da pesquisa e, assim, removê-lo ou alterá-lo produzirá seu alijamento, reduzindo-o a um enredo teórico incoerente. Nele encontra-se a premissa teórica fundante da pesquisa que, consensuada pelos protagonistas, é considerada infalsificável. Uma vez alcançado, o núcleo duro assume o trabalho de sustentar toda a pesquisa, sendo considerado elemento contínuo. Por isso, os proponentes devem ter a devida transparência para a sua formulação, reconhecendo a grandeza e dimensão que exercem no estudo (GUIMARÃES, 2017). Do ponto de

vista do estudo dos PHA, o núcleo duro se concentraria nas condições de acúmulo desse biopolímero. Essas condições foram discutidas no item 1.1, são elas o excesso na fonte de carbono, não importa qual seja ela (glicose, sacarose, xilose) e limitação em algum nutriente essencial a multiplicação celular. Diversos estudos no campo de PHA , desde ensaios mais básicos como os cultivos em placas de Petri até mais sofisticados como cultivos em biorreator, já demonstraram que apenas diante dessas condições de “estresse” é que pode haver a formação do grânulo .

O cinturão protetor é o segundo componente do plano de pesquisa proposto por Lakatos (GUIMARÃES, 2017). Ele é constituído pelas hipóteses auxiliares explícitas que suplementam o núcleo, uma vez que, suposições subjacentes à exposição das condições iniciais e pelas proposições observacionais. Essas hipóteses servirão de anteparo para inviabilizar que fatos observados e não elucidados, venham a ferir o núcleo. Desta maneira, são essas hipóteses auxiliares que poderão ser substituídas ou remodeladas, contudo, cumprem a função de ser anteparo ao núcleo e, desta maneira, ele se manterá íntegro. Dentro do estudo de PHA o cinturão protetor são as enzimas que fazem parte de determinado tipo de microrganismo. Por exemplo, ao realizar cultivos com excesso na fonte de carbono e limitação em algum nutriente essencial, três resultados são passíveis de serem obtidos. O primeiro é o crescimento mediado pela quantidade de nutriente limitante essencial fornecido pelo meio de cultura, o consumo total da fonte de carbono e o acúmulo de PHA; numa segunda situação pode ocorrer o crescimento e o não acúmulo de PHA; na terceira situação pode não haver crescimento e conseqüentemente a ausência de acúmulo. Caso ocorra o segundo ou o terceiro caso, seria plausível inferir que o núcleo duro proposto não se sustenta, porém, ao analisar esses resultados, provavelmente verificaremos que o microrganismo que não acumulou PHA é desprovido da enzima *PHA síntase* ou outras envolvidas na síntese de PHA (Figura 3).

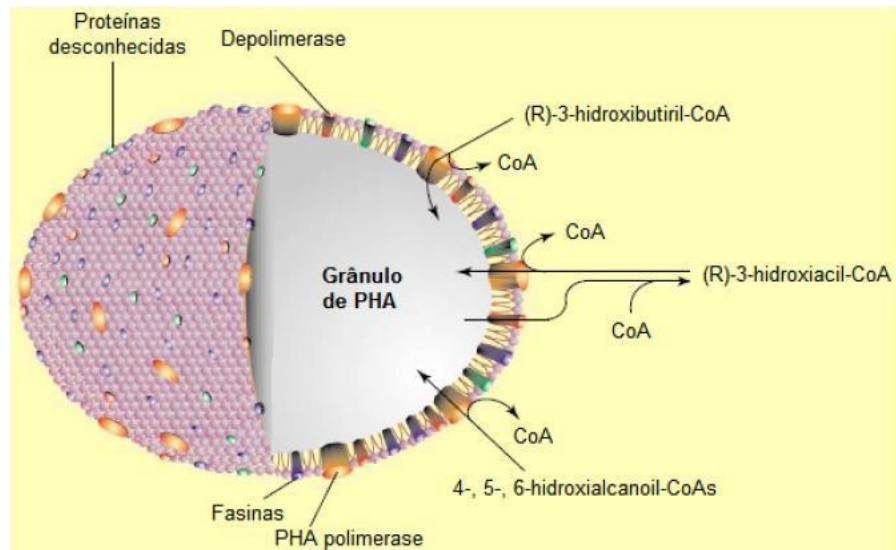


Figura 3: Representação da síntese de grânulo de PHA e as principais enzimas envolvidas no processo. **Fonte:** Karina Cesca.

Estudos envolvendo linhagens mutantes de *Burkholderia sacchari* demonstraram a incapacidade destas em acumular PHA (PHA-), posteriormente, através do seqüenciamento do genoma foi observado que as regiões responsáveis por transcrever enzimas envolvidas no metabolismo de PHA haviam sido prejudicadas. Com o objetivo de se verificar se era de fato essas enzimas o fator chave no não acúmulo de PHA, um plasmídeo contendo genes necessários para síntese de enzimas relacionadas a o metabolismo de PHA foram inseridos e foi observado a recuperação da capacidade em acumular PHA (Figura 4).

Na situação em que não há crescimento, possivelmente a bactéria é incapaz de consumir a fonte de carbono oferecida, como é o caso de muitos microrganismos incapazes de consumir xilose como fonte de carbono devido à ausência das enzimas envolvidas no catabolismo desse carboidrato.

O terceiro elemento é a heurística negativa. Ela é a exigência de que durante o desenvolvimento do programa de pesquisa científica, o núcleo duro deve permanecer intacto e sem modificações. O quarto componente é a heurística positiva. Ela constitui o aspecto do programa que indica aos pesquisadores o que deve ser feito, antes do que não se deve fazer, é algo

mais superficial e difícil de caracterizar do que a heurística negativa (PAZ, 2019).

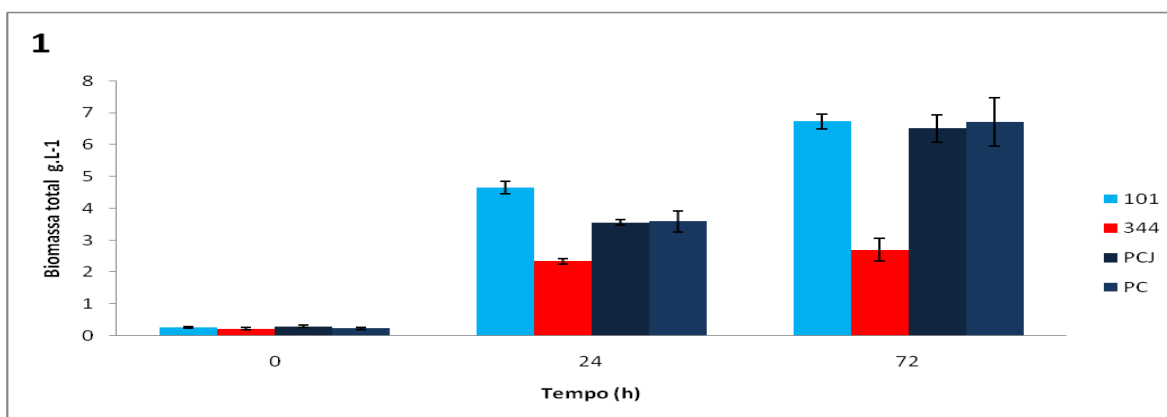


Figura 4: Acúmulo observado ao longo de 72h de cultivo em frascos agitados. A linhagem 101 refere-se a uma *Burkholderia sacchari* selvagem. A linhagem 344 refere-se a uma *Burkholderia sacchari* mutante, que perdeu a capacidade de acumular biopolímero. As linhagens contendo os genes PCJ e PC são *Burkholderias saccharis* mutantes contendo genes de síntese de PHA. Observa-se a recuperação da capacidade dessas linhagens em acumular PHA. **Fonte:** Silva, 2020

2.3 George Pólya e a arte de resolver problemas

Os estudos recentes sobre PHA tem se concentrado na análise de redes metabólicas. A análise de redes metabólicas pode ser compreendida a partir das ideias de Pólya (POLYA, 1910). Heuristicamente, Pólya propõe que devemos 1- entender o problema que nos cerca (PRODANOV et al. , 2013). Do ponto de vista do estudo dos PHA, especificamente no Laboratório de Bioprodutos do ICB-USP, o problema atual seria compreender como funciona o metabolismo microbiano, mais especificamente o metabolismo de *Burkholderia saacchari*.

Ainda sob o ponto de vista de Pólya , a segunda etapa seria “construir estratégias para resolver um problema” (PRODANOV et al. , 2013). No sentido de estudo de redes metabólicas, várias estratégias têm sido construídas para resolver esse “problema”. Uma delas é o uso de análises de fluxos metabólicos

(AFM). A AFM se utiliza da avaliação das velocidades de reações envolvidas nas vias metabólicas, possibilitando o entendimento de forma detalhada e quantitativa da natureza dos fluxos das reações bioquímicas, sendo essencial que se conheça todos os componentes de uma rede metabólica e não apenas um metabolito em particular (PRADELHA et al., 2012).

Na terceira etapa, é sugerido por Pólya executar a estratégia (PRODANOV et al. , 2013), nesse caso, a análise por AFM. A execução da AFM baseia-se no uso de várias ferramentas para se resolver matematicamente múltiplas variáveis em uma AFM. Dentre essas várias ferramentas podemos destacar o *Metatool*. O *Metatool* baseia-se no conceito de modos elementares de fluxos. Os modos elementares são construídos a partir de uma rede metabólica onde podem testar conjuntos de enzimas que formam uma via metabólica consistente, considerando o direcionamento (irreversibilidade) das reações. A partir da análise de um modelo de rede metabólica, e utilizando os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente, o programa define as possíveis vias que o microrganismo utiliza na situação em estudo para fechar o balanço estequiométrico, gerando uma ou mais equações que representam este caminho (modos elementares) (TACIRO, 2008).

Na quarta etapa, Pólya propõe revisar a solução. As análises de redes metabólicas a partir de AFM tem se demonstrado pouco conclusivas devido a uma série de perguntas não respondidas a partir desse tipo de avaliação. Um exemplo é o estudo da AFM de *Burkholderia sacchari* PCJ com o suprimento de xilose e ácido hexanóico como fontes de carbono. A partir da AFM cerca de 120 soluções possíveis foram propostas para o metabolismo, porém, nenhuma foi validada.

Desse modo, outras formas de responder questões envolvendo a compreensão do metabolismo tem sido empregadas. Entre abordagens mais refinadas que a AFM , podemos destacar a reconstrução de redes metabólicas a partir de dados genômicos, ferramenta que tem sido explorada na área da saúde e cada vez mais na área industrial, inclusive o estudo de PHA.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho *in silico* e *in vitro* no que diz respeito à pesquisa relacionada aos polímeros biodegradáveis da família dos Polihidroxicanoatos no Brasil é tão bem estabelecida, sendo estudada desde a década de 1990, que ao iniciar na área, pouco nos preocupamos se as abordagens estão inseridas no contexto do que é considerado Ciência. Aqui, neste trabalho, foram realizadas tentativas de se inserir o contexto de estudo de PHA na visão de três grandes influentes na área do pensamento científico Karl Popper, Imre Lakatos e George Pólya, tendo sido demonstrado como as principais metodologias de estudos envolvendo o contexto de PHA se inserem na visão científica desses autores. Finalmente, embora muitos protocolos estejam muito bem estabelecidos para a área, ainda há muitos outros a serem explorados, tais como as reconstruções de redes metabólicas, que ao consultar a literatura disponível nos deparemos com diferentes estratégias de estudos para diferentes tipos de organismos. Desse modo, é necessário pensar heurísticamente uma possibilidade mais eficiente a cerca do estudo das redes metabólicas inseridas no contexto de produção de polímeros biodegradáveis da família dos Polihidroxicanoatos.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexandrino, P. M. R., Mendonça, T. T., Bautista, L. P. G., Cherix, J., Lozano-Sakalauskas, G. C., Fujita, A., ... & Gomez, J. G. C. (2015). Draft genome sequence of the polyhydroxyalkanoate-producing bacterium *Burkholderia sacchari* LMG 19450 isolated from Brazilian sugarcane plantation soil. **Genome Announc.**, 3(3), e00313-15.

BUFFONI, E. Avaliação da composição de polímeros biodegradáveis produzidos por *Burkholderia sacchari* a partir de diferentes substratos. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) –Instituto de Pesquisas Tecnológicas –Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FONDI, Marco; LIÒ, Pietro. Genome-scale metabolic network reconstruction. In: **Bacterial Pangenomics**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 233-256.

FONSECA PATRÓN, Ana Laura. El debate sobre las heurísticas. Una disputa sobre los criterios de buen razonamiento entre la Tradición de Heurística y Sesgo y la Racionalidad Ecológica. *Valenciana*, v. 9, n. 17, p. 87-115, 2016.

FRANCKE, Christof; SIEZEN, Roland J.; TEUSINK, Bas. Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 11, p. 550-558, 2005.

GOMEZ, J. G. C. et al. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 6, p. 785–791, 1996.

Gomez, J. G. C. Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de Polihidroxialcanoatos. Tese (Mestrado em Biotecnologia)- São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1994.

GUIMARÃES, Gilberto de Lima et al. THE CONTRIBUTION OF IMRE LAKATOS FOR EPISTEMOLOGICAL ANALYSIS OF THE BRASÍLIAN NURSING POSTGRADUATE PROGRAM. *Texto & Contexto-Enfermagem*, v. 26, n. 1, 2017.

HAGGART, Charles R. et al. Whole-Genome Metabolic Network Reconstruction and Constraint-Based Modeling*. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 2011. p. 411-433.

Lakatos I. Falsification and the methodology of scientific research programs. In: Lakatos I, *Criticism and the growth of knowledge*. Cambridge: University Press; 1974.; p.20-6.

LIMA, Nelson. *Biotecnologia Microbiana*. 1998. (NELSON, 1998)

MAYR, Ernst. *Biologia, ciência única*. Editora Companhia das Letras, 2005.

MENDONÇA, T. T. Estudo de bactérias recombinantes e análise de fluxos metabólicos para a biossíntese do copolímero biodegradável poli (3-hidroxi butirato-co-hidroxi hexanoato) [P(3HB-co-3HHx)]. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo

MENDONÇA, T. T. et al. Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by *Burkholderia sacchari*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 654–663, 2017.

PAZ, Cleane C.; MAGALHÃES, Janildo L.; FERREIRA, Luciana NA. O Diagrama Heurístico em atividades experimentais baseadas em problemas no Ensino Superior de Química.

PÓLYA, George; CONWAY, John Horton. How to solve it: A new aspect of mathematical method. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1910.

POPPER, Karl R. *Conjecturas e refutações:(o progresso do conhecimento científico)*. Ed. Universidade de Brasília, 1972.

PRODANOV, Cleber Cristiano; DE FREITAS, Ernani Cesar. Metodologia do trabalho científico: métodos e técnicas da pesquisa e do trabalho acadêmico-2ª Edição. Editora Feevale, 2013.

SILVA, L. F. et al. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorrefineries associated with the production of sugar and ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 71, p. 2 – 7, 2014

SILVA, L. F. et al. Poly-3-hydroxybutyrate (3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 245–254, 2004.

SILVA, L. F. et al. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (3HB-co-3HV) production by *Burkholderia sp.* **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 2–3, p. 165–174, 2000.

Silva, L. F.; Gomez, J. G. C. Produção biotecnológica de PoliHidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**. 2007; v. 30, n. 7, p. 1732-1743.

SILVA, L.F. & GOMEZ, J.G.C Processo de obtenção e mutante de *Burkholderia sp* mais eficiente na utilização de propionato para produção de copolímero biodegradável, PI 9806557-2 . . Concedida em 11/2013

SILVA, S. S. et al. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros**, v. 8, n. 2, p. 25–33, 1998.

TONETTO, Leandro Miletto et al. O papel das heurísticas no julgamento e na tomada de decisão sob incerteza. **Estudos de Psicologia (Campinas)**, v. 23, n. 2, p. 181-189, 2006.