

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MATHEUS LEITE BARBOSA LIMA

**Avaliação de crescimento e produção de carotenoides e clorofila da cepa
Anagnostidinema amphibium CCIBt 3214 sob diferentes parâmetros de cultivo**

**PIRACICABA
2023**

MATHEUS LEITE BARBOSA LIMA

**Avaliação de crescimento e produção de carotenoides e clorofila da cepa
Anagnostidinema amphibium CCIbt 3214 sob diferentes parâmetros de cultivo**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de Ciências Biológicas
para obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Jr.
Coorientadora: Me. Paloma Nathane Nunes de
Freitas

**PIRACICABA
2023**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 OBJETIVOS	5
2.1 Geral	5
2.2 Específicos	5
3 MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1 Cepa de cianobactéria	5
3.2 Meios de cultivo	6
3.3 Temperatura	8
3.4 Luminosidade.....	8
3.5 Espectrofotometria	8
3.6 Contagem celular	9
4 RESULTADOS ESPERADOS	9
5 CRONOGRAMA	9
REFERÊNCIAS	10

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são um grupo de microrganismos procariontes fotossintetizantes mais amplo, diverso e bem distribuído no planeta, podendo estar presente em diversos ambientes, desde regiões polares até áridas, podendo estar presente em fontes termais, geleiras, lagos e represas, até mesmo fazendo parte da comunidade microbiana subterrânea em desertos (WHITTON, 2000). E segundo evidências fósseis, foram os primeiros produtores de oxigênio na atmosfera primitiva, surgindo há aproximadamente 2,4 bilhões de anos e até os dias atuais continuam sendo importantes para inúmeros ecossistemas (FISCHER, 2008).

Além disso, as células destes microrganismos contêm clorofila α , principal pigmento fotossintético, além da presença de alguns carotenóides e outros pigmentos acessórios característicos como ficobilina, ficoeritrina e ficocianina, sendo este último, responsável pela coloração verdeazulada, típica dos membros deste grupo (VIDAL et al., 2021).

Além de sua importância biológica, os pigmentos e carotenoides produzidos por esses organismos podem ter aplicações especiais nas indústrias cosmética e farmacêutica (BOROWITZKA, 2013). As cianobactérias possuem um grande potencial biotecnológico seja na produção de biomassa, na confecção de pigmentos, produtos naturais de metabólitos secundários, biocombustíveis, entre outros (ESTEVEZ-FERREIRA et al., 2017).

Em alguns estudos, foi observado a influência de fatores abióticos, como temperatura (SINHA, 2000), fotoperíodo (RASGATONI, 2015) e concentração de nutrientes (LITCHMAN, 2019) na produção de determinados metabólitos em cepas de cianobactérias (JACINAVICIUS, 2021). Além disso, estes estudos mostraram que estes parâmetros podem influenciar no crescimento celular destes microrganismos (GIANNUZZI, 2018).

Desse modo, a cepa de cianobactéria *Anagnostidinema amphibium* CCIBt 3214, que faz parte da Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt) e da Coleção de Cianobactérias do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (LBA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), isolada da Represa Billings (São Paulo – SP), foi selecionada para o desenvolvimento deste projeto.

De acordo com Jacinavicius et al. (2020) a cepa é produtora das micosporinas shinorina e porfira-334.

Os aminoácidos tipo micosporina (MAAs) são produtos do metabolismo secundário e tem função fisiológica relacionada à proteção celular contra o excesso de radiação ultravioleta no ambiente e ao stress oxidativo (CARRETO, 2011). De acordo com a Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), em 2017, o Brasil foi o 4º maior consumidor de protetores solares. Portanto, este estudo pode contribuir para expandir a possibilidade de utilização da cepa selecionada na indústria cosmética e farmacêutica como uma nova fonte de obtenção um composto relevante para a confecção de produtos para o mercado.

Os experimentos possibilitarão entender como determinados parâmetros de cultivo influenciam no crescimento da cepa e na produção de metabólitos como clorofila e carotenoides, mas que possivelmente também possam influenciar na produção de micosporinas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral será investigar a influência de diferentes parâmetros de cultivo no crescimento e na produção de metabólitos como clorofila e carotenoides da cepa de cianobactéria *Anagnostidinema amphibium* (CCIBt 3214).

2.2 Específicos

Os objetivos específicos serão:

- a. Cultivar a cepa de cianobactéria *A. amphibium* (CCIBt 3214);
- b. Acompanhar o crescimento da cepa ao longo do período estabelecido de 30 dias, por meio de hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, utilizando a microscopia óptica, e por meio de espectrofotometria de UV/Vis;
- c. Realizar a análise da produção de carotenóides e clorofila, por meio de espectrofotometria de UV/Vis, ao longo do período estabelecido de 30 dias de crescimento.

As análises serão realizadas no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (LBA) localizado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba – SP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Cepa de cianobactéria*

Será utilizada a cepa de cianobactéria *Anagnostidinema amphibium* (CCIBt 3214) isolada da Represa Billings - SP, sendo parte da Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt) em São Paulo – SP e da Coleção de Cianobactérias do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (LBA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP).

O crescimento da cepa será feito na sala de cultivo climatizada com temperatura de 22 °C, fotoperíodo 12:12, irradiância de 50 $\mu\text{moles de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sem a utilização de aeração, no meio ASM-1.

3.2. *Meios de cultivo*

Para a avaliação dos possíveis efeitos de diferentes meios de cultivo sobre o crescimento da cepa assim como na produção de carotenóides e clorofila, serão utilizados três diferentes meios líquidos de cultivo: ASM-1, BG11 e BG11-0, com as composições descritas no Quadro 1 a 6, respectivamente.

Quadro 1 – Soluções A para o preparo do meio ASM-1. **Fonte:** Gorham et al. (1964).

Solução	Nutriente	Quantidade (g)	Volume (mL)
1	NaNO ₃	8,5	1000
2	MgCl ₂ 6H ₂ O	1,64	1000
3	MgSO ₄ 7H ₂ O	3,6	1000
4	CaCl ₂	2	1000

Quadro 2 – Soluções B para o preparo do meio ASM-1. **Fonte:** Gorham et al. (1964).

Solução	Nutriente	Quantidade (g)	Volume (mL)
1	KH ₂ PO ₄	6,8	1000

2	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	6,9	1000
3	NaH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	13,4	1000
4	NaH ₂ PO ₄ .12H ₂ O	17,4	1000

Quadro 3 – Soluções C para o preparo do meio ASM-1. **Fonte:** Gorham et al. (1964).

Solução	Nutriente	Quantidade (g)	Volume (mL)
1	H ₃ BO ₃	24,8	1000
2	MnCl ₂ . 4H ₂ O	13,9	1000
3	FeCl ₃ .6H ₂ O	10,8	1000
4	ZnCl ₂	3,36	1000
5	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,19	1000
6	CuCl ₂	0,19	1000

Quadro 4 – Soluções D para o preparo do meio ASM-1. **Fonte:** Gorham et al. (1964).

Solução	Nutriente	Quantidade (g)	Volume (mL)
1	EDTA Na ₂	18,6	1000

Observação para ASM-1: Ajustar o pH para 8.

Quadro 5: Soluções estoque para o preparo do meio BG – 11. **Fonte:** Rippka et al. (1979).

Solução	Nutriente	Quantidade (g)	Volume (mL)
1	NaNO ₃	15	1000
2	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	4	1000
3	MgSO ₄ 7H ₂ O	7,2	1000
4	CaCl ₂ 2H ₂ O	3,6	1000
5	Ácido cítrico	0,6	1000
6	EDTA Na ₂	0,6	1000

7	Na ₂ CO ₃	1	1000
8	FeCl ₃ 3H ₂ O	0,6	1000

Observação para BG-11: Ajustar o pH para 7,4.

Quadro 6: Soluções estoque para o preparo do meio BG11-0. Fonte: Rippka et al. (1979).

Solução	Nutriente	Quantidade (g)	Volume (mL)
1	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	4	1000
2	MgSO ₄ 7H ₂ O	7,2	1000
3	CaCl ₂ 2H ₂ O	3,6	1000
4	Ácido cítrico	0,6	1000
5	EDTA Na ₂	0,6	1000
6	Na ₂ CO ₃	2	1000
7	FeCl ₃ 3H ₂ O	1,2	1000

Observação para BG-0: Ajustar o pH para 7,4.

Será realizado um inóculo padronizado em triplicata da cepa nos diferentes tratamentos e o crescimento das culturas, bem como a produção de carotenóides e clorofila serão monitorados por um determinado período de 30 dias. O crescimento celular das culturas será acompanhado por meio da contagem de células e a produção de carotenóides e clorofila será monitorado por espectrofotometria de UV/Vis.

3.3. *Temperatura*

Para avaliar os possíveis efeitos de diferentes temperaturas sobre o crescimento da cepa bem como na produção de carotenóides e clorofila, serão realizados ensaios da cepa sob três diferentes temperaturas, 15, 25 e 35 °C. Será realizado um inóculo padronizado da cepa nos diferentes tratamentos e o crescimento das culturas bem como a produção de carotenóides e clorofila serão monitorados por um determinado período de 30-45 dias.

O crescimento celular das culturas será acompanhado por meio da contagem de células e a produção de carotenóides e clorofila será monitorado por espectrofotometria de UV/Vis.

3.4. Luminosidade

Para avaliar os possíveis efeitos de diferentes de luminosidade sobre o crescimento da cepa bem como na produção de carotenoides e clorofila, serão realizados ensaios da cepa sob três diferentes luminosidades, sem iluminação, iluminação com lâmpadas UV, e iluminação com lâmpadas fluorescentes. Será realizado um inóculo padronizado das cepas nos diferentes tratamentos e o crescimento das culturas bem como a produção de carotenóides e clorofila serão monitorados por um determinado período de 30-45 dias.

O crescimento celular das culturas será acompanhado por meio da contagem de células e a produção de carotenóides e clorofila será monitorado por espectrofotometria de UV/Vis.

3.5. Espectrofotometria

A espectrofotometria de UV/Vis, utilizando um equipamento modelo SP 2000 (Bell Engineering) com cubeta de quartzo de 1 cm será utilizada como método de análise para avaliação de clorofila e carotenoides, bem como, avaliação do crescimento celular da cepa *A.amphibium* (CCIBt 3214) sob diferentes parâmetros de cultivo (meio de cultura, temperatura e luminosidade). As etapas serão as seguintes:

1. Retirada de um inóculo de 2 mL de cada tratamento;
2. Por meio do espectrofotômetro, será determinada a absorvância (luz absorvida) das ondas condizentes com a Clorofila A (680 nm) e Carotenoides (450nm);

3.6. Contagem celular

O crescimento celular das culturas será acompanhado por meio da contagem de células, no qual 1 mL de alíquota será retirada da cultura e as células serão fixadas com 0,5 mL de solução de Lugol imediatamente após a amostragem. As contagens celulares serão feitas em hemocítômetro de Fuchs-Rosenthal, com o auxílio de microscópio óptico (JACINAVICIUS, 2015).

4. Resultados esperados

Ao concluir o trabalho é esperado avaliar os atributos da cepa de cianobactéria CCIbt 3214 em relação à capacidade e limitação de crescimento e produção de carotenóides e clorofila, a partir de diferentes condições laboratoriais, gerando dados com informações valiosas e descobrindo as condições que possam agregar na utilização da espécie na questão de potencial biotecnológico. Os dados gerados buscarão fundamentar futuros estudos científicos mais aprofundados sobre o tema e a cepa em questão.

5. Cronograma

Atividades	Meses – 2023					
	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês
Revisão de literatura	Já executado					
Cultivo da cepa CCIbt 3214						
Teste em diferentes meios de cultivo						
Teste em diferentes temperaturas	X	X	X			
Teste em diferentes luminosidades		X	X	X		
Análise dos dados obtidos	X	X	X	X	X	X

REFERÊNCIAS

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 743–756, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>

CARRETO, J. I.; CARIGNAN, M. O. Mycosporine-like Amino Acids: Relevant Secondary Metabolites. Chemical and Ecological Aspects. **Mar Drugs** 2011, 9 (3), 387–446. <http://dx.doi.org/10.3390/md9030387>

FISCHER, W. W. Biogeochemistry: Life before the Rise of Oxygen. **Nature** 2008, 455–446. <http://dx.doi.org/10.1038/4551051a>

GIANNUZZI, Leda. Cyanobacteria growth kinetics. **Algae**. IntechOpen, 2018, 1-17. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.81545>

GORHAM, PR; MCLACHLAN, J; HAMMER, UT; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of anabaena flos-aquae (Lyngb.) de Bréb. **SIL Proceedings**, 2017;15(2) 796–804. <https://doi.org/10.1080/03680770.1962.11895606>

JACINAVICIUS, F. R., GERALDES, V., CRNKOVIC, C. M., DELBAJE, E., FIORE, M. F., & PINTO, E. (2021). Effect of ultraviolet radiation on the metabolomic profiles of potentially toxic cyanobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, 97(1). <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIAA243>

LITCHMAN, E., NEALE, P. J., & BANASZAK, A. T. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: photoprotection and repair. **Limnology and Oceanography**. 47:86–94, 2002. <http://doi.org/10.4319/lo.2002.47.1.0086>

PANORAMA DO SETOR 2018 – **ABIHPEC**. 2018. <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2018/>

RASTOGI, R.P; INCHAROENSAKDI, A. Occurrence and Induction of a Ultravioletabsorbing Substance In the Cyanobacterium Fischerella Muscicola TISTR8215. **Phycological research**, v. 63 ,.1 pp. 51-55. <http://doi.org/10.1111/pre.12069>

RIPPKA, R. et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.

SINHA, R. P.; Klisch, M.; Gröniger, A.; Häder, D.-P. Mycosporine-like Amino Acids in the Marine Red Alga Gracilaria Cornea—Effects of UV and Heat. *Environ. Exp. Bot.* 2000, 43 (1), 33–43 SINHA, R. P; KLISCH; M; GRÖNIGER, A.; HÄDER, D. P. Mycosporine-like amino acids in the marine red alga Gracilaria cornea - Effects of UV and heat. **Environmental and Experimental Botany**, 43(1), 33–43. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(99\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(99)00043-X)

WHITTON, B. A.; POTTS, M. The Ecology of Cyanobacteria, **Kluwer**, 2000, pp. 1–11.2000. <https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7>

VIDAL, L. et al. Introduction to cyanobacteria. In: CHORUS, I.; WELKER, M. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. **CRC Press**, 2021, p. 163-211. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781003081449>

Matheus Leite B. Lima

Matheus Leite Barbosa Lima (Graduando em Ciências Biológicas)

Ernani Pinto

Prof. Dr. Ernani Pinto (Orientador)

**TERMO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL E DEMAIS
PESQUISADORES ENVOLVIDOS NO PROJETO DE PESQUISA**

À Comissão de Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Coc CB
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ-USP

Com relação ao projeto de título Avaliação de crescimento e produção de carotenoides e clorofila da cepa Anagnostidinema amphibium CCIbt 3214 sob diferentes parâmetros de cultivo, desenvolvido para cumprimento das atividades da Disciplina LCB0525, sob supervisão de Ernani Pinto e com execução parcial outotal sob responsabilidade de Matheus Leite Barbosa Lima, declaramos que:

1. Estamos cientes do conteúdo e assumimos o compromisso de cumprir os termos das Leis e Decretos complementares (Lei No 6.894 de dezembro de 1980, Lei N 7.803 de 18 de julho de 1989, Lei No 9.985 de 18 de julho de 2000, Lei No 9.974 de 6 de junho de 2000, Decreto No 99.556 de 1 de Outubro de 1990, Decreto No 4.340 de 22 de agosto de 2002, Instrução Normativa N 154 de 01 de mar o de 2007, Decreto N 4.074 de 4 de janeiro de 2002, Instrução Normativa N 169/2008, ABNT-NBR10004 2004, Resolução ANVISA RDC 306 - 07 de dezembro de 2004, Resolução No 358, de 29 de abril de 2005) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas posteriores relativos aos assuntos ambientais pertinentes. Também cientes, que apresentaremos todas as declarações e documentos exigidos pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa CEAP-ESALQ se solicitados;
2. Todos os procedimentos, organismos, insumos, equipamentos e quaisquer outros itens que serão utilizados direta ou indiretamente nesta pesquisa serão adquiridos e empregados segundo a legislação/normas dos órgãos competentes;
3. O projeto prevê recursos financeiros, se necessários, para o gerenciamento dos resíduos oriundos da pesquisa;
4. Todo impacto ambiental decorrente da má condução do projeto é de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos no projeto;
5. Estamos cientes das normas estabelecidas pelo Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da ESALQ (PGRQ-ESALQ) e comprometemo-nos com o seu cumprimento na sede da instituição responsável pela condução do projeto, colaborando para sua adequada realização;
6. Comprometemo-nos a providenciar, quando exigido em função da natureza do projeto de pesquisa, todos os documentos/autorizações exigidos por órgãos públicos ou privados.

Piracicaba, 17 de Maio de 2023

Assinam:



Docente Orientador(a)

Aluna(o)