



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

SAMANTHA SERRA COSTA

PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) DA BIOMASSA DE
MICROALGAS

SALVADOR

2019

SAMANTHA SERRA COSTA

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) DA BIOMASSA DE
MICROALGAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Janice Izabel Druzian

Co-orientadora: Profa. Dra. Michele Greque de Moraes

SALVADOR

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Costa, Samantha Serra
Produção, extração e caracterização de
polihidroxialcanoatos (PHAs) da biomassa de
microalgas / Samantha Serra Costa, Samantha Costa. --
Salvador, 2019.
110 f. : il

Orientadora: Janice Izabel Druzian.
Coorientadora: Michele Greque de Moraes.
Tese (Doutorado - Doutorado em Biotecnologia -
RENORBIO) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto
de Ciências da Saúde, 2019.

1. cianobactérias. 2. biopolímeros. 3. microalgas.
4. polihidroxialcanoatos. 5. massa molecular. II.
Costa, Samantha. I. Druzian, Janice Izabel. II. de
Moraes, Michele Greque. III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

“Produção, Extração e Caracterização de Polihidroxicanoatos (PHAs) da Biomassa de Microalgas”

Elaborada por:

SAMANTHA SERRA COSTA

Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de

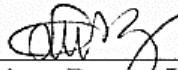
DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA

Salvador - Bahia, 30 de abril de 2019

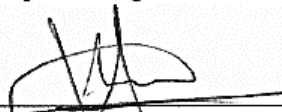
BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Janice Izabel Druzian
(Orientadora)
Universidade Federal da Bahia



Prof.ª Dr.ª Josiane Dantas Viana Barbosa
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – SENAI/BA



Prof. Dr. Marcelo Andres Umsza Guez
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Denilson de Jesus Assis
Universidade Salvador - UNIFACS



Prof. Dr. Ícaro Thiago Andrade Moreira
Universidade Federal da Bahia

*Aos meus pais, Tania e Jeovan, por toda dedicação,
amor e esforços em prol da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus pelo dom da vida e por sempre iluminar meus caminhos.

Agradeço à minha família, pais, irmãos e sobrinha pelo apoio, torcida e por serem o meu maior incentivo para nunca desistir.

À minha grande amiga Andréa pelo companheirismo, pela agradável convivência e amizade durante todo esse período.

À minha orientadora Profa. Janice Izabel Druzian, por sempre ter acreditado no meu potencial, e por todo compromisso e dedicação que teve na elaboração deste trabalho.

À minha co-orientadora Profa. Michele e a FURG por todo apoio dado na execução deste projeto.

Aos grandes amigos que fiz nessa caminhada, Denilson e Cris, que com certeza tornaram os obstáculos mais leves e as conquistas mais vitoriosas.

À todos os amigos do LAPESCA Paulo Romano, Jamile, Lucas, Bianca, Arão, Paulo Leonardo e Paulo Lemos pelos dias difíceis e alegres de experimentos compartilhados, pelos grandes momentos de aprendizado e amizade.

À Carol por todos os ensinamentos, pela disponibilidade e paciência.

Aos colegas de doutorado da turma 2016.1, em especial a Pedro, Roger, Sandra, Neandder e Patrícia, pela amizade e companheirismo durante o doutorado.

À FAPESB pelo financiamento da bolsa de estudo.

À UFRB pelo apoio dado no final dessa trajetória.

À Claudia pela paciência e por todo profissionalismo no atendimento as demandas.

Ao RENORBIO e a todos professores pelo aprendizado e ensinamentos passados durante o curso.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado. Muito obrigada.

RESUMO

A crescente utilização de plásticos convencionais tem gerado preocupação com o grande acúmulo no ambiente, surgindo a necessidade de produção e utilização de polímeros biodegradáveis para substituí-los. Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são biopolímeros sintetizados intracelularmente por diversos microrganismos, como forma de armazenamento de energia. As microalgas são fontes promissoras de PHAs, pois são os únicos microrganismos que acumulam PHAs pela fotossíntese, utilizando a luz como principal fonte de energia, e o CO₂ como principal fonte de carbono, reduzindo os custos de produção, que se configura como maior obstáculo para comercialização dos PHAs. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi produzir e caracterizar PHAs da biomassa de diferentes microalgas, avaliando os métodos de extração e estratégias de cultivo para maior acúmulo de biopolímero. Inicialmente, a eficácia de seis métodos de extração de PHAs da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 foi avaliada, considerando o rendimento da extração, pureza e propriedades (FTIR, massa molecular, índice de cristalinidade e composição monomérica) dos polímeros. Após 30 dias de cultivo obteve-se 1,02 g/L de biomassa, com rendimentos entre 6,10 a 9,80% de PHAs e graus de pureza entre 63,5 e 93,6%, dependendo do método de extração empregado. O uso do hipoclorito de sódio na etapa inicial da extração contribuiu para aumentar o rendimento, e o uso do metanol no final do processo aumentou a pureza dos biopolímeros. A massa molecular, o índice de cristalinidade e a composição dos PHAs variaram com os métodos de extração, demonstrando interferência do processo de extração nas propriedades dos polímeros. Constatou-se uma relação indireta ($R^2 = 0,80$) entre o percentual do monômero 11-hidroxihexadecanoato e o grau de cristalinidade dos PHAs, sugerindo que o aumento de cadeias médias e longas na estrutura dos PHAs, contribui para isto. Na segunda etapa, foi avaliada a influência da disponibilidade de nitrogênio do meio de cultivo na produção e composição de biomassa (clorofila, proteínas, lipídios e ácidos graxos), e na produção e propriedades dos PHAs (FTIR, índice de cristalinidade, TGA e DSC). *Chlorella minutíssima* e *Synechococcus subsalsus* foram cultivadas em meio BG-11 e *Spirulina* sp. LEB-18 foi cultivada em meio Zarrouk. As cepas foram cultivadas em meio “padrão”, contendo todos os constituintes presentes em cada meio de cultivo, e em meio com redução de 70% de nitrogênio (meio limitado). O crescimento celular das microalgas foi reduzido no meio limitado de nitrogênio, assim como também houve alteração da composição bioquímica da biomassa, com maior armazenamento de moléculas carbonáceas, como lipídios e PHAs. *C. minutíssima* não sintetizou PHA mesmo em ambiente limitado de nitrogênio, ao contrário de *S. subsalsus* (16% m/m de biomassa seca) e *Spirulina* sp. (12%). Os PHAs apresentaram diferentes propriedades térmicas e físicas, evidenciando a influência da cepa nas propriedades do polímero, formados majoritariamente por monômeros de cadeia longa (C14 a C18). Esta composição é uma novidade científica, uma vez que não foi registrada em PHAs sintetizados por outras microalgas. Os PHAs obtidos pelas duas microalgas podem ser utilizados em diversas áreas, com potencial para o desenvolvimento de embalagens devido a baixa cristalinidade.

Palavras-chave: cianobactérias; biopolímeros; microalgas; massa molecular.

ABSTRACT

The growing use of conventional plastics has generated concern about the large accumulation in the environment, arising the need for production and use of biodegradable polymers to replace them. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biopolymers synthesized intracellularly by various microorganisms as a form of energy storage. Microalgae are promising sources of PHAs, as they are the only microorganisms that accumulate PHAs by photosynthesis, using light as the main source of energy, and CO₂ as the main source of carbon, reducing production costs, which is a major obstacle to commercialization of PHAs. Thus, the objective of this work was to produce and characterize PHAs of the biomass of different microalgae, evaluating the extraction methods and cultivation strategies for greater biopolymer accumulation. Initially, the efficacy of six methods of PHA extraction from *Spirulina* sp. LEB-18 was evaluated considering the extraction yield, purity and properties (FTIR, molecular mass, crystallinity index and monomer composition) of the polymers. After 30 days of cultivation, 1.02 gL⁻¹ of biomass was obtained, yielding between 6.10 and 9.80% of PHAs and degrees of purity between 63.5 and 93.6%, depending on the extraction method used. The use of sodium hypochlorite at the initial extraction stage contributed to increased yield, and the use of methanol at the end of the process increased the purity of the biopolymers. The molecular mass, the crystallinity index and the composition of the PHAs varied with the extraction methods, demonstrating interference of the extraction process in the properties of the polymers. An indirect relationship ($R^2=0.80$) was found between the percentage of the 11-hydroxyhexadecanoate monomer and the degree of crystallinity of the PHAs, suggesting that the increase of medium and long chains in the PHA structure contributes to this. In the second stage, the influence of the nitrogen availability of the culture medium on the production and composition of biomass (chlorophyll, proteins, lipids and fatty acids) and PHA production and properties (FTIR, crystallinity index, TGA and DSC). *Chlorella minutissima* and *Synechococcus subsalsus* were cultivated in BG-11 medium and *Spirulina* sp. LEB-18 was grown in Zarrouk medium. The strains were grown in "standard" medium, containing all the constituents present in each culture medium, and in medium with reduction of 70% of nitrogen (limited medium). The cellular growth of microalgae was reduced in the limited nitrogen medium, as well as the biochemical composition of the biomass, with higher storage of carbonaceous molecules such as lipids and PHAs. *C. minutissima* did not synthesize PHA even in a limited nitrogen environment, unlike *S. subsalsus* (16% m / m dry biomass) and *Spirulina* sp. (12%). The PHAs presented different thermal and physical properties, evidencing the influence of the strain on the properties of the polymer, formed mainly by long chain monomers (C14 to C18). This composition is a scientific novelty, since it was not registered in PHAs synthesized by other microalgae. The PHAs obtained by the two microalgae can be used in several areas, with potential for the development of packages due to low crystallinity.

Keywords: cyanobacteria; biopolymers; microalgae; molecular mass.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1.1. Estrutura molecular geral dos PHAs, com $m = 1$ a 13, n variando de 100 a milhares de unidades e R variável (BRITO et al., 2011)..... 27
- Figura 1.2. Ciclo de produção e degradação dos PHAs de microalgas. 28
- Figura 1.3. Diagrama esquemático dos fatores bióticos e abióticos que afetam o crescimento das microalgas (RAZZAK et al., 2017). 35
- Figura 1.4. Esquema de conversão de CO₂ atmosférico em lipídios, proteínas, bioplástico, carboidratos, e outros bioprodutos produzidos por microalgas (KHAN et al., 2018). 43

CAPÍTULO II

- Figura 2.1. Espectros de FTIR dos PHAs produzidos por *Spirulina* sp. LEB-18 obtidos a partir dos diferentes métodos de extração. 68
- Figura 2.2. Difractogramas de raios-X dos PHAs produzidos por *Spirulina* sp. LEB-18 obtidos pelos diferentes métodos de extração..... 72
- Figura 2.3. Quantificação de compostos hidroxialcanoatos e não-hidroxialcanoatos presentes nos PHAs de *Spirulina* sp. LEB-18 obtidos pelos diferentes métodos de extração. 75

CAPÍTULO III

- Figura 3.1. Concentração celular durante os cultivos de *Chlorella minutissima* (A), *Synechococcus subsalsus* (B) e *Spirulina* sp. LEB-18 (C) em meio padrão e em meio limitado. 89
- Figura 3.2. Concentração de clorofila durante dos cultivos de *Chlorella minutissima* (A), *Synechococcus subsalsus* (B) e *Spirulina* sp. LEB-18 (C) em meio padrão e limitado. 92
- Figura 3.3. Produção de PHAs durante os cultivos de *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18. 94
- Figura 3.4. Derivadas termogravimétricas (DTGs) da biomassa das microalgas obtidas nos cultivos feitos em meio padrão e limitado. 97
- Figura 3.5. Espectros FTIR dos PHAs produzidos pelas cianobactérias *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18 cultivadas em meio limitado de nitrogênio. 100
- Figura 3.6. Derivadas termogravimétricas (DTGs) (A) e análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) (B) dos PHAs produzidos pelas cianobactérias *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18 cultivadas em meio limitado de nitrogênio. 102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.1. Propriedades físicas e térmicas de diferentes tipos de PHAs, do polipropileno e do polietileno de alta densidade.	32
Tabela 1.2. Efeito das condições de estresse na produção de bioprodutos por microalgas.	37
Tabela 1.3. Acúmulo de PHAs em microalgas em condições específicas de cultivo.....	38

CAPÍTULO II

Tabela 2.1. Métodos utilizados para extração dos biopolímeros.....	61
Tabela 2.2. Rendimentos de cada método de extração e pureza dos PHAs de <i>Spirulina sp.</i> LEB-18.....	65
Tabela 2.3. Massa molecular e índice de cristalinidade dos PHAs obtidos pelos diferentes métodos de extração.....	69
Tabela 2.4. Composição (% area/massa) determinada por GC-MS dos PHAs de <i>Spirulina sp.</i> LEB-18 obtidos a partir dos diferentes métodos de extração.....	73

CAPÍTULO III

Tabela 3.1. Curvas de crescimento padrão de cada microalga, em meio padrão e limitado, utilizada para quantificação de biomassa dos cultivos.....	82
Tabela 3.2. Produtividade máxima de biomassa e taxa de crescimento específico dos cultivos.	90
Tabela 3.3. Determinação de proteínas, lipídeos e PHAs nas biomassas após 20 dias de cultivo.	94
Tabela 3.4. Valores de T_{onset} , T_{decomp} e perda de massa da biomassa das microalgas obtidas nos cultivos feitos em meio padrão e limitado.	98
Tabela 3.5. Composição de ácidos graxos da biomassa das microalgas após os 20 dias de cultivo.....	99
Tabela 3.6. Massa molecular e propriedades termofísicas dos PHAs produzidos pelas cianobactérias <i>Synechococcus subsalsus</i> e <i>Spirulina sp.</i> LEB-18 cultivadas em meio limitado de nitrogênio.	101
Tabela 3.7. Composição (% area/massa) determinada por GC-MS de PHAs de <i>Synechococcus subsalsus</i> e <i>Spirulina sp.</i> LEB-18.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

PHAs	Polihidroxialcanoatos
PHA _{SCL}	Polihidroxialcanoatos de cadeia curta
PHA _{MCL}	Polihidroxialcanoatos de cadeia média
PHA _{LCL}	Polihidroxialcanoatos de cadeia longa
PHB	Polihidroxibutirato
PHBV	Polihidroxivalerato
PP	Polipropileno
P	Polietileno de alta densidade
T _m	Temperatura de melting
T _g	Temperatura de transição vítrea
UV	Ultravioleta
AcetilcoA	Acetil coenzima A
FTIR	Infra-vermelho com transformada de Fourier
ATR	Acessório de reflectância total atenuada
R	Rendimento
m _p	Massa de PHA
m _b	Massa de biomassa
M _m	Massa molecular
IR	Índice de refração
Tr	Tempo de retenção
% C	Índice de cristalinidade
I _c	Somatório das áreas dos picos cristalinos
I _a	Área do halo amorfo
DRX	Difração de raio-x
CG-MS	Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas
C	Concentração celular
Abs	Absorbância
P _x	Produtividade de biomassa
P _{max}	Produtividade máxima
μ _{max}	Taxa de crescimento específico

X_f	Concentração final de biomassa
X_o	Consentração inicial de biomassa
X	Biomassa
FAME	Estéres metílicos de ácidos graxos
T_{decomp}	Temperatura máxima de decomposição
T_{onset}	Temperatura inicial de decomposição
TGA	Análise termogravimétrica
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Derivada teermogravimétrica
T_m	Temperatura de fusão
ΔH_m	Entalpia de fusão
ANOVA	Análise de variância
MP	Meio padrão
ML	Meio limitado

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	16
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Referências	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 CAPÍTULO I	22
Microalgas como fonte de polihidroxialcanoatos (PHAs) – uma revisão.....	22
3.1 Resumo	22
3.2 Introdução.....	22
3.3 Biopolímeros microbianos.....	25
3.3.1 Polihidroxialcanoatos (PHAs)	25
3.3.2 Extração dos PHAs.....	29
3.3.3 Propriedades e composição dos PHAs	30
3.4 Cultivo de Microalgas	33
3.4.1 Fatores que influenciam o crescimento das microalgas e estimulam a produção de bioprodutos.....	34
3.5 Produção de PHAs por microalgas e vias biossintéticas	37
3.6 Potencial de produção de PHAs de microalgas em larga escala.....	42
3.7 Conclusão	45
3.8 Referências	46
4 CAPÍTULO II	57
Eficácia de métodos de extração de polihidroxialcanoatos (PHAs) de <i>Spirulina</i> sp. e influência na composição e propriedades do polímero	57
4.1 Resumo	57
4.2 Introdução.....	58
4.3 Material e Métodos	59
4.3.1 Microrganismo, meios e condições de cultivo.....	59
4.3.2. Métodos de extração.....	60
4.3.3 Rendimentos de extração.....	62
4.3.4 Propriedades dos PHAs	62
4.3.4.1 Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	62
4.3.4.2 Massa molecular (Mm).....	62

4.3.4.3 Difração de raio-x (DRX).....	63
4.3.4.4 Composição monomérica dos PHAs	63
4.3.5 Análise estatística.....	64
4.4 Resultados e Discussão	64
4.4.1 Rendimentos de extração.....	64
4.4.2 Propriedades dos PHAs	67
4.4.2.1 FTIR	67
4.4.2.2 Massa molecular.....	69
4.4.2.3 Difração de raio-x (DRX).....	71
4.4.2.4 Composição monomérica dos PHAs	72
4.5 Conclusão	75
4.6 Referências	75
5 CAPÍTULO III.....	79
Influência do nitrogênio no crescimento, composição de biomassa, produção e propriedades de polihidroxicanoatos (PHAs) de microalgas	79
5.1 Resumo	79
5.2 Introdução.....	80
5.3 Material e Métodos	81
5.3.1 Microrganismos, meios de cultivo e condições experimentais.....	81
5.3.2 Determinações analíticas	82
5.3.3 Parâmetros de crescimento	83
5.3.3.1 Produtividade de biomassa	83
5.3.3.2 Taxa máxima de crescimento específico	83
5.3.4 Caracterização da biomassa	84
5.3.4.1 Quantificação de proteínas e lipídeos.....	84
5.3.4.2 Composição de ácidos graxos das microalgas	84
5.3.4.3 Extração e quantificação dos PHAs	85
5.3.4.4 Análises termograviméticas (TGA).....	85
5.3.5 Caracterização dos PHAs	86
5.3.5.1 Infra-vermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	86
5.3.5.2 Massa molecular (Mm).....	86
5.3.5.3 Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	86
5.3.5.4 Composição monomérica dos PHAs	87
5.3.6 Análise estatística.....	87
5.4 Resultados e discussão	87

5.4.1 Crescimento e caracterização da biomassa.....	87
5.4.2 Caracterização dos PHAs	99
5.4.2.1 FTIR	99
5.4.2.2 Massa molecular (Mm).....	100
5.4.2.3 Caracterização térmica	101
5.4.2.4 Composição dos PHAs	103
5.5 Conclusões.....	104
5.6 Referências	105
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	110

APRESENTAÇÃO

A tese apresenta os resultados obtidos durante o desenvolvimento do Projeto de Pesquisa “Produção, extração e caracterização de polihidroxicanoatos (PHAs) da biomassa de microalgas”. O documento está dividido em três capítulos, onde cada capítulo refere-se a um artigo oriundo da tese. O primeiro Capítulo “Microalgas como fonte de polihidroxicanoatos (PHAs) – uma revisão” refere-se a um artigo de revisão que consolida as principais informações sobre a produção de PHAs por microalgas, com foco nas propriedades e composição dos biopolímeros, dando embasamento para um estudo sobre o potencial de utilização destes bioplásticos em substituição aos plásticos derivados do petróleo. O artigo foi publicado na revista *International Journal of Biological Macromolecules*.

O segundo Capítulo “Eficácia de métodos de extração de polihidroxicanoatos (PHAs) de *Spirulina* sp. e influência na composição e propriedades do polímero” refere-se à primeira parte da pesquisa, que foi publicada na revista *Algal Research*. Nessa parte da pesquisa, foram feitos um estudo e uma avaliação dos métodos empregados na extração dos biopolímeros da célula microbiana, verificando a influência de cada método na pureza, composição e propriedades dos biopolímeros obtidos. Dessa forma, foi possível selecionar o método mais eficaz para extração dos PHAs das microalgas.

O terceiro Capítulo “Influência do nitrogênio no crescimento, composição de biomassa, produção e propriedades de polihidroxicanoatos (PHAs) obtidos de microalgas” refere-se ao segundo artigo oriundo do projeto, que foi publicado na revista *International Journal of Biological Macromolecules*. O objetivo dessa etapa foi verificar se a deficiência de nitrogênio no meio de cultivo de três diferentes microalgas, estimularia a síntese de PHAs por esses microrganismos. Nessa etapa, também foi feita uma avaliação da influência da disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo, no crescimento celular, na composição da biomassa, na produção e nas propriedades dos PHAs obtidos durante o cultivo das três microalgas estudadas: *Chlorella minutíssima*, *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18.

A tese conta, ainda, com uma Introdução geral sobre o tema proposto na pesquisa e, com um tópico de Considerações Finais, após a apresentação dos capítulos.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e conseqüentemente, a maior utilização de produtos plásticos convencionais, tem gerado um acúmulo de enormes quantidades de resíduos de materiais não biodegradáveis em todo o planeta, o que gera uma grande preocupação ambiental. Atualmente, a nível mundial, utiliza-se 140 milhões de toneladas de plásticos por ano, e para seu processamento, emprega-se aproximadamente 150 milhões de toneladas de combustíveis fósseis que são difíceis de substituir. Os plásticos convencionais não biodegradáveis, não só levam muitas décadas para se decompor na natureza, como também produzem toxinas nocivas durante o seu processo de degradação (SURIYAMONGKOL et al., 2007; HEMPEL et al., 2011). Dessa forma, existe um interesse eminente na produção e obtenção de bioplásticos que possam ser facilmente degradados no ambiente, de forma não prejudicial, e que conduzam a uma redução do uso dos combustíveis fósseis.

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros sintetizados intracelularmente por bactérias e microalgas como forma de armazenamento de energia. As propriedades dos PHAs, como a absoluta resistência a água e a sua completa biodegradabilidade, sugerem que esses biopolímeros podem ser substitutos potenciais dos plásticos comuns comerciais. Inúmeros estudos já foram realizados com bactérias com o objetivo de obter PHAs com propriedades competitivas aos polímeros sintéticos, e com custos de produção que viabilizem sua aplicação industrial (ANDERSON e DAWES, 1990; LAYCOCK et al., 2013). Entretanto, os custos elevados com substratos e com o processo de extração desses biopolímeros ainda se configuram como um grande entrave para sua comercialização, visto que são aproximadamente cinco vezes mais altos que os custos envolvidos na obtenção dos polímeros sintéticos.

Dessa forma, a produção de PHAs a partir de microalgas pode se caracterizar como uma ferramenta importante para redução dos custos de obtenção dos bioplásticos e com isso, fornecer uma maior competitividade frente aos sintéticos. As microalgas são organismos fotossintetizantes que utilizam a luz como principal fonte de energia, e o CO₂ como principal fonte de carbono para seu crescimento e reprodução. Além disso, possuem exigências nutricionais mínimas para crescimento, sendo por isso, consideradas como uma fonte promissora para produção de PHAs. O consumo de CO₂ por esses microrganismos também se configura como um importante papel ambiental, de forma que podem minimizar o efeito estufa provocado pela liberação desse gás pelas diferentes indústrias. Com isso, a produção de PHAs pelas microalgas, além de contribuir para redução do uso de recursos fósseis, também reduz as

emissões de dióxido de carbono no ambiente, o que se constitui como um importante benefício ambiental (RANJANA e NIRUPAMA, 2015; COSTA et al., 2018).

A biotecnologia das microalgas tem sido desenvolvida para diferentes aplicações comerciais. Em 1969 surgiu a primeira fábrica de processamento de *Spirulina* para comercializar a biomassa para consumo como alimento ou suplemento, e entre 2004 e 2013, a produção mundial de biomassa de microalgas atingiu cerca de 15 mil ton/ano (peso seco). Algumas espécies cultivadas são usadas também como fonte de pigmentos e antioxidantes, como os carotenoides astaxantina, cantaxantina e betacaroteno, cujo valor de mercado pode atingir US\$ 8 mil por quilo. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6 produzidos a partir de microalgas compõem formulações nutricionais infantis e suplementos dietéticos (BRASIL e GARCIA, 2016, SINGH e GU, 2010).

Ao contrário da produção de microalgas para fins alimentícios, a produção de biocombustíveis e de bioplásticos PHAs de microalgas ainda não ocorrem em escala comercial, apesar de existir muitas empresas com essa finalidade, e em diferentes estágios de implantação, a depender do país. Entre 23 empresas que produzem combustíveis de microalgas em escala piloto, a maioria estão nos USA (78%), 13% são européias, e 9% são de outros lugares. A biomassa microalgal é obtida via cultivo autotrófico e/ou heterotrófico com o uso de fotobiorreatores abertos ou fechados, sem a necessidade de terras agricultáveis (BLEAKLEY e HAYES, 2017; KHAN et al., 2018).

As microalgas apresentam crescimento acelerado e composição química bastante diversificada, com maior concentração e produtividade de bioprodutos (lipídios, bioplástico, carboidratos, proteínas, entre outros), quando comparado às biomassas tradicionalmente utilizadas. A composição está relacionada à natureza de cada espécie de microalga, bem como aos fatores ambientais e ao meio de cultivo utilizado. A formação de cada composto no interior da célula de microalga é regulada por complexos mecanismos metabólicos (HOSSAIN et al., 2008; NOREEN et al., 2016).

Os métodos de extração dos bioplásticos de PHAs e as rotas bioquímicas envolvidas na sua biosíntese por microalgas, precisam ser estudados e elucidados. Neste contexto, deve-se identificar quais as espécies e estratégias de cultivo das microalgas podem ser empregadas para concentrar o biopolímero, e os métodos de extração desses polímeros que são mais promissores para obtenção de PHAs com propriedades adequadas para sua comercialização e aplicação industrial. Ao contrário dos estudos de produção de PHAs com bactérias, os estudos de estimulação de síntese de PHAs pelas microalgas ainda são considerados incipientes COSTA

et al., 2018). Ainda assim, está claro que as microalgas têm potencial para produção de biopolímeros com menor custo, e com isso, podem desempenhar um papel vital com relação a diminuição dos problemas ambientais.

1.1 REFERÊNCIAS

ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450–472, 1990.

BLEAKLEY, S.; HAYES, M. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. **Foods**, v. 6, p. 1-34, 2017.

BRASIL, B. S. A. F.; GARCIA, L. C. Microalgas: alternativas promissoras para a indústria. **Agroenergia em Revista**, v. 10, p. 1-60, 2016.

COSTA, S.S.; MIRANDA, A.L.; ASSIS, D.J.; SOUZA, C.O.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; DRUZIAN, J.I. Efficacy of *Spirulina* sp. polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition. **Algal Research**, v. 33, p. 231–238, 2018.

HEMPEL, F.; BOZARTH, A.S.; LINDENKAMP, N.; KLINGL, A.; ZAUNER, S.; LINNE, U.; STEINBUHEL, A.; MAIER, U.G. Microalgae as bioreactors for bioplastic production. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 81-87, 2011.

HOSSAIN, A.B.M.S.; SALLEH, A.; BOYCE, A.N.; CHOWDHURY, P.; NAQUIUDDIN, M. Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, p. 250-254, 2008.

KHAN, I.; SHIN, J.H.; KIM, D.J. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, 36, 1-21, 2018.

LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 536–583, 2014.

NOREEN, A.; ZIA, K.M.; ZUBER, M.; ALI, M.; MUJAHID, M. A critical review of algal biomass: A versatile platform of bio-based polyesters from renewable resources. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 937–949, 2016.

RANJANA, B.; NIRUPAMA, M. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: Process optimization and polymer characterization. **Algal Research**, v. 7, p. 78–85, 2015.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 2596-2610, 2010.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S.
Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms
and plants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 148–175, 2007.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar a eficácia de diferentes métodos de extração de polihidroxialcanoatos e a eficácia da estratégia de redução de nitrogênio do meio de cultivo de diferentes cepas de microalgas, na maior produção do bioplástico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fornecer um estudo de revisão sobre a produção de PHAs por microalgas, verificando o potencial de utilização destes bioplásticos em substituição aos plásticos derivados do petróleo;
- Avaliar a eficácia de seis métodos de extração de PHAs da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 com base nos rendimentos de extração, grau de pureza dos polímeros, e propriedades do bioplástico;
- Caracterizar os PHAs extraídos da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 por diferentes métodos, avaliando a influência do processo de extração nas características dos biopolímeros;
- Determinar o método mais eficaz para a extração dos PHAs da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB-18;
- Avaliar a influência da disponibilidade de nitrogênio nos meios de cultivo das microalgas *Chlorella minutíssima*, *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18, no crescimento, na composição bioquímica da biomassa e na produção de PHAs;
- Caracterizar os biopolímeros sintetizados pelas microalgas por meio de análises térmicas, físicas e de composição;
- Identificar a microalga com potencial para obtenção de PHAs com características mais favoráveis à sua aplicação industrial.

3 CAPÍTULO I

MICROALGAS COMO FONTE DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS) – UMA REVISÃO

Artigo publicado em 2019

Revista International Journal of Biological Macromolecules

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.099>

3.1 RESUMO

Polihidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros sintetizados e acumulados por diferentes microrganismos, quando estão sob alguma condição limitante do crescimento celular. Os PHAs são considerados potenciais substitutos dos plásticos derivados do petróleo, pois possuem propriedades mecânicas similares as dos polímeros sintéticos, podem ser processados de maneira similar e são totalmente biodegradáveis. Atualmente, os PHAs comerciais são produzidos em fermentadores utilizando bactérias heterotróficas e grandes quantidades de fontes de carbono orgânico e sais nos meios de cultivo, responsáveis por aproximadamente 50% dos custos totais de produção. Uma maior aplicação comercial do PHA está limitada a diminuição do custo de produção. As microalgas são um tipo de microrganismos que podem ser usados para obter PHAs a um custo menor, pois possuem requisitos mínimos de nutrientes para crescimento e possuem natureza fotoautotrófica, ou seja, utilizam luz e CO₂ como principais fontes de energia. Dessa forma, este trabalho tem por objetivo fornecer uma revisão sobre a produção de PHAs de diferentes microalgas, com foco nas propriedades e composição dos biopolímeros, verificando o potencial de utilização destes bioplásticos em substituição aos plásticos derivados do petróleo. Estudos de estimulação da síntese de PHAs por microalgas ainda são considerados incipientes, e os PHAs obtidos estão longe de serem comercializados. Ainda assim, está claro que as microalgas têm o potencial de produzir biopolímeros com menor custo e podem desempenhar um papel vital no meio ambiente.

Palavras-chave: cianobactérias; nitrogênio; microrganismos; bioplástico.

3.2 INTRODUÇÃO

Plásticos convencionais derivados de petróleo ganharam atenção substancial desde 1940 e se tornaram os materiais mais amplamente utilizados em todo o mundo, substituindo a

madeira, o vidro, os materiais de construção e metais, em várias aplicações industriais e domésticas (LEE et al. 1991; CAIN, 1992; POIRIER et al., 1995; LEE, 1996; SINGH et al., 2016). Os plásticos têm propriedades altamente desejáveis como leveza, robustez, durabilidade e resistência à degradação (ANJUN et al., 2016). No entanto, suas numerosas aplicações e ampla utilização, principalmente como embalagem, contribuem para a maior parte do plástico descartado como lixo ou detrito no mundo (RIVARD et al. 1995; WITT et al., 1997; MULLER et al., 2001; RAY e BOUSMINA, 2005).

Cerca de 140 milhões de toneladas de plástico são utilizadas a cada ano em todo o mundo, o que exige o processamento de aproximadamente 150 milhões de toneladas de combustíveis fósseis e dá origem a imensas quantidades de resíduos que podem levar milhares de anos para se decompor na natureza (SURIYAMONGKOL et al., 2007; HEMPEL et al., 2011). Uma vez descartados no meio ambiente, os plásticos apresentam sérios desequilíbrios ambientais devido à sua persistência por vários anos, pois são extremamente resistentes à degradação microbiana (ALEXANDER, 1981; SINGH et al., 2016). Sendo flutuante, eles podem, ainda, ser dispersos por longas distâncias e persistir por séculos em sedimentos (ALEXANDER, 1981; RYAN, 1987; HANSEN, 1990; GOLDBERG, 1997; SINGH et al., 2016). Nas próximas décadas, estima-se que o aumento do consumo de plástico deverá continuar até 2020 (CRANCK et al., 2004; ANJUN et al., 2016).

Segundo Anjun et al (2016), os métodos utilizados para o descarte de materiais plásticos são desafiadores. Nos aterros, as taxas de degradação são tremendamente baixas. A incineração gera subprodutos tóxicos e caros. A reciclagem pode ser feita, mas é um processo muito demorado e também causa alteração nas propriedades dos materiais plásticos. Além disso, a presença de aditivos como revestimentos e pigmentos limita o uso do material reciclado (CASTILHO et al., 2009). Consequentemente, os bioplásticos a base de biopolímeros, são uma alternativa viável para substituição dos plásticos sintéticos, pois não utilizam recursos fósseis e podem ser facilmente biodegradados. Até agora, no entanto, os custos de produção dos polímeros derivados do petróleo ainda são mais baixos do que as alternativas biodegradáveis, o que se configura como um obstáculo ao desenvolvimento comercial de alternativas ambientalmente amigáveis (HEMPEL et al., 2011).

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são bioplásticos promissores, pois suas propriedades mecânicas são similares as do polipropileno e podem ser processados de maneira similar, incluindo o processamento por extrusão e moldagem por injeção (KHOSRAVI-DARANI et al., 2013), com total biodegradabilidade. Eles são degradados de forma relativamente rápida pelos

organismos do solo, permitindo uma fácil compostagem do material residual (TROSCHL et al., 2017).

Atualmente, os PHAs são produzidos em grandes fermentadores por bactérias heterotróficas, como *Cupriavidus necator* (RIBEIRO et al., 2015; CAMPOS et al., 2014) e *Escherichia coli* recombinante (CHEN et al., 2009). Para esses processos de cultivo, são necessárias grandes quantidades de fontes de carbono orgânico, como a glicose, e sais minerais, responsáveis por aproximadamente 50% dos custos totais de produção (HALAMI et al., 2008; TROSCHL et al., 2017). De acordo com Balaji et al (2013), o uso industrial do PHA produzido pela fermentação bacteriana como um polímero é limitado pelo seu alto custo de produção comparado a alguns plásticos derivados de petróleo amplamente utilizados.

Uma maneira alternativa de produzir PHA é o uso de biomassa celular de microalgas procarióticas, conhecidas como cianobactérias (COSTA et al., 2018a; COSTA et al., 2018b). Como parte do fitoplâncton, elas são produtoras de biomassa utilizando a luz e o CO₂ atmosférico como únicas fontes de energia (TING et al., 2002; NOREEN et al., 2016).

As microalgas são um tipo de microrganismos que podem ser usados para obter PHAs a um custo mais baixo. Isto é possível porque as microalgas têm requisitos mínimos de nutrientes e possuem natureza fotoautotrófica; estes procariontes acumulam PHAs pela fotossíntese oxigenada (FREITAS et al., 2017; SUNDARAMOORTHY et al., 2013; COSTA et al., 2018a). Segundo Costa et al. (2018a), além de reduzir os custos de produção, é necessário melhorar as características do polímero para aumentar sua processabilidade e competitividade de mercado dos PHAs. Assim, é fundamental conhecer as propriedades dos biopolímeros obtidos, verificando suas possíveis aplicações industriais (RIBEIRO et al., 2015). Diversos estudos já foram desenvolvidos com o objetivo de obter PHAs de diferentes espécies de microalgas (BALAJI et al., 2013; COSTA et al., 2018a; COSTA et al., 2018b; NOREEN et al., 2016), no entanto, poucos abordam as propriedades dos PHAs obtidos em comparação com polímeros sintéticos, e fornecem uma visão dos mecanismos envolvidos na síntese de biopolímeros por microalgas.

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo fornecer uma revisão sobre a produção de PHAs de diferentes microalgas, com foco nas propriedades e composição dos biopolímeros, verificando o potencial de utilização destes bioplásticos em substituição aos plásticos derivados do petróleo.

3.3 BIOPOLÍMEROS MICROBIANOS

Os biopolímeros microbianos são polímeros naturais que são sintetizados e catabolizados por vários organismos, que não causam efeitos tóxicos no hospedeiro e têm certas vantagens sobre os plásticos derivados do petróleo (ANJUN et al., 2016). Os biopolímeros são novos e promissores devido ao seu potencial de utilização e rápida degradação por microrganismos, incluindo bactérias (SURIYAMONGKOL et al., 2007). Esses biopolímeros se acumulam como materiais de armazenamento em células microbianas sob condições de estresse (SINGH et al., 2016).

3.3.1 Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres sintetizados e acumulados por diferentes microrganismos, geralmente quando entram na fase estacionária de crescimento (MENDHULKAR e SHETYE, 2017). Os PHAs formam inclusões intracelulares e podem ser sintetizados para armazenar carbono e energia, podendo atingir 80% do peso celular (COSTA et al., 2018b). Eles são sintetizados intracelularmente como inclusões citoplasmáticas insolúveis, na presença de excesso de carbono, quando outros nutrientes essenciais, como oxigênio, fósforo ou nitrogênio são limitados. Esses materiais poliméricos podem ser armazenados em altas concentrações dentro da célula, uma vez que não alteram substancialmente seu estado osmótico (ANDERSON e DAWES, 1990; LAYCOCK et al., 2013).

Essas inclusões são geralmente esféricas, com diâmetros médios de 0,2-0,7 μm , são circundadas por uma membrana de 2 nm composta por cerca de 2% de proteína e 0,5% de lipídios. Os grânulos são envolvidos por uma camada fosfolipídica, por polimerases, despolimerases e proteínas citosólicas inespecíficas (SUDESH et al., 2000). Segundo Luengo et al. (2003), a função da monocamada de fosfolipídios não está bem estabelecida, embora seja necessária para evitar a transição do poliéster de estado amorfo para o estado cristalino, que é mais estável e poderia provocar o rompimento celular.

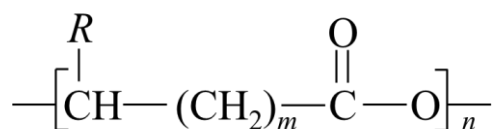
Grage et al. (2009), em seu estudo sobre grânulos de polihidroxialcanoato bacteriano, confirmaram a existência de uma camada fosfolipídica em preparações de PHA. Além da monocamada de fosfolipídios, os autores acreditam que os grânulos consistem em um núcleo de poliéster, circundados por uma camada limite com proteínas incorporadas ou aderidas, que incluem a PHA sintase, as enzimas de polimerização e as proteínas reguladoras. Apesar das

evidências, a ocorrência *in vivo* de um revestimento de fosfolipídio ainda não foi estabelecida. Vários dados colocaram em questão a ocorrência real da camada lipídica *in vivo* (POTTER e STEINBUCHER, 2006; JENDROSSEK e PFEIFFER, 2014), especificamente a partir dos estudos de microscopia de fluorescência, segundo os quais a existência do revestimento lipídico pode se desenvolver a partir de um artefato experimental na extração e preparação do PHA (BRESAN et al., 2016).

Segundo Singh et al. (2016), os PHAs sintetizados microbiologicamente mostraram um potencial considerável para várias aplicações nos campos de (i) produtos farmacêuticos: liberação controlada e sistemas de administração de fármaco; (ii) agricultura: descarga regulamentada de pesticidas, reguladores de crescimento de plantas e herbicidas, fertilizantes; (iii) biocombustível: o éster metílico de 3-hidroxi butirato e os ésteres metílicos de 3-hidroxi alcanoato de cadeia média (MCL) podem ser utilizados como biocombustíveis; (iv) medicina: PHAs podem ser explorados para o desenvolvimento de suturas absorvíveis, placas ósseas, pinos cirúrgicos, filmes e grampos, suportes de medula óssea, dispositivos de reparo de tendões, implantes de células oculares, substitutos de pele, válvulas cardíacas, tecidos cardiovasculares, enxertos vasculares, aplicações em engenharia de tecidos, guias nervosos, barreiras de adesão, etc; (v) descartáveis: os PHAs poderiam ser utilizados para a fabricação de aparelhos de barbear, bandejas para alimentos, fraldas, produtos de higiene, utensílios, embalagens de cosméticos, copos, roupas cirúrgicas médicas, estofados, carpetes, embalagens, sacos e tampas compostáveis, etc; e (vi) cromatografia: os PHAs podem ter aplicação em fase estacionária para colunas cromatográficas.

Os PHAs são polímeros termoplásticos predominantemente lineares, com ácido hidroxi alcanoico como unidades monoméricas, onde o grupo carboxila de uma unidade monomérica forma uma ligação éster com o grupo hidroxila da unidade monomérica adjacente (MADISON e HUISIMAN, 1999; SINGH et al., 2016). Eles são descritos pela fórmula estrutural da Figura 1.1, onde “n” pode atingir 35.000 monômeros. Cada unidade monomérica de PHA possui um grupo R de cadeia lateral que pode diferir de um átomo de hidrogênio a metil a tridecil (MADISON e HUISIMAN, 1999; LU et al., 2009).

Figura 1.1. Estrutura molecular geral dos PHAs, com $m = 1$ a 13, n variando de 100 a milhares de unidades e R variável (BRITO et al., 2011).



m = 1:	R = hidrogênio;	Poli(3-hidroxiopropionato)
	R = metil;	Poli(3-hidroxiбутирато) [P(3HB)]
	R = etil;	Poli(3-hidroxiуалерато)
	R = propil;	Poli(3-hidroxiгексаноато)
	R = nonil;	Poli(3-hidroxiдодеcanoато)
m = 2:	R = hidrogênio;	Poli(4-hidroxiбутирато)
	R = metil;	Poli(4-hidroxiуалерато) [P(4HV)]
m = 3:	R = hidrogênio;	Poli(5-hidroxiуалерато)
	R = metil;	Poli(5-hidroxiгексаноато) [P(5HHx)]
m = 4:	R = hexil;	Poli(6-hidroxiдодеcanoато)
m = 9:	R = hidroxila;	Poli(11-hidroxiгексадеcanoато) [P(11HHD)]
m = 12:	R = hidrogênio;	Poli(14-hidroxitетрадеcanoато) [P(14HTD)]
m = 13:	R = hidroxila	Poli(15-hidroxiпентадеcanoато) [P(15HPD)]

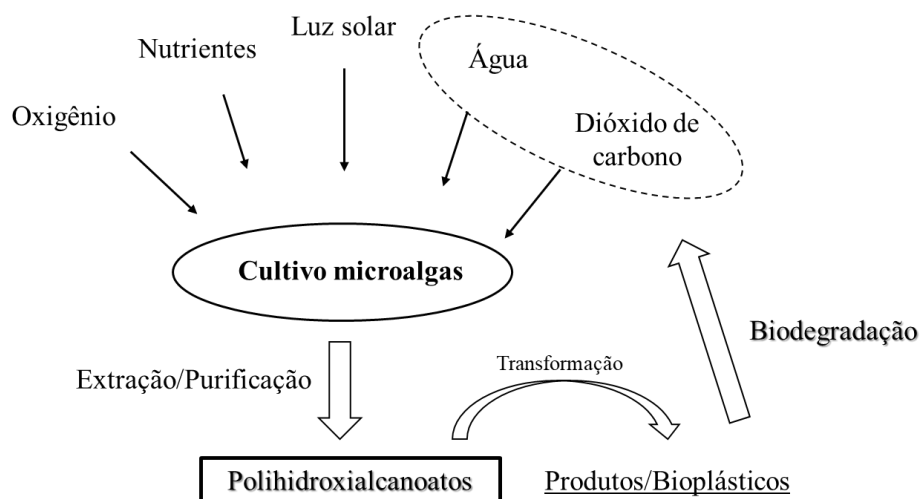
A cadeia lateral dos PHAs, normalmente possui um grupo alquila saturado, mas também pode conter a rara estrutura química de grupos alquila insaturados, aromáticos, ramificados, halogenados, epoxidados e substituídos (ANJUN et al., 2016; SINGH et al., 2016; MEIXNER et al., 2018). Nas cadeias laterais dos PHAs, os substituintes podem ser quimicamente alterados como resultado da ligação cruzada de ligações insaturadas (SINGH et al., 2016).

Os bioplásticos de PHAs são classificados de acordo com o número de átomos de carbono que compõem o grupo funcional em três grupos principais: PHAs consistindo de unidades de ácidos hidroxiálcanóicos de cadeia curta (PHA_{SCL}), ou seja, aqueles com uma cadeia de carbono de 3 a 5 átomos de carbono, PHAs constituídos de ácidos hidroxiálcanóicos de cadeia média (PHA_{MCL}) com 6 a 14 átomos de carbono na cadeia, e PHAs constituídos de ácidos hidroxiálcanóicos de cadeia longa (PHA_{LCL}) com mais de 15 átomos de carbono (ANJUN et al., 2016; TROSCHL et al., 2017, QUINES et al., 2005). A diferença entre essas classes é devida principalmente à especificidade do substrato das PHAs sintases que podem “aceitar” 3 hidroxiácidos de uma certa faixa de comprimento de carbono. Dependendo do substrato utilizado e do metabolismo do microrganismo, diferentes monômeros e, portanto, diferentes polímeros e copolímeros podem ser obtidos (SQUIO e ARAGÃO, 2004). Em geral, PHA_{SCL} tem propriedades próximas aos plásticos convencionais, enquanto os PHA_{MCL} são considerados como elastômeros e borrachas (SURIYAMONGKOL et al., 2007).

O poli-3-hidroxi-butarato (PHB) é um tipo bem conhecido de PHAs de cadeia curta sendo explorado comercialmente. O maior obstáculo na produção comercial dos PHAs é o alto custo dos processos de fermentação bacteriana, que tornam o bioplástico bacteriano mais caro do que os polímeros derivados do petróleo, como o polipropileno e o polietileno (MENDHULKAR e SHETYE, 2017). Segundo Singh et al. (2016), os bioplásticos de PHAs são quase 5 vezes mais caros que os plásticos de polipropileno. Os gastos com as fontes de carbono usados no processo de produção de biopolímeros representam 47% do custo total e é o fator que mais contribui para aumentar os preços dos PHAs. Por isso, Van-Thuoc et al. (2008) argumentam que estratégias de cultivo com alta produtividade de PHAs e emprego de fontes de carbono de baixo custo são essenciais para a viabilidade econômica dessa atividade.

Mais de 100 cepas de microalgas foram testadas até o momento para produção de PHAs; aproximadamente 70% destas cepas contêm PHAs em concentrações variando de 0,04 a 40% do peso seco das células em condições de crescimento fotoautotrófico (RANJANA e NIRUPAMA, 2015; COSTA et al., 2018a). A Figura 1.2 apresenta um esquema de resumo do biociclo de produção e degradação de PHAs produzidos por microalgas, que demonstra como a produção de PHAs por esses organismos pode ser ambientalmente satisfatória.

Figura 1.2. Ciclo de produção e degradação dos PHAs de microalgas.



Neste ciclo através da fotossíntese, as microalgas usam a luz solar, dióxido de carbono, água e nutrientes para produzir os PHAs que são extraídos, purificados e processados nos mais diversos artigos de plástico. Após seu uso, os PHAs podem ser depositados em ambientes microbianos ativos e a biodegradação desse polímero formará dióxido de carbono e água, que serão novamente consumidos por microalgas (RIBEIRO, 2014).

3.3.2 Extração dos PHAs

A extração dos PHAs a partir da célula microbiana é um passo fundamental na obtenção desses biopolímeros, uma vez que pode influenciar suas características e, conseqüentemente, sua aplicação industrial. Por ser um produto acumulado intracelularmente no citoplasma das células dos microrganismos, os PHAs devem ser extraídos das células após o estágio de produção (cultivo) (COSTA et al., 2018a). Desta forma, o tratamento da biomassa, após o cultivo para a extração dos PHAs acumulados, é uma etapa muito importante, pois pode levar a mudanças nas propriedades do produto final (MADKOUR et al., 2013).

Em geral, o processo de extração de PHAs envolve as etapas de tratamento de desestabilização e/ou ruptura celular, recuperação e purificação de biopolímeros. Nestas etapas, métodos químicos, físicos e biológicos, ou mesmo uma combinação desses métodos, podem ser aplicados para garantir um produto com alta pureza e com características físicas e térmicas preservadas (QUINES et al., 2015).

O processo de extração de PHAs começa com a etapa de separação do material sólido, composto de células com biopolímero intracelular, a partir do caldo de cultivo, que geralmente é realizado por centrifugação. Posteriormente, ocorre o estágio de desestabilização e/ou ruptura da parede celular microbiana, que pode ser feito por métodos químicos, físicos ou biológicos (KAPRITCHKOFF et al., 2006; COSTA et al., 2018a). Após a ruptura ou desestabilização da parede celular, é formada uma suspensão consistindo de biopolímero, células com biopolímero (células que desestabilizaram, mas não romperam as paredes celulares) e detritos celulares (mistura de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e fragmentos de parede celular). O próximo passo é recuperar o biopolímeros. Essa etapa também pode ser realizada usando métodos químicos, biológicos e físicos, ou com o uso de métodos combinados, tais como físicos e químicos, biológicos e químicos, entre outros. O processo é finalizado após a recuperação do biopolímero por sedimentação (centrifugação) ou por precipitação (FIORESE et al., 2009; GHATNEKAR et al., 2002; QUINES et al., 2015).

Os métodos químicos empregados na extração dos PHAs das células dos microrganismos envolvem o uso isolado ou combinado de solventes. Os solventes mais comumente utilizados são clorofórmio, acetona, metil isobutil cetona, cloreto de metileno, carbonato de propileno, acetato de etila e álcool isoamílico (COSTA et al., 2018a). A fim de determinar a eficiência do processo de extração e a qualidade do produto, é necessário avaliar o tempo de contato e a temperatura de aquecimento do polímero com o solvente (FIORESE et al., 2009; RIEDEL et al., 2012).

Os métodos físicos mais comuns aplicados na extração de PHAs são aqueles que usam os moinhos homogeneizador e o ultrassom. Normalmente estes métodos são aplicados no início do processo de extração, com o objetivo de desestabilizar e romper a membrana celular dos microrganismos. Os métodos mecânicos de extração, quando comparados aos químicos, conferem melhores propriedades térmicas ao polímero, além de serem mais econômicos e menos tóxicos (MIDDELBERG, 1995). A aplicação do método mecânico para a extração de biopolímeros aumentará seu potencial de recuperação se estiver associado a um método químico adequado, que permita uma alta recuperação dos PHAs no processo de extração sem promover mudanças significativas em suas características (QUINES et al., 2015).

O método biológico de extração de PHAs microbianos é um processo complexo que é baseado na aplicação de enzimas, como lisozimas, nucleases e proteases, para a recuperação do biopolímero. As enzimas são adicionadas ao caldo de cultivo para hidrolisar as células contendo PHAs. Essa técnica é atraente devido às condições brandas de operação, à alta seletividade das enzimas na hidrólise das proteínas da parede celular dos microrganismos, sem atuar na degradação do polímero, e à qualidade do polímero recuperado (KAPRITCHKOFF et al., 2006; SUZUKI et al., 2008).

Segundo Quines et al. (2015), métodos biológicos e físicos são uma alternativa positiva para a extração de PHAs, uma vez que não há necessidade de inserir substâncias químicas no processo, mas apresentam resultados de recuperação de polímero menores do que os encontrados em outros métodos. Por outro lado, esses métodos têm sua eficácia aumentada quando combinados com químicos. A combinação de métodos de extração tem potencial neste contexto, pois facilita a ruptura celular, a recuperação dos polímeros e reduz o tempo de processamento, bem como a aplicação de produtos químicos tóxicos. De acordo com Costa et al. (2018a), o método empregado na extração dos PHAs interfere diretamente nas propriedades dos polímeros, como massa molecular, índice de cristalinidade, grau de pureza, temperatura de decomposição térmica e composição monomérica, sendo de grande importância para obtenção do polímero. A maior evidência dessa interferência é o fato dos PHAs dentro das células dos microrganismos ser amorfo e, dependendo do método empregado na sua extração, torna-se mais ou menos cristalino, o que pode determinar sua aplicação industrial.

3.3.3 Propriedades e composição dos PHAs

Os PHAs têm propriedades similares às dos plásticos convencionais, devido à grande diversidade química de seus radicais (POLI et al., 2011). Esses polímeros podem variar de

termoplásticos rígidos e quebradiços a elastômeros, borrachas e adesivos, dependendo de sua composição monomérica (LOCATELLI, 2012). Eles têm um grau de polimerização de até 30.000, confirmado pelas massas moleculares altas que normalmente possuem. Como resultado do aumento no comprimento da cadeia, ou aumento no número de co-monômeros num copolímero, a sua elasticidade aumenta e, assim, os PHAs possuem propriedades diferentes de acordo com a sua composição monomérica (FORMOLO et al., 2003).

As propriedades físicas mais estudadas dos PHAs são massa molecular, propriedades térmicas e índice de cristalinidade, pois são determinantes para a processabilidade do polímero. A massa molecular e a distribuição da massa molecular de um polímero são características importantes para sua adequação comercial, sendo que polímeros com massa molecular menor que 4×10^4 Da têm suas propriedades mecânicas deterioradas (SIM et al., 1997; TAIDI et al., 1995).

A massa molecular dos PHAs varia de 2×10^5 a 3×10^5 Da, dependendo do tipo e da espécie microbiana utilizada e das condições de crescimento, como pH, condições e modos de cultivo, e tipo e concentração da fonte de carbono (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005). O método de extração empregado também pode interferir na massa molecular dos PHAs (COSTA et al., 2018a). Laycock et al. (2013) sugeriram que a distribuição da massa molecular está associada às propriedades de uso final dos biopolímeros através do controle estrutural de macromoléculas. As propriedades dos PHAs dependem do tamanho das cadeias poliméricas, cujos rearranjos estruturais podem depender do grau de polimerização (COSTA et al., 2018b).

As propriedades térmicas de um polímero (T_m - temperatura de fusão, T_g - temperatura de transição vítrea), bem como propriedades como cristalinidade e tempo de cristalização, definem algumas propriedades mecânicas do material à temperatura ambiente, sendo também parâmetros úteis para o processamento térmico do material (CAMPOS, 2013). Os PHAs exibem uma temperatura de fusão de 50 a 180°C e uma cristalinidade que varia de 30 a 70%, dependendo da composição do polímero (REHM, 2010). Segundo Assis et al. (2016), PHAs com cristalinidade entre 60 e 80% são considerados rígidos. Os PHAs flexíveis e mais elásticos têm comprimentos de cadeia média (30–40%) e curta (30%), respectivamente. O menor grau de cristalinidade aumenta o número de possíveis aplicações industriais de PHAs, melhorando suas características de processamento. Segundo Laycock et al. (2013), um claro entendimento das relações entre a cristalinidade dos PHAs e a composição do polímero, auxiliará no desenvolvimento de polímeros com as características desejadas.

Os PHAs mais comuns são polímeros semicristalinos, que possuem propriedades mecânicas comparáveis às do polipropileno e do polietileno, embora sejam mais frágeis e menos resistentes aos solventes (REHM, 2010). A Tabela 1.1 apresenta as propriedades físicas do PHB e seus copolímeros, como o polihidroxivalerato (PHBV), que podem ser comparados às propriedades dos polímeros sintéticos de polipropileno e polietileno de alta densidade.

Tabela 1.1. Propriedades físicas e térmicas de diferentes tipos de PHAs, do polipropileno e do polietileno de alta densidade.

Propriedades	PHB	PHBV	PP	PEAD
Temperatura de fusão (°C)	180	150 – 172	174	125 - 132
Cristalinidade (%)	60 – 80	30 – 40	68	60 - 80
Módulo de elasticidade (MPa)	3500	1500 – 2500	1700	1000
Resistência a ruptura (%)	6	8 – 35	400	12
Massa molecular (KDa)	500	300	200	200 - 600

Fonte: COUTINHO et al. (2003), FORMOLO et al. (2003) e DOMÍNGUEZ-DÍAZ et al. (2015). PHB – polihidroxibutirato; PHBV – polihidroxivalerato; PP – polipropileno; PEAD – polietileno de alta densidade.

As propriedades dos PHAs, que incluem origem natural, biodegradabilidade, biocompatibilidade, pureza óptica e termoplaticidade, fazem dele uma alternativa adequada aos plásticos sintéticos (FUKADA e ANDO, 1986). Eles são hidrofóbicos, insolúveis em água, inertes e indefinidamente estáveis no ar, e também são termoplásticos e/ou elastoméricos, não-tóxicos e possuem pureza muito alta dentro da célula (LAYCOCK et al., 2013; POTTER e STEINBUCHER, 2005; HAZER e STEINBUCHER, 2007). Os PHAs têm uma resistência muito melhor à degradação por luz ultravioleta (UV) do que o polipropileno, mas é menos resistente a solventes.

Os PHAs podem ser degradados por numerosos microrganismos em vários ambientes. Em condições aeróbicas, a degradação dos PHAs resulta na formação de dióxido de carbono e água, enquanto que, sob condições anaeróbicas, produz dióxido de carbono e metano (BALAJI et al., 2013). O tempo de degradação varia de meses (digestão anaeróbica) a anos (ambiente marinho) e depende de vários fatores, como área de superfície, atividade microbiana do meio ambiente, pH, temperatura, umidade, presença de outros nutrientes e características do polímero, como composição e cristalinidade (SUDESH et al., 2000).

Devido à sua alta densidade, os PHAs não flutuam nos sistemas aquáticos e, portanto, uma vez descartados nesses ambientes, eles afundam e são degradados na superfície dos sedimentos por mecanismos biogeoquímicos (BALAJI et al., 2013). Em geral, a biodegradação

dos polímeros ocorre por dois mecanismos distintos: o primeiro é a hidrólise biótica ou abiótica seguida de bioassimilação (hidrobiodegradação), processo primário envolvido na biodegradação de heterocompósitos poliméricos como celulose, amido e poliésteres alifáticos, dos quais os PHAs são típicos, e o segundo é a peroxidação seguida pela bioassimilação de produtos de baixa massa molecular (oxibiodegradação), que é aplicada, em particular, à cadeia de carbono dos polímeros. Apesar de sua rápida biodegradabilidade, os PHAs não se degradam sob condições normais de armazenamento e são extremamente estáveis no ar (SUDESH et al., 2000).

A composição monomérica dos PHAs é extremamente dependente das condições de cultivo e da cepa produtora, e está diretamente relacionada às propriedades dos polímeros e suas possíveis aplicações industriais (COSTA et al., 2018b). Embora as bactérias sejam capazes de acumular maior quantidade de PHAs, os polímeros obtidos são formados, em maior porcentagem, por monômeros com 4 a 10 átomos de carbono (CAMPOS et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015). Essas porcentagens elevadas desses monômeros fazem com que os PHAs apresentem propriedades que dificultam sua aplicação industrial.

Além de usos rotineiros, como fabricação de sacos, tecidos, etc., os PHAs também são conhecidos por terem aplicações de alta qualidade em ciências ambientais, agrícolas e biomédicas. Os PHAs podem ser usados para produzir itens descartáveis, ossos artificiais, substitutos de vasos sanguíneos e materiais usados na engenharia de tecidos de válvulas cardíacas (SHIRIVASTAV et al., 2010).

3.4 CULTIVO DE MICROALGAS

As microalgas pertencem a um grupo heterogêneo de microrganismos fotossintéticos, eucarióticos ou procarióticos, gram-negativos e coloridos devido à presença dos pigmentos fotossintéticos (OLAIZOLA, 2003; TOMASELLI, 1997). As microalgas têm a capacidade de se desenvolver rapidamente sob condições adversas devido à sua estrutura celular simples e podem, portanto, ser uma fonte potencial de produção de PHAs, uma vez que esses polímeros são sintetizados quando os microrganismos estão em condições adversas de crescimento (LEHNINGER and NELSON, 1995; MATA et al., 2010; GONÇALVES et al., 2017).

Por serem microrganismos fotossintéticos, as microalgas usam energia luminosa e nutrientes inorgânicos (dióxido de carbono, nitrogênio, fósforo, etc.) para o crescimento, e são capazes de sintetizar compostos importantes na biomassa. A produção de biomassa de microalgas autotróficas é vantajosa em comparação com outras heterotróficas (leveduras,

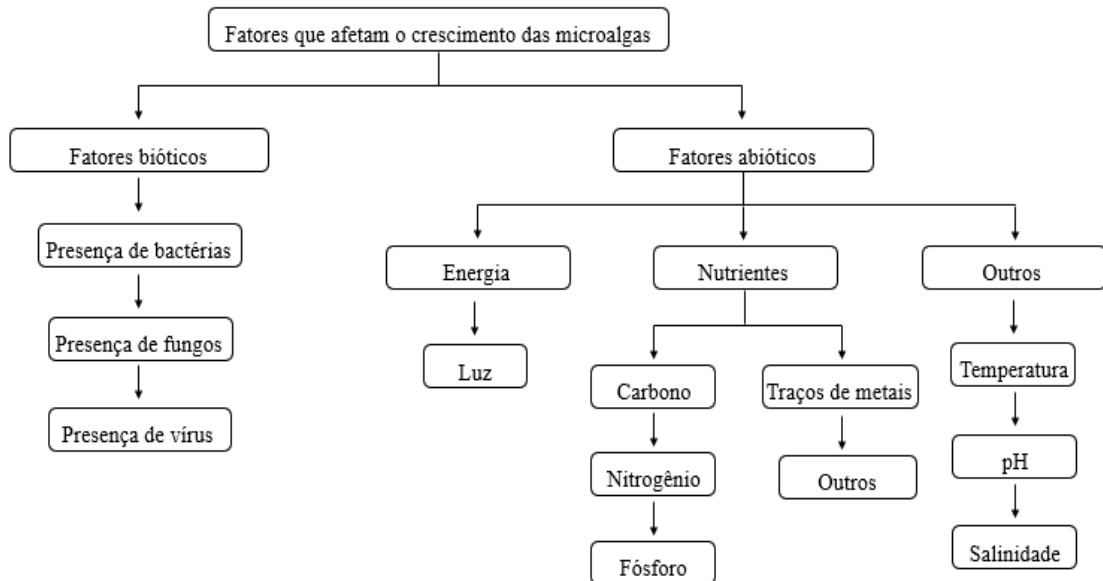
bactérias, etc.), uma vez que esta última requer moléculas orgânicas para produzir esses metabólitos, que são mais caras que os compostos inorgânicos necessários para o crescimento de microalgas (JIN e MELIS, 2003). A própria capacidade autotrófica converte de maneira direta a energia solar em moléculas orgânicas (PEREZ-GARCIA et al., 2010; MARKOU e NERANTZIS, 2013).

As microalgas têm potencial para alta produtividade, são tolerantes as mudanças nas condições ambientais e podem ser cultivadas em áreas que não são adequadas para a agricultura. Além do bioplástico, a biomassa de microalgas contém diversos bioprodutos, como proteínas, lipídios, carboidratos, pigmentos e moléculas de alto valor agregado, como antioxidantes, carotenóides, polissacarídeos, ácidos graxos, vitaminas e hidrocolóides, que podem ser utilizados em diversas aplicações industriais. (BENNETT e BOGORAD, 1973; GUALTIERI, 2001; MORAIS e COSTA, 2007; HOSSAIN et al., 2008; NOREEN et al., 2016). As quantidades dos compostos que são produzidos pelas microalgas podem ser moldadas pela alteração das condições físicas e químicas dos cultivos, isto é, a alteração das condições de crescimento das microalgas pode favorecer a produção de certos compostos de interesse como os PHAs (DERNER et al., 2006; SONI et al., 2017).

3.4.1 Fatores que influenciam o crescimento das microalgas e estimulam a produção de bioprodutos

O crescimento das microalgas pode ser influenciado por vários fatores, tanto bióticos quanto abióticos (Figura 1.3). Fatores bióticos incluem a presença de patógenos, como bactérias, fungos e vírus, e a competição com outras microalgas. Fatores abióticos incluem a luz (qualidade e quantidade), temperatura, pH, salinidade e quantidade de nutrientes nos meios de cultivo. Quando as microalgas estão em circunstâncias extremas causadas por fatores de estresse bióticos e/ou abióticos, elas podem produzir PHAs como uma forma de armazenamento de energia, para superar e/ou aclimatar essas condições (CHEN et al., 2017). Fatores abióticos são os que mais interferem e estimulam a síntese de biopolímeros (PALIWAL et al., 2017).

Figura 1.3. Diagrama esquemático dos fatores bióticos e abióticos que afetam o crescimento das microalgas (RAZZAK et al., 2017).



A disponibilidade e a intensidade da luz são fatores importantes no processo de fotossíntese e, com isso, interferem diretamente no crescimento das microalgas, no seu perfil bioquímico e na produção de PHAs. Em sistemas de cultivo aberto, a luz solar penetra diretamente no meio de cultivo. Assim, nesses sistemas, pode-se notar que, às vezes, há limitações de crescimento, uma vez que a radiação luminosa é baixa e distribuída de forma desigual (CHEN et al., 2017; GONÇALVES et al., 2017). Por outro lado, em sistemas fechados que utilizam fotobiorreatores, lâmpadas fluorescentes podem ser usadas para contribuir para uma melhor propagação da luz. A intensidade da luz também pode ser afetada pela densidade e pigmentação celular, o que pode interferir na penetração da luz e afetar o crescimento (RAZZAK et al., 2017).

A temperatura tem efeitos visíveis no crescimento das microalgas e na produção de biomassa, porque afeta o processo metabólico e a taxa de reação biológica. Cada espécie de microalga tem uma temperatura ideal para o seu crescimento (CHEN et al., 2017; PRAVEENKUMAR et al., 2016). Vários estudos demonstraram que o estresse térmico tende a aumentar o acúmulo de lipídios e PHAs por microalgas (PRAVEENKUMAR et al., 2016; ROBARTS e ZOHARY, 1987; XIN et al., 2011).

O pH do meio de cultivo também é um fator importante que afeta o crescimento de microalgas (GONÇALVES et al., 2017; YOO et al., 2015). A maioria das espécies cresce entre pH 7,0 e 9,0. O pH do meio de cultivo é responsável por alterações fisiológicas nas microalgas

e, portanto, é crucial manter os cultivos na faixa de pH ideal (GONÇALVES et al., 2017). Nenhum estudo ainda correlacionou mudanças no pH dos cultivos de microalgas com a maior produção de PHAs.

No caso da salinidade, os níveis ideais diferem de acordo com as espécies de microalgas. Mudanças na salinidade do meio de cultivo podem ter efeitos adversos no crescimento e composição de microalgas devido ao estresse osmótico, iônico (sal) e mudanças na permeabilidade da membrana aos íons (XIA et al., 2014). As perdas por evaporação e precipitação (em sistemas abertos) são as principais responsáveis pelas mudanças na salinidade dos meios de cultivo (RAZZAK et al., 2017). Segundo Li et al. (2009), o estresse salino é responsável pelo aumento da síntese de carotenóides e lipídios, não estando diretamente relacionado à produção de PHAs.

A deficiência de nutrientes no meio de cultivo das microalgas, especialmente de carbono, nitrogênio e fósforo, afeta diretamente seu metabolismo e, conseqüentemente, a produtividade de biomassa, uma vez que esses nutrientes são necessários para a síntese de ácidos nucléicos e proteínas essenciais para o crescimento das microalgas. O carbono inorgânico é considerado o principal nutriente para os organismos autotróficos, uma vez que é o precursor das reações fotossintéticas (GONÇALVES et al., 2017). Os compostos nitrogenados, especialmente o amônio e o nitrato, contribuem com mais de 10% da biomassa das microalgas, uma vez que são convertidos por assimilação em compostos orgânicos que contêm nitrogênio, como proteínas, enzimas e clorofilas (SHEN et al., 2015). O fósforo é outro nutriente importante para o crescimento de microalgas, que participa na formação de proteínas, lipídios e compostos intermediários de carboidratos (CHU et al., 2013; RAZZAK et al., 2017). Dessa forma, o conteúdo desses nutrientes pode ser manipulado para favorecer a formação de certos bioprodutos, como os PHAs. Por exemplo, ficou provado que a limitação de nitrogênio e fósforo no meio de cultivo de algumas espécies de microalgas favorece o acúmulo de lipídios, PHAs e outros compostos carbonáceos, uma vez que reduz a formação de compostos nitrogenados, como proteínas (CHU et al., 2013). A deficiência de nutrientes nos meios de cultivo de microalgas tem sido a principal ferramenta sugerida para estimular a síntese de PHAs por esses microrganismos (CHU et al., 2013; SHEN et al., 2015).

Assim, observa-se que o estudo da influência de fatores abióticos no crescimento e na composição bioquímica das microalgas é fundamental, pois pode estimular a produção de bioprodutos de interesse industrial, como lipídios, polímeros, proteínas e pigmentos. A Tabela 1.2 apresenta várias abordagens usadas para manipular os fatores abióticos (condições de

estresse) do crescimento de microalgas para produzir compostos bioquímicos de alto valor, incluindo os PHAs.

Tabela 1.2. Efeito das condições de estresse na produção de bioprodutos por microalgas.

Condição de estresse	Espécie	Bioproduto	Resultado	Referência
Limitação de nitrogênio	<i>C. vulgaris</i>	Carboidratos	O teor de carboidratos da biomassa mudou de 20% para 43% de peso seco de células.	Silva e Sforza (2016)
Limitação de nitrogênio	<i>C. vulgaris</i>	Carotenóide	Aumento na síntese de carotenoides.	Zhang et al. (2017)
Elevada intensidade da luz	<i>Dunaliella salina</i>	β -caroteno	Aumento no acúmulo de β -caroteno através do aumento da intensidade da luz de 200 a 1400 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.	Lamers et al. (2010)
Limitação de nitrogênio e fósforo	<i>Nostoc muscorum</i>	Polihidroxialcanoato	Aumento de 35% no acúmulo de polihidroxialcanoatos.	Sharma e Mallick (2005)
Salinidade	<i>Dunaliella salina</i>	Exopolissacarídeo	Aumento da produção de exopolissacarídeos com o aumento da salinidade do meio.	Mishra and Jha (2009)

3.5 PRODUÇÃO DE PHAs POR MICROALGAS E VIAS BIOSINTÉTICAS

Vários estudos têm apontado que a produção de PHAs por microalgas ocorre quando esses microrganismos crescem em um ambiente deficiente em nutrientes (Tabela 1.3) (NISHIOKA et al., 2001; MALLICK et al., 2007; COSTA et al., 2018b). Segundo Mendhulkar e Shetye (2017), quando as microalgas crescem em ambientes deficientes de compostos como nitrogênio e/ou fósforo, suas vias metabólicas são desviadas para produzir compostos ricos em carbono, como os PHAs, que funcionam como fonte de armazenamento de energia. Costa et al. (2018b) relatou em seu estudo com as cianobactérias *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18, que quando essas microalgas estão em um ambiente com deficiência de nitrogênio, elas desviam o carbono para outras rotas metabólicas e produzem biopolímeros para servir como compostos de armazenamento de carbono e energia, que podem ser reutilizados quando as condições se tornam mais favoráveis. Quando as condições são favoráveis, incluído períodos em que o conteúdo de nitrogênio do ambiente aumenta, o microrganismo pode produzir

proteínas para o crescimento celular, em vez dos lipídios de armazenamento, dos quais derivam os PHAs.

Tabela 1.3. Acúmulo de PHAs em microalgas em condições específicas de cultivo.

Microalga	Condição de crescimento	PHAs (m/m biomassa seca)	Referência
<i>Synechococcus</i> sp. MA19	Deficiência de fósforo	55.0 %	Nishioka et al. (2001)
<i>Nostoc muscorum</i>	Adição de acetato e propionato	31.0 %	Mallick et al. (2007)
<i>Spirulina platensis</i>	Adição de acetato e CO ₂	10.0 %	Toh et al. (2008)
<i>Botryococcus braunii</i>	Meio BG-11	16.4 %	Kavitha et al. (2016)
<i>Synechocystis</i> sp.	Deficiência de fósforo e nitrogênio	11.0 %	Panda et al. (2006)
<i>Synechococcus elongates</i>	Deficiência de nitrogênio	17.15 %	Mendhulkar and Shetye (2017)
<i>Synechococcus elongates</i>	Deficiência de fósforo	7.02 %	Mendhulkar and Shetye (2017)
<i>Synechocystis Salina</i>	Meio BG-11	5.5 – 6.6 %	Kovalcik et al. (2017)
Consórcio de microalgas	Esgoto	31.0 %	Rahman et al. (2015)
<i>Spirulina subsalsa</i>	Aumento da salinidade	7.45 %	Shrivastav et al. (2010)
<i>Spirulina</i> sp. LEB18	Deficiência de nitrogênio	30.7 %	Coelho et al. (2015)
<i>Nostoc muscorum</i>	Deficiência de fósforo	69.0 %	Bhati and Mallick (2015)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	Meio BG-11	5.0 %	Sudesh et al. (2002)
Consórcio de microalgas	Esgoto	43.0 %	Chakravarty et al. (2010)
<i>Spirulina</i> sp. LEB-18	Deficiência de nitrogênio	12.0 %	Costa et al. (2018b)
<i>Synechococcus subsalsus</i>	Deficiência de nitrogênio	16.0 %	Costa et al. (2018b)
<i>Aulosira fertilissima</i>	Limitação de troca gasosa	49.0 %	Samantary and Mallick (2015)

Kavitha et al. (2016) relataram um acúmulo de PHAs na microalga *Botryococcus braunii* em meio BG-11. Os autores identificaram que, como o *B. braunii* é um organismo de crescimento lento, o acúmulo de PHAs é alto, o que pode ser melhorado sob limitação de nitrogênio. Kovalcik et al. (2017) encontraram porcentagens de acúmulo de PHAs na microalga *Synechocystis salina* entre 5,5 e 6,6% utilizando meio BG-11, após 40 dias de cultivo sem qualquer limitação nutricional.

Diferentes estratégias de cultivo para maximizar a concentração de PHAs são empregadas, como uso de meios com concentração reduzida ou aumentadas de alguns nutrientes, como deficiência de fósforo, de nitrogênio, ou deficiência concomitante de fósforo e nitrogênio, adição de acetato e propionato, além de aumento da salinidade, limitação de troca gasosa e utilização de águas de rejeitos como esgotos, entre outras (Tabela 1.3). Além disto, a seleção de cepas altamente produtivas também é fator primordial para aumento do acúmulo do polímero, resultando em produções que podem variar de 5,0% a aproximadamente 70% de PHAs em base celular seca da microalga.

Mendhulkar e Shetye (2017) cultivaram a microalga *Synechococcus elongatus* em meio ASN-III deficiente de fósforo e com adição de 1% de glicose, e encontraram uma porcentagem de acúmulo de PHAs de 7,02%. Um acúmulo de PHAs de 17,15% foi encontrado usando o meio deficiente de nitrogênio, sugerindo uma maior influência do nitrogênio na produção de PHAs por esta microalga. Os resultados demonstraram que a deficiência de nutrientes como nitrogênio e fósforo têm pronunciados efeitos sobre a capacidade de síntese de PHAs. Para os autores, o excesso de carbono disponível no meio foi utilizado pelas células para sintetizar moléculas de armazenamento de carbono, como os PHAs, que seriam consumidos para sua sobrevivência. Já as células incubadas em meios deficientes de fosfato foram metabolicamente ativas por um longo tempo e não acumularam quantidade suficiente de PHAs.

Coelho et al. (2015) encontraram uma maior porcentagem de acúmulo de PHAs (30,7%) em *Spirulina* sp. utilizando meio Zarrouk limitado de nitrogênio quando comparado ao uso do mesmo meio limitado de fósforo (14,1%). Segundo os autores, os microrganismos respondem à limitação de nitrogênio pela degradação preferencial de uma ou mais macromoléculas que contêm esse componente, o que resulta na redução desses nutrientes e no acúmulo de compostos de reserva de carbono, como lipídeos e PHAs. O fósforo é um nutriente essencial para o metabolismo das microalgas, tendo influência direta na formação de moléculas orgânicas, tais como ácidos nucleicos (DNA e RNA), fosfolipídios de membranas e ATP (MARKOU et al., 2014).

Ainda não há consenso sobre as vias metabólicas da produção de PHAs por bactérias e microalgas, embora se acredite que a produção de PHAs passe pela produção de ácidos graxos (BALAJI et al., 2013, MAGDOULI et al., 2015; REHM et al., 1998; REHM et al., 2001). No estudo de Costa et al. (2018b) ficou claro que a produção de PHAs pelas cianobactérias *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18 está associado à via metabólica da produção de ácidos graxos. Neste estudo, quando as microalgas aumentaram a produção de PHAs durante os cultivos em meio limitado de nitrogênio, ocorreu uma redução no conteúdo de ácidos graxos, sugerindo que alguns dos ácidos graxos produzidos foram convertidos em PHAs.

A via metabólica mais comum, encontrada em uma ampla gama de bactérias produtoras de PHAs e ácidos graxos, está relacionada a um precursor comum, o acetilcoA (MAGDOULI et al., 2015). Acredita-se que uma via metabólica similar ocorre na produção de PHAs por microalgas (BALAJI et al., 2013). Segundo Balagi et al. (2013), os PHAs são sintetizados a partir da acetil-coenzima A (acetilcoA) através de três reações enzimáticas. A 3-cetotiolase converte duas moléculas de acetil-coA em uma molécula de acetoacetil-coA; a acetoacetil-coA redutase dependente de NADPH, converte acetoacetilcoA em D-3-hidroxiacetilcoA; e a última enzima, PHAs sintase, catalisa a ligação da porção D-3-hidroxiacetil a uma molécula de PHAs através de uma ligação éster. No entanto, muitos outros PHAs são compostos por 3 hidroxi ácidos graxos. O grupo pendente varia de 1 carbono metílico a 13 tridecil-carbono. Ácidos graxos com o grupo hidroxila na posição 4, 5 e 6, grupo pendente contendo substituintes ou insaturação são conhecidos, e isto dá origem a diferentes copolímeros e homopolímeros de PHAs.

Segundo Magdouli et al. (2015), a síntese de PHAs pode seguir duas rotas: (i) β -oxidação quando ácidos graxos são utilizados como fonte de carbono e; (ii) a biossíntese de ácidos graxos na presença de glicose, acetato ou etanol como fontes de carbono, rapidamente metabolizada em acetil-CoA. Rhem et al. (2001) acreditam que a síntese de PHAs e ramnolipídeos está fortemente ligada em muitos microrganismos, uma vez que o ácido (R)-3-hidroxiacetil é um precursor comum em ambas as vias. Embora as duas vias tenham um precursor comum, ainda existe uma competição entre o ramnolipídeo e a síntese de PHAs e nenhuma evidência explica esse tipo de relação competitiva (MAGDOULI et al., 2015). Costa et al. (2018b) em seu estudo sobre a produção de PHAs pelas microalgas *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18 demonstra a existência de uma relação entre a estrutura molecular dos PHAs e a composição de ácidos graxos da biomassa, onde também foi observado um maior conteúdo de compostos de cadeia longa (14-18 átomos de carbono), indicando que

um composto comum do metabolismo do ácido graxo serve como um precursor na síntese de monômeros de PHAs.

Segundo Laycock et al. (2013), o acúmulo de PHAs é controlado por muitos genes que codificam uma gama de enzimas que estão direta ou indiretamente envolvidas na síntese de PHAs (STEINBUCHER, 2003; REHM, 2010; VERLINDEN et al., 2007; KESSLER e WITHOLT, 1998). De acordo com Chen (2010), a biossíntese do PHAs pode ser resumida em quatro vias principais. A primeira via (Via I) envolve as três principais enzimas: β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase dependente de NADPH e PHAs sintase. A fonte de carbono é inicialmente convertida em coenzima A tioésteres do ácido (R)-hidroxialcanóico. A β -cetotiolase catalisa a condensação de dois monômeros de coenzima A tioéster. Isto é seguido por uma redução (R)-específica para dar (R)-3-hidroxiacil-CoA, que é então convertida pela PHAs sintase em PHAs (PEOPLES e SINSKEY, 1989; REHM, 1999). Pelo menos 88 PHAs sintases foram sequenciadas, com quatro classes principais sendo identificadas (GRAGE et al., 2009). Classe I usa ácidos graxos com 3-5 átomos de carbono; classe II usa aqueles com 6-14 carbonos; e as classes III e IV sintetizam PHA de cadeia longa.

De acordo com os autores, a via II está associada à captação de ácidos graxos por microrganismos e pode ser utilizada para a síntese de PHAs de cadeia com comprimento médio. Após a oxidação do ácido graxo para dar acil-CoA, o precursor é então convertido em 3-hidroxiacil-CoA que pode então formar PHAs sob catálise com a PHAs sintase. A via III envolve 3-hidroxiacil-ACP-CoA transferase e malonil-CoA-ACP transacilase; os substratos são convertidos em 3-hidroxiacil-ACP, que podem então formar 3-hidroxi-acil-CoA e, assim, PHAs. A via IV utiliza acetoacetil-CoA redutase dependente de NADPH para oxidar (S)-(+)-3-hidroxiacil-CoA.

De acordo com Ratledge e Kristiansen (2001), durante o crescimento microbiano normal, a β -cetotiolase na Via I é inibida pela coenzima A livre saindo do ciclo de Krebs. Mas quando outros nutrientes além do carbono são limitados, a acetil-CoA é impedida de entrar no ciclo de Krebs e o excesso de acetil-CoA é canalizado para a biossíntese de PHAs. Se o crescimento for limitado por outras razões, a síntese proteica é interrompida, o que leva a altas concentrações de NADH e NADPH. Isso inibe a citrato sintase e a isocitrato desidrogenase, o que novamente retarda o ciclo de Krebs, direcionando acetil-CoA para a síntese de PHAs (HENDERSON e JONES, 1997). Assim, Kessler e Witholt (1998) acreditam que a regulação do metabolismo da PHAs pode ocorrer em diferentes níveis: (1) ativação da expressão do gene PHAs devido a sinais ambientais específicos, como a privação de nutrientes; (2) ativação das

enzimas sintéticas de PHAs por componentes celulares específicos ou intermediários metabólicos; (3) inibição de enzimas metabólicas de vias concorrentes e, portanto, enriquecimento de intermediários necessários para a síntese de PHAs; ou (4) uma combinação destes. Isso justifica a maior produção de PHA quando os microrganismos estão em condições desfavoráveis de crescimento, seja devido a mudanças nas condições ambientais ou desequilíbrio nutricional.

No entanto, de fato, a produção eficiente de PHAs e o controle preciso da composição dos PHAs através do metabolismo dos ácidos graxos ainda não foram alcançados e precisa de uma extensa pesquisa (MAGDOULI et al., 2015). É crucial obter uma compreensão mais profunda do ciclo de β -oxidação que pode ajudar a direcionar a síntese para um componente sob demanda e produzir alto rendimento de PHAs através de ácidos graxos. Além disso, a síntese da cadeia polimérica do PHAs ocorre dentro do citoplasma da célula microbiana, dentro de inclusões conhecidas como grânulos; a bioquímica desse processo sintético e desses grânulos, por sua vez, influencia as propriedades do polímero (LAYCOCK et al., 2013).

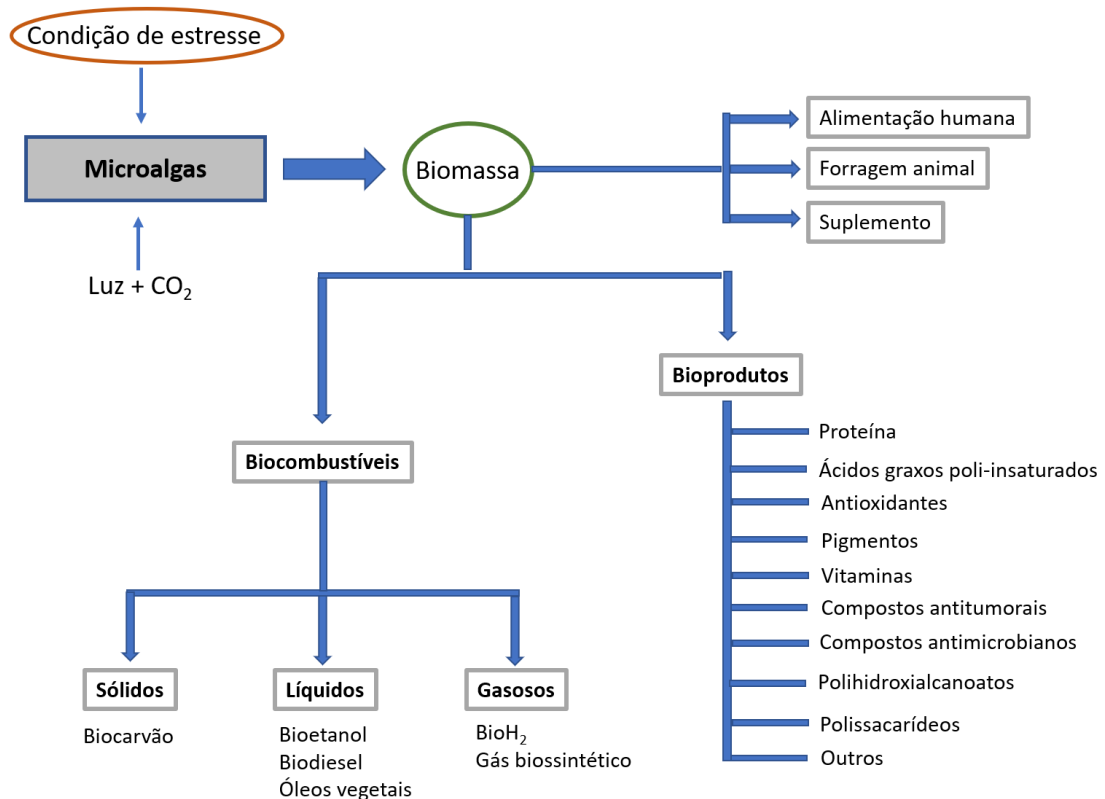
3.6 POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE PHAs DE MICROALGAS EM LARGA ESCALA

O interesse no estudo de microalgas surgiu a partir da descoberta da *Spirulina* sp. em 1519, na Espanha, pela observação de seu consumo pelos astecas no Vale do México e, mais tarde, pelas evidências científicas dos benefícios de seu consumo (SONI et al., 2017; JESUS et al., 2018). Em 1969, a primeira fábrica de processamento de *Spirulina* sp. foi construída, com o objetivo de comercializar as microalgas, principalmente para consumo direto (SONI et al., 2017). No período de 2004 a 2013 a produção mundial de biomassa de microalgas atingiu cerca de 15 mil toneladas/ano (peso seco). Espécies cultivadas dos gêneros *Spirulina* e *Chlorella* são utilizadas como suplementos protéicos para alimentação humana e aquicultura, e pigmentos são utilizados na indústria de cosméticos. *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* são espécies utilizadas como fonte de pigmentos e antioxidantes, como os carotenóides astaxantina, cantaxantina e beta-caroteno (JESUS et al., 2018).

Ao contrário da produção de microalgas para fins de alimentação direta, a produção de bioplásticos (PHAs) de microalgas ainda não ocorre em escala comercial, embora existam muitas empresas envolvidas para esse fim, em diferentes fases de implantação. Os principais componentes de uma microalga são lipídios, ácidos graxos, proteínas, polissacarídeos, PHAs, minerais, micronutrientes, pigmentos, antioxidantes, vitaminas entre outros (Figura 1.4). A

grande quantidade de bioprodutos de alto valor comercial na biomassa de microalgas permite viabilizar a obtenção industrial dos PHAs sintetizados, já que podem ser utilizados em diferentes aplicações industriais (CHEW et al., 2017; KHAN et al., 2018).

Figura 1.4. Esquema de conversão de CO₂ atmosférico em lipídios, proteínas, bioplástico, carboidratos, e outros bioprodutos produzidos por microalgas (KHAN et al., 2018).



Uma questão levantada por Khan et al. (2018), Jesus et al. (2018) e Chew et al. (2017) é que atualmente a produção de microalgas é focada individualmente em energia ou em um bioproduto específico. Segundo os autores, uma biorrefinaria híbrida poderia ser um empreendimento lucrativo, produzindo simultaneamente energia e diversos bioprodutos. De acordo com os autores, as microalgas podem se encaixar na maioria dos projetos integrados de biorrefinaria, uma vez que seus componentes podem ser direcionados e otimizados para produzir mais óleos, carboidratos, PHAs ou proteínas, por exemplo. O principal desafio é identificar cepas de microalgas com alta produtividade de PHAs e reduzir os custos de produção, tornando-a mais competitiva que os PHAs bacterianos e plásticos convencionais.

De acordo com o Brasil e Gracia (2016), pode-se dizer que os principais desafios atuais são o melhoramento genético de linhagens de microalgas, o desenvolvimento de métodos

eficientes de cultivo, o controle de pragas e a otimização dos processos de colheita. Países como China, Japão, Estados Unidos e Brasil, estão investindo em pesquisa e demonstração de plantas industriais (pré-comerciais) com o objetivo de produzir microalgas em larga escala.

De acordo com Singh e Mallick (2017), os seguintes desafios são necessários para que os PHAs de microalgas sejam uma realidade comercial: cultivo em larga escala, colheita e secagem da biomassa. Atualmente, o principal gargalo para a produção comercial de PHAs de microalgas é a inexistência de uma estratégia econômica de cultivo em larga escala. Um fotobioreator ideal pode fornecer boa resposta a todos os sistemas de cultivo fototróficos necessários para diferentes cepas de microalgas, juntamente com ambientes de crescimento específicos para produzir o produto final de interesse (PULZ e GROSS, 2004). No entanto, o cultivo de microalgas em grande escala é geralmente conduzido em sistemas de lagoas abertas e dependentes da luz natural, que é configurada como um gargalo para este sistema (SINGH e MALLICK, 2017). Até o momento, a construção, operação e manutenção de fotobiorreatores fechados são comparativamente caros em relação ao cultivo aberto (PIENKOS e DARZINS, 2009).

Segundo Singh et al. (2018), há uma alta viabilidade de co-produção de PHAs e proteínas, incluindo outros pigmentos de valor agregado, se as cepas/espécies de microalgas forem cultivadas em ambientes otimizados. Como pré-requisito, os parâmetros devem ser constantes durante o período de cultivo, sendo que se for necessária manipulação, tem que ocorrer em conformidade. Os sistemas com fotobiorreatores também devem ser flexíveis, uma vez que essa flexibilidade facilitará o cultivo de vários tipos de espécies/linhagens de microalgas, incluindo outros organismos fototróficos.

A colheita de microalgas a partir da água continua a ser um grande obstáculo para a escala comercial devido o seu pequeno tamanho (poucos micrômetros), relativamente baixa concentração (0,2-2 g/L) e sua estabilidade coloidal que dificultam sua recuperação (GERDE et al., 2014). Além disso, a colheita da biomassa poderia contribuir com 20 a 30% do preço total da produção, desempenhando assim um papel importante no aumento do valor da biomassa (GRIMA et al., 2003). Nesse sentido, é necessário intensificar os esforços no sentido de realizar pesquisas para desenvolver tecnologias eficientes e rentáveis de coleta de biomassa de microalgas.

Segundo Singh e Mallick (2017), a secagem da biomassa de microalgas como a *Spirulina* pode contribuir com até 20% dos preços globais de produção dos bioprodutos da biomassa, incluindo os PHAs. Após a colheita, a remoção de água da biomassa úmida é

essencial para o armazenamento da matéria-prima. Assim, a energia intensiva usada para a secagem também é um obstáculo para a comercialização dos PHAs de microalgas.

Além desses gargalos, deve-se também considerar os custos com a extração e purificação dos PHAs. A extração de PHAs envolve enormes quantidades de solventes tóxicos e voláteis que aumentam o custo total de produção (COSTA et al., 2018a). Assim, estratégias inovadoras envolvendo abordagens de extração rápida por meio de ruptura enzimática/química da biomassa, temperatura e pressão elevadas e técnicas mecânicas de ruptura celular devem ser exaustivamente examinadas para diferentes espécies que acumulam PHAs (SINGH e MALLICK, 2017).

Segundo Singh et al. (2018), o mercado global de PHAs deverá alcançar US\$ 93,5 milhões em 2021, com taxa de crescimento anual de 4,88%. A comercialização/industrialização de materiais poliméricos de PHAs de microalgas ainda são incipientes por causa dos custos de obtenção que é 5 a 7 vezes maior em comparação com os plásticos tradicionais, bem como quatro vezes maior do que o ácido polilático comercializável (CASTILHO et al., 2009; CHANDEL et al., 2018). Assim, os PHAs ainda têm um mercado restrito, apesar de sua perspectiva de substituir 33% dos materiais poliméricos comercializáveis (CASTILHO et al., 2009).

Nas próximas décadas, observa-se que melhorias tecnológicas em vários aspectos são necessárias para o desenvolvimento de espécies de microalgas muito mais eficientes, relativas ao potencial fotossintético e de acumulação de PHAs. De acordo com Singh e Mallick (2017), a pesquisa de PHAs não é apenas uma questão de encontrar o tipo certo de biomassa e transformá-la em bioplástico, mas também deve ser sustentável em termos econômicos em larga escala. Ainda assim, os autores consideram que as microalgas devem ser reconhecidas como sendo uma das candidatas mais propícia para acúmulo dos PHAs.

Nos próximos anos, espera-se que a produção de microalgas no mundo continue a crescer, levando a um aumento na escala desta indústria. Espera-se que as indústrias possam criar ferramentas e metodologias para extrair e utilizar todos os bioprodutos da biomassa das microalgas para convertê-los em produtos de alto valor agregado (COSTA et al., 2018b).

3.7 CONCLUSÃO

A obtenção de PHAs a partir de microalgas pode ser caracterizada como uma importante ferramenta para reduzir os custos de obtenção dos polímeros e, com isso, proporcionar uma maior competitividade frente aos sintéticos. As microalgas são consideradas uma fonte

promissora para a produção de PHAs, pois são os únicos microrganismos que acumulam PHAs pela fotossíntese, utilizando luz e CO₂ como principais fontes de energia, e possuem requisitos nutricionais mínimos para o crescimento.

A abordagem mais empregada para aumentar o acúmulo dos PHAs nas microalgas têm sido a manipulação das condições ambientais de crescimento, relacionadas a quantidade dos nutrientes disponíveis nos meios de cultivo. Com relação as propriedades físicas dos PHAs, as mais estudadas são massa molecular, propriedades térmicas e índice de cristalinidade, pois são determinantes para a processabilidade do polímero e, conseqüentemente, para sua comercialização e aplicação industrial. Essas propriedades variam de acordo com a cepa produtora, condições de cultivo e método empregado na sua extração.

As rotas bioquímicas envolvidas na síntese de PHAs em microalgas ainda não foram totalmente elucidadas, embora acredite-se que a via de produção dos PHAs passe pela via de produção dos ácidos graxos. Os estudos de estimulação da síntese de PHAs ainda são considerados incipientes, e os PHAs obtidos estão longe de serem comercializados. Ainda assim, está claro que as microalgas têm o potencial de produzir biopolímeros com menor custo e podem desempenhar um papel importante no meio ambiente.

3.8 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, v. 211, p. 132–138, 1981.

ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450–472, 1990.

ANJUM, A.; ZUBER, M.; ZIA, K.M.; NOREEN, A.; ANJUM, M.N.; TABASUM, S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 161–174, 2016.

ASSIS, D.J.; GOMES, G.V.P.; PASCOAL, D.R.C.; PINHO, L.S.; CHAVES, L.B.O.; DRUZIAN, J.I. Simultaneous biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substance (EPS) from crude glycerol from biodiesel production by different bacterial strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1110–1127, 2016.

BALAJI, S.; GOPI, K.; MUTHUVELAN, B. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, p. 278–285, 2013.

BENNET, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973.

BHATI, R.; MALLICK, N. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: Process optimization and polymer characterization. **Algal Research**, v. 7, p. 78–85, 2015.

BRASIL, B. S. A. F.; GARCIA, L. C. Microalgas: alternativas promissoras para a indústria. **Agroenergia em Revista**, v. 10, p. 1-60, 2016.

BRITO, G.F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.M.; MÉLO, T.J.A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, p. 127-139, 2011.

CAIN, R.B. Microbial degradation of synthetic polymers. **In:** Fry JC et al. (eds) Microbial control of pollution. 48th Symposium of the Society for General Microbiology, University of Cardiff, Cambridge University Press, Cambridge, p. 293–338, 1992.

CAMPOS, M.I. **Polihidroxicanoatos (PHAs) obtidos a partir da glicerina bruta residual do biodiesel (GBRB): produção, otimização, cinética e propriedades**. Tese de Doutorado – Universidade Federal da Bahia, Departamento de Engenharia Química, Salvador, Bahia, 148p., 2013.

CAMPOS, M.I.; FIGUEIREDO, T.V.B.; SOUSA, L.S.; DRUZIAN, J.I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 338–346, 2014.

CASTILHO, L.R.; MITCHEL, D.A.; FREIRE, D.M.G. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5996–6009, 2009.

CHAKRAVARTY, P.; MHAISALKAR, V.; CHAKRABARTI, T. Study on polyhydroxyalkanoate (PHA) production in pilot scale continuous mode wastewater treatment system. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2896–2899, 2010.

CHANDEL, A.K.; GARLAPATI, V.K.; SINGH, A.K.; ANTUNES, F.A.F.; SILVA, S.S. The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. **Bioresource Technology**, v. 264, p. 370-381, 2018.

CHEN, G.Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 2434-2446, 2009.

CHEN, G.Q. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. **In:** Chen G, editor. Plastics from bacteria: natural functions and applications. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag; p. 17–37, 2010.

CHEN, B.; WAN, C.; MEHMOOD, M.A.; CHANG, J.; BAI, F.; ZHAO, X. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products – A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1198–1206, 2017.

CHEW, K.W.; YAP, J.Y.; SHOW, P.L.; SUAN, N.H., JUAN, J.C.; LING, T.C.; CHANG, J.S. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.

CHU, F.F.; CHU, P.N.; CAI, P.J.; LI, W.W.; LAM, P.K.; ZENG, R.J. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 341–346, 2013.

COELHO, V.C.; SILVA, C.K.; TERRA, A.L.; COSTA, J.A.V.; MORAIS, M.G. Polyhydroxybutyrate production by *Spirulina* sp. LEB 18 grown under different nutrient concentrations. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 1586-1594, 2015.

COUTINHO, B.C.; MIRANDA, G.B.; SAMPAIO, G.R.; de SOUZA, L.B.S.; SANTANA, W.J.; COUTINHO, H.D.M. A importância e as vantagens do polihidroxialcanoato (plástico biodegradável). **Holos**, v. 20, p. 76-81, 2003.

COSTA, J.V.; MORAIS, M.G. An Open Pond System for Microalgal cultivation. **In**: Pandey A., Lee D., Chisti Y., Soccol C. Biofuels from Algae. 1ª edição. São Diego: Elsevier; p. 1- 20, 2014.

COSTA, S.S.; MIRANDA, A.L.; ASSIS, D.J.; SOUZA, C.O.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; DRUZIAN, J.I. Efficacy of *Spirulina* sp. polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition. **Algal Research**, v. 33, p. 231–238, 2018a.

COSTA, S.S.; MIRANDA, A.L.; ANDRADE, B.B.; ASSIS, D.J.; SOUZA, C.O.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; DRUZIAN, J.I. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 552–562, 2018b.

CRANK, M.; PATEL, M.; MARSCHEIDER-WEIDMANN, F.; SCHLEICH, J.; HUSING, B.; ANGERER, G. **Techno-economic feasibility of large-scale production of bio-based polymers in Europe (PRO-BIP)**, Final Report Prepared for the European Commission's Institute for Prospective Technological Studies (IPTS) (2004).

DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; DE CARVALHO, S.M.F.R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DOMÍNGUEZ-DÍAZ, M.; MENESES-ACOSTA, M.; ROMO-URIBE, A.; PENA, C.; SEGURA, D.; ESPIN, G. Thermo-mechanical properties, microstructure and biocompatibility in poly- β -hydroxybutyrates (PHB) produced by OP and OPN strains of *Azotobacter vinelandii*. **European Polymer Journal**, v. 63, p. 101-112, 2015.

FIGLIARESE, M.L.; FREITAS, F.; PAIS, J.; RAMOS, A.M.; ARAGÃO, G.M.F.; REIS, M.A.M. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, p. 454-461, 2009.

FORMOLO, M.C.; DUARTE, M.A.T.; SCHNEIDER, A.L.; FURLAN, S.A.; PEZZIN, A.P.T. Polihidroxialcanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 4, p. 14-21, 2003.

FREITAS, B.C.C.; CASSURIAGA, A.P.A.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248-253, 2017.

- FUKADA, E.; ANDO, Y. Piezoelectric properties of poly- β -hydroxybutyrate and copolymers of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8, p. 361-366, 1996.
- GERDE, J.A.; YAO, L.; LIO, J. Microalgae flocculation: impact of flocculant type, algae species and cell concentration. **Algal Research**, v. 3, p. 30-35, 2014.
- GHATNEKAR, M.S.; PAI, J.S.; GANESH, M.; Production and recovery of poly-3hydroxybutyrate from methylobacterium sp V49. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 444-448, 2002.
- GOLDBERG, E.D. Plasticizing the sea-floor: an overview. **Environmental Technology**, v. 18, p. 195-202, 1997.
- GONÇALVES, A.L.; PIRES, J.C.M.; SIMÕES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. **Algal Research**, v. 24, p. 403-415, 2017.
- GRAGE, K.; JAHNS, A.C.; PARLANE, N.; PALANISAMY, R.; RASIAH, I.A.; ATWOOD, J.A.; REHM, B.H.A. Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 660-669, 2009.
- GRIMA, E.M.; BELARBI, E.; FERNÁNDEZ, F.G.A.; MEDINA, A.R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.
- GUALTIERI, P. Morphology of photoreceptor systems in microalgae. **Micron**, v. 32, p. 411-426, 2001.
- HALAMI, P.M. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 805-812, 2008.
- HANSEN, J. Draft position statement on plastic debris in marine environments. **Fisheries**, v. 15, p. 16-17, 1990.
- HAZER, B.; STEINBUCHER, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p. 1-12, 2007.
- HEMPEL, F.; BOZARTH, A.S.; LINDENKAMP, N.; KLINGL, A.; ZAUNER, S.; LINNE, U.; STEINBUCHER, A.; MAIER, U.G. Microalgae as bioreactors for bioplastic production. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 81-87, 2011.
- HOSSAIN, A.B.M.S.; SALLEH, A.; BOYCE, A.N.; CHOWDHURY, P.; NAQUIUDDIN, M. Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, p. 250-254, 2008.
- HUSSAIN, A.B.M.; AISHAH, S.; BOYCE, A.N.; CHOWDHURY, P.; NAQUIUDDIN, M. Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. **Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, p. 250-254, 2008.

- JESUS, C.S.; UEBEL, L.S.; COSTA, S.S.; MIRANDA, A.L.; MORAIS, E.G.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; NUNES, I.L.; FERREIRA, E.S.; DRUZIAN, J.I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86-94, 2018.
- JIN, E.; MELIS, A. Microalgal biotechnology: carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 331–337, 2003.
- KAPRITCHKOFF, F.M.; VIOTTI, A.P.; ALLI, R.C.P.; ZUCCOLO, M.; PRADELLA, J.G.C.; MAIORANO, A.E.; MIRANDA, E.A.; BONOMI, A. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 453-462, 2006.
- KAVITHA, G.; KURINJIMALAR, C.; SIVAKUMAR, K.; KAARTHIK, M.; ARAVIND, R.; PALANI, P.; RENGASAMY, R. Optimization of polyhydroxybutyrate production utilizing wastewater as nutrient source by *Botryococcus braunii* Kütz using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 534-542, 2016.
- KESSLER, B.; WITHOLT, B. Synthesis, recovery and possible application of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: a short overview. **Macromolecular Symposium**, v. 130, p. 245–260, 1998.
- KHAN, I.; SHIN, J.H.; KIM, D.J. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, 36, 1-21, 2018.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Recent Advances in Microbial Polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607–619, 2005.
- KHOSRAVI-DARANI, K.; MOKHTARI, Z.B.; AMAI, T.; TANAKA, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1407–1424, 2013.
- KOVALCIK, A.; MEIXNERB, K.; MIHALICA, M.; ZEILINGER, W.; FRITZ, I.; FUCHS, W.; KUCHARCZYK, P.; STELZER, F.; DROSG, B. Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 497–504, 2017.
- LAMERS, P.P.; VAN DE LAAK, C.C.; KAASENBROOD, P.S.; LORIER, J.; JANSSEN, M.; DE VOS, R.C.; BINO, R.J.; WIJFFELS, R.H. Carotenoid and fatty acid metabolism in light stressed *Dunaliella salina*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, p. 638–648, 2010.
- LAYCOCK, B.; HALLEYA, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANTA, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 536– 583, 2013.
- LEE, B.; POMETTO, A.L.; FRATZKE, A.; BAILEY, T.B. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 678–685, 1991.

- LEE, S.Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering.**, v. 49, p. 1-14, 1996.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Pincípios de Bioquímica.** 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
- LI, Y.; HUANG, J.; SANDMANN, G.; CHEN, F. High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (*Chlorophyceae*). **Journal of Phycology**, v. 45, p. 635–641, 2009.
- LIANG, M.H.; ZHU, J.; JIANG, J.G. High-value bioproducts from microalgae: strategies and progress. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 01–53, 2018.
- LOCATELLI, G.O. **Estudo das condições de hidrólise da pectina para uso como substrato na produção de polihidroxicanoatos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Biotecnologia Industrial, Recife, Pernambuco, 120p., 2012.
- LU, J.; TAPPEL, R.C.; NOMURA, C.T. Mini-review: biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). **Polymer**, v. 49, p. 226–248, 2009.
- LUENGO, J.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G; OLIVEIRA, E. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 251-260, 2003.
- MADISON, L.L.; HUISIMAN, G.W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 21–53, 1999.
- MADKOUR, M.H.; HEINRICH, D.; ALGHAMDI, M.A.; SHABBAJ, I.I.; STEINBUHEL, A. PHA recovery from biomass. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 2963-2972, 2013.
- MAGDOULI, S.; BRAR, S.K.; BLAIS, J.F.; TYAGI, R.D. How to direct the fatty acid biosynthesis towards polyhydroxyalkanoates production?. **Biomass and bioenergy**, v. 74, p. 268-279, 2015.
- MALLICK, N.; GUPTA, S.; PANDA, B.; SEM, R. Process optimization for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production by *Nostoc muscorum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 125–130, 2007.
- MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1532–1542, 2013.
- MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186-202, 2014.
- MATA, T.; MARTINS, A.; CAETANO, N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable a sustainable energy reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.
- MEIXNER, K.; KOVALCIK, A.; SYKACEKA, E.; GRUBER-BRUNHUMERA, M.; ZEILINGERA, W.; MARKL, K.; HAAS, C.; FRITZA, I.; MUNDIGLERA, N.; STELZERC, F.; NEUREITERA, M.; FUCHSA, W.; DROSGA, B. Cyanobacteria Biorefinery - Production

of poly(3-hydroxybutyrate) with *Synechocystis salina* and utilisation of residual biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 265, p. 46–53, 2018.

MENDHULKAR, V.; SHETYE, L., Synthesis of Biodegradable Polymer Polyhydroxyalkanoate (PHA) in Cyanobacteria *Synechococcus elongates* Under Mixotrophic Nitrogen- and Phosphate-Mediated Stress Conditions. **Industrial Biotechnology**, v. 13, p. 85, 2017.

MIDDELBERG, A.P.J. Process-scale disruption of microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 13, p. 491-551, 1995.

MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from microalgae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3382–3386, 2009.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Carbon dioxide mitigation with *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1349-1352, 2007.

MULLER, R.J.; KLEEBERG, I.; DECKWER, W.D. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 87–95, 2001.

NISHIOKA, M.; NAKAI, K.; MIYAKE, M.; ASADA, Y.; TAYA, M. Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate limitation. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1095–1099, 2001.

NOREEN, A.; ZIA, K.M.; ZUBER, M.; ALI, M.; MUJAHID, M. A critical review of algal biomass: A versatile platform of bio-based polyesters from renewable resources. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 937–949, 2016.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering Journal**, v. 20, p. 459-466, 2003.

PALIWAL, C.; MITRA, M.; BHAYANI, K.; BHARADWAJ, V.; GHOSH, T.; DUBEY, S.; MISHRA, S. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1216–1226, 2017.

PANDA, B.; JAIN, P.; SHARMA, L.; MALLICK, N. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1296–1301, 2006.

PEOPLES, O.P.; SINSKEY, A.J. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes-Eutrophus* H16 – characterization of the genes encoding-ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 15293–15297, 1989.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, E.Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2010.

PIENKOS, P. T.; DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 3, p. 431-440, 2009.

POIRIER, Y.; DENNIS, D.; KLOMPARENS, K.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in plants. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 237-246, 1992.

POLI, A.; DONATO, P.D.; ABBAMONDI, G.R.; NICOLAUS, B. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 11, p. 1-13, 2011.

POTTER, M.; STEINBUHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) granule associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 552–60, 2005.

PRAVEENKUMAR, R.; KIM, B.; LEE, J.; VIJAYAN, D.; LEE, K.; NAM, B.; JEON, S.G.; KIM, D.M.; OH, Y.K. Mild pressure induces rapid accumulation of neutral lipid (triacylglycerol) in *Chlorella* spp. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 661–665, 2016.

PULZ, O. GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

QUINES, L.K.M.; SCHMIDT, M.; ZANFONATO, K.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G.M.F. Métodos de extração de poli-hidroxiálcanoatos a partir de biomassa bacteriana. **Quimica Nova**, v. 38, p. 1207-1218, 2015.

RAHMAN, A.; PUTMAN, R.J.; INAN, K.; SAL, F.A.; SATHISH, A.; SMITH, T. Polyhydroxybutyrate production using a wastewater microalgae based media. **Algal Research**, v. 8, p. 95-98, 2015.

RANJANA, B.; NIRUPAMA, M. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: Process optimization and polymer characterization. **Algal Research**, v. 7, p. 78–85, 2015.

RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic biotechnology**. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001, 584 pp.

RAY, S.S.; BOUSMINA, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: in greening the 21st Century materials world. **Progress in Materials Science**, v. 50, p. 962–1079, 2005.

RAZZAK, S.A.; ALI, S.A.M.; HOSSAINA, M.M.; LASAB, H. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 379–390, 2017.

REHM, B.H.A.; KROGER, N.; STEINBUHEL, A. New metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24044-24051, 1998.

REHM, B.H.A.; MITSKY, T.A.; STEINBUHEL, A. Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3102-3109, 2001.

REHM, B.H.A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p. 578–92, 2010.

RIBEIRO, P.L.L. **Efeito da glicerina residual do biodiesel e de estirpes microbianas (*Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438) na produção, propriedades e composição de copolímeros de polihidroxicanoatos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Departamento de Engenharia Química, Bahia, Brasil, 99p., 2014.

RIBEIRO, P.L.L.; SILVA, A.C.M.S.; FILHO, J.A.M.; DRUZIAN, J.I. Impact of different by-products from the biodiesel industry and bacterial strains on the production, composition, and properties of novel polyhydroxyalkanoates containing achiral building blocks. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 212–223, 2015.

RIEDEL, S.L.; BRIGHAM, C.J.; BUDDE, C.F.; BADER, J.; RHA, C.; STAHL, U.; SINSKEY, A.J. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* cultures with non-halogenated solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, p. 461-470, 2012.

RIVARD, C.; MOENS, L.; ROBERTS, K.; BRIGHAM, J.; KELLEY, S. Starch esters as biodegradable plastics: Effects of ester group chain length and degree of substitution on anaerobic biodegradation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 848–852, 1995.

ROBARTS, R.D.; ZOHARY, T. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 21, p. 391-399, 1987.

RYAN, P.G. The origin and fate of artefacts stranded on islands in the African sector of the Southern Ocean. **Environmental Conservation**, v. 14, p. 341–346, 1987.

SAMANTARY, S.; MALLICK, N. Impact of various stress conditions on poly- β -hydroxybutyrate (PHB) accumulation in *Aulosira fertilissima* CCC 444. **Current Biotechnology**, v. 4, p. 366–372, 2015.

SHARMA, L.; MALLICK, N. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light–dark cycles. N and P status and carbon sources, **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1304–1310, 2005.

SHEN, X.F.; CHU, F.F.; LAM, P.K.S.; ZENG, R.J. Biosynthesis of high yield fatty acids from *Chlorella vulgaris* NIES-227 under nitrogen starvation stress during heterotrophic cultivation. **Water Research**, v. 81, p. 294-230, 2015.

SHIRIVASTAV, A.; MISHRA, S.K.; MISHRA, S. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel by product. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 255–260, 2010.

SILVA, C.E.D.F.; SFORZA, E. Carbohydrate productivity in continuous reactor under nitrogen limitation: effect of light and residence time on nutrient uptake in *Chlorella vulgaris*. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 2112–2118, 2016.

SIM, S.J., SNELL, K.D., HOGAN, S.A., et al. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 63-67, 1997.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 2596-2610, 2010.

SINGH, A.K.; MALLICK, N. Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates Production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, p. 1-13, 2017.

SINGH, A.K.; SHARMA, L.; MALLICK, N.; MALA, J. Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 1213–1232, 2016.

SINGH, A.K.; SRIVASTAVA, J.K.; CHANDEL, A.K.; SHARMA, L.; MALLICK, N.; SINGH, S.P. Biomedical applications of microbially engineered Polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 1, p. 1-26, 2018.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R.S. Spirulina - From growth to nutritional product: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 157-171, 2017.

SQUIO, C.R; ARAGÃO, G.M.F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, p. 615-622, 2004.

STEINBUCHER, A.; LUTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, p. 81–96, 2003.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

SUDESH, K.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. Effect of increased PHA synthase activity on polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC6803. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 97–104, 2002.

SUNDARAMOORTHY, B.; KADIYALA, G.; BHASKARAN, M. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, p. 278–285, 2013.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 148–175, 2007.

SUZUKI, D.V.; CARTER, J.M.; RODRIGUES, M.F.A.; SILVA, E.S.; MAIORANO, A.E. Purification of polyhydroxybutyrate produced by *Burkholderia cepacia* IPT64 through a chemical and enzymatic route. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 771-775, 2008.

- TAIDI, B.; MANSFIELD, D.A.; ANDERSON, A.J. Turnover of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 129, p. 201 – 205, 1995.
- TING, C.S.; ROCAP, G.; KING, J.; CHISHOLM, S.W. Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: The origins and significance of divergent light-harvesting strategies. **Trends in Microbiology**, v. 10, p. 134–142, 2002.
- TOH, P.S.Y.; JAU, M.H.; YEW, S.P.; ABED, R.M.M.; SUDESH, K. Comparison of polyhydroxyalkanoates biosynthesis, mobilization and the effects on cellular morphology in *Spirulina platensis* and *Synechocystis* sp. **Journal of Biosciences**, v. 19, p. 21–38, 2008.
- TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*). **In: VONSHAK, A. Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology.** London: Taylor & Francis, 1997.
- TROSCHL, C.; MEIXNER, K.; DROSG, B. Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years' Working Experience Running a Pilot Plant. **Bioengineering**, v. 4, p. 26-45, 2017.
- VAN-THUOC, D.; QUILLAGUAMÁN, J.; MAMO, G.; MATTIASSON, B. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 420-428, 2008.
- VERLINDEN, R.A.J.; HILL, D.J.; KENWARD, M.A.; WILLIAMS, C.D.; RADECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1437–1449, 2007.
- XIA, L.; RONG, J.; YANG, H.; HE, Q.; ZHANG, D.; HU, C. NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 402–409, 2014.
- XIN, L.; HONG-YING, H.; YU-PING, Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3098–3102, 2011.
- WITT, U.; MULLER, R.J.; DECKWER, W.D. Biodegradation behaviour and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 15, p. 81–89, 1997.
- YOO, C.; LA, H.J.; KIM, S.C.; OH, H.M. Simple processes for optimized growth and harvest of *Ettlia* sp. by pH control using CO₂ and light irradiation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, p. 288–296, 2015.
- ZHANG, P.; LI, Z.; LU, L.; XIAO, Y.; LIU, J.; GUO, J.; FANG, F. Effects of stepwise nitrogen depletion on carotenoid content, fluorescence parameters and the cellular stoichiometry of *Chlorella vulgaris*. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 181, p. 30–38, 2017.

4 CAPÍTULO II

EFICÁCIA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS) DE *SPIRULINA* SP. E INFLUÊNCIA NA COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES DO POLÍMERO

Artigo publicado em 2018

Revista: Algal Research

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.05.016>

4.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de diferentes métodos de extração de polihidroxicanoatos da microalga *Spirulina* sp. LEB-18, e verificar a influência do método na pureza, propriedades e composição dos polímeros. Os PHAs foram caracterizados por meio das análises de FTIR, massa molecular, índice de cristalinidade e composição monomérica. Os métodos de extração apresentaram diferentes níveis de eficácia, com rendimentos entre 6,10 e 9,80% e graus de pureza entre 63,5 e 93,6%. O uso do hipoclorito de sódio na etapa inicial da extração aumentou o rendimento, enquanto que o uso do metanol no final do processo contribuiu para aumentar a pureza dos polímeros. A massa molecular e o índice de cristalinidade dos PHAs variaram com os métodos empregados, demonstrando interferência da extração nas propriedades dos polímeros. A composição dos PHAs também foi influenciada pela extração, apresentando percentuais variáveis dos monômeros identificados. Os copolímeros dos PHAs obtidos são formados pelos monômeros 11-hidroxihexadecanoato, em maior proporção, hidroxieptanoato e hidroxitetradecanoato, demonstrando que a *Spirulina* sp. LEB-18 é capaz de produzir polímeros de cadeia média e longa. A detecção destes blocos monoméricos na estrutura dos PHAs desta microalga é uma importante novidade científica, uma vez que são constituintes de polímeros absolutamente novos. Observou-se uma relação indireta ($R^2 = 0,8044$) entre o percentual do monômero 11-hidroxihexadecanoato e o grau de cristalinidade dos PHAs obtidos pelos diferentes métodos, sugerindo que a obtenção do polímero com monômeros de cadeias médias e longas contribui para reduzir a sua cristalinidade.

Palavras-chave: Cianobactéria, biopolímero, massa molecular, microalga.

4.2 INTRODUÇÃO

Os PHAs são poliésteres, sintetizados e acumulados intracelularmente como grânulos por vários microrganismos (FRADINHO et al., 2013; KULKARNI et al., 2011). As propriedades dos PHAs, incluindo a capacidade de processo termoplástico, resistência absoluta à água e biodegradabilidade completa, sugerem que os PHAs podem ser atraentes como os plásticos comuns e, portanto, são considerados como seus possíveis substitutos (BEN et al., 2007; CHEN et al., 2008; MENDHULKAR et al., 2017). Apesar das características atraentes dos PHAs, seu uso em embalagens de alimentos, na biomedicina, na área farmacêutica e em outras aplicações, é limitado devido ao alto custo de produção e extração (KAVITHA et al., 2016; KULKARNI et al., 2011).

As cianobactérias podem ser consideradas como microrganismos alternativos às bactérias para obtenção de PHAs com menor custo, devido às suas exigências mínimas de nutrientes e a sua natureza fotoautotrófica, sendo os únicos procariotos que acumulam PHAs pela fotossíntese (FREITAS et al., 2017; SUNDARAMOORTHY et al., 2013). Mais de 100 cepas de cianobactérias já foram identificadas como produtoras de PHAs, em concentrações que variaram de 0,04 a 40% do peso das células secas sob condições de crescimento fotoautotróficas (SHARMA et al., 2007).

Além da etapa de produção, o método de extração dos PHAs é um ponto relevante não apenas relacionado aos custos de obtenção, como também as características e a composição monomérica dos biopolímeros, que podem determinar sua aplicação industrial. As propriedades desses materiais e, portanto, também o potencial de aplicação, dependem em grande parte da sua composição monomérica (KAVITHA et al., 2016).

Os PHAs são compostos de monômeros com um comprimento de cadeia de carbono variando de 3 a 18 átomos de carbono, e uma ampla gama de grupos funcionais que podem estar presentes, por exemplo, grupos halogêneos, fenoxi, acetoxi, fenilo, ciano e epoxi (MENDHULKAR et al., 2017; RANJANA e NIRUPAMA, 2015). O método de extração é muito importante para a composição monomérica e também pode influenciar as propriedades dos PHAs. Como é um produto acumulado intracelularmente no citoplasma das células dos microrganismos, os PHAs são extraídos das células após a etapa de produção (cultivo) (FRADINHO et al., 2013).

A etapa de extração envolve operações unitárias diferentes que asseguram a remoção adequada do biopolímero do interior das células, envolvendo uma etapa de tratamento de desestabilização e/ou rompimento celular, separação da biomassa do meio de cultivo,

recuperação e purificação do biopolímero (FREITAS et al., 2017; KULKARNI et al., 2011). Entre os métodos utilizados nos processos de extração dos PHAs, estão a aplicação de solventes orgânicos, fluidos supercríticos, digestor biológico (enzimas), aplicação de métodos mecânicos, como homogeneizador de alta pressão, ultrassom, entre outros, métodos mecânicos e químicos combinados e estudos de liberação espontânea dos PHAs (KAVITHA et al., 2016; MARTINS et al., 2014; MENDHULKAR et al., 2017). Entretanto, a técnica de extração de PHAs com solventes orgânicos é a mais utilizada por sua facilidade de aplicação, baixa degradação e alta pureza do produto extraído (RAHMAN et al., 2015).

Devido à importância dos métodos de extração na obtenção dos PHAs, é essencial a realização de estudos que abordem a eficiência dos métodos utilizados, e a influência dos processos de extração nas características do polímero, como a massa molecular, grau de cristalinidade e composição monomérica, por exemplo. Essas características poliméricas são extremamente importantes porque estão diretamente relacionadas à aplicação do polímero e ao tempo de degradação do mesmo quando descartado (KAVITHA et al., 2016).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a eficácia de seis métodos de extração de PHAs da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB-18, correlacionando os resultados com a pureza, composição e propriedades dos biopolímeros obtidos.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Microrganismo, meios e condições de cultivo

Neste estudo, foi utilizada uma cepa de *Spirulina* sp. LEB-18 isolada da Lagoa Mangueira (33°30'12 "S, 53°08'58" W; Rio Grande, Brasil). O meio Zarrouk foi utilizado para manutenção do inóculo e para o cultivo de *Spirulina* sp. LEB-18. Os constituintes do meio foram NaHCO₃: 16,8 g/L, K₂HPO₄: 0,5 g/L, NaNO₃: 2,5 g/L, K₂SO₄: 1,0 g/L, NaCl: 1,0 g/L, MgSO₄.7H₂O: 0,2 g/L, CaCl₂: 0,04 g/L, FeSO₄.7H₂O: 0,01 g/L, EDTA: 0,08 g/L e micronutrientes (MORAES et al., 2016).

O cultivo outdoor foi realizado em tanque com comprimento, largura e altura de 2,20m, 0,90m e 0,35m, respectivamente, que continham 240 L de *Spirulina* sp. LEB-18. No tanque, o cultivo foi agitado constantemente por bombas submersas, com uma temperatura do cultivo variando de 26 a 37 °C. O volume do meio de cultivo foi mantido pela adição periódica de água potável para compensar a evaporação de água no tanque. Os cultivos foram feitos durante o mês de agosto (inverno), e foram mantidos no tanque sob luz natural por 30 dias, com um

fotoperíodo de aproximadamente 12h (claro/escuro) e com uma concentração celular inicial de 0,2 g/L. Após este período, a concentração celular do cultivo foi determinada por densidade óptica (absorbância) utilizando um espectrofotômetro digital (BEL PHOTONICS UV-M51, Piracicaba-SP - Brasil) a um comprimento de onda de 670 nm. Antes dos experimentos, uma curva de crescimento padrão de *Spirulina* sp. LEB-18 que correlacionava a densidade óptica com a biomassa em peso seco (concentração celular g/L = $0,617 \times \text{Absorbância} + 0,00125$; $R^2 = 0,9916$), foi construída para determinação da concentração celular.

A biomassa produzida na escala piloto foi removida e separada por centrifugação a 10000 rpm por 15 min (Hitachi Himac CR-GIII, Tóquio-Japão). Posteriormente, a biomassa foi congelada, liofilizada e armazenada até início dos testes.

4.3.2. Métodos de extração

A biomassa seca foi submetida aos seis diferentes métodos de extração de PHAs, de acordo com a Tabela 2.1. Para cada método, utilizou-se 3g de biomassa seca para extrair os PHAs. O método M 1 consistiu na lavagem da biomassa com solução de hipoclorito de sódio a 4% (20min/45°C) e subsequente centrifugação. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com água destilada, depois recentrifugado e novamente descartado o sobrenadante e adicionado acetona (2h/45°C) para precipitar o biopolímero. Após essa etapa, o polímero foi seco em estufa a 35°C por 48h (MARTINS et al., 2014).

O método M 2 consistiu na lavagem da biomassa com hipoclorito de sódio a 4% (20min/45°C) e subsequente centrifugação. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o polímero foi extraído em clorofórmio quente (3h/80°C) seguido de precipitação da solução de clorofórmio em metanol frio. A mistura de metanol-clorofórmio foi decantada e o polímero precipitado foi separado por centrifugação. Em seguida, o polímero foi dissolvido novamente em clorofórmio e obtido após evaporação do solvente, de acordo com método proposto por Samrot et al. (2011) com modificações.

No método M 3, a biomassa foi suspensa em metanol durante a noite a 4°C para remoção de pigmentos. O sedimento obtido após centrifugação foi seco a 60°C e os polímeros foram extraídos em clorofórmio quente (3h/80°C). Os PHAs foram precipitados da solução de clorofórmio em metanol frio. A mistura de metanol-clorofórmio foi decantada e o polímero precipitado foi separado por centrifugação. Em seguida, o polímero foi dissolvido novamente em clorofórmio e obtido após evaporação do solvente (SHIRIVASTAV et al., 2010).

Tabela 2.1. Métodos utilizados para extração dos biopolímeros.

Método	Descrição	Referência
M 1	Lavagem com hipoclorito de sódio 4 % (20 min/45°C); Lavagem com acetona (2h /40°C).	Martins et al. (2014)
M 2	Lavagem com hipoclorito de sódio 4% (20 min/45°C); Extração com clorofórmio quente (3h/80°C); Precipitação da solução de clorofórmio em metanol frio.	Samrot et al. (2011) com modificações
M 3	Suspensão em metanol (24h/4°C); Extração com clorofórmio quente (3h/80°C); Precipitação da solução de clorofórmio em metanol frio.	Shrivastav et al. (2010)
M 4	Lavagem com hipoclorito de sódio 4% (20 min/45°C); Extração com clorofórmio quente (3h / 80 °C).	Martins et al. (2014) com modificações
M 5	Suspensão em metanol (24h/4°C); Ultrassom (30 min); Extração com clorofórmio quente (3h/80°C).	Penloglou et al. (2012) com modificações
M 6	Ultrassom (30 min); Extração com clorofórmio quente (3h/80°C).	Penloglou et al. (2012)

O método M 4 foi feito de acordo com Martins et al. (2014) com modificações. O primeiro passo foi lavar a biomassa com solução de hipoclorito de sódio a 4% (20min/45°C) e subsequente centrifugação. O sobrenadante foi rejeitado e o precipitado foi lavado com água destilada, depois recentrifugado e novamente descartado o sobrenadante e adicionado clorofórmio (3h/80°C), substituindo a acetona utilizada no Método M 1, para precipitar o biopolímero. Em seguida, secou-se o polímero em estufa a 35 °C durante 24h.

O método M 5 foi feito de acordo com Penloglou et al. (2012) com modificações. A biomassa seca foi suspensa em metanol e mantida durante a noite a 4°C para remoção de pigmentos. O sedimento obtido após centrifugação foi seco a 60°C, ressuspensão em água destilada e submetido ao banho de ultrassom durante 30 min. Após este período, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. A extração dos PHAs foi feita em clorofórmio quente (3h/80°C). Após a extração, a amostra foi filtrada e o polímero foi obtido após evaporação do solvente.

O método M 6 foi semelhante ao método M 5, excluindo a etapa inicial de lavagem da biomassa com metanol. A biomassa seca foi ressuspensa em água destilada e submetida ao banho de ultrassom (30 min) seguido da etapa de centrifugação. A extração dos PHAs foi feita em clorofórmio quente (3h/80°C). Após este período, a amostra foi filtrada e o polímero foi obtido após evaporação do solvente (PENLOGLOU et al. 2012).

Todas as extrações foram feitas em triplicata.

4.3.3 Rendimentos de extração

Os rendimentos de extração dos PHAs foram determinados gravimetricamente, considerando a massa inicial de biomassa empregada em cada extração, de acordo com a Equação (2.1).

$$R = \frac{(mp \times 100)}{mb} \quad (2.1)$$

Onde,

R é o rendimento de extração dos PHAs em porcentagem;

mp é a massa obtida de PHA em gramas;

mb é a massa de biomassa seca utilizada na extração em gramas.

4.3.4 Propriedades dos PHAs

4.3.4.1 Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de PHAs foram analisadas qualitativamente através de espectroscopia FTIR (PerkinElmer Modelo Espectro 100, Perkin Elmer), num intervalo de 4000 cm⁻¹ a 600 cm⁻¹, utilizando acessório de reflectância total atenuada (ATR).

4.3.4.2 Massa molecular (Mm)

A massa molecular dos PHAs foi determinada por meio da cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um cromatógrafo (PerkinElmer Series 200) equipado com injetor automático e um detector de índice de refração (IR) (PerkinElmer), de acordo com Assis et al. (2016).

Para separação dos PHAs, foi utilizada uma coluna de exclusão molecular Shodex KD 807 (30 cm × 78 mm × 5 mm) a uma temperatura de 30 °C. Os polímeros foram dissolvidos em clorofórmio a uma concentração final de 0,7 g/L e filtrados (membrana PTFE, 0,45 µm) antes da injeção no cromatógrafo. A fase móvel empregada foi clorofórmio, a um fluxo de 1,0 mL/min. A massa molecular foi determinada por meio de uma curva padrão, Equação (2.2), que foi construída utilizando padrões de poliestireno de baixa polidispersividade (682–1.670.000 Da, Poliestireno de alta Mm Normas Kit, Polymer Standards Service,.) e correlacionava a massa molecular dos padrões com o tempo de retenção (Tr) identificado nos cromatogramas.

$$\log Mm = -0,8364 \times Tr + 14,83 \quad \text{com} \quad R^2 = 0,9917 \quad (2.2)$$

4.3.4.3 Difração de raio-x (DRX)

As análises de DRX foram realizadas em um difratômetro de raio-x (SHIMADZU) com monocromador de grafite, operando com radiação CuK α a 40 kV, 30 mA, na região de 5 a 50°, em uma velocidade de 2 °/min. O percentual de cristalinidade das amostras foi obtido pelo método de ajuste dos picos dos difratogramas de raios-X de acordo com o método de Vonk (VONK, 1973; RIBEIRO et al., 2015). Para os cálculos da cristalinidade dos PHAs, considerou-se a razão do somatório das áreas dos picos cristalinos pela área total de todas as gaussianas de acordo com a Equação (2.3).

$$\% C = \frac{Ic \times 100}{(Ic + Ia)} \quad (2.3)$$

Onde,

% C = grau de cristalinidade;

Ic = somatório das áreas dos picos cristalinos;

Ia = áreas do halo amorfo.

4.3.4.4 Composição monomérica dos PHAs

A identificação e quantificação dos monômeros que compõe as amostras de PHAs foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-MS) (Clarus 500 Perkin Elmer, Perkin Elmer) com software TurboMass v. 4.5.0 e biblioteca NIST 98. As amostras de PHAs (~0,04g) foram submetidas a metanólise conforme método descrito

por BRANDL et al. (1988), com algumas modificações (CAMPOS et al., 2014). Todas as amostras de polihidroxicanoatos foram dissolvidas em 2 mL de metanol acidificado, contendo 3% (v/v) de H₂SO₄ e 1mL de clorofórmio em um tubo de ensaio com tampa de rosca. As amostras foram então mantidas a 100 °C durante 60 min. Depois de esfriar a temperatura ambiente, adicionou-se 1mL de água destilada e a amostra foi então agitada durante 10 min, após esse período ocorreu a separação de fases (CAMPOS et al., 2014).

A fase orgânica foi separada depois da injeção no modo splitless, em uma coluna capilar DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), utilizando hélio (1,0 mL/min) como gás de arraste. A temperatura do injetor foi 250 °C, e a do detector foi 240 °C. O espectrômetro de massas foi programado para digitalizar no intervalo de 50 a 550 m/z, com um programa de temperatura de 80 °C a 200 °C (20 °C/min). Os monômeros de PHAs foram identificados por comparação dos espectros de massas das amostras, com espectros da biblioteca NIST 98 e quantificados por normalização de área.

4.3.5 Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando análise de variância seguida pelo teste de Tukey a um nível de confiança de 95,0%. Os resultados foram analisados usando o software STATISTICA 7.0.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Rendimentos de extração

O cultivo apresentou uma concentração celular de 1,02 g/L ao final dos 30 dias, produzindo aproximadamente 245g de biomassa seca. A curva de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 nas mesmas condições do cultivo desse estudo pode ser visualizada no trabalho de Jesus et al. (2018). Os rendimentos de extração dos PHAs (Tabela 2.2) variaram de 6,10 a 9,80% entre os métodos empregados, com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre algumas metodologias. Estes resultados indicam a existência de diferentes níveis de eficácia entre os métodos, que podem estar relacionados com a pureza dos biopolímeros obtidos. O método que utilizou o hipoclorito de sódio (M 4) apresentou maior acúmulo de PHAs (Tabela 2.2) em relação ao método que submeteu a biomassa ao ultrassom (M 6). Tanto o hipoclorito de sódio quanto o ultrassom são utilizados para desestabilizar e romper a membrana celular dos microrganismos, possibilitando assim a extração dos PHAs acumulados intracelularmente.

Tabela 2.2. Rendimentos de cada método de extração e pureza dos PHAs de *Spirulina sp.* LEB-18.

Método de extração	Rendimento (% m/m biomassa seca)	Pureza (%)	Rendimento de PHAs puros (%)
M 1 Hipoclorito de sódio + acetona	8,06 ± 0,20 ^a	89,35	7,20 ± 0,20 ^a
M 2 Hipoclorito de sódio + clorofórmio + metanol	8,70 ± 0,30 ^b	93,62	8,14 ± 0,30 ^b
M 3 Metanol + clorofórmio + metanol	6,10 ± 0,30 ^c	85,17	5,20 ± 0,30 ^c
M 4 Hipoclorito de sódio + clorofórmio	9,80 ± 0,40 ^d	79,84	7,82 ± 0,40 ^d
M 5 Metanol + ultrassom + clorofórmio	6,70 ± 0,40 ^c	84,24	5,64 ± 0,40 ^c
M 6 Ultrassom + clorofórmio	8,91 ± 0,20 ^b	63,51	5,66 ± 0,20 ^c

Médias ± desvio padrão. Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os experimentos ao nível de 95% de confiança.

O uso do ultrassom refere-se a um método de perturbação mecânica, no qual as ondas ultrasônicas são transferidas e dissipadas na suspensão celular, formando um tipo de campo, no qual ocorre aumento de massa e conseqüente transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e a criação de uma força capaz de desestabilizar a parede celular (JEON et al., 2013). Assim, com o uso de ultrassom, existe uma maior facilidade para a ação do solvente e, conseqüentemente, ocorre uma melhora na obtenção do polímero (PENLOGLOU et al., 2012).

Quando este método físico é usado para rompimento da parede celular dos microrganismos, um solvente (método químico) é aplicado posteriormente para extrair o polímero, como usado no método M 6 estudado, que após o uso do ultrassom foi aplicado o clorofórmio para extração dos biopolímeros (Tabela 2.1). Este método teve um rendimento de extração de 8,91%, cerca de 9% inferior ao rendimento encontrado utilizando o hipoclorito de sódio (9,80%, método químico – M 4) como etapa inicial (Tabela 2.2). Esses dados demonstram que o método químico utilizado é mais eficiente para a etapa de desestabilização e ruptura da parede celular da biomassa das microalgas do que o método físico (ultrassom).

O uso de um método químico consiste na inserção da biomassa em um solvente com emprego de alta temperatura (60 a 80°C). Neste caso, a permeabilidade da membrana celular é modificada pela solubilização do polímero no solvente, formando uma suspensão de debris celulares (JACQUEL et al., 2008). O polímero sólido em contato com o solvente tende a inchar devido à difusão das moléculas do solvente no volume livre entre as cadeias de polímero, formando um gel (JEON et al., 2013).

No caso do uso de hipoclorito no estágio inicial da extração, ocorre um processo inverso porque o hipoclorito rompe a membrana celular e dissolve o material celular não-PHAs,

deixando o polímero insolúvel que precipita na solução. Com o uso subsequente de um solvente em que o polímero é solúvel, a extração do mesmo tende a ocorrer com maior pureza (SAMROT et al., 2011). Inúmeros solventes (clorofórmio, acetona, metil isobutilcetona, cloreto de metileno, carbonato de propileno, acetato de etilo e álcool isoamílico) podem ser utilizados para extrair os PHAs, sendo o clorofórmio o mais utilizado nos processos de extração (CAMPOS et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015).

Sharma et al. (2007) utilizaram hipoclorito de sódio seguido de clorofórmio quente (método M 4, Tabela 2.1) para extrair PHAs da biomassa da cianobactéria *Nostoc muscorum* e encontraram um rendimento de extração de 47,4%, adicionando glicose e acetato ao meio de cultivo da microalga. Jau et al. (2005) também empregaram o hipoclorito de sódio no estágio inicial da extração de PHAs da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 e encontraram um rendimento de extração de 10,1% semelhante ao encontrado neste estudo. Penloglou et al. (2012) utilizaram o ultrassom na fase inicial de extração dos PHAs da biomassa da bactéria *Alcaligenes latus* cultivada em processo contínuo, e encontraram rendimentos de extração entre 4 e 12% dependendo da concentração da fonte de carbono utilizada no meio.

No presente estudo, em cinco (M 2, M 3, M 4, M 5 e M 6) dos seis métodos avaliados, o clorofórmio foi utilizado para extrair os PHAs, e somente no método M 1 utilizou-se acetona como solvente de extração (Tabela 2.1). Na comparação da eficácia destes dois solventes (Tabela 2.2), observou-se que com o clorofórmio, o rendimento de extração (9,80%, M 4) foi cerca de 18% maior que o obtido com o uso da acetona (8,06%, M 1). No entanto, a acetona é amplamente utilizada para a extração de PHAs da biomassa de microalgas porque é um solvente de menor custo e menos tóxico do que o clorofórmio (FEI et al., 2016; RAMSAY et al., 1994), o que pode justificar seu uso.

Martins et al. (2014) utilizaram acetona como solvente de extração de PHAs da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 e relataram rendimentos de extração entre 7,64 e 44,19%, superiores aos encontrados neste estudo. As maiores porcentagens de acúmulo dos PHAs encontrados no estudo de Martins et al. (2014) são justificadas pelas variações na concentração e fonte de carbono utilizada no meio de cultivo, o que favoreceu maior produção de PHAs pelas microalgas.

Nos métodos M 2, M 3 e M 5, foi utilizada uma etapa de lavagem da biomassa com metanol (Tabela 2.1). Este solvente quando empregado no início do processo de extração (M 3 e M 5), objetiva remover pigmentos presentes na biomassa que possam interferir na extração dos biopolímeros. Essa etapa é amplamente utilizada nos métodos de extração de PHAs da

biomassa de microalgas, uma vez que esses microrganismos possuem grandes quantidades de pigmentos que podem ser extraídos em conjunto com os PHAs e com isso interferirem na eficiência da extração.

Quando o metanol é utilizado no final do processo de extração (M 2 e M 3, Tabela 2.1), é empregado com a finalidade de precipitar o polímero em solução com o solvente de extração. Esta etapa é importante, pois pode aumentar a pureza na recuperação dos PHAs. Quando utilizado para este fim, o metanol pode ser substituído por um solvente que também exerça a função de um não-solvente dos PHAs, tais como misturas de álcoois e água, ou por um método físico de separação, tal como filtração ou centrifugação, que foi utilizada nos métodos M 1, M 4, M 5 e M 6 (Tabela 2.1). Um não-solvente é definido como uma substância que é incapaz de dissolver o biopolímero, precipitando-o por indução e/ou enfraquecendo o poder de diluição do solvente (LAYCOCK et al., 2014).

Assim, os métodos que utilizaram metanol, apresentaram menores rendimentos de extração do que os métodos que não o utilizaram, pois apresentaram menor quantidade de compostos interferentes e, conseqüentemente, uma maior pureza na extração dos PHAs. Este fato pode ser observado comparando os métodos M 4 e M 2, nos quais os rendimentos de extração reduziram de 9,80 para 8,70%, respectivamente, e os métodos M 6 e M 5, onde os rendimentos de extração reduziram de 8,91% para 6,70% respectivamente, quando o metanol foi utilizado no final do processo de extração (Tabela 2.2).

Shrivastav et al. (2010) usaram metanol no início e no final do processo de extração dos PHAs da cianobactéria *Spirulina subsalsa* cultivada em meio ASNIII e encontraram um rendimento de extração de 7,45% após 10 dias de cultivo. Kavitha et al. (2016) utilizaram a lavagem com hipoclorito de sódio, seguido da extração com clorofórmio quente e precipitação em metanol frio (método M 2) para extrair PHAs da biomassa da microalga *Botryococcus braunii* e encontraram um rendimento de extração de 20,4%, empregando uma temperatura de 40 °C e um meio de cultivo incorporado com 60% de esgoto.

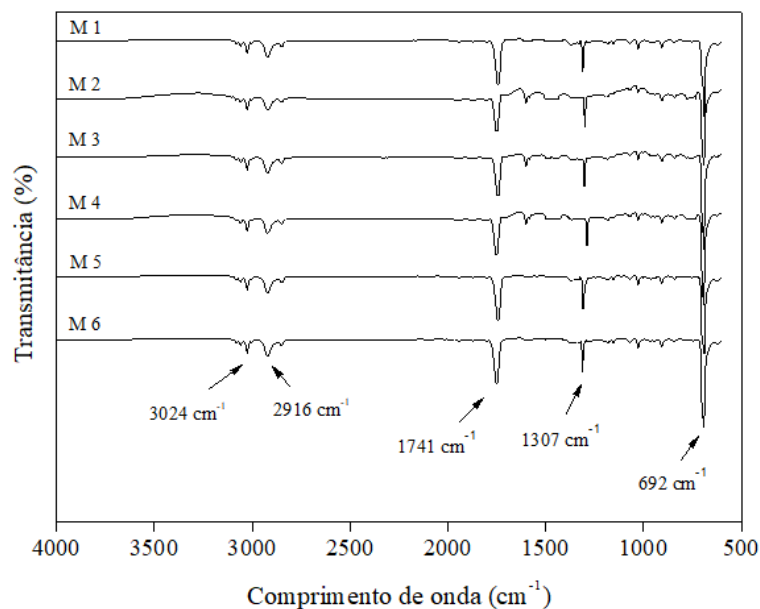
4.4.2 Propriedades dos PHAs

4.4.2.1 FTIR

Em relação aos PHAs, a Figura 2.1 apresenta os espectros FTIR das amostras de PHAs obtidos por cada método de extração, demonstrando uma similaridade entre todas as amostras. As bandas de transmitância localizadas em 1735-1745 cm^{-1} são atribuídas à vibração de

estiramento do grupo C=O (éster carbonilo) no poliéster. As bandas dos grupos C-O-C aparecem na região espectral de 1285 a 1310 cm^{-1} . A região de transmitância de 2800-3100 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento de ligações C-H de grupos metil (CH_3) e metileno (CH_2). A banda a 700 cm^{-1} corresponde ao grupo R-C-O (HONG et al., 1999; ROHINI et al., 2006). Esses grupos funcionais são característicos das estruturas químicas dos PHAs, confirmando que todas as metodologias empregadas extraem PHAs como compostos principais. Apesar disso, observaram-se diferentes níveis de intensidade dessas bandas entre as amostras obtidas pelos diferentes métodos, sugerindo diferentes níveis de pureza entre as amostras dos PHAs, que foram confirmados na análise da composição monomérica.

Figura 2.1. Espectros de FTIR dos PHAs produzidos por *Spirulina* sp. LEB-18 obtidos a partir dos diferentes métodos de extração.



Shrivastav et al. (2010) obtiveram os espectros de FTIR de amostras de PHAs obtidas a partir da biomassa de *Spirulina subsalsa* e relataram a presença de bandas a 1724 cm^{-1} , correspondendo ao grupo éster carbonilo. Kavitha et al. (2016) analisaram os espectros de FTIR de polihidroxibutirato extraídos da biomassa da microalga *Botryococcus braunii* e identificaram a presença de bandas de absorção a 2933 cm^{-1} , relacionadas ao grupo $-\text{CH}_3$, banda a 1652 cm^{-1} , relacionada a presença do grupo carboxílico éster e banda a 1232 cm^{-1} , que é característica das vibrações de alongamento assimétricas e simétricas dos grupos C-O-C, comprovando a obtenção do biopolímero.

4.4.2.2 Massa molecular

A Tabela 2.3 apresenta a massa molecular média dos PHAs obtidos pelos diferentes métodos de extração. Os resultados da massa molecular variaram de 58,76 a 62,26 KDa com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras, confirmando a interferência do método de extração na massa molecular dos PHAs. Os métodos de extração M 2, M 3 e M 4 resultaram na extração de PHAs com menor massa molecular (58,76 KDa), sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras obtidas por esses métodos de extração. Em contraste, os métodos M 1, M 5 e M 6 resultaram na extração de PHAs com massa molecular até 5% maior que os extraídos por outros métodos e com diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras (Tabela 2.3).

Os métodos M 5 e M 6, que utilizaram o banho em ultrassom como etapa inicial (Tabela 2.3) da extração, apresentaram PHAs com massa molecular (62,26 KDa) 5% superiores aos métodos que utilizaram a lavagem com hipoclorito de sódio (M 2, M 3 e M 4) como etapa inicial, demonstrando que o método químico é mais agressivo e resulta em polímeros com menor massa molecular (Tabela 2.3). Isto é decorrente da combinação do uso do solvente com a alta temperatura que pode causar a quebra do polímero e com isso reduzir a sua massa molecular (JEON et al., 2013).

Tabela 2.3. Massa molecular e índice de cristalinidade dos PHAs obtidos pelos diferentes métodos de extração.

Métodos	Mm (KDa)	Cristalinidade (%)
M 1	61,07 ± 0,03 ^a	50,47
M 2	58,76 ± 0,09 ^b	50,15
M 3	58,76 ± 0,04 ^b	51,20
M 4	58,76 ± 0,03 ^b	51,32
M 5	62,26 ± 0,03 ^c	51,18
M 6	62,26 ± 0,05 ^c	51,65

Médias ± desvio padrão. Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os experimentos ao nível de 95% de confiança.

De acordo com Kulkarni et al. (2011), polímeros termoplásticos são caracterizados por ligações covalentes entre moléculas e estas podem ser rompidas pela inserção de energia. Por conseguinte, quando os polímeros são aquecidos, se a energia térmica imposta ao polímero for

maior que a energia das ligações químicas, algumas dessas ligações podem ser rompidas, causando uma diminuição da massa molecular do polímero (NAVARRO et al., 2007).

Quando se avalia o tipo de solvente de extração utilizado por cada método, verifica-se que o uso de acetona resultou em um polímero de maior massa molecular, demonstrando que este solvente foi menos agressivo na extração do polímero (Tabela 2.3). Este fato pode ser observado comparando o método M 1 (acetona) com o método M 4 (clorofórmio), onde é evidenciada uma redução de 4% na massa molecular dos PHAs, que pode ter sido causado pelo uso de clorofórmio associado ao emprego de uma temperatura mais alta (80 °C) no método de extração M 4 (Tabela 2.3).

Os PHAs extraídos pelos métodos M 4 e M 5 apresentaram massas moleculares mais elevadas que os obtidos pelos demais métodos, o que pode ser atribuído à não utilização de um método químico no início do processo de extração, que é um fator importante relacionado à redução da massa molecular do polímero. Mesmo que a estrutura química do biopolímero seja a mesma, diferentes massas moleculares podem alterar significativamente as propriedades dos PHAs (físicas, mecânicas, térmicas, reológicas, de processamento e outros), uma vez que estas propriedades dependem do tamanho da cadeia do biopolímero.

Nesse contexto, com os resultados obtidos, observa-se que a massa molecular média dos PHAs pode ser influenciada não apenas pela composição do meio de cultivo e pelas condições de produção, como relatado em outros estudos (CAMPOS et al., 2014; DIVYASHREE et al., 2009; KULKARNI et al., 2011), mas também pelo método usado na extração do polímero. Esta diferença de comportamento observada para os polímeros obtidos neste estudo é mais provável que seja atribuída a um rearranjo estrutural do polímero durante a extração. Esse rearranjo estrutural pode ter sido causado por um aumento do grau de polimerização que ocorre quando o material está sob aquecimento e que pode produzir polímeros com diferentes tamanhos de cadeia e, conseqüentemente, com diferentes massas moleculares. (CAMPOS et al., 2014). Devido à concorrência industrial, a capacidade de controlar a massa molecular do biopolímero durante a produção e extração, e a compreensão de como ela influencia as propriedades finais do polímero, é extremamente importante.

Kulkarni et al. (2011) relataram uma massa molecular de 208 KDa para PHAs extraídos com clorofórmio da biomassa do cianobactéria *Halomonas campisalis* após 42 dias de cultivo em meio adicionado de maltose e cloreto de cálcio, um valor três vezes maior que o encontrado neste estudo. Campos et al. (2014) encontraram massas moleculares entre 510 KDa e 745 KDa para os PHAs extraídos com clorofórmio da bactéria *Cupriavidus necator* cultivada com

diferentes concentrações de carbono e nitrogênio, um valor bem superior ao encontrado neste estudo. Na literatura, não encontramos estudos que relatem a massa molecular de PHAs extraídos da biomassa de *Spirulina*.

Sabe-se que diferentes microrganismos produzem PHAs com diferentes massas moleculares, e que as condições de cultivo como tipo e concentração do substrato, disponibilidade de nutrientes, pH e temperatura, além do método empregado na extração, podem interferir na massa molecular do polímero (KULKARNI et al., 2011; LAYCOCK et al., 2014). Acredita-se que os valores baixos de massa molecular dos PHAs produzidos pela *Spirulina* sp. LEB-18 encontrado neste estudo, deve-se a diferenças nos processos metabólicos e de polimerização envolvidos na síntese de polímeros pelas microalgas quando comparado a outros microrganismos, como bactérias, por exemplo. A natureza cíclica do metabolismo dos PHAs permite que a produção e a degradação do polímero ocorram simultaneamente e isso pode interferir diretamente na sua massa molecular.

Além disso, fatores como nível e tempo de expressão da enzima polihidroxialcanoato sintase, que varia com o tipo e espécie de microrganismo, também interferem na massa molecular do polímero (LAYCOCK et al., 2014). Acredita-se que todos esses fatores afetam diretamente o comprimento da cadeia polimérica, e que precisam ser estudados detalhadamente para o desenvolvimento de modelos que possam prever a massa molecular desses polímeros, uma vez que esta é uma propriedade fundamental para sua aplicação industrial (SUNDARAMOORTHY et al., 2013; LAYCOCK et al., 2014).

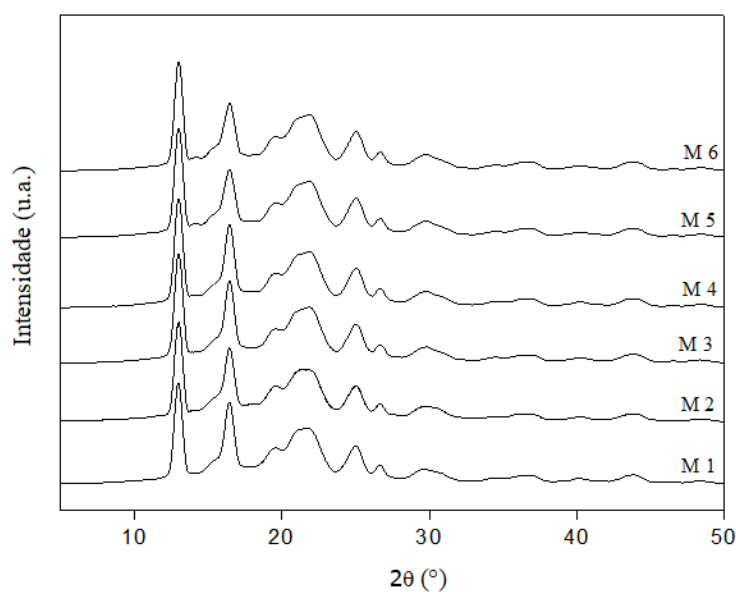
4.4.2.3 Difração de raio-x (DRX)

O perfil DRX dos PHAs (Figura 2.2) apresenta a difração de pico em 2θ , que é típico dos poliésteres semi-cristalinos, a aproximadamente $13,0^\circ$, $16,40^\circ$, $21,77^\circ$ e $24,96^\circ$ para todas as amostras de PHAs, indicando uma fase cristalina nas composições (RIBEIRO et al., 2015). Uma variação discreta no índice de cristalinidade (50,15 a 51,65%) foi observada nos resultados obtidos para as amostras de PHAs extraídos pelos diferentes métodos (Tabela 2.3). Os métodos M 1 e M 2 que utilizaram a lavagem com hipoclorito de sódio como etapa inicial da extração (Tabela 2.1), apresentaram polímeros com menor grau de cristalinidade e menor massa molecular (Tabela 2.3). O grau de cristalinidade está diretamente relacionado à processabilidade e as aplicações industriais dos PHAs. De acordo com Laycock et al. (2014), uma cristalinidade igual ou superior a 50% é considerada alta e prejudicial para fins comerciais

e industriais. Desta forma, um baixo grau de cristalinidade aumenta o número de possíveis aplicações industriais dos PHAs, melhorando suas características para processamento.

Campos et al. (2014) encontraram grau de cristalinidade entre 52,23 e 66,12% para PHAs obtidos da bactéria *Cupriavidus necator* cultivadas em meio com diferentes concentrações de carbono e nitrogênio, demonstrando a influência do meio sobre o grau de cristalinidade do polímero. Ribeiro et al. (2015) obtiveram PHAs da bactéria *B. cepacia* cultivadas com diferentes fontes de carbono e relataram uma variação discreta no grau de cristalinidade (48,10 a 49,70%) dos polímeros obtidos, e concluíram que esses microrganismos são capazes de biossintetizar PHAs com o mesmo grau de cristalinidade, independentemente da composição do meio de cultivo.

Figura 2.2. Difratomogramas de raios-X dos PHAs produzidos por *Spirulina* sp. LEB-18 obtidos pelos diferentes métodos de extração.



4.4.2.4 Composição monomérica dos PHAs

Além da massa molecular e do grau de cristalinidade, a composição monomérica dos PHAs também foi influenciada pelo método de extração utilizado na obtenção do polímero. As amostras de PHAs produzidas foram compostas por três blocos de construção com 7-16 átomos de carbono. Os copolímeros formados consistem principalmente do bloco do monômero de 11-hidroxihexadecanoato (16 átomos de carbono; 55,54 a 81,05%), identificado por meio da biblioteca NIST (Tabela 2.4). Os blocos de construção dos monômeros de hidroxiheptanoato

(7 átomos de carbono; 4,65 a 9,95%) e hidroxitetradecanoato (14 átomos de carbono; 2,80 a 7,23%) estão presentes em quantidades menores, e revalam a formação de um heteropolímero de polihidroxicanoato na biomassa da microalga *Spirulina* sp. Esta caracterização dos PHAs por GC-MS demonstrou que esta cianobactéria é capaz de produzir PHAs de copolímeros com blocos de construção de cadeia longa e média.

A biossíntese dos PHAs por microalgas é derivada do metabolismo dos ácidos graxos, no qual, os intermediários podem ser eliminados e incorporados em um poliéster, formando estruturas de cadeias mais longas. Assim, nas microalgas é comum obter um heteropolímero que consiste em monômeros que variam de 6 a 14 átomos de carbono (AGNEW e PFLEGER, 2013). A detecção destes monômeros na estrutura dos PHAs de *Spirulina* sp. é uma novidade científica, uma vez que são constituintes de polímeros absolutamente novos.

Tabela 2.4. Composição (% area/massa) determinada por GC-MS dos PHAs de *Spirulina* sp. LEB-18 obtidos a partir dos diferentes métodos de extração.

Tempo de retenção (min)	Identificação NIST	Métodos					
		M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6
5,40	Metil hidroxihexanoato	4,93±0,03 ^a	8,38±0,02 ^b	9,95±0,05 ^c	9,80±0,03 ^d	4,65±0,04 ^e	5,17±0,02 ^f
6,48	Metil hidroxitetradecanoato	5,08±0,03 ^a	4,19±0,03 ^b	7,23±0,04 ^c	6,34±0,06 ^d	4,05±0,02 ^e	2,80±0,03 ^f
8,23	11-hidroxihexadecanoato	79,34±0,04 ^a	81,05±0,03 ^b	67,99±0,05 ^c	63,7±0,03 ^d	75,54±0,05 ^e	55,54±0,03 ^f
Outros picos	Não identificado	8,65±0,03 ^a	6,38±0,03 ^b	14,83±0,03 ^c	20,16±0,03 ^d	15,76±0,05 ^e	36,49±0,03 ^f

Médias ± desvio padrão. Letras iguais em uma mesma linha indicam que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os experimentos ao nível de 95% de confiança.

Por meio dos resultados, observou-se que os PHAs obtidos pelos diferentes métodos de extração, apresentaram diferentes percentuais dos monômeros identificados, dando origem a polímeros com diferentes composições monoméricas (Tabela 2.4), além de diferentes massas moleculares e grau de cristalinidade, o que resulta em diferenças em suas propriedades e, conseqüentemente, na sua aplicação industrial. Esses resultados demonstram que a composição química dos PHAs sintetizados por microrganismos depende não apenas da fonte de carbono utilizada na fase de acumulação dos PHAs, como descrito em outros estudos (CAMPOS et al., 2014, HAYWOOD et al., 1989), mas também do método usado para extração do polímero.

Por meio dos resultados, verificou-se que os métodos que utilizavam hipoclorito de sódio como etapa inicial da extração do polímero (M 1 e M 2, Tabela 2.), apresentaram potencial

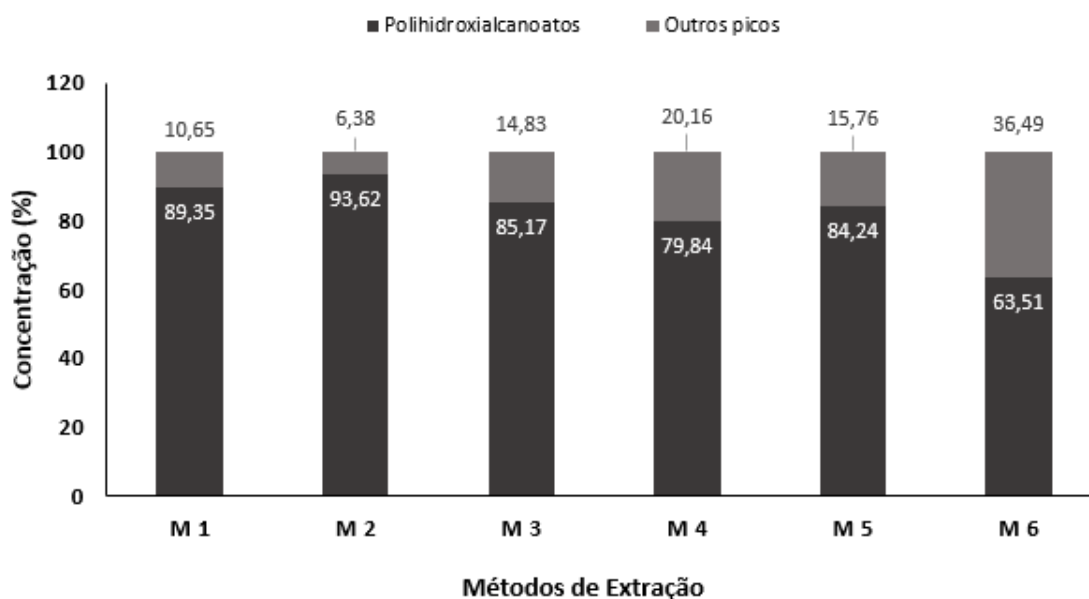
para melhorar a adaptabilidade aos blocos de construção com 14 a 16 unidades de carbono (79,42% - M 1, 85,24% - M 2, Tabela 2.4) em suas cadeias, confirmando que a etapa de extração influencia no rearranjo e na formação da cadeia do polímero.

Quanto às propriedades dos PHAs, observou-se uma relação indireta ($R^2 = 0,8044$) entre o percentual do monômero 11-hidroxihexadecanoato e o grau de cristalinidade obtido para as amostras de PHAs extraídos pelos diferentes métodos. Esses resultados indicam que a organização complexa dos blocos de construção com cadeias médias e longas pode ter impedido a formação e distribuição bem definidas de esferas cristalinas no material polimérico, o que contribuiu para a redução de sua cristalinidade (LAYCOCK et al., 2014; SIMON- COLIN et al., 2008).

Por meio da avaliação da composição monomérica dos polímeros e do cálculo da pureza dos PHAs (Tabela 2.2), foi possível verificar que o percentual de compostos não-hidroxicanoatos, que foram extraídos em conjunto com o polímero, é variável (Tabela 2.4). Na Figura 2.3, pode-se observar que os percentuais dos compostos não-hidroxicanoato identificados nas amostras dos polímeros variaram de 6,38% (M 2) a 36,49% para M 6, demonstrando que os métodos de extração empregados apresentaram eficiências diferentes quando se analisa a pureza dos biopolímeros obtidos. Analisando o percentual de pureza dos PHAs obtidos por cada método e correlacionando com os rendimentos de extração obtidos anteriormente (Tabela 2.2), verificou-se que o método M 2 foi o mais eficiente na extração de polímeros com maior pureza (93,62%), apresentando um rendimento de extração de PHAs puros de 8,14%, enquanto que os métodos M 3, M 5 e M 6 foram os menos eficientes com rendimentos de extração de PHAs puros de 5,20, 5,64 e 5,66%, respectivamente.

Observa-se que os métodos nos quais foi utilizada a etapa da lavagem da biomassa com hipoclorito de sódio (M 1, M 2 e M 4) apresentaram maior eficiência na extração dos biopolímeros, confirmando que esse tratamento é mais eficaz para a ruptura da membrana das células das cianobactérias, e com isso permitem uma maior extração dos PHAs. Além disso, verificou-se que a etapa de precipitação do biopolímero em metanol (M 2) foi importante para obter um polímero de maior pureza, com menor percentual de compostos não-hidroxicanoatos, demonstrando que esta etapa é importante na extração de PHAs mais puros.

Figura 2.3. Quantificação de compostos hidroxialcanoatos e não-hidroxialcanoatos presentes nos PHAs de *Spirulina* sp. LEB-18 obtidos pelos diferentes métodos de extração.



4.5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que os métodos de extração de PHAs da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB-18 avaliados, possuem eficácias diferentes na extração do polímero. O uso de hipoclorito de sódio na etapa inicial da extração aumenta seu rendimento, enquanto que o uso de metanol no final do processo, provou ser uma ferramenta importante na obtenção de PHAs de maior pureza. No que diz respeito às propriedades dos polímeros, observou-se uma influência do método de extração na massa molecular, índice de cristalinidade e composição monomérica dos PHAs, demonstrando que o método de extração é uma etapa importante para a obtenção de polímeros com as características desejadas visando sua aplicação industrial. Os PHAs extraídos de *Spirulina* sp. LEB-18 são formados em grande parte por monômeros de 11-hidroxihexadecanoato e hidroxitetradecanoato, o que se configura como uma novidade científica, pois são constituintes de polímeros absolutamente novos.

4.6 REFERÊNCIAS

AGNEW, D.E.; PFLEGER, B.F. Synthetic biology strategies for synthesizing polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources. **Chemical Engineering Science**, v. 103, p. 58–67, 2013.

- ASSIS, D.J.; GOMES, G.V.P.; PASCOAL, D.R.C.; PINHO, L.S.; CHAVES, L.B.O.; DRUZIAN, J.I. Simultaneous Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates and Extracellular Polymeric Substance (EPS) from Crude Glycerol from Biodiesel Production by Different Bacterial Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1110-1127, 2016.
- BEN, F.; REBAH, D.; PREVOST, A.; YEZZA, R.D. Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3535-3546, 2007.
- BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(beta-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1977-1982, 1988.
- CAMPOS, M.I.; FIGUEIREDO, T.V.B.; SOUSA, L.S.; DRUZIAN, J.I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 338-346, 2014.
- CHEN, C.Y.; LU, W.B.; LIU, C.H.; CHANG, J.S. Improved phototrophic H₂ production with *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 using acetate and butyrate as dual carbon substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3609-3616, 2008.
- DIVYASHREE, M.S.; SHAMALA, T.R.; RASTOGI, N.K. Isolation of polyhydroxyalkanoate from hydrolyzed cells of *Bacillus flexus* using aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and phosphate. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 482-489, 2009.
- FRADINHO, J.C.; DOMINGOS, J.M.B.; CARVALHO, G.; OEHMEN, A.; REIS, M.A.M. Polyhydroxyalkanoates production by a mixed photosynthetic consortium of bacteria and algae. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 146-153, 2013.
- FEI, T.; CAZENEUVE, S.; WEN, Z.; WU, L.; WANG, T. Effective Recovery of Poly-b-Hydroxybutyrate (PHB) Biopolymer from *Cupriavidus necator* Using a Novel and Environmentally Friendly Solvent System. **Biotechnology Progress**, v. 32, p. 678-685, 2016.
- FREITAS, B.C.C.; CASSURIAGA, A.P.A.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248-253, 2017.
- HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 471-476, 1989.
- HONG, K.; SUN, S.; TIAN, W.; CHEN, G.Q.; HUANG, W. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared Spectroscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 523-526, 1999.
- JACQUEL, N.; LO, C.W.; WEI, Y.H.; WU, H.S.; WANG, S.S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 15-27, 2008.

JAU, N.; YEWA, S.; TOH, P.S.Y.; CHONG, A.S.C.; CHU, W.; PHANG, S.; NAJIMUDIN, N.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 144-151, 2005.

JEON, B.; CHOI, J.; KIM, H.; WANG, J.; SHANAB, R.; DEMPSEY, B.; REGAN, J.R.; KIM, J.R. Ultrasonic disintegration of microalgal biomass and consequent improvement of bioaccessibility/bioavailability in microbial fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 37-46, 2013.

JESUS, C.S.; UEBEL, L.S.; COSTA, S.S.; MIRANDA, A.L.; MORAIS, E.G.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; NUNES, I.L.; FERREIA, E.S.; DRUZIAN, J.I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86-94, 2018.

KAVITHA, G.; KURINJIMALAR, C.; SIVAKUMAR, K.; KAARTHIC, M.; ARAVIND, R.; PALANI, P.; RENGASAMY, R. Optimization of polyhydroxybutyrate production utilizing wastewater as nutrient source by *Botryococcus braunii* Kütz using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 534-542, 2016.

KULKARNI, S.O.; PRADNYA, P.K.; JOG, J.P.; PATIL, P.A.; NILEGAONKAR, S.S.; SARNAIK, S.S.; KSHIRSAGAR, P.R. Characterisation of copolymer, poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) produced by *Halomonas campisalis* (MCM B-1027), its biodegradability and potential application. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6625-6628, 2011.

LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 536–583, 2014.

MARTINS, R.G.; GONÇALVES, I.S.; MORAES, M.G.; COSTA, J.A.V. Bioprocess Engineering Aspects of Biopolymer Production by the Cyanobacterium *Spirulina* Strain LEB-18. **International Journal of Polymer Science**, v. 1, p. 1-6, 2014.

MENDHULKAR, V.; SHETYE, L., Synthesis of Biodegradable Polymer Polyhydroxyalkanoate (PHA) in Cyanobacteria *Synechococcus elongates* Under Mixotrophic Nitrogen- and Phosphate-Mediated Stress Conditions. **Industrial Biotechnology**, v. 13, p. 85, 2017.

MORAES, L.; ROSA, G.M.; CARDIAS, B.B.; SANTOS, L.O.; COSTA, J.A.V. Microalgal biotechnology for greenhouse gas control: Carbon dioxide fixation by *Spirulina* sp. at different diffusers. **Ecological Engineering**, v. 91, p. 426–431, 2016.

NAVARRO, R.F.; D'ALMEIDA, J.R.M.; RABELLO, M.S. Elastic properties of degraded polypropylene. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 2167–2174, 2007.

PENLOGLOU, G.; CHATZIDOUKAS, C.; KIPARISSIDES, C. Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made properties: an integrated modelling approach and experimental validation. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 329–337, 2012.

- RAHMAN, A.; PUTMAN, R.J.; INAN, K.; SAL, F.A.; SATHISH, A.; SMITH, T.; NIELSEN, C.; SIMS, R.C.; MILLER, C.D. Polyhydroxybutyrate production using a wastewater microalgae based media. **Algal Research**, v. 8, p. 95–98, 2015.
- RAMSAY, J.A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIE, C.; RAMSAY, B.A. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnology Techniques**, v. 8, p. 589–594, 1994.
- RANJANA, B.; NIRUPAMA, M. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: Process optimization and polymer characterization. **Algal Research**, v. 7, p. 78–85, 2015.
- RIBEIRO, P.L.L.; SILVA, A.C.M.S.; FILHO, J.A.M.; DRUZIAN, J.I. Impact of different by-products from the biodiesel industry and bacterial strains on the production, composition, and properties of novel polyhydroxyalkanoates containing achiral building blocks. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 212–223, 2015.
- ROHINI, D.; PHANDNIS, S.; RAWAL, S.K. Synthesis and characterization of poly-hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 276–283, 2006.
- SAMROT, A.V.; AVINESH, R.B.; SUKEETHA, S.D.; SENTHILKUMAR, P. Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Enterobacter cloacae* SU-1 during growth with two different carbon sources in batch culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 195–203, 2011.
- SHARMA, L.; SINGH, A.K.; PANDA, B.; MALLICK, N. Process optimization for poly-3-hydroxybutyrate production in a nitrogen fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 987–993, 2007.
- SHIRIVASTAV, A.; MISHRA, S.K.; MISHRA, S. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 255–260, 2010.
- SIMON-COLIN, C.; RAGUÉNÈS, G.; COSTA, B.; GUEZENNEC, J. Biosynthesis of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenei* from various carbon sources. **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, p. 1534–1541, 2008.
- SUNDARAMOORTHY, B.; KADIYALA, G.; BHASKARAN, M. A review on production of poly β hydroxybutyrate from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, p. 278–285, 2013.
- VONK, C.G. Computerization of Ruland's X-ray method for determination of the crystallinity in polymers. **Journal of Applied Crystallography**, v. 6, p. 148–152, 1973.

5 CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO DE BIOMASSA, PRODUÇÃO E PROPRIEDADES DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS) DE MICROALGAS

Artigo publicado em 2018

Revista International Journal of Biological Macromolecules

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.064>

5.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da disponibilidade de nitrogênio nos meios de cultivo, no crescimento celular, composição da biomassa, produção e propriedades de PHAs obtidos durante o cultivo das microalgas *Chlorella minutissima*, *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18. O crescimento celular das microalgas reduziu com o uso do meio limitado de nitrogênio, demonstrando que a deficiência do nitrogênio no cultivo interfere no metabolismo desses microrganismos e na produção de biomassa. A composição bioquímica das microalgas também apresentou alteração, sendo que a mais notável foi a degradação das proteínas e clorofilas, e o maior acúmulo de moléculas carbonáceas de armazenamento, como lipídios e PHAs. *Chlorella minutissima* não sintetizou os polímeros de PHA, mesmo em ambiente com deficiência de nitrogênio. Os maiores acúmulos de PHAs ocorreram com 15 dias de cultivo, com concentração de 16% (m/m de biomassa seca) para a microalga *Synechococcus subsalsus* e 12% para *Spirulina* sp. LEB-18. Os PHAs produzidos por *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. O LEB-18 apresentaram diferentes propriedades térmicas e físicas, evidenciando a influência da cepa produtora nas propriedades dos PHAs. Os polímeros obtidos por ambas as cepas, são formados por monômeros de cadeia longa com 14 a 18 átomos de carbono. Esta composição é uma novidade científica, uma vez que não foi encontrada em PHAs sintetizados por *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18.

Palavras-chave: cianobactéria; *Chlorella minutissima*; *Spirulina* sp., biopolímeros.

5.2 INTRODUÇÃO

As microalgas correspondem a um grupo de microrganismos fotossintéticos altamente diversificados, com importância ecológica e grande potencial biotecnológico, que vem atraindo atenção nos últimos anos (KAVITHA et al., 2016; SASSO et al., 2012). As microalgas são microrganismos que possuem um curto período de geração, e precisam de nutrientes inorgânicos simples, como fosfato, nitrato, magnésio e cálcio, além de micronutrientes para seu crescimento e multiplicação (JAU et al., 2005; SHARMA e MALLICK, 2005). A biomassa das microalgas possui altas concentrações de lipídios, proteínas e carboidratos, que podem ser utilizados para diferentes aplicações.

O teor de determinados compostos alvo na biomassa das microalgas, tais como lipídios, carboidratos, pigmentos, entre outros, é variável e pode ser moldado alterando as condições de cultivo. Esses microrganismos, quando cultivados em ambientes deficientes de um ou mais nutrientes, têm suas vias metabólicas desviadas, o que pode favorecer a produção e o acúmulo de vários bioprodutos. Dessa forma, a composição bioquímica das microalgas pode ser manipulada pela alteração das condições ambientais, induzindo a produção de altas concentrações de biocompostos comercialmente importantes, como os PHAs (KAVITHA et al., 2016).

Entre os vários nutrientes do meio, a fonte de carbono e de nitrogênio contribuem de forma mais significativa para o custo total do processo de produção e para a estimulação da síntese do biopolímero. Quando todo o potencial dos constituintes da biomassa de microalgas é explorado, os subprodutos de interesse podem ser obtidos simultaneamente e o valor de mercado pode ser maior do que os custos de obtenção (WIJIFFELS et al., 2010).

PHAs são poliésteres semicristalinos, sintetizados e armazenados em células microbianas, como carbono intracelular e como material de armazenamento de energia (CAMPOS et al., 2014; JAU et al., 2005; JOA et al., 2009; KAVITHA et al., 2016). Devido à renovabilidade, degradabilidade, seu ciclo de vida praticamente neutro de CO₂ e sua processabilidade, os PHAs são considerados uma boa alternativa aos plásticos sintéticos derivados de petróleo, e têm aplicações em vários campos, como indústria alimentícia, agricultura, farmácia e medicina, servindo também como matéria-prima para a produção de produtos químicos puros e na fabricação de tintas (JESUS et al., 2018; SASSO et al., 2012).

Bactérias produzem grandes quantidades de biopolímeros em um curto espaço de tempo; no entanto, as microalgas têm a vantagem de utilizar quantidades menores de nutrientes devido à fotossíntese, utilizando a energia solar e transformando o dióxido de carbono em

oxigênio, essencial para os seres humanos. Assim, as altas taxas de crescimento e a eficiência fotossintética, são algumas das qualidades críticas das microalgas para a produção de biopolímeros (KAVITHA et al., 2016; SHIRIVASTAV et al., 2010).

Além de reduzir os custos de produção, é necessário melhorar as características do polímero para facilitar sua processabilidade e aumentar a competitividade do mercado de PHAs. Assim, é fundamental conhecer as propriedades dos biopolímeros obtidos, verificando suas possíveis aplicações industriais (RIBEIRO et al., 2015). Mais de 150 monômeros formados a partir de hidroxiésteres de ácidos graxos com cadeias de carbono que contêm de quatro a milhares de carbonos, podem ser combinados dentro da família de PHAs para criar polímeros com propriedades extremamente diferentes para várias aplicações (KHOSRAVI-DARANI et al., 2013).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da disponibilidade de nitrogênio, no meio de cultivo, no crescimento celular, na composição da biomassa, na produção e nas propriedades de PHAs obtidos durante o cultivo das microalgas *Chlorella minutíssima*, *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Microrganismos, meios de cultivo e condições experimentais

As cepas de *Chlorella minutíssima* e *Synechococcus subsalsus* foram obtidas do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (USP). A *Spirulina* sp. LEB-18 foi obtida da Coleção de Cultura do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os cultivos foram realizados em meio padrão e em meio de limitado de nitrogênio. Os cultivos padrão de *Chlorella minutíssima* e *Synechococcus subsalsus* foram feitos utilizando o meio BG11 (RIPPKA et al., 1979), contendo sais minerais (K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $CaCl_2$, $C_6H_{11}FeNO_7$, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$, Na_2CO_3 e $C_6H_8O_7$) e 0,40 g/L de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) como fonte de carbono, e 1,5 g/L de nitrato de sódio ($NaNO_3$) como principal fonte de nitrogênio.

O cultivo em meio padrão de *Spirulina* sp. LEB-18 foi feito em meio Zarrouk, contendo sais minerais (K_2HPO_4 , K_2SO_4 , $NaCl$, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $FeSO_4$ e EDTA) e 16,8 g/L de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) como fonte de carbono, e 2,5 g/L de nitrato de sódio ($NaNO_3$) como principal fonte de nitrogênio (MORAIS e COSTA, 2007). Os cultivos no meio limitado de nitrogênio foram feitos utilizando o respectivo meio padrão, com redução de

aproximadamente 70% da principal fonte de nitrogênio utilizada nos meios, ou seja, nitrato de sódio (NaNO₃).

Os experimentos foram realizados em fotobiorreator cilíndrico acrílico, com volume de trabalho de 20 L, altura de 450 mm e diâmetro de 250 mm. Os cultivos foram mantidos por 20 dias, com uma concentração celular inicial de aproximadamente 0,2 g/L, a 28 °C em câmara de crescimento, sob fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro). A iluminação foi fornecida por lâmpadas tubulares fluorescentes, tipo luz diurna de 40W, que produziram uma iluminação de 41,6 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ (MORAIS e COSTA, 2007). A água evaporada nos ensaios foi reabastecida a cada dois dias, antes da amostragem, pela adição de água estéril. A agitação foi efetuada por injeção de ar comprimido a 0,3 vvm. Para evitar a contaminação, o ar bombeado foi filtrado utilizando filtros de lã de vidro acoplados ao sistema.

5.3.2 Determinações analíticas

O crescimento celular foi monitorado a cada dois dias por medida da densidade óptica (absorbância) dos cultivos, utilizando um espectrofotômetro digital (Bel Photonics UV-MS1) em um comprimento de onda de 570 nm, 630 nm e 670 nm para *Clorella minutissima*, *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18, respectivamente. Antes dos experimentos, foi gerada uma curva padrão para os cultivos de cada cepa, em meio padrão e em meio limitado de nitrogênio, que correlaciona a densidade óptica (absorbância) dos meios de cultivo, com a concentração de biomassa seca (g/L), de acordo com a Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Curvas de crescimento padrão de cada microalga, em meio padrão e limitado, utilizada para quantificação de biomassa dos cultivos.

Microalga	Meio de crescimento	Curva de crescimento padrão
<i>Clorella minutissima</i>	Meio padrão	$C = (0,5045 \times \text{abs}) - 0,091, R^2=0,9926$
	Meio limitado	$C = (0,527 \times \text{abs}) - 0,0277, R^2= 0,9911$
<i>Synechococcus subsalsus</i>	Meio padrão	$C = (1,3964 \times \text{abs}) - 0,0077, R^2=0,9909$
	Meio limitado	$C = (1,5527 \times \text{abs}) - 0,0169, R^2=0,9919$
<i>Spirulina</i> sp. LEB-18	Meio padrão	$C = (0,6170 \times \text{abs}) - 0,0125, R^2=0,9916$
	Meio limitado	$C = (1,438 \times \text{abs}) - 0,0092, R^2=0,9901$

“C” equivale a concentração celular (g/L) e “abs” equivale a absorbância.

A concentração de nitrogênio nos meios de cultivo foi determinada a cada dois dias, utilizando um método colorimétrico (CATALDO et al., 1975). Uma curva padrão (Nitrato =

163,62 x absorvância - 0,0046, $R^2 = 0,9999$), feita antes dos ensaios utilizando concentrações conhecidas de nitrato de sódio, foi utilizada para obtenção dos resultados das concentrações de nitrogênio no meio.

As medições de pH foram realizadas nos cultivos a cada dois dias utilizando um medidor de pH digital (SANXIM PHS-3D). O conteúdo de clorofila foi determinado a cada dois dias usando 1 mL do cultivo. As amostras foram centrifugadas a 2000xg por 5 min (Eppendorf® 5702-R), e o sedimento foi ressuspensão em metanol. A clorofila foi extraída por incubação a 4 °C (no escuro) por 24 h, e a absorvância foi medida em 652,4 e 664,2 nm, de acordo com Freitas et al. (2016).

Após 20 dias de cultivo, a biomassa total de cada experimento foi recuperada por centrifugação (Hitachi Himac CR-GIII, Tóquio-Japão) a 10000xg durante 15 min, ressuspensão em água destilada e centrifugada novamente nas mesmas condições para remoção dos sais. A biomassa foi congelada a -80 °C, liofilizada e armazenada a -20 °C até a caracterização.

5.3.3 Parâmetros de crescimento

5.3.3.1 Produtividade de biomassa

A produtividade da biomassa (P_x) foi obtida de acordo com a Eq. (3.1), onde X_t é a concentração de biomassa (g/L) no tempo t (d), e X_0 é a concentração de biomassa (g/L) no tempo t_0 (d).

$$P_x = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad \text{Eq. (3.1)}$$

5.3.3.2 Taxa máxima de crescimento específico

A taxa máxima de crescimento específico foi calculada por meio da regressão linear aplicada a taxa de crescimento logarítmica de cada experimento obtida a partir de um gráfico de $\ln X$ (g/L) versus t (d), onde X é a biomassa.

5.3.4 Caracterização da biomassa

5.3.4.1 Quantificação de proteínas e lipídeos

A concentração de proteínas foi determinada usando o método de Kjeldahl (AOAC, 2005), com um fator de conversão de 5,22 (LOURENÇO et al., 2004). O conteúdo de lipídeos totais da biomassa das microalgas foi extraído com uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1) e quantificado por gravimetria conforme descrito por Folch et al. (1957).

5.3.4.2 Composição de ácidos graxos das microalgas

Os ácidos graxos individuais das amostras foram identificados por cromatografia gasosa. Alíquotas de lipídeos foram saponificadas e, em seguida, metiladas. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foram extraídos e armazenados em atmosfera inerte (N₂) em freezer a -60 °C (JESUS et al., 2018). Os FAME foram separados e identificados em um cromatógrafo a gás (Clarus 680; Perkin Elmer[®]) com uma coluna DB-FFAP (30 m × 0,32 mm × 0,25 mm) e equipados com um detector de ionização de chama.

Os parâmetros de análise incluíam uma temperatura do injetor de 250°C e uma temperatura do detector de 280 °C. Utilizou-se o seguinte programa de temperatura: 150°C por 16 min, aumentando em 2°C/min até 180°C, mantendo essa temperatura por 25 min. Após esse período, foi feito um aumento de 5°C/min até 210°C, mantido por 25 min. O hélio foi usado como gás de arraste a 1,0 mL/min. Um fluxo de gás hidrogênio e de ar sintético foi fornecido em 30 e 300 mL/min, respectivamente. As injeções foram realizadas em duplicata para cada extração em um volume de 1 µL.

Os FAME foram identificados comparando-se os tempos de retenção das amostras com os tempos de retenção de uma mistura de padrões conhecidos (189-19; Sigma-Aldrich[®]). A quantificação dos ácidos graxos, expressa em mg/g de lipídios, foi realizada pela adição do padrão interno (C23:0; T9900, Sigma Aldrich[®]). Como parâmetro para a identificação conclusiva dos ácidos graxos, as amostras foram injetadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrofotômetro de massa (Clarus 500; Perkin Elmer[®]). Os fragmentos de massa das amostras foram comparados com os dados espectrais do banco de dados espectrais de massa padrão do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) e padrões de mistura sob as mesmas condições operacionais usadas no GC/FID em um espectro de 50-500 m/z (EI, 70 eV).

5.3.4.3 Extração e quantificação dos PHAs

A extração dos PHAs foi feita seguindo Yellore e Desia (1998) com algumas modificações. A cada cinco dias de cultivo, um litro do meio foi retirado para determinar o teor de PHAs produzido. Uma quantidade conhecida de células das microalgas foi agitada com uma solução de hipoclorito de sódio a 4,0% (v/v) durante 20 min a 45 °C. As amostras foram então centrifugadas a 10000 rpm durante 20 minutos e o polímero foi extraído com clorofórmio quente seguido de precipitação com metanol frio. As amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm por 20 min para obtenção dos *pellets*. O sedimento foi dissolvido novamente em clorofórmio quente e seco a 60°C.

A quantificação dos PHAs (obtidos após a extração) na biomassa das microalgas, foi determinada utilizando um método gravimétrico. O rendimento da extração dos PHAs foi determinado pela razão entre a concentração de PHAs e a concentração de biomassa de acordo com a Equação (3.2).

$$R = \frac{m_p \times 100}{m_b} \quad \text{Eq. (3.2)}$$

Onde,

R é o rendimento de extração dos PHAs em porcentagem;

m_p é a massa de PHAs em gramas;

m_b é a massa de biomassa seca empregada em cada extração em gramas.

Os PHAs produzidos utilizando o meio limitado de nitrogênio foram caracterizados por meio de análises de FTIR, massa molecular, análise termogravimétrica, calorimetria exploratória diferencial, índice de cristalinidade e composição monomérica.

5.3.4.4 Análises termograviméticas (TGA)

As análises termograviméticas (TGA) (PerkinElmer Modelo Pyris 1 TGA Waltham, Massachusetts, USA) da biomassa das microalgas foram feitas para determinação da temperatura inicial de decomposição (T_{onset}) e a temperatura de máxima decomposição (T_{decomp}) das amostras. Cinco miligramas de biomassa foram colocados em uma bandeja de platina e aquecidos a 10 °C/min de 30 a 700 °C sob um fluxo de 20 mL/min (CAMPOS et al., 2014).

5.3.5 Caracterização dos PHAs

5.3.5.1 Infra-vermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de PHAs foram analisadas qualitativamente por Espectroscopia de FTIR (Perkin Elmer Modelo Spectrum 100, Perkin Elmer, Waltham Mass, USA) entre 4000 cm^{-1} e 600 cm^{-1} pela técnica de reflectância total atenuada (ATR) (CAMPOS et al., 2014).

5.3.5.2 Massa molecular (Mm)

A Mm dos PHAs foi determinada por cromatografia de exclusão molecular com um HPLC (PerkinElmer Series 200) equipado com um amostrador automático e um detector de índice de refração (IR) (PerkinElmer), conforme descrito por Assis et al. (2016). Para separação dos PHAs, foi utilizada uma coluna Shodex KD 807 ($30\text{ cm} \times 78\text{ mm} \times 5\text{ mm}$) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os polímeros foram dissolvidos em clorofórmio a uma concentração final de $0,7\text{ g/L}$ e filtrados (membrana PTFE, $0,45\text{ }\mu\text{m}$) antes da separação. A fase móvel usada foi clorofórmio, a um fluxo de $1,0\text{ mL/min}$. A massa molecular foi determinada por meio de uma curva padrão, Eq. (3.3), que foi feita utilizando padrões de poliestireno de baixa polidispersividade ($682\text{--}1.670.000\text{ Da}$; Polystyrene High Mw Standards Kit, Polymer Standards Service, USA), e correlacionava a massa molecular dos padrões com o tempo de retenção (Tr) identificado nos cromatogramas.

$$\log Mm = -0.8364 \times Tr + 14.83 \text{ with } R^2 = 0.9917 \quad \text{Eq. (3.3)}$$

5.3.5.3 Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises termogravimétricas (TGA) (PerkinElmer Modelo Pyris 1 TGA Waltham, Massachusetts, USA) dos PHAs foram feitas para determinação da temperatura inicial (T_{onset}) e temperatura máxima de decomposição (T_{decomp}) das amostras. Cinco miligramas de PHA foram colocados em uma bandeja de platina e aquecidos a uma taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ de 30 a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob um fluxo de gás nitrogênio de 20 mL/min (ASSIS et al., 2016).

A temperatura de fusão (T_m) e a cristalinidade dos PHAs foram determinados por calorimetria exploratória diferencial (DSC) (SHIMADZU DSC-50). Dois miligramas de PHAs foram encapsulados em uma panela de alumínio e aquecidos de 25 a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, utilizando nitrogênio líquido como refrigerante e hélio como gás de purga. A T_m e a entalpia de fusão (ΔH_m) foram determinadas a partir da endoterma de fusão. O ΔH_m de uma

amostra teórica 100 % cristalina ($\Delta H_{m100\%}$) foi assumido como sendo 146 J/g. A cristalinidade dos PHAs (% Ic) foi calculada usando a razão $\Delta H_{m100\%} / \Delta H_m$ (RIBEIRO et al., 2015) conforme a Eq. (3.4).

$$\% Ic = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_{m100\%}} \times 100 \quad \text{Eq. (3.4)}$$

5.3.5.4 Composição monomérica dos PHAs

A quantificação e composição dos monômeros que constituem os PHAs foram determinados usando cromatografia gasosa – espectrometria de massas (GC–MS; Clarus 500 PerkinElmer) com software TurboMass versão 4.5.0 e a biblioteca NIST 98. Aproximadamente 4 mg dos PHAs secos foram submetidos a metanólise baseado no método de Brandl et al. (1988) com modificações propostas por Campos et al. (2014). Uma porção da fase orgânica foi separada após a injeção modo “splitless” em uma coluna capilar DB-1 (30 m × 0.25 mm × 0.25 mm). Hélio (fluxo 1,0 mL/min) foi usado como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 240 °C, respectivamente. O espectrômetro de massas foi programado para scanear entre 50 e 550 m/z. O seguinte programa de temperatura foi aplicado: 80 – 200 °C (20 °C/min). Os espectros de massas foram comparados com os espectros da biblioteca NIST 98, e os monômeros foram quantificados por normalização de área.

5.3.6 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do Teste de Tukey ao nível de 95 % de confiança. Os resultados foram analisados usando o software STATISTICA versão 7.0.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Crescimento e caracterização da biomassa

A Figura 3.1 apresenta a produção de biomassa durante os cultivos das microalgas *Chlorella minutissima*, *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18. Para as três microalgas, os cultivos em meio padrão e em meio limitado de nitrogênio não apresentaram a fase de adaptação, iniciando-se já na fase exponencial, pois os inóculos foram adaptados

previamente aos meios de cultivo empregados. O crescimento celular das microalgas no meio padrão e no limitado de nitrogênio foram similares até 4 dias de cultivo para *Chlorella minutissima*, 6 dias de cultivo para *Synechococcus subsalsus* e 10 dias de cultivo para *Spirulina* sp. LEB-18. Após esses períodos, o crescimento celular no meio limitado cessou ou começou a declinar para as três microalgas, demonstrando que a deficiência de nitrogênio nos meios de cultivo interfere diretamente no metabolismo desses microrganismos e na produção de biomassa.

Além disso, foi observada uma redução de 20% na produtividade máxima do cultivo de *Chlorella minutissima*, que passou de 0,025 g/L/d quando o meio padrão foi utilizado, para 0,020 g/L/d quando utilizou o meio limitado (Tabela 3.2). Um comportamento semelhante foi observado para a taxa de crescimento específico (μ_{\max}), que apresentou uma redução de 23% quando se limitou a disponibilidade de nitrogênio para o crescimento desta microalga. Com relação a *Synechococcus subsalsus*, houve redução de aproximadamente 93% na produtividade máxima e de 39% para μ_{\max} quando foi utilizado o meio limitado de nitrogênio (Tabela 3.2). Para *Spirulina* sp. LEB-18, a redução foi de aproximadamente 11% na P_{\max} e de 26% na μ_{\max} quando foi limitada a disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo.

O consumo de nitrato durante os cultivos apresentou grande variação quando comparado com as reduções de concentração de nitrato no meio padrão com as ocorridas no meio limitado. Para *Chlorella minutissima* houve redução de 0,29 g/L na concentração de nitrato após 20 dias de cultivo em meio padrão, enquanto que a redução da concentração em meio limitado foi de 0,25 g/L, sugerindo maior consumo desse nutriente no meio padrão. Já para *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18, a diferença de consumo de nitrato entre meio padrão e limitado foi ainda maior; para *Synechococcus subsalsus* a redução da concentração de nitrato no meio após 20 dias de cultivo foi de 0,48 g/L no meio padrão e 0,22 g/L no meio limitado; para *Spirulina* sp. LEB-18 essa diferença após 20 dias de cultivo foi de 0,65 g/L em meio padrão e 0,25 g/L em meio limitado. Esses dados apontam para o menor consumo de nitrogênio nos cultivos realizados em meio limitado, responsável pelas alterações no metabolismo dessas microalgas.

Figura 3.1. Concentração celular durante os cultivos de *Chlorella minutissima* (A), *Synechococcus subsalsus* (B) e *Spirulina sp.* LEB-18 (C) em meio padrão e em meio limitado.

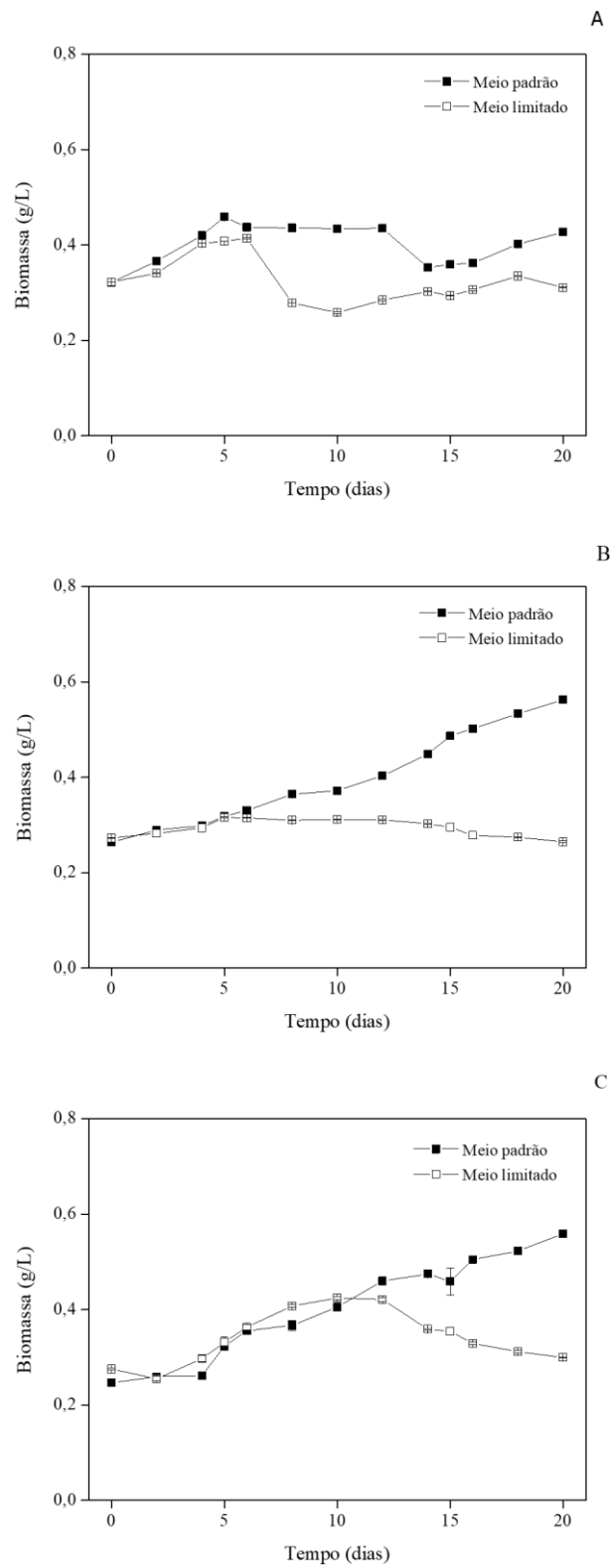


Tabela 3.2. Produtividade máxima de biomassa e taxa de crescimento específico dos cultivos.

Microalga	Meio de cultivo	Produtividade máxima de biomassa (P_{max} , g/L/ d)	Taxa de crescimento específico (μ_x , d ⁻¹)
<i>Chlorella minutissima</i>	MP	0,025	0,061
	ML	0,020	0,047
<i>Synechococcus subsalsus</i>	MP	0,145	0,039
	ML	0,009	0,024
<i>Spirulina sp.</i> LEB-18	MP	0,018	0,043
	ML	0,016	0,032

MP significa meio padrão e ML significa meio limitado de nitrogênio.

A alta concentração de nitrogênio nos cultivos contribui para o crescimento e, dessa forma, seu maior consumo também é responsável por melhorar o crescimento das microalgas. O nitrogênio é quantitativamente o segundo nutriente inorgânico mais importante para microalgas, e está disponível, em maior proporção, nos meios de cultivo empregados neste estudo, através do nitrato de sódio. O nitrato, que é absorvido pelas células microalgais através de um sistema de transporte ativo, é reduzido a nitrito pela nitrato redutase e depois ao amônio pela nitrito redutase (LIOTENBERG et al., 1996).

Além disso, quando o nitrato é a fonte de nitrogênio para o crescimento, há um aumento significativo na demanda por redutores, em competição com a fixação fotossintética de CO₂ (DEAMICIA et al., 2018). Esses resultados são consistentes com dados relatados na literatura, onde está bem documentado que a limitação de nitrogênio nos meios de cultivo das microalgas diminui o seu crescimento e a produção de biomassa, juntamente com a alteração da composição bioquímica da biomassa (ADAMS et al., 2013). A redução da μ_{max} nos cultivos indica a existência de alterações nas vias metabólicas dessas microalgas, uma vez que se sabe que elas crescem mais ativamente, e que parte da sua energia é desviada para a síntese de compostos de armazenamento, incluindo biopolímeros, com valores menores de μ_{max} (LIOTENBERG et al., 1996).

O pH dos cultivos das três microalgas apresentou discretas variações ao longo do tempo ficando entre 8,6 e 9,8 para *Chlorella minutissima*, 9,0 e 9,8 para *Synechococcus subsalsus* e entre 9,2 e 9,8 para *Spirulina sp.* LEB-18. Uma pequena variação no pH foi observada comparando-se os cultivos feitos nos meios padrão e limitado para as microalgas *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina sp.* LEB-18. Uma maior variação foi encontrada para os

cultivos de *Chlorella minutissima*, onde o cultivo em meio padrão apresentou pH entre 9,0 e 9,8, e o cultivo em meio limitado de nitrogênio apresentou pH entre 8,6 e 9,5. O pH é uma das condições ambientais mais críticas no cultivo de microalgas, uma vez que determina a solubilidade e disponibilidade de CO₂ e nutrientes, e tem uma influência significativa no metabolismo desses microrganismos (CHEN et al., 1994). Cada espécie microalgal possui uma faixa ideal de pH para produção de biomassa, que é estreita e específica para espécie (MOHEIMANI et al., 2013).

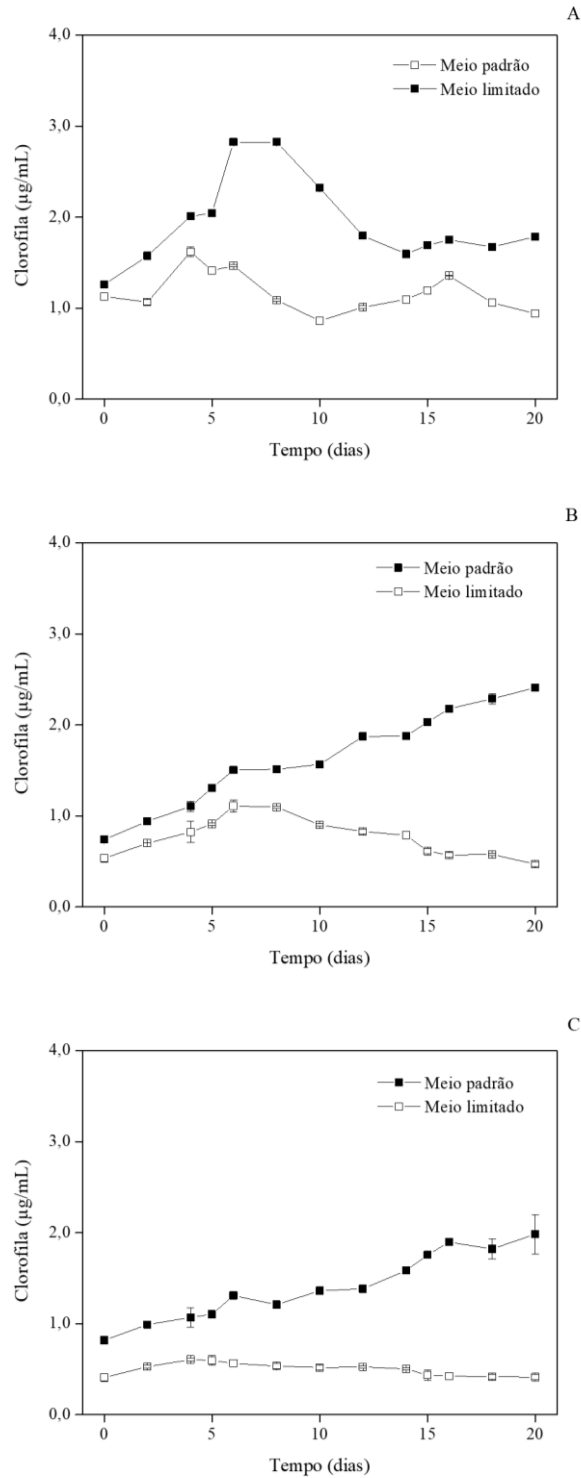
De acordo com Vonshak (1997), o pH ótimo para microalgas varia de 8,5 a 10,5, com uma redução no número de células ocorrendo em pH abaixo de 8,0. Jimenez et al. (2003) relatam que um pH acima de 9,5 é ideal para o cultivo de *Spirulina*, com seus cultivos de *Spirulina* em Málaga apresentando valores de pH de 9,0 a 10,9, semelhante ao pH de 9,2 a 9,8 observado em nosso estudo. Para *Chlorella*, Qiu et al. (2017) afirmam que um pH entre 7,0 e 8,0 é ideal para o crescimento dessa microalga, e meios de cultivo fora dessa faixa podem comprometer seu crescimento. Isso pode explicar a baixa concentração de células (Figura 3.1) encontrada neste estudo nos cultivos de *Chlorella minutissima*. Segundo Cuaresma et al. (2006), o aumento do pH em culturas fotossintéticas ocorre devido à atividade biológica das células, o que reduz o conteúdo de carbono inorgânico dissolvido devido ao seu consumo durante o crescimento celular.

A concentração de clorofila durante os cultivos das três microalgas apresentou um comportamento semelhante ao crescimento celular (Figura 3.2). Isso era esperado já que a produção de clorofila faz parte do metabolismo primário das microalgas e, portanto, está diretamente relacionada à produção de biomassa. As maiores concentrações de clorofila para as três microalgas foram encontradas usando o meio padrão.

A microalga *Chlorella minutissima* apresentou a maior concentração de clorofila (2,9 µg/mL de cultivo) com 6 dias de cultivo em meio padrão, enquanto que os maiores valores encontrados para *Synechococcus subsalsus* (2,4 µg/mL cultivo) e *Spirulina* sp. LEB-18 (1,9 µg/mL cultivo) foram alcançados no final dos cultivos em meio padrão. Ao limitar a disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo, as concentrações de clorofila caíram após 4, 7 e 5 dias para *Chlorella minutissima*, *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18, respectivamente (Figura 3.2). Durante a privação de nitrogênio, as células mudam gradualmente de um estado vegetativo para um estado dormente. A característica mais óbvia disso foi a mudança na cor de azul-verde dos cultivos para amarronzado, que ocorreu para todas as microalgas. Esse fenômeno é chamado de "clorose de nitrogênio" e é causado pela

degradação dos pigmentos ficocianina e clorofila nos meios de cultivo (KHOSRAVI-DARANI et al., 2013).

Figura 3.2. Concentração de clorofila durante dos cultivos de *Chlorella minutissima* (A), *Synechococcus subsalsus* (B) e *Spirulina sp.* LEB-18 (C) em meio padrão e limitado.



No trabalho realizado por Gorl et al. (1998), ao transferir o *Synechococcus* PCC7942 para um meio depletado de nitrogênio, 95% da ficocianina foi degradada em 24h, e após 10 dias, 95% da clorofila também foi degradada. Segundo Markou et al. (2017), quando as microalgas são privadas de nitrogênio, a síntese de biomoléculas ricas em nitrogênio (proteínas e clorofilas) é reduzida, e passam a ser acumuladas biomoléculas ricas em carbono (carboidratos e/ou lipídeos). Dessa forma, a limitação de nutrientes, particularmente o nitrogênio, é frequentemente uma estratégia eficaz para aumentar o acúmulo de compostos específicos na biomassa, como os lipídeos, carboidratos e carotenóides.

De acordo com Adams et al. (2013), embora a limitação de nitrogênio resulte em um acúmulo de determinados compostos alvo, a taxa de crescimento de biomassa diminui significativamente, resultando em uma diminuição global da produtividade do composto alvo, como observado neste estudo. Além disso, está bem documentado que a limitação de nitrogênio resulta em uma diminuição no teor de proteína da biomassa das microalgas (PANCHÁ et al., 2014) e, em particular, de proteínas associadas ao aparato fotossintético (MARKOU et al., 2017).

Neste estudo, a mudança mais notável na composição bioquímica é a degradação de proteínas e dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas) e o acúmulo de moléculas de armazenamento carbonáceas, como lipídeos e PHAs. A análise lipídica e protéica mostrou que a limitação de nitrogênio causou um maior acúmulo de lipídeos e uma redução no teor de proteína da biomassa das microalgas ao final do cultivo (Tabela 3.3). Houve uma redução de 15% no teor de proteína da biomassa de *Chlorella minutissima* e um aumento de 40% no teor de lipídios ao limitar a disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo. Para *Synechococcus subsalsus*, a redução do teor de proteína foi de 16% e o aumento no teor de lipídeos foi de 28%, e para *Spirulina* sp. LEB-18 a redução do teor de proteínas foi de 14%, e o aumento da concentração lipídica na biomassa foi de aproximadamente 20% quando se utilizou o meio limitado. Estas observações estão de acordo com estudos publicados anteriormente, que relatam que o grau de limitação de nutrientes no meio, afeta proporcionalmente a composição bioquímica e o crescimento microalgal (ADAMS et al., 2013).

Além de acumular lipídeos com a redução da disponibilidade de nitrogênio durante os cultivos, as microalgas *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18 também aumentaram o acúmulo dos PHAs (Tabela 3.3, Figura 3.3). Os maiores acúmulos do polímero ocorreram com 15 dias de cultivo, onde foi encontrada uma concentração de aproximadamente 16% (m/m de biomassa seca) para a microalga *Synechococcus subsalsus* e de 12% para *Spirulina* sp. LEB-

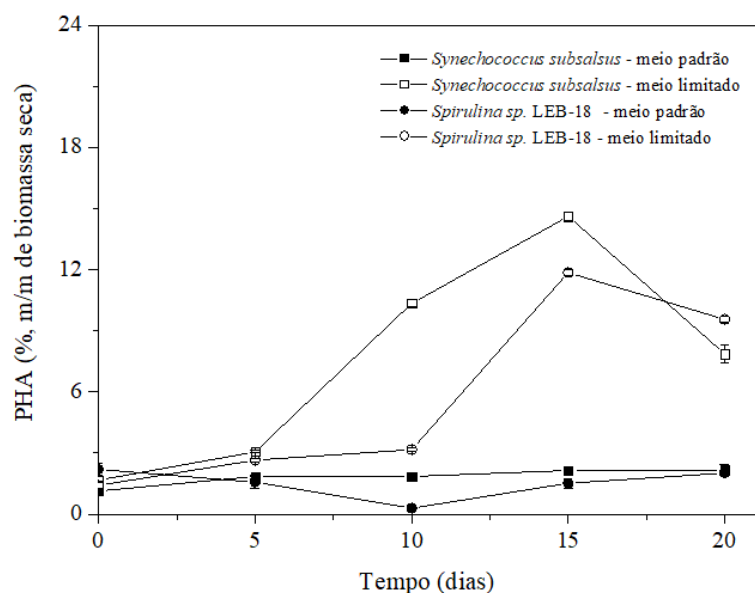
18. A diminuição da quantidade de nitrogênio no meio de cultivo resultou em um aumento no rendimento de extração do polímero de 400% para *Synechococcus subsalsus* e de 300% para *Spirulina* sp. LEB-18. Com base nesses resultados, é evidente que a redução de nitrogênio no meio de cultivo é uma ferramenta eficaz para estimular a produção de PHAs por essas microalgas.

Tabela 3.3. Determinação de proteínas, lipídeos e PHAs nas biomassas após 20 dias de cultivo.

Microalga	Meio de crescimento	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	PHAs (%)
<i>Chlorella minutissima</i>	MP	48,71 ± 1,13 ^a	13,21 ± 0,12 ^a	-
	ML	41,34 ± 1,22 ^b	18,54 ± 0,89 ^b	-
<i>Synechococcus subsalsus</i>	MP	59,22 ± 0,87 ^c	10,11 ± 0,33 ^c	2,16 ± 0,63 ^a
	ML	50,03 ± 1,23 ^a	12,96 ± 1,02 ^a	7,87 ± 0,71 ^b
<i>Spirulina</i> sp. LEB-18	MP	57,70 ± 0,75 ^d	11,40 ± 0,52 ^d	2,02 ± 0,40 ^a
	ML	48,24 ± 0,44 ^a	13,67 ± 1,13 ^a	9,56 ± 0,76 ^c

Médias ± desvio padrão. Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não existe diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os resultados ao nível de significância de 95%. MP significa meio padrão e ML significa meio limitado de nitrogênio.

Figura 3.3. Produção de PHAs durante os cultivos de *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18.



Já a microalga *Chlorella minutissima* não foi capaz de acumular o polímero mesmo em ambiente com deficiência de nitrogênio. Segundo Kavitha et al. (2016), *Chlorella* sp. é um organismo eucariótico do gênero das algas verdes, que acumula grandes quantidades de

carbono, principalmente na forma de lipídeos. Assim, a maximização da produção de PHA em algas verdes provavelmente exigirá que o carbono normalmente usado para a síntese de lipídeos de armazenamento, ou para síntese de amido, seja desviado para a síntese de PHA. Assim, apenas a limitação de nitrogênio no meio de cultivo tem demonstrado não ser capaz de estimular a síntese de PHAs por estes organismos, sendo necessário um conhecimento mais detalhado dos mecanismos envolvidos no controle do fluxo de carbono através das várias vias metabólicas essenciais, para alcançar esse objetivo. Poirier et al. (1992) afirmam que é provável que a expressão de vários genes tenha que ser controlada, para se alcançar a atividade apropriada de várias vias metabólicas que levam à produção de PHAs por organismos eucarióticos, como a *Chlorella*.

O aumento do acúmulo de PHAs pelas microalgas *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18 começou no final da fase exponencial do crescimento celular e início da fase estacionária, quando o crescimento microbiano cessou (Figura 3.1). Biopolímeros como os PHAs atendem as reservas energéticas intracelulares, pois sua produção geralmente ocorre durante a fase exponencial em paralelo com qualquer fator utilizado para medir o crescimento celular, que no nosso caso, foi o aumento da biomassa (PANCHA et al., 2014; SHIRIVASTAV et al., 2010). Isso ajuda na sobrevivência do microrganismo produtor, que pode usar os PHAs para sobreviver nos estágios mais avançados do crescimento, quando os nutrientes se tornam limitantes e justifica a redução do teor dos PHAs no final dos cultivos, quando o período de morte celular já estava iniciando (Figura 3.3).

No caso das cianobactérias, *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18, os resultados demonstram que ambas são fontes ricas de proteínas (Tabela 3.3), implicando em uma grande necessidade de nitrogênio para o crescimento. Neste caso, sob limitação de nitrogênio, elas desviam o carbono para outras rotas metabólicas e produzem biopolímeros para servir como compostos de armazenamento de carbono e energia, que podem ser reutilizados quando as condições se tornam mais favoráveis. Quando o teor de nitrogênio do ambiente aumenta, o organismo pode produzir proteínas para o crescimento celular em vez dos lipídios de armazenamento dos quais derivam os PHAs. Assim, os resultados demonstram que a quantidade de nitrogênio disponível é conhecida por influenciar diretamente a síntese dos biopolímeros. O aumento da produção de PHA por outras cianobactérias submetidas a condições de estresse, por causa da limitação de fósforo e/ou nitrogênio, já foi destacado em estudos anteriores (SHIRIVASTAV et al., 2010; ADAMS et al., 2013). No entanto, menores porcentagens de acúmulo foram obtidas do que as deste estudo, o que indica um potencial para

obtenção desses biopolímeros pelas microalgas *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18.

Com relação a análise térmica das amostras, os resultados obtidos foram consistentes com a composição bioquímica encontrada para a biomassa. A derivada termogravimétrica (DTG) demonstrou a existência de três estágios de perda de massa característicos da biomassa das microalgas (Figura 3.4). O primeiro estágio começa em aproximadamente 30 °C e termina próximo a 150 °C e está relacionado a perda de água da biomassa. Assim, a perda de massa nesta etapa depende fortemente do teor de umidade da amostra. O segundo estágio é o mais significativo e ocorre entre 250 e 450 °C. Nesse estágio, todos os componentes das microalgas (carboidratos, proteínas, lipídios e outros componentes menores) são decompostos para produzir carbonos e liberar voláteis. O terceiro estágio inicia-se a partir de 500 °C, e demonstra uma pequena perda de massa devido à degradação de matéria carbonosa nos resíduos sólidos (RIZZO et al., 2013).

Como a biomassa das microalgas é composta principalmente de proteínas e lipídeos, observa-se que, para as três microalgas, a maior perda de massa ocorreu no estágio de decomposição próximo a 250°C. Como mencionado, esse estágio ocorre devido à decomposição térmica de carboidratos e proteínas (CHEN et al., 2014), que normalmente se fundem. O pico de decomposição foi acompanhado por picos menores que são consequência da degradação térmica dos lipídeos. Isso decorre do fato de que as temperaturas de decomposição dos lipídeos são um pouco maiores que as dos carboidratos e proteínas (LOPEZ-GONZALEZ et al., 2015). Assim, quando a disponibilidade de nitrogênio do meio de cultivo foi limitada, houve aumento do conteúdo lipídico e, conseqüentemente, aumento do “ombro” formado após o pico mais expressivo desse estágio. Isso pode ser observado principalmente nas cultivos de *Chlorella minutissima*, onde houve um aumento mais significativo no conteúdo lipídico da biomassa (Figura 3.4).

A Tabela 3.4 apresenta os valores de T_{onset} , T_{decomp} e perda de massa da biomassa das microalgas e permite uma melhor visualização dos resultados. Nos cultivos de *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18, foi observada uma redução da T_{onset} do segundo estágio de decomposição da biomassa obtida usando o meio limitado de nitrogênio. Isso se deve ao aumento do teor de PHAs na biomassa, que tem início de decomposição próximo a 260 °C (CAMPOS et al., 2014), e com isso diminuiu a T_{onset} do estágio principal.

Figura 3.4. Derivadas termogravimétricas (DTGs) da biomassa das microalgas obtidas nos cultivos feitos em meio padrão e limitado.

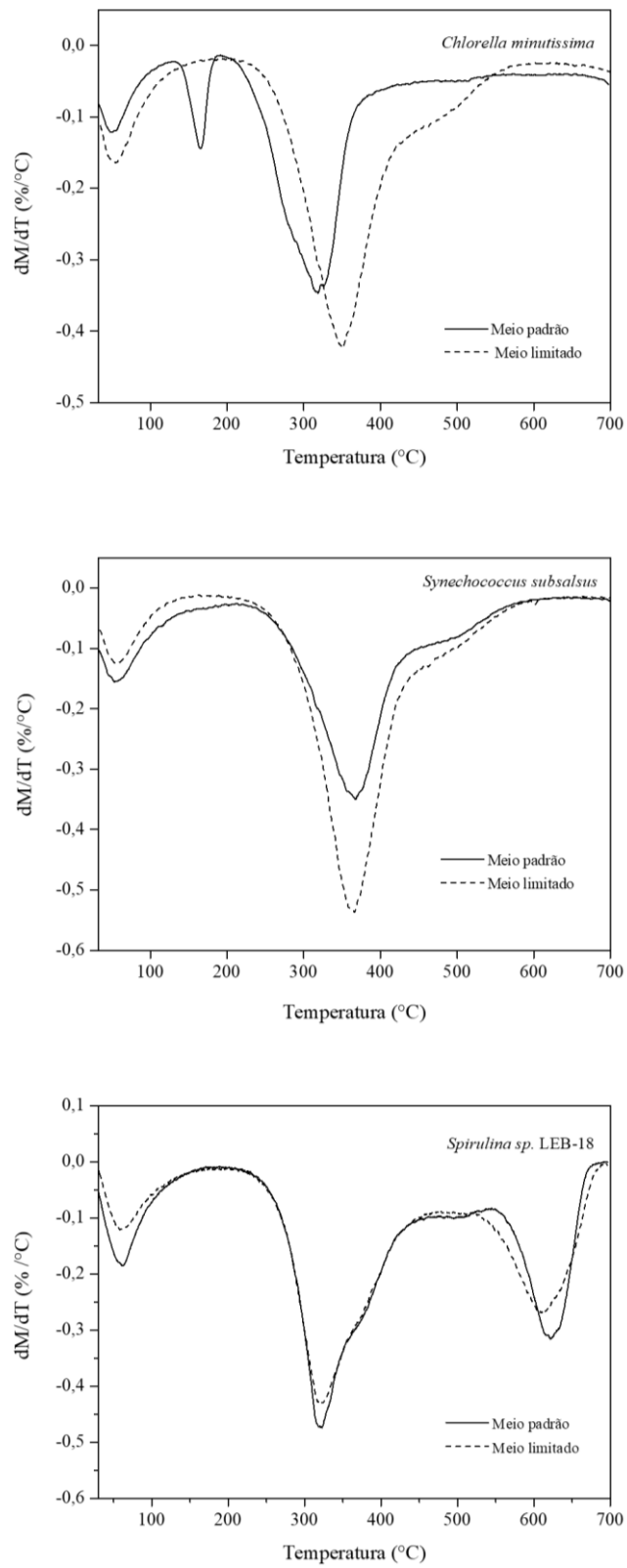


Tabela 3.4. Valores de T_{onset} , T_{decomp} e perda de massa da biomassa das microalgas obtidas nos cultivos feitos em meio padrão e limitado.

Microalga	Meio de crescimento	1° estágio			2° estágio			3° estágio		
		T_{onset} (°C)	T_{decomp} (°C)	Perda de massa (%)	T_{onset} (°C)	T_{decomp} (°C)	Perda de massa (%)	T_{onset} (°C)	T_{decomp} (°C)	Perda de massa (%)
<i>Chlorella minutissima</i>	MP	28,60	51,18	7,48	127,72	167,45	14,82	255,72	322,23	34,82
	ML	27,18	53,99	12,67	290,46	351,63	43,70	364,35	488,94	11,83
<i>Synechococcus subsalsus</i>	MP	31,39	57,82	8,79	308,40	365,88	39,50	435,90	503,59	11,44
	ML	25,65	57,46	14,01	296,85	369,89	55,59	476,82	500,45	8,55
<i>Spirulina sp.</i> LEB-18	MP	42,70	62,51	11,67	285,07	322,76	48,48	590,13	623,23	23,00
	ML	37,34	63,10	8,47	278,39	325,49	51,42	551,84	615,02	30,01

MP significa meio padrão e ML significa meio limitado de nitrogênio.

A Tabela 3.5 apresenta as concentrações de ácidos graxos das biomassa das microalgas obtidas em meio padrão e em meio limitado de nitrogênio. Para *Chlorella minutissima* e *Synechococcus subsalsus* observa-se maior concentração de ácido esteárico (C18:0) na biomassa obtida nos dois meios de cultivo, com alto teor de compostos saturados. Para *Spirulina sp.* LEB-18, é observada uma maior concentração de ácido palmítico (C16:0). Com o uso do meio limitado, observa-se que os perfis dos ácidos graxos obtidos não se alteraram para as três microalgas, porém ocorreram mudanças nas concentrações dos ácidos graxos encontrados (Tabela 3.5). Segundo Sakarika e Kornaros (2017), o perfil de ácidos graxos é uma impressão digital característica para uma certa microalga em um determinado modo de cultivo.

Para *Chlorella minutissima*, a utilização do meio limitado provocou um aumento na concentração dos ácidos graxos, que passou de 52,86 mg/g para 82,59 mg/g de lipídeo, em decorrência da maior produção de lipídeos (Tabela 3.5). O teor de ácidos graxos saturados e insaturados também aumentou quando o meio limitado foi utilizado no cultivo dessa microalga. Já para *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina sp.* LEB-18, comportamento diferente foi observado, onde houve redução na concentração dos ácidos graxos totais, bem como dos ácidos graxos insaturados (Tabela 3.5).

Como as microalgas *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina sp.* LEB-18 aumentaram o acúmulo dos PHAs em meio limitado de nitrogênio, parte dos lipídeos formados foram convertidos nesses biopolímeros. Hu et al. (2008) explicaram minuciosamente os mecanismos da síntese lipídica, indicando que os ácidos graxos saturados são sintetizados primeiro e as duplas ligações são introduzidas mais tarde pela enzima solúvel esteroil-acil-dessaturase, e a partir desse ponto os PHAs são formados. Segundo Sakarika e Kornaros (2017), a limitação de

nitrogênio não só aumenta a produtividade lipídica como também melhora o perfil lipídico para a produção de bioprodutos como biopolímeros e biodiesel, além de reduzir a necessidade de adição de nitrogênio, resultando em economia de custos e energia.

Tabela 3.5. Composição de ácidos graxos da biomassa das microalgas após os 20 dias de cultivo.

Ácidos graxos	Concentração (mg/g de lipídeo)					
	<i>Chlorella minutissima</i>		<i>Synechococcus subsalsus</i>		<i>Spirulina sp. LEB-18</i>	
	MP	ML	MP	ML	MP	ML
C4:0	*	*	*	*	2,91 ± 0,44	1,75 ± 0,08
C6:0	-	0,26 ± 0,08	0,24 ± 0,06	0,48 ± 0,06	0,29 ± 0,03	0,36 ± 0,01
C8:0	0,14 ± 0,03	0,31 ± 0,01	0,27 ± 0,04	0,48 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,02
C10:0	0,20 ± 0,07	0,27 ± 0,12	0,14 ± 0,01	0,23 ± 0,08	0,87 ± 0,06	1,21 ± 0,08
C11:0	0,30 ± 0,05	1,04 ± 0,10	0,61 ± 0,03	0,37 ± 0,05	0,28 ± 0,04	0,16 ± 0,05
C13:0	2,50 ± 0,18	3,14 ± 0,26	5,37 ± 0,01	4,57 ± 0,03	3,45 ± 0,24	2,97 ± 0,14
C14:0	2,07 ± 0,03	2,85 ± 0,60	5,03 ± 0,53	4,33 ± 0,04	1,44 ± 0,23	1,27 ± 0,12
C14:1w5	3,25 ± 0,82	6,78 ± 0,02	8,69 ± 0,22	6,19 ± 0,21	0,28 ± 0,05	2,26 ± 0,25
C16:0	5,91 ± 0,06	6,39 ± 0,48	9,11 ± 0,41	13,33 ± 0,27	18,27 ± 1,09	28,12 ± 1,80
C17:0	1,43 ± 0,01	3,38 ± 0,02	1,03 ± 0,07	2,71 ± 0,65	0,48 ± 0,10	0,52 ± 0,08
C18:0	30,73 ± 0,27	51,42 ± 0,36	12,65 ± 0,44	16,58 ± 0,25	12,20 ± 0,07	8,94 ± 0,09
C18:1w9	6,32 ± 0,52	6,75 ± 0,66	15,91 ± 0,35	4,39 ± 0,26	14,92 ± 0,01	13,94 ± 0,11
C18:2w6	*	*	*	*	11,77 ± 1,25	3,91 ± 0,19
C18:3w6	*	*	*	*	3,90 ± 0,11	*
Σ saturados	43,29 ± 0,98	69,07 ± 1,19	34,44 ± 0,82	43,07 ± 1,16	40,33 ± 1,98	45,45 ± 2,34
Σ insaturados	9,57 ± 0,67	13,52 ± 0,87	24,60 ± 1,10	10,59 ± 0,91	30,87 ± 1,52	20,11 ± 1,56
Total	52,86 ± 1,13	82,59 ± 1,46	59,04 ± 1,63	53,66 ± 1,83	71,20 ± 4,66	60,56 ± 3,10

Médias ± desvio padrão. MP significa meio padrão e ML significa meio limitado de nitrogênio. * Não detectado.

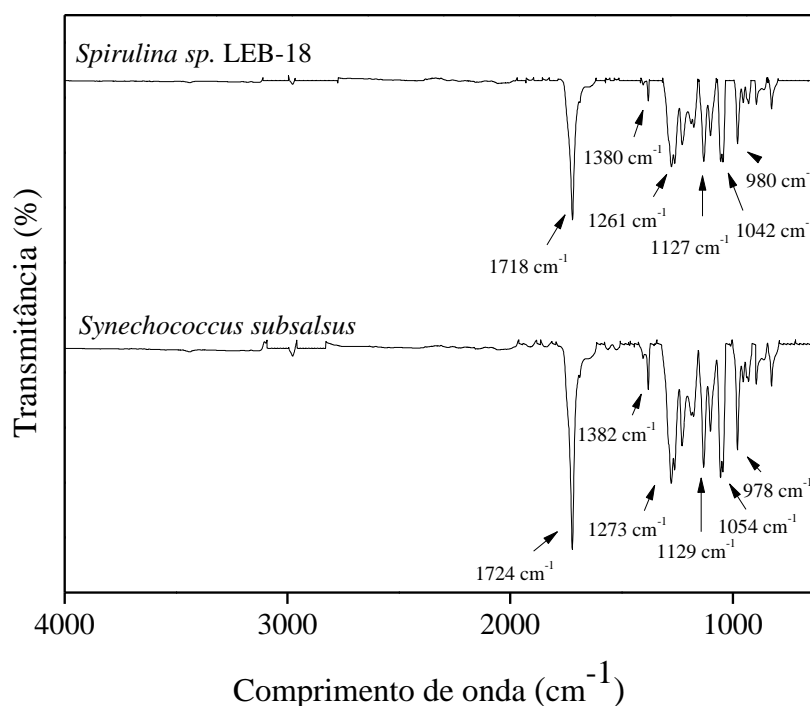
5.4.2 Caracterização dos PHAs

5.4.2.1 FTIR

A Figura 3.5 apresenta os espectros de FTIR das amostras de PHA produzidas pelas duas cepas de cianobactérias, demonstrando uma semelhança entre as amostras. As bandas principais observadas no espectro dos PHAs são atribuídas à deformação axial do grupo carbonila éster (C=O) (1710-1750 cm^{-1}), e a formação dos grupos C-O-C aparecendo na região espectral de 1260 a 1300 cm^{-1} (fase cristalina) e na região de cerca de 1050 cm^{-1} (KHAN et al., 2012). As bandas próximas a 1380 cm^{-1} estão associadas à deformação angular simétrica no plano dos grupos metila (CH₃), e as bandas próximas a 980 cm^{-1} correspondem à vibração da carbonila do grupo éster (C-C) (RIBEIRO et al., 2015). Estes grupos funcionais são

característicos das estruturas químicas dos PHAs, confirmando a produção destes biopolímeros pelas microalgas estudadas.

Figura 3.5. Espectros FTIR dos PHAs produzidos pelas cianobactérias *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina sp.* LEB-18 cultivadas em meio limitado de nitrogênio.



5.4.2.2 Massa molecular (Mm)

O valor de Mm encontrado para o PHA produzido pela microalga *Synechococcus subsalsus* foi de 179,66 KDa, enquanto a Mm encontrada para o PHA obtido de *Spirulina sp.* LEB-18 foi de 163,26 KDa (Tabela 3.6), demonstrando que a massa molecular do polímero varia com a característica da cepa produtora. Essa diferença de comportamento observada para os polímeros obtidos neste estudo é provavelmente atribuída a um rearranjo estrutural do polímero durante a biossíntese de cada cepa (CAMPOS et al., 2014). Esse rearranjo estrutural pode ter sido causado por um aumento do grau de polimerização, que forma cadeias mais longas com Mm diferentes. Laycock et al. (2012) sugeriram que a distribuição da Mm está associada às propriedades de uso final dos biopolímeros através do controle estrutural das macromoléculas.

As propriedades dos PHAs dependem do tamanho das suas cadeias poliméricas, cujos rearranjos estruturais podem depender do grau de polimerização (ASSIS et al., 2016). Assim,

como os polímeros obtidos pelas duas microalgas apresentaram Mm diferentes, consequentemente, apresentam propriedades diferentes (físicas, mecânicas, térmicas, reológicas e outras). Devido à significativa competição industrial, a capacidade de controlar a massa molecular do polímero durante sua produção, e entender como a massa molecular influencia as propriedades finais do polímero, é extremamente importante.

Tabela 3.6. Massa molecular e propriedades termofísicas dos PHAs produzidos pelas cianobactérias *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina sp.* LEB-18 cultivadas em meio limitado de nitrogênio.

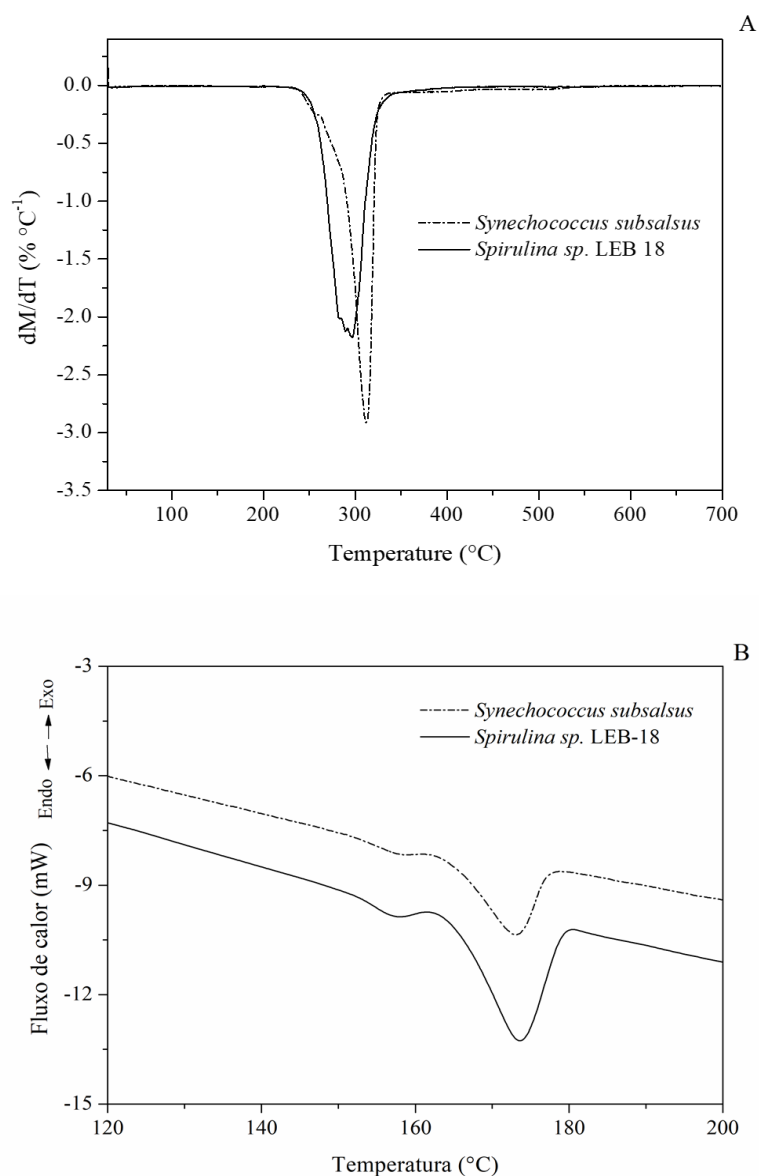
	Microalgas produtoras dos PHAs	
	<i>Synechococcus subsalsus</i>	<i>Spirulina sp.</i> LEB-18
Mm (KDa)	179,66 ± 1,75 ^{a*}	163,26 ± 7,94 ^{b*}
T _{onset} (°C)	286,88	249,79
T _{decom} (°C)	312,19	269,76
T _m (°C)	173,53	171,69
ΔH _m (J g ⁻¹)	54,15	65,93
% C	37,09	45,15

Médias ± desvio padrão. * Letras iguais em uma mesma linha indicam que não existe diferenças significativas (p>0,05) entre as amostras ao nível de 95% de confiança.

5.4.2.3 Caracterização térmica

A Tabela 3.6 apresenta as propriedades termofísicas dos PHAs, e a Figura 3.6A apresenta as curvas das derivadas termogravimétricas associadas as amostras. A temperatura inicial de decomposição (T_{onset}) dos PHAs foi de 286,88 °C e 249,79 °C, para amostras produzidas por *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina sp.* LEB-18, respectivamente, demonstrando que os polímeros obtidos podem ser termicamente estáveis a temperaturas inferiores a 240 °C. A decomposição térmica ocorreu em um estágio onde a perda de massa foi de 96,74% para o PHA produzido por *Synechococcus subsalsus*, e de 93,49% para o PHA produzido por *Spirulina sp.* LEB-18. Esse comportamento é típico das amostras de PHAs (CAMPOS et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015) e indicou a presença mínima de impurezas remanescentes do seu processo de extração (ASSIS et al., 2016). Assim, estes resultados sugerem que o PHA obtido da microalga *Synechococcus subsalsus* pode apresentar maior percentual de polímero puro quando comparado ao obtido com *Spirulina sp.* LEB-18.

Figura 3.6. Derivadas termogravimétricas (DTGs) (A) e análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) (B) dos PHAs produzidos pelas cianobactérias *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina sp.* LEB-18 cultivadas em meio limitado de nitrogênio.



A T_m , a entalpia de fusão (ΔH_m) e o grau de cristalinidade (%C) dos PHAs estão apresentados na Tabela 3.6. As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos PHAs (Figura 3.6B), demonstraram picos endotérmicos superiores a 170 °C (T_m), associados a fusão cristalina destes biopolímeros. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Bhati e Mallick (2015), que analisaram o PHA produzido pela cianobactéria *Nostoc muscorum* e encontraram valores de T_m próximos a 178 °C. Já Hermann-Kraus et al. (2013) obtiveram PHAs produzidos pela bactéria *B. cepacia* com temperaturas de fusão mais baixas (130 - 140 °C) do que as temperaturas obtidas neste estudo. Segundo Pohlmann et al. (2006), os

copolímeros de PHA são instáveis acima de suas temperaturas de fusão cristalina, o que os torna suscetíveis à degradação molecular e isso provoca dificuldades no seu processamento. Assim, os dois polímeros obtidos podem ser facilmente moldados por injeção e são aplicáveis ao processamento de filmes soprados (CHANPRATEEP et al., 2010).

Com base no ΔH_m , notamos que os graus de cristalinidade dos PHAs foram de 37,09% para os polímeros produzidos por *Synechococcus subsalsus*, e 45,15% para aqueles produzidos por *Spirulina* sp. LEB-18. Os PHAs são polímeros semicristalinos e seu grau de cristalinidade depende diretamente de sua composição. Segundo Assis et al. (2016), PHAs com cristalinidade entre 60 e 80% são considerados rígidos; PHAs flexíveis e mais elásticos têm comprimentos de polímero de cadeia média (30 – 40%) e curta (< 30%). Um grau de cristalinidade menor aumenta o número de possíveis aplicações industriais do PHA, melhorando suas características de processamento. Assim, o PHA produzido pela microalga *Synechococcus subsalsus* apresenta maior expectativa de aplicações industriais do que o produzido pela *Spirulina* sp. LEB-18, especialmente no setor de embalagens.

5.4.2.4 Composição dos PHAs

A Tabela 3.7 apresenta a composição monomérica dos PHAs produzidos pelas duas microalgas estudadas. Observa-se a predominância de blocos de cadeia média e longa com 10 a 18 átomos de carbono. Os PHAs produzidos pela microalga *Synechococcus subsalsus* apresentaram maior percentual de monômeros com 16 (51,78%) e 18 (34,10%) átomos de carbono, enquanto que o polímero produzido pela *Spirulina* sp. LEB-18 apresentou maior teor dos monômeros com 14 (16,49%) e 16 carbonos (72,58%), demonstrando que os PHAs produzidos por cada microalga apresentam diferentes composições monoméricas. A detecção destes blocos de construção se configura como uma novidade científica, uma vez que são constituintes absolutamente novos dos PHAs produzidos por estas microalgas. Embora as bactérias sejam capazes de acumular maior quantidade de PHAs, os polímeros obtidos são formados, em maior porcentagem, por monômeros com 4 a 10 átomos de carbono (CAMPOS et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015). Essas porcentagens mais altas desses monômeros de cadeia menor, fazem com que esses PHAs apresentem propriedades que dificultam sua aplicação industrial. Também foi observado um maior percentual de impurezas (10,93 %) nos PHA extraídos da *Spirulina* sp. LEB-18, confirmando os resultados obtidos nas análises termogravimétricas, que apontaram para um maior grau de PHA puro nos polímeros produzidos pela cianobactéria *Synechococcus subsalsus*.

A composição monomérica dos PHAs é extremamente dependente das condições de cultivo e das cepas produtoras, e está diretamente relacionada às propriedades dos polímeros e, conseqüentemente, às suas possíveis aplicações industriais. Durante o processo de polimerização, verificou-se que as cepas mostraram potencial de melhor adaptabilidade aos blocos de construção com 14 ou 16 unidades de carbono. Isso demonstra a existência de uma relação entre a estrutura molecular dos PHAs e a composição dos ácidos graxos da biomassa, onde um alto conteúdo de compostos de cadeia longa (14-18 átomos de carbono) também foi observado, indicando que um metabólito intermediário comum de ácido graxo, serve como um precursor na síntese de monômeros de PHA.

Tabela 3.7. Composição (% area/massa) determinada por GC-MS de PHAs de *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina sp.* LEB-18.

Tempo de retenção (min)	Identificação NIST	PHAs de <i>Synechococcus subsalsus</i>	PHAs de <i>Spirulina sp.</i> LEB-18
4.72	metil hidroxidodecanoato	1,59	-
5.84	metil hidroxitetradecanoato	5,04	16,49
7.06	metil hidroxihexadecanoato	51,78	72,58
8.72	metil hidroxioctadecanoato	34,10	-
Outros picos	Não identificado	7,48	10,93

Neste trabalho, demonstramos que a cristalinidade do material polimérico é muito semelhante à do material cristalino (RIBEIRO et al., 2015; LAYCOCK et al., 2012). O PHA produzido por *Spirulina sp.* LEB-18 apresentou menor percentual de monômeros de cadeia longa, resultando em um polímero com maior cristalinidade e menor massa molecular. Segundo Ribeiro et al. (2015), o módulo e a resistência à tração desses polímeros diminuem com o aumento da concentração e das cadeias dos monômeros. Estes dados demonstram que os PHAs obtidos possuem grande potencial para aplicação industrial.

5.5 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a deficiência da fonte de nitrogênio no meio de cultivo das microalgas *Clorella minutíssima*, *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina sp.* LEB-18, influencia no metabolismo desses microrganismos, pois reduz a produção de compostos de seu metabolismo primário, como as clorofilas e proteínas, e desvia suas vias metabólicas para a

produção de bioprodutos do seu metabolismo secundário, como lipídeos e PHAs. Embora a microalga *Chlorella minutissima* não tenha produzido PHAs, mesmo com a limitação de nitrogênio, ficou evidente que o estresse causado pela deficiência desse elemento nos meios de cultivo, se configura como uma ferramenta para estimular a produção de biopolímeros pelas cianobactérias.

Os PHAs produzidos por *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18 apresentaram diferentes características, evidenciando a influência da cepa produtora nas propriedades dos polímeros. Os PHAs obtidos por essas microalgas, são formados por blocos de construção de cadeia longa, com 14 a 18 átomos de carbono. Esta composição monomérica é uma novidade científica, uma vez que não foi encontrada em PHAs obtidos por bactérias. As propriedades dos PHAs produzidos pelas cianobactérias estudadas estimulam a aplicação industrial desses polímeros, principalmente na área de embalagem.

5.6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, C.; GODFREY, V.; WAHLEN, B.; SEEFELDT, L.; BUGBEE, B. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 188–194, 2013.
- ASSIS, D.J.; GOMES, G.V.P.; PASCOAL, D.R.C.; PINHO, L.S.; CHAVES, L.B.O.; DRUZIAN, J.I. Simultaneous Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates and Extracellular Polymeric Substance (EPS) from Crude Glycerol from Biodiesel Production by Different Bacterial Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1110-1127, 2016.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. Washington: AOAC, 2005.
- BHATI, R.; MALLICK, N. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: Process optimization and polymer characterization. **Algal Research**, v. 7, p. 78–85, 2015.
- BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(beta-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1977–1982, 1988.
- CAMPOS, M.I.; FIGUEIREDO, T.V.B.; SOUSA, L.S.; DRUZIAN, J.I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 338–346, 2014.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.

CHANPRATEEP, S.; BUASRI, K.; MUANGWONG, A.; UTISWANNAKUL, P. Biosynthesis and biocompatibility of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 2003–2012, 2010.

CHEN, C.Y.; DURBIN, E.G. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. **Marine Ecology Progress Series**, v. 109, p. 83–94, 1994.

CHEN, W.H.; WU, Z.Y.; CHANG, J.S. Isothermal and non-isothermal torrefaction characteristics and kinetics of microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 245–251, 2014.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.A.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 158–162, 2006.

DEAMICIA, K.M.; SANTOS, L.O.; COSTA, J.A.V. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 168–174, 2018.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497–509, 1957.

FREITAS, B.C.B.; ESQUÍSEL, M.G.; MATOS, R.G.; ARRAIANO, C.M.; MORAES, M.G.; COSTA, J.A.V. Nitrogen balancing and xylose addition enhances growth capacity and protein content in *Chlorella minutissima* cultures. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 129–133, 2016.

GORL, M.; SAUER, J.; BAIER, T.; FORCHHAMMER, K. Nitrogen-starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: Adaptation to long-term survival. **mBio**, v. 144, p. 2449–2458, 1998.

HERMANN-KRAUSS, C.; KOLLER, M.; MUHR, A.; FASL, H.; STELZER, F.; BRAUNEGG, G. Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co- and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products. **Archaea**, v. 1, p. 1–10, 2013.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant Journal**, v. 54, p. 621–639, 2008.

JAU, N.; YEWA, S.; TOH, P.S.Y.; CHONG, A.S.C.; CHU, W.; PHANG, S.; NAJIMUDIN, N.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 144–151, 2005.

JESUS, C.S.; UEBEL, L.S.; COSTA, S.S.; MIRANDA, A.L.; MORAIS, E.G.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; NUNES, I.L.; FERREIRA, E.S.; DRUZIAN, J.I. Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86–94, 2018.

- JIMÉNEZ, C.; COSSÍO, B.R.; NIELL, F.X. Relation between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. **Aquaculture**, v. 221, p. 331–345, 2003.
- JOA, O.; CAVALHEIRO, M.; ALMEIDA, C.M.D.D.; CHRISTIAN, G.; FONSECA, M.M.R. Poly(3hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 509–515, 2009.
- KAVITHA, G.; KURINJIMALAR, C.; SIVAKUMAR, K.; PALANI, P.; RENGASAMY, R. Biosynthesis, purification and characterization of polyhydroxybutyrate from *Botryococcus braunii kütz.* **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 700–706, 2016.
- KHAN, N.Y.; BIBI, M.; YOUSUF, S.; QURESHI, I.H.; ATTA-UR-ABDULLAH, N.; AL-MAJID, A.M.; MESAİK, M.A.; KHALID, A.S.; SATTAR, S.A.; ATIA-TUL-WAHAB, N.; CHOUDHARY, M.I. Synthesis of some potent immunomodulatory and anti-inflammatory metabolites by fungal transformation of anabolic steroid oxymetholone. **Chemistry Central Journal**, v. 6, p. 1533–1540, 2012.
- KHOSRAVI-DARANI, K.; MOKHTARI, Z.B.; AMAI, T.; TANAKA, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1407–1424, 2013.
- LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKERC, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 536–583, 2012.
- LIOTENBERG, S.; CAMPBELL, D.; RIPPKA, R.; HOUMARD, J.; MARSAC, N.T. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. **mBio**, v. 142, p. 611–622, 1996.
- LÓPEZ-GONZÁLEZ, D.; PUIG-GAMERO, M.; ACIÉN, F.G.; GARCÍA-CUADRA, F.; VALVERDE, J.L.; SANCHEZ-SILVA, L. Energetic, economic and environmental assessment of the pyrolysis and combustion of microalgae and their oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 1752–1770, 2015.
- LOURENÇO, S.O.; BARBARINO, E.; LAVIN, P.L.; MARQUEZ, U.M.L.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, p. 17–32, 2004.
- MARKOU, G.; DAOC, L.H.T.; MUYLAERTA, K.; BEARDALLD, J. Influence of different degrees of N limitation on photosystem II performance and heterogeneity of *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 26, p. 84–92, 2017.
- MOHEIMANI, N.R. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 387–398, 2013.
- MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Carbon dioxide mitigation with *Chlorella kessleri*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1349–1352, 2007.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B.; GHOSH, T.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, 2014.

POHLMANN, A.; FRICKE, W.F.; REINECKE, F.; KUSIAN, B.; LIESEGANG, H.; CRAMM, R.; EITINGER, T.; EWERING, C.; POTTER, M.; SCHWARTZ, E.; STRITTMATTER, A.; VOSS, I.; GOTTSCHALK, G.; STEINBUCHER, A.; FRIEDRICH, B.; BOWIEN, B. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1257–1262, 2006.

POIRIER, Y.; DENNIS, D.; KLOMPARENS, K.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in plants. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 237–246, 1992.

QIU, R.; GAOB, S.; LOPEZC, P.A.; KIMBERLY, L.O. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, v. 28, p. 192–199, 2017.

RIBEIRO, P.L.L.; SILVA, A.C.M.S.; FILHO, J.A.M.; DRUZIAN, J.I. Impact of different by-products from the biodiesel industry and bacterial strains on the production, composition, and properties of novel polyhydroxyalkanoates containing achiral building blocks. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 212–223, 2015.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.W.; HERDMAN, M.; STANIER, R.G. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1–61, 1979.

RIZZO, A.M.; PRUSSI, M.; BETTUCCI, L.; LIBELLI, I.M.; CHIARAMONTI, D. Characterization of microalga *Chlorella* as a fuel and its thermogravimetric behavior. **Applied Energy**, v. 102, p. 24–31, 2013.

SAKARIKA, M.; KORAROS, M. Kinetics of growth and lipids accumulation in *Chlorella vulgaris* during batch heterotrophic cultivation: Effect of different nutrient limitation Strategies. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 356–365, 2017.

SASSO, S.; POHNER, G.; LOHR, M.; MITTAG, M.; HERTWECK, C. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 761–785, 2012.

SHARMA, L.; MALLICK, N. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light–dark cycles. N and P status and carbon sources, **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1304–1310, 2005.

SHIRIVASTAV, A.; MISHRA, S.K.; MISHRA, S. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 255–260, 2010.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira) **Physiology, Cell-biology and Biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997.

YELLORE, V.; DESIA, A. Production of poly-b-hydroxybutyrate from lactose and whey by *methylobacterium* sp. ZP24. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 391–394, 1998.

WIJFFELS, R.H.; BARBOSA, M.J.; EPPINK, M.H.M. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, p. 287-295, 2010.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, foi confirmada a influência do método de extração dos PHAs da biomassa de microalgas nas propriedades dos biopolímeros, o que demonstra que a escolha do método adequado para extração do PHA, tem importância fundamental para sua aplicação industrial. O método de extração dos PHAs deve garantir um alto rendimento e elevado grau de pureza dos polímeros, e devem assegurar a obtenção de PHAs com características, como massa molecular, índice de cristalinidade e composição monomérica, que permitam a sua processabilidade. O método M 2 foi mais eficaz na extração dos PHAs da biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 pois apresentou maior rendimento de PHAs puros.

O estudo também permitiu verificar que a limitação do nitrogênio nos cultivos das cianobactérias pode ser uma ferramenta para estimular a produção de PHAs e de lipídeos por esses microrganismos. Os PHAs produzidos pelas cianobactérias *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18 apresentaram propriedades que permitem seu processamento, sendo formados majoritariamente por monômeros de cadeia longa, com 14 a 18 átomos de carbono. Esta composição monomérica é uma novidade científica, uma vez que não foi encontrada em PHAs obtidos por bactérias, e estimulam o desenvolvimento de mais pesquisas nessa área para viabilizar a obtenção e aplicação desses polímeros. Os PHAs produzidos por *Synechococcus subsalsus* apresentaram propriedades ligeiramente melhores que os produzidos por *Spirulina* sp. LEB-18, com menor índice de cristalinidade e maior estabilidade térmica.

Nas próximas décadas, observa-se a necessidade de melhorias tecnológicas em vários aspectos para o desenvolvimento de espécies de microalgas muito mais eficientes para a síntese e acúmulo dos PHAs. Como relatado, a pesquisa de PHAs não é apenas uma questão de encontrar o tipo certo de biomassa e transformá-la em bioplástico, mas também deve ser sustentável em termos econômicos em larga escala.

Espera-se que, nos próximos anos, a produção de microalgas continue a crescer no mundo, levando a um aumento na escala desta indústria. A biomassa das microalgas é formada majoritariamente por bioprodutos de grande interesse industrial, como pigmentos, proteínas, PHAs e ácidos graxos. Espera-se que as indústrias possam criar ferramentas e metodologias para extrair e utilizar todos os bioprodutos da biomassa das microalgas para convertê-los em produtos de alto valor agregado.