

Benedito Rodrigues da Silva Neto

(Organizador)

A Produção do Conhecimento nas Ciências da Saúde

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Lorena Prestes e Geraldo Alves

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

P964 A produção do conhecimento nas ciências da saúde [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. – (A Produção do Conhecimento nas Ciências da Saúde; v. 1)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-298-2

DOI 10.22533/at.ed.982193004

1. Abordagem interdisciplinar do conhecimento. 2. Saúde – Pesquisa – Brasil. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da. II. Série.

CDD 610.7

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

POTENCIAL PRODUÇÃO DE BIOMATERIAL PELA CIANOACTÉRIA AMAZÔNICA *Tolypothrix* sp. CACIAM 22

Diana Gomes Gradíssimo

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas
e Biotransformações, Instituto de Ciências
Biológicas, UFPA
Belém - Pará

Murilo Moraes Mourão

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas
e Biotransformações, Instituto de Ciências
Biológicas, UFPA
Belém - Pará

Samuel Cavalcante do Amaral

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas
e Biotransformações, Instituto de Ciências
Biológicas, UFPA
Belém - Pará

Alex Ranieri Jerônimo Lima

Laboratório de Tecnologia Biomolecular, Instituto
de Ciências Biológicas, UFPA
Belém – Pará

Evonnildo Costa Gonçalves

Laboratório de Tecnologia Biomolecular, Instituto
de Ciências Biológicas, UFPA
Belém - Pará

Luciana Pereira Xavier

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas
e Biotransformações, Instituto de Ciências
Biológicas, UFPA
Belém - Pará

Agenor Valadares Santos

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas
e Biotransformações, Instituto de Ciências
Biológicas, UFPA
Belém - Pará

RESUMO: Os polihidroxicanoatos (PHAs) são lipídios estocados nas células de alguns organismos como reserva energética. São bioplásticos termoestáveis e elastômeros, que apresentam propriedades físicas semelhantes à de plásticos como polietileno e polipropileno. Este polímero biodegradável é produzido por cianobactérias fotossintetizantes com uso reduzido de substrato, diminuindo os custos de produção. A aplicação de PHAs na área médica já vem sendo desenvolvida, carecendo ainda de maiores estudos a fim de aliar a degradação do polímero in vivo, com o tempo de recuperação e a biocompatibilidade. São uma atraente alternativa aos plásticos petroquímicos e importante foco de pesquisa na busca por biomateriais sustentáveis. O cultivo se deu em meio BG-11 e BG-11 modificado, com gradiente de concentração de fosfato. Observou-se maior produção e biopolímero na cultura controle, utilizando BG-11 com 0,04 g/L de fosfato dipotássico, o que resultou em acúmulo médio de PHA de $30,55 \pm 2,57$ g/L. Dos quatro tratamentos testados apenas a privação total do nutriente resultou em variação significativa, acumulando apenas $8,53 \pm 0,75$ g/L de PHA. O estresse provocado pela privação nutricional pode ter prejudicado o crescimento da cianobactéria, não se mostrando interessante para a maior produção de biopolímero. As condições de cultivo serão otimizadas visando

maior produtividade e o bioplástico será posteriormente caracterizado para aplicação como biomaterial.

PALAVRAS-CHAVE: Bioplástico, Biopolímero, Polihidroxialcanoato, Cianobactéria, Amazônia

ABSTRACT: Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are lipids stored in the cells of some organisms as energy reserves. They are thermostable and elastomer bioplastics, which have similar physical properties to plastics such as polyethylene and polypropylene. This biodegradable polymer is produced by photosynthetic cyanobacteria with minimal substrate use, reducing production costs. The application of PHAs in the medical field has already been developed, requiring further studies to ally the degradation of the polymer in vivo, with recovery time and biocompatibility. They are an attractive alternative to petrochemical plastics and an important research focus in the search for sustainable biomaterials. Cultivation was done on modified BG-11 and BG-11 medium, with phosphate concentration gradient. It was observed higher production and biopolymer in the control culture, using BG-11 with 0.04 g / L of dipotassium phosphate, which resulted in a mean PHA accumulation of 30.55 ± 2.57 g / L. Out of the four treatments tested only total nutrient deprivation resulted in significant variation accumulating with 8.53 ± 0.75 g / L of PHA. Stress caused by nutritional deprivation may have decreased the growth of the cyanobacteria, not proving to be advantageous for the higher biopolymer production. The culture conditions will be optimized for higher productivity and the bioplastic will be further characterized for application as biomaterial.

KEYWORDS: Bioplastic, Biopolymer, Polyhydroxyalkanoate, Cyanobacteria, Amazon

1 | INTRODUÇÃO

As cianobactérias são um dos organismos mais antigos de nosso planeta (OLSON, 2006), de grande importância evolutiva, sendo responsáveis pela oxigenação da atmosfera terrestre e desenvolvendo um papel importante no ciclo do carbono e nitrogênio na terra (KASTING, 2001, KASTING; SIEFERT, 2002). Além disso, originaram os cloroplastos, que foram transferidos horizontalmente a outras linhagens (CAVALIER-SMITH, 2002). Fisiologicamente, são microrganismos fotossintetizantes e muitas espécies podem ainda se manter em ambientes sem oxigênio, sendo comum em várias espécies de bactérias (STAL, 1995). Apresentam alta capacidade adaptativa, sobrevivendo em ambientes com temperaturas, salinidade, pH e níveis de radiação solar extremos (WATERBURY *et. al.*, 1986, STAL, 1995, THAJUDDIN; SUBRAMANIAN, 2005). O metabolismo das cianobactérias se adapta a estas condições hostis através da produção de uma série de compostos bioativos de potencial biotecnológico, e tais metabólitos possuem uma gama de aplicações em diversos setores.

Na indústria farmacêutica temos a potencial aplicação das cianotoxinas, já bem descritas na literatura com ação essencialmente tóxica em mamíferos (DAWSON,

1998; CODD et. al., 2005;). Como alternativa sustentável, pode-se fazer o uso de metabólitos de cianobactérias na produção de biocombustíveis, com grande potencial na síntese de gás hidrogênio (H_2), e na fabricação de biodiesel a partir dos lipídios armazenados em suas células como possíveis substituintes dos combustíveis de origem fóssil (ARYAL et. al., 2012), e na substituição de materiais derivados de hidrocarbonetos como os polihidroxialcanoatos (PHA), um bioplástico produzido por cianobactérias, que têm ainda importante papel na medicina, podendo ser aplicado no carreamento de fármacos e confecção de próteses biocompatíveis ou *scaffolds* na engenharia tecidual (DOI, 1990, DOI 1992).

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) e polihidroxibutiratos (PHBs) são exemplos de lipídios neutros estocados nas células de cianobactérias e outros organismos como reserva energética e fonte de carbono. São bioplásticos termoestáveis e elastômeros que apresentam propriedades físicas semelhantes aos plásticos de origem fóssil como polietileno e o polipropileno (DOI, 1990). São produzidos a partir da fermentação de açúcares, lipídios, alcanos, alcenos e ácidos alcanóicos e armazenados como reserva energética destes microrganismos, sendo acumulados em grânulos citoplasmáticos (REEDY, MOHAN, 2015).

A síntese destes lipídios, especialmente de PHB, o biopolímero mais encontrado em cianobactérias, já é bem descrita em arqueias e bactérias como no bacilo de água doce, o *Cupriavidus metalliduran*. Estes grânulos são resultantes do processo metabólito cíclico, tendo como precursor a enzima acetil coenzima A. O processo ocorre em três reações enzimáticas que são mediadas, respectivamente, pela enzima 3-cetotiolase, que catalisa a condensação reversível de duas moléculas de acetil-CoA, cujo o intermediário gerado é reduzido por ação de uma redutase de acetil-CoA ligada ao NADPH, resultando em D(-)-3- hidroxibutiril-CoA, o qual é então, polimerizado por ação da PHA polimerase, gerando o biopolímero poli(3-hidroxibutirato) (PHB). Estas três enzimas são codificadas pelos genes *phaA*, *phaB*, *phaC* e *phaE*, sendo os dois últimos envolvidos na codificação da PHA sintase, atuando no último passo da biossíntese (HEIN et al., 1998, MATSUSAKI et al., 1998).

Já são descritos na literatura copolímeros de PHB contendo cadeias carbônicas de 3 a 14 átomos, cuja a produção se dá em microrganismos pelo uso de substratos como álcoois, açúcares e alcanos. Sendo assim, as diferentes estruturas químicas conferem aos polímeros propriedades físicas distintas, que podem ser mais adequadas a determinadas aplicações (DOI 1992). Quanto ao rendimento da produção destes biopolímeros por microrganismos, na cianobactéria *Synechocystis* sp. PCC6803 o acúmulo de lipídios neutros pode chegar até a 10% do peso seco da célula, sendo a média de cerca de 6% do peso seco (HEIN et al., 1998).

A linhagem *Tolypothrix* sp. CACIAM 22 possui genoma anotado o que permitiu a busca dos genes relacionados com a biossíntese de PHA. Uma análise preliminar de seu genoma revelou a presença de um gene de biossíntese de PHA em cianobactérias, o gene *phaF*.

A principal característica destes polímeros tão versáteis nas suas composições químicas e aplicações é a capacidade de serem degradados de forma natural. Sendo de origem biológica estes plásticos são biodegradáveis, sendo digeridos por PHA depolimerases. A degradação de biofilmes de PHA a 25°C em solo, lodo ou água marinha é de até 7 μm por semana (DOI, 1992), sendo, portanto, uma atraente alternativa aos plásticos petroquímicos e um importante foco de pesquisa na busca por materiais termoplásticos sustentáveis.

Além do enfoque sustentável, outro aspecto importante que justifica a busca por biopolímeros em cianobactérias e microorganismos é a sua biocompatibilidade (KAEWBAI-NGAM *et al.*, 2016). Polihidroxicanoatos já vêm sendo utilizados na engenharia de materiais, principalmente como *scaffolds* para regeneração tecidual, seja utilizando PHA sozinho ou em blendas com plásticos sintéticos ou ainda associado a minerais como hidroxiapatita e exoesqueletos como a quitosana (ZHAO *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos que tratam o uso de PHAs como biomateriais utiliza biopolímeros produzidos por bactérias heterotróficas (CHEN e WU, 2005). O potencial de produção de PHA por cianobactérias autotróficas possibilita uma grande vantagem de uma produção mais barata, já que estes microrganismos necessitam apenas de luz e gás carbônico como fonte de carbono para produzir os biopolímeros (DROGS *et al.*, 2015, ANSARI e FATMA, 2016). Além disso, a produção de bioplástico pode ser associado a outras indústrias, uma vez que as cianobactérias podem capturar o CO_2 emitido pelas usinas e indústrias, possibilitando uma produção com zero emissão de carbono (SAYRE, 2010).

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultivo

A linhagem *Tolypothrix* sp. CACIAM 22, pertencente à Coleção Amazônica de Cianobactérias e Microalgas (CACIAM), foi coletada no Lago Bolonha (Fig. 1), 1°25'00"S, 48°25'58"W, situado dentro do Parque Ambiental do Utinga, uma área de Proteção Ambiental (APA) da região metropolitana de Belém-PA. O Lago Bolonha tem capacidade de armazenamento de 2.000.000 m³ de água, sendo utilizado como reservatório para abastecimento de água de consumo para a região metropolitana (SECTAM, 1992).



Figura 1. Mapa do Parque Estadual do Utinga e localização do ponto de coleta da CACIAM 22 no Lago Bolonha (Fonte: Google Maps, 2018, Adaptado).

A CACIAM 22 foi identificada por análise morfológica e molecular, através de 16S rRNA, como sendo do gênero *Tolypothrix* (Figura 2), uma cianobactéria filamentosa da ordem *Nostocales*.



Figura 2. *Tolypothrix* sp. CACIAM 22 em microscópio óptico, aumento de 100x e escala de 5 µm (Fonte: Acervo CACIAM, LTB, UFPA).

O cultivo se deu em frascos erlenmeyer de 250 mL, utilizando-se meio de cultivo líquido BG-11 (ALLEN, 1968) – com 0,04 g/L de fosfato -, com fotoperíodo de 14/10 horas claro/escuro, à temperatura de 27 °C (ARYAL *et al.*, 2012), em câmara de germinação BOD (CT-718, CIENTEC). As condições de cultivo foram modificadas, utilizando-se um gradiente de concentração de fosfato, promovendo-se o estresse nutricional pela privação de fosfato dipotássio e sua suplementação em excesso. Foram testadas quatro concentrações deste nutriente, entre 0, 0,2, 0,04 e 0,24 g/L.

2.2 Curva de Crescimento

A curva de crescimento da CACIAM 22, em meio de cultivo BG-11 padrão, foi mensurada através da quantificação de clorofila, extraído-se a mesma com metanol, e fazendo-se a leitura em espectrofotômetro a 665 nm, multiplicando-se o resultado

pelo coeficiente do metanol, 12,7 (MEEKS & CASTENHOLZ, 1971).

2.3 Extração de Polihidroxialcanoato

Seguindo-se as adaptações propostas por Getachew & Woldesenbet (2016) do protocolo de Slepecky & Law (1960), o PHA foi extraído de 60 mL de cada cultura bacteriana utilizando-se clorofórmio.

Primeiramente retirou-se o meio de cultivo, centrifugando-se as amostras a 5000 RPM por 20 minutos. Ao *pellet* obtido foram adicionados 5 mL de hipoclorito (5%), deixando-se as amostras incubadas a 30°C por 2 horas. Após nova centrifugação a 5000 RPM por 15 minutos, o concentrado foi dissolvido em 5 mL de clorofórmio (PA) à 60°C utilizando vórtex, sendo novamente centrifugado por 10 minutos.

A fase clorofórmica foi transferida para tubos de ensaio de vidro previamente pesados, lavados com etanol e clorofórmio para remover traços de plásticos. As amostras de PHA/Clorofórmio foram mantidas em evaporador com sílica *overnight* para evaporação do clorofórmio, restando apenas o PHA, sendo o mesmo pesado em balança analítica.

2.4 Quantificação de Polihidroxialcanoato (PHA)

A produção de PHA pela CACIAM 22 em diferentes concentrações de fosfato, foi quantificada através em espectrofotômetro utilizando-se como padrão ácido crotônico comercial. Após a evaporação do clorofórmio, o PHA foi convertido a ácido crotônico através de reação com ácido sulfúrico (98%), adicionando-se às amostras de PHA 5 mL de ácido, mantendo-se os tubos em banho-maria à 100°C para a reação. A amostras em triplicata foram, então, lidas em espectrofotômetro (Ultraspec 5300 Pro, Amersham) no comprimento de onda de 235 nm, utilizando-se ácido sulfúrico como branco.

A quantidade de ácido crotônico foi calculada com base em uma curva padrão com concentrações conhecidas de ácido crotônico comercial, tendo-se a quantidade de PHA em g/L pelo produto da concentração de ácido crotônico pelo coeficiente de extinção molar do mesmo de valor $1,55 \times 10^4$ (SPLECKY & LAW, 1960).

2.5 Análise Estatística

A produção de biopolímero nas diferentes condições de cultivo foi analisada por ANOVA e Kruskal Wallis, para uma dispersão não paramétrica, utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01, considerando-se significativos resultados para $p < 0.05$.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curva de Crescimento da *Tolypothrix* sp. CACIAM 22

O crescimento da linhagem foi mensurado a partir da concentração de clorofila

na amostra (Fig. 3). Acompanhou-se o crescimento até o 27º dia, quando a mesma passou a estar na fase estacionária.

A fase exponencial da cultura ocorreu entre o 5º e 17º dia de cultivo, havendo uma queda na concentração de clorofila ao 15º dia. Este declínio e posterior crescimento podem indicar a adaptação da cianobactéria ao estímulo nutricional do meio de cultivo ou ainda a metabólitos por ela produzidos que podem interferir como por exemplo o pH do meio (FOGG, 1978, WATERBURY *et. al.*, 1986).

Curva de Crescimento *Tolypothrix* sp. CACIAM 22

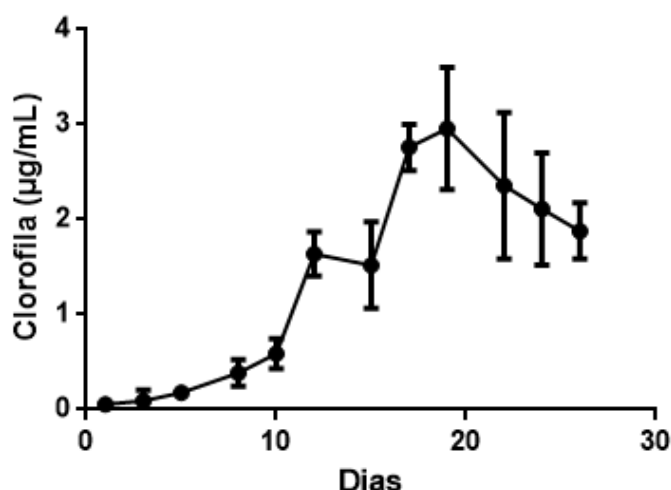


Figura 3. Curva de Crescimento da *Tolypothrix* sp. CACIAM 22, em função da concentração de clorofila, em µg/mL, pelo tempo em dias.

Em comparação ao crescimento de outras linhagens do mesmo gênero, a *Tolypothrix* sp. CACIAM 22 apresentou crescimento mais rápido que cepas *Tolypothrix* sp. PBGA1 e *Tolypothrix* sp. PBGA2, cujo trabalho de Thangave e colaboradores (2018), foi observada uma maior fase de adaptação em seus cultivos, levando oito dias para atingir a fase *log*. A adaptação mais rápida da CACIAM 22 pode ser justificada pela qualidade do inóculo inicial, já que um inóculo retirado de um cultivo em fase *log* garante melhor adaptação ao meio de cultivo (FOGG, 1978).

As culturas utilizadas neste estudo foram mantidas por dois meses para posterior extração do PHA, uma vez que há indícios de maior acúmulo de lipídios por cianobactérias na fase estacionária, além de maior produção e biomassa para os ensaios (MODIRI *et. al.*, 2015).

3.2 Quantificação de Polihidroxialcanoato (PHA)

A produção e acumulação de bioplástico nas diferentes concentrações de fosfato dipotássico foi medida por espectrofotometria usando o comprimento de onda referente ao ácido crotônico após a conversão do PHA extraído neste ácido. Através da regressão linear da curva padrão de ácido crotônico com oito concentrações e R^2 de 0,9889, obteve-se a concentração de polihidroxialcanoato para o gradiente de

concentração de fosfato (Fig. 4).

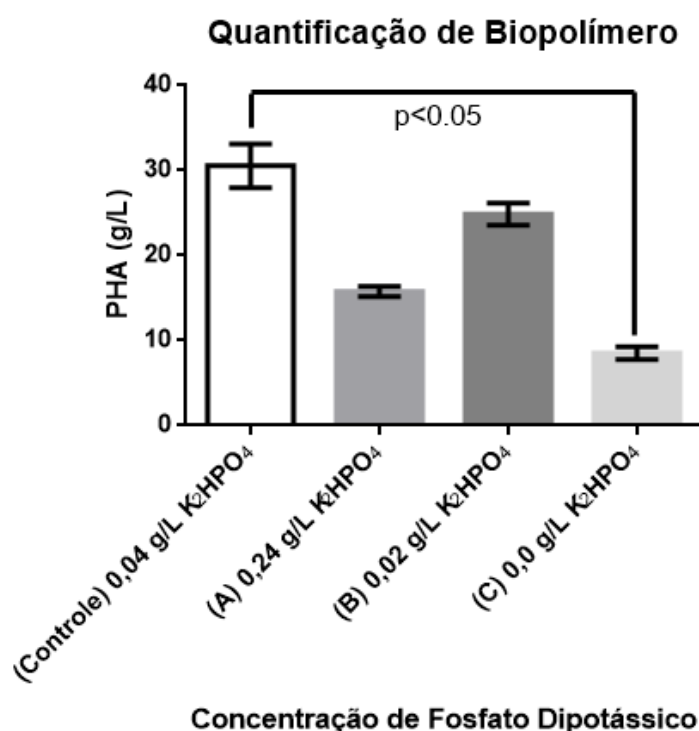


Figura 4. Quantificação de Biopolímero em quatro diferentes concentrações de fosfato dipotássico, em função da concentração de polihidroxialcanoato, em g/L.

A maior produção de PHA foi verificada na condição controle, onde foi utilizado meio de cultivo BG-11 sem alterações na concentração de fosfato dipotássico, com 0,04 g/L do nutriente. Nesta condição foram obtidas $30,55 \pm 2,57$ g/L de PHA. O tratamento com indução de fosfato, utilizando seis vezes mais nutriente do que no meio padrão, resultou numa produção de $15,75 \pm 0,58$ g/L, e o meio de cultivo com metade da concentração de fosfato, ou seja, com 0,02 g/L de fosfato, apresentou quantificação de $24,86 \pm 1,32$ g/L. A análise estatística aplicada, ANOVA univariada, apontou variação entre os tratamentos, no entanto a análise não paramétrica, Kruskal Wallis, utilizada por conta do baixo valor de P value retornado pela ANOVA ($P < 0,0001$), apontou significância apenas para o tratamento (C) com privação de fosfato dipotássico. Nesta condição com privação obteve-se concentração de apenas $8,53 \pm 0,75$ g/L de PHA.

Na melhor condição testada, em cultivo com BG-11 padrão, a CACIAM 22 apresentou cerca de 3% de produção de PHA em relação a cultura total, o que está de acordo com a produção encontrada por Ansari e Fatma (2016) no mesmo gênero, com produção de 3,15% de PHB em cultivo de *Tolypothrix tenuis* em meio BG-11. A concentração de bioplástico encontrada no presente trabalho foi maior do que o que verificado por Bhanti e colaboradores (2012) com produção máxima de 2,2% de PHB em *Tolypothrix* sp. ao 35º dia de cultivo.

O teste com excesso de fosfato visa mimetizar as condições ambientais que propiciam a floração de cianobactérias, já que o excesso de nutrientes orgânicos em ambientes aquáticos, seja por ação antropogênica ou natural, está diretamente

relacionado a este acúmulo de biomassa (PAERL e OTTEN, 2013).

No entanto, em condições laboratoriais, o excesso de fósforo, na forma de fosfato dipotássico parece interferir negativamente no crescimento celular, representado por uma menor produção e biomassa. Em trabalho de Feng e colaboradores (2012), *Chlorella zofingiensis*, uma microalga eucariótica, apresentou concentrações acima de 0,04 g/L, em meio BG-11 padrão, que resultou em menor biomassa, havendo maior crescimento em meio com apenas 0,01 g/L de fosfato dipotássico. A produção de lipídios também foi beneficiada pela privação de fosfato em comparação com concentrações superiores a 0,04 g/L deste nutriente no meio.

Encontrou-se na literatura indícios de que a privação de fosfato age como estresse direcionando o metabolismo das cianobactérias para uma maior produção e acúmulo de PHA, como verificado por exemplo na maior produção de PHA por *Nostoc muscorum* NCCU- 442, sendo esta cianobactéria filamentosa pertencente a mesma ordem da *Tolypothrix* sp., como Nostocales. Logo, foi detectada uma produção de 15% de PHB em relação à cultura total, no meio com privação de fosfato, contra 4,9% de PHB em BG-11 (ANSARI e FATMA, 2016).

Uma justificativa para a maior produção de polímero frente a este estresse nutricional está no fluxo não-cíclico de elétrons fotossintéticos, que acumulam NADPH pela redução de NADP que se mantêm apesar da queda na produção e ATP proporcionada pela escassez de fósforo. Este acúmulo de NADPH é então utilizado pelo metabolismo da cianobactéria para a produção de PHB (BOTTOMLEY e STEWART, 1976). O acúmulo de PHB é também explicado pela alta concentração de NADP E NADPH, uma vez que estes são inibidores de citrato sintase, interferindo negativamente no ciclo do ácido cítrico, levado a um maior acúmulo de lipídios pela célula (KESSLER e WITHOLT, 2001).

Apesar das alterações provocadas pelo estresse nutricional tendem a direcionar o metabolismo para a produção de lipídios e de PHA, neste trabalho encontrou-se a menor quantidade de PHA no meio com 0,0 g/L de fosfato dipotássio dentre as condições testadas. Isto pode se justificar no tempo prolongado de cultivo, uma vez que o esgotamento dos nutrientes provocados por uma privação prolongada, pode interferir com processos biológicos importantes como síntese de ácido nucléicos e síntese proteica (ANSARI e FATMA, 2016), prejudicando o crescimento saudável da célula, e, como consequência, limitando a produção de metabólitos de interesse.

Outra justificativa está na privação do nutriente potássio, que no tratamento (C) estava também na concentração de 0,0 g/L. Ainda que sais de potássio apresentem certa toxicidade para cianobactérias, sendo propostos inclusive como solução a florações destas microalgas (PARKER et al., 1997), quantidades pequenas de potássio são necessárias ao desenvolvimento celular, sendo interessante, em trabalhos posteriores, o cultivo com privação de fósforo, mantendo ainda o potássio e substituindo-se o fosfato dipotássico (K_2HPO_4) do meio BG-11 por cloreto de potássio (KCl) (MONSHUPANEE e INCHAROENSAKDI, 2014).

4 | CONCLUSÕES

A linhagem de cianobactéria amazônica *Tolypothrix* sp. CACIAM 22 mostrou-se produtora de polihidroxialcanoatos, sendo um potencial alvo para produção de bioplástico. Das condições testadas verificou-se maior produção de PHA quando cultivada em meio BG-11 com 0,04 g/L de fosfato dipotássico, com produção de 3,05% de PHA, ou 30,05 g/L do polímero. As modificações no cultivo não resultaram em melhorias na produção do lipídio, sendo necessários posteriores cultivos e ensaios para otimização da cultura. O bioplástico extraído será posteriormente caracterizado e passará por ensaios de biocompatibilidade para aplicação como biomaterial.

5 | AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, ao Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações e ao Laboratório de Tecnologia Biomolecular, e aos órgãos de fomento CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. B. **Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates.** Journal of Phycology, v.4, p. 1-4, 1968.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. **Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates.** Microbiology Review, n. 54, p. 450–472, 1990.
- ANSARI, S.; FATMA, T. **Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization.** PLOS ONE, v. 11, n. 6, p. e0158168, 2016.
- ARYAL, U. K.; CALLISTER, S. J.; MISHRA, S.; ZHANG, X.; SHUTTHANANDAN, J. I.; ANGEL, T. E.; SHUKDA, A. K.; MONROE, M. E.; MOORE, R. J.; KOPPENAAL, D. W.; SMITH, R. D.; SHERMAN, L. **Proteome analyses of strains ATCC 51142 e PCC 7822 of the diazotrophic Cyanobacterium Cyanothece sp. Under culture conditions resulting in enhanced H₂ Production.** Applied and Environmental Microbiology, p. 1070–1077. 2012.
- BHATI, R.; SAMANTARAY, S.; SHARMA, L. **Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria under photoautotrophy.** Biotechnology Journal, v. 5, n. 11, p. 1181–1185, 2010.
- BOTTOMLEY, P. J.; STEWART, W. D. **ATP pools and transientss in the blue-green alga, Anabaena cylindrica.** Archives of Microbiology, v. 108, n. 3, p. 249–258, 1976.
- CAVALIER-SMITH, T. **Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses.** Current Biology, v. 12, n. 2, p. 62-64, 2002.
- CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. **Optimization of oil extraction from Nannochloropsis salina biomass paste.** Algal Research, v. 15, p. 100–109, 2016.
- CHEN, G.; WU, Q.. **The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials.** Biomaterials, v. 26, n. 33, p. 6565–6578, 2005.

- CODD, G. A.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. **Cyanobacterial toxins: risk management for health protection**. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 264–72. 2005.
- DAWSON, R. M. **The toxicology of microcystins**. *Toxicon*, 36: 953–62. 1998.
- DOI, Y. **Microbial Synthesis and Properties of Polyhydroxyalkanoates**. *MRS Bulletin*, p. 39-42, 1992.
- DROSG, B. **Photo-autotrophic Production of Polyhydroxyalkanoates in Cyanobacteria**. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 29, n. 2, p. 145–156, 2015.
- FENG, P.; DENG, Z.; FAN, L. **Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 114, n. 4, p. 405–410, 2012.
- FOGG, G. E. **Algal cultures and phytoplankton ecology**. 2d ed. Madison: University of Wisconsin Press, 1975.
- 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, 2016.
- HEIN, S., TRAN, H., STEINBÜCHEL, A. ***Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria**. *Archives of Microbiology*, n. 170, p. 162–170, 1998.
- KAEWBAI-NGAM, A.; INCHAROENSAKDI, A.; MONSHUPANEE, T. **Increased accumulation of polyhydroxybutyrate in divergent cyanobacteria under nutrient-deprived photoautotrophy: An efficient conversion of solar energy and carbon dioxide to polyhydroxybutyrate by *Calothrix scytonemica* TISTR 8095**. *Bioresource Technology*, v. 212, p. 342–347, 2016.
- KESSLER, B.; WITHOLT, B. **Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism**. *Journal of Biotechnology*, v. 86, n. 2, p. 97–104, 2001.
- KASTING, J. F. **Earth history. The rise of atmospheric oxygen**. *Science*, v. 293, p. 819-820, 2001.
- KASTING, J. F., SIEFERT, J. L. **Life and the evolution of Earth's atmosphere**. *Science*, v. 296, p. 1066-1068, 2002.
- KARR, D.B., WATERS, J. K., EMERICH, D. W. **Analysis of Poly-beta-Hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection**. *Applied Environmental Microbiology*, n. 46, p. 1339-1344, 1983.
- LAW, J. H.; SLEPECKY, R. A. **Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid**. *Journal of Bacteriology*, v. 82, p. 33–36, 1961.
- MATSUSAKI, H., MANJI, S., TAGUCHI, K., KATO, M., FUKUI, T., DOI, Y. **Cloning and Molecular Analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in *Pseudomonas* sp. Strain 61-3**. *Journal of Bacteriology*, n. 24, v. 108, p. 6459–6467, 1998.
- Meeks, J.C., Castenholz, R.W., **Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta)**. *Archives Mikrobiologie*. 78, 25–41. 1971.
- MODIRI, S.; HAJFARAJOLLAH, H.; ZAHIRI, H. S. **Lipid production and mixotrophic growth features of cyanobacterial strains isolated from various aquatic sites**. *Microbiology*, v. 161, n. 3,

p. 662–673, 2015.

MONSHUPANEE, T.; INCHAROENSAKDI, A. **Enhanced accumulation of glycogen, lipids and polyhydroxybutyrate under optimal nutrients and light intensities in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803**. Journal of Applied Microbiology, v. 116, n. 4, p. 830–838, 2014.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. **Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls**. Microbial Ecology, v. 65, n. 4, p. 995–1010, 2013.

OLSON, J. M. **Photosynthesis in the Archean Era**. Photosynthesis Research, v. 88, p. 109–117, 2006.

REEDY, M. V., MOHAN, S. V. **Polyhydroxyalkanoates Production by Newly Isolated Bacteria *Serratia ureilytica* Using Volatile Fatty Acids as Substrate: Bio-Electro Kinetic Analysis**. Journal of Microbial and Biochemical Technology, n 7, p. 026-032, 2015.

SANTOS, L. Q. **Bioprospecção De Polihidroxialcanoatos em cinco linhagens de Cianobactérias da Região Amazônica**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

SAYRE, R. **Microalgae: The Potential for Carbon Capture**. BioScience, v. 60, n. 9, p. 722–727, 2010.

SECTAM. **Parque Estadual do Utinga: estudo ambiental**. Belém: Secretaria de Estado de Ciência Tecnologia e Meio Ambiente. 107 p. 1992.

STAL, L. J. **Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities**. New Phytology, v. 31, p. 1–32. 1995.

SCHLEBUSCH, M.; FORCHHAMMER, K. **Requirement of the Nitrogen Starvation-Induced Protein SII0783 for Polyhydroxybutyrate Accumulation in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803**. Appl. Environ. Microbiol. vol. 76, p. 6101-6107, 2010.

SPIEKERMANN, P.; REHM, B. H. A.; KALSCHUEER, R.; BAUMEISTER, D.; STEINBÜCHEL, A. **A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct Screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage Compounds**. Archives of Microbiology, v. 171, p. 73–80, 1999.

THAJUDDIN, N.; SUBRAMANIAN, G. **Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology**. Current Science, v. 89, p. 47–57. 2005.

THANGAVEL, K.; RADHA-KRISHNAN, P.; NAGAIHA, S. **Growth and metabolic characteristics of oleaginous microalgal isolates from Nilgiri biosphere Reserve of India**. BMC Microbiology, v. 18, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-1144-x>>. Acesso em: 17 jul. 2018.

VILLÉN, J., GYGI, S. P. **The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry**. Nature Protocols, v. 3, n. 10, p. 1630 – 1638, 2008.

WATERBURY, J. B., WATSON, S. W., VALOIS, F. W., FRANKS, D. G. **Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus***. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 214, p.71-120, 1986.

ZHAO, K.; DENG, Y.; CHUN CHEN, J. **Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility**. Biomaterials, v. 24, n. 6, p. 1041–1045, 2003.