



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL DA BAHIA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AMBIENTAIS

ELIAS SILVA GALLINA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS
PRODUTORAS DE PIGMENTOS**

PORTO SEGURO
2023

ELIAS SILVA GALLINA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE
PIGMENTOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias Ambientais da Universidade Federal do Sul da Bahia e do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, com vistas à obtenção do título de mestre em Ciências e Tecnologias Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Ernesto Jorquera Cortes
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Taiara Aguiar Caires

PORTO SEGURO
2023

Catálogo na Publicação (CIP)
Universidade Federal do Sul da Bahia (UFSB)
Sistema de Bibliotecas (SIBI)

G169i Gallina, Elias Silva, 1995 -
 Isolamento e seleção de cianobactérias produtoras de pigmentos. / Elias
 Silva Gallina. – Porto Seguro, 2023.
 75 f.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Ernesto Jorquera Cortes
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Sul da Bahia. Centro de
Formação em Ciências Ambientais. Programa de Pós-Graduação em Ciências e
Tecnologias Ambientais. Campus Sosígenes Costa.

1. Ficoeritrina. 2. Ficocianina. 3. Mata Atlântica. 4. Carotenoides. 5.
Escitoneminas. I. Cortes, Orlando Ernesto Jorquera. II. Título.

CDD – 589.46

ELIAS SILVA GALLINA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE
PIGMENTOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias Ambientais da Universidade Federal do Sul da Bahia e do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, com vistas à obtenção do título de mestre em Ciências e Tecnologias Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Ernesto Jorquera Cortés
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Taiara Aguiar Caires

Este trabalho foi submetido à avaliação e julgado APROVADO em: 14/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Bruna Carmo Rehem

Dra. Bruna Carmo Rehem
Instituto Federal da Bahia

Juzana Telles da Cunha Lima

Dra. Juzana Telles da Cunha Lima
Universidade Federal da Bahia

Thiago Mafra Batista

Dr. Thiago Mafra Batista
Universidade Federal do Sul da Bahia

ORIENTADOR

Orlando Ernesto Jorquera Cortés

Dr. Orlando Ernesto Jorquera Cortés
Universidade Federal do Sul da Bahia

COORIENTADORA

Taiara Aguiar Caires

Dr^a. Taiara Aguiar Caires
Universidade Estadual do Sudoeste da
Bahia

Ausente na sessão de defesa por maternidade

PORTO SEGURO
2023

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado da colaboração de muitas pessoas, em diversas instituições, que não mediram esforços para alcançarmos os objetivos de pesquisa, por isto, agradeço a todos que, acadêmicas ou não, estiveram envolvidas na construção deste trabalho, em especial aos listados abaixo.

Ao Prof. Dr. Orlando Ernesto Jorquera Cortés pela oportunidade, orientação, autonomia, paciência e compreensão nos momentos difíceis, especialmente na etapa final deste trabalho.

À coorientadora, Prof.^a. Dr.^a Taiara Aguiar Caires (UESB), que me ensinou muito sobre taxonomia de cianobactérias, sendo crucial para a consolidação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Lima (IFBA) por me permitir trabalhar em seu laboratório e fornecer alguns reagentes, agilizando muito minhas atividades, e por todo conhecimento transferido ao longo do mestrado.

À Prof.^a. Dr.^a. Florisvalda da Silva Santos (UFSB), por ter permitido o uso de equipamentos do NEA, tornando minha rotina laboratorial mais eficiente.

Ao Prof. Dr. Jaílson Santos de Novais (UFSB), por me permitir utilizar o microscópio do palinoFLORAS – facilitando a avaliação morfológica das cepas.

A todos os professores que participaram das bancas ao longo dos Seminários I e II, dando contribuições para delineamento da pesquisa e melhoria deste trabalho: Prof.^a. Dr.^a. Fabiana Cezar Felix Hackradt (UFSB), Prof. Dr. Gleidson Vieira Marques (UFSB), Prof.^a Dr.^a. Bruna do Carmo Rehem (IFBA), à Dr.^a. Leticia Jungmann Cançado (EMBRAPA) e à Prof.^a Dr.^a. Suzana Telles da Cunha Lima (UFBA) que além de estar nas bancas, me recomendou a Prof.^a Dr.^a. Taiara Caires.

Ao Prof. Dr. Thiago Mafra (UFSB) pelas dicas e por ter intermediado o contato com o CBG da UESC para complementação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovanni (CBG), por ter me recebido em seu laboratório no CBG, pela acessibilidade e pelas incríveis aulas de cromatografia e preparo de soluções.

Aos técnicos de laboratório Taíse Alves, Luan Ramos e Dalliane Oliveira por sempre me atenderem prontamente nas centenas de vezes que solicitava acesso a salas, equipamentos, reagentes e vidrarias;

À toda equipe do Laboratório de Genômica e Proteômica da UESC, especialmente à Monaliza Ferreira e Keilane Freitas por terem me levado pela mão durante minha estadia no CBG.

Aos colegas e amigos de curso e laboratório pelos bons momentos de descontração.

À Dalila Teixeira Rodrigues, minha amiga, por ter me recebido e aturado por mais de um mês em sua casa para que eu pudesse fazer minhas análises na UESC.

Aos amigos Ronildo Nicodemos e Andreína Carrillo, por terem aturado minhas reclamações e compartilhado suas visões.

À minha família, que me deu todo o suporte necessário para que eu pudesse me dedicar totalmente às atividades de pesquisa, em especial, ao meu companheiro Marlyo Rafael, por ter suportado minha ausência e facilitado minha vida nos momentos difíceis que passamos na reta final deste trabalho.

À FAPESB pela concessão de bolsa, que permitiu a dedicação exclusiva às atividades de pesquisa.

“A cor é uma força primordial que influencia tudo em nosso mundo”
Johannes Itten, o criador do disco de cores.

GALLINA, Elias SILVA. **Isolamento e seleção de cianobactérias produtoras de pigmentos.** Orientador: Orlando Ernesto Jorquera Cortes. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias Ambientais) – Universidade Federal do Sul da Bahia; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Porto Seguro, 2023.

RESUMO

As cianobactérias têm em sua composição diversos pigmentos (*e. g.* carotenoides, ficobiliproteínas e compostos fotoprotetores) com diferentes aplicações nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Estes microrganismos podem ser encontrados nos mais diversos ambientes e a Mata Atlântica do sul baiano apresenta condições de suporte a uma biodiversidade com potencial para produção de pigmentos ainda não caracterizados. Desta forma, a pesquisa teve como objetivo selecionar cianobactérias isoladas em açudes inseridos em área preservada de Mata Atlântica no sul baiano, com base na produção de biomassa e pigmentos. Para tal, após cadastro de acesso no SISGEN, realizou-se o isolamento por pescaria e esgotamento em meio BG-11 e ASM-1 a partir de três amostras de três açudes. As cepas foram identificadas a nível de gênero baseando-se na morfologia e cultivadas por 14 dias em 300 mL dos respectivos meios, sob iluminação constante de $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e iluminação UVA/UVB durante $2 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$. Monitorou-se o crescimento pela quantificação de clorofila *a* via espectrofotometria a cada dois dias. Ao término do cultivo, extraiu-se os pigmentos com solventes (acetato de etila para apolares e PBS para ficobiliproteínas) e detectados via espectrofotometria. A seleção foi feita com base na concentração de pigmentos e acúmulo de biomassa. Os isolados selecionados foram cultivados em fotobiorreator *bubble column*, além de terem o gene 16S parcialmente sequenciado. Doravante, avaliou-se a influência da cor da luz e da intensidade luminosa sobre a produção de ficobiliproteínas das cepas selecionadas, além da purificação por FPLC de troca iônica e caracterização parcial por SDS-PAGE da ficoeritrina. Ao todo, foram isoladas 17 cianobactérias pertencentes às ordens Synechococcales (02) e Oscillatoriales (15), distribuídas em oito gêneros. Em todas as cepas foram detectados carotenoides (máximo de $0,387 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e ficobiliproteínas (máximo de $84,64 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), já escitoneminas foram detectadas em 4 cepas em concentração inferior a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Foram selecionadas duas cepas: *Phormidesmis* sp. F2 e *Leptolyngbya* sp.5 B1. A cepa F2 apresentou acúmulo de biomassa seca de $1,35 \pm 0,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $66,71 \pm 2,78 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de ficocianina e $17,93 \pm 2,05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de aloficocianina. Em *Leptolyngbya* sp.5 B1 foi detectada concentração máxima de ficoeritrina de $48,88 \pm 5,00 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Em fotobiorreator, F2 apresentou produtividades de biomassa e ficocianina de $0,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ e $8,62 \pm 0,34 \text{ mg}_{\text{PC}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente. *Leptolyngbya* sp.5 B1 apresentou produtividades de biomassa e ficoeritrina de $0,13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ e $6,99 \pm 0,49 \text{ mg}_{\text{PE}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente. O cultivo da cepa B1 sob luz verde e intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ resultou em $8,30 \text{ mg}_{\text{PE}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, valor 70% maior que a mesma intensidade em luz branca. Já para a cepa F2, a maior produtividade se deu sob luz vermelha e $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($13,38 \pm 0,77 \text{ mg}_{\text{PC}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), porém estatisticamente similar à quando cultivada sob luz branca a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A purificação da ficoeritrina de B1 teve rendimento final de 21,35% com pureza de 3,90 e a eletroforese revelou a composição por duas bandas com cerca de 16,5 e 17,5 kDa. Além de uma primeira referência sobre cianobactérias dulciaquícolas da região, esta pesquisa demonstra seu potencial biotecnológico e estabelece base para novas pesquisas e desenvolvimento de produtos de alto valor agregado, num sistema de cultivo mitigador de CO₂, atrelando ação climática ao uso sustentável da biodiversidade – o maior ativo do Brasil.

Palavras-chave: Ficoeritrina. Ficocianina. Mata Atlântica. Carotenoides. Escitoneminas.

GALLINA, Elias Silva. **Isolation and selection of pigment-producing cyanobacteria.** Advisor: Orlando Ernesto Jorquera Cortés. 2023. Dissertation (Master's in Environmental Science & Technology) – Universidade Federal do Sul da Bahia; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Porto Seguro, 2023.

ABSTRACT

Cyanobacteria have in their composition several pigments (*e. g.* carotenoids, phycobiliproteins, and photoprotective compounds) with many applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. These microorganisms can be found in the most diverse environments. The Atlantic Forest of southern Bahia presents conditions to support biodiversity with the potential for producing pigments not yet characterized. Thus, the present research aimed to select cyanobacteria isolated from reservoirs located in preserved areas of the Atlantic Forest, based on biomass and pigment production. To this end, after access registration at SISGEN, isolation was carried out by glass capillarity or spread-plate in BG-11 and ASM-1 medium from three reservoirs in a preserved area of Atlantic Forest. The isolated strains were identified at the genus level based on morphology and cultivated for 14 days in 300 mL of the respective media, under constant lighting of $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, plus UVA/UVB lighting for $2 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$. Growth was monitored by spectrophotometric quantification of chlorophyll *a* (90% ethanol extraction) every two days. At the end of the cultivation, the pigments were extracted with solvents (ethyl acetate for nonpolar pigments and PBS for phycobiliproteins) and detected via spectrophotometry. The selection was based on pigment concentration and biomass accumulation. The selected isolates were cultivated in a bubble column photobioreactor, with previously characterized hydrodynamics, and the volumetric productivity of phycobiliprotein and the pigment content were determined. Henceforth, the influence of light color and light intensity on the production of phycobiliproteins of the isolated strains was evaluated, in addition to purification by ion exchange FPLC and partial characterization by SDS-PAGE. In total, 17 cyanobacteria strains were isolated belonging to the orders Synechococcales (02) and Oscillatoriales (15), which were distributed in eight genera. In all strains, carotenoids (maximum of $0.387 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) and phycobiliproteins (maximum of $84.64 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) were detected, while scytonemins were detected in 4 strains in concentrations below $0.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Two strains were selected: *Phormidesmis* sp. F2 and *Leptolyngbya* sp.5 B1. The F2 strain showed accumulation of dry biomass of $1.35 \pm 0.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $66.71 \pm 2.78 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of phycocyanin and $17.93 \pm 2.05 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of allophycocyanin. In *Leptolyngbya* sp.5 B1, a maximum concentration of phycoerythrin of $48.88 \pm 5.00 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ was detected. In photobioreactor, *Phormidesmis* sp. F2 presented biomass and phycocyanin productivity of $0.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $8.62 \pm 0.34 \text{ mg}_{\text{PC}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectively. *Leptolyngbya* sp.5 B1 showed biomass and phycoerythrin productivities of $0.13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $6.99 \pm 0.49 \text{ mg}_{\text{PE}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectively. Cultivation of the B1 strain under green light and light intensity of $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ resulted in $8.30 \text{ mg}_{\text{PE}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, a value 70% higher than the same intensity under white light. For the F2 strain, the highest productivity occurred under red light and $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($13.38 \pm 0.77 \text{ mg}_{\text{PC}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), but statistically similar to when cultivated under white light at $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The purification of phycoerythrin from B1 had a final yield of 21.35% with a purity of 3.90 and electrophoresis revealed the composition by two bands with approximately 16.5 and 17.5 kDa. In addition to being a first reference on freshwater cyanobacteria in this region, this research demonstrates the biotechnological potential of these microorganisms and establishes the basis for further research and the development of high-added-value products in a CO₂-mitigating cultivation system, linking climate action to the sustainable use of biodiversity—Brazil's biggest asset.

Keywords: Phycoerythrin. Phycocyanin. Atlantic Forest. Carotenoids. Scytonemins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1 Sistemática e biodiversidade	14
2.2 Potencial biotecnológico.....	17
2.3. Ficobiliproteínas	18
2.3.1 Ficocianinas	19
2.3.2 Ficoeritrinas	21
2.3.3 Aloficocianinas	22
2.4 Carotenoides e escitoneminas.....	23
2.5 Cultivo de cianobactérias para produção de pigmentos	26
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Acesso ao patrimônio genético e locais de coleta.....	29
4.2 Procedimento de isolamento.....	29
4.3 Identificação de cianobactérias isoladas.....	31
4.3.1 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S das cepas selecionadas.....	33
4.3.2 Análises filogenéticas	33
4.4 Seleção das cianobactérias isoladas.....	34
4.4.1 Preparo do inóculo.....	34
4.4.2 Cultivo para obtenção de biomassa e extração de pigmentos	35
4.4.2.1 Extração de clorofila <i>a</i> para monitoramento do crescimento	35
4.4.3 Extração de pigmentos alvos	36
4.5 Cultivo em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas (<i>bubble column</i>).....	37
4.5.1 Hidrodinâmica do fotobiorreator	38
4.5.2 Cultivo	39
4.6 Avaliação da influência da intensidade luminosa e cor de luz sobre a produção de ficobiliproteínas pelas cepas selecionadas.....	39
4.7 Caracterização parcial de ficoeritrina de <i>Leptolyngbya</i> sp.5 B1	40
4.7.1 Precipitação em sulfato de amônia e diálise.....	40
4.7.2 Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC)	41
4.7.3 SDS-PAGE	41
4.8 Tratamento estatístico	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Isolamento	43
5.1.1 Caracterização taxonômica do material isolado	44
5.1.2 Análise filogenética das cepas selecionadas	56
5.2 Seleção de cianobactérias produtoras de pigmentos.....	58
5.2.1 Crescimento e obtenção de biomassa	58
5.2.2 Extração e quantificação de ficobiliproteínas.....	60
5.2.3 Extração e quantificação de carotenoides e escitoneminas	68
5.2.4 Seleção das cepas isoladas.....	70
5.3 Cultivo em fotobiorreator	72
5.3.1 Caracterização hidrodinâmica do fotobiorreator	72
5.3.2 Cultivo das cepas selecionadas em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas.....	73

5.4 Influência da intensidade luminosa e cor de luz sobre a produção de ficobiliproteínas pelas cepas selecionadas	76
5.5 Purificação e caracterização parcial da ficoeritrina de <i>Leptolyngbya</i> sp.5 B1	81
6. CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICES	101
ANEXOS	112

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes muito bem sucedidos, com distribuição por todo o planeta, principalmente em meio aquático. Com altos teores de proteínas, ácidos graxos poli-insaturados, carboidratos e vitaminas, as cianobactérias já têm sido empregadas como alimento há milênios (SEKAR, 2008; SARMA, 2013; PAGELS et al., 2019). Doravante, estes microrganismos têm se destacado como alternativa interessante para obtenção de produtos de alto valor agregado para emprego nos setores cosmético, nutracêutico, energético entre outros (SINGH; KATE; BANECJEE, 2005; NOWRUZI; SARVARI; BLANCO, 2020). A atratividade se dá pelo fato de as cianobactérias produzirem diversos compostos bioativos (*e. g.* pigmentos, fitohormônios, polímeros e compostos fenólicos) e por apresentarem necessidades nutricionais simples com rápido crescimento, utilizarem a luz solar como fonte de energia e não requererem terras agricultáveis para o cultivo, que pode ser feito com uso de águas residuais ou efluentes (MANDAL; CHANU; CHAURASIA, 2020). Além disso, o sistema de produção (em lagoas ou fotobiorreatores) promove a absorção de CO₂ atmosférico, alinhando-se ao décimo terceiro Objetivo do Desenvolvimento Sustentável: ação climática, especialmente no que tange à mitigação dos gases de efeito estufa (GRIGGS, 2013).

Dentre os compostos bioativos, os pigmentos apresentam grande versatilidade de aplicação e atendem a uma demanda crescente por corantes naturais nas indústrias cosmética e alimentícia. Os pigmentos tipicamente azuis (aloficocianina e ficocianina) e vermelho (ficoeritrina) são os principais componentes do ficobilissomo nas membranas tilacoidais. Estas ficobiliproteínas são aplicadas comercialmente como agentes antioxidantes, anti-inflamatórios e imunomoduladores, marcadores moleculares, antivirais e, principalmente, corante alimentício (WU et al., 2016; LAUCERI; CHINI; TORZILLO, 2019; PAGELS et al., 2019; BRAUNE et al., 2021). A ficocianina é aprovada como corante alimentício nos Estados Unidos desde 2013 e já tem um mercado expressivo. De acordo com a *Allied Market Research*, o mercado global movimentou cerca de US\$ 138 milhões em 2020 e tem projeções de US\$ 360 milhões até 2030. Cerca de 80% da ficocianina comercializada é empregada no setor de alimentos, onde não requer alto grau de purificação e, conseqüentemente, de menor custo. O crescimento da demanda tem sido estimulado principalmente pela limitação do uso de corantes sintéticos em alimentos e pela necessidade de produtos naturais e renováveis na área cosmética. Já a ficoeritrina é aplicada principalmente como marcador para imunofluorescência, citometria de fluxo ou coloração de células e seu custo pode chegar a US\$ 1500 por miligrama pura (ZITTELLI et al., 2022).

Os carotenoides são pigmentos isoprenoides que se distribuem na membrana externa e tilacoidal das cianobactérias e incluem carotenos e xantofilas. Menos conexos a aplicações relacionadas à cor, este grupo de pigmentos desempenha um importante papel como agente antioxidante, fotoprotetor, antissinais e antienvhecimento, sendo de alta utilidade para as indústrias alimentícia, farmacêutica e de saúde (nutracêutica) (BROWNE et al., 2014; KANNAUJIYA et al., 2018; MORONE et al., 2019; NOWRUZI; SARVARI; BLANCO, 2020). O mercado global destes pigmentos ultrapassou US\$ 1,5 bilhão em 2021 e tem perspectivas de crescimento com taxa de 3,78% ao ano. Comparados a outras fontes, os carotenoides microalgais têm processo produtivo muito mais simples. Nas cianobactérias, podem representar até 0,2% da biomassa seca e incluem principalmente o β -caroteno, luteína e cantaxantina. Além disso, devido às propriedades químicas distintas, os carotenoides podem ser produzidos junto às ficobiliproteínas, otimizando a aplicabilidade da biomassa produzida (WINAYU et al., 2021).

A grande diversidade de aplicações faz com que os pigmentos cianobacterianos, assim como aqueles derivados de microalgas eucarióticas, sejam foco de diversos estudos sobre sua produção e aplicação, havendo também aumento expressivo no depósito de patentes nos últimos cinco anos (SILVA et al., 2020). Por isso, instituições de pesquisa estão em busca de exemplares de melhor produtividade, maior diversidade de cores, possibilidades de usos e em cultivos adaptados às condições locais (UE, 2017). No Brasil, a Mata Atlântica é o bioma que abriga a maioria dos registros de cianobactérias do país e, devido à variabilidade de microambientes, tem potencialmente ainda mais microrganismos a serem catalogados e estudados (SANT'ANNA et al., 2011; MENEZES et al., 2015). A região do sul da Bahia detém a maior porção deste bioma no estado e o endemismo pode chegar a até 28% das espécies de fauna e flora – possivelmente o mesmo pode vir a ocorrer com os microrganismos (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005; GAMA et al., 2012). Entretanto, o conhecimento sobre a biodiversidade de cianobactérias na região ainda é escasso. O ambiente favorável e o alto endemismo fazem do sul baiano uma provável fonte de cianobactérias particulares com potenciais biotecnológicos ainda não caracterizados. Neste cenário, investigar a presença de pigmentos destas cianobactérias pode vir a identificar não só alternativas de coloração, mas também uma grande fonte de compostos bioativos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As cianobactérias são organismos procarióticos fotossintetizantes e correspondem a um dos grupos mais bem sucedidos, importantes e diversos morfológica, metabólica e ecologicamente. Estes microrganismos estão presentes em praticamente todos os ambientes minimamente iluminados, incluindo o solo, fontes de água, filosfera e em habitats extremos como fontes termais, desertos, salinas e “criosferas” (SANT’ANNA et al., 2006a; WHITTON; POTTS, 2012). Datadas de mais de 3,5 bilhões de anos, estima-se que a biomassa total de cianobactérias no planeta supere 1 bilhão de toneladas. Além disso, por liberarem oxigênio elementar, acredita-se que as cianobactérias foram as responsáveis por viabilizar a vida aeróbia na terra (SCHOPF, 2012).

Tipicamente gram-negativas, as cianobactérias apresentam parede celular composta por peptidoglicanas (mureína) revestida externamente por uma camada de lipopolissacarídeos, podendo ou não estar envolta por bainha mucilaginosa. Poros e microfibrilas podem estar presentes na parede celular auxiliando na locomoção. A composição e a disposição da parede celular pode variar de acordo com o estágio, ambiente ou arranjo do grupamento de células (HOICZYK; HANSEL, 2000). A membrana plasmática encontra-se abaixo da parede celular, promovendo o transporte seletivo de substâncias e tendo importante papel nos mecanismos de aclimação, especialmente naqueles em que ocorrem mudanças estruturais. Em provável rede de interconexões com a membrana plasmática está a membrana tilacoidal (exceto os membros da ordem Gloeobacterales) (SEN, 2020). As membranas tilacoidais geralmente ocupam a região periférica do citoplasma e se organizam de forma particular nas diferentes ordens deste filo (LIBERTON et al., 2013). Imersos ou inseridos nas membranas do tilacoide se encontram os pigmentos fotossintéticos: clorofilas, universalmente a clorofila *a*; ficobiliproteínas, que são os principais componentes dos ficobilissomos e, em algumas espécies, o principal pigmento; e carotenoides. Além de situar os complexos fotossintéticos, estas membranas são o principal local de transporte de elétrons respiratórios (TOMASELLI, 2004).

Embora as espécies de cianobactérias apresentem inúmeras formas e tamanhos, as mais frequentes são esféricas, em haste e em espiral. A morfologia é determinada geneticamente, mas pode mudar em função das variações ambientais e, naquelas filamentosas, podem exibir vários tipos de células diferenciadas durante o desenvolvimento: heterocitos e acinetos (SINGH; MONTGOMERY, 2011). Os heterocitos são células maiores que as vegetativas, de parede celular espessa e citoplasma rarefeito com nódulos polares de cianoficina. Formados em ambientes com privação de nitrogênio, são especializados na fixação deste composto. Nas ordens Oscillatoriales e Chroococcales podem ser encontrados os diazófitos, células não

verdadeiramente diferenciadas onde a fotossíntese e a fixação biológica de nitrogênio ocorrem temporalmente separadas (SINGH; MONTGOMERY, 2011; SARMA, 2013). Já os acinetos apresentam parede celular espessa e citoplasma granular, sendo formas de resistência às condições adversas (temperatura ou radiação elevadas e escassez de fósforo e/ou carbono) que podem “germinar” quando as condições voltam a ser favoráveis (SINGH; MONTGOMERY, 2011). Além de ocorrer por meio de algumas das células diferenciadas/especializadas, a multiplicação celular das cianobactérias pode ocorrer por fissão binária, fissão múltipla ou por fragmentação. A fragmentação do tricoma gera hormogônios, compostos por células normalmente menores que as vegetativas, podendo ou não ser dotados de motilidade para realocação de curto alcance e colonização simbiótica de hospedeiros (TOMASELLI, 2004; SINGH; MONTGOMERY, 2011). Eventos de recombinação genética podem ocorrer por conjugação ou transformação (TOMASELLI, 2004).

A forma de nutrição mais comum é a fotoautotrófica, onde ocorre a absorção de energia luminosa visível para a redução de CO₂ através da oxidação de água, liberando O₂. Nas rotas fotoheterotróficas há o requerimento de energia luminosa para utilizar componentes orgânicos como nutriente, sendo que não se desenvolvem na ausência de luz. Além disto, as cianobactérias podem ser auxotróficas, requerendo uma pequena quantidade de componentes orgânicos essenciais para o crescimento, como vitaminas e determinados aminoácidos; ou ainda mixotróficas (anfitrólicas), quando podem crescer utilizando ambas as rotas ao mesmo tempo, exceto na ausência total de luz (GROBBELAAR, 2004). As principais formas de reserva energética são inclusões citoplasmáticas como grânulos de glicogênio ou cianoficina (mais comum nas fotoheterotróficas) e, em alguns casos, grânulos de polihidroxibutirato (TOMASELLI, 2004).

2.1 Sistemática e biodiversidade

Desde a primeira identificação em 1838, a sistemática do atual filo Cyanobacteria se mostrou intensamente conturbada e passou por inúmeras modificações (SANT’ANNA et al., 2006a; SARMA, 2013). Os primeiros tratados taxonômicos classificavam as cianobactérias de acordo com critérios botânicos, agrupando-as como algas verdes-azuis (termo em desuso) devido à coloração característica. Alguns marcos, como a percepção do polimorfismo morfológico induzido por fatores exclusivamente ambientais, a comprovação da natureza procariótica gram-negativa e com os avanços no sequenciamento de genomas, diversas foram as revisões taxonômicas sofridas (SARMA, 2013). Atualmente há consenso de que filo Cyanobacteria faz parte do domínio Bacteria, mas tanto o Código Internacional de

Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas, quanto para Procariotos tratam deste filo. Apesar de estar há anos em debate, ainda não há consenso entre os códigos (PARKER; TINDALL; GARRITY, 2019). Enquanto na botânica são classificadas como cianobactérias (filo Cyanobacteria, classe Cyanophyceae), microbiologistas as classificam como cianoprocaríotas.

De acordo com Sarma (2013), a classificação botânica proposta por Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005) foi baseada em uma abordagem polifásica, considerando características morfológicas, ultraestruturais, ecológicas e genéticas (sequenciamento do gene 16S rRNA). O objetivo destes autores foi melhorar a resolução da sistemática cianobacteriana e passou a ser utilizado pelos principais centros de referência. As principais alterações foram feitas por Komárek e colaboradores com estudos entre 2006 e 2014, considerando novas espécies e acréscimos de dados de filogenia molecular, antes inacessíveis devido às dificuldades para obtenção e amplificação de material genético para sequenciamento (KOMAREK et al., 2014). Devido a estes acréscimos, novas ordens foram criadas e muitas famílias foram redistribuídas entre as ordens. O resumo das características das ordens de cianobactérias é apresentado na Tabela 01.

Tabela 01: Características das cianobactérias nas diferentes ordens de acordo com o sistema de classificação proposto por Komárek et al. (2014).

Ordem	Características
Gloeobacterales	Cocoides, sem tilacoides
Synechococcales	Unicelulares ou filamentosas, divisão em 1 ou dois planos, tilacoides parietais
Chroococcales	Unicelulares (coloniais ou não) e pseudofilamentosas, vários planos de divisão, tilacoides radiais irregulares
Oscillatoriales	Filamentosas homocitadas ou cocoides, tilacoides com arranjo radial, fasciculado ou irregular
Nostocales	Filamentosas heterocitadas, células diferenciam-se em acinetos, ramificações verdadeiras (T ou Y) e/ou falsas, tilacoides com arranjo irregular
Pleurocapsales	Baeócitos ¹ , divisão em múltiplos planos e/ou irregulares, colônias polarizadas e/ou pseudofilamentosas, tilacoides com arranjo irregular
Spirulinales*	Tricomas enrolados típicos, forma espiralada, sem bainha, tilacoides com arranjo parietal
Chroococciopsidales	Divisão em 3 ou mais planos, formando baeocitos, tilacoides com arranjo irregular

*Não inclui as “spirulinas” comerciais, que geralmente são do gênero *Arthrospira*, família Microcoleaceae, ordem Oscillatoriales | ¹ - Células que passam por vários processos de divisão simultânea ou repetidamente, com invaginação da membrana e compartimentalização do conteúdo celular | Complementado com dados de Hauer e Komárek (2020).

No mundo existem registros de mais de 2800 espécies de cianobactérias. Porém, a biodiversidade destes microrganismos ainda é subestimada, uma vez que este número é composto principalmente por espécies encontradas nas regiões temperadas. Até 2011 estimava-

se que apenas 10% das espécies de regiões tropicais e subtropicais eram conhecidas (SANT'ANNA et al., 2011). De acordo com a lista de espécies do Flora do Brasil 2020, existe no país 160 gêneros de cianobactérias (10 endêmicos), 512 espécies (32 endêmicas) e 6 variedades (uma endêmica). A região sudeste concentra a maior parte dos registros de cianobactérias, com 433 registros, enquanto no Nordeste há apenas 84 – vinte e oito destes correspondem a espécies catalogadas na Bahia. A maioria dos registros baianos são marinhos e as espécies *Symploca infralitoralis* T. A. Caires et al.; *Lyngbya sordida* Gomont; *Leptolyngbya membraniporae* (A.Lindst.) Anagn. & Komárek; e *Calothrix confervicola* Bornet & Flahault têm ocorrência registrada apenas no estado (MENEZES et al., 2015). Contudo, estes números não refletem a realidade da biodiversidade de cianobactérias no estado da Bahia, uma vez que a lista de espécies do Flora do Brasil está em processo de construção e ainda há muitas áreas a se investigar.

Ramos e colaboradores (2018) investigaram as comunidades de microalgas e cianobactérias de quatro espécies de bromélias-tanque de diferentes formações vegetais no estado da Bahia. Utilizando microscopia óptica, foram identificados 89 táxons de algas e cianobactérias, sendo que o perfil da comunidade microbiana variou de acordo com as espécies de bromélias. Além disso, foram identificadas 21 espécies de cianobactérias com diferentes formas de vida, incluindo cocoides e coloniais, mas principalmente filamentosas. Quando comparadas as listas de espécies deste trabalho com o Flora do Brasil, apenas *Pseudanabaena catenata* Lauterborn está presente em ambas. Já Caires, Sant'anna e Nunes (2019) investigaram a biodiversidade e os aspectos ecológicos de cianobactérias filamentosas bentônicas no ambiente marinho ao longo da costa da Bahia. Foram identificados trinta e dois táxons – 22 dos quais constam na lista de espécies do Flora do Brasil (MENEZES et al., 2015). Os autores perceberam maior riqueza de espécies nas regiões protegidas dos recifes, enquanto nenhuma cianobactéria foi encontrada em áreas de alto hidrodinamismo. Ainda na Bahia, Severiano et al. (2012) realizaram o acompanhamento da comunidade de microfítoplâncton do Rio de Contas entre 2007 e 2010. Dos 198 táxons identificados, 34 eram de cianobactérias das ordens Chroococcales, Nostocales e Oscillatoriales. As espécies *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagn. & Komárek; *Anagnostidinema amphibium* (C.Agardh ex Gomont) Strunecký, Bohunická, J.R.Johansen & J.Komárek; *Oscillatoria* sp. e *Raphidiopsis raciborskii* (Wołoszyńska) Aguilera et al. foram ditas como altamente frequentes, enquanto membros da ordem Chroococcales eram infrequentes, esporádicos ou raros.

A Bahia apresenta em seu território os biomas Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica, além de conter os ecossistemas Costeiro e Marinho – o que possibilita a existência de uma grande

biodiversidade (BAHIA, 2008). A Mata Atlântica é um bioma que compreende muitos tipos de habitat, cada um com seu microclima distinto, o que contribui para a descoberta de novos gêneros e espécies. Entretanto, os estudos de biodiversidade são pontuais e concentram-se no estado de São Paulo, não sendo suficientes para determinar a extensão da diversidade de cianobactérias do bioma Mata Atlântica (SANT'ANNA et al., 2011; GAMA et al., 2012; MENEZES et al., 2015; SOPHIA et al., 2016; ALVARENGA et al., 2017). Deste modo, ainda existem ambientes e grupos que não foram investigados de forma intensiva (GAMA et al., 2012). Embora reste menos de 8% da cobertura nacional da Mata Atlântica, no extremo sul da Bahia localiza-se a maior concentração florestal nativa protegida do estado. A floresta nesta região começa a assumir sua formação mais densa e apresenta índice de endemismo altíssimo, correspondendo a até 28% das espécies (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005). Tais aspectos fazem da região uma provável fonte de cianobactérias com potenciais ecológicos e econômicos ainda não caracterizados.

2.2 Potencial biotecnológico

A biotecnologia em fotossintetizantes baseia-se na premissa do aproveitamento da luz natural e dióxido de carbono atmosférico para gerar os mais diversos produtos e/ou processos (RICHMOND, 2013). As cianobactérias têm alta atratividade para a biotecnologia industrial, uma vez que (i) suas exigências nutricionais são simples; (ii) têm crescimento rápido; (iii) podem crescer em meios alternativos ou até mesmo em efluentes; (iv) têm processos eficientes de aclimação que podem ser aproveitados para direcionamento de rotas produtivas; e (v) devido à sua natureza procariótica, são mais facilmente modificadas geneticamente quando comparadas às microalgas eucariotas (KUMAR et al., 2018). Com os recentes avanços das ômicas das cianobactérias e com mecanismos de edição gênica cada vez mais sofisticados, estes microrganismos têm consolidado seu potencial como plataformas de biotecnologia em muitos novos processos industriais, especialmente no setor de biocombustíveis, como na produção de etanol (LIANG et al., 2018) e biohidrogênio (SADVAKASOVA et al., 2020). Porém, ainda há nas cianobactérias um imenso potencial natural a ser explorado e futuramente otimizado, como a biorremediação de metais pesados (AL-AMIN et al., 2021); desenvolvimento de nanopartículas com atividade antimicrobiana (PATEL et al., 2015); biomineração (DISSOOK; ANEKTHANAKUL; KITTICHOTIRAT, 2013); fertilização de solos e reversão da desertificação (ROSSI et al., 2017; ROMÁN et al., 2020); e a exploração de compostos bioativos, como no desenvolvimento de herbicidas menos prejudiciais ao meio ambiente (BRILISAUER et al., 2019).

Dentre os compostos bioativos, os pigmentos (ficobiliproteínas, carotenoides e escitoneminas) apresentam grande versatilidade de aplicações em produtos para uso ou consumo humano. Como apontado por Zahra et al. (2020), os pigmentos cianobacterianos podem ser empregados desde a produção de cosméticos e alimentos até mesmo como marcadores para fluorescência. Considerando o potencial destes microrganismos, a União Europeia em parceria com o Instituto de Pesquisas Têxtil e banco de algas espanhol, financiaram um projeto com o objetivo de selecionar macroalgas, microalgas eucarióticas e cianobactérias potencialmente produtoras de pigmentos visando à substituição dos corantes têxteis originalmente produzidos por rotas químicas e altamente recalcitrantes. Foram estudadas centenas de microalgas eucarióticas, cianobactérias e macroalgas. Ao analisarem a produtividade de pigmentos, estabilidade aos processos, durabilidade, custos financeiros e impacto ambiental dos processos na indústria têxtil, as ficobiliproteínas, carotenoides e clorofilas das cianobactérias tiveram destaque. As espécies proeminentes eram dos gêneros *Synechococcus* C.Nägeli, *Arthrospira* Sitenberger ex Gomont, *Leptolyngbya* Anagnostidis & Komárek e *Nostoc* Vaucher ex Bornet & Flahault. Outro aspecto importante é que, enquanto as macroalgas têm concentração de pigmento inferior a $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, nas cianobactérias estes valores podem chegar a $100 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de biomassa (UE, 2017).

2.3. Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas constituem um grupo de pigmentos presentes nas cianobactérias e em algumas micro e macroalgas. Nas cianobactérias, essas proteínas se associam formando o ficobilissomo, sendo responsáveis por até 50% da captura de energia luminosa (CHANG et al., 2015). Estas proteínas são compostas por duas subunidades polipeptídicas (α e β) que se ligam covalentemente a cromóforos tetrapirrólicos de cadeia aberta, arranjando-se como trímeros e hexâmeros estáveis com forma toroidal (Figura 01). Os cromóforos variam estruturalmente entre si, existindo quatro grupos principais amplamente distribuídos entre as cianobactérias: (I) ficocianobilina – azul; (II) ficoeritrobilina – vermelha; (III) ficourobilina – amarela; e (IV) ficobiliviolina – roxa. Nas ficobiliproteínas, de uma a três unidades podem estar ligadas a cada subunidade α ou β , de modo que no trímero toroidal pode haver de 6 a 18 cromóforos (ficobilinas). A depender do tipo e da posição do aminoácido ligante dos cromóforos, o pigmento apresentará diferentes propriedades espectrais (Tabela 02), sendo classificadas em: ficocianinas, aloficocianinas e ficoeritrinas que têm espectro azul-esverdeado (575 nm a 655 nm), azul (610 nm a 620 nm) e vermelho (540 nm a 570 nm), respectivamente (SUN et al., 2009; KANNAUJIYA; SUNDARAM; SINHA, 2017).

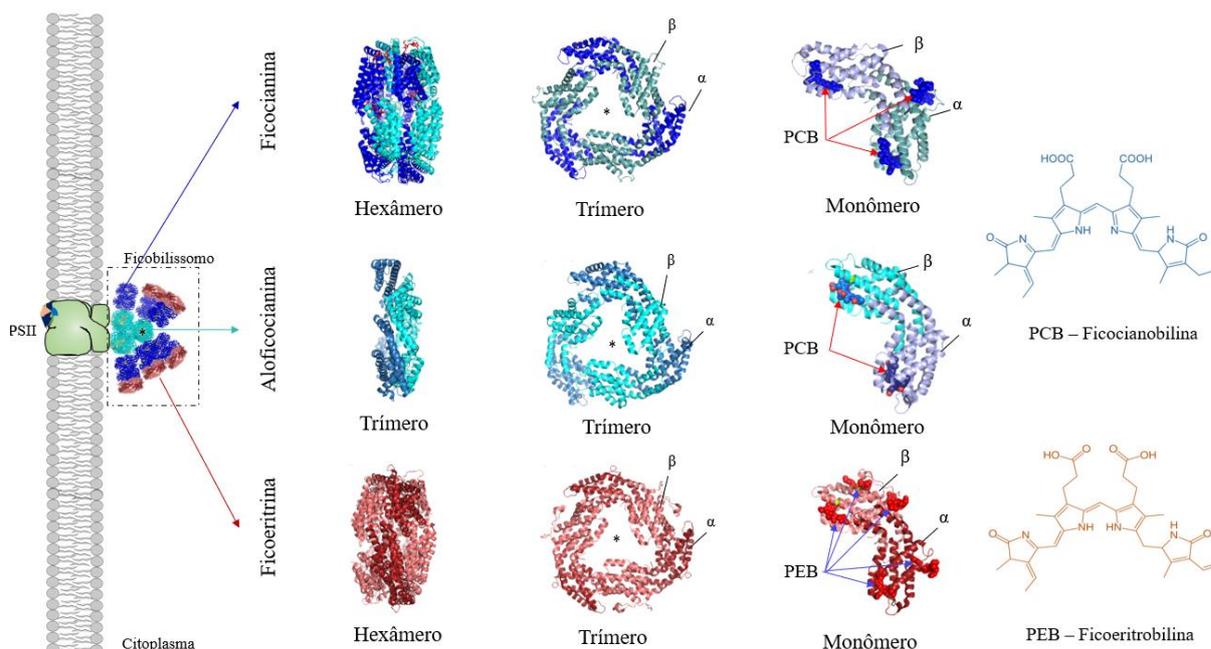


Figura 01: Representação da estrutura do ficobilissomo (ancorado no PSII, contendo centro de aloficocianina onde se ligam as ficocianinas e/ou ficoeritrinas), das ficobiliproteínas e de suas subunidades e cromóforos. PSII – Fotossistema II; α e β – subunidade alfa e beta das ficobiliproteínas, respectivamente. *Ponto de inserção de peptídeos bastonetes que promovem a ancoragem das unidades de hexâmeros ou trímeros para formação da antena. Elaborado com base nas estruturas tridimensionais disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB code: 7EXT, 6JPR, 6YX8, 5NB4) editadas no software Pymol. Autoria própria.

Tabela 02: Composição cromófora das principais classes de ficobiliproteínas e suas propriedades espectroscópicas.

Classes	Pigmentos	Cromóforos ¹	$A_{\text{máx.}} / \text{nm}$	$F_{\text{máx.}} / \text{nm}$		
Ficoeritrinas	C-ficoeritrina-I	4 PEB e 2 PUB	495, 543	565	Blue 490 nm	
	C-ficoeritrina	5 PEB	548	573		
Ficocianinas	Ficoeritrocianina	2 PCB e 1 PVB	575	635		Green 550 nm
	R-ficocianina I	2 PCB e 1 PEB	547, 616	636		
	R-ficocianina II	2 PEB e 1 PCB	615	646		
	C-ficocianina	3 PCB	642	643		
Aloficocianinas	Aloficocianina	2 PCB	650	663	Red 660 nm	
	Aloficocianina B	Indeterminada	652	665		

¹Por subunidade $\alpha\beta$; (PCB) ficocianobilina – azul; (PEB) ficoeritrobilina – vermelha; (PUB) ficourobilina – amarela; e (PVB) ficobiliviolina – roxa. $A_{\text{máx.}}$ – Absorbância máxima; $F_{\text{máx.}}$ – Fluorescência máxima. Elaborado a partir de Sun et al. (2009) e Kannaujiya et al. (2018).

2.3.1 Ficocianinas

As ficocianinas são as ficobiliproteínas mais difundidas nos organismos que possuem ficobilissomos. Entretanto, o tipo de ficocianina varia de acordo com o tipo de organismo. A C-ficocianina (ou apenas ficocianina) é exclusiva das cianobactérias, a ficoeritrocianina é encontrada apenas em algumas cianobactérias e a R-ficocianina ocorre principalmente nas

algas. A estrutura mais comum destas proteínas é em forma de trímeros, mas nos ficobilissomos ocorrem em hexâmeros, sendo ligados internamente por um peptídeo bastonete. A coloração varia de azul ou azul-púrpura e tem maior absorção de luz entre 580 nm a 630 nm, podendo ser aumentado em 17 nm devido aos peptídeos bastonetes (SUN et al., 2009).

Arthrospira platensis, comercializada sob o nome de spirulina, é a espécie mais empregada em processo industrial de produção de ficocianina. A depender da pureza, o preço pago pela ficocianina pode variar de US\$ 0,13 mg⁻¹ (fins alimentícios) a US\$ 15,00 mg⁻¹ (marcadores de fluorescência ou para fins farmacêuticos) (WINAYU et al., 2021). Muitos trabalhos na área visam aumentar a produtividade de ficocianina e a coprodução de outras ficobiliproteínas através de cultivo em condições otimizadas e/ou de estresse em espécies alternativas (SILVA et al., 2020). Espécies produtoras destes compostos têm sido isoladas nos mais diversos ambientes: hipersalinos, fontes termais, lagos e lagoas e nos mares (MOGANY et al., 2018; WINAYU et al., 2021).

Durante o isolamento e seleção, as cianobactérias são cultivadas em condições mais próximas às do ambiente de origem e os teores de pigmentos obtidos podem ser, posteriormente, otimizados por ajustes nas condições de cultivo. Mogany et al. (2018) buscaram cianobactérias em ambiente hipersalino e isolaram uma cepa de crescimento rápido e de considerável produtividade de ficocianina em relação à massa seca (12 mg·g⁻¹). Ao otimizarem a composição do meio, obtiveram produtividade de ficocianina de 45 mg·g⁻¹, um aumento de 280% em relação à produtividade inicial, que faz da *Euhalothece* sp. KZN uma candidata à produção em escala. Outras cepas indicadas com potencial para produção comercial de ficocianina incluem: *Phormidium* sp. e *Pseudoscillatoria* sp. (KHAZI; DEMIREL; DALAY, 2018); *Synechococcus* sp. PCC6715 (KLEPACZ-SMÓŁKA et al., 2020); *Aphanothece microscopica* Nägeli em meio suplementado com vinhaça (MORAIS; BASTOS, 2019); e *Nostoc* sp. em meio suplementado com águas residuais tratadas (ARASHIRO et al., 2020).

O interesse elevado na ficocianina está relacionado à variabilidade de aplicações para este pigmento, por (i) não requerer transformações químicas para uso, (ii) ser considerado seguro para consumo, e (iii) ser azul, uma cor rara em organismos vivos e frequentemente tóxica em fontes minerais. Além disso, a depender da técnica de extração, a ficocianina pode apresentar diferentes propriedades, potencializando sua aplicação como colorante em maquiagens e cosméticos (MORAES; KALIL, 2018). Algumas aplicações para ficocianina são apresentadas na Tabela 03 a seguir.

Tabela 03: Aplicações comerciais e na literatura da C-ficocianina.

	Aplicações	Referências
Ortodôntica	Inibição de formação de biofilme	Pourhajbagher e Bahador (2021)
Anticâncer <i>in vitro</i> via indução de apoptose, redução de proliferação e/ou migração celular	Adenocarcinoma pancreático, colorretal, pulmonar, alveolar e de mama. Carcinoma cervical, pancreático e de próstata. Leucemia, câncer de mama, melanoma e hepatoblastoma.	Braune et al. (2021)
Coadjuvante em radioterapia	Estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , com redução de 32,5% do volume tumoral em câncer de cólon	Kefayat et al. (2019)
Modulação da microbiota gástrica	Relacionada ao aumento da população de bifidobactérias gástricas e proteção contra úlceras em ratos	Hsieh et al. (2021)
Imunomodulador e anti-inflamatório	Relacionado aos efeitos benéficos do uso de spirulina na alimentação	Wu et al. (2016)
Corante alimentício*	Colorante com atividade antioxidante em leite desnatado	Galetovic et al. (2020)
Marcador bioquímico*	Em solução aquosa, apresenta fluorescência. Uso em microscopia e citometria	Moraes e Kalil (2018)
Pigmentos para batons e sombras (cosméticos)	Intensidade de cor das ficobilinas	Hamed (2016)

* Produzidos e comercializados por empresas como [Phyco-Biotech](#), [DIC](#) e [Pondtech](#).

De acordo com levantamento da Pondtech, empresa canadense de alimentação saudável e derivados de *Chlorella* e spirulina, o mercado de produtos contendo ficocianina chega a US\$ 1,3 bilhão e apresenta taxa de crescimento de cerca de 7% ao ano (PONDTECH, 2021).

2.3.2 Ficoeritrinas

As ficoeritrinas são proteínas hidrossolúveis e estão presentes em algumas cianobactérias e são responsáveis pela absorção de luz em comprimentos de onda inacessíveis para as clorofilas. Denominadas C-ficoeritrinas, as ficoeritrinas de cianobactérias geralmente são produzidas durante a adaptação cromática complementar, que ocorre quando as cianobactérias são expostas à luz do espectro verde e radiação ultravioleta (KOKABI et al., 2019; GHOSH; MISHRA, 2020a). Os subtipos mais frequentes incluem a C-ficoeritrina que tem cerca de 5 unidades de ficoeritrobilinas por monômero $\alpha\beta$ (Figura 01), mas podem ocorrer casos com ficourobilina e ficoeritrobilina para adaptar à qualidade da luz rica em espectro mais azul esverdeado. A C-ficoeritrina I tem seis ficourobilinas por monômero ($\alpha\beta$), de modo que exibam dois máximos de absorção (495 nm e 543 nm). Entre as espécies podem ocorrer

variações quanto à composição e à quantidade dos cromóforos (SUN et al., 2009; KANNAUJIYA; SUNDARAM; SINHA, 2017).

Estes pigmentos têm sido estudados devido às suas aplicações como corante natural de alimentos, agente antioxidante e anti-hiperglicêmico, e como marcador fluorescente e de pequenos íons, como o hidrossulfeto (GHOSH; MISHRA, 2020a). Em cosméticos, além de conferir cor, C-ficoeritrinas podem agregar atividade antienvhecimento e antioxidante (PATEL et al., 2018; PAGELS et al., 2019), tendo também potencial farmacêutico. Em estudo *in silico* e *in vivo*, a ficoeritrina de *Lyngbya* sp. A09DM apresentou atividade inibidora de enzima relacionada ao acúmulo de placas beta-amiloides no cérebro, apontando potencial para a prevenção e estabilização de Alzheimer (CHAUBEY et al., 2019).

A exploração comercial de ficoeritrinas parte, principalmente, de macroalgas (R-ficoeritrina) e microalgas (B-ficoeritrina) devido ao registro de poucas cepas de cianobactérias com boa produtividade e, algumas delas, estarem associadas à produção de cianotoxinas (GHOSH; MISHRA, 2020a). As cianobactérias mais frequentes nos estudos acerca da produção de ficoeritrinas incluem *Nostoc* sp., *Scytonema* sp., *Lyngbya* sp., *Anabaena* sp., *Phormidium* sp., *Synechococcus* sp., *Microcoleus autumnalis* (Gomont) Strunecky, Komárek & J.R.Johansen e *Halomicronema* sp. (PARMAR et al., 2011; BASHEVA et al., 2018; GHOSH; MISHRA, 2020a; VEGA et al., 2020).

2.3.3 Aloficocianinas

As aloficocianinas são proteínas hidrossolúveis e estão presentes em todas as cianobactérias, pois formam o núcleo do ficobilissomo, ligando as varetas de ficocianinas e/ou ficoeritrinas ao fotossistema II (PSII) e à membrana tilacoide (Figura 01). No núcleo estão presentes três tipos de aloficocianinas: aloficocianina (compõe a maior parte do núcleo), aloficocianina-B e complexo ligante de membrana. Os últimos estão relacionados com a ligação do ficobilissomo ao fotossistema e à membrana do tilacoide e têm estrutura indeterminada (SUN et al., 2009; KANNAUJIYA; SUNDARAM; SINHA, 2017). Embora com potencial biotecnológico pouco caracterizado, a aloficocianina é o ingrediente ativo de um composto patenteado com ação inibitória da replicação de enterovírus e influenza, de modo a evitar efeitos citopáticos (SEKAR, 2008). Além disso, tem potencial antioxidante e é amplamente utilizada em técnicas bioquímicas, como uma sonda proteica fluorescente, particularmente para citometria de fluxo (SU; XIE; CHEN, 2010). Em estudos recentes, a microalga tradicionalmente utilizada para produção de ficoeritrina *Porphyridium purpureum* (Bory) K. M. Drew & R. Ross (LÓPEZ-HERNANDES et al., 2020) e a cianobactéria *Arthrospira platensis*

se destacaram por acumular maior teor de aloficocianina que as demais ficobiliproteínas (ARASHIRO et al., 2020).

2.4 Carotenoides e escitoneminas

Os carotenoides são pigmentos apolares de natureza terpenóide com coloração variando do vermelho ao amarelo, apresentando função estrutural, de captação de energia luminosa e proteção contra espécies reativas de oxigênio, salinidade e radiação excessiva. Sua faixa de absorção concentra-se entre 400 nm e 550 nm (PAGELS et al., 2020a) e podem ser encontrados no interior dos fotossistemas, nas membranas plasmáticas e no citoplasma quando associados à proteínas solúveis (Figura 02). Os carotenoides podem ser primários, relacionados à absorção de energia luminosa e essenciais para a sobrevivência, ou secundários – aqueles produzidos quando em condições de estresse (PALIWAL et al., 2015). Os principais carotenoides produzidos por cianobactérias são: β -caroteno, hidroxicarotenoides (zeaxantina e nostoxantina) e cetocarotenoides (equinenona e cantaxantina) (GAO et al., 2020). Por terem a capacidade de modular a atividade de queratinócitos e atuarem como antioxidantes e anti-inflamatórios, os carotenoides têm alta aplicabilidade na área cosmética, seja como colorantes, hidratantes, agentes antissinais ou antienvhecimento (MORONE et al., 2019).

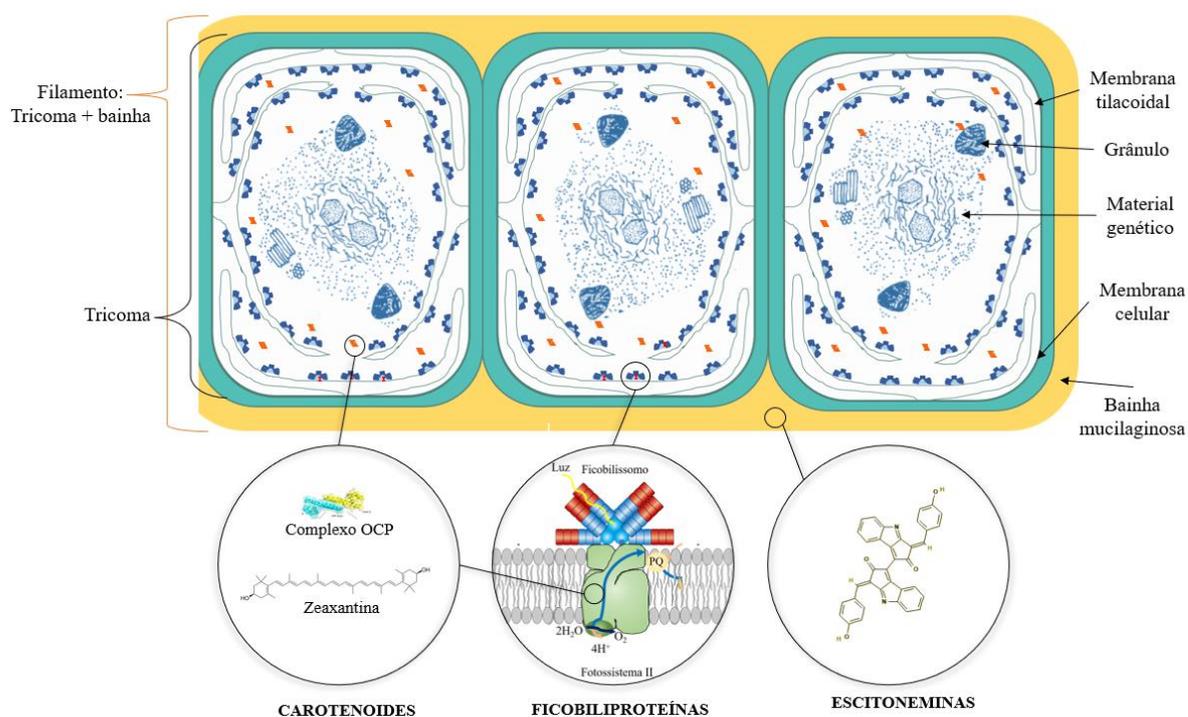


Figura 02: Estrutura típica de um filamento cianobacteriano, disposição dos pigmentos nas células e estrutura típica dos carotenoides e escitoneminas. Enquanto as ficobiliproteínas estão arranjadas no ficobilissomo, os carotenoides podem ser encontrados nos centros de reação dos fotossistemas ou em complexo com proteína solúvel dispersa no citoplasma (Complexo OCP). Já a escitonemina é componente da bainha mucilaginosa, conferindo cor acastanhada. Autoria própria.

Um atrativo para aplicação comercial de carotenoides de cianobactérias em cosméticos consiste na possibilidade de uso de extratos, não requerendo técnicas de purificação robustas. Morone et al. (2020) demonstraram que extratos de etanol de cepas dos gêneros *Cyanobium*, *Synechocystis*, *Nodosilinea*, *Phormidium* e *Tychonema*, cultivadas em condições usuais, apresentaram diversos carotenoides: zeaxantina, luteína, cantaxantina, equinenona e β -caroteno. Dentre as cepas, os extratos de *Tychonema* sp. e *Cyanobium* sp. se destacaram por promover a proliferação de fibroblastos, terem alto potencial antioxidante e inibirem a digestão do ácido hialurônico – características interessantes para formulações antienvhecimento.

Quando direcionados à fins alimentícios (humano ou animal), os carotenoides não precisam ser extraídos e purificados, desde que a biomassa esteja apta para consumo. Desta forma, avaliar a presença destes compostos em espécies de boa produtividade de biomassa pode ser interessante para elevar o potencial comercial na nutraceutica. Os ésteres de xantofilas são carotenoides com maior estabilidade e potencial antioxidante que as formas livres, o que eleva sua funcionalidade mesmo que em baixíssimas concentrações. Neste contexto, Maroneze et al. (2019) avaliaram a presença de carotenoides esterificados em *Aphanothece microscopica* (isolada na Lagoa dos Patos – RS, Brasil) e *Microcoleus autumnalis* (ex *Phormidium autumnale*) cultivadas em fotobiorreator de coluna de bolhas. Os autores identificaram compostos inéditos em cianobactérias, como os ésteres de miristoil-zeinoxantina, miristoil- β -criptoxantina, e 2'-linolenoil-mixoléster, além de outros onze compostos. Isto destaca que as cianobactérias podem ser biofábricas destes ésteres, uma vez que estes microrganismos podem ser submetidos a condições de estresse que possam direcionar aumento na produtividade.

Além dos carotenoides, os extratos apolares de cianobactérias podem conter também compostos fotoprotetores, como as escitoneminas, tornando-os ainda mais atrativos. A escitonemina é um pigmento conhecido apenas nas cianobactérias que absorve radiação ultravioleta e é produzido principalmente como resposta à exposição à radiação UV-A, sendo capaz de bloquear até 90% desta. De coloração marrom-dourada, é acumulada na bainha de polissacarídeos (Figura 02), podendo conferir coloração marrom aos filamentos e com picos de absorção em 384 nm (RATH; MANDAL; PRASAD, 2012). De acordo com revisão sistêmica de Castro, Martinez e Nieves (2020), cianobactérias produtoras de escitoneminas incluem: *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet & Flahault, *Leptolyngbya tenuis* (Gomont) Anagnostidis & Komárek, *Scytonema siculum* Bornet & Flahault, *Synechocystis* sp., *Lyngbya aestuarii* Liebman ex Gomont, *Gloeocapsa* sp., *Diplocolon* sp., *Chlorogloeopsis* sp., *Calothrix* sp.,

Aulosira fertilissima S.L.Ghose e *Trichormus variabilis* (Kützing ex Bornet & Flahault) Komárek & Anagnostidis.

Rastogi e Incharoensakdi (2014) realizaram a caracterização dos compostos protetores de radiação ultravioleta de *Lyngbya* sp. CU2555, quando cultivada em meio exposto à radiação ultravioleta. Para realização do experimento, *Lyngbya* sp. foi cultivada em meio BG-11 sólido e, posteriormente, exposta por 72 h à radiação UVA, UVB, radiação fotossinteticamente ativa e diferentes combinações destas. A exposição direta à radiação desencadeia a produção de compostos fotoprotetores que foram extraídos e identificados por cromatografia e espectrometria de alta resolução. Os principais compostos encontrados foram aminoácidos similares às micosporinas (palitina, asterina e M-312) e a escitonemina, sendo a combinação de UVA e UVB mais eficiente na indução. Além disso, estes compostos apresentaram forte atividade antioxidante e estabilidade frente à temperatura e radiação ultravioleta, podendo ser utilizados como substituto aos fotoprotetores orgânicos, considerados contaminantes emergentes.

Desta forma, as cianobactérias podem ser exploradas numa perspectiva de biorrefinaria de pigmentos, especialmente, devido às diferenças de polaridade de ficobiliproteínas e carotenoides e escitoneminas, facilitando os processos de separação. Ao cultivar as cianobactérias para extração de ficobiliproteínas, a biomassa remanescente pode ser empregada para extração ou uso de carotenoides e escitoneminas ou vice-versa (TAVANANDI; VANJARI; RAGHAVARAO, 2019). Winayu et al. (2021) realizaram o cultivo de *Thermosynechococcus* sp. CL-1 e obtiveram sucesso na produção de ficocianina, ficoeritrina, aloficocianina, zeaxantina e β -caroteno. Outros estudos também têm buscado a otimização das condições de cultivo para a produção concomitante de ficobiliproteínas e carotenoides (PAGELS et al., 2020a).

A bibliografia para pigmentos de cianobactérias, em especial de ficocianinas, é extensa, uma vez que estão diretamente relacionados com o processo de fotossíntese. Entretanto, a busca pela produção comercial tem se intensificado apenas na última década, visando atender às tendências de mercado e legislações ambientais cada vez mais restritivas (SILVA et al., 2020). A produção e concentração dos pigmentos relacionam-se diretamente às condições em que as cianobactérias são expostas, uma vez que, além de obtenção direta de energia, estão relacionados a mecanismos de defesa e adaptação às variáveis ambientais. Entretanto, o tipo de pigmento e a capacidade de produção são determinados pela variabilidade genética, o que justifica a busca por novos exemplares diretamente na natureza.

2.5 Cultivo de cianobactérias para produção de pigmentos

O cultivo de cianobactérias em grande escala pode ser conduzido em tanques abertos (lagoas) ou reatores fechados (fotobiorreatores), tendo cada um suas vantagens e desvantagens. Devido ao baixo custo, a produção comercial de cianobactérias está centrada em algumas espécies cultivadas em lagoas abertas em condições seletivas ou numa alta taxa de crescimento. As lagoas do tipo *raceway* (ou de rolamento), são frequentemente empregadas para o cultivo comercial de *Arthrospira*. Estas lagoas consistem numa vala rasa (por volta de 15 cm de profundidade) revestida por membranas plásticas onde a agitação é realizada por uma grande roda de pás (RICHMOND, 2013). Entretanto, muitas espécies não podem ser cultivadas nestes sistemas abertos devido ao alto risco de contaminação por fungos, bactérias, protozoários, ou mesmo, outras microalgas (TREDICI, 2004; DUAN; SHI, 2014).

Um fotobiorreator pode ser considerado como um reator onde organismos fototróficos crescem ou são utilizados para efetuar uma reação fotobiológica. Os fotobiorreatores oferecem ambientes fechados que permitem maior controle de nutrientes, pH e balanço de CO₂ e reduzem a possibilidade de contaminação por cepas de algas nativas ou outros organismos. Isto viabiliza o cultivo de diversas espécies, muitas das quais podem ser fontes interessantes de compostos de elevado valor (GROBBELAAR, 2004; TREDICI, 2004; RICHMOND, 2013; DUAN; SHI, 2014). Existe uma grande variedade de fotobiorreatores, sendo os tubulares, em placas planas (*flat-plate*) e em coluna os mais comuns. Os tubulares envolvem longos tubos, geralmente horizontais, de no máximo 10 cm, o que gera uma alta eficiência fotossintética, mas também acúmulo de oxigênio, incrustações nas paredes e estratificações de pH. Já os fotobiorreatores de placas planas consistem em finos painéis translúcidos onde a cultura circula, podendo ser aerado. Estes modelos apresentam grande área superficial iluminada e eficiência fotossintética, mas com certo estresse hidrodinâmico, difícil controle de temperatura e alto custo de *scale up* (TREDICI, 2004).

Nos fotobiorreatores em coluna, a agitação/arejamento/mistura é realizada pela injeção de ar (ou outros gases) em sua base, permitindo uma elevada transferência de massa e uma boa mistura a um baixo consumo de energia. Estes fotobiorreatores podem ser do tipo coluna de bolhas (*bubble column*) ou *air-lifts*. O tipo coluna de bolhas é basicamente um recipiente cilíndrico com um distribuidor de gás na parte inferior, enquanto no *air-lift* esta coluna é dividida em tubo ascendente, onde ocorre a injeção de gás que se libera na parte superior, e o tubo descendente para recirculação com fluxo mais brando e menos gaseificado. O baixo custo de manutenção e operação do *bubble column* o torna muito atrativo. Como desvantagem, têm menor área de iluminação, o que prejudica a eficiência fotossintética (KRISHNA; BATEN,

2003; KANTARCI; BORAK; ULGEN, 2005). Por outro lado, ajustes na taxa de irradiação e no tempo de mistura podem otimizar a eficiência fotossintética (YOON; SHIN; PARK, 2008).

No geral, poucos fotobiorreatores são utilizados para o cultivo em massa de microalgas devido às limitações durante o aumento de escala. Muito se deve ao baixo retorno positivo de energia ou econômico frente a lagoas abertas, especialmente em processos de produção de compostos de baixo valor agregado ou biocombustíveis (DASAN et al., 2019). Por outro lado, fotobiorreatores *bubble column* têm potencial para produção ambientalmente sustentável de biomassa, dependendo de extenso estudo de otimização das condições de cultivo (HULATT; THOMAS, 2011). No caso dos fotobiorreatores *bubble column*, o design simples, a fácil operação e a economia de energia o tornam atrativo para o escalonamento (BRANCO-VIEIRA et al., 2012; SEO et al., 2012).

Para produção de pigmentos, o sistema de cultivo ideal é aquele que gera, não só uma elevada produtividade de biomassa, mas também uma elevada concentração de pigmentos – num baixo custo de manutenção, extração e purificação (KLEPACZ-SMÓŁKA et al., 2020). Isto, teoricamente, tende a ser mais viável em fotobiorreatores, especialmente quando a finalidade do uso requer maior grau de pureza, uma vez que nele as condições de cultivo podem ser melhor controladas. Embora o fornecimento de macro e micronutrientes, o balanço de CO₂, temperatura e pH específicos sejam necessários para se obter produtividade máxima, a luz é o pilar central para produção de biomassa e metabólitos de cianobactérias e, geralmente, o primeiro fator a ser ajustado (RICHMOND, 2013; DUAN; SHI, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar cianobactérias de açudes inseridos em área de Mata Atlântica preservada no município de Santa Cruz Cabrália, Bahia, e selecioná-las com base na produção de biomassa e pigmentos.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar cianobactérias a partir das amostras coletadas em três açudes inseridos em área de Mata Atlântica preservada do município de Santa Cruz Cabrália, Bahia;
- Realizar a identificação morfológica das cepas isoladas;
- Identificar as cepas selecionadas por análise filogenética a partir de sequenciamento do gene de RNAr 16S;
- Selecionar, dentre as cepas isoladas, aquelas com potencial para produção de ficobiliproteínas, carotenoides e/ou escitoneminas;
- Avaliar os efeitos da cor da luz e da intensidade luminosa sobre a produção de biomassa e pigmentos nas cepas selecionadas.
- Realizar o cultivo das cepas selecionadas em fotobiorreator tubular *bubble column*.
- Realizar purificação e caracterização parcial da ficoeritrina de *Leptolyngbya* sp.5 B1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Acesso ao patrimônio genético e locais de coleta

As coletas foram realizadas em áreas preservadas de Mata Atlântica em propriedades rurais no entorno da Estação Ecológica do Pau-Brasil, tendo suas coordenadas previamente cadastradas no SISGEN por meio do cadastro de acesso número AD406CC (Apêndice A). Para tal, três amostras de 200 mL foram coletadas na coluna superficial da água (até 25 cm de profundidade) dos açudes indicados nas coordenadas da figura 03. As alíquotas foram transportadas em frasco âmbar de vidro em banho de gelo até o laboratório para o isolamento (SANT'ANNA et al., 2006a).

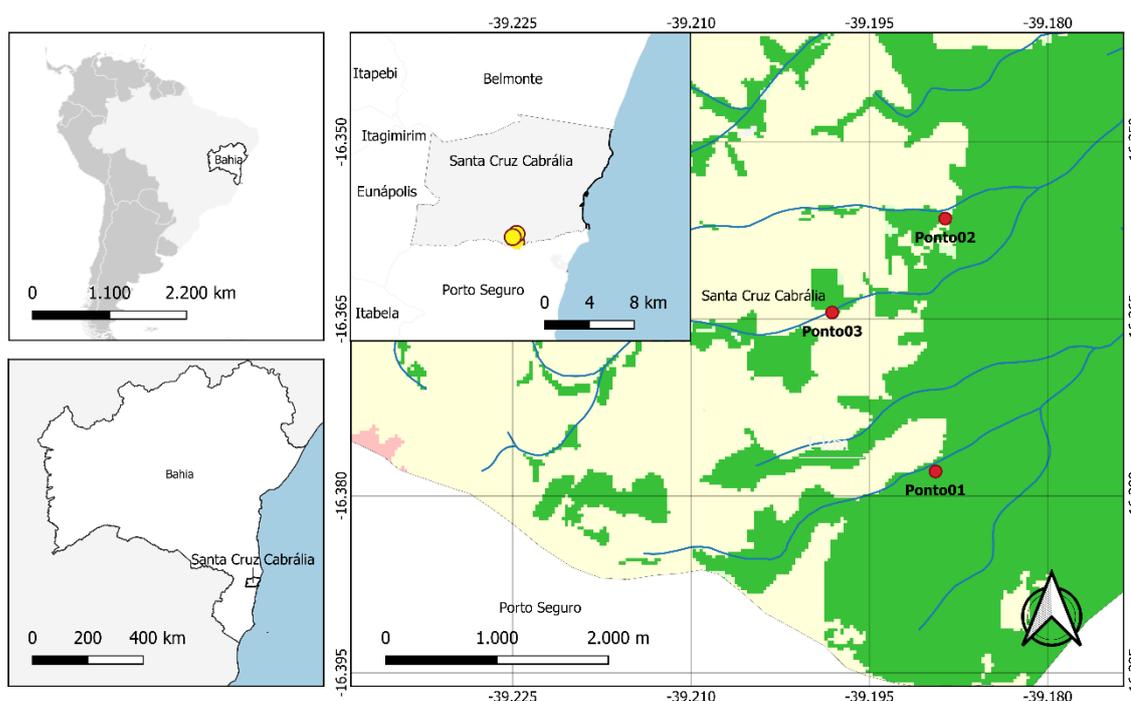


Figura 03: Localização dos pontos de coleta no entorno da Estação Ecológica do Pau-Brasil. Ponto de coleta 1: $16^{\circ} 22' 40,5''$ S \times $39^{\circ} 11' 22,0''$ W; Ponto de coleta 2: $16^{\circ} 21' 51,7''$ S \times $39^{\circ} 11' 53,3''$ W; Ponto de coleta 3: $16^{\circ} 21' 23,1''$ S \times $39^{\circ} 11' 19,9''$ W. Elaboração própria a partir de base de dados do IBGE utilizando sistema de referência SIRGAS 200 Z22 e sistema de projeção UTM.

4.2 Procedimento de isolamento

O isolamento foi realizado por meio das técnicas de esgotamento (*spread plate*) e pela técnica de pescaria utilizando os meios BG-11 e ASM-1 acrescidos de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cicloheximida (antibiótico para evitar o crescimento de microalgas eucarióticas e fungos) nas formas líquida e sólida (com 1% (m/v) de ágar), respectivamente. A composição dos meios empregados fora definida por Waterbury (2006) e Jacinavicius et al. (2013), apresentada na Tabela 04. Com auxílio de soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio com concentração

de $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, o pH dos meios foi ajustado para entre 7,39 e 7,41. O meio, assim como todos os materiais para o isolamento, foram autoclavados (120°C por 30 min) e toda manipulação do meio e os procedimentos para isolamento ocorreram em câmara de fluxo laminar nas adjacências de chama de lamparina a fim de evitar contaminações. A incubação se deu em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) com fotoperíodo de 12 h claro/ 12 h escuro, intensidade luminosa de cerca de $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e temperatura de aproximadamente 25°C .

Tabela 04: Composição dos meios utilizados nos procedimentos de isolamento e cultivos.

Composto	Concentração ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	
	BG-11	ASM-1
Nitrato de sódio	1,500	0,1700
Fosfato ácido dipotássio tri-hidratado	0,040	0,0174
Citrato férrico amoniacal	0,006	-
Cloreto de cálcio di-hidratado	0,036	0,0290
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,075	0,0490
Carbonato de sódio	0,020	-
Ácido cítrico	0,006	-
EDTA	0,001	0,0074
Cloreto de magnésio hexa-hidratado	-	0,0410
Fosfato de sódio dodeca-hidratado	-	0,0356
Ácido bórico	$2,86 \times 10^{-3}$	$2,84 \times 10^{-3}$
Cloreto de manganês tetra-hidratado	$1,81 \times 10^{-3}$	$1,39 \times 10^{-3}$
Sulfato de zinco hepta-hidratado	$2,20 \times 10^{-4}$	-
Molibdato de sódio	$3,90 \times 10^{-4}$	-
Sulfato de cobre penta-hidratado	$8,00 \times 10^{-5}$	-
Nitrato de cobalto hexa-hidratado	$5,00 \times 10^{-5}$	-
Cloreto de ferro hexa-hidratado	-	$1,08 \times 10^{-3}$
Cloreto de zinco	-	$3,35 \times 10^{-4}$
Cloreto de cobalto hexa-hidratado	-	$1,90 \times 10^{-5}$
Cloreto de cobre di-hidratado	-	$1,40 \times 10^{-6}$

Elaborado com base em Waterbury (2006) e Jacinavicius et al. (2013). Os meios foram preparados em formas concentradas e diluídos para se aproximarem das concentrações listadas.

No isolamento por esgotamento, alíquotas de $50 \mu\text{L}$ das amostras foram inoculadas na superfície do meio sólido em placa de Petri e espalhadas com auxílio de alça de Drigalski (*spread plate*). Ao longo de 21 dias de incubação as placas foram analisadas e a seleção das colônias se deu com base em diferenças de coloração, forma e consistência. As colônias coletadas foram submetidas a um novo esgotamento (estrias) em mesmo meio e incubação por mais 14 dias. A partir destas, foram coletados microrganismos com auxílio de alça de inoculação e transferidos

para 5 mL do respectivo meio líquido para estabelecimento do banco de cepas. No caso daquelas filamentosas que formaram “tapetes”, realizou-se o repique com uma área de cerca de 9 mm² para 5 mL do respectivo meio líquido, sendo incubados por sete dias e recolhida alíquota de 50 µL para um novo *spread plate*, a fim de evitar contaminações e/ou mistura de cepas. Após mais 14 dias de incubação, foi realizado novo repique das cepas para meio líquido respectivo, constituindo parte do banco de cepas.

Já para o isolamento por pescaria, foram seguidas as recomendações de Jacinavicius et al. (2013). Adicionou-se a uma lâmina previamente flambada uma gota de amostra ambiental e algumas gotas (cerca de 8) de meio estéril (ASM-1 ou BG-11). Ao microscópio (Nikon 104c, objetiva de 10x), visualizou-se a espécie a ser isolada e, com auxílio de uma pipeta Pasteur adaptada (afinada em bico de Bunsen para formação de capilar), realizou-se a sua transferência para as gotas de meio estéril. O processo foi repetido até que se obtivesse apenas uma espécie e com menor contaminação por bactérias. Com a espécie isolada, esta foi transferida para tubo de ensaio contendo 5 mL de meio líquido. Para cada espécie, quando disponíveis, pelo menos cinco indivíduos foram isolados e incubados por 7 a 14 dias. Em seguida, a partir daqueles em que se constatou o crescimento, realizou-se o *spread plate* e, após 14 dias de crescimento, foi realizado o repique para tubo de ensaio contendo 5 mL do respectivo meio líquido, compondo o banco de cepas. A Figura 04 apresenta o fluxo do processo de isolamento tanto por esgotamento quanto por pescaria.

4.3 Identificação de cianobactérias isoladas

Primeiramente, realizou-se a identificação taxonômica de todas as cepas com base nas características morfológicas, após a seleção, realizou-se a avaliação genética com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA apenas das cepas de melhor produtividade de pigmentos. A identificação baseada em morfometria foi realizada em microscópio óptico com aumento de 400 e 1000 vezes, seguindo chave de identificação e imagens de espécies representativas proposta por Komárek e Anagnostidis (2005) e Komárek e Johansen (2015a,b), além do banco de dados Cyano 2.0 (KOMÁREK et al., 2014; HAUER; KOMÁREK, 2020). Para tal, colocou-se uma gota de amostra oriunda do cultivo sobre uma lâmina de vidro, que foi posteriormente coberta com lamínula. A observação se deu em microscópio óptico (Motic Panthera U trinocular), e as imagens capturadas por câmera de celular Motorola One Fusion (48 Mpx) e processadas no software ImageJ. Para realização das medidas de comprimento e largura das células utilizou-se régua micrométrica. Os aspectos observados nas análises incluíram: morfologia externa; presença ou ausência de envelope mucilaginoso ou bainha

mucilaginosa; forma e dimensões das células vegetativas; relação celular entre comprimento e largura ou largura e comprimento; estrutura dos tricomas; forma do ápice dos tricomas; presença ou ausência de grânulos e de aerótopos; motilidade e presença/ausência de células necridiais. O corante azul de metileno (1%) foi utilizado para evidenciar as bainhas mucilaginosas. Foram analisadas pelo menos quatro lâminas de cada cepa, sendo mensuradas pelo menos 15 células em cada uma delas.

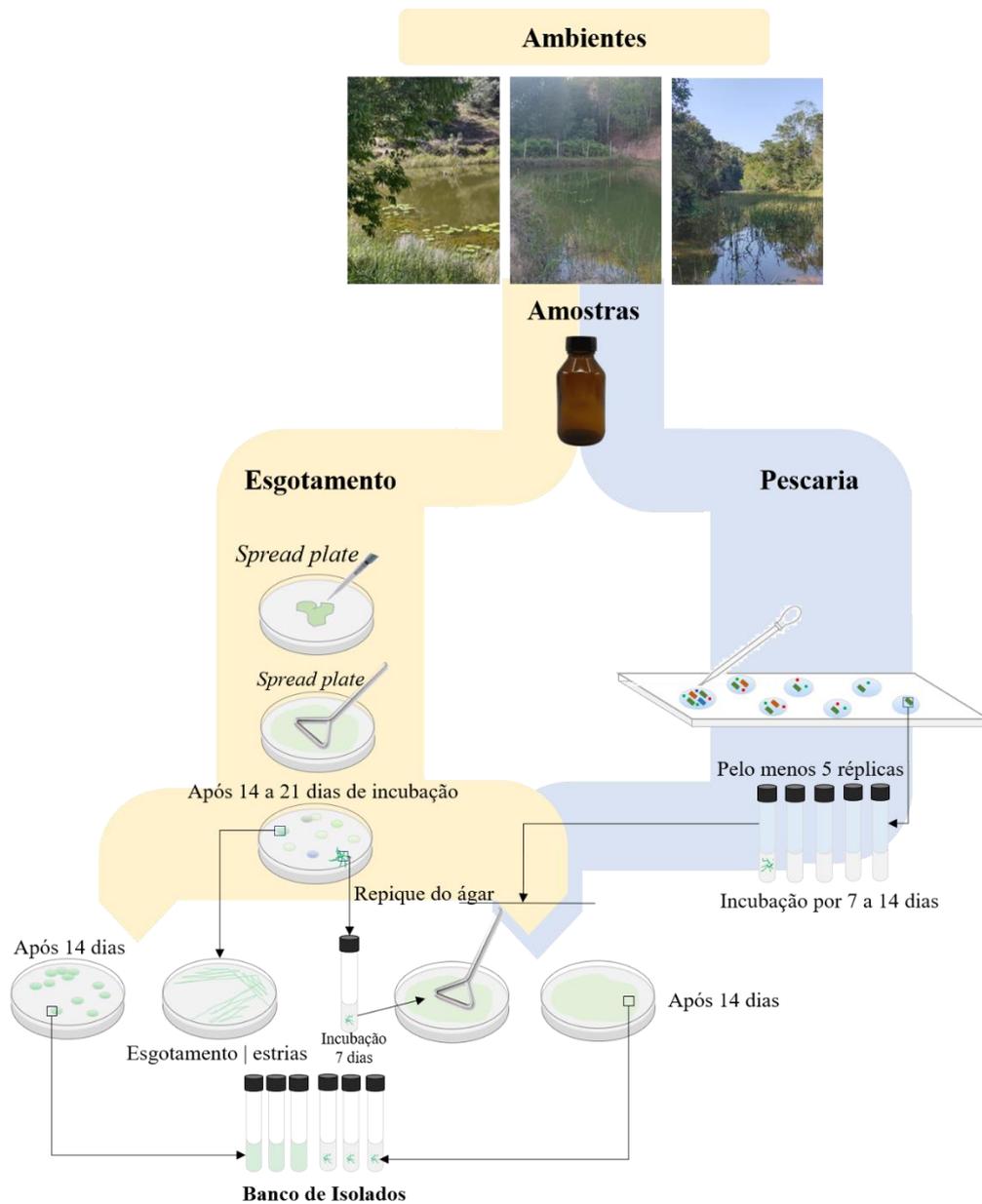


Figura 04: Fluxo do processo de isolamento por pescaria e esgotamento até o estabelecimento do banco de cepas. Autoria própria.

4.3.1 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S das cepas selecionadas

O DNA total das cepas *Phormidesmis* sp. F2 e *Leptolyngbya* sp.5 B1 foi extraído utilizando kit Fungal/Bacterial DNA MiniPre (D6005, Zymo Research) de acordo com protocolo do fabricante e armazenado a -20°C até o momento do uso. As reações de PCR foram feitas em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL de GoTaq Colorless Master Mix 2x (Promega), 0,6 µM da sequência direta do oligonucleotídeo e 0,6 µM da sequência reversa do oligonucleotídeo, e 40 ng de DNA genômico, diluídos com água ultrapura estéril. Para amplificação da região de interesse foram utilizados os primers CYA359F (GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG) e uma mistura equimolar de CYA781Ra (GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T) e CYA781b (GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T). As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 56°C por 40 s; extensão a 72°C por 1 min e uma extensão final a 72°C por 5 min. As amostras de PCR foram avaliadas em gel de agarose 2% corados com UniSafe Dye, visualizado sob luz UV e purificadas com Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). A quantificação dos produtos purificados foi realizada em fluorômetro (Qubit, ThermoFischer). A reação de sequenciamento foi executada em sequenciador ABI3730XL DNA Analyzer, utilizando kit BigDye Terminator (Applied Biosystems). Após o sequenciamento, foi realizada a análise dos eletroferogramas utilizando os programas Chromas Lite (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) e Geneious 4.8.3 (<https://www.geneious.com>) para obtenção das sequências consenso.

4.3.2 Análises filogenéticas

Após a edição, as sequências obtidas foram confrontadas com sequências similares depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando o programa online *Standard Nucleotide BLAST*. As sequências não clonais com valor de identidade superior a 99,0% foram utilizadas para compor a matriz de alinhamento juntamente com a sequência de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ([AY224195.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AY224195.1)), elencada como grupo externo. Embora não tenham sido selecionadas a partir do BLASTn, adicionou-se sequências representativas do gene 16S dos gêneros *Pantanalinema* ([KF246483.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/KF246483.2)), *Alkalinema* ([KF246494.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/KF246494.2)) e *Phormidesmis* ([NR_177013.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/NR_177013.1)) em função da similaridade morfológica com as cepas selecionadas. O alinhamento foi realizado via ClustalW e a estimativa filogenética foi realizada por dois procedimentos analíticos: Máxima Verossimilhança (ML) via IQ-Tree 2.1.2

(POSADA, 2003) e Inferência Bayesiana (IB) por meio do MrBayes 3.2.7a (RONQUIST et al., 2012). A robustez da árvore filogenética de ML foi estimada usando análise *bootstrap* com 1.000 replicações. Para a análise Bayesiana foram realizadas duas execuções separadas com quatro cadeias cada e 1.000.000 gerações de Monte Carlo da Cadeia Markov (MCMC). O HKY+G foi utilizado como modelo de substituição na IB, a partir de sua indicação no jModelTest2. As cadeias foram executadas um milhão de gerações e as árvores selecionadas a cada 1000 geração. A árvore consenso foi calculada após a combinação das execuções menos o *burn-in* de 25%. Todos os programas foram utilizados por meio da plataforma CIPRES (www.phylo.org). As topologias foram ilustradas com FigTree v. 1.4.4.

4.4 Seleção das cianobactérias isoladas

A seleção dos microrganismos se deu a partir da análise do crescimento no meio líquido em que fora isolado e da detecção de pigmentos na biomassa obtida a partir deste cultivo. Na natureza, os microrganismos estabelecem diversas interações com o meio e com outros organismos que não podem ser reproduzidas em laboratório. Algumas cianobactérias dependem de relação simbiótica ou de fatores de crescimento específicos com vitaminas para crescerem em alta densidade. Culturas de baixa densidade em meios generalistas, como o BG-11 e ASM-1, não são interessantes para sistemas de produção, pois podem torná-los ineficazes (LEE et al., 2013).

Para acompanhar o crescimento dos microrganismos determinou-se a concentração de clorofila *a*, a cada 48 horas, a partir do cultivo das cepas em erlenmeyer de 500 mL com 300 mL do respectivo meio em que fora isolado. Embora os dados de crescimento sejam normalmente determinados a partir da concentração de células por mililitro, obtida pela contagem de células isoladas, em colônias ou filamentos numa câmara de Newbauer ou Utermöhl, o banco de cepas incluía cianobactérias filamentosas que crescem em arranjo extremamente emaranhado, formando aglomerados densos. Desta forma, contagens a partir de pequenas alíquotas poderiam resultar em dados de baixa qualidade e pouco adequados para comparação (JIANG; YU; PEI, 2021).

4.4.1 Preparo do inóculo

O preparo dos inóculos se deu a partir da transferência, com auxílio de micropipeta, de uma alíquota de 0,5 mL do banco de cepas para tubo de ensaio contendo cerca de 4,5 mL de meio e incubados numa intensidade luminosa de cerca de $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 h

claro/ 12 h escuro e temperatura de aproximadamente 25°C. Constatado o crescimento nos tubos de ensaio, realizou-se a transferência dos 5 mL de cultivo para erlenmeyer de 125 mL, contendo 45 mL de meio líquido. Nesta etapa, a incubação se deu sob uma intensidade luminosa de cerca de $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (gerado por lâmpada tubular Empalux LT31016), fotoperíodo de 12 h claro/ 12 h escuro, temperatura ambiente e agitação promovida pela injeção de ar atmosférico filtrado (filtro bacteriano BeCare HME) num fluxo de cerca de $281,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ medido com rotâmetro (Ômega, modelo FT-062-01-CA-VN). Ao final de 14 dias, estes cultivos foram coletados em ambiente estéril e utilizados como inóculo para a etapa de produção de biomassa.

4.4.2 Cultivo para obtenção de biomassa e extração de pigmentos

Os 50 mL dos inóculos obtidos no item 4.4.1 foram transferidos para erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de meio e incubados sob uma intensidade luminosa de cerca de $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (gerado por lâmpada tubular Empalux LT31016), além de iluminação com lâmpada UVA/UVB (Lâmpada JBL, T8 de 15 W, 36% UV-A + 8% UV-B) durante duas horas diárias – esta iluminação é necessária para estimular a produção de fotoprotetores UV (SINGH et al., 2008). A iluminação foi constante e a agitação foi promovida pela injeção de ar atmosférico filtrado num fluxo de cerca de $281,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ medido com rotâmetro. O crescimento foi acompanhado pela quantificação de clorofila *a* em ciclos de 48 horas (Item 4.4.2.1). Ao final de duas semanas, a biomassa foi recuperada por centrifugação (4000 rpm por 10 min) e avaliada quanto à presença de ficobiliproteínas, carotenoides e escitoneminas por métodos espectrofotométricos (JACINAVICIUS et al., 2013; ARASHIRO et al., 2020).

4.4.2.1 Extração de clorofila *a* para monitoramento do crescimento

A extração e determinação de clorofila *a* foi realizada com base na metodologia específica para cianobactérias de Yéprémian et al. (2017) e Ritchie (2008), executada em ambiente com pouca luz. A biomassa de uma alíquota de 1 mL do cultivo foi recuperada por centrifugação (10000 rpm durante 10 min, a 4°C) em microtubo de polipropileno e recoberto com papel alumínio para evitar possível degradação fotoquímica do pigmento. Em seguida, realizou-se a lavagem com água ultrapura e posterior centrifugação – repetido 2 vezes para minimizar a presença dos compostos do meio de cultivo. Para lise celular, realizou-se o congelamento (24 h)/descongelamento das amostras em freezer a -20°C. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de etanol (90%), homogeneizou-se em vórtex, e manteve-se a 75°C por 10 min em banho-maria. Por fim, os tubos foram postos em banho ultrassônico com gelo por 10 min e centrifugados por 10 min, a 10°C e 10000 rpm. A absorbância das amostras foi registrada

no comprimento de onda de 665 nm, sendo posteriormente subtraído o valor registrado em 750 nm (turbidez residual) e seus respectivos ensaios em branco. Para obter as concentrações de clorofilas utilizou-se a Equação 1.

$$\text{Chl}_a (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = [11,90 \cdot (A_{665} - A_{750}) \cdot V_e] / (V_s \cdot I) \quad \text{Equação 1}$$

Onde: 11,90: coeficiente de extinção para clorofila em etanol; A_{665} : Absorbância em 665 nm; A_{750} : Absorbância em 750 nm; V_e : volume de extrato de etanol (mL); V_s : volume de amostra (mL); I: caminho óptico (cm).

4.4.3 Extração de pigmentos alvos

Ao final do período de duas semanas, os cultivos realizados no item 4.3.2 tiveram a biomassa recuperada por meio de centrifugação (4000 rpm durante 10 min), lavada duas vezes com água destilada e congelada a -20°C para uso posterior. Para extração de ficobiliproteínas, uma amostra de cerca de 0,02 g de biomassa foi transferida para microtubo de 1,5 mL, adicionou-se 1 mL de tampão fosfato (pH 7,4) refrigerado (4°C), homogeneizou-se em vórtex por 30 segundos e realizou-se cinco ciclos de congelamento (24 h a -20°C) e descongelamento (1 h – temperatura ambiente), com homogeneização em cada intervalo (CHITTAPUN et al., 2020). Ao final dos ciclos, os microtubos foram mantidos em refrigerador (4°C) por *overnight*. Por fim, a biomassa foi centrifugada (10000 rpm durante 10 min) e os sobrenadantes avaliados em espectrofotômetro (*Thermo Scientific*, modelo *Multiskan Go*) nos comprimentos de onda de $\lambda = 562$ nm para ficoeritrinas; $\lambda = 615$ nm para ficocianinas e $\lambda = 652$ nm para aloficocianinas (ARASHIRO et al., 2020). Além das leituras em comprimento de onda específico para detecção dos pigmentos de interesse, foram realizadas leituras de varredura para se determinar o pico máximo de absorbância, de modo a analisar outros possíveis grupos de compostos absorventes de luz (ARASHIRO et al., 2020). O ensaio em branco foi realizado apenas com o tampão fosfato e a relação entre as proporções de cada classe de ficobiliproteínas foi determinada pelas equações específicas de acordo com Bennett e Bogorad (1973), respeitando os limites de absorbância entre 0,05 e 1,0.

$$PC = (A_{615} - 0,474 \cdot A_{652}) / 5,34 \quad \text{Equação 2}$$

$$APC = (A_{652} - 0,208 \cdot A_{615}) / 5,09 \quad \text{Equação 3}$$

$$PE = [(A_{562} - 2,41 \cdot PC) - (0,849 \cdot APC)] / 9,62 \quad \text{Equação 4}$$

Onde: PC – concentração de ficocianina na amostra ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); APC – concentração de aloficocianina na amostra ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); PE – concentração de ficoeritrina na amostra ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); A_λ – a absorbância num determinado comprimento de onda.

Em função de serem pigmentos proteicos polares, a biomassa remanescente da extração de ficobiliproteínas foi empregada para extração de outros pigmentos (WINAYU et al., 2021). Para extração de carotenoides e escitoneminas foi utilizado acetato de etila, por 24 h sob refrigeração, com posterior separação por centrifugação e recolhimento do sobrenadante. A quantificação se deu por meio de leitura em espectrofotômetro e aplicação das “equações tricromáticas” relacionados com seus “coeficientes de extinção” listados a seguir (KOKABI; YOUSEFZADI, 2019).

$$S_{cyt} = [(1,04 \cdot A_{384}) - (0,79 \cdot A_{663}) - (0,27 \cdot A_{490})] / 112,6 \quad \text{Equação 5}$$

$$Car = [(1,02 \cdot A_{490}) - (0,08 \cdot A_{384}) - (0,026 \cdot A_{663})] / 250 \quad \text{Equação 6}$$

Onde: S_{cyt} – concentração de escitoneminas ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); Car – concentração de carotenoides totais ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); A_{λ} – a absorvância num determinado comprimento de onda.

As equações foram desenvolvidas a partir da absorvância de soluções purificadas de escitonemina, clorofila *a*, β -caroteno, mixoxantofila e equinenona (oriundos de *Diplocolon* sp.), nos comprimentos de onda de 384 nm, 490 nm e 663 nm. Nos carotenoides, a contribuição de β -caroteno, equinenona e mixoxantofila são de, respectivamente, 67,5%, 23,5% e 10% (PICHEL; CASTENHOLZ, 1991). Ensaio em branco (contendo apenas o solvente) foi realizado para fins de correções.

Nesta etapa, o principal critério de seleção foi a presença/concentração de pigmentos, podendo ser considerados critérios adicionais, como o perfil de crescimento da cepa por meio da relação entre a concentração de pigmento pela biomassa total.

4.5 Cultivo em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas (*bubble column*)

Utilizou-se um fotobiorreator do tipo coluna de bolhas (*bubble column*) com capacidade de 3,95 L e volume útil de 3,5 L, equipado com duas lâmpadas tubulares Empalux LT31016; sensor de pH e temperatura (FiveEasy, Mettler Toledo), rotâmetro (Ômega, modelo FT-062-01-CA-VN) para medir o fluxo de ar em ponto seguinte ao filtro do ar injetado por um compressor; bomba de alimentação, através da qual são adicionados meio e inóculo; aspensor de gás (pedra porosa para aquários); e válvulas de saída de ar, coleta de amostras e dreno. A disposição destes itens pode ser vista na Figura 05, além da esquematização da circulação do meio e principais medidas. A estrutura tubular translúcida foi produzida em acrílico com espessura de aproximadamente 0,45 cm. A concepção e confecção do equipamento é de autoria do professor orientador, Orlando Ernesto Jorquera Cortés.

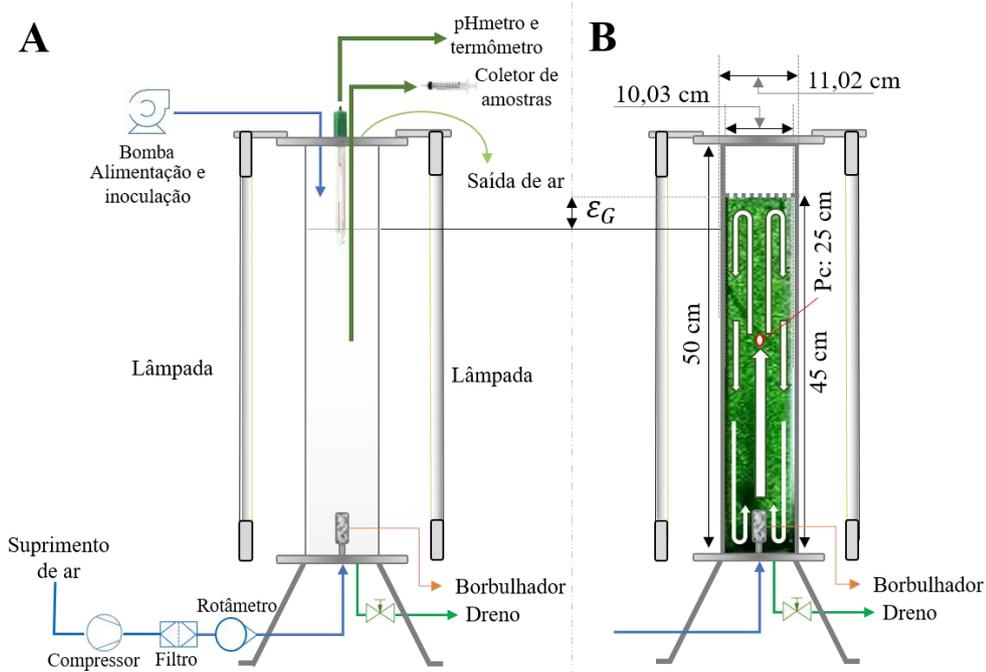


Figura 05: Diagrama esquemático da composição e operação do fotobiorreator. A – disposição dos componentes do fotobiorreator e equipamentos essenciais para o correto funcionamento; notar preenchimento com líquido estático. B – Dimensões e regime de fluxo de biomassa no fotobiorreator; Pc: altura na qual as amostras são coletadas; notar preenchimento em agitação e aumento do volume, variação esta correspondente à retenção do gás (ϵ_G). Elaborado com base em Khoo, Lam e Lee (2016).

4.5.1 Hidrodinâmica do fotobiorreator

Os parâmetros hidrodinâmicos do fotobiorreator consistiram em tempo de mistura (T_m), retenção de gás (*gas hold-up* – ϵ_G) e velocidade superficial do gás (V_G). A medição foi realizada em diferentes fluxos de ar (0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3,0 L/min). A retenção de gás consiste na fração do volume da fase gasosa dissolvida no líquido, sendo empregado o método da expansão volumétrica para sua determinação (NWOBA et al., 2020), realizado três vezes para cada fluxo de ar. A equação para cálculo é detalhada na Equação 7.

$$\epsilon_G = (H_L - H_C) / H_L \quad \text{Equação 7}$$

Onde: H_C corresponde à altura do líquido no fotobiorreator antes da aeração e H_L a altura do líquido quando aerado.

O tempo de mistura – tempo necessário para atingir pelo menos 95% da mistura completa do líquido – foi determinado em meio bifásico, contendo apenas água e ar, através do método de pulso de pH utilizando ácido clorídrico a 35% (NWOBA et al., 2020). Para tal, o fotobiorreator foi preenchido com água deionizada até o volume operacional (3,5 L), acidificado com a solução de ácido clorídrico até o pH 2,0 e aerado por 20 min para expulsão de carbonatos. Em seguida, o pH foi ajustado para 4,50 com solução de NaOH a 12 M,

adicionado 1 mL da solução de HCl 35% e a mudança de pH foi monitorada utilizando pHmetro digital (FiveEasy, Mettler Toledo). O tempo necessário para que o pH atingisse um valor constante (estabilização do pH do sistema) foi registrado, sendo realizado em triplicata. A velocidade superficial do gás ($UG, m \cdot s^{-1}$) foi derivada do quociente da vazão volumétrica de ar e a área de secção transversal da coluna do fotobiorreator. Os dados de ϵ_G e tempo de mistura estão apresentados em função da velocidade superficial do gás correspondente a cada vazão de ar avaliada.

4.5.2 Cultivo

O cultivo se deu a partir de inóculo (10% do volume útil) coletado em fase de crescimento linear (12 dias de cultivo) em meio BG-11, mantido a temperatura ambiente (máxima de 24°C), sendo os aspectos hidrodinâmicos previamente caracterizados. O monitoramento ocorreu a cada 24 horas e incluiu a mensuração do pH e da temperatura e a coleta de amostras de 3 mL para acompanhamento da biomassa. A biomassa foi determinada pela filtração das amostras em papel filtro (previamente seco em estufa por 48 horas e pesado) com posterior secagem em estufa a 60°C por 24 horas e pesagem após esfriar em dessecador (LEE et al., 2013). Adicionalmente, realizou-se a extração e quantificação de ficobiliproteínas a cada 4 dias de acordo com o item 4.5. Alguns parâmetros da cinética de crescimento e produtividade foram determinados de acordo com os métodos descritos por Xie et al. (2015). A produtividade de biomassa (P_{BM}) foi calculada de acordo com a Equação 8. A produtividade de ficocianina (P_{PC}) foi determinada pela Equação 9 e a velocidade máxima de crescimento específico (μ_{max}) determinada pela Equação 10. Em todos estes casos se considera a massa seca (gs).

$$P_{BM}(g_s \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}) = \Delta X / \Delta t \quad \text{Equação 8}$$

$$P_{PC}(mg \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}) = X_t \cdot PC_t / t \quad \text{Equação 9}$$

$$\mu_{max}(d^{-1}) = d \ln X / dt \quad \text{Equação 10}$$

Onde: X, t, PC correspondem à concentração de biomassa ($g \cdot L^{-1}$), tempo (dias) e rendimento de ficocianina ($mg \cdot g^{-1}$), respectivamente.

4.6 Avaliação da influência da intensidade luminosa e cor de luz sobre a produção de ficobiliproteínas pelas cepas selecionadas

Considerando que a cor da luz e sua intensidade luminosa são os fatores mais relatados na literatura para estímulo à produção de ficobiliproteínas, delimitou-se as cores com base nas faixas ótimas de absorção dos pigmentos: vermelho para clorofilas e ficocianina, verde para

ficoeritrina, azul para outras clorofilas e pigmentos fotossintetizantes. A luz branca foi utilizada como controle. As intensidades luminosas empregadas foram de 25, 50 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para todas as cores. Para a execução simultânea das condições testadas para cada cepa, foi construída a estrutura esquematizada na Figura 06. As lâmpadas coloridas empregadas eram da AAA-top (LED tubular T8, 30 cm, Collor, 5 W), enquanto as lâmpadas brancas foram da Granfei (linear dupla de 30cm, 4,5 W e 640 lumens). Esta variação foi necessária para que a intensidade luminosa fosse a mesma em todos os casos. A agitação se deu pela injeção de ar atmosférico filtrado. Enquanto no cultivo de *Phormidesmis* sp. F2 empregou-se as cores branca, azul e vermelha, para *Leptolyngbya* sp.5 B1 empregou-se as cores branca, verde e vermelha. Esta diferença se deve ao fato de uma produzir mais ficocianina e a outra mais ficoeritrina, respectivamente. Os cultivos foram mantidos por 14 dias e avaliados o acúmulo de biomassa total e a produtividade de ficobiliproteínas.

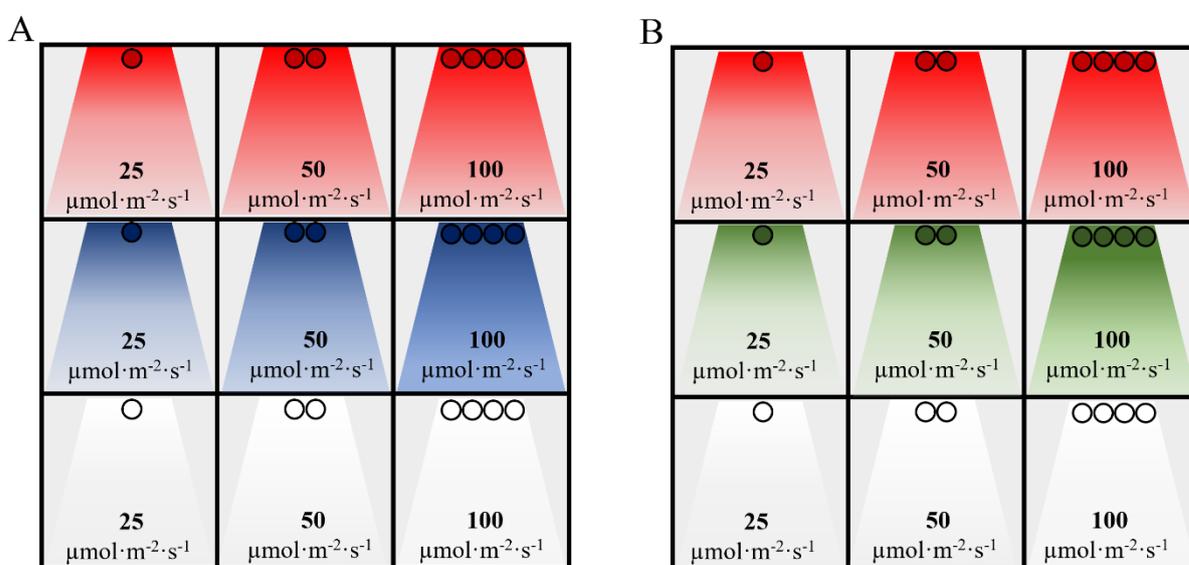


Figura 06: Esquema da estrutura e experimento de avaliação da influência da qualidade de luz e intensidade luminosa sobre a produção de pigmentos e biomassa de *Phormidesmis* sp. F2 (A) e *Leptolyngbya* sp.5 B1 (B). Autoria própria.

4.7 Caracterização parcial de ficoeritrina de *Leptolyngbya* sp.5 B1

4.7.1 Precipitação em sulfato de amônia e diálise

O extrato foi inicialmente fracionado por meio de precipitação fracional com sulfato de amônio sólido, inicialmente a 25% de saturação e, posteriormente, a 60%. Para tal, adicionou-se lentamente 5,76 g de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a 40 mL de extrato (tampão PBS) sob agitação constante, atingindo 25% de saturação. A solução foi mantida em repouso sob refrigeração (4°C) por 16 horas e, posteriormente, centrifugada a 6000 rpm por 30 min a 4°C. O pélete resultante era composto por proteínas menos hidrofílicas, sendo descartado. O

sobrenadante foi coletado (reservada uma alíquota para análises posteriores) e novamente adicionado sulfato de amônio até atingir 60% de saturação (mais 9,36 g do sulfato). A precipitação ocorreu em repouso de 16 horas com posterior centrifugação a 1200 rpm por 30 min a 4°C (MISHRA; SHRIVASTAV; MISHRA, 2011; GHOSH; MISHRA, 2020b; GHOSH et al., 2021). O pélete ressuspendido em 9 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7,4) foi adicionado em uma membrana de celofane e dialisado frente a 500 mL do tampão no qual foi ressuspendido durante quatro ciclos de 4 horas. O teor de ficobiliproteínas foi acompanhado em cada etapa da precipitação de acordo com o item 4.4.3 e a pureza foi determinada pela razão entre a absorbância a 562 e 280 nm para ficoeritrina (WINAYU et al., 2021).

4.7.2 Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC)

O dialisado foi novamente fracionado em uma coluna de troca aniônica Mono Q (Cytivia, 5/50GL) de 5 x 50 mm, com grupo carregado de (-CH₂-N⁺(CH₃)₃), em equipamento de cromatografia líquida de proteína rápida (Amersham Biosciences, AKTA 10). Após a lavagem com tampão (fosfato de sódio a 10 mM, pH 7,40), eluiu-se a coluna com um gradiente linear de concentração iônica crescente de NaCl (de 0 a 500 mM), num fluxo de 1 mL·min⁻¹. Para otimizar a separação dos picos, estabeleceu-se um gradiente em dois estágios, aumentando o volume de eluente para 20 mL entre os picos de absorbância elevada a 562 e 280 nm. (TANG et al., 2016).

4.7.3 SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizado utilizando gel de poliacrilamida a 12,5% (p/v), 1,5 mm de espessura, contendo 0,1% (p/v) de SDS com empilhamento gel de 4% de acrilamida e 0,1% de bisacrilamida. As amostras foram pré-incubadas com 20% de tampão de amostra (Tris-HCl a 250 mM e pH 6,8; 30% (v/v) glicerol; 9,2% (p/v) SDS, 20% (v/v) β-mercaptoetanol, 1% (p/v) de azul de bromofenol) num ciclo de desnaturação. As amostras foram separadas usando uma voltagem constante de 60 V a 12°C e visualizado por coloração com azul brilhante Coomassie R 250 em metanol/ácido acético/água (4:1:4, v/v/v) e registrado em transiluminador. Os pesos moleculares das subunidades foram determinados calibrando o gel com marcadores de baixo peso molecular. O peso molecular foi determinado a partir da permeabilidade dos padrões utilizando o software GelAnalyzer 19.1.

4.8 Tratamento estatístico

As análises executadas em algumas das etapas têm caráter apenas qualitativo, apontando a presença e a ausência, seja de crescimento/produção de biomassa ou de pigmentos. Os dados obtidos nas etapas 4.4.3, 4.5.1 e 4.5.2 e aqueles relativos à biomassa de 4.4.2 foram analisados quanto à presença de *outliers*, por teste IQR (Inter-quartil); sua distribuição (normal ou não-normal) via teste de normalidade de Shapiro-Wilk; para os não-normais aplicou-se o teste de Kurskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn; para os de distribuição normal verificou-se a homoscedasticidade dos dados por teste de Levene. A partir deste, realizou-se a comparação por Anova de uma via e DHS de Tukey como *post-hoc* para os dados homocedásticos, e Anova de Welch e teste de Games-Howel para dados heterocedásticos. Para comparação apenas entre dois grupos utilizou-se o Teste T-*student*, uma vez que se demonstraram normais. A influência dos fatores e sua combinação na avaliação da influência de cor de luz e intensidade luminosa (item 4.6) foi avaliada por Anova de duas vias por meio do IBM SPSS Statistics. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) e o nível de significância foi mantido menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento

A partir dos pontos de coleta com coordenadas e imagens indicadas na Figura 03 foram isolados microrganismos filamentosos (15) e unicelulares (02), distribuídos em quatro famílias e oito gêneros. A distribuição nos táxons, seus respectivos meios de cultivo e técnicas de isolamento estão dispostos na Tabela 05.

Tabela 05: Codificação utilizada nos experimentos e resumo dos táxons isolados.

Ponto de coleta	Cód.	Técnica de isolamento	Meio de cultivo	Táxons
Açude 1: 16°22'40,5"S 39°11'22,0"W	A4	Esgotamento	ASM-1	<i>Leptolyngbya</i> sp.3 A4
	A7	Esgotamento	ASM-1	<i>Arthronema</i> sp. A7
	F1	Pescaria	BG-11	<i>Monilinema</i> sp.1 F1
	F2	Pescaria	BG-11	<i>Phormidesmis</i> sp. F2
	F3	Pescaria	BG-11	<i>Planktolyngbya contorta</i> F3
Açude 2: 16°21'51,7"S 39°11'53,3"W	FA3	Esgotamento	BG-11	<i>Leptolyngbya</i> sp.1 FA3
	8A4	Esgotamento	BG-11	<i>Synechococcus</i> sp.1 8A4
	4H5	Pescaria	BG-11	<i>Synechococcus</i> sp.2 4H5
	A1	Esgotamento	ASM-1	<i>Pseudanabaena</i> sp.1 A1
	A2	Esgotamento	ASM-1	<i>Pseudanabaena</i> sp.2 A2
Açude 3: 16°21'23,1"S 39°11'19,9"W	A3	Esgotamento	ASM-1	<i>Leptolyngbya</i> sp.2 A3
	A5	Esgotamento	ASM-1	<i>Pseudanabaena</i> sp.1 A5
	A10	Esgotamento	ASM-1	<i>Leptolyngbya</i> sp.1 A10
	B1	Pescaria	BG-11	<i>Leptolyngbya</i> sp.5 B1
	B2	Esgotamento	BG-11	<i>Leptolyngbya</i> sp.4 B2
	B4	Esgotamento	BG-11	<i>Pseudophormidium</i> sp. B4
	B5	Esgotamento	BG-11	<i>Monilinema</i> sp.2 B5

As cepas pertencem às ordens Synechococcales e Oscillatoriales. A ordem Nostocales foi frequente nas amostras ambientais e diversos filamentos heterocitados foram pescados na etapa de isolamento, especialmente do gênero *Anabaenopsis* (Wołosz.) V. V. Miller, entretanto, não se desenvolveram no meio líquido. Em sua tese, Vasconcellos (2010) também não obteve sucesso no isolamento de Nostocales em meio BG-11 contendo fonte de nitrogênio, apontando que presença de compostos nitrogenados favorece o crescimento de espécies homocitadas e nenhuma cepa heterocitada se desenvolveu. Membros de Chroococcales chegaram a ser constatados no esgotamento, mas também não sobreviveram até as etapas finais do isolamento. Variações de meio de cultivo e maiores repetições das etapas iniciais do isolamento poderiam ampliar a eficiência do isolamento, de modo a maximizar a biodiversidade abordada. Contudo,

esta pesquisa está norteada por aspectos práticos, como o rápido crescimento dos táxons e não o estudo total da biodiversidade presente nos ambientes de coleta.

O gênero *Leptolyngbya* Anagnostidis et Komárek correspondeu a 35% das cepas isoladas. A alta ocorrência deste gênero pode ser explicada pela grande quantidade de plantas aquáticas nos pontos de coleta que poderiam estar recobertas por perifiton (SANT'ANNA et al., 2006b). A seguir é apresentada a caracterização das cepas isoladas e sua discussão taxonômica.

5.1.1 Caracterização taxonômica do material isolado

Phormidesmis sp. F2

Tricomas cilíndricos, moniliformes, longos e emaranhados, formando massas densas (Figura 07 A), constrictos nas paredes transversais, não atenuados e não captados, sem grânulos nos septos (Figura 07 B). Bainha mucilaginosa e aerótopos ausentes. Células um pouco mais largas que longas, com 1,8 a 2,7 μm de diâmetro e 0,9 a 1,8 μm de comprimento, e relação largura/comprimento de 1,5 a 2,0, tendendo a isodiamétricas ao final dos tricomas. Células apicais arredondadas (Figura 07 C). Conteúdo celular homogêneo e reprodução por fragmentação dos tricomas, sem células necridiais (Figura 07 D).

As características morfológicas dos espécimes analisados se aproximam daquelas consideradas diagnósticas para um complexo de gêneros, como *Monilinema* C.F.S. Malone et al. (MALONE et al., 2021), *Pantanalinema* M.G.M.V. Vaz et al., *Alkalinema* M.G.M.V. Vaz et al. (VAZ et al., 2015) e *Phormidesmis* Turicchia et al. (TURICCHIA et al., 2009), tais como: tricomas homocitados moniliformes, sem ramificação, células isodiamétricas ou mais longas ou mais curtas do que largas, células terminais arredondadas, sem caliptra e ausência de células necridiais. Todos estes gêneros possuem semelhanças morfológicas entre si, tendo sido delimitados através de análises genéticas baseadas no gene 16S RNAr. Apesar das semelhanças morfológicas, todos estes gêneros são referidos para ambientes alcalinos: *Monilinema*, *Pantanalinema* e *Alkalinema* são referidos para lagos alcalinos do pantanal brasileiro, enquanto *Phormidesmis* foi referida para pântanos alcalinos em Belize, diferindo dos espécimes analisados que foram coletados em açudes não alcalinos.

Com relação à bainha, *Pantanalinema* apresenta bainha obrigatória, enquanto *Alkalinema* possui mucilagem difluente presente, diferindo do táxon em análise que não apresentou nem bainha firme e nem mucilagem em qualquer momento do cultivo. *Monilinema*, por sua vez, apresenta bainha de forma rara, mas suas células são sempre isodiamétricas, o que não foi observado nos espécimes estudados, dada a variação morfométrica ocorrente, inclusive,

ao longo de um mesmo tricoma. Desta forma, o conjunto de dados possibilitou a inclusão do táxon avaliado no gênero *Phormidesmis*. Apesar das características morfológicas da cepa serem muito próximas à espécie tipo deste gênero, *P. mollis* (Gomont) Turicchia et al., os aspectos ecológicos impossibilitam a definição deste táxon em nível específico. A diversidade genotípica existente neste grupo associada à ausência de variabilidade morfológica, requer a realização de análises moleculares para uma identificação específica mais acurada.

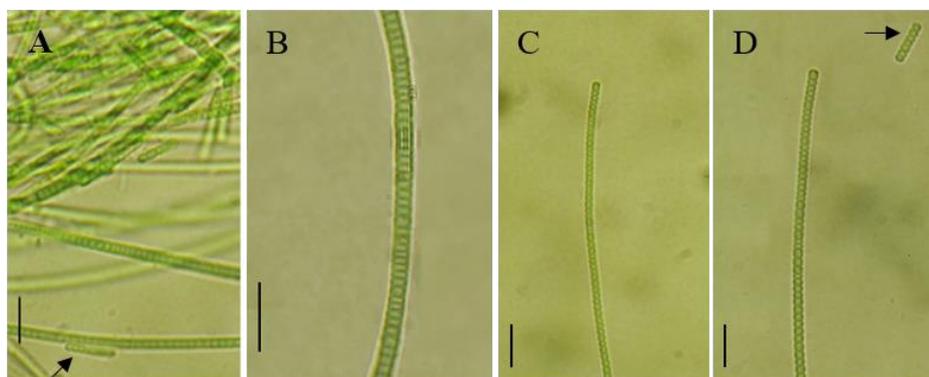


Figura 07: *Phormidesmis* sp. F2 (material de cultura): A – filamentos emaranhados, destaque para hormogônio (seta); B – células mais largas que longas na região mais central do tricoma; C – tricoma constricto; D – Destaque para célula apical e hormogônio (seta). Escalas: 10 μ m.

***Monilinema* sp.1 F1**

Filamentos longos, cilíndricos e densamente emaranhados (Figura 08 A). A bainha é facultativa, individual, incolor e delgada (Figura 08 B). Os tricomas são constrictos, retos ou flexíveis, não atenuados ou captados (Figura 08 C). Aerótopos e grânulos nos septos ausentes. Células quadráticas, com diâmetro de 1,9 a 2,1 μ m e 1,6 a 2,0 μ m de comprimento, com uma relação largura/comprimento de 1,0 a 1,2. Células apicais cônico-arredondadas (Figura 08 D). Conteúdo celular verde azulado homogêneo e reprodução por fragmentação dos tricomas por meio de células necridiais (Figura 08 E) ou não.

De acordo com a discussão taxonômica já apresentada para o táxon anterior, é possível alocar os espécimes estudados desta amostra no gênero *Monilinema*, o qual apresenta bainha relativamente rara, mas quando presente apresenta-se firme, além das células isodiamétricas e célula apical podendo ser cônico-arredondada. Com relação aos aspectos ecológicos, esta amostra também difere da descrição original da espécie tipo do gênero, *Monilinema alkalinum* C.F.S. Malone et al. (MALONE et al. 2020), a qual foi coletada em lagos alcalinos do pantanal brasileiro. Desta forma, somente com a realização de análises moleculares será possível a determinação específica desta cepa.



Figura 08: *Monilinema* sp.1 F1 (material de cultura): A – tricoma reto e longo; B – filamento com detalhe da bainha firme (seta); C – tricoma com células aparentes e hormogônio curto (seta); D – tricoma constricto com célula apical cônico-arredondada (seta); E – tricoma com célula necridial (seta). Escalas: 10 µm.

***Monilinema* sp.2 B5**

Tricomas móveis, medindo não mais que 200 µm de comprimento, cilíndricos, retos, constrictos (moniliformes), não atenuados e não captados (Figura 09 A). Embora apresente mucilagem corada com azul de metileno, esta não forma bainha (Figura 09 B). As células variam de quadráticas a mais largas que longas, com 2,3 a 2,7 µm de diâmetro e 1,5 a 2,2 µm de comprimento, e relação largura/comprimento de 1,2 a 1,5. Células apicais arredondadas (Figura 09 A). Conteúdo celular homogêneo. Aerótopos e grânulos nos septos ausentes. A fragmentação do tricoma ocorre por meio de desintegração de células (Figura 09 C-E), formando hormogônios móveis.

Este táxon apresentou características peculiares quando comparado àqueles outros estudados, contudo, a análise dos seus dados morfométricos, como o aspecto moniliforme do seu tricoma e o padrão celular, possibilitou o seu enquadramento dentro do gênero *Monilinema*. A sua identificação específica não foi possível, especialmente devido ao habitat para o qual a espécie tipo, *M. alkalinum*, foi relatada - lagos alcalinos do pantanal brasileiro (MALONE et al., 2021), destoando ecologicamente dos açudes em que o material analisado foi coletado, evidenciando a necessidade de realização de análises que acessem a sua diversidade genética para corroboração.

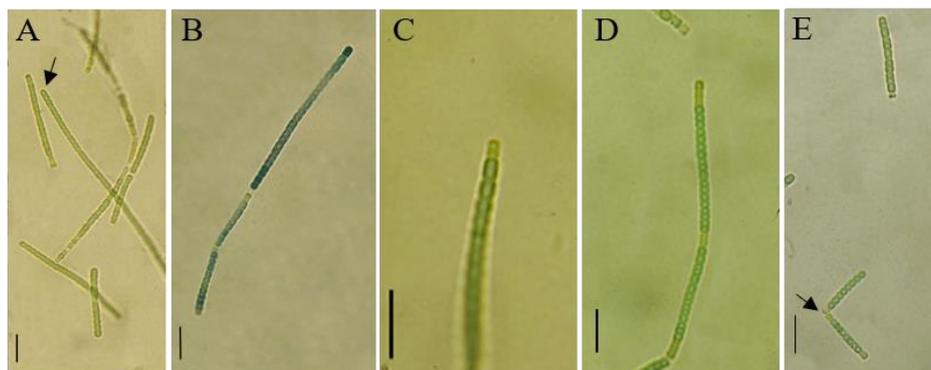


Figura 09: *Monilinema* sp. 2 B5 (material de cultura): A – tricomas com seta indicando célula apical; B – tricoma corado com azul de metileno indicando a presença de fina camada de mucilagem; C – detalhe de resquício de célula degenerada onde ocorreu a fragmentação do tricoma; D – tricoma com células mais quadráticas e células em processo de degeneração; E – filamento fragmentado a partir de células degeneradas (seta). Escalas 10 μ m.

***Leptolyngbya* sp.1 FA3 e *Leptolyngbya* sp.1 A10**

Os filamentos desta cepa formam emaranhados densos, são cilíndricos, flexuosos a levemente espiralados, com bainha individual e aberta (Figura 10 A, B, D, E). Os tricomas são imóveis, cilíndricos, não constrictos e com paredes transversais de difícil visualização, não atenuados ou captados (Figura 10 C, D). Sem aerótopos e com 1 a 2 grânulos nos septos (Figura 10 C, F). As células são mais longas que largas, com 1,4 a 2,4 μ m de diâmetro e 2,4 a 4,6 μ m de comprimento, e relação largura/comprimento de 0,5 a 0,6. Células apicais cilíndrica-arredondadas, sem caliptra (Figura 10 B, D). O conteúdo celular é homogêneo e os tricomas formam hormogônios móveis sem a presença de células necridiais. Estas características morfométricas são muito similares às apresentadas pela cepa A10, que difere apenas no aspecto macroscópico ao apresentar coloração quase preta.

As características deste táxon são condizentes com as do gênero *Leptolyngbya*, em especial a presença de grânulos e os tricomas imóveis (MALONE, 2010; KOMÁREK et al., 2014; KOMÁREK; JOHANSEN, 2015b). Dentre os táxons descritos até o momento, os espécimes analisados apresentam algumas características similares a *Leptolyngbya aeruginea* (Kützing ex Hansgirg) Komárek, especialmente a morfometria e a ocorrência em ambiente dulcícola. Contudo, *L. aeruginea* é relatada apresentando filamentos densamente espiralados (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005), adicionalmente, esta espécie não apresenta a ocorrência de grânulos nos septos, diferindo do observado nas amostras estudadas. Dessa forma, não foi possível a definição em nível específico deste táxon.

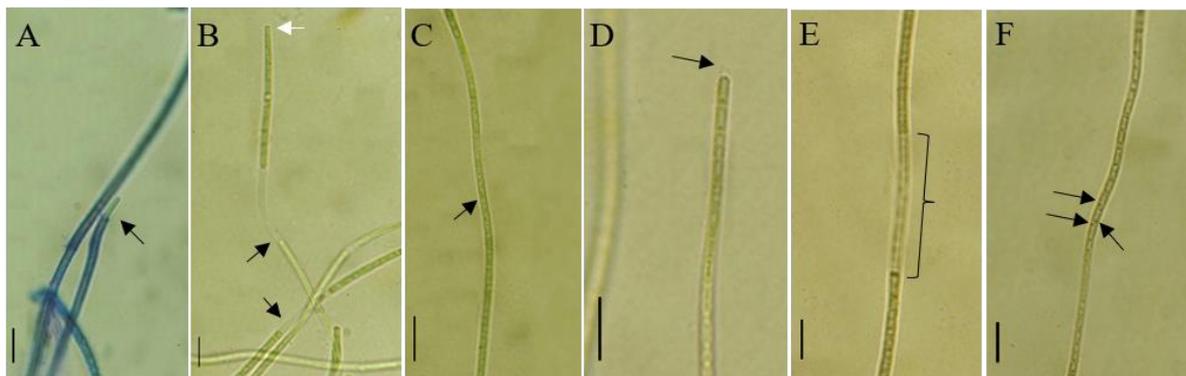


Figura 10: *Leptolyngbya* sp.1 (material de cultura) - *Leptolyngbya* sp.1 FA3: A – detalhe da bainha aberta corada com azul de metileno (seta); B – bainhas aparentes (setas) e formação de hormogônios por fragmentação e destaque para célula apical cilíndrica-arredondada (seta branca); C – filamento com destaque para os grânulos aos pares nas células (seta); *Leptolyngbya* sp.1 A10: D – filamento com destaque para célula apical cilíndrica e bainha aberta (seta); E – filamento em fragmentação com bainha evidente (chave); F – filamento com células aparentes e destaque para os grânulos aos pares nas células (setas). Escalas: 10 μ m.

***Leptolyngbya* sp.2 A3**

Os filamentos são imóveis, longos, cilíndricos, retos a flexuosos, formando emaranhados flutuantes. Tricomas levemente constrictos, não atenuados ou captados, com células apicais cilíndrico-arredondadas (Figura 11 A). A bainha é delgada e hialina (Figura 11 B). As células são ligeiramente mais longas que largas, com 1,5 a 2,0 μ m de diâmetro e 2,1 a 2,6 μ m de comprimento, e relação largura/comprimento de 0,7 a 0,8. Sem aerótopos e septos não granulados. O conteúdo celular é homogêneo, verde oliva. A reprodução se dá por meio da fragmentação dos tricomas sem a presença de células necridiais, gerando hormogônios imóveis (Figura 11 C).

Dentre as espécies descritas para o gênero *Leptolyngbya* até o momento, nenhuma delas apresenta correspondência com o conjunto de características exibido por esta cepa, diferindo ou na morfologia ou no hábito e habitat. A ausência de características diacríticas dificulta a caracterização de espécies neste gênero, havendo mais de 100 catalogadas ocorrendo, principalmente, no perifiton (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005; SANT'ANNA et al., 2006b). Neste contexto de ausência de variabilidade morfológica, apenas com a realização de análises moleculares e ultraestruturais torna-se possível evidenciar a diversidade genética existente neste grupo.

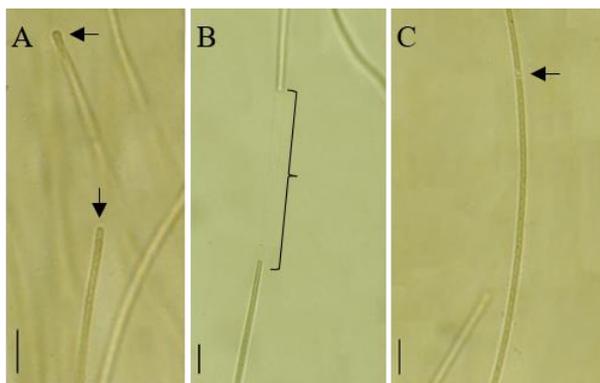


Figura 11: *Leptolyngbya* sp.2 A3 (material de cultura): A – células apicais cilíndrico-arredondadas (setas pretas); B – destaque da bainha delgada e hialina (chave); C – início da fragmentação do tricoma (seta preta). Escalas: 10 μ m.

Leptolyngbya sp.3 A4

Os filamentos são longos, flexuosos, cilíndricos, com bainha firme, delgada e hialina (Figura 12 D). Os tricomas são constrictos (Figura 12 B), com células mais longas que largas, com 1,0 a 1,2 μ m de diâmetro e 2,3 a 3,1 μ m de comprimento, e relação largura/comprimento de 0,4. Conteúdo celular homogêneo, com ausência de aerótopos e grânulos. Células apicais cilíndrico-arredondadas (Figura 12 A). Reprodução por fragmentação do tricoma para formação de hormogônios (Figura 12 C).

Assim como discutido para *Leptolyngbya* sp.2, este táxon difere das espécies descritas na literatura para este gênero, seja pela morfologia e/ou pelo hábito e habitat (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005), sendo necessária a realização de análises genéticas para confirmação do seu status específico.

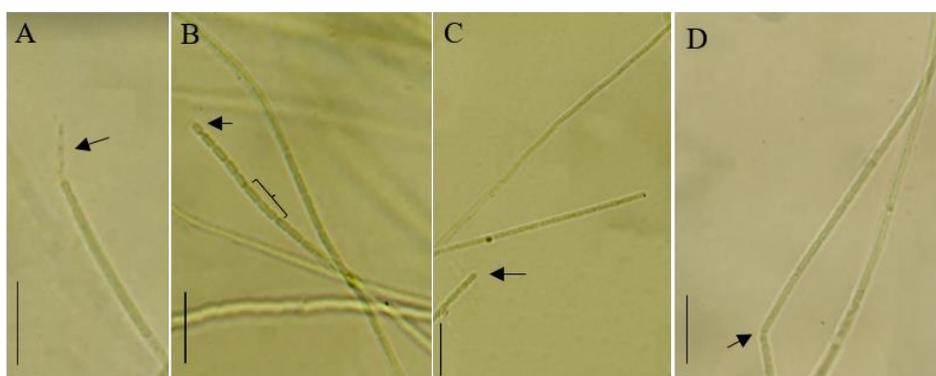


Figura 12: *Leptolyngbya* sp.3 A4 (material de cultura): A – detalhe da bainha ao final do tricoma (seta); B – célula apical (seta) e detalhe das células cilíndricas em tricoma constricto (chave). C – detalhe de célula apical cilíndrico-arredondada (seta); D – filamento fragmentando-se (seta). Escalas: 10 μ m.

Leptolyngbya sp.5 B1

Filamentos longos, cilíndricos e emaranhados, bainha individual, incolor e delgada (Figura 13 A). Os tricomas são flexuosos, cilíndricos, moniliformes, não atenuados ou captados (Figura 13 B). Pseudoramificações simples raras (Figura 13 C). Grânulos nos septos e

aerótopos estão ausentes. Células predominantemente quadráticas, com 2,0 a 2,8 μm de diâmetro e 1,3 a 2,7 μm de comprimento, e relação largura/comprimento de 1,0 a 1,5. Células apicais cônico-arredondadas. Conteúdo celular homogêneo e reprodução por fragmentação dos tricomas por meio de células necridiais (Figura 13 D), gerando hormogônios imóveis.

O aspecto moniliforme e a morfometria deste táxon se assemelham ao gênero *Pantanalinema*, contudo, na descrição original apresentada por Vaz et al. (2015) para a espécie tipo *P. rosanae* M.G.M.V. Vaz et al., não há referência quanto à ocorrência de pseudorramificação. Outra diferença nesta comparação decorre do local de coleta, pois *Pantanalinema* é referida para lagos alcalinos do pantanal brasileiro, enquanto o material analisado foi coletado em açudes. Embora em cultivo tenda a elevar o pH do meio, valores muito alcalinos ($>9,0$) afetam o desenvolvimento da cepa. As análises filogenéticas (Figura 20) também evidenciaram a distância evolutiva entre esta cepa e o gênero *Pantanalinema*. Desta forma, esse táxon foi denominado como *Leptolyngbya* até a corroboração da sua identificação em nível genérico e específico.

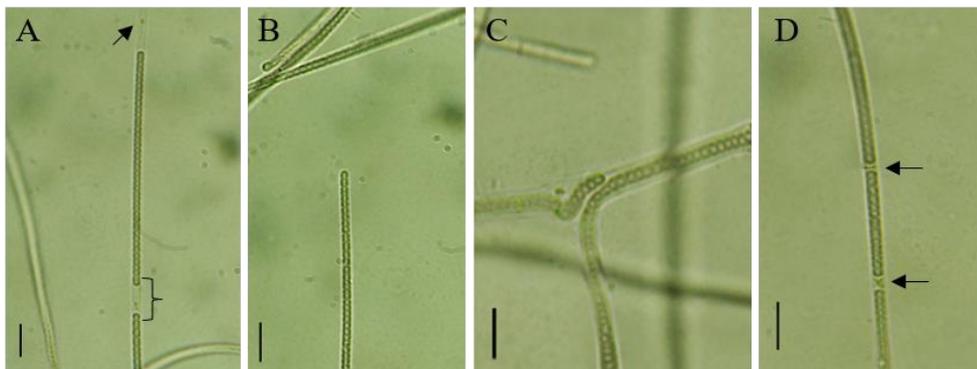


Figura 13: *Leptolyngbya* sp.5 B1. A – destaque para bainha (chave) e remanescente da célula necridial (seta); B – tricoma individual e célula apical; C – pseudorramificação simples; D – células necridiais (setas). Escalas: 10 μm .

***Planktolyngbya contorta* (Lemmermann) Anagnostidis & Komárek F3**

Filamentos imóveis, longos, cilíndricos, alternando entre retos, flexuosos a altamente espiralados (Figura 14 A, B, C, E). A bainha é delgada, individual e hialina. Os tricomas são levemente constrictos nas paredes transversais, não atenuados ou captados (Figura 14 D). Aerótopos e grânulos nos septos não foram observados. As células são mais longas que largas, com 1,4 a 1,8 μm de diâmetro e 2,0 a 2,9 μm de comprimento, e relação largura/comprimento de 0,6 a 0,7. Células apicais arredondadas, sem caliptra. Não foram observadas células necridiais ou hormogônios móveis.

O conjunto de características morfométricas e ecológicas identificadas inclui o táxon estudado na espécie *Planktolyngbya contorta*, a qual apresenta caracteristicamente os

filamentos irregularmente espiralados e células mais longas que largas (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005).



Figura 14: *Planktolyngbya contorta* (Lemmermann) Anagnostidis & Komárek F3 (material de cultura): A – filamentos emaranhados (Escala: 40 μm); B – filamento isolado; C – região terminal do filamento espiralado; D – destaque para as células aparentes de filamento fragmentado (chave) e uma pequena espiral ao final de um filamento reto (seta); E – região terminal espiralada após uma região retilínea (seta indicando a conexão). Escalas: 10 μm .

***Pseudophormidium* sp. B4**

Filamentos formando pequenos agregados densos. Bainha individual e muito delgada (Figura 15 A). Os tricomas são flexíveis e, em alguns casos, chegam a formar espiras completas (Figura 15 A, B). Os tricomas são imóveis, levemente constrictos, não atenuados ou captados. Pseudorramificações duplas (geminadas) são frequentes (Figura 15 C, A). As células são mais largas que longas e apresentam conteúdo celular homogêneo, sem grânulos. Apresentam de 2,5 a 3,3 μm de diâmetro e 1,0 a 1,5 μm de comprimento, com relação largura/comprimento de 2,2 a 2,5. As células terminais são arredondadas e sem caliptra. A reprodução se dá pela fragmentação do tricoma com ou sem auxílio de células necridiais (Figura 15 D), com hormogônios imóveis (Figura 15 E).

As características apresentadas por esta cepa, especialmente a presença de pseudorramificações e morfometria, correspondem àquelas relatadas para o gênero *Pseudophormidium* (Forti) Anagnostidis & Komárek de acordo com Komárek e Anagnostidis (2005). Dentre as espécies relatadas para este gênero, morfologicamente os filamentos analisados se assemelham a *P. hollerbachianum* (Elenkin) Anagnostidis, contudo, difere marcadamente quanto ao talo gelatinoso observado no ambiente natural e ao hábito, ocorrendo como aerofítico sobre solos (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005). Deste modo, a realização de análises moleculares e ultraestruturais possibilitarão a identificação específica deste táxon.

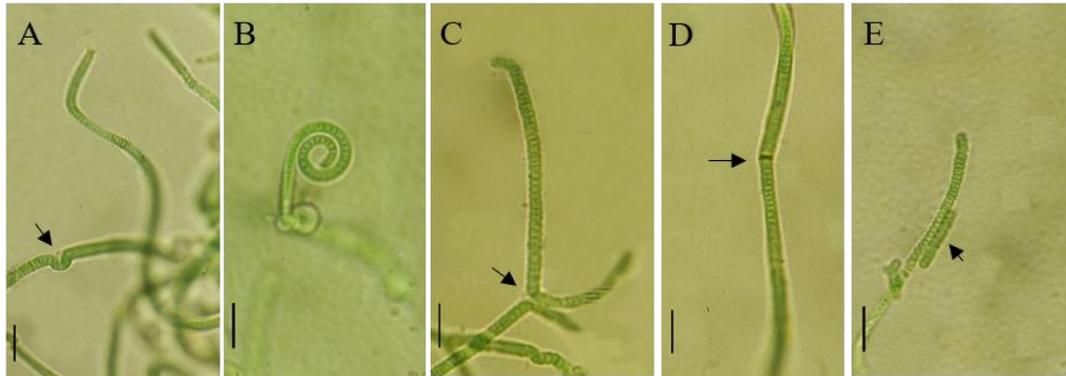


Figura 15: *Pseudophormidium* sp. B4 (material de cultura): A – filamento iniciando a formação de uma pseudorramificação (seta); B – filamento formando espiral; C – filamentos formando pseudorramificação dupla (seta); D – necrídio (seta); E – filamento com células evidentes e hormogônio (seta). Escalas: 10 μm .

Pseudanabaena sp.1 A1 e *Pseudanabaena* sp.1 A5

Tricomas sem bainha, retos, constrictos, não maiores que 100 μm , cilíndricos, imóveis, podendo ser solitários ou formar agregados (*mats*) (Figura 16 A). As células são mais longas que largas, com 1,6 a 2,0 μm de largura e de 2,5 a 3,4 μm de comprimento, e razão largura/comprimento de 0,6 a 0,7. Aerótopos e grânulos nos septos estão ausentes. As células apicais são cilíndrico-arredondadas. Reprodução por fragmentação, formando hormogônios de duas a algumas células. Embora isolada de ponto distinto e apresentar filamentos menos cumpridos (até 35 μm), a cepa A5 (Figura 16 B) foi considerada como pertencente a este mesmo táxon.

Estas características condizem com o gênero *Pseudanabaena* Lauterborn, contudo, o conjunto morfo-ecológico de características do material estudado não corresponde a nenhuma espécie descrita para este gênero, principalmente pela proporção entre largura e comprimento celular, destoando do que é observado na literatura (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005; SANT'ANNA et al., 2006b; KOMÁREK; JOHANSEN, 2015b), tornando-se necessária a realização de análises genéticas para a comprovação da sua identificação em nível específico.

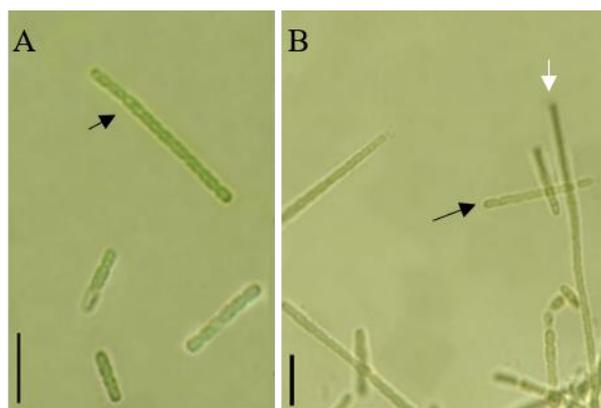


Figura 16: *Pseudanabaena* sp.1 (material de cultivo). A – *Pseudanabaena* sp.1 A5: tricomas (seta) e hormogônios com quantidade variada de células; B – *Pseudanabaena* sp.1 A1: tricomas mais longos (seta

branca); hormogônio com cerca de oito células e destaque para célula apical cilíndrico-arredondada (seta preta). Escalas: 10 μm .

Pseudanabaena sp.2 A2

Os tricomas não apresentam bainha mucilaginosa, sendo longos, cilíndricos, retos a flexuosos, levemente constrictos, formando emaranhados (*mats*) (Figura 17 A). Não atenuados e não captados. Sem aerótopos e com septos agranulados. As células variam de quadráticas a mais largas que longas, com 1,7 a 2,1 μm de diâmetro e 1,2 a 1,7 μm de comprimento, e relação largura/comprimento de 1,2 a 1,5 (Figura 17 B, C). Células apicais variando de truncada a cilíndrico-arredondada, sem caliptra. O conteúdo celular é homogêneo e a reprodução se dá por meio da fragmentação dos tricomas sem a presença de células necridiais, gerando hormogônios longos e imóveis (Figura 17 C).

As características morfológicas e ecológicas apresentadas por este táxon não correspondem a nenhuma espécie descrita para o gênero *Pseudanabaena* (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005), evidenciando a necessidade de análises moleculares para que a diversidade genética seja evidenciada, dada a ausência de atributos morfológicos que possibilitem a identificação em nível específico.

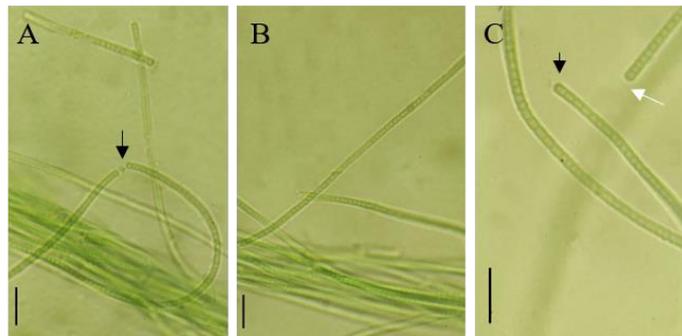


Figura 17: *Pseudanabaena* sp.2 A2 (material de cultura): A – detalhe de fragmentação de um tricoma (seta); B – tricoma reto; C – detalhe da célula apical (seta preta) e célula terminal (seta branca) pós fragmentação do tricoma. Escalas: 10 μm

Arthronema sp. A7

Os tricomas não possuem bainha, sendo imóveis, longos, cilíndricos, flexuosos, constrictos, não atenuados, podendo ocorrer livres ou formando emaranhados (Figura 18 A). Os tricomas apresentam células apicais truncadas (Figura 18 B). Sem aerótopos e grânulos nos septos. Há dois tipos celulares, sendo as células predominantes levemente mais largas que longas, com 1,6 a 2,0 μm de diâmetro e 1,2 a 1,7 μm de comprimento, e relação largura/comprimento de 1,2 a 1,3, e células infladas distribuídas irregularmente ao longo do tricoma, estando algumas vezes aos pares, com 2,5 μm de diâmetro por 3,0 μm de comprimento (Figura 18 C, A). Quando menores, as células infladas promovem mudança na direção de

crescimento do tricoma (Figura 18 A). O conteúdo celular é homogêneo e a reprodução se dá por meio da fragmentação dos tricomas sem a presença de células necridiais, gerando hormogônios móveis (Figura 18 D).

As características desta cepa se aproximam às descritas para o gênero *Arthronema* Komárek et Lukavsky. Entretanto, neste gênero, os hormogônios gerados são imóveis e o desenvolvimento das células infladas parece estar atrelado a alguma condição de estresse, além de ser oriundo de ambiente hipersalino (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005; KOMÁREK; JOHANSEN, 2015b). Adicionalmente, Casamatta et al. (2005) descreveram *Arthronema gygaxiana* Casamatta et Johansen, uma nova espécie para o gênero coletado em ambiente de água doce, apresentando tricomas com menor quantidade de células e mais largos que os estudados, além do hábito epifítico. Adicionalmente, Batista et al. (2022) detectaram, com base em análise metagenômica, abundância relativa de genes 16S RNA com alta similaridade às sequências do gênero *Arthronema* no sistema de abastecimento de uma cidade no estado de Minas Gerais. Possivelmente, o táxon analisado pode corresponder a uma nova espécie para o gênero, necessitando ser corroborado através de análises ultraestruturais e moleculares.

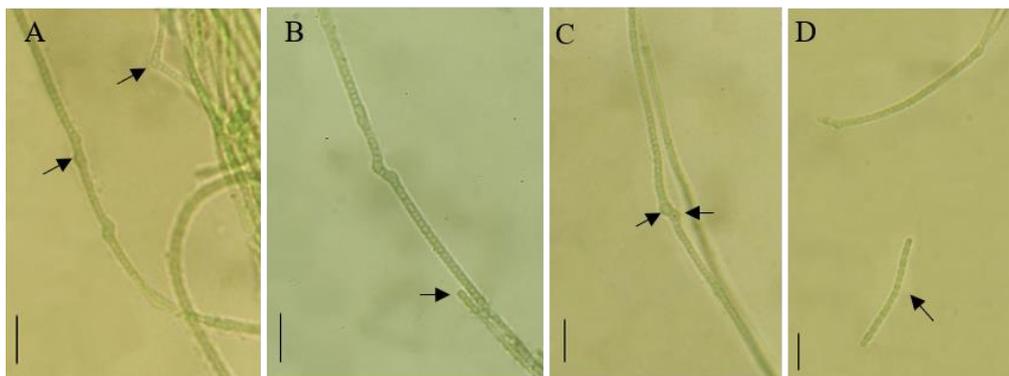


Figura 18: *Arthronema* sp. A7 (material de cultura): A – destaque para células diferenciadas que muda a orientação do crescimento do tricoma (seta superior) e célula inflada (seta inferior); B – célula apical truncada (seta); C – tricoma constricto com células mais largas que longas aparentes e células infladas (setas); D – hormogônio (seta). Escalas 10 μ m.

***Synechococcus* sp.1 8A4**

Células isoladas, de vida livre, sem mucilagem, com formato cilíndrico e de extremidades arredondadas (Figura 19 A). Conteúdo celular homogêneo, sem grânulos e aerótopos. Divisão celular em um único plano, perpendicular ao eixo longitudinal da célula. Observou-se que durante a divisão da célula-mãe, há a geração de duas células filhas menores que crescem até o tamanho usual (Figura 19 B). As células têm de 1,4 a 1,7 μ m de diâmetro e de 2,3 a 2,6 μ m de comprimento, com relação comprimento/largura de 1,5 a 1,6.

O gênero *Synechococcus* Nägeli, além das características citadas, não forma colônias distintas, apresenta células solitárias, cilíndricas e em forma de bastonetes, até levemente arqueadas (TURICCHIA et al., 2009; KOMÁREK; JOHANSEN, 2015a). Desta forma, a cepa pode ser considerado membro deste táxon.

***Synechococcus* sp.2 4H5**

Células de vida livre, sem mucilagem e cilíndricas com extremidades arredondadas. Não forma colônias distintas, mas apresenta aglomerações irregulares. O conteúdo celular é homogêneo, podendo ocorrer grânulos isolados pouco frequentes. Sem aerótopos evidentes. Divisão perpendicular ao eixo longitudinal das células, na qual a célula cresce e se divide formando células filhas (Figura 19 C). As células têm de 2,1 a 3,1 μm de diâmetro e de 4,9 a 6,4 μm de comprimento, com relação comprimento/largura de 2,1 a 2,3.

As características apresentadas por esta cepa correspondem ao gênero *Synechococcus*, contudo não houve possibilidade de delimitação específica em função da distinção morfométrica e de hábito apresentado pelas espécies já descritas (SANT'ANNA et al., 2006b; MALONE, 2010; KOMÁREK; JOHANSEN, 2015a). Komárek et al. (2020) realizaram uma ampla análise filogenética e taxonômica com morfotipos de *Synechococcus* e propuseram o desmembramento de novos gêneros, com destaque para a segmentação em função dos ambientes de ocorrência. Adicionalmente, com o avanço das técnicas ultraestruturais e moleculares, novas espécies têm sido continuamente descritas, abarcando principalmente ambientes pouco amostrados, como os estudados neste trabalho.

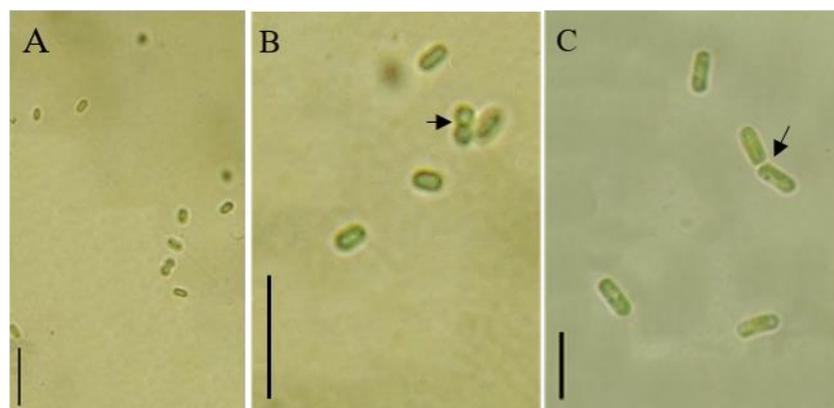


Figura 19: *Synechococcus* spp. (material de cultura) - *Synechococcus* sp. 8A4: A – células cilíndricas com ápices arredondados; B – Detalhe de célula finalizando a divisão em um único plano, gerando duas células filhas (seta). *Synechococcus* sp. 4H5: C – células cilíndricas com ápices arredondados e divisão sendo finalizada com duas células filhas (seta). Escala: 10 μm .

A filogenia apresentou a formação de dois grandes clados destacados em azul e roxo, cada um englobando uma das sequências estudadas. Apesar da cepa B1 apresentar características morfológicas similares ao gênero *Pantanalinema*, a análise genética evidenciou que este táxon não pertence a este gênero, dado que foi utilizada na matriz a sequência da espécie tipo *P. rosanae* Vaz et al. Assim, a cepa B1 é tratada como *Leptolyngbya* sp.5 B1, ainda que esteja dentro de um clado considerado como *Leptolyngbya lato senso*, dado que não possui similaridade genética com as sequências referências para a espécie tipo do gênero, *L. boryana* (Gomont) Anagnostidis et Komárek UTEX B 487, UTEX B 488 ou PCC 6306. Inúmeras sequências identificadas como *Leptolyngbya* podem se constituir em novos gêneros em função da grande diversidade genética que este grupo possui em detrimento da sua baixa variabilidade fenotípica (ARAÚJO et al., 2022).

A sequência da cepa *Phormidesmis* sp. F2 agrupou-se mais proximamente também com táxons identificados como *Leptolyngbya lato senso*. O grupo irmão deste clado engloba sequências do gênero *Monilinema*, contudo, em função da distância genética entre a sequência estudada e este clado, não há possibilidades de inclusão da cepa F2 neste gênero. A cepa F2 está mais relacionada filogeneticamente com a sequência de *L. boryana* SBM-IAUF-4, contudo esta não é a cepa referência para a espécie tipo deste gênero citada acima. Adicionalmente, a ausência de bainha, células necridiais e de pseudorramificações na cepa F2 divergem muito das características diagnósticas de *L. boryana*, assemelhando-se apenas no que tange ao formato das células e à constrição nos tricomas (KOMÁREK; JOHANSEN, 2015b). Dessa forma, em função da similaridade morfológica apresentada entre F2 e o gênero *Phormidesmis*, optou-se por incluí-la neste gênero, dado a cepa referência da espécie tipo, *P. mollis* (Gomont) Turicchia, Ventura, Komárková & Komárek, não estar abarcada na análise.

A abordagem polifásica, englobando análises genética, morfológica, ultraestrutural e ecológica possibilitará a identificação genérica e específica das cepas de maneira mais acurada, trazendo contribuições científicas relevantes para o ambiente estudado.

5.2 Seleção de cianobactérias produtoras de pigmentos

5.2.1 Crescimento e obtenção de biomassa

As cepas foram cultivadas visando a obtenção de biomassa para as extrações de pigmentos e seleção daquelas com maior acúmulo. O crescimento foi acompanhado por quantificação de clorofila *a*, uma vez que a diversidade morfológica e de crescimento entre as cepas não permitiu a recuperação eficiente de biomassa por procedimento único. Para obter os dados de rendimento de biomassa, determinou-se a umidade da biomassa, de modo a expressá-la em massa seca, forma que é considerada a maneira mais acurada de determinação (LEE et al., 2013). A Figura 21 a seguir apresenta as curvas de crescimento de todas as cepas.

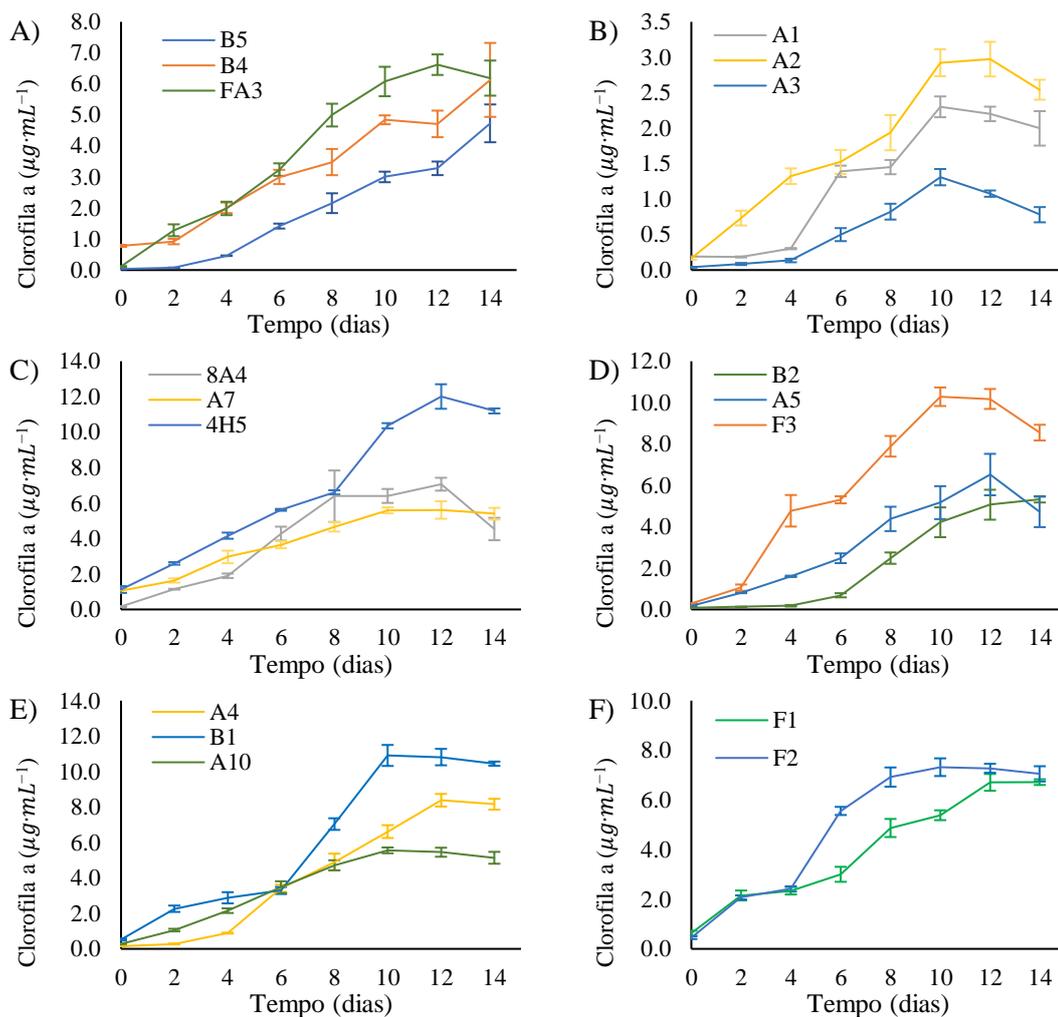


Figura 21: Curva de crescimento das diferentes cepas determinada a partir da quantificação de clorofila *a*. Dados médios a partir de triplicatas, barras de erro indicam o erro padrão (n=3). **A** – Cepas *Monilinema* sp.2 B5 (B5), *Pseudophormidium* sp. B4 (B4), *Leptolyngbya* sp.1 FA3 (FA3); **B** – Cepas *Pseudanabaena* sp.1 A1 (A1), *Pseudanabaena* sp.2 A2 (A2), *Leptolyngbya* sp.2 A3 (A3); **C** – Cepas *Synechococcus* sp.1 8A4 (8A4), *Arithronema* sp. A7 (A7), *Synechococcus* sp.2 4H5 (4H5); **D** – Cepas *Leptolyngbya* sp.4 B2 (B2), *Pseudanabaena* sp.1 A5 (A5), *Planktolyngbya* sp. F3 (F3); **E** – Cepas *Leptolyngbya* sp.3 A4 (A4), *Leptolyngbya* sp.5 B1 (B1), *Leptolyngbya* sp.1 A10 (A10); **F** – Cepas *Monilinema* sp.1 F1 (F1) e *Phormidesmis* sp. F2 (F2).

A partir da análise da Figura 21, pode-se perceber que as cepas se adaptaram bem às condições de cultivo empregadas. Em A4, B4 e B5 a fase de adaptação foi superada após dois dias de inoculação, enquanto em A1, A3 e B2, (Figura 21 A, B, D, E) se estendeu por quatro dias. Embora não tenha sido percebido a fase *lag* na maioria das cepas, esta pode ter ocorrido em tempo menor que o intervalo de medição (um dia), uma vez que o inóculo utilizado fora cultivado por sete dias no meio BG-11 e em fase exponencial/linear de crescimento. A fase de crescimento intenso se deu entre o quarto e décimo dia, se estendendo até o décimo segundo dia para F2, A4, A5, 4H5 e FA3 (Figura 21 A, C, D, E, F). Já para B4 e B5, o tempo de cultivo de 14 dias não foi suficiente para o estabelecimento de fase estacionária (Figura 21 A). De modo geral, o crescimento das culturas apresentou tendência linear ($R^2 \geq 0,90$), indicando que todos os fótons disponíveis que chegam à superfície de cultivo são rapidamente absorvidos, mantendo a taxa de crescimento constante (LEE et al., 2013). Incrementos na agitação/fluxo de ar e/ou na intensidade luminosa podem vir a ser necessários para melhorar rendimentos de biomassa.

Embora relacionadas, a concentração de clorofila não reflete diretamente a concentração de biomassa entre as diferentes cepas, existindo uma ampla diferença espécie-específica. Por isso, esta variável fora acompanhada apenas para delinear o crescimento dos microrganismos, sendo a biomassa seca mais adequada para comparações (LEE et al., 2013; RAMARAJ; TSAI; CHEN, 2013). Os maiores rendimentos de biomassa foram obtidos nos cultivos de *Leptolyngbya* sp.5 B1 e *Leptolyngbya* sp.1 A10 (Tabela 06), apresentando diferença significativa dos demais, mas não entre si (Apêndice B, Tabela I-2), com valores próximos a $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Em seguida, tem-se o grupo de *Phormidesmis* sp. F2 e *Monilinema* sp.1 F1 com rendimento de cerca de $1,20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo F2 distinto e F1 similar às demais cepas com rendimento de biomassa superior a $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$: *Synechococcus* sp.2 4H5 e *Pseudophormidium* sp. B4. Estes valores podem ser considerados promissores considerando as condições de cultivo empregadas (meio generalista, sem controle de pH e baixa intensidade luminosa ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)). Em estudo com condições similares, Limrujiwat, Supan e Khetkron (2022) obtiveram rendimentos entre $0,12$ e $0,70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para espécies do gênero *Leptolyngbya* e até $0,20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para *Phormidesmis* sp. Já Schipper et al. (2020) obtiveram $1,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de rendimento máximo de biomassa a $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ em *Leptolyngbya* sp. QUCCM 56.

Tabela 06: Dados relativos ao acúmulo de biomassa e determinação do rendimento de biomassa das diferentes cepas.

Cepa	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Biomassa (g)*	Teor de umidade (%)	Rendimento de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)**
A1	2,00 ± 0,42	1,57 ± 0,17 ^a	94,45 ± 0,75	0,41 ± 0,04 ^a
A2	2,54 ± 0,24	1,65 ± 0,18 ^a	85,64 ± 4,42	0,43 ± 0,05 ^a
A3	0,78 ± 0,19	1,27 ± 0,11 ^a	89,26 ± 0,64	0,33 ± 0,03 ^a
A4	8,16 ± 0,53	2,68 ± 0,20 ^b	87,27 ± 4,72	0,70 ± 0,05 ^b
A5	4,72 ± 1,27	1,66 ± 0,35 ^a	84,56 ± 2,48	0,44 ± 0,09 ^a
A7	5,40 ± 0,57	1,48 ± 0,22 ^a	82,08 ± 5,29	0,39 ± 0,06 ^a
A10	5,14 ± 0,58	6,00 ± 0,35 ^c	93,29 ± 1,88	1,58 ± 0,09 ^c
B1	10,44 ± 0,21	6,22 ± 0,36 ^c	92,12 ± 2,47	1,63 ± 0,09 ^c
B2	5,32 ± 0,27	0,96 ± 0,11 ^a	89,42 ± 0,92	0,25 ± 0,03 ^a
B4	6,13 ± 2,06	3,88 ± 0,13 ^d	91,53 ± 2,29	1,02 ± 0,03 ^d
B5	4,73 ± 1,06	1,69 ± 0,16 ^a	87,66 ± 2,65	0,44 ± 0,04 ^a
F1	6,72 ± 0,20	4,44 ± 0,44 ^{de}	93,14 ± 1,19	1,17 ± 0,12 ^{de}
F2	7,05 ± 0,53	5,16 ± 0,31 ^e	91,64 ± 2,65	1,35 ± 0,08 ^e
F3	8,55 ± 0,66	3,59 ± 0,29 ^d	93,01 ± 0,97	0,94 ± 0,94 ^d
FA3	6,19 ± 0,98	3,33 ± 0,07 ^{bd}	95,10 ± 1,11	0,88 ± 0,02 ^{bd}
8A4	4,53 ± 1,09	2,66 ± 0,29 ^b	91,60 ± 3,11	0,70 ± 0,07 ^b
4H5	11,20 ± 0,24	3,98 ± 0,24 ^d	93,60 ± 1,56	1,04 ± 0,06 ^d

*Em massa úmida coletada por centrifugação em cultivo de 300 mL. **Em massa seca. Média ± desvio-padrão, seguidas das mesmas letras, nas colunas, não diferem entre si (ANOVA seguida de DHS de Tukey com $p < 0,05$). Testes estatísticos não aplicados na segunda e quarta colunas.

5.2.2 Extração e quantificação de ficobiliproteínas

A biomassa obtida ao final do cultivo foi lavada com água destilada esterilizada, congelada e, posteriormente, utilizada para a extração e quantificação de ficobiliproteínas. Em extrações iniciais algumas das cepas apresentaram absorvância muito superior ao limite de detecção apontado por Bennett e Bogorad (1973), entre 0,05 e 1,0. Desta forma, foram realizadas novas extrações ajustando-se a relação biomassa:tampão salino de 1:10 para 1:50. Os resultados para ficocianinas, aloficocianinas e ficoeritrinas estão dispostos na Tabela 07, além do total de ficobiliproteínas dado pelo somatório das demais. A representação gráfica dos dados tabelados pode ser consultada nos Apêndices, Figuras I-1 a I-4. Com exceção das cepas B1 e A10, a absorvância para ficoeritrina ($\lambda = 562 \text{ nm}$) foi menor que o limite de detecção da técnica empregada, indicando ausência ou baixa concentração deste pigmento.

Tabela 07: Concentração de ficobiliproteínas extraídas da biomassa das diferentes cepas no décimo quarto dia de cultivo, expressa em massa seca.

Cepa	PC	APC	PE	PBP
	mg·g ⁻¹			
A1	27,02 ± 3,49 ^a	6,69 ± 2,13 ^{abc}	-	33,71 ± 5,48 ^{abd}
A2	18,29 ± 4,19 ^{abf}	5,45 ± 1,25 ^{abc}	-	23,73 ± 5,30 ^{abd}
A3	16,83 ± 4,93 ^{abf}	16,10 ± 4,80 ^{abcd}	-	32,93 ± 9,50 ^{abc}
A4	12,77 ± 3,39 ^{abf}	3,44 ± 1,10 ^a	-	16,21 ± 4,41 ^a
A5	12,03 ± 1,68 ^{abf}	4,00 ± 0,67 ^a	-	16,03 ± 2,06 ^{ab}
A7	16,59 ± 1,78 ^a	5,73 ± 0,98 ^{ac}	-	22,32 ± 2,71 ^{ab}
A10	11,76 ± 2,49 ^{abf}	7,05 ± 1,94 ^{abc}	11,52 ± 2,60	30,33 ± 5,82 ^{abd}
B1	4,10 ± 0,43 ^{bf}	16,40 ± 3,97 ^{abcd}	48,88 ± 5,00	69,38 ± 9,37 ^{abcde}
B2	12,50 ± 1,96 ^{af}	4,33 ± 1,95 ^{ab}	-	16,83 ± 3,48 ^a
B4	52,34 ± 1,97 ^c	12,26 ± 0,20 ^{ab}	-	64,60 ± 1,77 ^{bcd}
B5	20,98 ± 0,48 ^{ad}	5,25 ± 0,36 ^a	-	26,22 ± 0,28 ^{ab}
F1	46,20 ± 4,96 ^{acde}	9,61 ± 0,81 ^{abcd}	-	55,81 ± 5,77 ^{abcd}
F2	66,71 ± 2,78 ^e	17,93 ± 2,05 ^{bd}	-	84,64 ± 4,7 ^{bce}
F3	11,48 ± 0,93 ^{af}	6,26 ± 0,90 ^{ac}	-	17,74 ± 0,47 ^{ab}
FA3	14,94 ± 2,55 ^{abf}	2,35 ± 0,23 ^a	-	17,29 ± 2,61 ^{ab}
4H5	12,11 ± 0,76 ^{af}	1,13 ± 0,09 ^a	-	13,23 ± 0,75 ^{ab}
8A4	7,56 ± 1,63 ^{bf}	2,35 ± 0,61 ^a	-	9,91 ± 2,23 ^a

PC – Ficocianina, APC – Aloficocianina, PE – Ficoeritrina, PBP – Ficobiliproteínas totais. “-” abaixo do limite de detecção. Média ± desvio-padrão seguidos das mesmas letras, nas colunas PC, APC e PBP, não diferem entre si (ANOVA de Welch seguida de Games-Howel com $p < 0,05$). Dados para PE apresentam diferença significativa em teste T de Student para grupos independentes com α de 0,05.

Dentre as 17 cepas, três apresentaram teor de ficocianina maiores que 45 mg·g⁻¹, com alguma diferença significativa das demais. As cepas B4 (*Pseudophormidium* sp. B4) e F2 (*Phormidesmis* sp. F2) apresentaram os maiores valores médios de concentração deste pigmento, com 52,34 ± 1,97 e 67,71 ± 2,78 mg·g⁻¹, respectivamente. Apesar de serem distintos entre si, compartilham semelhança com a cepa F1 (*Monilinema* sp.1 F1), com 46,20 ± 4,96 mg·g⁻¹. Esta cepa apresentou elevado coeficiente de variação (10,75%), o que expande o intervalo de comparação do método estatístico empregado.

Embora os dados tenham apresentado distribuição normal e ausência de dados discrepantes (*outliers*), a homogeneidade das variâncias não foi detectada (Levene) – Apêndices, Tabela I-1. A heterocedasticidade dos dados tende a produzir valores de “p” menores do que deveriam ser, causando aumento nos erros do Tipo I (rejeitar a hipótese nula quando deveria ser aceita), induzindo a concluir equivocadamente que um grupo é significativamente distinto (CELIK, 2022). Desta forma, a análise estatística por ANOVA de uma via de Fisher foi substituída pela Anova de Welch (Apêndices, Tabela I-3), um método desenvolvido para dados com estas características. Devido à heterocedasticidade dos dados,

empregou-se o teste *post-hoc* de Games-Howell, representados pelas diferentes letras nas colunas.

Na literatura, a concentração de ficocianina tem grande variação entre as espécies (Tabela 08), havendo sensibilidade às condições de cultivo e ao método de extração. Gantar et al. (2012) realizaram a prospecção de cianobactérias potenciais produtoras de ficocianina num banco com 125 cepas isoladas de água doce na Flórida, Estados Unidos. Os conteúdos de ficocianina mais elevados estiveram entre 10 e 56 mg·g⁻¹ em relação à massa seca, com excepcionalidade para uma espécie de *Limnothrix*, com cerca de 180 mg·g⁻¹. Considerando a similaridade das condições de cultivo e de extração, as cepas neste estudo (açudes no sul da Bahia) apresentaram teores comparáveis aos melhores resultados obtidos por Gantar et al. (2012).

Tabela 08: Comparação do conteúdo de ficocianina desta pesquisa com trabalhos relacionados relatados na literatura.

Microrganismo	Conteúdo de PC (%)*	Referência
<i>Leptolyngbya</i> sp. QUCCCM 56 ¹	7,21 ± 0,35	Schipper et al. (2020)
<i>Oscillatoria okeni</i> TISTR8549	3,99 ± 0,09	Chittapun et al. (2020)
<i>Nostoc commune</i> TUBT05	2,97 ± 0,5	
<i>Spirulina</i> sp. ²	5,85 ± 0,5	Ores, Amarante e Kalil (2016)
<i>Arthrospira platensis</i> ³	7,37 ± 0,10	Tavanandi et al. (2018)
<i>Limnothrix</i> sp. 37-2-1	18 ± 1,90	Gantar et al. (2012)
<i>Spirulina subsalsa</i> FACHB-351	7,52 ± 0,73	Jiang, Yu e Pei (2021)
<i>Arthrospira platensis</i> WH879	12,3 ± 0,30	Xie et al. (2015)
<i>Pseudophormidium</i> sp. B4	5,23 ± 0,20	
<i>Monilinema</i> sp.1 F1	4,62 ± 0,50	Este estudo
<i>Phormidesmis</i> sp. F2	6,67 ± 0,28	

*Média ± desvio-padrão disponível nas referências ou convertidos a partir delas. ¹Em condições otimizadas de cultivo. Extração pode ser otimizada chegando a aumentar em 2 vezes a eficiência.

²Otimizada chega a 101 ± 0,2 mg·g⁻¹. ³Pode ser otimizada a 119,00 ± 0,2 mg·g⁻¹.

Os trabalhos apresentados na Tabela 08 incluem diferentes espécies nas quais se empregou a extração por congelamento e descongelamento em tampões salinos aquosos. Neste processo, o congelamento dos fluidos intracelulares promove a formação de poros na parede celular, o que permite a difusão dos pigmentos para o tampão de extração (DEVI et al., 2020; ROCHA et al., 2021). A eficiência do método varia entre diferentes espécies, sendo utilizado como referência ou ponto de partida em estudos prospectivos ou de otimização (SAFAEI et al., 2019; SINTRA et al., 2021). Embora o conteúdo de *Phormidesmis* sp. F2 não esteja muito acima dos resultados encontrados em estudos relacionados, esta cianobactéria tem concentração compatível com espécie empregada na produção comercial. Além disso, apresentou rendimento

de biomassa de até $1,35 \pm 0,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em condições ainda não otimizadas (Tabela 06). Desta forma, *Phormidesmis* sp. apresenta potencial para produção de ficocianina a ser explorado.

A produção comercial de ficocianina é obtida principalmente a partir da *Arthrospira platensis*, comercializada como spirulina, e depende mais da disponibilidade de biomassa do que da qualidade ou produtividade de pigmento (JIANG; YU; PEI, 2021). Diversos estudos são frequentemente realizados buscando otimizar a produção de biomassa e de pigmentos em *A. platensis*, além da extração. Em comparativo realizado por Xie et al. (2015) e Jiang, Yu e Pei (2021), cepas de *A. platensis*, em condições de cultivo e extração otimizadas, apresentam conteúdo de ficocianina entre 3,29 e 12,6% e rendimento de biomassa de 0,6 a $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, com máximas de 16% e $7,29 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Geralmente, os maiores teores de pigmento não acompanham altos rendimentos de biomassa. Embora sejam muito promissores os resultados das pesquisas, pouco disto chega ao mercado. Além disso, os cultivos de *A. platensis* sofrem severas limitações de produtividade e qualidade de pigmentos devido a contaminações fúngicas e bacterianas, fazendo com que ainda seja válida a busca por novas espécies produtoras deste pigmento e ou novos sistemas de produção.

O espectro de absorção do extrato aquoso contendo a ficocianina, obtida a partir de *Phormidesmis* sp. F2 (Figura 22 B), apresenta disposição típica, com pico de absorção em 617 nm. Usualmente, o pico de absorção deste pigmento se dá em 620 nm, como em espécies de *Lyngbya*, *Spirulina*, *Phormidium*, *Limnothrix*, *Thermosynechococcus*, *Arthrospira* entre outras (PATEL et al., 2005; GANTAR et al., 2012; LEU et al., 2013; TAVANANDI et al., 2018). Embora com pico de absorção menor, a diferença de absorbância entre os comprimentos de onda de 615 a 620 nm ocorrem na terceira casa decimal ($\pm 0,007$). A baixa variação nesta faixa é considerada desprezível na literatura, sendo as Equações 2 e 3 (empregadas para cálculo de concentração) comumente realizadas com a absorbância a 620 nm ao invés de 615 nm, como determinado por Bennett e Bogorad (1973). Já para as cepas B4 e F1 (Figura 22 C e A), ficam nítidos os “ombros” na região de 652 nm, onde se detecta a aloficocianina. Embora os picos de absorbância sejam relativos a um pigmento, a determinação da concentração não é necessariamente proporcional à absorbância, mas sim à função resultante das Equações 2 a 4 que considera alguns fatores e absorbâncias em diferentes comprimentos de onda. Desta forma, mesmo que haja compostos absorventes num determinado comprimento de onda, não significa que sejam ficobiliproteínas, como no caso da ficoeritrina (562 nm) que não foi detectada pelo método descrito. Neste caso, a absorbância é residual de outros compostos ou equivale a teor não quantificável pela técnica empregada.

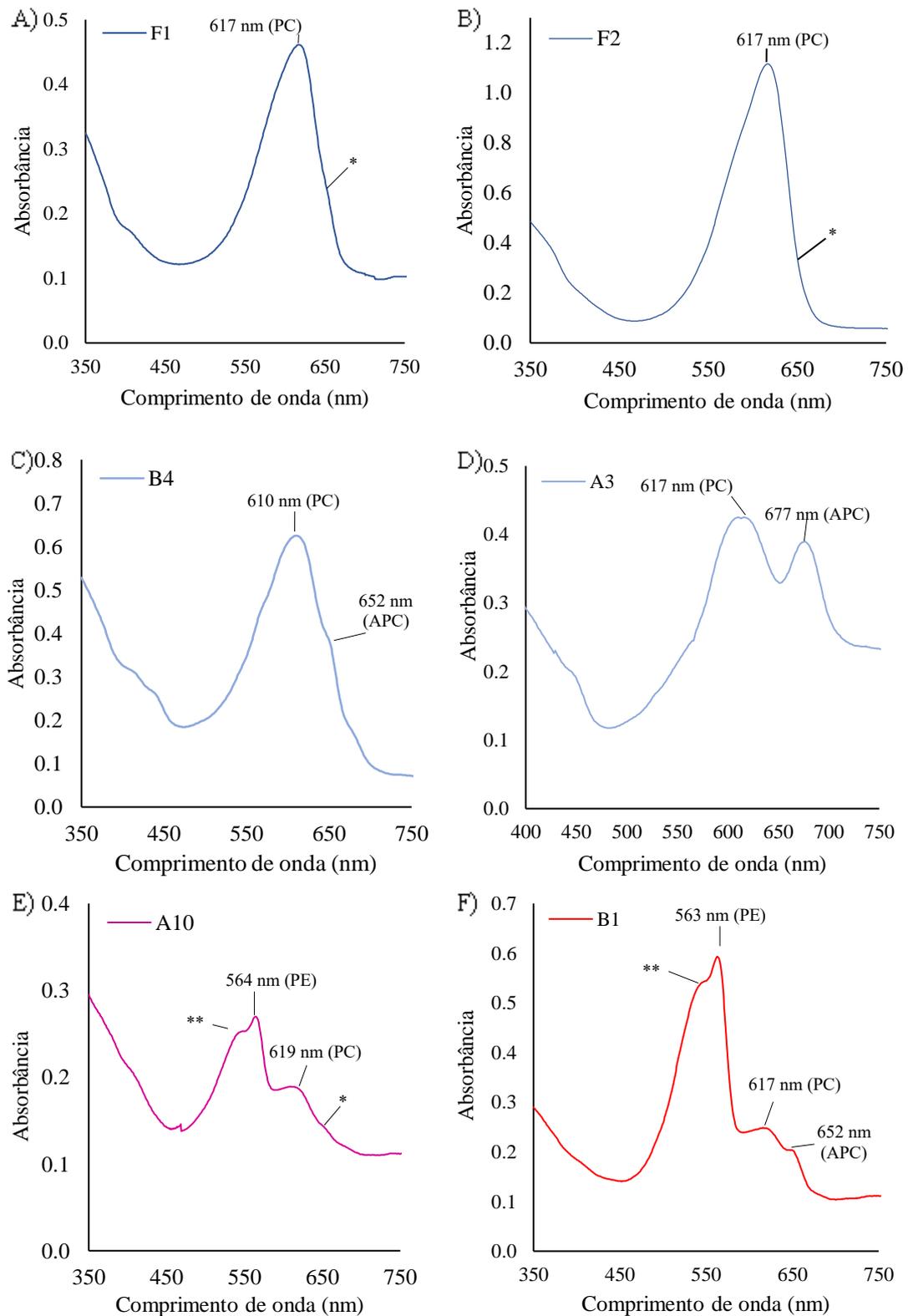


Figura 22: Espectro de absorção de extrato aquoso (tampão fosfato salino) das cepas de maior concentração de ficobiliproteínas. A) *Monilinema* sp.1 F1; B) *Phormidesmis* sp. F2; C) *Pseudophormidium* sp. B4; D) *Leptolyngbya* sp.2 A3; E) *Leptolyngbya* sp.1 A10; F) *Leptolyngbya* sp.5 B1, considerando a absorbância do tampão. Valores médios de extração em triplicata, desvios não mostrados. *Ombro sem pico aparente relativo à aloficocianina; **Ombro em pico definido relativo à variação da ficoeritrina.

Na Figura 22 (E, F) são apresentados os espectros de absorbância dos extratos que, apesar das diferenças nos níveis de absorbância, têm curvas similares. Os “ombros” próximos aos picos de absorção para ficoeritrina (≈ 562 nm) são similares aos encontrados em duas espécies do gênero *Leptolyngbya* e em uma cepa marinha de *L. tenuis* (Gomont) Anagnostidis & Komárek A27DM [anteriormente como *Phormidium tenue*] mantida em cultivo prolongado de 72 dias (PARMAR et al., 2011; LIMRUJIWAT; SUPAN; KHETKORN, 2022). Este fato pode estar relacionado a diferenças na composição de cromóforos das ficoeritrinas (Tabela 02) ou à ausência da subunidade β (SUN et al., 2009; KANNAUJIYA et al., 2018). Soni et al. (2010) caracterizaram em *L. tenuis* A27DM uma ficoeritrina funcional contendo apenas a subunidade α da ficobiliproteína de espectro de absorção similar aos notados em B1 e A10.

Em relação à produção de aloficocianina, as cepas A3, B1, B4 e F2 apresentaram concentrações mais elevadas em seus extratos, com valores médios entre 12,26 e 17,93 mg·g⁻¹ (Tabela 07, Figura I-2). Embora tenham alta concentração de aloficocianina, as cepas A3 e B1, pouco se distinguem das demais, enquanto B4 e F2 são semelhantes apenas aos de concentração elevada. Além disso, a concentração de aloficocianina se manteve menor que ficoeritrina para *Leptolyngbya* sp.1 A10 e *Leptolyngbya* sp.5 B1, e menor que as concentrações e picos de ficocianina para as demais, com exceção de A3. Enquanto *Leptolyngbya* sp.2 A3 apresentou relação de ficocianina ou ficoeritrina/aloficocianina de cerca de 1 (quantidades idênticas), nas demais cepas esse valor variou entre 2 e 10. Esta relação fica evidente na Figura 22-D, além de indicar o máximo de absorção num comprimento de onda mais distante (677 nm) em relação ao pico máximo usual de 652 nm (BENNETT; BOGORAD, 1973; WINAYU et al., 2021; LIMRUJIWAT; SUPAN; KHETKORN, 2022). Esta variação pode estar associada a demais compostos solúveis presentes no extrato bruto. Purificações adicionais para a caracterização dos pigmentos ainda se fazem necessárias.

No ficobilissomo, a aloficocianina forma o centro da estrutura a partir da qual se arranjam a ficocianina e a ficoeritrina (Figura 01), transferindo a energia absorvida pelos pigmentos para os centros de reação do fotossistema (SHEVELA; PISHCHALNIKOV; EICHACKER, 2013; CHANG et al., 2015). Devido a este arranjo, independente do pigmento das antenas (ficocianina e/ou ficoeritrina), a presença da aloficocianina nos espectros de absorção de extratos aquosos é esperada, variando de acordo com a eficiência da extração. Apesar de ter várias aplicações, a aloficocianina recebe menor atenção que a ficocianina devido à baixa eficiência da extração primária (apenas de 50 a 60% da aloficocianina é extraída), à menor concentração de aloficocianina frente à ficocianina e à baixa pureza dos extratos

primários associada à complexidade para separação da ficocianina devido às mesmas propriedades bioquímicas (TAVANANDI; VANJARI; RAGHAVARAO, 2019).

Basheva et al. (2018) avaliou o perfil de ficobiliproteínas produzidas por 18 cepas de cianobactérias isoladas em diversos ambientes da Europa. Os autores indicaram que a cepa *Leptolyngbya boryana* (Gomont) Anagnostidis & Komárek CCALA 084 tem potencial para produção comercial do pigmento com 2,630 mg·g⁻¹ em relação à biomassa úmida. Além disso, ao estudar algumas cepas de mesma espécie em mesmas condições de crescimento, os autores indicam que a concentração de ficobiliproteínas é estritamente individual e provavelmente relacionada às propriedades de cada uma das cepas. Por outro lado, neste estudo (Tabela 07, Figura I-2), diferentes espécies do gênero *Leptolyngbya* não apresentaram diferenças significativas em seus teores de aloficocianina.

A Tabela 09 traz alguns trabalhos com foco na concentração de aloficocianina obtida a partir de extração via congelamento e descongelamento em tampão aquoso. O conteúdo inicial de cepas citadas como potenciais produtoras de aloficocianina gira em torno de 2,5% e o estudo das condições ideais de extração podem dobrar o rendimento. De qualquer modo, os resultados obtidos a partir das cepas deste trabalho estão muito abaixo daqueles com potencial para exploração biotecnológica.

Tabela 09: Comparação do conteúdo de aloficocianina desta pesquisa com trabalhos em que a extração se dá por tampão aquoso via congelamento/descongelamento.

Microrganismo	Conteúdo de APC*	Referência
¹ <i>Arthrospira platensis</i>	3,29%	Tavanandi, Vanjari e Raghavarao (2019)
² <i>Arthrospira maxima</i>	2,86 ± 0,10%	Devi et al. (2020)
³ <i>Leptolyngbya boryana</i> CCALA 084	0,26% ^U	Basheva et al. (2018)
³ <i>Microcoleus autumnalis</i> PACC 5522	0,16% ^U	
³ <i>Anabaena</i> sp. PACC 8632	0,04% ^U	
<i>Spirulina</i> sp.	2,23 ± 0,10%	Ores, Amarante e Kalil (2016)
⁴ <i>Thermosynechococcus</i> sp. CL-1	12,07 ± 0,30%	Winayu et al. (2021)
<i>Pseudophormidium</i> sp. B4	0,10 ± 0,00% ^U 1,23 ± 0,02%	
<i>Leptolyngbya</i> sp.2 A3	0,17 ± 0,05 % ^U 1,61 ± 0,48%	Este estudo
<i>Leptolyngbya</i> sp.5 B1	0,13 ± 0,03% ^U 1,64 ± 0,40%	
<i>Phormidesmis</i> sp. F2	0,12 ± 0,01% ^U 1,79 ± 0,20%	

*Dados em %^U são relativos à biomassa úmida. ¹Otimizada em extração serial a 5,5%; ²Otimizada por extração assistida por ultrassom a 5,6%, a nomenclatura atual da espécie é *Limnospira maxima* (Setchell & N.L.Gardner) Nowicka-Krawczyk, Mühlsteinová & Hauer; ³Estimados a partir dos dados apresentados no estudo. ⁴Extração assistida por ultrassom otimizada.

Diferentemente das demais cepas, o cultivo de *Leptolyngbya* sp.5 B1 e *Leptolyngbya* sp.1 A10 apresentou coloração variando de castanho avermelhado a acastanhada. Isto se relacionou com os perfis de ficobiliproteínas, sendo as únicas a apresentarem níveis detectáveis de ficoeritrina nos extratos aquosos (Tabela 07, Figura I-3). Na cepa A10 a concentração foi de $11,52 \pm 2,60 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, enquanto em B1 chegou a $48,88 \pm 5,00 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, apresentando diferença significativa em si. Embora a concentração de ficoeritrina de A10 resulte em extração de coloração intensa, os níveis ainda são distantes de B1, que em comparação com a literatura se mostra promissora para exploração biotecnológica. Em estudo prospectivo de cianobactérias produtoras de pigmentos em diversas cavernas na Tailândia, Limrujiwat, Supan e Khetkron (2022) identificaram seis cepas, dentre as 86 isoladas, com perfil interessante para produção de ficobiliproteínas, em especial para ficoeritrinas. Os conteúdos de ficoeritrina de quatro destas cepas estão listados na Tabela 10, a partir da qual é possível perceber que a cepa *Leptolyngbya* sp.5 B1 apresentou conteúdo equivalente ao de *Leptolyngbya* sp. SCOM01 e *Leptolyngbya* sp. LKK14.

Tabela 10: Comparação do conteúdo de ficoeritrina desta pesquisa com trabalhos em que a extração ocorreu em tampão aquoso via congelamento/descongelamento.

Microrganismo	Conteúdo de PC (%)*	Referência
¹ <i>Porphyridium purpureum</i>	3,32	Kathiresan et al. (2007)
² <i>Anabaena circinalis</i>	3,15	Ojit et al. (2015)
³ <i>Pseudanabaena</i> sp.	2,92 ⁴	Mishra et al. (2012)
³ <i>Nostoc commune</i>	$1,40 \pm 0,01$	Vega et al. (2020)
³ <i>Lyngbya</i> sp.	$0,10 \pm 0,01$	
³ <i>Lyngbya</i> sp. CCNM 2053	$2,40 \pm 0,13$	Ghosh e Mishra (2020)
<i>Leptolyngbya</i> sp. SCOM01	5,37	Limrujiwat, Supan e Khetkron (2022)
<i>Leptolyngbya</i> sp. LKK14	4,39	
<i>Scytolyngbya</i> sp. LKK05	9,78	
<i>Nostoc</i> sp. SW02	16,90	
<i>Leptolyngbya</i> sp.5 B1	$4,89 \pm 0,50$	Este estudo
<i>Leptolyngbya</i> sp.1 A10	$1,15 \pm 2,60$	

*Média ou Média \pm desvio-padrão relativo à massa seca, disponível nas referências ou convertidos a partir delas. ¹Trata-se de uma microalga eucariota utilizada para produção comercial de ficoeritrina. ²Atualmente *Dolichospermum circinale* (Rabenhorst ex Bornet & Flahault) Wacklin, Hoffmann & Komárek. ³De origem marinha. ⁴Conteúdo de ficoeritrina quando em luz verde chega a 4,17%.

As condições de cultivo e métodos de extração empregados neste trabalho e por Limrujiwat, Supan e Khetkron (2022) são muito similares, diferindo no tempo de cultivo e na forma de agitação empregada: 14 dias de aeração frente a 21 dias e cultivo em mesa agitadora, respectivamente. Em relação aos demais dados listados na Tabela 10, *Leptolyngbya* sp.5 B1

apresentou maior conteúdo de pigmentos, com exceção de *Scytolyngbya* sp. LKK05 e *Nostoc* sp. SW02. Estas espécies apresentaram as maiores concentrações do pigmento para cianobactérias em cultivos não otimizados registradas até o momento.

5.2.3 Extração e quantificação de carotenoides e escitoneminas

Os pigmentos apolares foram extraídos a partir da biomassa remanescente da extração de ficobiliproteínas. Nas cianobactérias, estes pigmentos são considerados pertencentes ao metabolismo secundário e produzidos em pequenas concentrações, especialmente em condições adversas. Pensando nisso, foi introduzida a radiação ultravioleta UV-A e UV-B para estimular a síntese destes pigmentos. Entretanto, escitoneminas foram detectadas apenas em A4, A7, A10 e B1 em concentrações inferiores a $0,1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (Dados não mostrados). De acordo com Gao et al. (2021), as escitoneminas estão presente na bacia de mais de 300 cianobactérias, principalmente dos gêneros *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix*, *Lyngbya*, *Rivularia* e *Chlorogloeopsis*. Os teores podem variar de 0,08 a 7,98% em relação à massa seca. A escitonemina é um pigmento apolar encontrado na bacia de cianobactérias e está relacionado à proteção contra a radiação ultravioleta A, déficit de nutrientes, altas temperaturas ou estresse foto-oxidativo.

Apesar das cepas terem sido expostas à radiação UV-A, o tempo de exposição pode ter sido insuficiente para estimular a síntese desta classe de pigmentos, considerando que as demais condições de cultivo foram brandas. Em estudo sobre a influência da iluminação ultravioleta no conteúdo de pigmentos de *Leptolyngbya* cf. *fragilis*, Kokabi et al. (2019) identificaram aumento significativo na produção de escitoneminas, podendo dobrar a concentração. Por outro lado, o resultado obtido nesse estudo pode também decorrer da incapacidade das cepas em produzi-las ou à baixa resolução da técnica de detecção e quantificação. Em praticamente todas as cepas (Figuras 07 a 19), a presença de bacia foi pouco expressiva e, naquelas em que fora evidente, se apresentou muito delgada (característica de seus respectivos gêneros), contrastando com aquelas espécies que são ricas neste pigmento, as quais apresentam bacia com coloração acastanhada intensa (RASTOGI; INCHAROENSAKDI, 2014). Além disso, a detecção por espectrofotometria considera apenas a absorção em 384 nm num extrato bruto contendo outros pigmentos e compostos que podem causar interferências além das consideradas na Equação 05. Tais possibilidades poderiam ser exploradas em estudos focados nos mecanismos de síntese destes pigmentos e estratégias de proteção contra condições adversas, o que está fora do escopo desta pesquisa que visa a obtenção de cepas com alta produção de pigmentos.

Carotenoides totais foram detectados em todas as cepas, mas apenas B4, F1, F2, 8A4, FA3, A4 e A7 apresentaram teores maiores que $0,1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, chegando até $0,387 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ em 8A4 (Figura 23). O teste de Kruskal-Wallis indicou que há diferença significativa entre os grupos ($H_{(8)}=23,66$; $p=0,003$) e o teste *post-hoc* de Dunn mostrou que há diferença apenas entre 8A4 e B4, A4 e A7, indicando não haver uma cepa distintamente produtora de carotenoides. Por outro lado, os teores de carotenoides são condizentes com aqueles de outras cianobactérias. Müller, Rodriguez e Lourenço (2003) obtiveram até $0,481 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de carotenoides totais em *Synechocystis pevalekii*, isolada em Ubatuba, São Paulo. Hotos (2021) obteve, a partir do cultivo de *Phormidium* sp. em diferentes níveis de salinidade, rendimentos de carotenoides totais de $0,094$ a $0,166 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Em estudo prospectivo, visando a produção de compostos de interesse anti-idade, Morone et al. (2020) obtiveram concentrações de carotenoides totais de $0,215 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para *Phormidium* sp. LEGE 05292; $0,383 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para *Synechocystis salina* LEGE 06099; $0,371 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para *Nodosilinea nodulosa* LEGE 06102; $0,188 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para *Cyanobium* sp. LEGE 06113; $0,162 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para *Synechocystis salina* LEGE 06155; $0,154 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para *Cyanobium* sp. LEGE 07175; e $0,118 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para *Tychonema* sp. LEGE 07196.

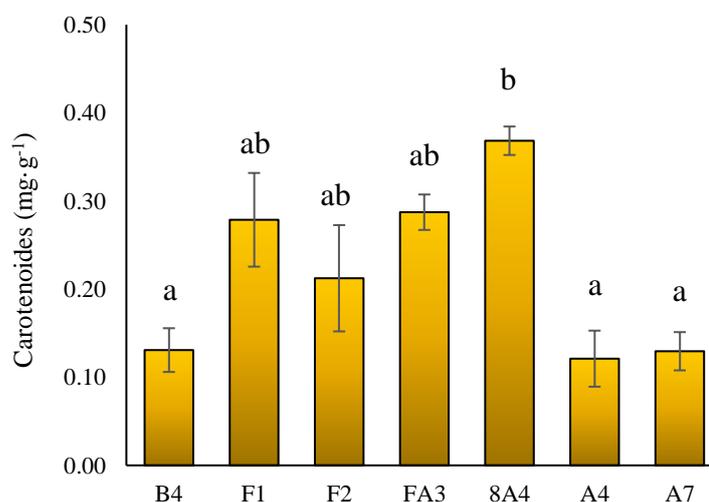


Figura 23: Concentração de carotenoides nas diferentes cepas em relação à massa seca. As letras minúsculas (a, b) representam dados estatisticamente distintos a partir de Kruskal-Wallis e teste *post-hoc* de Dunn com $p<0,05$.

Em condições otimizadas, a produção de carotenoides pode ser elevada em até dezenas de vezes. Utilizando um projeto fatorial Box-Behnken para temperatura (20 a 30°C), pH (6,0 a 9,0) e salinidade (10 a $30 \text{ g}_{\text{NaCl}}\cdot\text{L}^{-1}$), Pagels et al. (2020) obtiveram produtividade de $2,04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de carotenoides totais a partir de *Cyanobium* sp. LEGE 06113 (mesma cepa estudada por Morone et al. (2020)), o que corresponde a um acúmulo total de aproximadamente $16,10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ao final de 18 dias de cultivo. Isso se deve também ao elevado rendimento de biomassa desta cepa, até cerca de $2,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nas condições otimizadas. Embora as produtividades máximas

alcançáveis em otimizações sejam intrínsecas a cada cepa, as cepas da Figura 23 podem ser exploradas na perspectiva de biorrefinaria, especialmente *Phormidesmis* sp. F2 que apresenta alta concentração de ficocianina ($6,77 \pm 0,28 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e bom rendimento de biomassa ($1,35 \pm 0,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

5.2.4 Seleção das cepas isoladas

Algumas cepas neste estudo apresentaram teores de pigmentos compatíveis aos indicados na literatura como passíveis de exploração biotecnológica. Além disso, quando relacionado ao rendimento de biomassa, se mostram ainda mais interessantes (Tabela 11).

Tabela 11: Melhores cepas deste estudo em comparação com a literatura.

Condições de cultivo	Microrganismos	PE (%)	PC (%)	Y(g·L ⁻¹)	Ref.
Meio BG-11, aeração de 281,5 mL·min ⁻¹ , 24 ± 2°C, 14 dias com 15 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹	<i>Leptolyngbya</i> sp.5 B1	4,89 ± 0,50	0,41 ± 0,04	1,63 ± 0,09	1
	<i>Leptolyngbya</i> sp.1 A10*	1,15 ± 0,26	1,18 ± 0,28	1,58 ± 0,09	
	<i>Pseudophormidium</i> sp. B4	ND	5,23 ± 0,20	1,02 ± 0,03	
	<i>Monilinema</i> sp. F1	ND	4,62 ± 0,50	1,17 ± 0,12	
Meio BG-11, em shaker a 120 rpm, 27 ± 2°C, 21 dias com 10 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ constante	<i>Phormidesmis</i> sp. F2	ND	6,77 ± 0,28	1,35 ± 0,08	2
	<i>Leptolyngbya</i> sp. SCOM01	5,66 ± 0,16	3,29 ± 0,24	0,62 ± 0,02	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. LKK14	4,36 ± 0,16	2,77 ± 0,08	0,17 ± 0,05	
	<i>Scytolyngbya</i> sp. LKK05	9,20 ± 0,28	4,16 ± 0,16	0,71 ± 0,06	
Meio BBM, injeção de CO ₂ a 2,5 % v/v, 18 dias com 70 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ constante	<i>Nostoc</i> sp. SW02	16,90 ± 0,24	9,94 ± 0,26	0,55 ± 0,10	3
Meio BBM, 25°C, 8 dias com 180 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ constante	<i>Chroococidiopsis</i> sp.	4,74	8,33	3,00	
Meio SW-MSGR, 25 ± 2°C, 10 dias com 60 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ constante	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	-	10,4	0,58	4
	<i>Spirulina subsalsa</i> FACHB-351	-	5,30 ± 0,22	1,56 ± 0,11	
Meio Zarrouk, 30 °C, injeção de ar/CO ₂ (97/3v/v) a 5 L·min ⁻¹ , 11 dias luz vermelha + 14 dias luz azul, a 90 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹	<i>Arthrospira platensis</i> FACHB-350	-	5,09 ± 0,29	0,40 ± 0,05	5
	<i>Arthrospira platensis</i> M2	-	12,5	4,80	
Meio ASN-III, 25 ± 2 °C, 21 dias a 220 lux, 12:12h claro:escuro	<i>Arthrospira platensis</i> FACHB-350	-	12,5	4,80	6
Meio ASN-III, 25 ± 2 °C, 21 dias a 220 lux, 12:12h claro:escuro	<i>Pseudanabaena</i> sp.	3,00	0,26	0,82	
Meio BG-11, 28 ± 2°C, 15 dias com 40 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ , 14:10 h claro:escuro	<i>Dolichospermum circinale</i>	3,59	13,5	?	8
Meio BG-11, 45°C, aerado com 2,76 L·min ⁻¹ , 12 dias a 1200 lumens, 16:8 h claro:escuro	<i>Arthrospira platensis</i> M2	-	12,5	4,80	
Meio BG-11, 45°C, aerado com 2,76 L·min ⁻¹ , 12 dias a 1200 lumens, 16:8 h claro:escuro	<i>Synechococcus</i> sp. PCC6715	-	2,39 ± 0,10	3,96 ± 0,34	9
Meio SOT, lagoa aberta de 30 m ³ , 31 dias com coleta a	<i>Arthrospira platensis</i>	-	12 ± 2	3,31	

cada 2 dias, iluminação natural.

PC – ficocianina; APC – aloficocianina; PE – Ficoeritrina; Y – produtividade de biomassa; Ref. – referência bibliográfica de origem; ND – Não detectado; ? – Não informado e sem dados que permitam o cálculo; “-” – Não informado se não detectado ou não quantificado. *Cultivado em meio ASM-1. Referências: ¹ Este estudo; ²Limrujiwat, Supan e Khetkron (2022); ³Montero-Lobato et al. (2020); ⁴Khatoon et al. (2018); ⁵Jiang, Yu e Pei (2021); ⁶Chini Zittelli et al. (2022); ⁷Mishra et al. (2012b); ⁸Ojit et al. (2015); ⁹Klepacz-Smólka et al. (2020); ¹⁰Yu et al. (2019).

As cepas F1, F2, A10, B4 e B1 apresentaram uma boa combinação de teor de pigmentos e rendimento de biomassa, havendo destaque para F2 e B1 que podem ultrapassar os $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de rendimento de pigmentos. Comparado à literatura, em alguns casos, as cepas podem apresentar menor teor de pigmentos, mas têm maior rendimento de biomassa em período mais curto de cultivo em condições brandas de iluminação, fazendo com que tenham produtividades similares ou melhores. No caso do trabalho de Limrujiwat, Supan e Khetkron (2022), que tem os maiores teores de ficoeritrina, quando se avalia a produtividade volumétrica, a cepa *Nostoc* sp. SW02 que teve cerca de 16% de ficoeritrina, rendeu $4,43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, enquanto *Leptolyngbya* sp.5 B1 gerou $5,69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Comparado a cultivos otimizados, a cepa B1 se mostra inferior, como no caso de Montero-Lobato et al. (2020) que teve produtividade volumétrica aproximada de $7,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ para ficoeritrina. Entretanto, B1 ainda pode ter seu cultivo e extrações otimizadas, especialmente no que tange a fontes de nitrogênio e estudo da intensidade luminosa ideal.

Para ficocianina, a cepa *Phormidesmis* sp. F2 produziu maior quantidade de pigmento ao final do cultivo (cerca de $91 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), com uma produtividade volumétrica de $6,53 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Estes valores se aproximam daqueles obtidos por Khatoon et al. (2018), Klepacz-Smólka et al. (2020) e Jiang, Yu e Pei (2021), mas estão distantes de resultados como os de Montero-Lobato et al. (2020) ou Chini Zittelli et al. (2022), com produtividades volumétricas de 13,88 e $54,54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. Nestes estudos, os cultivos foram mantidos em condições ideais e, no último caso, cultivada em batelada alimentada. Em estudo do cultivo de *Arthrospira platensis* em lagoa aberta de 30 m^3 , Yu et al. (2019) mantiveram a produtividade de biomassa em $0,109 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ao longo de 31 dias, por meio de cortes a cada dois dias com recuperação da biomassa por filtração e reuso do meio adicionado de novos nutrientes. Os autores alcançaram ao todo $3,31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e uma produtividade volumétrica de ficocianina de $12,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Embora de menor produtividade de pigmento, a cepa *Phormidesmis* sp. F2 deve ainda ser estudada visando melhorias de produtividade e rendimentos, além de avaliação do custo energético. Cepas de *A. platensis* foram estudadas e testadas de inúmeras formas para se chegar aos bons

níveis de produtividade e viabilidade comercial para produção de pigmento, um caminho que deverá ser percorrido por qualquer outra cepa que apresente algum diferencial.

5.3 Cultivo em fotobiorreator

5.3.1 Caracterização hidrodinâmica do fotobiorreator

O *gas hold-up* (ε_G) pode ser entendido como o volume relativo de gás que está presente na dispersão gás-líquido em um biorreator. Essa retenção de gás determina a transferência de oxigênio e gás carbônico do ar injetado para a fase líquida (HOFMEESTER, 1988). Como uma variável adimensional, é importante para estudos de escalonamento de produção e parâmetro para estudos das transferências de massa mantidas no fotobiorreator. Como pode ser observado na Figura 24A, o ε_G no fotobiorreator variou proporcionalmente ao aumento da velocidade superficial (U_G) do ar injetado – algo comum para pequenas faixas de variação da U_G , como a avaliada neste estudo. O aumento da U_G pode ocasionar mudança no fluxo de bolhas de “borbulhante” para “golfadas”, mudando completamente a hidrodinâmica do fotobiorreator (HYUN; SIK; HYUN, 2012). Velocidades superficiais mais brandas e conseqüentemente ε_G menores, como as empregadas neste estudo, são essenciais para manter a integridade das células durante o cultivo, uma vez que a ruptura de bolhas pode ocasionar danos às células – observado em estudos com microalgas eucariotas e células animais, não se aplicando necessariamente em cianobactérias filamentosas (LÓPEZ-ROSALES et al., 2019). Além disso, a taxa de cisalhamento na coluna d’água é proporcional à velocidade superficial do gás, incidindo em maior estresse à cultura. Em fluxo borbulhante, Yoon, Shin e Park (2008) identificaram a velocidade superficial entre 0,0026 e 0,005 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ como ideal para o aumento da produtividade de biomassa de *Trichormus variabilis* (Kützing ex Bornet & Flahault) Komárek & Anagnostidis [anteriormente *Anabaena variabilis*], não havendo diferença significativa entre elas.

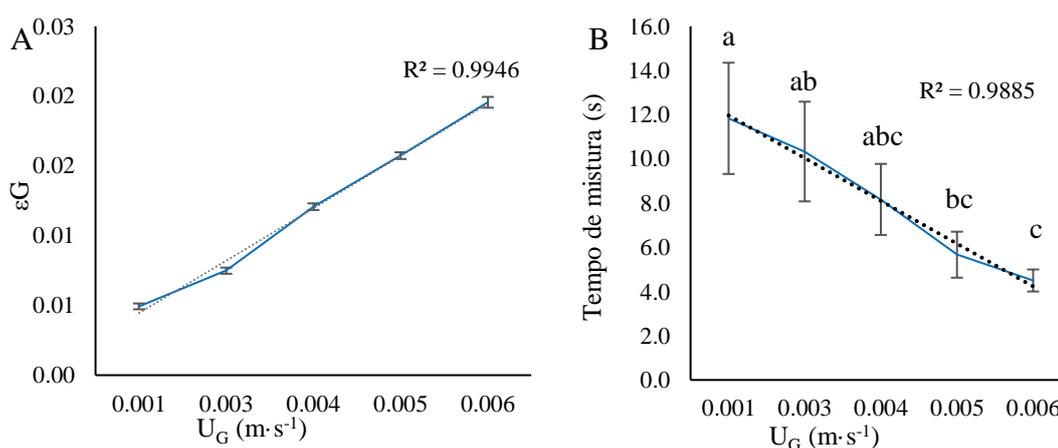


Figura 24: Hidrodinâmica do fotobiorreator. A – retenção do gás em função da velocidade superficial do gás; B – Tempo de mistura em função da velocidade superficial. Linhas de tendência e coeficiente

de correlação de Pearson (R^2) mostradas em ambos. Letras (a, b, c) sobre as colunas indicam grupos com diferença significativa via ANOVA seguida de DHS de Tukey com $p < 0,05$.

O tempo de mistura corresponde ao tempo necessário para que o meio atinja mais ou menos 5% do valor estabilizado de pH. Desta forma, considera-se que este é o tempo necessário para que se atinja a mistura total. Embora exista a redução do tempo de mistura com o aumento da velocidade superficial do gás, ela só ocorre de forma significativa em faixas maiores de variação da U_G (Figura 24B, Tabela I-2), o que afeta a correlação entre as variáveis. Em caracterização de fotobiorreator de 50 L, Araújo (2014) obteve tempos de mistura de 65 e 20 s para velocidades superficiais entre 0,004 e 0,010 $m \cdot s^{-1}$, respectivamente. A relação inversamente proporcional é similar, entretanto, o tempo de mistura é cerca de 8 vezes maior que aqueles observados nesta pesquisa. O posicionamento do eletrodo para medição do pH pode ter influenciado a obtenção de menor tempo de mistura, dado que, estando no topo do fotobiorreator, o eletrodo se insere na área de maior turbulência onde o pH pode ter se estabilizado antes da parte inferior da coluna, mesmo a solução ácida tendo sido injetada na área central do fotobiorreator.

5.3.2 Cultivo das cepas selecionadas em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas

Com base na discussão do tópico anterior, manteve-se a areação de 1,8 $L \cdot min^{-1}$ para os cultivos das cepas selecionadas, correspondente a uma velocidade superficial de 0,0038 $m \cdot s^{-1}$ e tempo de mistura de 8,2 s (Figura 24 B). O acompanhamento do crescimento via medição da biomassa diária e a produtividade de pigmento em intervalos de quatro dias para as cepas *Phormidesmis* sp. F2 e *Leptolyngbya* sp.5 B1 é apresentado na Figura 25 A e B, respectivamente. Estas cepas foram selecionadas por apresentarem maiores teores de pigmento e rendimento de biomassa. Diferentemente do comportamento em cultivo em erlenmeyer, ambas as cepas apresentaram fase *lag* bem definida em fotobiorreator. O crescimento de F2 teve fase exponencial bem definida apenas entre os dias 2 e 4, em que a taxa de crescimento específico máxima (μ_{max}) foi de 0,57 d^{-1} . Entre os dias 4 e 13 o crescimento ocorreu de forma linear e se estabilizou, com pequena queda até o décimo sexto dia (fase estacionária, início de declínio) – gráficos de velocidade específica de crescimento e a linearização da curva encontram-se no Apêndice B, Figura I-5.

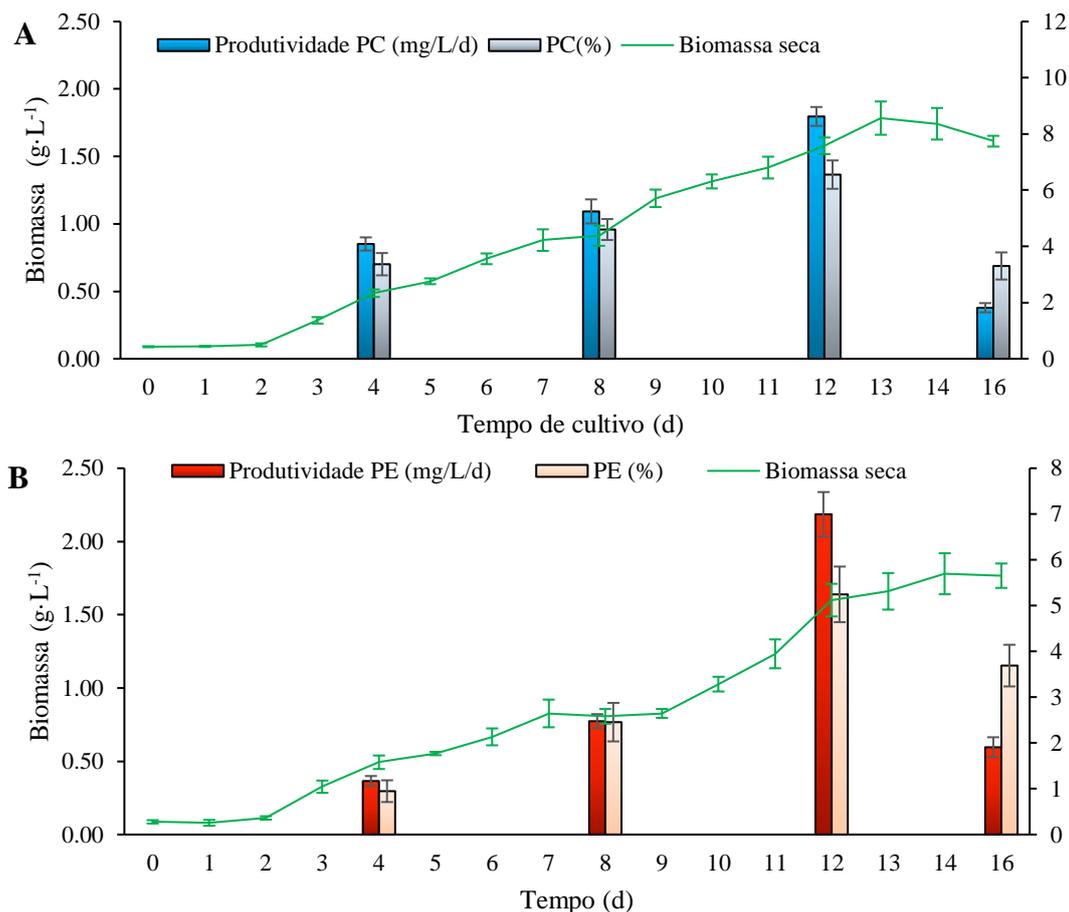


Figura 25: Curvas de crescimento, produtividades volumétricas e teores de pigmentos em intervalos de quatro dias para as cepas *Phormidesmis* sp. F2 (A) e *Leptolyngbya* sp.5 B1 (B) no fotobiorreator de coluna de bolhas. PC – Ficocianina; PE – Ficoeritrina.

A produtividade de pigmento de F2 atingiu seu máximo no décimo segundo dia ($8,62 \pm 0,34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), quando representou 6,54% da biomassa seca total, porcentagem similar ao obtido no décimo quarto dia de cultivo em erlenmeyer (Figura 25 A). Por mais que a produtividade de pigmento seja afetada pelo tempo de cultivo, a variação ao longo do tempo é influenciada pelo teor de pigmentos que aumenta junto com a concentração de biomassa. Entretanto, ao final do cultivo a concentração do pigmento cai drasticamente, apesar da concentração de biomassa ter redução suave. Este comportamento pode estar relacionado a dois fatores: disponibilidade de luz e exaustão de compostos nitrogenados. Nas fases iniciais do cultivo a baixa concentração de biomassa torna a agitação mais eficiente, mantendo a exposição das células elevada, contribuindo para o crescimento, mas a “abundância” de luz faz com que não sejam necessárias tantas ficobiliproteínas para seu aproveitamento. Com o aumento da concentração celular, a disponibilidade de luz diminui, sendo necessário mais pigmentos para atender às demandas energéticas (HYUN; SIK; HYUN, 2012; WASE; YEN; WRIGHT, 2013; WILTBANK; KEHOE, 2019; LIMRUJIWAT; SUPAN; KHETKORN, 2022). Em situações de

privação de nitrogênio, algumas cianobactérias que são incapazes de fixar nitrogênio molecular, degradam as ficobiliproteínas e polipeptídios ligantes que formam os ficobilissomos (LIOTENBERG et al., 1996; KHATTAR et al., 2015; XIE et al., 2015). Para confirmação desta hipótese, os níveis de nitrogênio no meio devem ser monitorados em outros experimentos.

Em *Leptolyngbya* sp.5 B1 os teores de pigmentos tiveram comportamento similar aos da cepa anterior (Figura 25 B). Entretanto, a concentração de ficoeritrina não caiu da mesma forma que a de ficocianina em F2, assim como a concentração de biomassa não teve redução. Além disso, a cepa B1 apresenta uma curva de crescimento diferenciada. A fase exponencial é mais longa, entre os dias 2 e 5, com taxa de crescimento específico máxima (μ_{\max}) de $0,49 \text{ d}^{-1}$. O comportamento linear começa a se desenvolver, mas entre os dias 7 e 9 a biomassa se mantém estável como numa fase estacionária. Era de se esperar que a fase estacionária se mantivesse, mas novamente assume comportamento linear – gráficos de velocidade específica de crescimento e a linearização da curva encontram-se no Apêndice B, Figura I-6. Um comportamento similar fora observado no cultivo em erlenmeyer (Figura 21 E), onde ocorre o crescimento, seguido da fase tipo estacionária e novamente o crescimento até uma nova estabilização. Mais repetições devem ser executadas em fotobiorreator para verificar se este resultado se trata de um comportamento típico ou se poderia estar relacionado a erros de medição. Acompanhar por mais tempo o crescimento até a percepção de declínio também pode auxiliar a compreender o comportamento do crescimento desta cepa.

Em relação à literatura, o cultivo de cianobactérias em fotobiorreatores para produção de ficobiliproteínas não é tão diverso, estando mais concentrada em otimizações de condições de cultivo e protocolos de extração. O trabalho de Nwoba et al. (2020) obteve produtividade de ficocianina de $16,30 \pm 1,31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ em fotobiorreator de coluna de bolhas sob iluminação natural, controle de temperatura e meio otimizado para *A. platensis*. Já Chaiklahan et al. (2022) obtiveram produtividade volumétrica de $123,66 \pm 8,39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ em *A. platensis* ao ajustar a concentração do inóculo para densidade óptica para 0,6 e intensidade luminosa para $2300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ num fotobiorreator tubular com aeração. Em condições de iluminação mais próximas àquelas aqui empregadas, Xie et al. (2015) obtiveram produtividade máxima de cerca de $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ em intensidade luminosa de $75 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em um meio otimizado para *A. platensis*, consistindo em valor ainda distante dos $8,62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ obtido por F2, contudo, vale ressaltar que esta cepa de *A. platensis* atingiu concentrações de biomassa de até $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

A ficoeritrina é obtida comercialmente a partir de microalgas eucarióticas como *Porphyridium purpureum* ou outras espécies do mesmo gênero (LI et al., 2019a). Velea, Ilie e Filipescu (2011) obtiveram produtividade volumétrica de $30,42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ em estudo da

otimização de cultivo em fotobiorreator de 3 L ao final de 16 dias de cultivo. Em outro estudo de otimização, Li et al. (2019) atingiram produtividade máxima de ficoeritrina de $19,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ao suplementar o meio ASW com $17,6 \text{ mM}$ de nitrato de potássio no cultivo de *Porphyridium purpureum* SCS-02 em fotobiorreator de 1 L. Já Guihéneuf e Stengel (2015) obtiveram produtividade volumétrica máxima de $3,88 \pm 0,45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ em meio suplementado com nitrato de sódio. Produtividades volumétricas similares são indicadas em revisão realizada por Li et al. (2019a). As ficoeritrinas de cianobactérias apresentam diferenças estruturais, assim como propriedades funcionais e estabilidade diferenciadas daquelas produzidas pelas microalgas eucarióticas, sendo normalmente denominadas C-ficoeritrinas. Neste estudo, a produtividade volumétrica máxima foi de $6,99 \pm 0,49 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Figura 25) sendo maior que a usual relatada para *Porphyridium purpureum*.

5.4 Influência da intensidade luminosa e cor de luz sobre a produção de ficobiliproteínas pelas cepas selecionadas

O uso de iluminação de cores e intensidades luminosas diferenciadas no cultivo das cepas selecionadas promoveu variações significativas na concentração dos pigmentos alvo (Tabela 12 e 13, Figura I-7). Por outro lado, não houve variação nas propriedades espectroscópicas dos extratos obtidos nos diferentes tratamentos, apresentando picos nas mesmas regiões, embora com diferentes amplitudes (Figuras I-8 e I-9). No experimento executado com a cepa *Leptolyngbya* sp.5 B1, apenas a cor de luz afetou os teores de ficocianina, sendo que a luz vermelha promoveu um aumento significativo em relação às demais. Para aloficocianina, não houve efeito de qualquer fator. Já para a ficoeritrina, o pigmento de maior interesse nesta cepa, tanto os fatores (cor de luz e intensidade luminosa) quanto a interação destes apresentou efeito significativo sobre a variável resposta. A luz vermelha inibiu a síntese de ficoeritrina a ponto de não ser detectada pelo método de quantificação empregado. O uso da luz verde elevou significativamente a produção de ficoeritrina, porém, assim como quando utilizada a luz branca, o aumento da intensidade luminosa reduziu o teor de pigmento. A maior concentração do pigmento de interesse para esta cepa ($87,70 \pm 3,16 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida utilizando menor intensidade luminosa ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) de luz verde. Em relação ao rendimento de biomassa, ambos os fatores afetaram significativamente a resposta. O maior rendimento foi obtido a partir da combinação de luz branca e $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ - aumento ou redução na intensidade afetaram negativamente o acúmulo de biomassa. Além disso, a luz vermelha reduziu o acúmulo de biomassa. Este comportamento provavelmente se explica pela composição dos ficobilissomos nesta condição. Embora haja aumento da produção de

ficocianina, para aumentar a captação de energia sob a luz vermelha, este não supre a necessidade energética para atingir os mesmos valores de biomassa obtidos nas luzes branca e verde (nesta, exceto a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Assim, a condição mais interessante para obtenção de ficoeritrina se dá naquela em que há tanto maior rendimento de biomassa quanto acúmulo de pigmento, o que é obtido a partir da combinação de luz verde com $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, uma vez que nesta condição, obtém-se a maior produtividade volumétrica do pigmento.

Tabela 12: Respostas às diferentes combinações de cor de luz e intensidade luminosa para a cepa *Leptolyngbya* sp.5 B1 com interesse à produção de ficoeritrina.

Trat.	Biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	APC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	PE ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	X($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
BR25	$1,37 \pm 0,09^a$	$28,89 \pm 2,45^a$	$28,23 \pm 2,11$	$49,43 \pm 5,18^a$	$4,85 \pm 0,83^a$
BR50	$1,66 \pm 0,13^b$	$26,55 \pm 0,88^a$	$27,29 \pm 1,18$	$41,05 \pm 3,85^{ab}$	$4,86 \pm 0,83^a$
BR100	$1,40 \pm 0,13^{ac}$	$20,70 \pm 1,05^a$	$22,36 \pm 2,37$	$19,37 \pm 2,66^b$	$1,93 \pm 0,44^b$
VD25	$1,33 \pm 0,03^a$	$17,54 \pm 2,97^a$	$17,61 \pm 2,46$	$87,70 \pm 3,16^c$	$8,30 \pm 0,48^c$
VD50	$1,33 \pm 0,11^a$	$16,65 \pm 0,47^a$	$15,15 \pm 0,58$	$44,19 \pm 0,45^a$	$4,21 \pm 0,38^a$
VD100	$0,97 \pm 0,08^c$	$21,19 \pm 3,26^a$	$20,85 \pm 3,31$	$42,61 \pm 6,27^a$	$2,95 \pm 0,67^b$
VM25	$1,00 \pm 0,02^c$	$53,93 \pm 6,62^b$	$23,83 \pm 2,17$	ND	-
VM50	$1,02 \pm 0,11^c$	$55,27 \pm 3,00^b$	$26,94 \pm 2,15$	ND	-
VM100	$0,91 \pm 0,05^c$	$57,01 \pm 6,79^b$	$28,63 \pm 4,21$	ND	-

PC – Ficocianina; APC – Aloficocianina; PE – Ficoeritrina; X – Produtividade Volumétrica; ND – Não detectável. Os tratamentos são representados pela sigla da cor (BR: Branca; VD: Verde; VM: Vermelho) seguida da intensidade luminosa (25, 50 ou $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Dados representados como média \pm desvio-padrão seguidos por letras para distinção de análise estatística. Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos a partir de ANOVA de duas vias. Cada coluna indica uma variável resposta, sendo elas avaliadas separadamente. Em negrito o tratamento que resultou em maior teor e produtividade de ficoeritrina.

Os resultados supracitados vão de encontro aos obtidos por Mishra et al. (2012) que cultivaram *Pseudanabaena* sp. em erlenmeyers cobertos com filmes de celofane verde, azul, amarelo e vermelho. Em relação ao controle (luz branca), o aumento obtido pelo autores foi de 63%, enquanto o obtido neste estudo foi de 77,42%. Por outro lado, no experimento de Mishra et al. (2012) o filtro vermelho afetou menos intensamente a concentração de ficoeritrina que o uso da luz vermelha neste estudo. Khan et al. (2019) obtiveram resposta similar utilizando *Pseudanabaena catenata* USMAC16 e *P. amphigranulata* USMAC18, com maiores teores de ficocianina na luz vermelha e ficoeritrina sob a luz verde. Em relação à resposta ao aumento da intensidade luminosa, estudos utilizando algas vermelhas também obtiveram produção mais elevada em menores intensidades luminosas (CHALOUB et al., 2015; YEH et al., 2022). Isto ocorre devido às estratégias de aclimação em função da intensidade luminosa, quanto menos luz disponível, maior a necessidade de captadores da energia luminosa.

A variação no perfil de ficobiliproteínas em função da cor da luz incidente ocorre devido ao mecanismo de Aclimação Cromática (CA – termo substituí “adaptação cromática complementar” cunhado no início do século passado), que permite que as células se adaptem para regular a fotossíntese de acordo com a qualidade e quantidade de luz do ambiente. São conhecidos pelo menos sete processos de aclimação à luz verde e vermelha e, naquelas cepas oriundas de água doce que apresentam tanto ficocianina quanto ficoeritrina, pode apresentar três respostas distintas: (i) nenhuma alteração no teor de pigmentos; (ii) maior concentração de ficoeritrina na luz verde em comparação com a vermelha, sem alteração dos níveis de ficocianina; e (iii) níveis elevados de ficoeritrina na luz verde e baixos na luz vermelha, enquanto para ficocianina ocorre o inverso. O comportamento apresentado pela cepa B1 (ausência de ficoeritrina e alto teor de ficocianina quando cultivada em luz vermelha) é compatível com a resposta iii regulada por um mecanismo denominado CA3 (HIROSE et al., 2019; ARIYANTI; IKEBUKURO; SODE, 2021).

No organismo modelo *Microchaete diplosiphon* UTEX 481, o mecanismo CA3 é desencadeado pela fosforilação de um fotorreceptor RcaE, ativada pela luz vermelha, que culmina na fosforilação de RcaC, um regulador da subfamília OmpR/PhoB. Este, por sua vez, controla diretamente a repressão do operon *cpeC* e a ativação do operon *cpc2*. Enquanto o operon *cpeC* contém genes codificadores de proteínas ligantes de ficoeritrina e ativadores dos genes que codificam as subunidades α e β da ficoeritrina (*cpeBA*) e as oxidoredutases de síntese de ficoeritrobilina (*pebAB*), o operon *cpc2* contém os genes que codificam a síntese de subunidades e cromóforo da ficocianina. Por outro lado, sob a luz verde, RcaC tem atividade de fosfatase, o que culmina na redução da ativação do operon *cpc2*. Embora a resposta a diferentes cores de luz seja similar à que ocorre na cepa modelo, a confirmação do mecanismo requer estudos aprofundados de expressão gênica. Além disso, a aclimação cromática se dá de forma e intensidade diferentes entre as espécies de cianobactérias (HIROSE et al., 2019; SANFILIPPO et al., 2019).

Nos experimentos com a cepa *Phormidesmis* sp. F2, as diferenças significativas nos teores de pigmentos foram induzidas pela combinação de fatores (Tabela 13). As iluminações azul e vermelha associadas às intensidades luminosas mais elevadas promoveram maior acúmulo de ficocianina, enquanto as diferentes combinações não diferiram significativamente, de modo que para a luz branca, o aumento de intensidade luminosa na faixa testada, não afeta o teor deste pigmento. Por outro lado, apenas a combinação de luz azul e maior intensidade luminosa gera aumento significativo no teor de aloficocianina. Em relação ao rendimento de biomassa, os fatores influenciaram isoladamente. Os maiores valores nominais foram obtidos

na luz branca, na qual a diferença significativa se deu apenas entre 25 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ – mas não de ambos em relação à intensidade média. No cultivo com a luz azul, o rendimento de biomassa foi influenciado apenas pela maior intensidade luminosa. Já na luz vermelha, a intensidade luminosa teve efeito a partir de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, elevando a biomassa. Embora esta cor de luz promova um acúmulo de biomassa mediano, o teor de pigmento é o maior entre todos os tratamentos. Isto é refletido na elevada produtividade volumétrica do tratamento VM100, que foi de $13,38 \pm 0,77 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Entretanto, este valor não difere estatisticamente do tratamento BR50, com produtividade de $9,74 \pm 3,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Assim, qualquer um destes tratamentos (BR50 e VM100) podem ser empregados ao visar unicamente a obtenção de ficocianina.

Tabela 13: Respostas às diferentes combinações de cor de luz e intensidade luminosa para a cepa *Phormidesmis* sp. F2, com interesse à produção de ficocianina.

Trat.	Biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	APC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	X ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
BR25	$1,63 \pm 0,13^a$	$56,64 \pm 5,76^a$	$17,68 \pm 1,21^a$	$6,58 \pm 1,19^{ab}$
BR50	$2,05 \pm 0,21^{ab}$	$66,36 \pm 13,74^a$	$22,10 \pm 3,66^a$	$9,74 \pm 3,01^{ab}$
BR100	$2,25 \pm 0,10^b$	$31,77 \pm 5,42^a$	$13,53 \pm 0,65^a$	$5,10 \pm 1,09^{ab}$
AZ25	$0,65 \pm 0,05^c$	$41,33 \pm 2,60^a$	$16,74 \pm 3,08^a$	$1,92 \pm 0,28^c$
AZ50	$0,73 \pm 0,05^c$	$69,68 \pm 9,45^a$	$23,57 \pm 0,36^{ab}$	$3,64 \pm 0,75^{abc}$
AZ100	$1,02 \pm 0,01^d$	$104,92 \pm 6,25^b$	$44,10 \pm 2,39^c$	$7,67 \pm 0,55^{abd}$
VM25	$0,84 \pm 0,11^c$	$60,77 \pm 2,33^a$	$22,30 \pm 2,18^a$	$3,63 \pm 0,62^{abc}$
VM50	$1,29 \pm 0,10^{ade}$	$54,97 \pm 2,10^a$	$15,85 \pm 0,44^{ad}$	$5,06 \pm 0,57^{ab}$
VM100	$1,35 \pm 0,04^e$	$138,38 \pm 3,46^c$	$23,24 \pm 2,81^a$	$13,38 \pm 0,77^{be}$

PC – Ficocianina; APC – Aloficocianina; X – Produtividade Volumétrica. Os tratamentos são representados pela sigla da cor (BR: Branca; AZ: Azul; VM: Vermelho) seguida da intensidade luminosa (25, 50 ou 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Dados representados como média \pm desvio-padrão seguidos por letras para distinção de análise estatística. Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos a partir de ANOVA de duas vias. Cada coluna indica uma variável resposta, sendo elas avaliadas separadamente. Em negrito os tratamentos que resultaram em maior produtividade de ficocianina.

Em estudo realizado por Zittelli et al. (2022), no cultivo de *Arthrospira platensis* M2, a luz azul promoveu menor acúmulo de biomassa (menos que $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e maior teor de ficocianina (cerca de $132 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) comparado às luzes branca e laranja. Klepacz-Smólka et al. (2020) também obtiveram maior rendimento de ficocianina no cultivo de *Synechococcus* PCC 6715 sob luz azul, embora os teores obtidos sob a luz vermelha tenham sido mais altos que em luz branca. Já para Prates et al. (2018), ao utilizar *Spirulina* sp. LEB 18, o maior acúmulo de ficocianina ($126,39 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foi sob luz verde, mas com maior biomassa sob luz vermelha ($1,77 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Em outras pesquisas, as respostas a diferentes cores de luz dependeu da integração

de fatores como suplementação do meio, temperatura, fotoperíodo e, principalmente, de qual cepa está sendo empregada (LEE et al., 2017; HO et al., 2018; PRATES et al., 2018).

De todo modo, o aumento do teor de ficocianina no cultivo sob a luz azul em relação à luz branca obtido neste estudo (Tabela 13), possivelmente se explica por uma estratégia de compensação energética. Como a luz azul é eficientemente absorvida pela clorofila *a* e esta é mais abundante no fotossistema I (PSI) que no PSII (onde o ficobilissomo se ancora), ocorre um maior fluxo de elétrons a partir do PSI, afetando a linearidade deste fluxo. Para compensar este desequilíbrio, as células aumentam a síntese de ficocianina. Por isso, mesmo com elevado teor deste pigmento, o crescimento ainda é menor que nas demais luzes (ZITTELLI et al., 2022). Já os resultados quando cultivada sob luz vermelha podem estar associados aos mecanismos clássicos de aclimatação cromática, citados acima. Entretanto, aqueles mecanismos foram estudados apenas em cepas nas quais são detectadas tanto ficocianina quanto ficoeritrina, algo que não ocorre em nenhum tratamento.

Em relação à intensidade luminosa, a partir de um certo ponto (que depende de cada cepa), o aumento ou redução da intensidade não tem efeito significativo sobre a produção de ficocianina até que induza fotoinibição. Khazi et al. (2021) testaram sete intensidades luminosas de 40 a 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ no cultivo de *Euryhalinema* sp. e *Desertifilum* sp., sendo os maiores rendimentos de biomassa e de ficocianina ($1,21 \pm 0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $123,4 \pm 1,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, e $1,18 \pm 0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $103,4 \pm 1,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente) obtidos em 60 e 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente. Os autores não encontraram diferença significativa entre maiores intensidades luminosas. Além disso, assim como nos trabalhos de Montero-Lobato et al. (2020) e Chaiklahan et al. (2022), intensidades luminosas a partir de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz branca resultaram em menor concentração de pigmento em cepas de *Chroococidiopsis* sp. e *A. platensis* PB, respectivamente. Por outro lado, os dados deste estudo (Tabela 13) não seguem esta tendência quando utilizadas as luzes azul e vermelha. Maiores faixas de intensidade luminosa devem ser testadas para compreender o comportamento da cepa *Phormidesmis* sp. F2. Outros estudos de otimização encontram-se resumidos na [Tabela I-4](#) e podem ser comparados aos dados deste trabalho.

Como, quando comparado à literatura (Itens [5.2.4](#) e [5.3.2](#)), a produtividade volumétrica de ficoeritrina da cepa *Leptolyngbya* sp.5 B1 se apresentou mais promissora que de *Phormidesmis* sp. F2, as etapas de purificação e caracterização parcial de pigmentos foram feitas apenas para ficoeritrina de B1.

5.5 Purificação e caracterização parcial da ficoeritrina de *Leptolyngbya* sp.5 B1

O processo de purificação consistiu em duas etapas: a precipitação com sulfato de amônio e a cromatografia líquida (FPLC). Os dados relativos ao processo de purificação da ficoeritrina de *Leptolyngbya* sp.5 B1 estão dispostos na Tabela 14. Embora a primeira precipitação com sulfato de amônio tenha resultado na redução da concentração de pigmento, houve o aumento da pureza, o que significa que uma boa parte das proteínas menos polares precipitaram. Já a segunda precipitação, com 60% de saturação de sulfato de amônio, possibilitou a concentração concomitante com o aumento de pureza. A pureza, obtida a partir da relação da absorbância específica da ficoeritrina (562 nm) pela absorbância de proteínas totais a 280 nm, é indicador de potencial uso: valores maiores que 0,7 são considerados aceitáveis para fins alimentícios; maiores que 1,5, para fins cosméticos; maiores que 3,9 considerados reativos; e maiores que 4,0 são considerados grau analítico (LAUCERI; CHINI; TORZILLO, 2019). Os valores para primeira e segunda precipitação apresentados na Tabela 14 são compatíveis com o estudo que estabeleceu o método e confere aos extratos precipitados aplicabilidade tanto na área alimentícia quanto cosmética (MISHRA; SHRIVASTAV; MISHRA, 2011). Vale ressaltar que o extrato não pode apresentar cianotoxinas, algo ainda não avaliado para esta cepa. Variações no espectro de absorção após as precipitações podem ser vistas na Figura [I-10](#), nos apêndices.

Tabela 14: Determinações espectrofotométricas e de pureza do extrato de *Leptolyngbya* sp.5 B1.

	Extrato bruto	Precipitação 1	Precipitação 2	Díalise	⁴ FPLC
¹ Volume (mL)	40,00	40,00	9,00	9,00	9,00
DO ₂₈₀	0,252	0,181	0,228	0,128	0,028
DO ₅₆₂	0,222	0,186	0,624	0,427	0,108
DO ₆₁₅	0,053	0,047	0,129	0,094	0,008
DO ₆₅₂	0,035	0,039	0,102	0,063	0,005
PC (mg·mL ⁻¹)	0,037	0,028	0,081	0,064	0,008
APC (mg·mL ⁻¹)	0,026	0,031	0,079	0,046	0,004
PE (mg·mL ⁻¹)	0,063	0,051	0,201	0,129	0,060
Pureza (DO ₅₆₂ /DO ₂₈₀)	0,882	1,031	2,737	3,348	3,908
² Total (mg)	2,520	2,040	1,809	1,161	0,538
³ Rendimento (%)	100	81,00	71,79	46,07	21,35

¹Volume de amostra; ²Total do pigmento de interesse no volume de amostra: ficoeritrina. ³Em relação ao total do extrato bruto. ⁴Dados para a fração de maior concentração de ficoeritrina obtida a partir de 1,8 mL do extrato. DO – Densidade óptica / absorbância; PC – Ficocianina; APC – Aloficocianina; PE – Ficoeritrina; Precipitação 1 – ocasionada por 25% de saturação de (NH₄)₂SO₄; Precipitação 2 – ocasionada por saturação de 60% de (NH₄)₂SO₄; FPLC – Cromatografia líquida rápida de proteínas.

O material resultante da diálise foi submetido à cromatografia líquida em coluna de troca aniônica Mono Q (Cytivia, 5/50GL, com grupo carregado de $(-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$), previamente equilibrada com tampão de corrida. O cromatograma resultante (Figura 26 A) mostrou seis picos proteicos evidentes, dos quais os picos de 1 a 4 apresentaram coloração lavanda/roxa, o pico 5 apresentou coloração azul (Figura 26 B) e o pico 6 era incolor. Os picos dois e três apresentaram concentração de ficoeritrina de 0,020 a 0,036 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e pureza de 2,34 a 2,67, podendo ser agrupados e aplicados em alimentos ou cosméticos. Já a fração contendo o pico 4 apresentou coloração mais intensa (Figura 26 B, 4), refletindo a maior concentração de ficoeritrina (Tabela 12), contendo nela 0,108 mg (ou 0,060 mg por mililitro de amostra injetada) do pigmento numa pureza de 3,908 – o que permite que possa ser usada em aplicações biotecnológicas, mas com limitações. O espectro de absorção desta fração (Figura 27) apresentou pico em 562 nm, sem o ombro visto na [Figura 22E](#) ou [I-10 A](#), mas com resquícios de ficocianina e aloficocianina. Já na fluorescência, exibiu pico de emissão a 580 nm. Embora estes dados corroborem a presença da ficoeritrina, era esperado que a coloração das frações fosse vermelha.

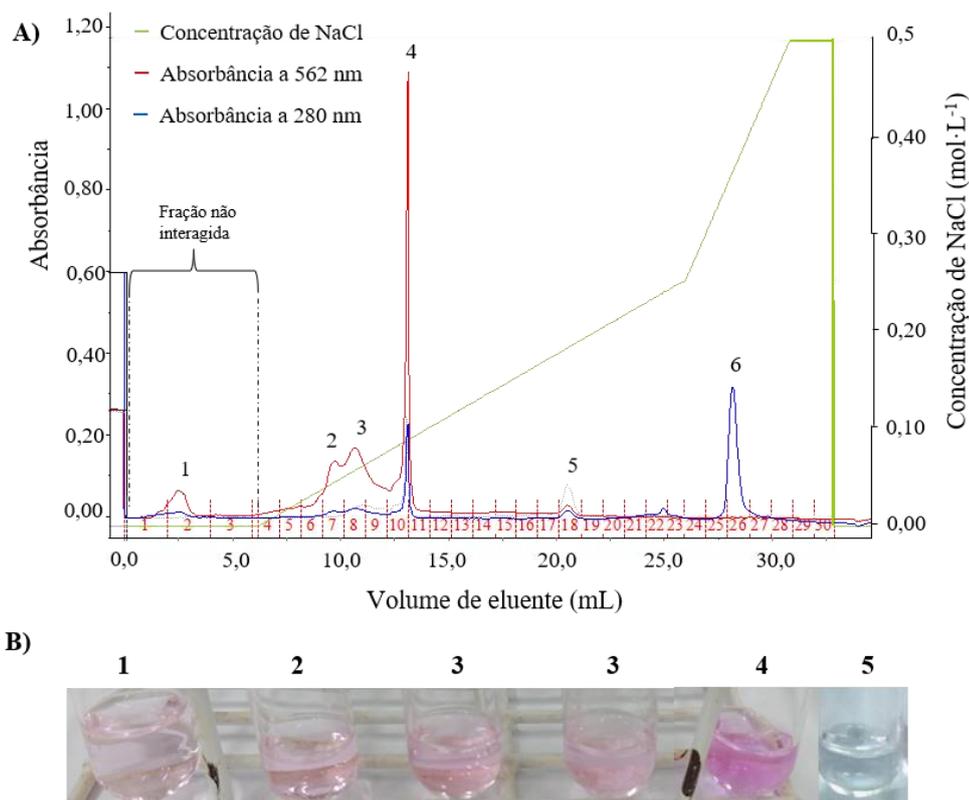


Figura 26: Cromatogramas da purificação do extrato dialisado de ficobiliproteínas de *Leptolyngbya* sp.5 B1. **A)** Cromatograma resultante de gradiente escalar. Pico 1 corresponde à fração não interagida, 2 a 4 à ficoeritrina, 5 a ficocianina/aloficocianina, e 6 às demais proteínas maiores/com maior carga. **B)** Tubos correspondentes aos picos do cromatograma. Devido a amplitude do pico 3, este foi coletado em dois tubos, por isto a repetição dos números.

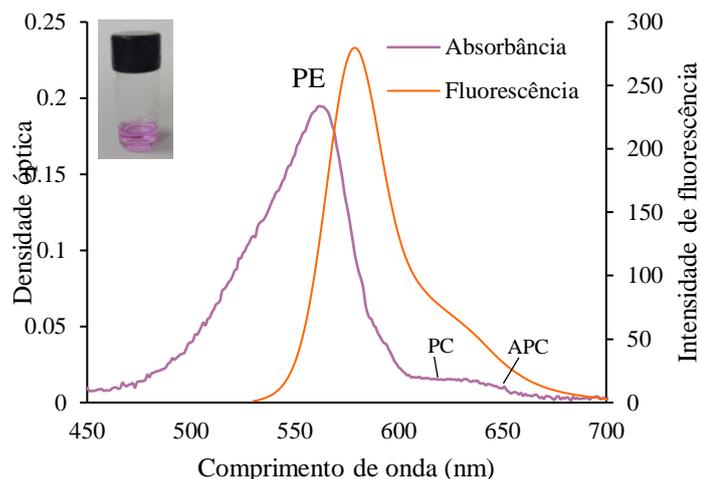


Figura 27: Espectro de absorção e fluorescência proveniente da fração contendo o pico 4 do cromatograma. PE – Pico relativo à ficoeritrina; PC – área relativa à ficocianina; APC – área relativa à aloficocianina.

Embora a presença, mesmo que residual das outras ficobiliproteínas, possa induzir a uma coloração roxa (mistura de azul com vermelho), já foram relatados extratos purificados de ficoeritrina com a mesma coloração da apresentada neste estudo. Este é o caso dos extratos das cepas de *Scytolyngbya* sp. LKK05, *Nostoc* sp. SW02 e *Leptolyngbya* sp. LKK14 que apresentaram espectros similares no estudo realizado por Limrujiwat, Supan e Khetkorn (2022). Isto pode estar associado à composição cromófora das subunidades da ficoeritrina. Como apresentado na Tabela 02, existem diferentes ficoeritrinas conhecidas que variam a sua composição de cromóforos (bilinas), sendo que um deles, a ficobiliviolina, é roxo. A confirmação disto requereria a purificação total da ficoeritrina, separação e purificação das bilinas e análise da composição química destas.

Na literatura, a purificação de ficoeritrinas, tanto de cianobactérias quanto de macroalgas, se dá pela sequência de cromatografias de permeação em gel e troca iônica e, em ambas, as frações de coloração vermelha de elevada pureza são misturadas. Esta combinação de processos resulta em soluções de ficoeritrina com purezas maiores que 5 (MISHRA; SHRIVASTAV; MISHRA, 2011; CHAUBEY et al., 2019). Por outro lado, em estudo que empregara a FPLC para purificação de ficoeritrina de *Porphyra* (macroalga), a maior pureza obtida foi de 3,18 (HUANG et al., 2021). Esta pureza menor pode ser evidenciada pela presença de outras bandas na eletroforese das frações (SDS-PAGE) cromatográficas (Figura 28). O peso molecular estimado foi de 16,5 kDa e 17,5 kDa para as subunidades α e β , respectivamente. Estes pesos moleculares das subunidades de ficoeritrina são próximos aos 15 e 17 kDa estimados por Nowruzzi, Fahimi e Lorenzi (2020) para cepa *Nostoc* sp. A5, e os 19 e 21 kDa para *Pseudanabaena persicina* [anteriormente *Phormidium persicinum*] no trabalho de Blas-

Valdivia et al. (2021). Outros trabalhos relatam subunidades de maior ou menor peso molecular e esta variação pode estar relacionada aos métodos de quantificação e à variabilidade na composição destas proteínas nas diferentes espécies.

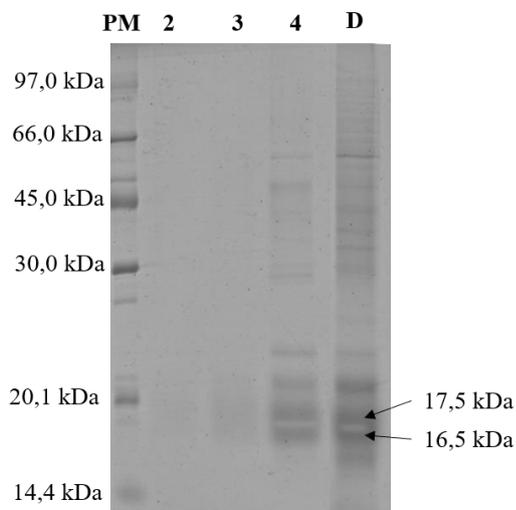


Figura 28: SDS-PAGE das frações cromatográficas de ficoeritrina de *Leptolyngbya* sp.5 B1 corado com azul de Coomassie. Nas colunas: PM – marcadores de peso molecular; 2 – fração 2 contendo o pico 2 do cromatograma; 3 – fração 3 contendo o pico 3 do cromatograma; 4 – fração 4 contendo o pico 4 do cromatograma; D – Extrato dialisado.

Como discutido na o item [5.2.3](#), o ombro no espectro de absorção do extrato bruto (na [Figura 22E](#) ou [I-10 A](#)) poderia estar relacionado a ausência de subunidade β da ficoeritrina. Como ao longo a da purificação este ombro desapareceu, a absorbância próxima a 540 nm está relacionada a compostos que foram precipitados com 25% de saturação do sulfato de amônio.

6. CONCLUSÃO

O acesso à biodiversidade nos três pontos de coleta resultou no isolamento de 17 cepas de cianobactérias, tendo duas delas elevado teor de ficobiliproteínas e sendo passíveis de melhoria de produtividade a partir da variação de condições de cultivo, como cor de luz e intensidade luminosa. Embora as técnicas de isolamento tenham sido limitadas para acessar a biodiversidade total de cianobactérias, especialmente aquelas heterocitadas, foi possível obter culturas unialgais. As particularidades morfológicas das cepas estudadas revelaram nove gêneros, sendo *Leptolyngbya* mais frequente. Por outro lado, não foi possível chegar ao nível de espécie para a maioria das cepas, revelando a importância da aplicação de métodos moleculares e ultraestruturais para o estudo desta biodiversidade. Algumas cepas apresentaram elevada concentração de ficobiliproteínas e boa produção de biomassa, mas com pouca representatividade quanto a carotenoides e escitoneminas (mesmo cultivadas sob luz UVA-B).

O rendimento de ficocianina *Phormidesmis* sp. F2 se mostrou compatível com os de cepas indicadas como potenciais produtoras do pigmento na literatura, enquanto o rendimento de ficoeritrina de *Leptolyngbya* sp.5 B1 se mostrou maior que na maioria dos relatos. Por ter boa produção de biomassa, a cepa B1 teve produtividade volumétrica maior que as cepas de *Porphyridium purpureum* (microalga eucariótica) usualmente cultivadas visando obtenção deste tipo de pigmento. Ambas as cepas mantiveram rendimentos de biomassa e pigmento em fotobiorreator de coluna de bolhas, mostrando que este pode ser uma alternativa para o cultivo em escala. Além disso, estas cepas apresentaram processo de aclimação cromática, o que permite melhorar a produtividade de pigmento variando a intensidade luminosa e a cor de luz. Em *Leptolyngbya* sp.5 B1, esta melhoria chegou a 70% com o uso de luz verde em menor intensidade luminosa. Além disso, ao realizar a purificação da ficoeritrina, esta apresentou coloração roxa ao invés de vermelha, como relatado na literatura, mesmo tendo espectro de absorção e fluorescência similar.

Esta pesquisa caracteriza-se como uma primeira referência de cianobactérias de água doce em Mata Atlântica na microrregião de Porto Seguro, Bahia, e demonstra o imenso potencial biotecnológico das cianobactérias locais a ser aproveitado. Desta forma, estabelece base para o desenvolvimento de novas pesquisas e, possivelmente, produtos ou ingredientes farmacêuticos, alimentícios ou cosméticos, num sistema de cultivo notavelmente mitigador de gás carbônico, atrelando ação climática ao uso sustentável da biodiversidade – o maior ativo do Brasil.

REFERÊNCIAS

- AL-AMIN, A. et al. Cyanobacteria mediated heavy metal removal: a review on mechanism, biosynthesis, and removal capability. **Environmental Technology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 44–57, 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21622515.2020.1869323>>.
- ALVARENGA, D. O. et al. *Kryptousia macronema* sp. and *Kryptousia microlepis* sp., nostocalean Cyanobacteria isolated from phyllospheres. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 3301–3309, 2017.
- ARASHIRO, L. T. et al. Natural pigments from microalgae grown in industrial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 303, n. January, p. 122894, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122894>>.
- ARAÚJO, M. S. De. **Caracterização e validação de novo fotobiorreator do tipo bubble column com agitação axial para produção de single-cell oil microalgal para biodiesel Mestrado Integrado em Engenharia Biológica**. 2014. Técnico Lisboa, 2014.
- ARIYANTI, D.; IKEBUKURO, K.; SODE, K. Artificial complementary chromatic acclimation gene expression system in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01621-3>>.
- BAHIA. **Projeto Biomas e Ecossistemas da Bahia**. Disponível em: <<http://www.meioambiente.ba.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=133#:~:text=A Bahia é o único,os biomas Costeiro e Marinho.>>. Acesso em: 6 mar. 2021.
- BASHEVA, D. et al. Content of phycoerythrin , phycocyanin , alophycocyanin and phycoerythrocyanin in some cyanobacterial strains : Applications. p. 861–866, 2018.
- BATISTA, A. M. M. et al. Diversity and dynamics of bacterial communities in the drinking water distribution network of a mid-sized city in Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 20, n. 12, p. 1733–1747, 2022.
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419–435, 1 ago. 1973. Disponível em: <<https://rupress.org/jcb/article/58/2/419/18179/COMPLEMENTARY-CHROMATIC-ADAPTATION-IN-A>>.
- BLAS-VALDIVIA, V. et al. C-phycoerythrin from *Phormidium persicinum* prevents acute kidney injury by attenuating oxidative and endoplasmic reticulum stress. **Marine Drugs**, v. 19, n. 11, 2021.
- BRANCO-VIEIRA, M. et al. Potential of *Phaeodactylum tricornutum* for biodiesel production

- under natural conditions in Chile. **Biosystems Engineering**, v. 113, p. 1–15, 2012.
- BRAUNE, S. et al. Phycocyanin from *Arthrospira platensis* as potential anti-cancer drug: review of in vitro and in vivo studies. **Life**, v. 11, n. 2, p. 1–14, 2021.
- BRILISAUER, K. et al. Cyanobacterial antimetabolite 7-deoxy-sedoheptulose blocks the shikimate pathway to inhibit the growth of prototrophic organisms. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08476-8>>.
- BROWNE, N. et al. Cyanobacteria as bio-factories for production of UV-screening compounds. **QA Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2014.
- CAIRES, T. A.; SANT'ANNA, C. L.; NUNES, J. M. de C. Biodiversity of benthic filamentous cyanobacteria in tropical marine environments of Bahia State, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 42, n. 1, p. 149–170, 21 mar. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40415-019-00517-2>>.
- CASAMATTA, D. A. et al. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v. 41, n. 2, p. 421–438, 2005.
- CASTRO, F. A.; MARTINEZ, V. R.; NIEVES, D. C. Robust natural ultraviolet filters from marine ecosystems for the formulation of environmental friendlier bio-sunscreens. **Science of the Total Environment**, v. 749, p. 141576, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141576>>.
- CELIK, N. Welch's ANOVA: Heteroskedastic skew-t error terms. **Communications in Statistics - Theory and Methods**, v. 51, n. 9, p. 3065–3076, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03610926.2020.1788084>>.
- CHAIKLAHAN, R. et al. Enhanced biomass and phycocyanin production of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by a cultivation management strategy: Light intensity and cell concentration. **Bioresource Technology**, v. 343, n. September 2021, p. 126077, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126077>>.
- CHALOUB, R. M. et al. Combined effects of irradiance, temperature and nitrate concentration on phycoerythrin content in the microalga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae). **Algal Research**, v. 8, p. 89–94, 2015.
- CHANG, L. et al. Structural organization of an intact phycobilisome and its association with photosystem II. **Cell Research**, v. 25, n. 6, p. 726–737, 2015.
- CHAUBEY, M. G. et al. Therapeutic potential of cyanobacterial pigment protein phycoerythrin: in silico and in vitro study of BACE1 interaction and in vivo A β reduction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 368–378, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.006>>.

CHITTAPUN, S. et al. C-phycoyanin extraction from two freshwater cyanobacteria by freeze thaw and pulsed electric field techniques to improve extraction efficiency and purity. **Algal Research**, v. 46, n. October 2019, p. 101789, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101789>>.

DASAN, Y. K. et al. Life cycle evaluation of microalgae biofuels production: Effect of cultivation system on energy, carbon emission and cost balance analysis. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 112–128, 2019.

DEVI, A. C. et al. An effective method for extraction of high purity phycocyanins (C-PC and A-PC) from dry biomass of *Arthrospira maxima*. **Journal of Applied Phycology**, p. 1141–1151, 2020.

DISSOOK, S.; ANEKTHANAKUL, K.; KITTICHOTIRAT, W. Screening of gold biomineralization mechanism in cyanobacteria. **Procedia Computer Science**, v. 23, n. November, p. 129–136, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procs.2013.10.017>>.

DUAN, Y.; SHI, F. Bioreactor design for algal growth as a sustainable energy source. In: **Reactor and Process Design in Sustainable Energy Technology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. p. 27–60.

GALETOVIC, A. et al. Use of phycobiliproteins from atacama cyanobacteria as food colorants in a dairy beverage prototype. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 1–13, 2020.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. de G. **Mata Atlântica : biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005.

GAMA, W. A. et al. A new species of *Lemmermanniella* (Cyanobacteria) from the Atlantic rainforest, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 35, n. 4, p. 319–324, 2012.

GANTAR, M. et al. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 1–2, p. 21–26, 2012.

GAO, X. et al. Improved production of echinenone and canthaxanthin in transgenic *Nostoc* sp. PCC 7120 overexpressing a heterologous crtO gene from *Nostoc flagelliforme*. **Microbiological Research**, v. 236, n. January, p. 126455, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126455>>.

GAO, X. et al. Biotechnological production of the sunscreen pigment scytonemin in Cyanobacteria: Progress and strategy. **Marine drugs**, v. 19, n. 3, p. 1–16, 2021.

GHOSH, T. et al. A naturally fluorescent protein C-phycoerythrin and graphene oxide bio-composite as a selective fluorescence ‘turn off/on’ probe for DNA quantification and

- characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, n. July, p. 644–653, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.201>>.
- GHOSH, T.; MISHRA, S. Studies on extraction and stability of c-phycoerythrin from a marine cyanobacterium. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, n. July, p. 1–12, 2020a.
- GHOSH, T.; MISHRA, S. A natural cyanobacterial protein C-phycoerythrin as an HS– selective optical probe in aqueous systems. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 239, p. 118469, 2020b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118469>>.
- GRIGGS, D. Sustainable development goals for people and planet. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 305–307, 2013.
- GROBBELAAR, J. U. Algal Nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. [s.l.] Blackwell, 2004. p. 97–115.
- GUIHÉNEUF, F.; STENGEL, D. B. Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. **Algal Research**, v. 10, p. 152–163, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.025>>.
- HAMED, I. The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 6, p. 1104–1123, 2016.
- HAUER, T.; KOMÁREK, J. **CyanoDB 2.0: On-line database of cyanobacterial genera**. Disponível em: <<http://www.cyanodb.cz/>>. Acesso em: 4 mar. 2021.
- HIROSE, Y. et al. Diverse chromatic acclimation processes regulating phycoerythrocyanin and rod-shaped phycobilisome in Cyanobacteria. **Molecular Plant**, v. 12, n. 5, p. 715–725, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.02.010>>.
- HO, S. H. et al. Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 669–675, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.165>>.
- HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) state in 2004. **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes**, v. 117, p. 95–115, 1 out. 2005.
- HOFMEESTER, J. J. M. Gas hold-up measurements in bioreactors. **Trends in Biotechnology**, v. 6, n. January, p. 19–22, 1988.
- HOICZYK, E.; HANSEL, A. Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1191–1199, 2000.
- HOTOS, G. N. Culture growth of the cyanobacterium *Phormidium* sp. in various salinity and

light regimes and their influence on its phycocyanin and other pigments content. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 9, n. 8, 2021.

HSIEH, S. Y. et al. Combined *Lycium barbarum* polysaccharides and C-phycocyanin increase gastric Bifidobacterium relative abundance and protect against gastric ulcer caused by aspirin in rats. **Nutrition and Metabolism**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2021.

HUANG, C. H. et al. Enzyme-assisted method for phycobiliproteins extraction from porphyra and evaluation of their bioactivity. **Processes**, v. 9, n. 3, 2021.

HULATT, C. J.; THOMAS, D. N. Productivity , carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5775–5787, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.025>>.

HYUN, J.; SIK, S.; HYUN, T. The cultivation of *Anabaena variabilis* in a bubble column operating under bubbly and slug flows. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 430–436, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.061>>.

JACINAVICIUS, F. R. et al. Manual para cultivo de cianobactérias. **Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo Instituto de Botânica**, v. 1, p. 32, 2013.

JIANG, L.; YU, S.; PEI, H. Seawater-cultured *Spirulina subsalsa* as a more promising host for phycocyanin production than *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 60, n. November, p. 102545, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102545>>.

KANNAUJIYA, V. K. et al. Phycobiliproteins and their commercial significance. In: **Cyanobacteria: From Basic Science to Applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 207–216.

KANNAUJIYA, V. K.; SUNDARAM, S.; SINHA, R. P. **Phycobiliproteins: Recent Developments and Future Applications**. Singapore: Springer Singapore, 2017.

KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. O. Bubble column reactors. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2263–2283, 2005.

KATHIRESAN, S. et al. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 3, p. 456–463, 2007.

KEFAYAT, A. et al. C-phycocyanin: a natural product with radiosensitizing property for enhancement of colon cancer radiation therapy efficacy through inhibition of COX-2 expression. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-55605-w>>.

KHAN, Z. et al. A comparative study of phycobilliprotein production in two strains of *Pseudanabaena* isolated from Arctic and tropical regions in relation to di ff erent light wavelengths and photoperiods. **Polar Science**, v. 20, n. October 2018, p. 3–8, 2019a.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.10.002>>.

KHATOON, H. et al. Effects of different light source and media on growth and production of phycobiliprotein from freshwater cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 652–658, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.052>>.

KHATTAR, J. I. S. et al. Hyperproduction of phycobiliproteins by the cyanobacterium *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5 under optimized culture conditions. **Algal Research**, v. 12, p. 463–469, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.007>>.

KHAZI, M. I. et al. Acclimation and characterization of marine cyanobacterial strains *Euryhalinema* and *Desertifilum* for C-phycocyanin production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. November, p. 1–13, 2021.

KHAZI, M. I.; DEMIREL, Z.; DALAY, M. C. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. **Journal of Applied Phycology**, p. 1513–1523, 2018.

KHOO, C. G.; LAM, M. K.; LEE, K. T. Pilot-scale semi-continuous cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactor (BC-PBR): Hydrodynamics and gas-liquid mass transfer study. **Algal Research**, v. 15, p. 65–76, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.001>>.

KLEPACZ-SMÓŁKA, A. et al. Effect of light colour and photoperiod on biomass growth and phycocyanin production by *Synechococcus* PCC 6715. **Bioresource Technology**, v. 313, n. April, 2020.

KOKABI, M. et al. Effects of different UV radiation on photoprotective pigments and antioxidant activity of the hot-spring cyanobacterium *Leptolyngbya cf. fragilis*. **Phycological Research**, v. 67, n. 3, p. 215–220, 2019.

KOMÁREK, J. et al. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **PRESLIA**, v. 86, n. 6, p. 295–335, 2014.

KOMÁREK, J. Planktic oscillatoriale cyanoprokaryotes (short review according to combined phenotype and molecular aspects). **Hydrobiologia**, v. 502, p. 367–382, 2003.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. **Phenotype characters of Oscillatoriales (important for identification)**. 1. ed. Munique: Elsevier GmbH., 2005.

KOMÁREK, J.; JOHANSEN, J. R. Coccoid Cyanobacteria. In: WEHR, J. D.; SHEATH, R. G.; KOCIOLEK, J. P. (Ed.). **Freshwater algae of north america: ecology and classification**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Inc, 2015a. p. 75–133.

KOMÁREK, J.; JOHANSEN, J. R. **Filamentous Cyanobacteria**. [s.l.: s.n.]

KRISHNA, R.; BATEN, J. M. Van. Mass transfer in bubble columns. **Catalysis Today**, v. 80,

p. 67–75, 2003.

KUMAR, J. et al. Cyanobacteria: Applications in Biotechnology. In: MISHRA, A. K.; TIWARI, D. N.; RAI, A. N. (Ed.). **Cyanobacteria: From Basic Science to Applications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. 7421p. 327–346.

LAUCERI, R.; CHINI, G.; TORZILLO, G. A simple method for rapid purification of phycobiliproteins from *Arthrospira platensis* and *Porphyridium cruentum* biomass. **Algal Research**, v. 44, n. May, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101685>>.

LEE, N. K. et al. Higher production of C-phycoyanin by nitrogen-free (diazotrophic) cultivation of *Nostoc* sp. NK and simplified extraction by dark-cold shock. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 164–170, 2017.

LEE, Y.-K. et al. Basic culturing and analytical measurement techniques. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Second ed. [s.l.] Blackwell Publishing Ltda, 2013. p. 37–51.

LEU, J. et al. Characterization of a novel thermophilic cyanobacterial strain from Taian hot springs in Taiwan for high CO₂ mitigation and C-phycoyanin extraction. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 41–48, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.019>>.

LI, S. et al. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. **Bioresource Technology**, v. 292, n. August, p. 122048, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122048>>.

LI, T. et al. Growth and biochemical composition of *Porphyridium purpureum* SCS-02 under different nitrogen concentrations. **Marine Drugs**, v. 17, n. 2, 2019b.

LIANG, F. et al. Engineered cyanobacteria with enhanced growth show increased ethanol production and higher biofuel to biomass ratio. **Metabolic Engineering**, v. 46, p. 51–59, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.02.006>>.

LIBERTON, M. et al. Organization and flexibility of cyanobacterial thylakoid membranes examined by neutron scattering. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 5, p. 3632–3640, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.416933>>.

LIMRUJIWAT, K.; SUPAN, S.; KHETKORN, W. Cyanobacterial biodiversity from Thai karstic caves as a potential source for phycobiliprotein production. **Algal Research**, v. 64, n. June 2021, p. 102666, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102666>>.

LIN, J. Y. et al. High-level production and extraction of C-phycoyanin from cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC7002 for antioxidation, antibacterial and lead adsorption.

Environmental Research, v. 206, n. May 2021, 2022.

LIOTENBERG, S. et al. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. **Microbiology**, v. 142, n. 3, p. 611–622, 1996.

LÓPEZ-HERNANDES, J. F. et al. Continuous microalgal cultivation for antioxidants production. **Molecules**, v. 25, p. 1–16, 2020.

LÓPEZ-ROSALES, L. et al. Characterization of bubble column photobioreactors for shear-sensitive microalgae culture. **Bioresource Technology**, v. 275, n. October 2018, p. 1–9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.009>>.

MALONE, C. F. da S. et al. *Monilinema* gen. nov., a homocytous genus (Cyanobacteria, Leptolyngbyaceae) from saline–alkaline lakes of Pantanal wetlands, Brazil. **Journal of Phycology**, v. 57, n. 2, p. 473–483, 2021.

MALONE, C. F. S. **Biodiversidade de algas e cianobactérias de duas lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia , MS , Brasil**. 2010. 2010.

MANDAL, M. K.; CHANU, N. K.; CHAURASIA, N. Cyanobacterial pigments and their fluorescence characteristics: applications in research and industry. In: SINGH, P. K. et al. (Ed.). **Advances in Cyanobacterial Biology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 55–72.

MARONEZE, M. M. et al. Esterified carotenoids as new food components in cyanobacteria. **Food Chemistry**, v. 287, p. 295–302, 2019.

MENEZES, M. et al. Update of the Brazilian floristic list of Algae and Cyanobacteria. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1047–1062, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602015000401047&lng=en&tlng=en>.

MISHRA, S. K. et al. Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. isolated from Gujarat coast, India. **Protein Expression and Purification**, v. 81, n. 1, p. 5–10, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.011>>.

MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. Preparation of highly purified C-phycoerythrin from marine cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. **Protein Expression and Purification**, v. 80, n. 2, p. 234–238, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.06.016>>.

MOGANY, T. et al. Elucidating the role of nutrients in C-phycoerythrin production by the halophilic cyanobacterium *Euhalothece* sp. **Journal of Applied Phycology**, p. 2259–2271, 2018.

- MONTERO-LOBATO, Z. et al. Identification, biochemical composition and phycobiliproteins production of *Chroococcidiopsis* sp. from arid environment. **Process Biochemistry**, v. 97, n. May, p. 112–120, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.005>>.
- MORAES, C. C.; KALIL, S. J. C-phycoyanin purification : multiple processes for different applications. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 03, p. 1117–1128, 2018.
- MORAIS, D. V.; BASTOS, R. G. Phycocyanin Production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in Synthetic Medium Supplemented with Sugarcane Vinasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 1, p. 129–139, 2019.
- MORONE, J. et al. Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals — A new bioactive approach. **Algal Research**, v. 41, n. May, p. 101541, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101541>>.
- MORONE, J. et al. Exploitation of filamentous and picoplanktonic cyanobacteria for cosmetic applications: potential to improve skin structure and preserve dermal matrix components. **Marine Drugs**, v. 18, n. 9, 2020.
- MÜLLER, M. C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; LOURENÇO, S. O. Carotenóides da cianobactéria *Synechocystis pevalekii* produzida em condições normais e sob limitação de nutrientes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 4, p. 415–423, 2003.
- NOWRUZI, B.; FAHIMI, H.; LORENZI, A. S. Recovery of pure C-phycoerythrin from a limestone drought tolerant cyanobacterium *Nostoc* sp. and evaluation of its biological activity. **Anales de Biología**, n. 42, p. 115–128, 2020.
- NOWRUZI, B.; SARVARI, G.; BLANCO, S. The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. **Algal Research**, v. 49, n. November 2019, p. 101959, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101959>>.
- NWOBA, E. G. et al. Outdoor phycocyanin production in a standalone thermally-insulated photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 315, n. July, p. 123865, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123865>>.
- OJIT, S. K. et al. The response of phycobiliproteins to light qualities in *Anabaena circinalis*. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 3, n. 03, p. 1–6, 2015.
- ORES, J. da C.; AMARANTE, M. C. A. de; KALIL, S. J. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 219–227, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.133>>.
- PAGELS, F. et al. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 3, p. 422–443, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>>.

- PAGELS, F. et al. Factorial optimization of upstream process for *Cyanobium* sp. pigments production. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 6, p. 3861–3872, 2020a.
- PAGELS, F. et al. White and red LEDs as two-phase batch for cyanobacterial pigments production. **Bioresource Technology**, v. 307, n. January, p. 123105, 2020b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123105>>.
- PALIWAL, C. et al. Selective carotenoid accumulation by varying nutrient media and salinity in *Synechocystis* sp. CCNM 2501. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 363–368, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.122>>.
- PARKER, C. T.; TINDALL, B. D.; GARRITY, G. M. International Code of Nomenclature of Prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 1A, p. S1–S111, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.000778>>.
- PARMAR, A. et al. Purification, characterization and comparison of phycoerythrins from three different marine cyanobacterial cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1795–1802, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.025>>.
- PATEL, A. et al. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, n. 2, p. 248–255, 2005.
- PATEL, S. N. et al. Antioxidant activity and associated structural attributes of *Halomicronema* phycoerythrin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 359–369, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.170>>.
- PATEL, V. et al. Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity. **Biotechnology Reports**, v. 5, n. 1, p. 112–119, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2014.12.001>>.
- PICHEL, F. G.; CASTENHOLZ, R. W. Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. **Journal of Phycology**, v. 27, n. 3, p. 395–409, 1991.
- PONDTECH. **Phycocyanin**. Disponível em: <<https://www.pondtech.com/phycoocyanin/>>. Acesso em: 15 jul. 2021.
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evaluation**, v. 25, n. 7, p. 2001–2004, 2003.
- POURHAJIBAGHER, M.; BAHADOR, A. Antimicrobial properties, anti-virulence activities, and physico-mechanical characteristics of orthodontic adhesive containing C-phycoocyanin: a promising application of natural products. **Folia medica**, v. 63, n. 1, p. 113–121, 2021.

- PRATES, D. da F. et al. Spirulina cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 38–43, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.122>>.
- RAMARAJ, R.; TSAI, D. D. W.; CHEN, P. H. Chlorophyll is not accurate measurement for algal biomass. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 40, n. 4, p. 547–555, 2013.
- RAMOS, G. J. P. et al. Unraveling algae and cyanobacteria biodiversity in bromeliad phytotelmata in different vegetation formations in Bahia state, northeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, n. 4, p. 567–577, 2018.
- RASTOGI, R. P.; INCHAROENSAKDI, A. Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU2555. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 87, n. 1, p. 244–256, 2014.
- RATH, J.; MANDAL, S.; PRASAD, S. Salinity induced synthesis of UV-screening compound scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya aestuarii*. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 115, p. 5–8, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.06.002>>.
- RICHMOND, A. Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae. In: **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition**. [s.l: s.n.]p. 171–204.
- RITCHIE, R. J. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. **Photosynthetica**, v. 46, n. 1, p. 115–126, 2008. Disponível em: <https://ps.ueb.cas.cz/artkey/phs-200801-0019_universal-chlorophyll-equations-for-estimating-chlorophylls-a-b-c-and-d-and-total-chlorophylls-in-natural-as.php>.
- ROCHA, I. et al. Phycocyanin from Spirulina : A review of extraction methods and stability. **Food Research International**, v. 143, p. 1–12, 2021.
- ROMÁN, J. R. et al. Assessing the viability of cyanobacteria pellets for application in arid land restoration. **Journal of Environmental Management**, v. 270, n. June, 2020.
- RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539–542, 2012.
- ROSSI, F. et al. Cyanobacterial inoculation (cyanobacterisation): Perspectives for the development of a standardized multifunctional technology for soil fertilization and desertification reversal. **Earth-Science Reviews**, v. 171, p. 28–43, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.05.006>>.
- SADVAKASOVA, A. K. et al. Bioprocesses of hydrogen production by cyanobacteria cells and

- possible ways to increase their productivity. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 133, n. June, p. 110054, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110054>>.
- SAFAEI, M. et al. Development of a novel method for the purification of C-phycoerythrin pigment from a local cyanobacterial strain *Limnothrix* sp. NS01 and evaluation of its anticancer properties. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.
- SANFILIPPO, J. E. et al. Chromatic Acclimation in Cyanobacteria: A Diverse and Widespread Process for Optimizing Photosynthesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 407–433, 2019.
- SANT’ANNA, C. L. et al. **Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2006a.
- SANT’ANNA, C. L. et al. Cyanobacteria. In: BICUDO, C. E. DE M.; MENEZES, M. (Ed.). **Gêneros de algas continentais do Brasil**. [s.l.] Rima, 2006b. p. 21–96.
- SANT’ANNA, C. L. et al. Lista de Cyanobacteria do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 11, n. suppl 1, p. 455–495, 2011.
- SARMA, T. A. **Handbook of Cyanobacteria**. 1. ed. Patiala: Taylor & Francis Group, 2013.
- SCHIPPER, K. et al. Production of phycoerythrin by *Leptolyngbya* sp. in desert environments. **Algal Research**, v. 47, n. February, p. 101875, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101875>>.
- SCHOPF, J. W. The Fossil Record of Cyanobacteria. In: **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 15–36.
- SEKAR, S. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. s.n., p. 113–136, 2008.
- SEN, S. Cyanobacterial membrane biology under environmental stresses with particular reference to photosynthesis and photomorphogenesis. In: **Advances in Cyanobacterial Biology**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 73–84.
- SEO, I. et al. Numerical investigation of a bubble-column photo-bioreactor design for microalgae cultivation Numerical investigation of a bubble-column photo-bioreactor design for microalgae cultivation. **Biosystems Engineering**, v. 113, n. 3, p. 229–241, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.08.001>>.
- SEVERIANO, J. dos S. et al. Micro-phytoplankton richness in Contas River, state of Bahia, northeastern Brazil. **Check List**, v. 8, n. 2, p. 218–223, 2012.
- SHEVELA, D.; PISHCHALNIKOV, R.; EICHACKER, L. Oxygenic Photosynthesis in Cyanobacteria. In: SRIVASTAVA, A. K.; RAI, A. N.; NEILAN, B. A. (Ed.). **Stress Biology of**

Cyanobacteria. [s.l.] CRC Press, 2013. p. 3–40.

SILVA, S. C. et al. Microalgae-Derived Pigments: A 10-Year Bibliometric Review and Industry and Market Trend Analysis. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3406, 28 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/15/3406>>.

SINGH, S.; KATE, B. N.; BANECJEE, U. C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 73–95, 2005.

SINGH, S. P. et al. Mycosporine-like amino acids (MAAs) profile of a rice-field cyanobacterium *Anabaena doliolum* as influenced by PAR and UVR. **Planta**, v. 229, n. 1, p. 225–233, 2008.

SINGH, S. P.; MONTGOMERY, B. L. Determining cell shape: Adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 278–285, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.03.001>>.

SINTRA, T. E. et al. Sequential recovery of C-phycoyanin and chlorophylls from *Anabaena cylindrica*. **Separation and Purification Technology**, v. 255, n. June 2020, p. 117538, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117538>>.

SONI, B. R. et al. Structure of the novel 14 kDa fragment of a -subunit of phycoerythrin from the starving cyanobacterium *Phormidium tenue*. **Journal of Structural Biology**, v. 171, n. 3, p. 247–255, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2010.05.008>>.

SOPHIA, M. G. et al. Subaerial eukaryotic algae and cyanobacteria on dripping rocks in the Atlantic Forest of southeast Brazil: composition and abundance. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 39, n. 2, p. 741–749, 2016.

SU, H.; XIE, B.; CHEN, X. Efficient separation and purification of allophycoyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. **Journal of Applied Phycology**, p. 65–70, 2010.

SUN, L. et al. Phycobilisomes from cyanobacteria. In: GAULT, P. M.; MARLER, H. J. (Ed.). **Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Applications.** [s.l.] Nova Science Publishers, 2009. p. 105–160.

TAVANANDI, H. A. et al. Simple and efficient method for extraction of C-Phycoyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 31, n. August 2017, p. 239–251, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.008>>.

TAVANANDI, H. A.; VANJARI, P.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Separation and purification technology synergistic method for extraction of high purity allophycoyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis* and utilization of spent biomass for recovery of carotenoids. **Separation and Purification Technology**, v. 225, n. December 2018, p. 97–111, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.05.064>>.

- TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. [s.l.] Blackwell, 2004. p. 3–19.
- TREDICI, M. R. Mass Production of Microalgae: Photobiorreactors. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phy.** [s.l.] Blackwell, 2004. p. 178–214.
- TURICCHIA, S. et al. Taxonomic evaluation of cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize: 2. Diversity of oscillatorialean genera. **Nova Hedwigia**, v. 89, n. 1–2, p. 165–200, 2009.
- UE, U. E. **Demonstration of new natural dyes from algae as substitution of synthetic dyes actually used by textile industries.** Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/life/publicWebsite/index.cfm?fuseaction=search.dspPage&n_proj_id=5017#>. Acesso em: 5 set. 2022.
- VASCONCELLOS, N. J. S. de. **Cianobactérias heterocitadas e euglenas vermelhas em lavoura de arroz irrigado por inundação em planossolo haplico, Santa Maria, RS.** 2010. Universidade Federal de Santa Maria, 2010.
- VAZ, M. G. M. V. et al. *Pantanalinema* gen. nov. and *Alkalinema* gen. nov.: Novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline–alkaline lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 298–308, 2015.
- VEGA, J. et al. Cyanobacteria and Red Macroalgae as Potential Sources of Antioxidants and UV Radiation-Absorbing Compounds for Cosmeceutical Applications. **Marine drugs**, v. 18, n. 12, 2020.
- VELEA, S.; ILIE, L.; FILIPESCU, L. Optimization of *Porphyridium purpureum* culture growth using two variables experimental design: Light and sodium bicarbonate. **UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science**, v. 73, n. 4, p. 81–94, 2011.
- WASE, N. V.; YEN, O. S.; WRIGHT, P. C. A Global Understanding of Light Stress in Cyanobacteria Environmental and Bioproducts Perspectives. In: SRIVASTAVA, A. K.; RAI, A. N.; NEILAN, B. A. (Ed.). **Stress Biology of Cyanobacteria**. 1. ed. Nova Iorque: Taylor & Francis Group, 2013. p. 273–289.
- WATERBURY, J. B. The Cyanobacteria—Isolation, Purification and Identification. **The Prokaryotes**, v. 4, p. 1053–1073, 2006.
- WHITTON, B. A.; POTTS, M. Introduction to the Cyanobacteria. In: **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 1–13.
- WILTBANK, L. B.; KEHOE, D. M. Diverse light responses of cyanobacteria mediated by phytochrome superfamily photoreceptors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 37–

50, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0110-4>>.

WINAYU, B. N. R. et al. Production of phycobiliprotein and carotenoid by efficient extraction from *Thermosynechococcus* sp. CL-1 cultivation in swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 319, n. September 2020, p. 124125, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124125>>.

WU, Q. et al. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 8, p. 1817–1840, 3 ago. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00204-016-1744-5>>.

XIE, Y. et al. Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira* (Spirulina) *platensis* under phototrophic cultivation. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 281–287, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.073>>.

YEH, H.-Y. et al. Enhanced *Coelaconema formosanum* biomass and phycoerythrin yield after manipulating inorganic carbon, irradiance, and photoperiod. **Bioresource Technology**, v. 352, 2022.

YÉPRÉMIAN, C. et al. Chlorophyll a Extraction and Determination. In: MERILUOTO, J.; SPOOF, L.; CODD, G. A. (Ed.). **Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 331–334.

YOON, J. H.; SHIN, J.; PARK, T. H. Characterization of factors influencing the growth of *Anabaena variabilis* in a bubble column reactor. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1204–1210, 2008.

YU, J. et al. Continuous cultivation of *Arthrospira platensis* for phycocyanin production in large-scale outdoor raceway ponds using microfiltered culture medium. **Bioresource Technology**, v. 287, p. 121420, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121420>>.

ZAHRA, Z. et al. Cyanobacteria: Review of current potentials and applications. **Environments - MDPI**, v. 7, n. 2, 2020.

ZITTELLI, G. C. et al. Effects of blue, orange and white lights on growth, chlorophyll fluorescence, and phycocyanin production of *Arthrospira platensis* cultures. **Algal Research**, v. 61, n. September 2021, p. 102583, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102583>>.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Comprovante de cadastro de acesso ao Patrimônio Genético



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AD406CC

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	AD406CC
Usuário:	Elias Silva Gallina
CPF/CNPJ:	058.001.155-08
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Impossibilidade de identificação

Título da Atividade: Isolamento e seleção de cianobactérias produtoras de pigmentos

Equipe

Elias Silva Gallina INDEPENDENTE

APÊNDICE B: Testes estatísticos empregados para as comparações necessárias nos Resultados e Discussão, figuras e tabelas complementares.

Tabela I-1: Testes estatísticos prévios para determinação do método de comparação de médias.

Grupo de dados	α	Shapiro-Wilk ¹	IQR ²	Levene ³
Ficocianina	0,05	Distribuição normal	Ausente	0,0431
Aloficocianina	0,05	Distribuição normal	Ausente	0,0001
Ficoeritrina	0,05	Distribuição normal	Ausente	0,2148
Ficobiliproteínas	0,05	Distribuição normal	Ausente	0,0140
Biomassa /(g)	0,05	Distribuição normal	Ausente	0,1210
Rendimento de biomassa /(g·L ⁻¹)	0,05	Distribuição normal	Ausente	0,1210
Carotenoides	0,05	Distribuição não-normal	Ausente	-
Tempo de mistura	0,05	Distribuição normal	Ausente	0,3000

Testes realizados utilizando a extensão *Real Statistics* no Microsoft Excel. ¹Dados totais não mostrados. ²IQR (*Inter Quartil Range*): considera outlier quando o dado for $1,5 \times (Q3 - Q1)$ acima do primeiro ou terceiro quartil; ³Hipóteses do teste de Levene: H_0 : as variâncias dos grupos são homogêneas ($p > 0,05$); H_1 : as variâncias dos grupos não são homogêneas ($p \leq 0,05$).

Tabela I-2: Anovas de uma via empregadas neste estudo

Fontes	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Estatística F	Valor P
Biomassas*					
Entre grupos	9,370	16	0,586	129,500	$1,07 \times 10^{-25}$
Dentro dos grupos	0,153	34	0,004		
Total	9,523	50	0,190		
Tempo de mistura					
Entre grupos	113,433	4	28,358	9,247	0,002
Dentro dos grupos	30,667	10	3,067		
Total	144,1	14	10,293		

*Devido ao rendimento de biomassa ser derivado do valor total de biomassa, têm o mesmo quadro de ANOVA.

Tabela I-3: Dados de ANOVA de Welch empregados em diferentes análises.

Parâmetros	Produção de pigmentos		
	PC	APC	Totais
Alpha	0,05	0,05	0,05
F	148,75	99,44	104,63
GL 1	16,00	16,00	16,00
GL 2	12,60	12,31	12,42
p-value	$9,14 \times 10^{-12}$	$1,75 \times 10^{-10}$	$1,08 \times 10^{-10}$
Diferença significativa	sim	sim	sim

PC – Ficocianina, APC – Aloficocianina. H_0 : as médias dos grupos são iguais ($p > 0,05$); H_1 : há pelo menos uma diferença entre as médias dos grupos ($p \leq 0,05$).

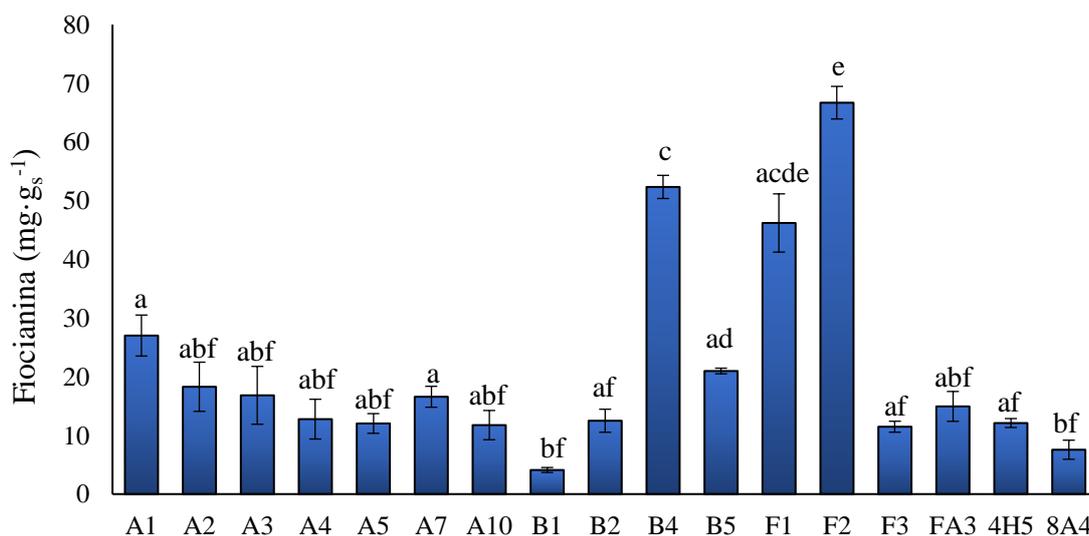


Figura I-1: Concentração de ficocianina extraída da biomassa das diferentes cepas no décimo quarto dia de cultivo, expressa em massa seca. As letras minúsculas (a, b, c, d, e, f) representam dados estatisticamente distintos a partir de ANOVA de Welch e identificado por teste de Games-Howel e teste Q com $p < 0,05$.

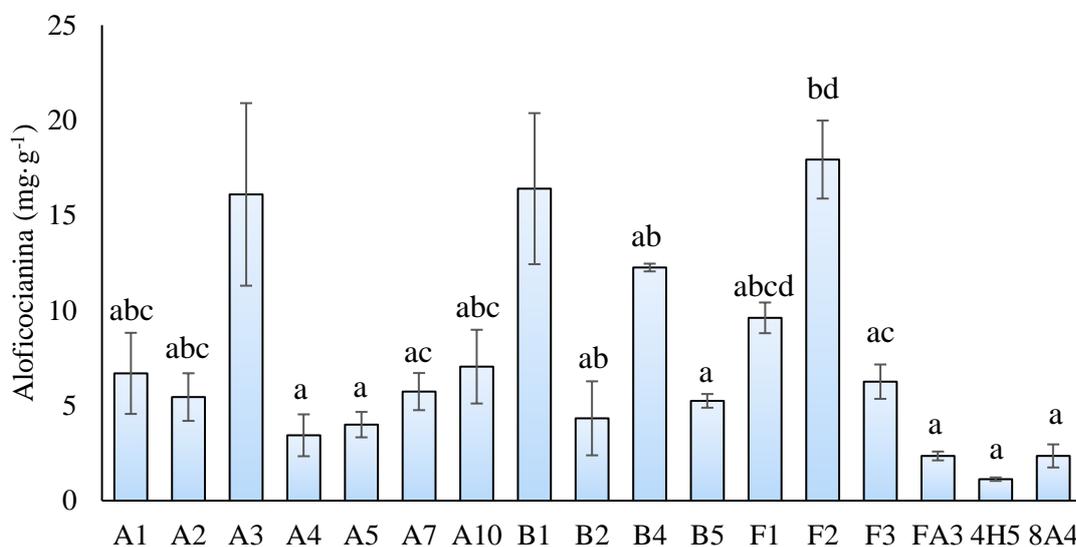


Figura I-2: Concentração de aloficocianina extraída da biomassa das diferentes cepas no décimo quarto dia de cultivo, expressa em massa seca. As letras minúsculas (a, b, c, d) representam dados estatisticamente distintos a partir de ANOVA de Welch e identificado por teste de Games-Howel e teste Q com $p < 0,05$.

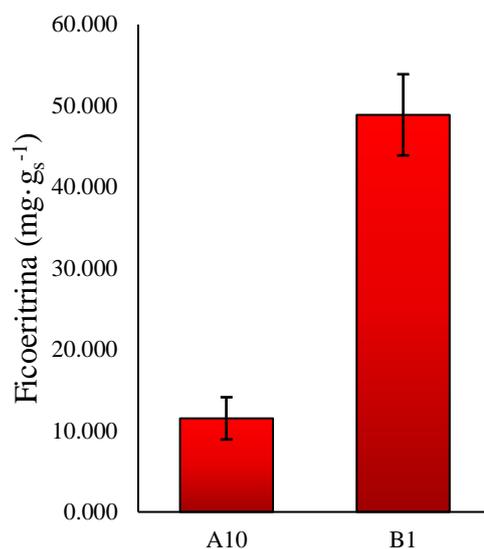


Figura I-3: Concentração de ficoeritrina extraída da biomassa das cepas A10 e B1 no décimo quarto dia de cultivo, expressa em massa seca. Demais cepas não apresentaram pigmento em concentração detectável pela técnica empregada.

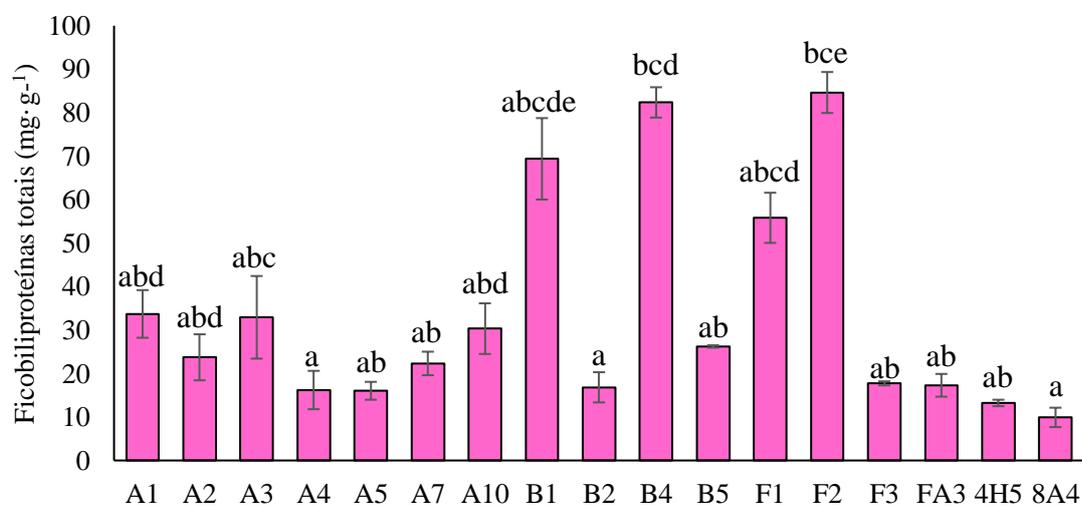


Figura I-4: Concentração de ficobiliproteínas totais no décimo quarto dia de cultivo, expressa em massa seca. As letras minúsculas (a, b, c, d) representam dados estatisticamente distintos a partir de ANOVA de Welch e identificado por teste de Games-Howel e teste Q com $p < 0,05$.

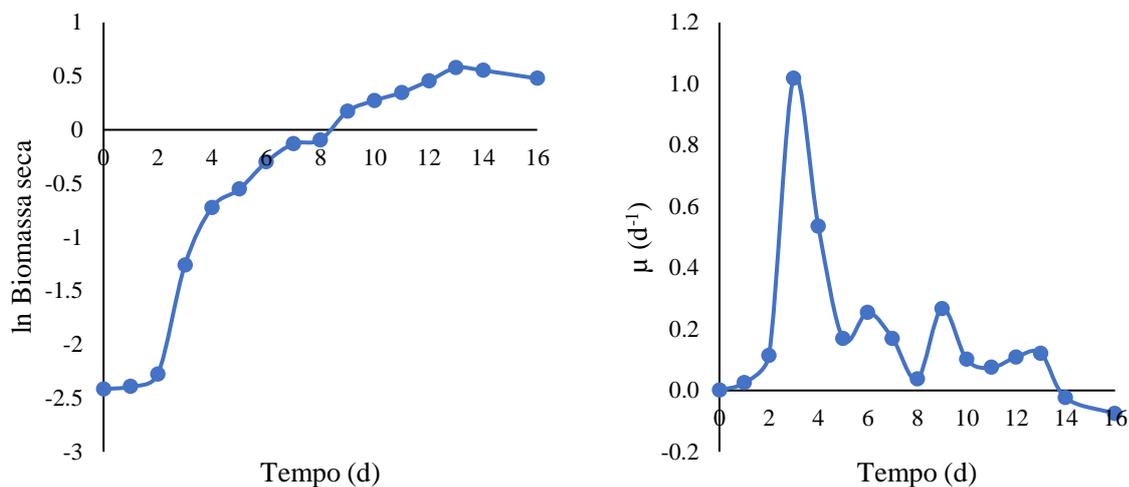


Figura I-5: Análise do comportamento do crescimento em fotobiorreator da cepa *Phormidesmis* sp. F2. À esquerda a curva linearizada por meio da transformação logarítmica da concentração de biomassa. O gráfico à direita apresenta a velocidade específica de crescimento.

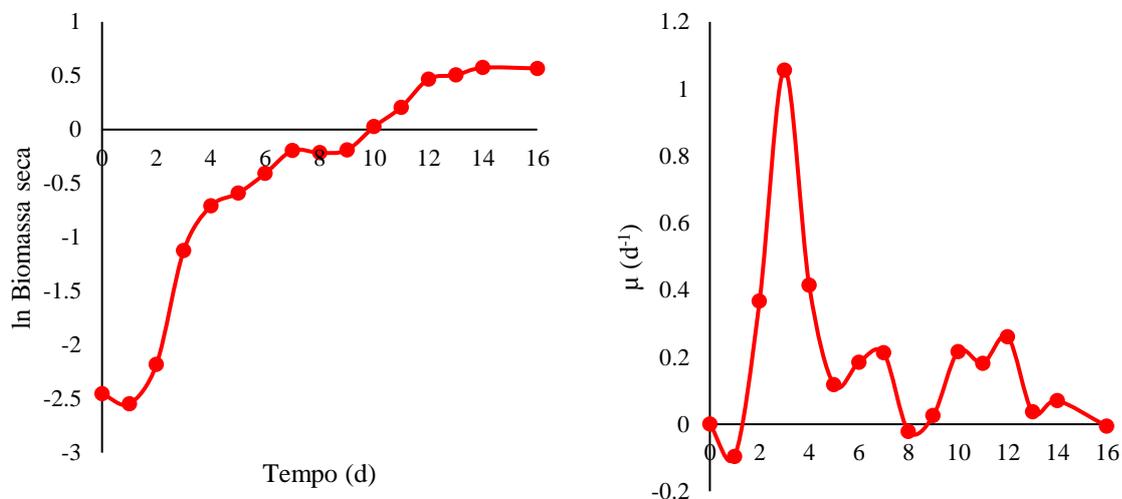


Figura I-6: Análise do comportamento do crescimento em fotobiorreator da cepa *Leptolyngbya* sp.5 B1. À esquerda a curva linearizada por meio da transformação logarítmica da concentração de biomassa. O gráfico à direita apresenta a velocidade específica de crescimento.

Tabela I-4: Relação de estudos de otimização de produção de pigmentos em cianobactérias.

Microrganismos	Pigmentos	Fatores	Condições testadas	Melhor resultado	Referências
<i>Arthrospira platensis</i> M2	Ficocianina, carotenoides e aloficocianina	Cor de luz	Cultivo sob luz branca, laranja e azul	BM: $\approx 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sob luz laranja; PC: $132,3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sob luz azul	(ZITTELLI et al., 2022)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	Ficocianina e carotenoides	Cor de luz, fotoperíodo	Cultivo sob luz branca, vermelha, verde e azul com fotoperíodos 12:12 h.	BM: $1,77 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sob luz integral vermelha; PC: $126,39 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sob 12 h de luz verde	(PRATES et al., 2018)
<i>Arthrospira platensis</i>	Ficocianina	Cor de luz, fotoperíodo e reciclagem de meio	Cultivo sob luz branca, vermelha e azul; reciclagem de meio; fotoperíodo (contínuo, 45:15, 30:30 e 15:45 claro:escuro); Suplementação de nitrato (37,5 a 90 mM)	X: $101,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ sob luz branca, 30 min claro/escuro, em meio reciclado suplementado com nitrato (45 mM)	(HO et al., 2018)
<i>Synechococcus</i> PCC 6715	Ficocianina	Cor de luz e fotoperíodo	Cultivo sob luz branca, vermelha, verde e azul com fotoperíodo de 16:8 h e iluminação constante.	BM: $5,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sob iluminação constante vermelha; PC: $122,66 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	(KLEPACZ-SMÓLKA et al., 2020)
<i>Nostoc</i> sp. NK.	Ficocianina	Cor de luz e concentração de nitrogênio	Cultivo sob luz branca, vermelha e de plantas (azul+vermelho) em meio com ou sem nitrogênio (BG11 ou BG11 ₀)	BM: 0,32; PC: $180 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; X: $57,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ – na luz vermelha em BG11 ₀	(LEE et al., 2017)
<i>Cyanobium</i> sp.	Ficocianina e carotenoides	Combinação de diferentes cores de luz	Ciclo de cultivo de 21 dias em 0, 3, 7, 10, 14, 18, 21 dias com luz branca completados com luz vermelha	X: $17 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de ficobiliproteínas e $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de carotenoides a 10 dias de luz branca com 4 dias de luz vermelha	(PAGELS et al., 2020b)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Ficocianina	Intensidade luminosa e fotoperíodo	Intensidade luminosa de 100, 250 e $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Fotoperíodos de 12:12; 16:12 e 24:0 claro:escuro	PC: $439 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ sob $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz branca num fotoperíodo de 12 h e com 2% de CO ₂	(LIN et al., 2022)

BM: Biomassa; PC: conteúdo de ficocianina; APC: conteúdo de aloficocianina; PE: conteúdo de ficoeritrina; X: produtividade volumétrica.

Tabela I-4: Relação de estudos de otimização de produção de pigmentos em cianobactérias (continuação).

Microrganismos	Pigmentos	Fatores	Condições testadas	Melhor resultado	Referências
<i>Arthrospira platensis</i> WH879	Ficocianina	Intensidade, inóculo e fonte de nitrogênio	Batelada alimentada com meio concentrado ou solução de nitrato, inóculos de 0,08, 0,12, 0,16, 0,20 e 0,24 g·L ⁻¹ ; intensidades luminosas de 75, 150, 300 e 450 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹	X: 94,8 123 mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹ sob luz de 300 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ e 0,24 g·L ⁻¹ de inóculo com reposição de 5 mM de nitrato.	(XIE et al., 2015)
<i>Arthrospira platensis</i> BP	Ficocianina	Intensidade luminosa e concentração celular	Intensidades luminosas de 635, 980, 1300, e 2300 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ em modo semi-contínuo mantendo OD de 0,4, 0,6 e 0,8	X: 123 mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹ a 2300 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ e OD de 0,6	(CHAIKLAHAN et al., 2022)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp.	Ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina	Intensidade luminosa, fonte e concentração de nitrogênio	Nitrito, nitrato, amônia e ureia em concentrações de 3, 6 e 9 mM; Intensidades luminosas de 10, 70, 100, 150 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹	X _{PC} : 17,52 mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹ X _{APC} : 15,34 mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹ X _{PE} : 9,98 mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹ A 70 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ em meio com 9 mM de nitrato	(MONTERO-LOBATO et al., 2020)
<i>Euryhalinema</i> sp. e <i>Desertifilum</i> sp.	Ficocianina	Intensidade luminosa, temperatura e nutrientes	Intensidades luminosas de 40, 60, 80, 100, 120, 150, and 200 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ ; 24, 28, 32, and 36 ± 1°C; e 2, 3 e 4 g·L ⁻¹ de nitrato e 12, 16 e 24 mg·L ⁻¹ e citrato férrico amoniacal	BM: 1,21 ± 0,2 g·L ⁻¹ e PC: 123,4 ± 1,0 mg·g ⁻¹ a 60 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ a 28 °C para <i>Euryhalinema</i> sp.; BM: 1,18 ± 0,02 g·L ⁻¹ e PC: 103,4 ± 1,0 mg·g ⁻¹ a 80 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ a 32 °C para <i>Desertifilum</i> sp.	(KHAZI et al., 2021)
<i>Pseudanabaena catenata</i> USMAC16 <i>P. amphigranulata</i> USMAC18	Ficoeritrina e ficocianina	Cor de luz e fotoperíodo	Cultivo em luz branca, verde e vermelha em fotoperíodos 12/12, 16/08 e 24/00 h (claro/escuro)	<i>P. catenata</i> : PC: 25,8 mg·L ⁻¹ em luz vermelha 24/00 h.; PE: 25,5 mg·L ⁻¹ em luz verde e 24/00 h. <i>P. amphigranulata</i> : PC: 86 mg·L ⁻¹ em luz vermelha 12/12 h.; PE: 10,2 mg·L ⁻¹ em luz verde e 12/12 h.	(KHAN et al., 2019b)
<i>Pseudanabaena</i> sp.	Ficocianina e ficoeritrina	Cor de luz	Cultivo sob luz branca, verde, vermelha, amarela e azul	PE: 39,2 mg·L ⁻¹ e BM: 0,89 g·L ⁻¹ em luz verde; PC: 10,9 mg·L ⁻¹ e BM: 0,50 g·L ⁻¹ em luz vermelha	(MISHRA et al., 2012)

BM: Biomassa; PC: conteúdo de ficocianina; APC: conteúdo de aloficocianina; PE: conteúdo de ficoeritrina; X: produtividade volumétrica.

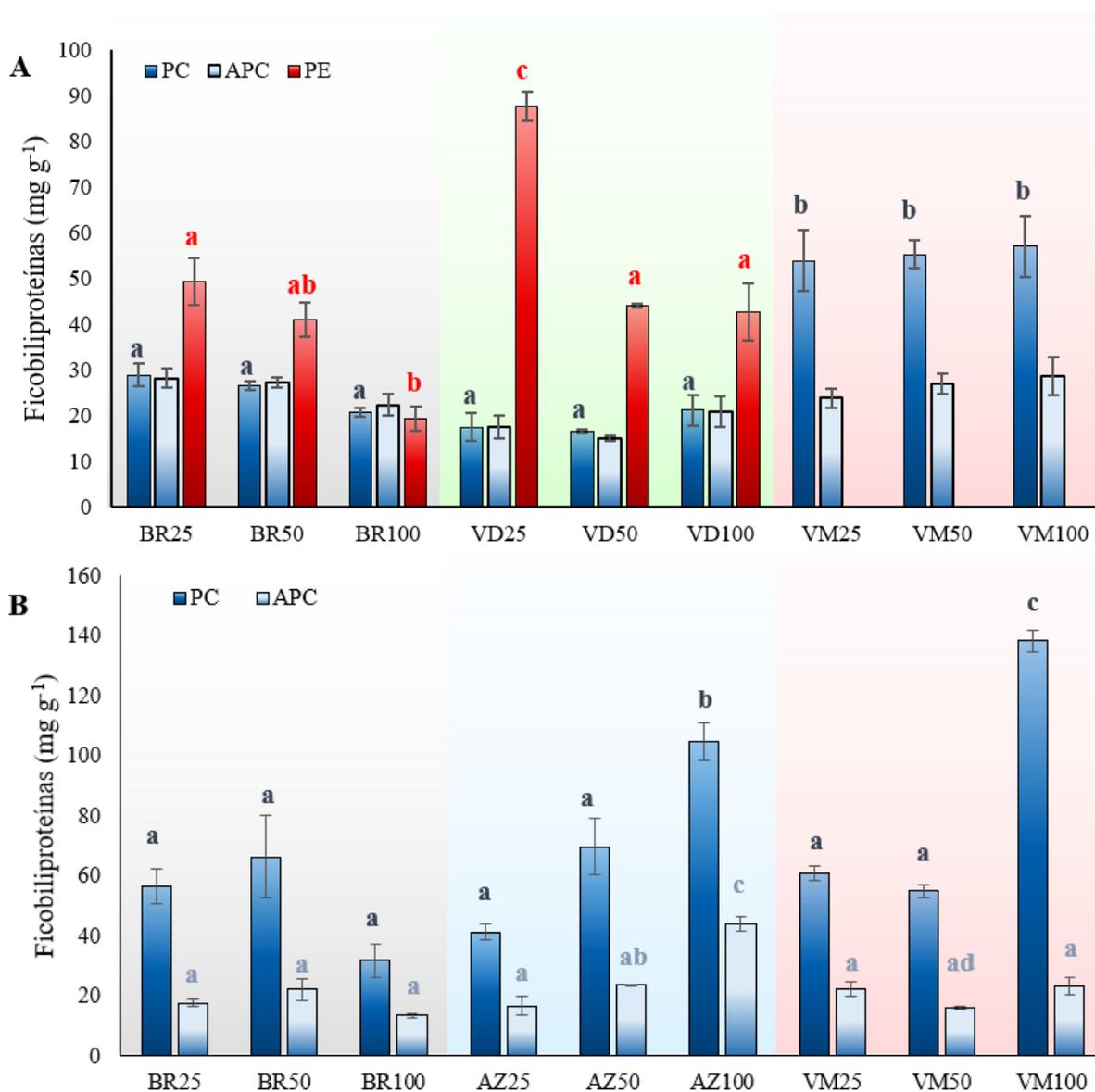


Figura I-7: Concentração de ficobiliproteínas (PC: Ficocianina; APC: Aloficocianina; PE: Ficoeritrina) na massa seca dos isolados *Leptolyngbya* sp.5 B1 (A) e *Phormidesmis* sp. F2 (B), em diferentes combinações de cor de luz e intensidade luminosa. No eixo horizontal os tratamentos são representados pela sigla da cor (BR: Branca; AZ: Azul; VD: Verde; VM: Vermelho) seguida da intensidade luminosa (25, 50 ou 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos. A resposta da produção de cada pigmento foi avaliada separadamente, por isto, as letras apresentam cores diferentes para cada classe de ficobiliproteína.

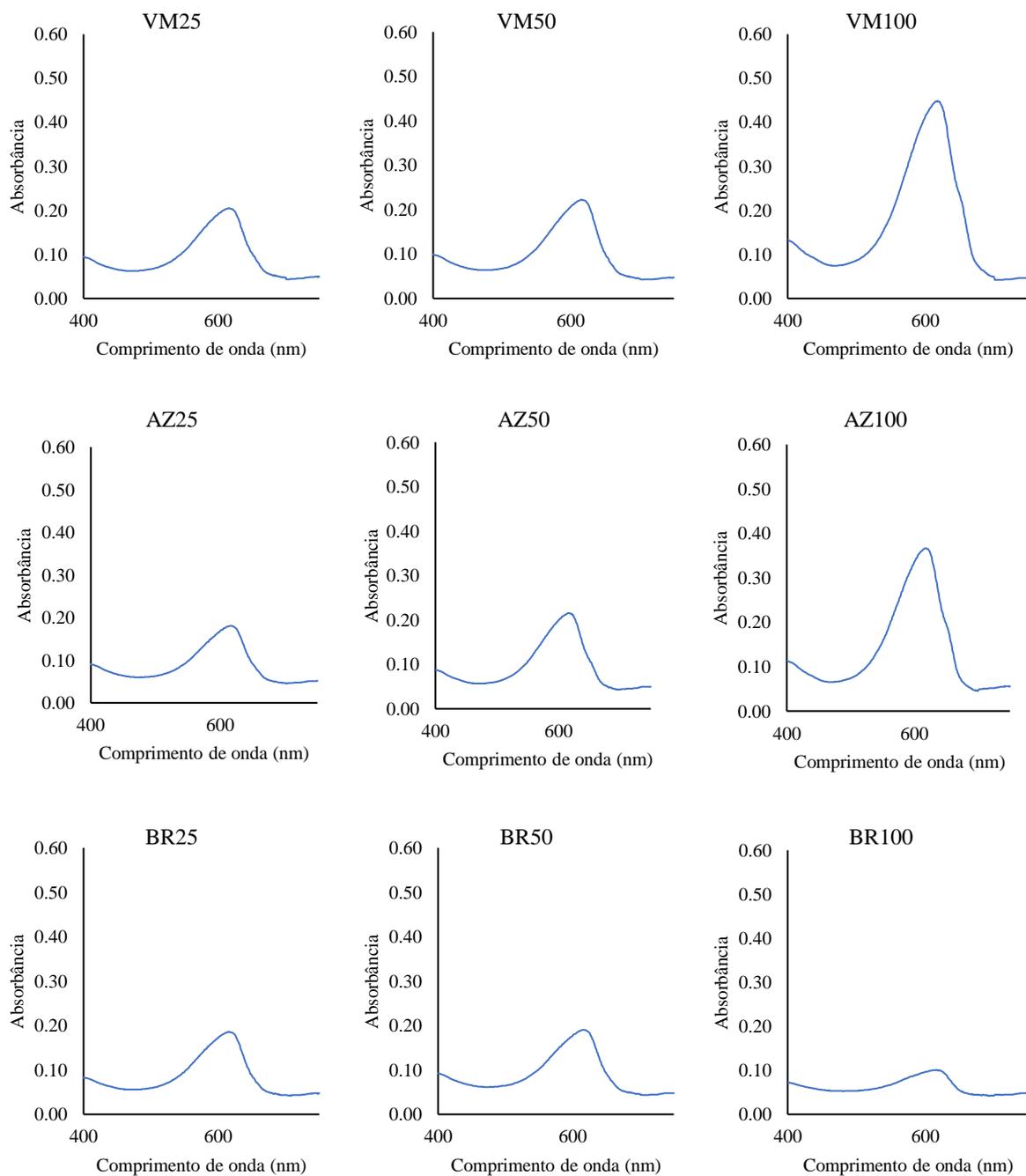


Figura I-8: Espectros de absorção dos extratos aquosos das biomassas dos diferentes tratamentos empregados no cultivo de *Phormidesmis* sp. F2. Codificação dos tratamentos: BR – luz branca; VM – luz vermelha; AZ – luz azul; 25 – $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 50 – $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 100 – $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Dados representados como média de três réplicas mensuradas nos comprimentos de onda de 400 a 750 nm.

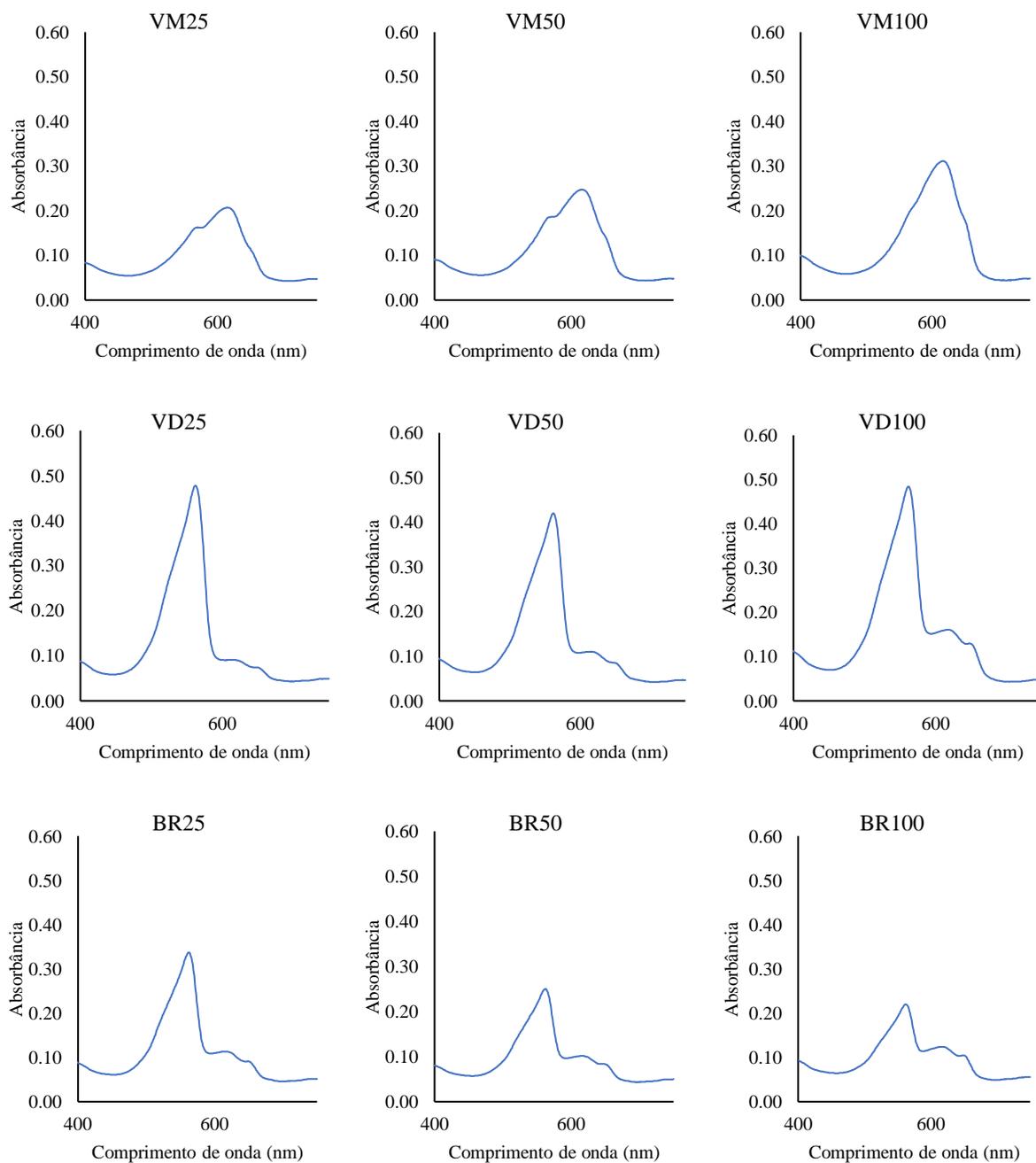


Figura I-9: Espectros de absorção dos extratos aquosos das biomassas dos diferentes tratamentos empregados no cultivo de *Leptolyngbya* sp.5 B1. Codificação dos tratamentos: BR – luz branca; VM – luz vermelha; VD – luz verde; 25 – $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 50 – $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 100 – $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Dados representados como média de três réplicas mensuradas nos comprimentos de onda de 400 a 750 nm.

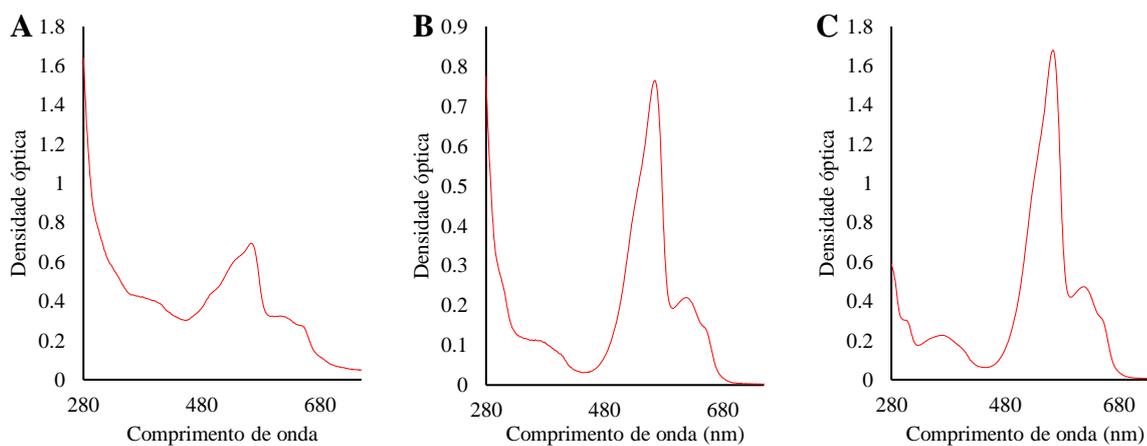


Figura I-10: Espectros de absorção ao longo do fracionamento com sulfato de amônio. A: Extrato bruto; B: Sobrenadante após precipitação com 25% de saturação de sulfato de amônio; C: Sobrenadante após precipitação com saturação elevada a 60%.

ANEXOS**Sequências de nucleotídeos obtidas a partir do sequenciamento realizado pela BPI Biotecnologia.**

>*Leptolyngbya* sp.5 B1 MI_067

ATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTACTGGTTGT
AAACCTCTTTTGATAGGGAAGAAGAAAGTGACGGTACCTATCGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAG
GTGGTTATTCAAGTCAGCTGTCAAAGGATGGAGCTTAACTCCATAAAGGCAGTTGAAACTGTGTAGC
TAGAGTGCGATAGGGGCAAGGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAAC
ATCGGTGGCGAAAGCGCCTTGCTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAA
GGGATTAGATAC

>*Phormidesmis* sp. F2 MI_068

TTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGTTGGGAGGACGCTTTTTGGAGTGTA
CCACTTTTATTAGGGAAGAAGAAGACTGACGGTACCTAATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGGGGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGG
CTTATCAAGTCTGTTGTCAAAGCGTGCGGCTTAAACGCATACGGGCGATGGAAACTGATGAGCTAGA
GTGCGATAGGGGTCAGGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCA
GTGGCGAAAGCGCCTGACTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGG
ATTAGATACC