



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DAS ENZIMAS ACETOACETIL-COA REDUTASE
EM CIANOBACTÉRIAS: POTENCIAL GENÉTICO PARA PRODUÇÃO DE
BIOPLÁSTICO**

ELIETE COSTA DA CRUZ

BELÉM, PARÁ

2024

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DAS ENZIMAS ACETOACETIL-COA REDUTASE
EM CIANOBACTÉRIAS: POTENCIAL GENÉTICO PARA PRODUÇÃO DE
BIOPLÁSTICO**

ELIETE COSTA DA CRUZ

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves

BELÉM, PARÁ

2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

D111a da Cruz, Eliete Costa.
AVALIAÇÃO IN SILICO DAS ENZIMAS ACETOACETIL-
COA REDUTASE EM CIANOBACTÉRIAS: POTENCIAL
GENÉTICO PARA PRODUÇÃO DE BIOPLÁSTICO / Eliete
Costa da Cruz. — 2024.
97 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular, Belém, 2024.

1. Cianobactérias. 2. Polihidroxicanoatos. 3. PhaB. 4.
Modelagem Molecular. 5. Dinâmica Molecular.. I. Título.

CDD 574.19296

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Considerações Gerais	11
1.2. Cianobactérias	13
1.2.1. Potencial biotecnológico	16
1.3. Polihidroxicanoatos (PHA)	18
1.3.1. Biossíntese do PHA	21
1.3.2. Acetoacetil-CoA redutase (PhaB)	23
1.4. Aplicações do PHA	25
1.5. Potencial da produção de pha em cianobactérias	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2. Objetivo específico.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Mineração de <i>phaB</i> em cianobactérias	31
3.2. Análise de similaridade	36
3.3. Modelagem molecular	37
3.3.1. Identificação e seleção de molde	37
3.3.2. Predição de estrutura.....	38
3.3.3. Validação.....	39
3.4. Ancoramento molecular	40
3.5. Dinâmica molecular	42
3.6. Cálculo de energia livre de ligação	43
3 RESULTADOS	44
4.1. Prospecção genômica	44
4.2. Caracterização da diversidade molecular	47
4.3. Modelagem molecular	49

4.4 Atracamento molecular	53
4.5 Dinâmica molecular	57
4.6 Cálculo de energia livre de ligação	67
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÃO	77
7 REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE A – Alinhamento completo das sequências PhaB.	91
APÊNDICE B – Resultado dos cálculos de energia livre pelos métodos MM/PBSA e MM/GBSA, em kcal/mol.	94

LISTA DE ABREVEATURA

CAA – Acetoacetiç-CoA

CDD – *Conserved Domain Database*

DM – Dinâmica Molecular

LCL-PHA - PHA de cadeia longa

MCL-PHA – PHA de cadeia média

MM-GBSA – *Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area*

MM-PBSA – *Molecular Mechanics-Poisson-Boltzmann Surface Area*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

P4HB - poli(4-hidroxibutirato)

PDB – *Protein Data Bank*

PE – Polietileno

PHA - Polihidroxialcanoato

PhaA – Enzima acetil-CoA acetiltransferase

PhaB – Enzima acetoacetyl-CoA redutase

PhaC – Enzima polihidroxialcanoato sintase

PhaG – Enzima 3-hidroxiacil-CoA transferase

PhaJ – Enzima enoil-CoA hidratase

PHB – poli(3-hidroxibutirato)

PHBV - poli(3-hidroxibutirato-co -3-hidroxivalerato)

PHH – poli(3-hidroxihexanoato)

PHO - poli(3-hidroxi octanoato)

PHV – poli(3-hidroxivalerato)

PP – Polipropileno

PS – Poliestireno

SCL-PHA – PHA de cadeia curta

SDR - superfamília desidrogenase/redutase de cadeia curta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diversidade morfológica das cianobactérias. (a) <i>Neosynechococcus sphagnicola</i> , (b) <i>Merismopedia glauca</i> , (c) <i>Pseudanabaena galeata</i> , (d) <i>Cyanothece aeruginosa</i> , (e, f) <i>Blennothrix sp.</i> , (g) <i>Asterocapsa divina</i> , (h) <i>Asterocapsa sp.</i> , (i) <i>Asterocapsa sp.</i> (j) <i>Tolypothrix sp.</i> , (k) <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> . Barra de escala 10 μm . Fonte: (DVOŘÁK et al., 2017).....	15
Figura 2 – Morfologia dos grânulos de PHA. (A) Microscopia de bactérias acumulando PHA (B) Esquema de um grânulo de PHA. Fonte: SHAHID et al., 2021; SHARMA et al., 2021.....	19
Figura 3 - Estrutura química básica do PHA. Fonte: ATIWESH et al., 2021b.....	20
Figura 4 - Etapas da via metabólica do PHB Fonte: OLAVARRIA et al., 2021.	23
Figura 5 - Exemplo de estrutura tridimensional da enzima PhaB. Fonte adaptado: KIM et al., 2014.....	24
Figura 6 - Matriz de similaridade calculada com as sequências do gene phaB em cianobactérias. (%).....	48
Figura 7 - Árvore filogenética do gene phaB. Os genes phaB das cianobactérias estão destacadas em azul e amarelo.....	48
Figura 8 – Modelo estrutural das cianobactérias (A)Visão geral do modelo PhaB1. O modelo é colorido segundo suas estruturas secundárias: α hélices em ciano, β fitas em vermelhos e loops em magenta. (B) Alinhamento da PhaB5 (vermelho) com a 3VZS (ciano). O destaque com o círculo verde indica a região onde a 3VZS apresenta a hélice $\alpha 2$ e a folha $\beta 3$ enquanto, na mesma região, a cianobactéria apresenta um loop.	52
Figura 9 - Alinhamento múltiplo de sequência para PhaB de cianobactérias e a referência 3VZS e 4RZI. Em destaque apresenta regiões de interação descritas experimentalmente com o cofator em setas azuis, com o substrato em setas rosas, o domínio Clamp-lid está apresentado pelo retângulo cinza e a tríade catalítica por triângulos roxos.	54
Figura 10 - Estrutura tridimensional dos ligantes que participam do complexo PhaB..	55
Figura 11 - Visão tridimensional dos resultados de atracamento da PhaB5, regiões em azul interagem com o cofator, em magenta interage com o ligante.	56
Figura 12 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) do controle 3VZS no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.	59

Figura 13 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) do controle 4RZI no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.	60
Figura 14 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) da PhaB5 no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.....	62
Figura 15 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) da PhaB16 no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.....	63
Figura 16 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) da PhaB18 no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.....	64
Figura 17 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) da PhaB21 no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.....	65
Figura 18 - Visão geral da conformação do acetoacetil-CoA na enzima PhaB5. (A) Alinhamento tridimensional da conformação final do ligante CAA após 100 ns de DM, das réplicas 1 (ciano) e 3 (rosa). (B) Representação da conformação tridimensional do CAA durante 100ns da réplica 1. O bloco azul claro está destacando a região acetoacetil e o bloco laranja está destacando a porção adenosina 3'-fosfato.....	66
Figura 19 - Representação detalhada da interação intermolecular entre o ligante CAA e o controle 3VZS. (A) Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 10 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante. Os círculos coloridos indicam o nível de conservação dos resíduos, conforme a legenda. (B) Mapas de interações 2D entre os resíduos e o ligante CAA.....	68
Figura 20 - Representação detalhada da interação intermolecular entre o ligante CAA e o controle 4RZI. (A) Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 10 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante. Os círculos coloridos indicam o nível de conservação dos resíduos, conforme a legenda. (B) Mapas de interações 2D entre os resíduos e o ligante CAA.....	69
Figura 21 - Representação detalhada da interação intermolecular entre o ligante CAA e a enzima PhaB5. (A) Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 10 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante. Os círculos coloridos indicam o nível de conservação dos resíduos, conforme a legenda. (B) Mapas de interações 2D entre os resíduos e o ligante CAA.....	70
Figura 22 - Representação detalhada da interação intermolecular entre o ligante CAA e a enzima PhaB16. (A) Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 10 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante. Os círculos	

coloridos indicam o nível de conservação dos resíduos, conforme a legenda. (B) Mapas de interações 2D entre os resíduos e o ligante CAA..... 71

Figura 23 - Representação detalhada da interação intermolecular entre o ligante CAA e a enzima PhaB18. (A) Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 10 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante. Os círculos coloridos indicam o nível de conservação dos resíduos, conforme a legenda. (B) Mapas de interações 2D entre os resíduos e o ligante CAA..... 71

Figura 24 - Representação detalhada da interação intermolecular entre o ligante CAA e a enzima PhaB21. (A) Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 10 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante. Os círculos coloridos indicam o nível de conservação dos resíduos, conforme a legenda. (B) Mapas de interações 2D entre os resíduos e o ligante CAA..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais genes envolvidos na síntese de PHA. Erro! Indicador não definido.	
Tabela 2 - Produção em escala comercial de companhias mundiais ativas. Fonte: AGARWAL et al. (2022), GAHLAWAT (2019).....	26
Tabela 3 - Produção de PHA por cianobactérias em diferentes tipos de cultivo.....	29
Tabela 4 - Lista de genomas coletados do NCBI.....	31
Tabela 5 - Resultado da prospecção do gene phaB encontrados nas linhagens cianobacterianas do banco de dados NCBI e respectivas informações. Códigos adotados para facilitar as análises, linhagens, comprimento das sequências de aminoácidos, resultados do HMMER (bit score e E-value), código de acesso do InterPro e resultados do Blast com o PDB 4RZI (identidade e cobertura).....	45
Tabela 6 - Resultados da validação dos modelos da enzima PhaB produzidos pelo servidor SWISS-MODEL.....	51
Tabela 7 - Resultado do atracamento molecular das enzimas PhaBs do programa Molegro Virtual Docker.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 8 - Resultado dos cálculos de energia livre pelos métodos MM/PBSA e MM/GBSA, em kcal/mol.	Erro! Indicador não definido.

RESUMO

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são uma família de biopolímeros naturais e biodegradáveis, com propriedades semelhantes às dos plásticos derivados do petróleo. As cianobactérias, organismos autotróficos que realizam fotossíntese, têm a capacidade de produzir PHAs a partir do carbono atmosférico, oferecendo uma alternativa sustentável para a produção desses biopolímeros. A enzima acetoacetyl-CoA redutase (PhaB) desempenha um papel crucial na biossíntese do PHB, o tipo mais comum de PHA, e pode ser uma etapa limitante para alcançar altos rendimentos de produção. No entanto, as informações sobre a caracterização funcional da PhaB em cianobactérias ainda são limitadas. Este estudo tem como objetivo avaliar, *in silico*, a estrutura e função da enzima PhaB em linhagens de cianobactérias, buscando caracterizar seu potencial para a produção de bioplásticos. Foram utilizadas ferramentas de bioinformática para realizar as etapas de prospecção, análise filogenética, modelagem estrutural, ancoragem molecular e simulações de dinâmica molecular. A prospecção de genes *phaB* em genomas de 128 linhagens cianobacterianas disponíveis em bancos de dados públicos resultou na identificação de 31 sequências. A análise filogenética mostrou a conservação do gene entre as cianobactérias, formando um clado monofilético distinto das bactérias heterotróficas. A modelagem estrutural, feita por homologia, revelou diferenças importantes em relação às bactérias heterotróficas, como a substituição da hélice $\alpha 2$ e da folha $\beta 3$ por uma região flexível em algumas cianobactérias. Para avaliar as interações proteína-ligante, foram realizados estudos de ancoragem molecular com acetoacetyl-CoA (substrato) e NADPH (cofator), seguidos por simulações de dinâmica molecular para analisar a estabilidade e a afinidade dos complexos formados. As melhores afinidades foram observadas nas PhaBs de *Microcystis aeruginosa* FD4, *Microcoleus vaginatus* PCC9802, *Planktothrix mougeotii* LEGE 06226 e *Hydrococcus rivularis* NIES-593. A análise de RMSD indicou que as cianobactérias têm dificuldade em estabilizar completamente o acetoacetyl-CoA, o que pode comprometer a atividade enzimática. Os achados deste estudo contribuem para preencher lacunas no conhecimento sobre a dinâmica estrutural da PhaB em cianobactérias, oferecendo novos insights para pesquisas futuras e possíveis aplicações industriais.

Palavras-chaves: Cianobactérias; Polihidroxialcanoato; PhaB; Modelagem Molecular, Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are a family of natural and biodegradable biopolymers with properties similar to petroleum-derived plastics. Cyanobacteria, autotrophic organisms that perform photosynthesis, have the ability to produce PHAs from atmospheric carbon, offering a sustainable alternative for biopolymer production. The enzyme acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) plays a crucial role in the biosynthesis of PHB, the most common type of PHA, and can be a limiting step in achieving high production yields. However, information on the functional characterization of PhaB in cyanobacteria is still limited. This study aims to evaluate, *in silico*, the structure and function of the PhaB enzyme in cyanobacterial strains, with the goal of characterizing its potential for bioplastic production. Bioinformatics tools were used to conduct the stages of gene prospecting, phylogenetic analysis, structural modeling, molecular docking, and molecular dynamics simulations. The prospecting of *phaB* genes in the genomes of 128 cyanobacterial strains deposited in public databases resulted in the identification of 31 sequences. Phylogenetic analysis revealed gene conservation among cyanobacteria, forming a monophyletic clade distinct from heterotrophic bacteria. Structural characterization was performed through homology modeling, revealing differences compared to heterotrophic bacteria, such as the replacement of the $\alpha 2$ helix and $\beta 3$ sheet with a flexible region in some cyanobacteria. To assess protein-ligand interactions, molecular docking studies were conducted with acetoacetyl-CoA (substrate) and NADPH (cofactor), followed by molecular dynamics simulations to analyze the stability and affinity of the complexes. The best affinities were observed in the PhaBs of *Microcystis aeruginosa* FD4, *Microcoleus vaginatus* PCC9802, *Planktothrix mougeotii* LEGE 06226, and *Hydrococcus rivularis* NIES-593. RMSD analysis indicated that cyanobacteria have difficulty fully stabilizing acetoacetyl-CoA, which may compromise enzymatic activity. The findings of this study contribute to filling knowledge gaps regarding the structural dynamics of PhaB in cyanobacteria, offering new insights for future research and potential industrial applications.

Keywords: Cyanobacteria; PolyHydroxyAlcanoate; PhaB; Molecular Dynamics Simulation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Os plásticos convencionais, derivados de petróleo, são materiais de acesso comum à sociedade, destacando-se pela versatilidade em propriedades e aplicações em diversos setores como saúde, eletrônicos, construção, embalagens, automotivos e outros (KASAR; SHARMA; AHMARUZZAMAN, 2020). Inicialmente considerado inofensivo, o plástico foi frequentemente descartado de maneira inadequada, resultando em problemas ambientais significativos devido à sua durabilidade e resistência (OECD, 2022).

Em resposta a esses desafios ambientais, os bioplásticos, que são polímeros derivados de fontes renováveis e/ou biodegradáveis, como os polihidroxialcanoatos (PHA), emergem como alternativas sustentáveis aos plásticos convencionais. Os PHAs constituem uma família de polímeros biodegradáveis de ácidos hidroxialcanóicos e são polimerizados naturalmente por bactérias e sintetizados enzimaticamente em condições de estresse, como consequência da carência ou ausência de nutrientes essenciais, como nitrogênio e fósforo, e com uma fonte abundante de carbono (YADAV *et al.*, 2021). Apresentam propriedades análogas aos plásticos derivados de petróleo, além de serem renováveis, biocompatíveis e não tóxicos (PRATT *et al.*, 2019; SHAHID *et al.*, 2021).

Entre os mais de 150 tipos monómeros de ácidos (R)-hidroxialcanóicos identificados (MUNEER *et al.*, 2020), destaca-se o polihidroxibutirato (PHB) como o polímero mais abundante e bem estudado. O PHB possui propriedades semelhantes ao polipropileno (PP) e polietileno (PE), sendo um candidato adequado à aplicação em diferentes setores da indústria, como embalagens de alimentos e agrícolas e aplicações biomédicas (YEO *et al.*, 2018).

Até o momento, a produção comercial de PHAs tem sido conduzida por bactérias heterotróficas, como *Cupriavidus* e *Escherichia coli* recombinante. Entretanto, a comercialização em larga escala de produtos plásticos à base de PHAs enfrenta desafios como o custo de fabricação e produtividade, resultando em produtos menos rentáveis quando comparados aos plásticos convencionais (GAHLAWAT, 2019). Um dos motivos apontados é o custo associado às fontes de carbono para a fermentação bacteriana, que contribui substancialmente para o aumento do custo geral, representando uma parcela de aproximadamente 40-50% do custo (GAHLAWAT, 2019; SINGH *et al.*, 2017).

Portanto, para viabilizar a comercialização dos PHAs, algumas opções estão sendo exploradas. Uma abordagem promissora envolve a exploração de cianobactérias, organismos que, na presença de luz solar, conseguem fazer a fixação de CO₂ para produção de energia, ou seja, são capazes de sintetizar PHB por meio da fotossíntese e com o potencial de reduzir a utilização de substratos (AFREEN *et al.*, 2021a). Assim, a exploração de organismos cianobacterianos começa a ganhar relevância nas pesquisas, pois demonstram um potencial modelo econômico de produção de PHAs.

As cianobactérias são um grupo diversificado de procariotos fotossintetizantes, possuem uma alta plasticidade ecológica, e sua diversidade genética e adaptabilidade permitiram que eles ocupem um gama de nichos ecológicos (DVOŘÁK *et al.*, 2017). As cianobactérias acumulam de forma natural apenas polihidroxialcanoatos de cadeia curta (SCL-PHAs), entre eles o PHB é o único produzido sob condições fotoautotróficas (OBRUCA *et al.*, 2020).

Em comparação com bactérias heterotróficas, o acúmulo de PHA por cianobactérias têm um rendimento menor, principalmente em condições fotoautotróficas (YASHAVANTH; MEENAKSHI; SOUMEN K., 2021). Por essa razão, a produção de PHA por cianobactérias ainda está em estágio acadêmico. Estudos são realizados tanto com cianobactérias geneticamente modificadas quanto com cepas selvagens. As pesquisas focam principalmente nas condições de cultivo, bem como nos aspectos genéticos, enzimáticos e metabólicos (KOLLER, 2020).

As bactérias heterotróficas e cianobactérias contém a mesma via metabólica para o acúmulo de PHA (TROSCHL; MEIXNER; DROSG, 2017). A via de síntese do PHB envolve três etapas enzimáticas fundamentais. Primeiro, a acetil-CoA acetiltransferase (PhaA) (EC 2.3.1.9) catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. Em seguida, a acetoacetil-CoA redutase (PhaB) (EC 1.1.1.36) reduz o acetoacetil-CoA para formar (R)-3-hidroxiacetil-CoA. Por fim, a polihidroxialcanoato sintase (PhaC) (EC 2.3.1.-) polimeriza o (R)-3-hidroxiacetil-CoA, resultando na formação de PHB (TAN *et al.*, 2020).

Embora tenham sido conduzidos vários estudos sobre a produção de PHB em cianobactérias, informações estruturais das enzimas permanecem limitadas. A compreensão desses aspectos pode ser crucial para elucidar a diferença entre as enzimas PhaB de cianobactérias e de bactérias heterotróficas, fatores que podem estar associados à produção do PHB. Dentro da via biosintética, a enzima PhaB destaca-se em alguns

estudos que indicam que a otimização da sua atividade pode aumentar a produção de PHB (JIN; NIKOLAU, 2014; LIN et al., 2017; MATSUMOTO et al., 2013; SINGH; DAS; GROVER, 2020; YOKOO et al., 2015). Portanto, esta enzima desempenha um papel fundamental na via biossintética do PHB. Neste contexto, o presente estudo propõe analisar a estrutura tridimensional e a diversidade da enzima PhaB de diferentes espécies de cianobactérias, visando preencher lacunas do conhecimento estrutural e proporcionar *insights* para otimizar a produção de PHB em cianobactérias.

1.2. Cianobactérias

As cianobactérias representam um filo de microrganismos procariotos, gram-negativos e fotossintetizantes, pertencentes ao domínio Bactéria, considerado um dos mais primitivos da terra. Estima-se que esses organismos surgiram há aproximadamente 3,5 bilhões de anos (ANDREEVA; MELNIKOV; SNARSKAYA, 2020). O termo “ciano” se dá pela coloração característica verde azulada das cianobactérias, que é derivada do pigmento fotossintético ficocianina, presente na maioria delas (SANDYBAYEVA et al., 2022).

Como procariontes, as cianobactérias possuem organização celular simples, sem carioteca e outras organelas celulares. Como as plantas, conseguem converter energia luminosa em energia química, porém, carecem de cloroplasto. A Clorofila-A e outros pigmentos para a fotossíntese estão contidos em tilacoides simples, com exceção da *Gloeobacter* spp. que não possui tilacoide (CHORUS; WELKER, 2021). Para a proteção celular de mudanças ambientais hostis, a parede celular das cianobactérias é constituída por uma estrutura complexa de multicamadas de peptidoglicano e uma membrana externa lipopolissacarídica, sendo que algumas cianobactérias secretam uma matriz mucosa (mucilagem) para unir as células com organização colonial ou filamentosa (MEHDIZADEH ALLAF; PEERHOSSAINI, 2022).

Esses microrganismos influenciam ativamente os ecossistemas e ciclos biogeoquímicos, são procariotos produtores primários de oxigênio atmosférico, fixadores de nitrogênio atmosférico e produtores de matéria orgânica nos ecossistemas. Há hipóteses de que as cianobactérias foram fundamentais para a história evolutiva da terra e formas de vida fotoautotróficas mais complexas. Supõe-se que são os primeiros organismos a desenvolverem capacidade fotossintética, que modificou significativamente a oxigenação da atmosfera primitiva durante o “Grande Evento de Oxidação”

(SHESTAKOV; KARBYSHEVA, 2017). A evolução dos plastídeos da célula eucariótica de algas e plantas ocorreu pela endossimbiose de cianobactérias em eucariotos primitivos, trazendo a capacidade de fotossíntese para os eucariotos (MCFADDEN, 2014).

Devido à sua natureza ser basicamente fotossintética aeróbica, o metabolismo das cianobactérias requer basicamente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para sobrevivência (VEAUDOR *et al.*, 2020). Esses microrganismos possuem uma alta plasticidade ecológica e sua diversidade genética e adaptabilidade permitiram que ocupassem uma gama de nichos ecológicos, podendo assim, serem encontrados em águas doces, salgadas, ecossistemas terrestres e habitats extremos que vão de crostas desérticas a regiões polares. Além disso, também podem ser encontrados em relações simbióticas e endofíticas com plantas, fungos e algas eucarióticas (DVOŘÁK *et al.*, 2017).

As características morfológicas das cianobactérias são bem diversas em relação a outros procariotos, podendo ser unicelulares, coloniais ou filamentosas, com suas células podendo ter formas esféricas, cilíndricas, cônicas, discídes, dentre outras (Figura 1). Alguns táxons possuem células especializadas, como heterocistos, que permitem a fixação do nitrogênio atmosférico, e acinetos, que atuam como estruturas de resistência, formadas quando as condições ambientais são desfavoráveis, o que permitem a sobrevivência dos microrganismos em períodos de estresse. A reprodução das cianobactérias é assexuada, ocorrendo por meio da divisão das células vegetativas (CHORUS; WELKER, 2021; HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2021).

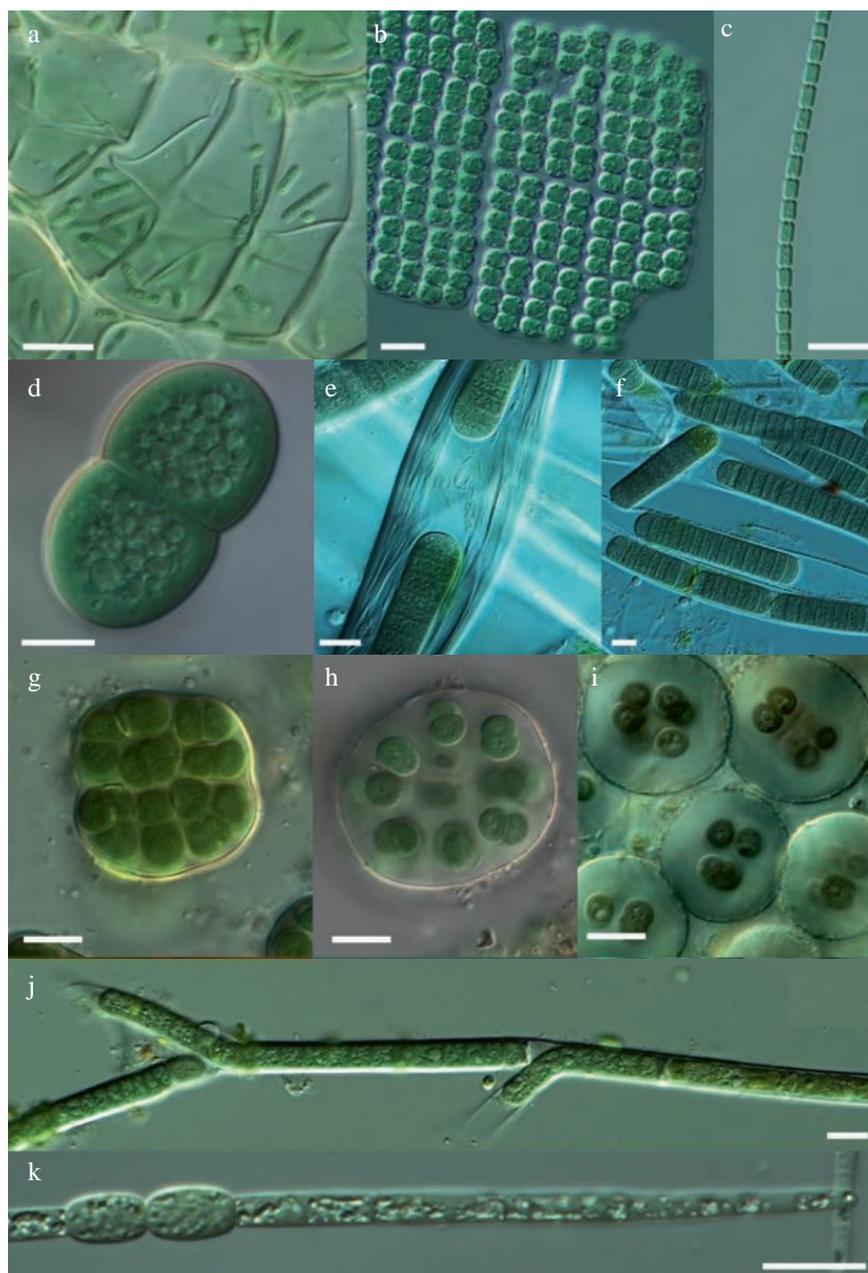


Figura 1 - Diversidade morfológica das cianobactérias. (a) *Neosynechococcus sphagnicola*, (b) *Merismopedia glauca*, (c) *Pseudanabaena galeata*, (d) *Cyanothece aeruginosa*, (e, f) *Blennothrix* sp., (g) *Asterocapsa divina*, (h) *Asterocapsa* sp., (i) *Asterocapsa* sp. (j) *Tolypothrix* sp., (k) *Cuspidothrix issatschenkoi*. Barra de escala 10 μm . Fonte: (DVOŘÁK et al., 2017).

A classificação taxonômica das cianobactérias é complexa, especialmente nos conflitos de nomenclaturas e metodologia de classificação. As cianobactérias foram inicialmente consideradas algas e muitos gêneros foram descritos seguindo o código Botânico. Contudo, depois da determinação de sua natureza procariótica, não houve uma transição completa para o código bacteriológico e as cianobactérias são tratadas por

ambos os códigos. Já foram propostos vários sistemas de classificação de acordo com a morfologia e dados moleculares (CHORUS; WELKER, 2021).

O atual sistema foi elaborado por Komárék e colaboradores em 2014, que adotou uma abordagem polifásica, associando dados moleculares, com microscopia eletrônica e análise bioquímica, a classificação baseou-se na nomenclatura botânica. O filo Cyanobacteria foi dividido em 8 ordens: *Gloeobacterales*, *Synechococcales*, *Spirulinales*, *Pleurocapsales*, *Chroococciopsidales*, *Chroococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*. As ordens e famílias foram baseadas em análise filogenética e morfologia ultraestrutural dos tilacoides e tipos de divisão celular (KOMÁREK *et al.*, 2014).

1.2.1. Potencial biotecnológico

A biotecnologia é o segmento que explora a diversidade biológica e a engenharia genética para a geração e o aprimoramento de processos e produtos de interesse comercial. Diversos organismos procarióticos e eucarióticos são manipulados para o uso em diferentes áreas industriais (UMESHA; K. SINGH; P. SINGH, 2018). Nesse ramo da pesquisa, as cianobactérias têm obtido grande visibilidade por serem organismos com capacidade fotossintética, procariotos (facilidade de manipulação genética), com adaptabilidade a diferentes condições ambientais e necessidades metabólicas mais simples, que os tornam candidatos promissores para muitos processos industriais (BOURGADE; STENSJÖ, 2022; ŚLIŻEWSKA; ŻYMAŃCZYK-DUDA, 2021).

Além disso, as cianobactérias são fontes de grande quantidade de metabólitos primários e secundários, com muitos desses compostos sendo de alto valor comercial, aplicados em campos como a agricultura, farmacologia, cosmetologia, indústria alimentícia, biocombustível, dentre outros setores (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Os metabólitos produzidos por cianobactérias são bastante diversos, compostos principalmente por peptídeos, lipopeptídeos, macrolídeos, terpenos, policetídeos, alcaloides, lipídeos, polissacarídeos, dentre outros, formando mais de 260 famílias de metabólitos identificados até o momento (DEMAY *et al.*, 2019).

As cianobactérias também são interessantes para a indústria farmacêutica, podendo ser uma fonte em potencial de compostos com funções antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, antiprotozoárias, anticâncer, para proteção de radiação solar, dentre outros (KUMAR *et al.*, 2019).

Na indústria alimentícia, as cianobactérias têm sido indispensáveis na área dos nutracêuticos, compostos naturais bioativos com função nutricional e propriedades promotoras à saúde (SACHDEVA; ROY; BHARADVAJA, 2020), pois possuem grande valor nutricional, sendo ricos em carboidratos, proteínas, vitaminas (principalmente B e E), minerais, ácidos graxos poliinsaturados, ômega-3 e ômega-6 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Metabólitos como pigmentos (clorofila, ficobiliproteína e carotenóides) são usados nesse setor para a fabricação de corantes naturais e exopolissacarídeos (EPSs) são usados como emulsificantes, gelificantes e hidratantes de alimentos (SAEED *et al.*, 2022).

Esses microrganismos são eficazes biorremediadores, pois são capazes de remover nutrientes e materiais pesados com sistema catabólico, fixação e renovação do carbono e adaptabilidade aos fluxos ambientais, podendo ser aplicados no tratamento de águas residuais, remoção de pesticidas e sequestro de CO₂, juntamente com a coprodução de subprodutos, (como biocombustíveis) tornando esse processo economicamente viável e sustentável (DEVIRAM *et al.*, 2020).

Na indústria de biocombustíveis e bioplásticos, a produção é obtida principalmente por plantas terrestres e bactérias heterotróficas. Os fatores limitantes do uso das plantas são a alta competição por terras para plantações com a finalidade de consumo humano, assim como para as bactérias são as altas exigências por substrato. As cianobactérias são alternativas viáveis, com a sua biomassa podendo ser transformada em fontes de energia, fornecendo matéria-prima para a fabricação de biocombustíveis como bio-hidrogênio, biodiesel, bioetanol e outros (KUMAR *et al.*, 2019). Na fabricação de bioplástico, as cianobactérias produzem principalmente PHA, que possui propriedades comparáveis ao plástico sintético. Entretanto, a obtenção desses insumos pelas cianobactérias ainda está em processo de otimização da produção para que se torne competitivo ao mercado mundial (AGARWAL *et al.*, 2022).

Conforme demonstrado, as cianobactérias são fontes abundantes de moléculas bioativas com diversas aplicações biotecnológicas. E com o avanço da tecnologia NGS, foi possibilitado o sequenciamento genômico de novas espécies, muitas das quais, até então, não eram cultiváveis, contribuindo para a formação de grandes bancos de dados disponíveis gratuitamente ao público (VUONG *et al.*, 2022). Essa tecnologia facilita o processo de prospecção de moléculas bioativas, uma vez que a obtenção dos genomas pode guiar a seleção de espécies ou cepas mais adequadas para o propósito do estudo

(HAGEMANN; HESS, 2018). Além de alcançar uma maior variabilidade genética, a engenharia genética é aplicada para modificação e aprimoramento do rendimento metabólico desses microrganismos (GOVINDASAMY *et al.*, 2022).

1.3. Polihidroxicanoatos (PHA)

Os plásticos convencionais derivados de petróleo são materiais de acesso comum à sociedade, constituídos por um material versátil, com uma variedade de propriedades, composições químicas e aplicações, sendo utilizados em diversos setores industriais, como a saúde, eletrônicos, construção, embalagens, automotivos e outros (KASAR; SHARMA; AHMARUZZAMAN, 2020). Inicialmente, o plástico foi considerado inofensivo e por muitos anos foi descartado de maneira inadequada, levando a diversos problemas ambientais, afetando água potável, oceanos, solo, organismos vivos e atmosfera (aproximadamente 400 milhões de toneladas de CO₂). É suposto que a produção de plástico dobre em 20 anos, o que ultrapassara a capacidade atual de gestão e reciclagem de resíduos (NIELSEN *et al.*, 2020). Portanto, há uma urgência em soluções mais sustentáveis, como o aumento na produção de bioplásticos.

Quimicamente, os plásticos são formados basicamente por polímeros de alto peso molecular, grandes moléculas formadas pela repetição de monômeros (unidade biológica). Dependendo do tipo de plástico, podem apresentar composições heterogêneas e complexas. O comprimento da cadeia pode variar, em polímeros comerciais são compostos por 1.000 a 10.000 unidades monoméricas (EDMONDSON; GILBERT, 2017).

Os PHAs são alternativas potenciais aos plásticos derivados de petróleo por possuírem características de grande interesse industrial: são biodegradáveis, renováveis, biocompatíveis, não tóxicos e de base biológica (SHAHID *et al.*, 2021). Essas biomoléculas constituem uma classe de poliésteres capazes de produzirem um bioplástico com propriedades físico-químicas similares à dos plásticos de origem petroquímica, como o polipropileno (PP) e polietileno de baixa densidade (PEBD) (KOURMENTZA *et al.*, 2017).

Os PHAs são polimerizados naturalmente por uma variedade de bactérias, são sintetizados enzimaticamente em condições de estresse em consequência da carência ou ausência de nutriente essenciais. São aglomerados como reserva de carbono e energia e

quando é restabelecido equilíbrio nutricional o PHA é metabolizado para o crescimento celular (YADAV *et al.*, 2021).

Os PHAs são intracelulares e ficam aglomerados como grânulos, variando de 1 a 90% do peso seco celular (YADAV *et al.*, 2021). Os grânulos de PHA variam entre 0,2 - 0,5 μm e estão envoltos por uma camada de fosfolípido, com a presença de proteínas estruturais, como as fascinas, que podem atuar como reguladores transcricionais, e enzimas, como a enzima de polimerização e a enzima de despolimerização do PHA. Ilustrações dos grânulos e da enzima são mostrados nas Figuras 2A e 2B, respectivamente.

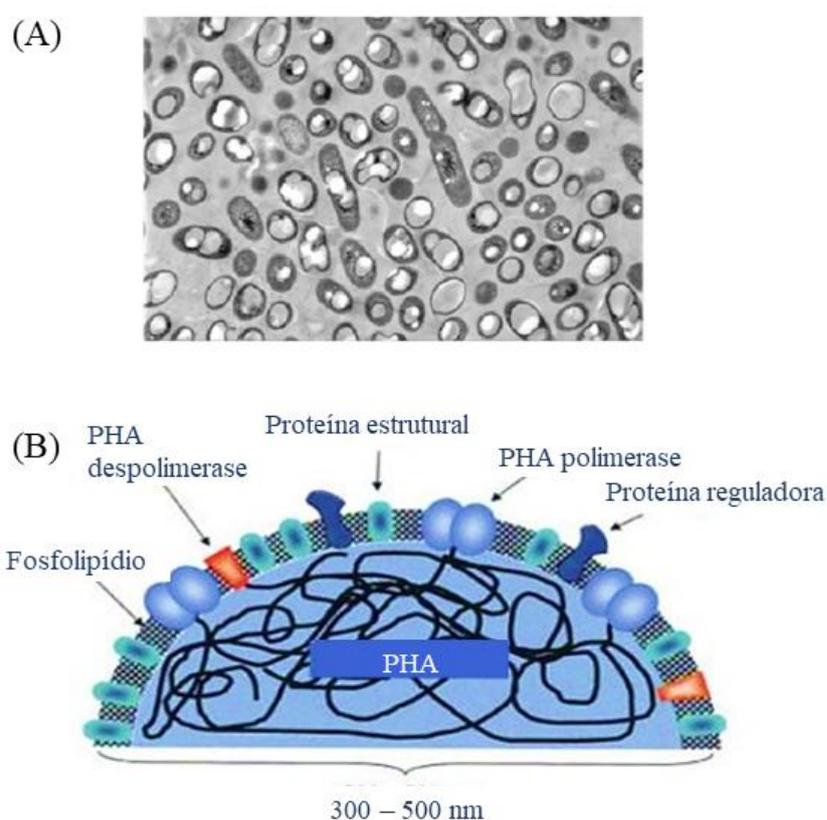


Figura 2 – Morfologia dos grânulos de PHA. (A) Microscopia de bactérias acumulando PHA (B) Esquema de um grânulo de PHA. Fonte: SHAHID *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2021.

Já foram identificados mais de 150 tipos de PHA, que diferem em estruturas lineares, ramificadas, aromáticas, saturadas e insaturadas, dependendo do tipo de substrato e microrganismos utilizados. Pela grande diversidade de monômeros de PHAs, há uma variação considerável nas propriedades físico-químicas, então hidrofobicidade, ponto de fusão e propriedades mecânicas é resultado da composição do monômero

(ANJUM *et al.*, 2016). A unidade monomérica básica do PHA é um poliéster linear constituído de ácido graxo (R)-hidroxi, o grupo R de cadeia lateral consiste em tipo um grupo alquil (alcano sem um hidrogênio) e os monômeros são conectados entre si por ligações ésteres (SHARMA; SEHGAL; GUPTA, 2021). A conformação do PHA se encontra ilustrada na Figura 3.

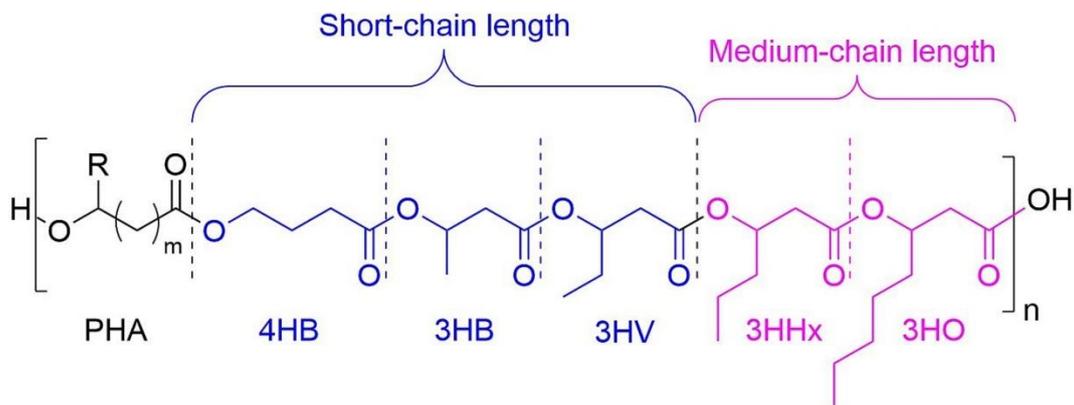


Figura 3 - Estrutura química básica do PHA em preto. Monômeros de PHA de comprimentos de cadeia curta em azul e monômeros de comprimentos de cadeia média em rosa. Fonte: ŽUR-PIŃSKA *et al.*, 2023.

Os PHAs podem ser classificados pelo comprimento das cadeias poliméricas, os quais são nomeados em PHA de cadeia curta (SCL-PHA), PHA de cadeia média (MCL-PHA) e PHA de cadeia longa (LCL-PHA) (LI *et al.*, 2021). Os SCL-PHAs são formados por monômeros de 3 - 5 átomos de carbono, apresentam propriedades termoplásticas, com alto grau de cristalinidade, rígidos e quebradiços, com um exemplo dessa classe sendo o PHB. Os MCL-PHAs são constituídos por monômeros com 6 - 14 átomos de carbono, são polímeros elastoméricos com baixa cristalinidade e baixa temperatura de fusão, o poli-3-hidroxiocetanoato (PHO) faz parte dessa classe. Por último, os LCL-PHAs possuem monômeros com mais de 15 átomos. Ainda há poucos estudos que relatam as características físico-químicas dos monômeros de LCL-PHA e suas aplicações, como exemplo dessa classe é possível citar o poli-3-hidroxipentadecanoato (ANJUM *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2021; SHARMA; SEHGAL; GUPTA, 2021).

Além da estrutura do monômero, o arranjo da cadeia do PHA pode ser classificado em homopolímero, constituído apenas por um tipo de monômero como PHB, o copolímero, formado por dois monômeros diferentes, como o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), e o terpolímero formado por três monômeros diferentes, como poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato-co-3-hidroxihexanoato) (ANJUM *et al.*, 2016; MENG; CHEN, 2018). As bactérias podem produzir copolímeros e

terpolímeros e variar a composição dos monômeros, a depender dos tipos de substratos de carbono utilizados e da variação na disponibilidade desses substratos (LAKSHMANAN *et al.*, 2019; PERNICOVA *et al.*, 2020).

Além das misturas entre os monômeros de PHAs, também é possível produzir misturas entre PHAs e outros tipos de biopolímeros ou outros constituintes de natureza diferente, como amido, lignina, celulose, PLA, poli(ϵ -caprolactona), poli(álcool vinílico) dentre outros. Técnicas como essas podem auxiliar na redução de custos e no aumento da produção, porém isto pode limitar a biodegradabilidade (KUMAR; SEHGAL; GUPTA, 2021; LAOUTID *et al.*, 2022).

Portanto, embora o PHA possua diversas vantagens, algumas limitações de propriedade dificultam seu uso. As misturas entre PHAs e entre PHAs e outros polímeros podem melhorar as propriedades plásticas, considerando que a porcentagem molar dos monômeros é importante para a caracterização de propriedades como flexibilidade, cristalinidade, resistência, dentre outros. Esses processos podem facilitar a obtenção de propriedades necessárias para as aplicações específicas (KUMAR; SEHGAL; GUPTA, 2021; PERNICOVA *et al.*, 2020). Dos polímeros de PHA, o PHB é o mais estudado e mais comum de ser produzido. Outros polímeros que também apresentaram importância foram o poli(4-hidroxi butirato) (P4HB), poli(3-hidroxi valerato) (PHV), poli(3-hidroxi hexanoato) (PHH), poli(3-hidroxi octanoato) (PHO) e seus copolímeros (FERNANDES *et al.*, 2020).

1.3.1. Biossíntese do PHA

Os microrganismos são capazes de metabolizar diversas substâncias que podem ser utilizadas como substrato para a biossíntese do PHA, tais como subprodutos agroindustriais (soro do leite, borra de café, cascas de ervilha, de arroz, de cebola), resíduos oleosos (resíduos de óleo de peixe, de fritura, de girassol), resíduos de processamento de alimentos (hidrolisado de penas de frango, bagaço da cana de açúcar), resíduos municipais, como o lixo orgânico e lodo de esgoto, dentre outros (BHATIA *et al.*, 2021). Os substratos variam nas possíveis fontes de açúcar ou ácidos graxos, que serão metabolizados por diferentes vias metabólicas, gerando monômeros de PHA (AFREEN *et al.*, 2021a). Os genes envolvidos na biossíntese do PHA são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais genes envolvidos na síntese de PHA.

Gene	Proteína	Função	Atividade	Referências
<i>phaM</i>	PhaM	Regulação	Ativador da atividade catalítica da PhaC1	(MITRA <i>et al.</i> , 2022)
<i>phaR</i>	PhaR	Regulação	Codifica a proteína repressora de ligação ao DNA, reativo a PHA	(MITRA <i>et al.</i> , 2022)
<i>phaP</i>	PhaP	Estrutural	Proteína fascina presente na membrana do PHA	LEE, 2023
<i>phaA</i>	Acetil-CoA acetiltransferase (PhaA)	Enzimático	Catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA	(HONG <i>et al.</i> , 2020)
<i>phaB</i>	Acetoacetil-CoA redutase (PhaB)	Enzimático	Catalisa redução dependente de acetoacetil-CoA para produzir D-(β)-3-hidroxiacil-CoA	(LIU <i>et al.</i> , 2015)
<i>phaJ</i>	Enoil-CoA hidratase (PhaJ)	Enzimático	Converte intermediários de enoil-CoA em antecessores de (R)-3-hidroxiacil-CoA. Formação de MCL-PHA	(VICENTE; PROENÇA; MORAIS, 2023)
<i>phaG</i>	3-hidroxiacil-CoA transferase (PhaG)	Enzimático	Catalisa a transferência do grupo funcional do (R)-3-hidroxiacil-ACP ao (R)-3-hidroxiacil-CoA. Formação de MCL-PHA	(ZHUO; CHOU; LI, 2022)
<i>phaC</i>	Polihidroxiacanoato sintase (PhaC)	Enzimático	Polimerização da unidade de polihidroxiacanoato	(CHEK <i>et al.</i> , 2017)
<i>phaZ</i>	PHA despolimerase (PhaZ)	Enzimático	Promove a degradação do PHA	(VICENTE; PROENÇA; MORAIS, 2023)

Já foram relatadas 14 diferentes vias de formação do PHA (MENG *et al.*, 2014), que geram diferentes tipos de PHAs, a maioria dos estudos são com base em 3 principais vias. A via I representa a via central da biossíntese, e é responsável principalmente pela polimerização PHB. Essa via é composta por 3 etapas enzimáticas fundamentais mediadas pela acetil-CoA acetiltransferase (PhaA) (EC 2.3.1.9), acetoacetil-CoA

redutase (PhaB) (EC 1.1.1.36) e polihidroxicanoato sintase (PhaC) (EC 2.3.1.-). Nesse processo, o açúcar é utilizado como substrato para a formação do acetil-CoA (TAN *et al.*, 2020). Essa via metabólica tem sido amplamente pesquisada para a produção de bioplástico e a Figura 4 exemplifica as etapas envolvidas nessa via. As outras vias irão atuar na formação de outros tipos de monômeros SCL-PHA e MCL-PHA.

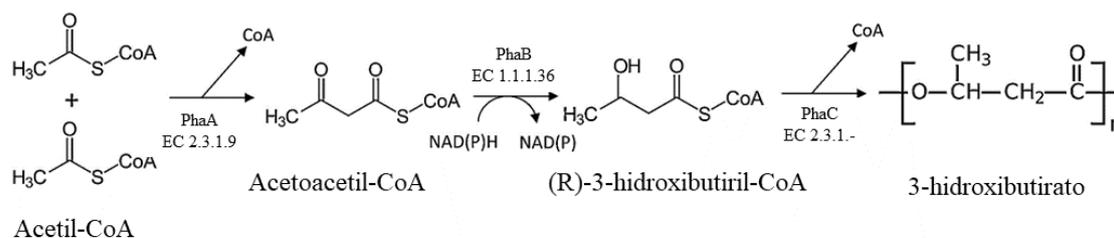


Figura 4 - Etapas da via metabólica do PHB Fonte: OLAVARRIA *et al.*, 2021.

1.3.2. Acetoacetil-CoA redutase (PhaB)

A PhaB é uma redutase da classe das oxidoredutases, pertencente à superfamília das desidrogenases/redutases de cadeia curta (SDR), que é dependente de NADPH. Esta superfamília é funcionalmente diversa e caracteriza-se por possuir um único domínio contendo a dobra de Rossmann, uma estrutura comum em proteínas que se ligam a nucleotídeos como o NAD(P)(H). A dobra de Rossmann é estruturalmente conservada e consiste em um padrão de dobramento alfa/beta, com uma folha beta central, responsável pela ligação ao cofator NAD(P)(H), e uma região C-terminal que apresenta variação estrutural (GABRIELLI; ANTINUCCI; TOFANELLI, 2022).

A SRD é uma superfamília heterogênea, cuja classificação é problemática devido ao baixo percentual de identidade. As regiões características dessa família são o *motif* rico em glicina, identificado como TGxxxGxG, localizado no N-terminal, essa região contribui para a ligação da região nicotinamida do NAD(P)(H), e também o *motif* catalítico YXXXXK que faz parte da tríade catalítica Ser-Tyr-Lys (GRÄFF *et al.*, 2019).

A PhaB desempenha a segunda etapa da biossíntese do PHB, na qual ela catalisa a redução do grupo 3-cetona do acetoacetil-CoA para produzir a (R)-3-hidroxiacetil-CoA, como é demonstrado na reação da Figura 4 (MATSUMOTO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2021).

A estrutura da enzima é constituída por sete folhas β e oito hélices α formando a dobra de Rossmann. As hélices α_4 e α_6 se estendem a partir da dobra de Rossmann, criando uma fenda profunda junto com o segmento formado pela hélice α_7 , o loop α_7 - α_8 e a hélice α_8 . Esta região acopla o substrato acetoacetil-CoA. Devido ao formato geral dos segmentos salientes, que se assemelha a uma pinça, este arranjo é denominado domínio *Clamp*. O domínio *Clamp* é subdividido em duas partes: o *Clamp-lid* e o *Clamp-base* (LIU *et al.*, 2015; MATSUMOTO *et al.*, 2013), a estrutura da proteína esta apresentada na figura 5.

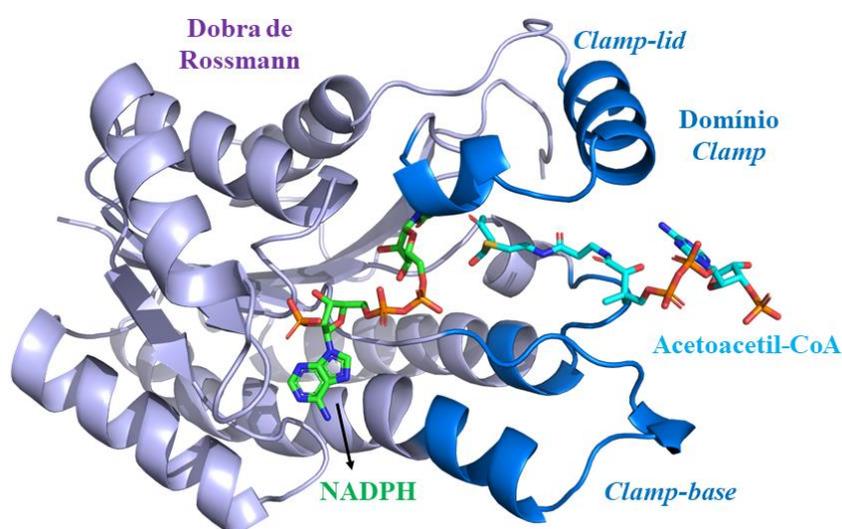


Figura 5 - Exemplo de estrutura tridimensional da enzima PhaB. Fonte adaptado: KIM *et al.*, 2014

O domínio *Clamp-lid* sofre alterações estruturais significativas ao interagir com o substrato, formando uma cavidade que acomoda o substrato. Essa cavidade facilita a interação com o substrato e posiciona o acetoacetil próximo ao anel de nicotinamida do cofator NADPH, permitindo a ocorrência da reação catalítica. Quando ocorre a ancoragem da acetoacetil-CoA, a região *Clamp-lid* passa por mudanças estruturais direcionadas ao acetoacetil-CoA, impedindo a saída do ligante e garantindo a eficiência da catalisação (KIM *et al.*, 2014).

Com o objetivo de melhorar a produtividade de PHB, alguns estudos buscaram aprimorar a atividade da PhaB, por meio métodos como a superexpressão do gene, mutação de sítio catalítico e otimização de códon que mostram resultados positivos na

produção de PhaB (JIN; NIKOLAU, 2014; LIN et al., 2017; MATSUMOTO et al., 2013; SINGH; DAS; GROVER, 2020; YOKOO et al., 2015).

1.4. Aplicações do PHA

Como discutido anteriormente, os PHAs são bioplásticos com propriedades que variam de acordo com a seleção de bactérias e substrato, o que as concede o potencial para produzir um material semelhante a plásticos consumidos no mercado global atual, como o polipropileno (PP), polietileno (PE) e poliestireno (PS) (NASER; DEIAB; DARRAS, 2021). Com essas propriedades mutáveis devido às variedades monoméricas, o PHA aumenta o interesse de vários setores industriais, principalmente em aplicações médicas, industriais e agrícolas.

Em aplicações médicas, as propriedades como biodegradação, biocompatibilidade e baixa toxicidade são muito desejadas na fabricação de produtos e na engenharia de tecidos, com muitos estudos que utilizam o PHA para fabricar enxertos e implantes para regeneração e reparação de tecidos (GUO *et al.*, 2022), fabricação de curativos integrados a fármacos, aplicado em infecções bacterianas e feridas diabéticas (AUGUSTINE *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2023), produção de nanopartículas transportadoras de drogas e também é muito estudado em terapias antibacterianas e anticâncer (BABOS *et al.*, 2020; SALAHUDDIN *et al.*, 2020; SHAH *et al.*, 2014), entre outros produtos biomédicos.

No setor industrial, a utilização de PHA na fabricação de embalagens tem sido amplamente estudada, uma vez que demanda aprimoramento das propriedades mecânicas, térmicas e de barreiras (MANIKANDAN; PAKSHIRAJAN; PUGAZHENTHI, 2020; SILVA et al., 2023). Há outras aplicações como produtos de higiene descartável, roupas descartáveis, sacolas, peças de aparelhos eletrônicos e automóveis (ACHARJEE *et al.*, 2022).

Há muitas aplicações do PHA para o setor agrícola e por apresentar características como biocompatibilidade, o PHA melhora a qualidade de vida e propriedades nutricionais das plantas em ambientes estressantes (SHARMA; SEHGAL; GUPTA, 2021). Uma das aplicações é na formulação de pesticidas com liberação controlada, que traz a degradação no solo com maior segurança ambiental (KISELEV *et al.*, 2022; VOLOVA *et al.*, 2022). Outras aplicações são filmes de cobertura que evitam a contaminação da estrutura do solo,

redes agrícolas para proteção das plantas e sacos de cultivos agrícolas (PANDEY *et al.*, 2022).

Os PHAs já são produzidos comercialmente para alguns desses fins, já sendo bastante utilizados em regiões como a Europa, América do Norte e Ásia-Pacífico (CARPINE *et al.*, 2020). A Tabela 2 apresenta algumas indústrias que comercializam produtos derivados de PHA atualmente.

Tabela 2 - Produção em escala comercial de companhias mundiais ativas. Fonte: AGARWAL et al. (2022), GAHLAWAT (2019).

Empresa/ País	Tipo de PHA	Escala de produção (Toneladas/ano)
Danimer Scientific, EUA	Vários tipos de PHA	272.000
Telles, EUA	PHB	50.000
Kaneka Co., Japão	P(3HB-co3HHx)	50.000
Tianan Biologic, China	PHBV	50.000
Bio-On, Itália	PHA (não relatado)	10.000
PHB Industrial, Brasil	PHB	10.000

Embora seja uma área em expansão e com muito interesse comercial, algumas indústrias encerraram a produção de PHA (GAHLAWAT, 2019), devido a limitações na produção e comercialização extensiva, em conjunto como alto custo de produção, que é de três a quatro vezes maior quando comparado ao custo dos plásticos convencionais (SINGH *et al.*, 2019a). Por isso, o plástico derivado do PHA ainda tem uma participação muito pequena no mercado global de plásticos, representando cerca de 1% da produção total de bioplásticos comercializados mundialmente. (NASER; DEIAB; DARRAS, 2021).

Os principais fatores que estão associados ao custo de produção do PHA são: substrato, energia, água, maquinário e complexidade do processamento. Entre esses fatores, o substrato do carbono atinge aproximadamente 40 - 50% do custo de produção (GAHLAWAT, 2019). Para que a comercialização do PHA em grande escala seja mais acessível economicamente, as pesquisas científicas buscam formas de reduzir os custos em vários âmbitos do processo, tais como a utilização de substratos de carbono mais baratos ou biorresíduos (LOAN et al., 2022; ODENIYI; ADEOLA, 2017), a otimização

das vias metabólicas (ZHANG *et al.*, 2020), estratégias de cultivos mais econômicas e produtivas, dentre outras (FOONG; HIGUCHI-TAKEUCHI; NUMATA, 2019; SARATALE *et al.*, 2022).

1.5. Potencial da produção de PHA em cianobactérias

Nesse contexto, as cianobactérias são uma abordagem atrativa para a produção de PHA. Esses organismos, na presença de luz solar, conseguem fixar CO₂ para produzir energia. Isso reduz a necessidade de substratos e ainda sequestra gás carbônico da atmosfera, contribuindo para mitigar os efeitos ambientais do CO₂. Além disso, esse processo não compete com o mercado agrícola (SINGH; MALLICK, 2017). Por essas razões, a exploração de cianobactérias vem ganhando relevância nas pesquisas, mostrando um potencial modelo econômico para a produção de PHAs.

Essas características dão uma maior vantagem ao uso de cianobactérias em relação a outros métodos de produção, como as bactérias heterotróficas e plantas. As bactérias heterotróficas dependem de fontes de carbono orgânicas, que é responsável por uma grande parcela do custo de produção desses bioplásticos (LOPEZ-ARENAS *et al.*, 2017). A produção de PHAs em organismos vegetais é possível por uma abordagem transgênica. No entanto, apresenta obstáculos como a competição de terras agrícolas, níveis baixos de expressão gênica, presença de outros componentes celulares no isolamento do PHA e longos períodos de crescimento, além da dificuldade de controlar a disseminação de plantas transgênicas (CARPINE *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2017).

Com a presença da mesma via metabólica das bactérias heterotróficas, as cianobactérias acumulam PHAs de forma semelhante, em condições ambientais desfavoráveis, com limitação de nutrientes, sendo a limitação de nitrogênio um dos fatores mais bem estudados na produção de PHAs em cianobactérias (TROSCHL; MEIXNER; DROSG, 2017). As cianobactérias acumulam de forma natural apenas SCL-PHAs e entre eles o PHB é o único produzido sob condições fotoautotróficas (OBRUCA *et al.*, 2020). Alguns fatores influenciam na produção de PHA em cianobactérias, tais como a disponibilidade de nutrientes e os parâmetros ambientais (ciclo claro/escuro, fluxo de CO₂, pH, temperatura), além da duração da fase estacionária (AFREEN *et al.*, 2021b).

As cianobactérias conseguem obter energia e crescimento celular de três formas diferentes: (i) fotoautotróficos, que na presença de luz solar, convertem o CO₂ em reservas orgânicas e energia; (ii) heterotróficos, que conseguem carbono e energia através de

fontes orgânicas; (iii) mixotróficos, com as cianobactérias tendo acesso ao carbono orgânico e inorgânico (na presença da luz) (SINGH *et al.*, 2017). Em 1966, houve o primeiro relato de acúmulo de PHA em cianobactérias via produção heterotrófica, isolado da espécie *Chlorogloea fritschii* suplementada por acetato (CARR, 1966). Alguns anos depois, em 1971, foi isolado PHA da cianobactéria *Gloeocapsa* cepa 6501 em condições fotoautotróficas (RIPPKA *et al.*, 1971). Posteriormente, vários estudos documentaram o acúmulo de PHA em condições mixotróficas (JAU *et al.*, 2005; MENDHULKAR; SHETYE, 2017; PHALANISONG; PLANGKLANG; REUNGSANG, 2021).

Até o presente momento, as principais culturas de microrganismos para a fabricação comercial de PHA são: *Cupriavidus necator*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Rhizobium*. Uma das bactérias mais estudadas e utilizadas, *Cupriavidus necator*, pode produzir até 80% do peso seco celular sob condições ideais de produção (CARPINE *et al.*, 2020). Em comparação com bactérias heterotróficas, o acúmulo de PHA por cianobactérias tem um rendimento menor, principalmente em condições fotoautotróficas (YASHAVANTH; MEENAKSHI; SOUMEN K., 2021). Por esse motivo, a produção de PHA por cianobactérias ainda se encontra em fase de pesquisa acadêmica. As pesquisas atuais se concentram principalmente nas condições de cultivo, aspectos genéticos, enzimáticos e metabólicos, engenharia de processos e fotobiorreatores, com o objetivo de alcançar alto rendimento e viabilidade econômica (KOLLER, 2020). A Tabela 3 mostra o rendimento de produção de algumas cianobactérias de acordo com o tipo de cultivo.

Tabela 3 - Produção de PHA por cianobactérias em diferentes tipos de cultivo.

Cianobactéria	Condições de cultura	Acúmulo de PHA (CDW*)	Composição do PHA	Referência
<i>Scytonema geitleri</i> Bharawaja	Heterotrófico: suplementação de acetato	7%	PHB	(SINGH <i>et al.</i> , 2019b)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Heterotrófico: suplementação de acetato e privação de N e P	36,10%	PHB	(UTHARN <i>et al.</i> , 2021)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Fotoautotrófico: com limitação de N e P	63%	PHB	(KOCH <i>et al.</i> , 2020)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Heterotrófico: adição de acetato, com limitação de N e P	81%	PHB	(KOCH <i>et al.</i> , 2020)
<i>Nostoc muscorum</i> Agardh	Fotoautotrófica	65%	PHB	(BHATI <i>et al.</i> , 2010)
<i>Leptolyngbya</i> sp. NIVA-CYA 255	Mixotrófico: suplementado com acetato de sódio na limitação de N e P	32,3%	PHB	(KETTNER; NOLL; GRIEHL, 2022)
<i>Anabaena</i> sp.	Mixotrófico: adição de NaOAc com limitação de N e P	40%	PHB	(SIMONAZZI <i>et al.</i> , 2021)

*CDW - Peso seco celular (%); N – nitrogênio; P – fosforo

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Prospectar e caracterizar, estrutural e funcionalmente, *in silico*, a enzima PhaB em linhagens cianobacterianas visando avaliar seu potencial para a produção de bioplásticos.

2.2 Objetivo específico

- Prospectar o gene *phaB* em genomas de cianobactérias;
- Analisar a diversidade das sequências do gene *phaB*;
- Modelar e validar as estruturas tridimensionais das enzimas;
- Realizar ancoramento do substrato e cofator no sítio catalítico dos modelos gerados;
- Avaliar a estabilidade dos complexos enzima-substrato;
- Comparar a afinidade de ligação de cada enzima com o seu ligante;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Mineração de *phaB* em cianobactérias

Primeiramente, procedeu-se à coleta dos genomas de cianobactérias no dia 5 de agosto de 2022, a partir do banco de dados *Refseq* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (O'LEARY *et al.*, 2016). A pesquisa abrangeu as 8 ordens taxonômicas do filo *Cyanobacteria* conforme definido por (KOMÁREK *et al.*, 2014). Um total de 128 genomas de cianobactérias foram recuperados em arquivos *fasta*, sendo as linhagens obtidas do banco de dados apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Lista de genomas coletados do NCBI.

Ordem	Linhagens	Acesso
	<i>Aphanothece hegewaldii</i> CCALA 016	PXOH01000009
	<i>Candidatus Atelocyanobacterium thalassa</i> isolate ALOHA	NC_013771
	<i>Chroogloeocystis siderophila</i> 5.2 s.c.1	NZ_MRCC01000001
	<i>Crocospaera subtropica</i> ATCC 51142	NC_010546
	<i>Cyanobacterium aponinum</i> PCC 10605	NC_019776
	<i>Euhalothece trionophila</i> Z-M001	NZ_CP042326
	<i>Geminocystis herdmanii</i> PCC 6308	NZ_CM001775
	<i>Gloeocapsopsis crepidinum</i> LEGE 06123	NZ_JADEWN010000100
<i>Chroococcales</i>	<i>Gleothece citrifomis</i> PCC 7424	NC_011729
	<i>Gleothece verrucosa</i> PCC7822	NC_014501
	<i>Microcystis aeruginosa</i> CACIAM 03	MCIH01000001
	<i>Microcystis aeruginosa</i> FD4	NZ_CP046973
	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-88	NZ_JXYX01000001
	<i>Microcystis elabens</i> FACHB-917	JACJSZ010000001
	<i>Microcystis flos-aquae</i> FACHB-1344	JACJSW010000001
	<i>Microcystis viridis</i> NIES-102	NZ_AP019314
	<i>Microcystis wesenbergii</i> FACHB-1317	NZ_JACJQV010000001
	<i>Rippkaea orientalis</i> PCC 8801	NC_011726
<i>Chroococciopsidales</i>	<i>Aliterella atlantica</i> CENA 595	NZ_JYON01000016
	<i>Chroococciopsis cubana</i> CCALA 043	PVWM01000660

	<i>Chroococidiopsis cubana</i> SAG 39.79	NZ_RSCK01000001
	<i>Chroococidiopsis</i> sp. CCALA 051	PYCI01000097
	<i>Chroococidiopsis</i> sp. CCMEE 29	NZ_CP083761
	<i>Chroococidiopsis</i> sp. CCNUC1	NZ_CP097480
	<i>Chroococidiopsis</i> sp. FACHB-1243	NZ_JACJQX010000001
	<i>Chroococidiopsis thermalis</i> PCC 7203	NC_019695
Gloebacterales	<i>Anthocerotibacter panamensis</i> C109	NZ_CP062698
	<i>Gloeobacter kilauensis</i> JS1	NC_022600
	<i>Gloeobacter morelensis</i> MG 652769	NZ_CP063845
	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	NC_005125
Nostocales	<i>Aetokthonos hydrillicola</i> CCALA 1050	JAAGKC010000001
	<i>Amazonocrinis nigriterrae</i> CENA67	JAECZC010000001
	<i>Anabaena catenula</i> FACHB-362	JACJTQ010000001
	<i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122	NC_019771
	<i>Anabaena subtropica</i> FACHB-260	JACJRF010000001
	<i>Anabaenopsis circularis</i> NIES-21	NZ_AP018174
	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> CCIBt3563	CP063311
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> FACHB-1287	JACJTO010000001
	<i>Brasilonema bromeliae</i> SPC951	QMEB01000406
	<i>Brasilonema sennae</i> CENA114	NZ_CP030118
	<i>Calothrix anomala</i> FACHB-343	JACJQG010000001
	<i>Calothrix brevissima</i> NIES-22	NZ_AP018207
	<i>Calothrix desertica</i> PCC 7102	VLKB01000009
	<i>Calothrix parietina</i> FACHB-288	JACJQH010000101
	<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 6912	NZ_AJLN01000109
	<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> CHARLIE-1	PGEM01000033
	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i> GIHE-G1	NZ_CP060822
	<i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417	CP003642
	<i>Dendronalium phyllosphericum</i> CENA369	JAECZA010000001
	<i>Desmonostoc muscorum</i> FACHB-395	JACJSF010000055
<i>Dolichospermum compactum</i> NIES-806	AP018316	

<i>Dolichospermum flos_aquae</i>	CCAP	CP051206
140313F		
<i>Fischerella muscicola</i>	PCC 7414	NZ_AJLK01000028
<i>Fischerella thermalis</i>	JSC-11	NZ_AGIZ01000009
<i>Hassallia byssoidea</i>	VB512170	JTCM02000040
<i>Mastigocladopsis repens</i>	PCC 10914	NZ_JH992901
<i>Nodularia sphaerocarpa</i>	UHCC 0038	CP060140
<i>Nodularia spumigena</i>	UHCC 0039	CP020114
<i>Nostoc azollae</i>	0708	NC_014248
<i>Nostoc calcicola</i>	FACHB-3891	JACJRQ010000025
<i>Nostoc edaphicum</i>	CCNP1411	CP054698
<i>Nostoc flagelliforme</i>	CCNUN1	CP024785
<i>Nostoc piscinale</i>	CENA21	CP012036
<i>Nostoc punctiforme</i>	PCC 73102	CP001037
<i>Nostoc spongiaeforme</i>	FACHB-130	JACJTB010000006
<i>Richelia sinica</i>	FACHB-800	CP021056
<i>Scytonema hofmannii</i>	PCC 7110	KQ976354
<i>Scytonema tolypothrichoides</i>	VB-61278	JXCA02000019
<i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i>		NZ_LUFH02000066
BCCUSP55		
<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	ITEP-024	NZ_CP080598
<i>Tolypothrix bouteillei</i>	VB521301	NZ_JHEG04000001
<i>Trichormus variabilis</i>	0441	NZ_CP047242
<i>Westiellopsis prolifica</i>	IICB1	NZ_NAPS01000001
<i>Allocoleopsis franciscana</i>	PCC7113	NC_019738
<i>Argonema galeatum</i>	A003/A1	NZ_JAIQZM010000003
<i>Baaleninema simplex</i>	PCC 7105	NZ_KB235958
<i>Coleofasciculus chthonoplastes</i>	PCC 7420	NZ_DS989850
<i>Crinalium epipsammum</i>	PCC9333	NC_019753
<i>Kamptonema formosum</i>	PCC 6407	NZ_KB235903
<i>Limnoraphis robusta</i>	CS-951	NZ_LATL02000064

Oscillatoriales

	<i>Limnospira indica</i> PCC8005	NZ_FO818640
	<i>Lyngbya aestuarii</i> BL J	NZ_AUZM01000113
	<i>Lyngbya confervoides</i> BDU141951	NZ_JTHE03000116
	<i>Microcoleus asticus</i> IPMA8	NZ_SRRZ00000000
	<i>Microcoleus vaginatus</i> PCC9802	NZ_CP031740
	<i>Microseira wollei</i> NIES-4236	BLAY01000042
	<i>Moorena bouillonii</i> PNG	NZ_MKZS01000001
	<i>Okeania hirsuta</i>	NZ_RCBZ01000093
	<i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304	NC_019693
	<i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC7112	NC_019729
	<i>Oscillatoria salina</i> IIICB1	JAAHBQ010000053
	<i>Oxynema aestuarii</i> AP17	NZ_CP051167
	<i>Phormidium pseudopriestleyi</i> FRX01	NZ_JAFLQW010000552
	<i>Phormidium tenue</i> NIES-30	NZ_MRCG01000008
	<i>Phormidium yuhuli</i> AB48	NZ_CP098611
	<i>Planktothrix mougeotii</i> LEGE 06226	NZ_JADEWU010000038
	<i>Planktothrixserta</i> PCC 8927	NZ_LR734885
	<i>Planktothrix tepida</i> PCC9214	NZ_LR882970
	<i>Sodalinema gerasimenkoae</i> IPPAS B-353	NZ_ML776472
	<i>Tychonema bourrellyi</i> FEM_GT703	NZ_NXIB02000092
	<i>Hydrococcus rivularis</i> NIES-593	NZ_MRCB01000001
	<i>Hyella patelloides</i> LEGE07179	NZ_LR213805
	<i>Myxosarcina</i> sp. GI1	NZ_JRFE01000001
	<i>Pleurocapsa</i> sp. CCALA 161	NZ_PVWF01000035
<i>Pleurocapsales</i>	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC7327	NC_019689
	<i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC7437	NC_019748
	<i>Stanieria</i> sp. NIES-3757	NZ_AP017375
	<i>Waterburya agarophytonicola</i> KI4	NZ_JADWDC010000016
	<i>Xenococcus</i> sp. PCC 7305	NZ_ALVZ01000001
	<i>Spirulina major</i> CCY 15215	NZ_JACSWA010000584
<i>Spirulinales</i>	<i>Spirulina major</i> PCC 6313	NZ_KV878783
	<i>Spirulina subsalsa</i> FACHB-351	NZ_JAIHOM010000011.

<i>Synechococcales</i>	<i>Spirulina subsalsa</i> PCC 9445	NZ_JH980292
	<i>Acaryochloris marina</i> MBIC 11017	NC_009925
	<i>Acaryochloris thomasi</i> RCC1774	PQWO01000008
	<i>Candidatus Synechococcus spongiarum</i> LMB bulk15N	MWLE01000053
	<i>Chamaesiphon minutus</i> PCC 6605	CP003600
	<i>Cyanobium gracile</i> PCC 6307	NC_019675
	<i>Dactylococcopsis salina</i> PCC 8305	CP003944
	<i>Parasynechococcus marenigrum</i> WH 8102	BX548020
	<i>Petrachloros mirabilis</i> ULC683	WVIC01000014
	<i>Prochlorococcus marinus</i> CCMP 1375	NC_005042
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	NZ_CP085785
	<i>Synechocystis salina</i> LEGE 00031	NZ_JADEVV010000003
	<i>Synechocystis</i> sp. CACIAM 05	NZ_CP019225
	<i>Synechocystis</i> sp. LEGE 06083	JADEWJ010000281
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	CP007542
	<i>Vulcanococcus limneticus</i> LL	NZ_NQLA01000001

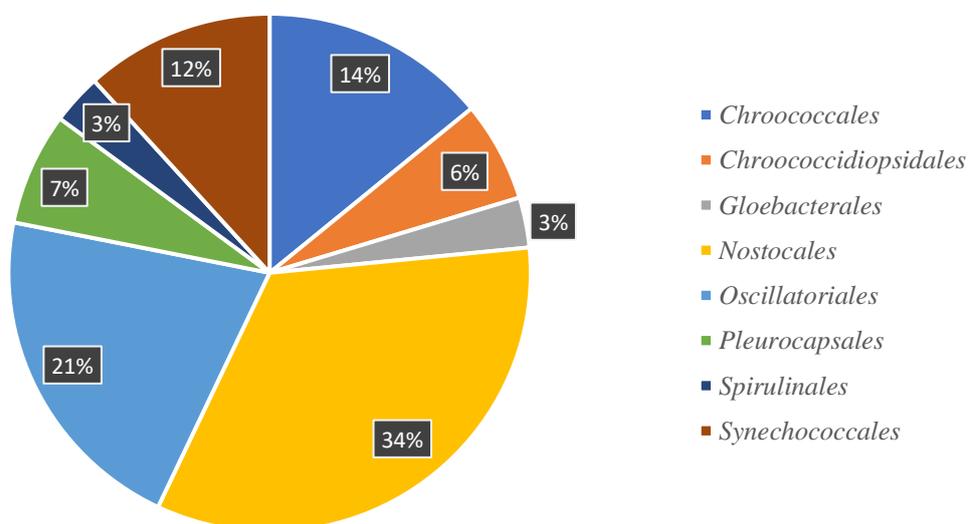


Gráfico 1 - Distribuição das linhagens de genomas de cianobactérias por ordem.

A prospecção dos genes foi conduzida através do *software* HMMER3.4, que utiliza modelos ocultos de Markov para discernir similaridades entre sequências, identificando conservação de nucleotídeos, taxas de inserções e deleções através de um perfil HMM, uma representação estatística que mostra a distribuição probabilística de cada nucleotídeo ou aminoácido em diferentes posições da sequência (POTTER *et al.*, 2018). Foi criado um perfil HMM com base no alinhamento múltiplo de sequências de genes *phaB* em cianobactérias do banco de dados *refseq*.

Para realizar a pesquisa nos genomas, em relação ao perfil HMM, o *software* HMMER3.4 foi empregado, utilizado o programa *hmmsearch*. Os resultados com o *hmmsearch* são classificados com base nos parâmetros de *bit score* e *E-value*. O *bit score* é uma pontuação *log-odds*, que compara a probabilidade do perfil HMM com a probabilidade de hipótese nula e o *E-value* é uma métrica estatística baseada no *bit score*, sendo uma medida que avalia a probabilidade de falsos positivos (FINN; CLEMENTS; EDDY, 2011).

Além disso, as sequências encontradas pelo HMM foram submetidas a uma análise comparativa com o banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (BITTRICH *et al.*, 2022), que contém informações sobre a estrutura de enzimas resolvidas experimentalmente. A análise foi conduzida pelo BLAST (MADDEN, 2013) para avaliar a identidade das sequências com proteínas, cuja estrutura foi confirmada experimentalmente, reforçando assim a validade e identidade das sequências analisadas.

As sequências encontradas nessa etapa passaram para a etapa de identificação e caracterização de domínios, famílias de proteínas e *motifs*. Para isso, as sequências prospectadas pelo HMMER3.4 foram submetidas aos bancos de dados de *Conserved Domain Database* (CDD) e InterPro, que foram utilizados para mapear famílias de domínios (superfamília e subfamília), fornecendo informações estruturais e funcionais das proteínas (LU *et al.*, 2020; PAYSAN-LAFOSSE *et al.*, 2023).

3.2 Análise de similaridade e filogenia

As sequências obtidas na prospecção foram analisadas quanto à sua diversidade e à sua distribuição filogenética entre diferentes linhagens de cianobactérias. Essa etapa é importante para evidenciar a variedade de sequências, uma vez que a exploração da diversidade permite a avaliação do maior número de enzimas diferentes, aumentando, assim, a probabilidade de identificar potenciais candidatas para aplicação na indústria.

Inicialmente, as sequências foram agrupadas em *clusters* utilizando o *software* CD-HIT (FU et al., 2012), que identificou e agrupou sequências que compartilhavam mais 90% de identidade, com o objetivo de eliminar a redundância das amostras.

Posteriormente, um alinhamento de múltipla sequência foi realizado pelo servidor MAFFT versão 7 (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2019), utilizando o método de refinamento iterativo L-INS-i, indicado para alinhamentos com menos de 200 sequências com domínios conservados. O alinhamento resultante foi submetido ao programa Bioedit versão 7.2.5 (HALL, 1999) para a construção de uma matriz de identidade entre as sequências. A matriz representa o percentual de identidade entre as sequências, onde os valores variam entre 0 e 1 para determinar a identidade entre si. A matriz foi utilizada para avaliar valores de identidade.

Para a construção da árvore gênica, foi realizada utilizando o método de inferência filogenética baseado em máxima verossimilhança pelo *software* IQ-TREE (MINH et al., 2020). Nesse processo, foi escolhido o método ModelFinder (KALYAANAMOORTHY et al., 2017) para a seleção automática do melhor modelo evolutivo, que são representações estatísticas para estimar parâmetros evolutivos.

A validação da árvore foi conduzida pelo método de *bootstrap* (HOANG et al., 2018), uma técnica estatística empregada para avaliar a robustez e confiabilidade das relações filogenéticas. Este método envolve a geração de múltiplas árvores possíveis com finalidade de testar o grau de repetição dos nós e, assim, avaliar a probabilidade de sua representação ser realista. No presente estudo, foram realizadas 1000 réplicas de *bootstrap* para a validação da árvore.

3.3 Modelagem molecular

3.3.1 Identificação e seleção de molde

Inicialmente, todas as sequências foram traduzidas para aminoácidos e submetidas ao programa SignalP 6.0, para a identificação de peptídeo sinal, uma sequência curta de aminoácidos responsável por direcionar a proteína para regiões específicas. Os peptídeos sinais são clivados assim a proteína atinge a região alvo, permitindo que a proteína adote sua conformação funcional (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019). Portanto, esses peptídeos devem ser removidos da sequência proteica para que a proteína seja modelada em sua forma ativa.

A modelagem comparativa envolve a seleção criteriosa de um molde que servirá como base para a construção dos modelos tridimensionais. O molde consiste em uma estrutura tridimensional determinada experimentalmente, que será utilizada como ponto de referência na predição da estrutura da proteína alvo (HADDAD; ADAM; HEGER, 2020). Foi realizado um alinhamento das sequências alvo com as sequências determinada experimentalmente do banco de dados PDB, utilizando o BLAST. A sequência alvo foi fornecida no formato FASTA, e os resultados obtidos foram avaliados com base em vários critérios, incluindo a identidade e cobertura de sequência, proximidade taxonômica, conservação funcional, presença de substrato e cofator, resolução e qualidade da estrutura. Estes são fatores importantes para garantir modelos previstos de boa qualidade.

3.3.2 Predição de estrutura

A predição da estrutura das proteínas-alvo foi realizada pelo servidor SWISS-MODEL (WATERHOUSE *et al.*, 2018), que aplica o método de modelagem por homologia. Para isso, o servidor utiliza uma biblioteca de modelos, SWISS-MODEL *Template Library* (SMTL), um banco de dados derivados do Protein Data Bank (PDB), utilizado para extrair informações estruturais necessárias à modelagem por homologia (STUDER *et al.*, 2019). O SWISS-MODEL depende dos *softwares* de biologia estrutural computacional *OpenStructure* (BIASINI *et al.*, 2013) e do mecanismo de modelagem ProMod3 (STUDER *et al.*, 2021) para executar de forma automática as seguintes etapas: Construção de um modelo inicial, no qual são transferidas as coordenadas dos átomos conservados, definido pelo alinhamento do modelo alvo. Para modelar regiões sem cobertura de modelo, ou seja, modelagem de inserção-deleção, realiza-se modelagem em *loop*, que, por meio de métodos estatísticos, seleciona fragmentos candidatos viáveis na base de dados estruturais, e modelagem de cadeias laterais, que utiliza uma biblioteca de rotâmeros dependentes da estrutura de *backbone* para otimizar as conformações das cadeias laterais dos aminoácidos.

Também é feita a minimização de energia, utilizada para resolver pequenas distorções estruturais, interações desfavoráveis ou conflitos estereoquímicos que possam surgir durante o processo de modelagem. Por último, a estimativa de qualidade do modelo é realizada para quantificar os erros e fornecer estimativas sobre a precisão do modelo resultante (STUDER *et al.*, 2019; WATERHOUSE *et al.*, 2018). O SWISS-MODEL é

continuamente avaliado e comparado com outros servidores da área por meio do projeto CAMEO (*Continuous Automated Model Evaluation*) (ROBIN et al., 2021), que realiza uma avaliação cega da previsão com base em sequências pré-lançadas do PDB, permitindo o monitoramento e melhoria contínua do desempenho do servidor.

3.3.3 Validação

Para validar o modelo gerado por homologia, é necessário avaliar sua confiabilidade e qualidade estrutural. Para isso foram empregadas ferramentas computacionais de validação, como o servidor MolProbity, que oferece uma análise da qualidade estereoquímica do modelo, fornecendo métricas para avaliar sua integridade estrutural. O principal resultado obtido é o gráfico de Ramachandran, que demonstra se os resíduos de aminoácidos estão em posições energeticamente favoráveis em relação aos ângulos de torção phi (Φ) e psi (Ψ) (WILLIAMS et al., 2018).

Foi aplicada a ferramenta QMEAN, do servidor SWISS-MODEL, que utiliza vários parâmetros estatísticos das características geométricas do modelo, como distâncias de pares atômicos, ângulos de torção e acessibilidade ao solvente, em comparação com estatísticas obtidas de estruturas resolvidas experimentalmente. A análise gera uma estimativa de qualidade absoluta e local do modelo, com os resultados transformados em z-score. Valores de z-score dentro da faixa de -3.0 a 3.0 indicam boa correspondência com o que é esperado de estruturas de raios X de alta resolução (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011).

A ferramenta ERRAT avalia a estabilidade e confiança estatística da conformação dos resíduos com base em interações não ligadas atômicas características estruturas de referência (COLOVOS; YEATES, 1993). A análise é baseada na premissa de que átomos em proteínas seguem padrões de distribuição não aleatórios devido a considerações geométricas e energéticas. Erros estruturais resultam em distribuições mais aleatórias desses átomos. ERRAT calcula a porcentagem de resíduos que se encontram em uma conformação aceitável, e uma pontuação acima de 90% indica uma boa qualidade do modelo. Resultados abaixo desse valor podem sugerir regiões com erros potenciais (AGNIHOTRY et al., 2022).

O servidor ProSA-web, fornece uma pontuação *Z-score*, mede o desvio da energia total do modelo com relação a energia derivada de conformações aleatórias, o z-score

fora de uma faixa de pontuação característica para proteínas nativas de tamanho semelhante indicam estruturas errôneas, para melhor compreensão, seu valor é exibido em um gráfico que contém o *Z-score* de todas as proteínas determinadas experimentalmente no PDB (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

Outro método de validação utilizado foi o cálculo do Desvio Quadrático Médio da Raiz (RMSD) das distâncias dos átomos de carbono alfa entre as estruturas do molde e do modelo. O RMSD permite avaliar a similaridade entre as estruturas por meio da sobreposição delas (ENGH; HUBER, 1991). Valores menores que 3,5 Å de desvio são geralmente considerados aceitáveis, sendo preferíveis aqueles mais próximos de zero, o que indica uma maior concordância entre as estruturas comparadas.

3.4 Ancoramento molecular

O ancoramento molecular, também conhecido como *docking*, é um método de modelagem molecular que visa prever a estrutura do complexo intermolecular formado entre duas ou mais moléculas. No caso de interações proteína-ligante, visa simular a conformação ideal de acordo com a complementaridade estrutural, afim de prever a afinidade de ligação e o modo de interação entre ligante e receptor (SINGH; BANI BAKER; SINGH, 2022).

Os programas de ancoramento molecular exigem uma metodologia capaz de gerar e avaliar as conformações do ligante, sendo empregados um algoritmo de busca e uma função de pontuação de energia (FAN; FU; ZHANG, 2019). O algoritmo de busca é responsável por explorar possíveis modos de ligação entre o ligante e a proteína, permitindo explorar os graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional do ligante no sítio receptor da proteína, gerando diversas conformações do ligante. Enquanto isso, a função de pontuação avalia a qualidade das conformações encontradas pelo algoritmo de busca com base na energia de interação. A energia de interação envolve termos relacionados a interações estéricas, eletrostáticas, de ligações de hidrogênio e hidrofóbicas, que classificam os modos de ligação mais favoráveis do ligante no sítio receptor (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

Para a realização do ancoramento molecular dos modelos gerados por homologia, foi necessário definir os resíduos relevantes para a atividade catalítica da enzima PhaB. A identificação dos resíduos catalíticos e a região de ligação com o cofator do PhaB foi feita com base da descrição de estruturas cristalinas de PhaB depositadas no banco de dados

PDB (KIM et al., 2014; LIU et al., 2015; MATSUMOTO et al., 2013) . Foi percebido que a região ligação de substrato e cofator dividem a mesma cavidade, foi utilizado como referência o substrato acetoacetil-CoA (CAA) e o cofator NADPH (NAP) cristalizado do modelo 3VZS para a realização do *docking*, pois já é descrito como as estruturas devem estar para a função catalítica e evitando colisões entre as moléculas.

. O *docking* molecular foram realizados no *software* Molegro Virtual Docking 5.0 (THOMSEN, 2003), que traz a possibilidade de aplicação de quatro algoritmos de busca diferentes e quatro opções de função de pontuação, tendo 32 protocolos com diferentes possibilidades, como já está determinada a posição dos ligantes no substrato, foi realizado um protocolo de *redocking* (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019), com o objetivo de utilizar a estrutura de referência para orientar o reposicionamento do ligante, isso permite que o mecanismo de encaixe concentre a pesquisa em conformações semelhantes ao modelo de encaixe.

Inicialmente, foi realizada a preparação das moléculas pelo próprio programa, foram adicionados hidrogênios e cargas parciais para cada átomo. Os modelos de PhaB foram mantidos rígidos, enquanto as ligações torcionais do ligante CAA não foram restringidas, permitindo um acoplamento flexível do ligante. Além disso, foi realizado a detecção de cavidades na proteína.

Para a realização da ancoragem, foi selecionado o algoritmo de busca MolDock Optimizer, que é um algoritmo de busca híbrida denominada evolução diferencial guiada, que combina técnicas de otimização de evolução diferencial e algoritmo de previsão de cavidade (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). A função de pontuação escolhida foi o MolDock Score, baseado em um potencial linear por partes (*piecewise linear potential - PLP*), que considera a direcionalidade das ligações de hidrogênio (DE AZEVEDO, 2010). A grade de busca foi definida em um raio de 15 Å e resolução de 0.3 Å, determinando o espaço de busca onde o ligante pode ser posicionado em relação ao receptor.

Foram feitos 20 *runs* para cada ancoragem, retornando as 5 melhores conformações avaliadas pelas funções de pontuação MolDock Score e Rerank. O Rerank reavalia as conformações geradas, considerando um termo de torção sp²-sp² e um potencial de Lennard-Jones (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). Além disso, foi calculado o RMSD, que mede o desvio médio entre os átomos correspondentes na conformação e o estado inicial do ligante.

3.5 Dinâmica molecular

Para uma compreensão mais aprofundada das interações intermoleculares, o atracamento molecular deve ser combinado com outras técnicas computacionais mais robustas. A dinâmica molecular (DM) é capaz de fornecer modelos moleculares muito mais próximos da realidade biológica, pois inclui diretamente características como flexibilidade e temperatura (SINGH; BANI BAKER; SINGH, 2022). A vantagem da simulação DM é que o arquivo de trajetória resultante registra dinamicamente todos os eventos que ocorrem no sistema ao longo de um intervalo de tempo. Isso permite observar o movimento de cada aminoácido na estrutura em nível atômico (WU et al., 2022).

Os complexos proteína-ligante gerados durante a etapa de atracamento molecular foram submetidos a simulação de DM em triplicata, com duração de 100 ns para cada simulação. Antes disso, foi realizado a preparação das moléculas para estas simulações. O servidor H++ (ANANDAKRISHNAN; AGUILAR; ONUFRIEV, 2012) foi empregado para definir o estado de protonação dos resíduos proteicos, esse processo calcula as interações intra e intermoleculares, e para reproduzir o efeito do pH no sistema, foi considerado um pH de 7,0.

As ferramentas incluídas no pacote de programas AMBER 23 (CASE et al., 2022) foram empregadas para conduzir todos os procedimentos de preparação, solvatação, montagem de sistema, bem como as etapas de minimização de energia, aquecimento e dinâmica molecular. Para a montagem do sistema, foi aplicado os campos de força ff19SB para a proteína (TIAN et al., 2020) e o campo de força *gaff* para os íons (WANG *et al.*, 2004). Após a montagem do sistema, o complexo foi solvatado com moléculas de água do modelo OPC (*optimal water models*) (XIONG; SHABANE; ONUFRIEV, 2020), em um espaço octaédrica com tamanho de 8 Å em todas direções da proteína. Por fim, foi adicionado os íons Na⁺ ou Cl⁻ para a neutralização das cargas, visando tornar as simulações mais estáveis. Dessa forma foram gerados os arquivos de topologia e parâmetros dos modelos e continham em torno de 30 mil átomos.

Os sistemas previamente preparados prosseguiram para a etapa de minimização de energia no *software* Sander, incluído no pacote AMBER23. Essa etapa é importante pois ao se adicionar água no modelo, que estava originalmente em condições de vácuo, são criadas interações que antes não existiam e que podem desestabilizar o modelo. Por este motivo, a minimização de energia é empregada para diminuir a energia total do sistema

solvatado, promovendo a estabilização das interações entre a água e o complexo. (KINI; EVANS, 1991). A minimização de energia foi realizada em cinco etapas, sendo quatro delas usando 3000 ciclos de descidas abruptas e 5000 ciclos de gradientes conjugados para cada modelo. Na última etapa será utilizada 5000 ciclos de descidas abruptas e 30 000 ciclos de gradientes conjugados. Durante as primeiras etapas, os átomos pesados tiveram seus movimentos restritos por um potencial harmônico de $1000 \text{ Kcal/mol} \cdot \text{Å}^2$, enquanto que na etapa final todos os átomos estavam livres.

A etapa de aquecimento e equilíbrio foi subdividido em 14 fases. A temperatura foi gradualmente aumentada até atingir 300 K. Dinâmicas de Langevin (termostática) foi empregada com frequência de colisão de 3.0 ps-1. Um potencial harmônico de $25 \text{ Kcal/mol} \cdot \text{Å}^2$ foi aplicado para restringir os átomos pesados nas fases iniciais e desligado durante a fase 13. O processo de aquecimento teve duração de 650 picossegundos até a fase 13 e foi aplicado por meio de um conjunto NVT. Na última etapa foram produzidos 2-ns de simulação em um ensemble NPT para a equilibração do sistema.

Para manter a estabilidade das ligações, o algoritmo SHAKE foi empregado para limitar a vibração dos ligantes dos átomos de hidrogênio. O método *Particle Mesh Ewald* foi usado para o cálculo de interações eletrostáticas usando um valor de corte limiar de 10.0 Å para interações não ligadas. Assim, foram realizadas as simulações de DMs de 100ns cada sistemas montados. Posteriormente, a análise estrutural das proteínas com seus respectivos ligantes foi realizada através do RMSD calculado a partir dos átomos N, CA e C da cadeia principal, utilizando o modulo *cpptraj*, e dos cálculos de energia livre.

3.6 Cálculo de energia livre de ligação

O cálculo de energia livre de ligação é uma técnica computacional empregada para prever a afinidade do complexo proteína-ligante. Trata-se de uma medida termodinâmica que quantifica a estabilidade do complexo (SWANSON; HENCHMAN; MCCAMMON, 2004). Nesse contexto, foram empregados dois métodos para o cálculo de energia livre de ligação: *Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area* (MM-GBSA) e *Molecular Mechanics-Poisson-Boltzmann Surface Area* (MM-PBSA) (GENHEDEN; RYDE, 2015), utilizados para calcular as contribuições energéticas de interações intra e intermoleculares.

Os métodos MM-GBSA e MM-PBSA são classificados como métodos de ponto final, ou seja, se baseia nos estados finais do complexo (receptor-ligante), com o receptor e o ligante separadamente. Dessa forma, esses métodos permitem uma análise detalhada das contribuições de cada átomo e dos diferentes tipos de interações, como a contribuição de ligações, ângulos e diedros, interações eletrostáticas, interações de van der Waals e um termo de solvatação que é decomposto em uma porção polar e apolar. A porção polar pode ser calculada usando o método de Born-generalizado (MM-GBSA) ou o Poisson-Boltzmann (MM-PBSA). A porção apolar surge da energia necessária para formação da cavidade do soluto dentro do solvente (GENHEDEN; RYDE, 2015).

Dessa forma, após a produção dos 100ns de simulação de DM, os sistemas seguiram para o cálculo de energia livre de ligação dos complexos, utilizando as duas metodologias mencionadas, utilizando os últimos 10ns de simulação. Em seguida, foi gerado o gráfico de decomposição do método MM-GBSA, que permite a análise de contribuição individual de cada resíduo da interação entre proteína e ligante.

3 RESULTADOS

4.1 Prospecção genômica

A prospecção realizada utilizando HMM e pelo BLAST identificou 31 sequências do gene *phaB*. As análises de similaridade realizadas pelo servidor BLAST revelaram maior correspondência residual com o modelo 4RZI, que corresponde à estrutura experimental da enzima PhaB de *Synechocystis* PCC6803, uma cianobactéria amplamente estudada na produção de PHA. Esse achado sugere que as sequências identificadas possuem uma estrutura tridimensional e função bioquímica semelhantes à PhaB de *Synechocystis*, o que reforça a confiabilidade das predições realizadas.

As sequências identificadas foram analisadas no InterPro, onde foram classificadas como pertencentes à superfamília das desidrogenase/reductase de cadeia curta (SDR) (ID: IPR002347) e à família específica de acetoacetyl-CoA reductase PhaB de cianobactérias (ID: IPR049956), validando a identificação dos genes conforme as classificações descritas na literatura (MATSUMOTO et al., 2013). Assim, a etapa de prospecção permitiu a predição confiável do gene *phaB*, conforme detalhado na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultado da prospecção do gene *phaB* encontrados nas linhagens cianobacterianas do banco de dados NCBI e respectivas informações. Códigos adotados para facilitar as análises, linhagens, comprimento das sequências de aminoácidos, resultados do HMMER (bit score e E-value), código de acesso do InterPro e resultados do Blast com o PDB 4RZI (identidade e cobertura).

Identificação		Hmmer			BLAST		
Códigos	linhagem	Comprimento de AA	Bit score	E-value	InterPro entry	Identidade (%)	cobertura
PhaB1	<i>Gloeotheca citriformis</i> PCC 7424	240	465.8	1.6E-138	IPR002347 IPR049956	74.58%	99%
PhaB2	<i>Gloeotheca verrucosa</i> PCC7822	240	468.8	1.9E-139	IPR002347 IPR049956	75.83%	99%
PhaB3	<i>Gloeotheca verrucosa</i> PCC7822	245	451.1	4.8E-134	IPR002347 IPR049956	68.57%	99%
PhaB4	<i>Microcystis aeruginosa</i> CACIAM 03	238	475.3	8E-144	IPR002347 IPR049956	75.83%	99%
PhaB5	<i>Microcystis aeruginosa</i> FD4	238	477.2	2.4E-144	IPR002347 IPR049956	77.08%	99%
PhaB6	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-88	238	479.5	1E-142	IPR002347 IPR049956	76.67%	99%
PhaB7	<i>Microcystis flos-aquae</i> FACHB-1344	238	474.2	1.9E-143	IPR002347 IPR049956	75.42%	99%
PhaB8	<i>Microcystis viridis</i> NIES-102	238	478.6	9.6E-145	IPR002347 IPR049956	76.67%	99%
PhaB9	<i>Microcystis wesenbergii</i> FACHB-1317	238	474.9	1.1E-143	IPR002347 IPR049956	75.83%	99%
PhaB10	<i>Chroococidiopsis</i> sp. CCMEE 29	240	444.9	2.1E-134	IPR002347 IPR049956	65.42%	99%
PhaB11	<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 6912	240	493.9	3.9E-147	IPR002347 IPR049956	78.33%	99%
PhaB12	<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 6912	242	438.4	3.6E-130	IPR002347 IPR049956	67.36%	98%
PhaB13	<i>Mastigocladopsis repens</i> PCC 10914	240	482.4	1.3E-143	IPR002347 IPR049956	67.50%	99%
PhaB14	<i>Nostoc flagelliforme</i> CCNUN1	240	435.9	1.8E-131	IPR002347 IPR049956	65.00%	99%
PhaB15	<i>Limnospira indica</i> PCC8005	240	438.3	3.9E-130	IPR002347 IPR049956	73.33%	99%

PhaB16	<i>Microcoleus vaginatus</i> PCC9802	240	465.8	7.8E-141	IPR002347	IPR049956	66.25%	99%
PhaB17	<i>Oxynema aestuarii</i> AP17	240	469.8	9.5E-140	IPR002347	IPR049956	75.83%	99%
PhaB18	<i>Planktothrix mougeotii</i> LEGE 06226	240	443.5	1E-131	IPR002347	IPR049956	73.33%	99%
PhaB19	<i>Planktothrixserta</i> PCC 8927	240	443.3	1.1E-131	IPR002347	IPR049956	74.58%	99%
PhaB20	<i>Planktothrix tepida</i> PCC9214	240	442.7	1.7E-131	IPR002347	IPR049956	73.75%	99%
PhaB21	<i>Hydrococcus rivularis</i> NIES-593	248	472.7	1.2E-140	IPR002347	IPR049956	83.33%	96%
PhaB22	<i>Hydrococcus rivularis</i> NIES-593	245	487	5.1E-145	IPR002347	IPR049956	71.02%	99%
PhaB23	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC7327	266	467.7	1.7E-141	IPR002347	IPR049956	82.50%	89%
PhaB24	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC7327	245	480.9	1.6E-145	IPR002347	IPR049956	70.61%	99%
PhaB25	<i>Leptodesmis sichuanensis</i> PKUAC- SCTA 121	240	468.1	3.2E-139	IPR002347	IPR049956	73.75%	99%
PhaB26	<i>Spirulina subsalsa</i> FACHB-351	240	460	3.8E-139	IPR002347	IPR049956	76.25%	99%
PhaB27	<i>Spirulina subsalsa</i> PCC 9445	240	458.6	2.5E-136	IPR002347	IPR049956	76.67%	99%
PhaB28	<i>Synechocystis salina</i> LEGE 00031	240	480.3	5.7E-143	IPR002347	IPR049956	99.17%	99%
PhaB29	<i>Synechocystis</i> sp. CACIAM 05	240	480.7	1.3E-145	IPR002347	IPR049956	97.92%	99%
PhaB30	<i>Synechocystis</i> sp. LEGE 06083	240	480.3	2E-145	IPR002347	IPR049956	99.17%	99%
PhaB31	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	240	480.2	3E-146	IPR002347	IPR049956	97.92%	99%

Com base nos resultados apresentados na Tabela 5, observa-se uma prevalência maior de alguns gêneros, como *Microcystis* e *Synechocystis*. Além disso, foi constatado que determinadas espécies apresentaram mais de uma sequência caracterizada como *phaB*, a exemplo de *Gloeothoece verrucosa*, *Chlorogloeopsis fritschi*, *Hydrococcus rivularis* e *Pleurocapsa* sp. PCC7327. Isso sugere que esses genes são parálogos, que podem ser resultados de eventos como duplicação gênica ou transferência horizontal de genes, conforme já demonstrado em estudos com outras espécies (BUDDE et al., 2010; HAN et al., 2009; HONG et al., 2021; KALIA; LAL; CHEEMA, 2007; REN et al., 2000).

4.2 Caracterização da diversidade molecular

Com o propósito de explorar a diversidade das enzimas de cianobactérias, as sequências identificadas foram inicialmente agrupadas em *clusters* com mais de 90% de identidade, a fim de reduzir a redundância. Um representante foi selecionado para cada *cluster*, resultando em um total de 17 sequências.

A matriz de identidade mostrou o percentual de resíduos idênticos entre todas as sequências no alinhamento. A Figura 6 apresenta os resultados dessa matriz para as sequências de *phaB*, com percentuais de identidade variando entre 62% e 88%. Esses dados evidenciam uma considerável diversidade entre as sequências analisadas.

A árvore gênica apresentada na Figura 7 ilustra as relações evolutivas do gene *phaB* entre as cianobactérias analisadas e suas semelhanças com genes *phaB* e *fabG* de bactérias heterotróficas. Esta árvore foi construída com base em genes *phaB* das cianobactérias prospectadas, genes *phaB* de bactérias heterotróficas e genes *fabG*, que são parálogos aos genes *phaB*, de bactérias heterotróficas e cianobactérias.

Como é possível perceber, os clados dos genes *fabG* e *phaB* ficaram bem definidos e separados. O clado da *phaB* se dividiu-se em um grupo de sequências de bactérias e um de cianobactérias, isso evidencia que a evolução das *phas* em cianobactérias foi distinta das bactérias observadas, formando um clado monofilético para as cianobactérias.

	PhaB1	PhaB3	PhaB5	PhaB10	PhaB11	PhaB12	PhaB13	PhaB14	PhaB15	PhaB16	PhaB17	PhaB18	PhaB21	PhaB24	PhaB25	PhaB26	PhaB28
PhaB1	ID	0.722	0.804	0.65	0.791	0.669	0.7	0.658	0.791	0.687	0.837	0.791	0.75	0.73	0.791	0.837	0.741
PhaB3	0.722	ID	0.689	0.64	0.734	0.643	0.685	0.657	0.681	0.685	0.718	0.681	0.691	0.844	0.706	0.677	0.673
PhaB5	0.804	0.689	ID	0.65	0.775	0.648	0.691	0.645	0.754	0.679	0.804	0.741	0.758	0.702	0.795	0.808	0.775
PhaB10	0.65	0.64	0.65	ID	0.725	0.743	0.858	0.829	0.62	0.866	0.683	0.645	0.673	0.706	0.666	0.65	0.658
PhaB11	0.791	0.734	0.775	0.725	ID	0.71	0.737	0.7	0.766	0.745	0.816	0.77	0.794	0.759	0.82	0.808	0.779
PhaB12	0.669	0.643	0.648	0.743	0.71	ID	0.793	0.776	0.632	0.772	0.673	0.636	0.661	0.668	0.657	0.661	0.661
PhaB13	0.7	0.685	0.691	0.858	0.737	0.793	ID	0.82	0.662	0.887	0.704	0.666	0.701	0.738	0.708	0.679	0.679
PhaB14	0.658	0.657	0.645	0.829	0.7	0.776	0.82	ID	0.629	0.816	0.67	0.641	0.665	0.702	0.645	0.654	0.645
PhaB15	0.791	0.681	0.754	0.62	0.766	0.632	0.662	0.629	ID	0.645	0.795	0.766	0.741	0.677	0.75	0.804	0.729
PhaB16	0.687	0.685	0.679	0.866	0.745	0.772	0.887	0.816	0.645	ID	0.691	0.666	0.697	0.742	0.691	0.67	0.666
PhaB17	0.837	0.718	0.804	0.683	0.816	0.673	0.704	0.67	0.795	0.691	ID	0.804	0.77	0.755	0.82	0.85	0.754
PhaB18	0.791	0.681	0.741	0.645	0.77	0.636	0.666	0.641	0.766	0.666	0.804	ID	0.701	0.697	0.783	0.783	0.729
PhaB21	0.75	0.691	0.758	0.673	0.794	0.661	0.701	0.665	0.741	0.697	0.77	0.701	ID	0.711	0.762	0.745	0.81
PhaB24	0.73	0.844	0.702	0.706	0.759	0.668	0.738	0.702	0.677	0.742	0.755	0.697	0.711	ID	0.726	0.706	0.693
PhaB25	0.791	0.706	0.795	0.666	0.82	0.657	0.708	0.645	0.75	0.691	0.82	0.783	0.762	0.726	ID	0.812	0.741
PhaB26	0.837	0.677	0.808	0.65	0.808	0.661	0.679	0.654	0.804	0.67	0.85	0.783	0.745	0.706	0.812	ID	0.758
PhaB28	0.741	0.673	0.775	0.658	0.779	0.661	0.679	0.645	0.729	0.666	0.754	0.729	0.81	0.693	0.741	0.758	ID

Figura 6 - Matriz de similaridade calculada com as seqüências do gene *phaB* em cianobactérias. (%)

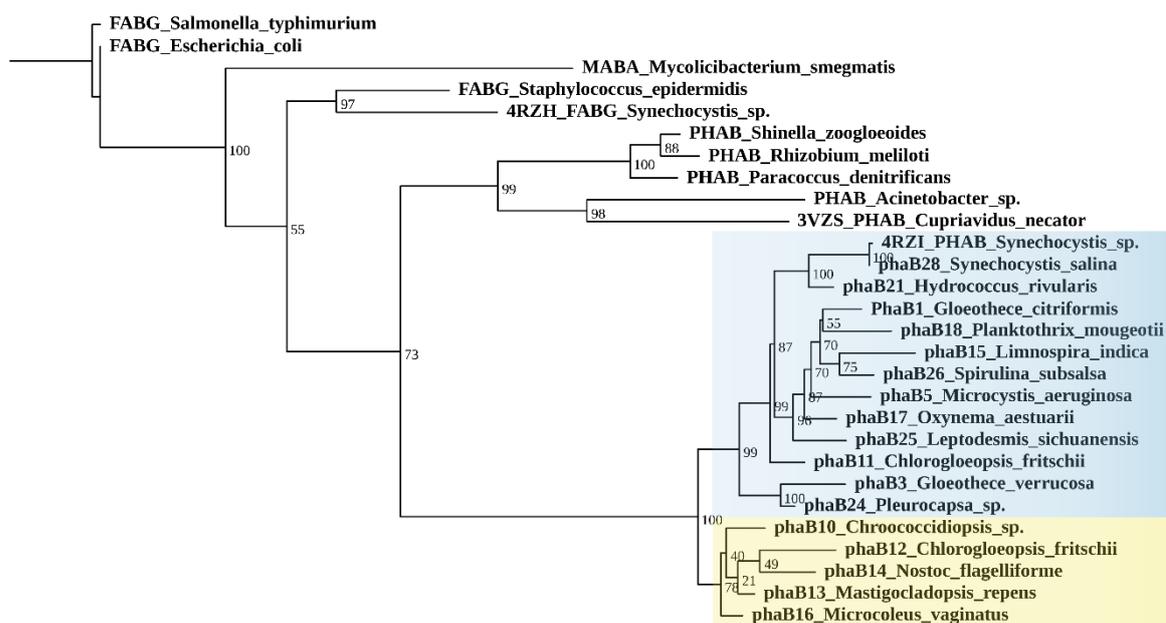


Figura 7 - Árvore gênica do gene *phaB*. Os genes *phaB* das cianobactérias estão destacadas em azul e amarelo.

O clado das cianobactérias apresentou duas ramificações principais: a região da árvore filogenética destacada em azul apresenta a maioria das seqüências de cianobactérias, que não ficaram necessariamente agrupadas conforme as ordens filogenéticas das cianobactérias; a região destacada em amarelo apresentou três seqüências da ordem *Nostocales* (PhaB12, PhaB13 e PhaB14), possivelmente devido ao

fato de ser uma ordem monofilética de cianobactérias filamentosas bem conservadas (KOMÁREK et al., 2014). Outras sequências na região amarela incluem: PhaB10 e PhaB16, pertencentes às ordens Chroococciopsidales e Oscillatoriales, respectivamente. A espécie *Chlorogloeopsis fritschi* apresentou uma sequência (PhaB12) na região amarela e outras sequências (PhaB11) na região azul.

4.3 Modelagem molecular

Como descrito anteriormente no tópico 1.3.2, o domínio *Clamp-lid* é um domínio móvel que sofre mudanças estruturais ao interagir com o substrato. Portanto, um dos critérios estabelecidos para a seleção do molde utilizado na modelagem foi a inclusão do substrato e do cofator. Isso garantiu que os modelos gerados representassem o estado ativo da proteína.

Como resultado, foi selecionada uma estrutura cristalina de PhaB em complexo com CAA e NADPH da espécie *Rastonia Eutropha* (código PDB: 3VZS), uma bactéria heterotrófica amplamente utilizada na indústria para a produção de bioplástico (MATSUMOTO et al., 2013). Esta estrutura foi resolvida pelo método de difração de raio-X, com uma resolução de 2,14 Å, e não apresenta mutações. Além disso, essa proteína desempenha a mesma atividade funcional na via biossintética do PHA, e a identidade das sequências entre o molde e as proteínas alvos está em torno dos 40%.

Todas as sequências obtiveram valores de similaridade e cobertura adequados para gerar modelos de qualidade. Todos os resultados dos testes de validação apresentaram valores favoráveis, conforme os parâmetros recomendados pelos servidores. Os valores de QMEAN interpretados como de boa qualidade são valores próximos de zero, sugerindo uma boa concordância entre a estrutura do modelo e estruturas experimentais de tamanho similar. Pontuações que ultrapassam 4.0 ou -4.0 indicam modelos de baixa qualidade (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011). Os valores de QMEAN variaram -2.85 a -0.07, permanecendo dentro do desvio padrão aceitável.

Para que a estrutura seja validada pelo gráfico de Ramachandran, o modelo deve apresentar mais de 90% dos resíduos em regiões favoráveis, o que indica que a sua conformação é possível (WILLIAMS et al., 2018). Em nossos resultados, o menor resultado do gráfico de Ramachandran apresentou 92% dos resíduos em regiões favoráveis. O Prosa-Web apresentou *Z-score* variando de -8.3 a -9.5, estes valores estão

dentro da faixa de conformação nativa das proteínas semelhantes às depositadas no PDB (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

O ERRAT considera estruturas com resolução de 2–3 Å depositadas no PDB, geralmente apresentam fator de qualidade em torno de 90% e estruturas de alta resolução atingem cerca de 95%. Os resultados desta pesquisa apresentam fatores de qualidade entre 90.95 a 100%. Por fim, o RMSD foi calculado com base na sobreposição dos átomos C α das cadeias principais do molde e dos modelos, apresentando distâncias entre 0,068 a 0,181Å. Isso indica um desvio muito pequeno entre as posições atômicas das duas estruturas.

Dessa forma, os modelos gerados pelo SWISS-MODEL foram validados, devido aos resultados positivos dos valores de pontuação de qualidade geral e qualidade estereoquímica, conforme avaliados pelos quatro algoritmos de validação estrutural utilizados, além da alta sua similaridade à estrutura experimental, sugerida pelos baixos valores de RMSD. Na Tabela 6, são apresentados os valores de identidade e cobertura de cada modelo em relação ao molde, bem como os resultados de validação das enzimas.

Tabela 6 - Resultados da validação dos modelos da enzima PhaB produzidos pelo servidor SWISS-MODEL.

ID	Molde (3VZS)		Gráfico de Ramachandran		QMEAN	ProSA	ERRAT	RMSD
	Identidade	Cobertura	Favoráveis	Não favoráveis				
PhaB1	42.06%	97%	94.37%	0.87%	-1.59	-8.56	95.455	0.068
PhaB3	38.63%	97%	94.92%	0.42%	-0.44	-8.87	96.429	0.135
PhaB5	39.57%	97%	96.07%	0.44%	-0.94	-8.67	93.665	0.082
PhaB10	41.81%	97%	96.54%	0.00%	-0.51	-9.27	95.516	0.158
PhaB11	41.20%	97%	96.10%	0.43%	-0.48	-9.52	98.618	0.094
PhaB12	39.06%	97%	95.67%	0.87%	-1.46	-9.37	97.321	0.105
PhaB13	39.43%	97%	95.67%	0.00%	-0.52	-9.32	98.667	0.089
PhaB14	41.63%	97%	95.24%	0.00%	-0.28	-9.17	96.444	0.141
PhaB15	40.35%	95%	94.37%	0.43%	-1.73	-9.33	97.222	0.08
PhaB16	41.06%	97%	95.67%	0.87%	-1.13	-8.3	100	0.181
PhaB17	38.21%	97%	95.24%	0.43%	-0.82	-9.27	97.778	0.103
PhaB18	39.48%	97%	93.94%	0.87%	-2.85	-8.32	92.889	0.119
PhaB21	42.54%	92%	94.81%	0.82%	-1.26	-9.02	98.649	0.080
PhaB24	38.63%	97%	96.19%	0.00%	-0.07	-8.57	99.13	0.154
PhaB25	38.63%	97%	95.24%	0.87%	-1.31	-8.73	96.364	0.137
PhaB26	40.34%	97%	93.94%	0.87%	-2.1	-9.02	94.222	0.139
PhaB28	41.20%	97%	92.64%	0.43%	-2.72	-8.76	90.95	0.095

As enzimas PhaB foram descritas estruturalmente como contendo uma estrutura típica de dobra de Rossmann, composta por sete folhas β e oito hélices α (LIU et al., 2015). Embora a estrutura geral seja altamente análoga, algumas diferenças foram encontradas entre as PhaBs de cianobactérias e a referência (3VZS). As PhaBs 1, 5, 15, 25, 26 e 28 apresentaram apenas seis folhas β , conforme ilustrado na figura 8. A folha β ausente é descrita como β_3 na 3VZS, esta região foi substituída por uma região flexível nas cianobactérias citadas, no alinhamento da figura 9, é possível perceber que a região β_3 é pouco conservada. Também foi observado que a maioria das PhaBs de cianobactérias não possuem a hélice α_2 presente na 3VZS, pois essa região não está presente nas cianobactérias, conforme mostrado no alinhamento na figura 9, apenas os modelos PhaB3, PhaB13, PhaB16 e PhaB24 apresentaram uma pequena hélice na mesma região da α_2 .

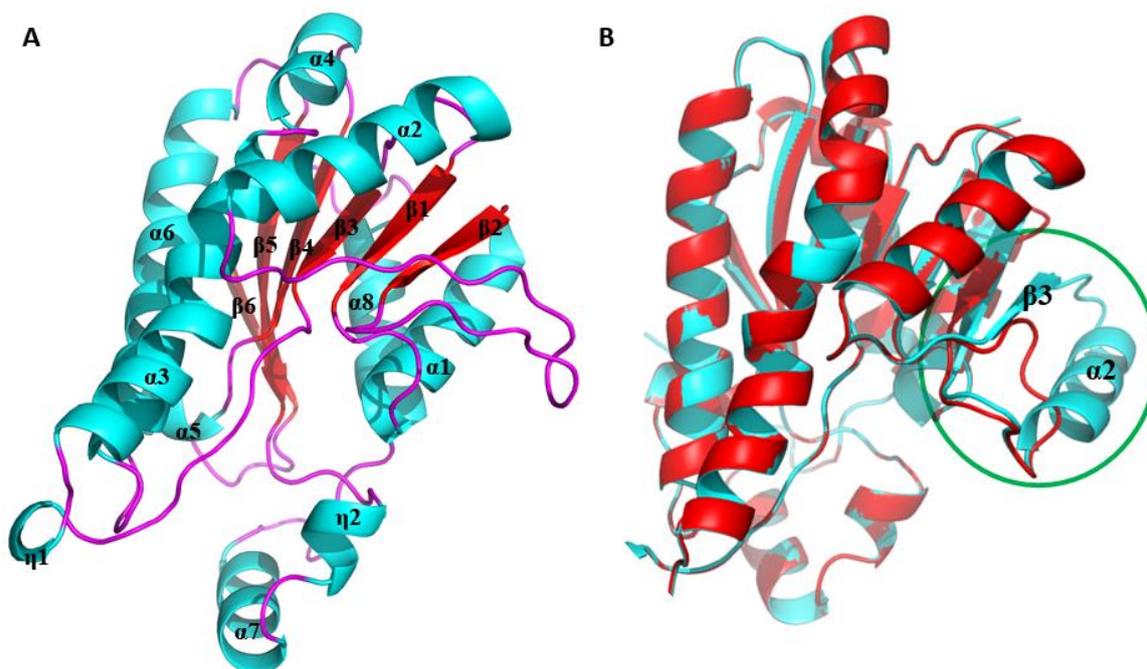


Figura 8 – Modelo estrutural das cianobactérias (A) Visão geral do modelo PhaB1. O modelo é colorido segundo suas estruturas secundárias: α hélices em ciano, β fitas em vermelhos e loops em magenta. (B) Alinhamento da PhaB5 (vermelho) com a 3VZS (ciano). O destaque com o círculo verde indica a região onde a 3VZS apresenta a hélice α_2 e a folha β_3 enquanto, na mesma região, a cianobactéria apresenta um loop.

A folha β central adotou a topologia $\beta_7\beta_6\beta_5\beta_4\beta_1\beta_2\beta_3$ para as cianobactérias com sete folhas β e $\beta_6\beta_5\beta_4\beta_3\beta_1\beta_2$ para as cianobactérias que apresentaram seis folhas β , que

estão envolvidas pelas hélices $\alpha 1$ e $\alpha 8$ de um lado e $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ e $\alpha 6$ do outro lado. As hélices $\alpha 3$ e $\alpha 6$ se estendem da dobra de Rossmann, criando uma fenda profunda, juntamente com a hélice $\alpha 7$, formando o segmento saliente do domínio *Clamp*, onde irá acoplar o ligante.

4.4 Atracamento molecular

Para a ancoragem dos ligantes, foram utilizados como referência o ligante e o cofator do modelo 3VZS, devido à descrição de como as estruturas devem estar posicionadas para a função catalítica já está bem descrita. Isso evita conformações errôneas e colisões entre as moléculas, que compartilham a mesma cavidade.

A figura 9 apresenta o alinhamento de algumas sequências das enzimas PhaB de cianobactérias e das referências 4RZI e 3VZS, realizado por meio do servidor ESPript 3.0 (<https://escript.ibcp.fr>). O alinhamento destaca as regiões de ligação ao substrato e ao cofator, bem como outras regiões importantes da enzima para o reconhecimento dos ligantes. O alinhamento de todas as sequências está presente no apêndice A.

As regiões destacadas na figura 9 foram obtidas a partir das interações descritas experimentalmente da espécie *Ralstonia eutropha* (KIM et al., 2014; MATSUMOTO et al., 2013). Como é possível observar, os aminoácidos da tríade catalítica são altamente conservados (triângulos roxos), as regiões próximas a eles também apresentam um bom grau de conservação. A tríade catalítica está localizada na região de alça que conecta a hélice $\alpha 5$ e a hélice $\alpha 6$. A região do domínio *Clamp-lid*, exibe uma diversidade considerável entre as sequências.

Em relação aos resíduos destacados que interagem com o cofator, os resíduos que mantêm interação com a porção nicotinamida do NADPH (de acordo com o 3VZS) são Pro177, Gly178, Ile180, Thr182 e Val185. Esses resíduos se mantiveram bem conservados, exceto Val185, que não manteve conservação. A porção dinucleotídica é estabilizada pelos resíduos Gly18, Gly19, Asn82, Gly84 e Thr86, além das cadeias laterais Arg45, Tyr147 e Lys151, sendo que apenas o Gly18 e Arg45 não são conservadas. A adenosina 3'-fosfato interage com as cadeias principais de Gly40 e Gly54 e as cadeias laterais de Ser43, Arg45 e Asn55, como é possível perceber, é uma região sem conservação.

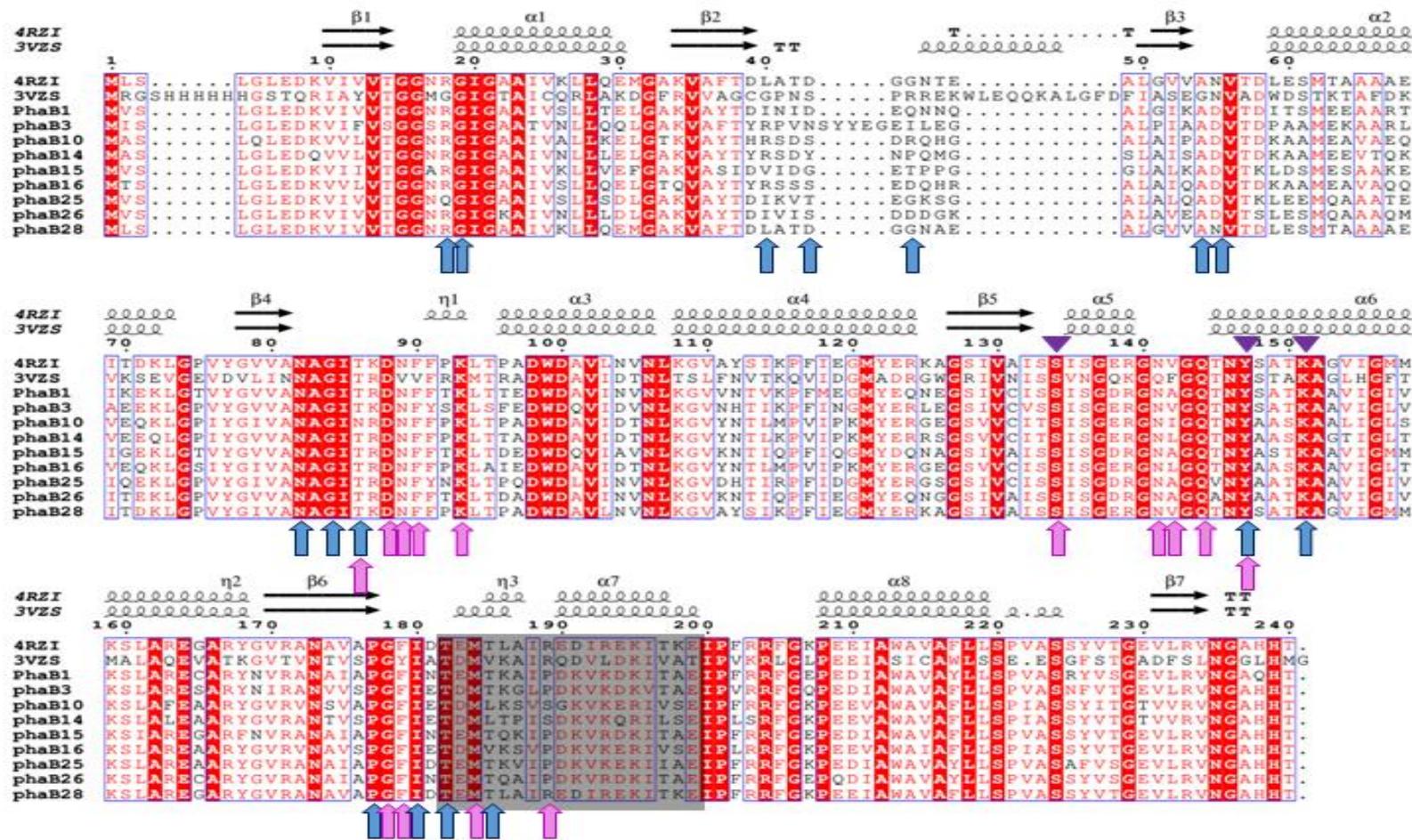


Figura 9 - Alinhamento múltiplo de sequência para PhaB de cianobactérias e a referência 3VZS e 4RZI. Em destaque apresenta regiões de interação descritas experimentalmente com o cofator em setas azuis, com o substrato em setas rosas, o domínio Clamp-lid está apresentado pelo retângulo cinza e a tríade catalítica por triângulos roxos.

Adjacente ao sítio de ligação do NADPH está a molécula de CAA, o anel de nicotinamida do NADPH realiza contato com a porção acetoacetil, onde ocorre a redução catalítica de CAA em (R)-3-hidroxi-butiril-CoA (WANG et al., 2021). A estrutura dos ligantes está apresentada na figura 10.

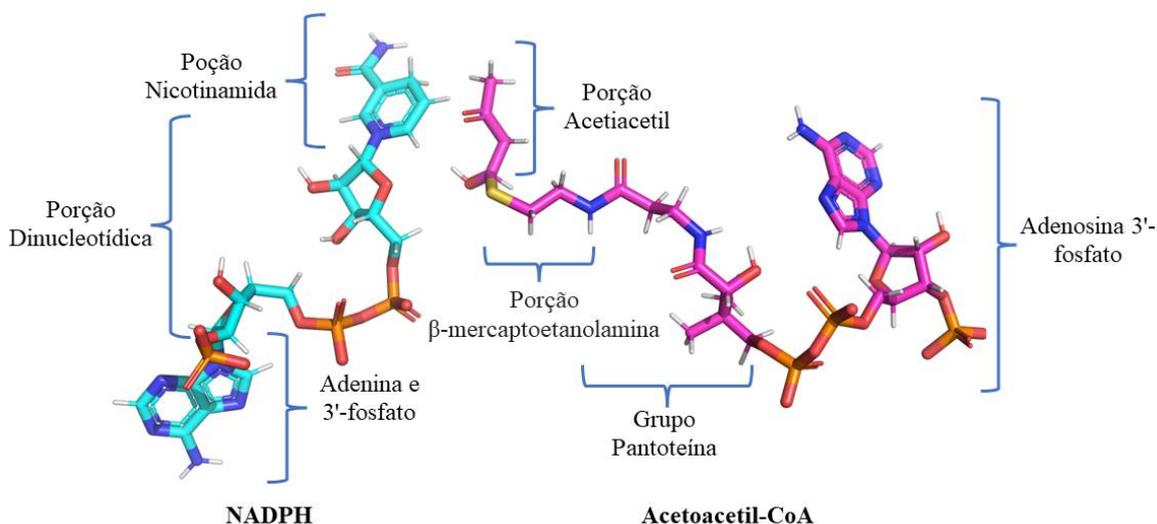


Figura 10 - Estrutura tridimensional dos ligantes que participam do complexo PhaB.

A porção acetoacetil é reconhecida pelos resíduos Ser134, Gln144, Tyr147 Gly178, Met184, todos bem conservados. O grupo pantotéico interage com os resíduos Thr86, Asp88, Val89, Val90, Gln141, Gln144, Tyr179, os resíduos Val89, Val90, Gln141 e Tyr179 não são conservados em cianobactérias, sendo substituído por Asn89, Fen90, Asn141, Fen179. A porção de adenosina 3'-fosfato interage com Lys93, Phe142 e Arg189, os resíduos Phe142 e Arg189 não são conservados. A figura 11 apresenta as regiões de interação destacadas no alinhamento, representadas em um modelo tridimensional de cianobactérias que foi gerado.

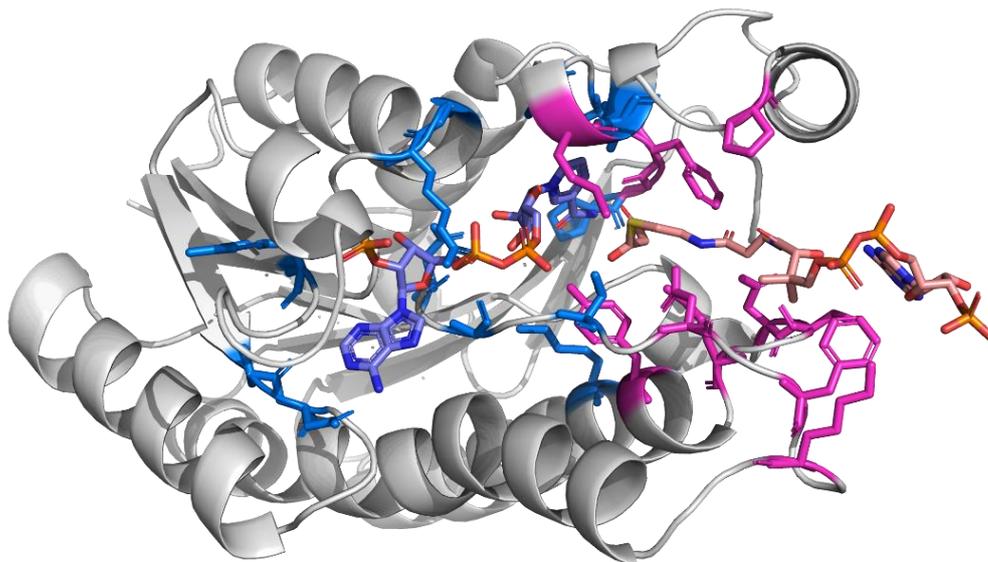


Figura 11 – Estrutura representativa do resultados de atracamento, regiões em azul interagem com o cofator, em magenta interage com o ligante.

Os resultados do atracamento molecular foram promissores, apresentando valores de Moldock score entre -65,77 e -126,75, considerando que os *scores* negativos são indicadores de sucesso de atracamento, valores mais negativos representam melhores resultados. O RMSD variou de 1,2 a 3,5 Å, indicando pequenos desvios entre a posição atômica inicial e da conformação selecionada. Para fins de comparação, o atracamento dos controles foi realizado, o 3VZS obteve o melhor resultado com Moldock score de -142,73 e RMSD de 0,86, enquanto o 4RZI obteve resultados próximos das outras cianobactérias. Dessa forma, é possível concluir que os resultados do atracamento foram satisfatórios. Os resultados do atracamento estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Resultado do atracamento molecular das enzimas PhaBs do programa Molegro Virtual Docker.

ID	Moldock score	Re-rank score	Hbond	RMSD (Å)
PhaB1	-95.21	-61.09	-3.96	2.16
PhaB3	-95.60	-56.84	-6.95	1.97
PhaB5	-120.36	-91.73	-7.62	1.72
PhaB10	-92.63	-58.71	-4.93	1.80
PhaB11	-88.71	-53.83	-6.81	1.25
PhaB12	-70.65	-40.36	-4.89	2.62
PhaB13	-112.11	-44.82	-9.48	3.56
Phab14	-65.77	-38.33	-4.56	2.19
Phab15	-107.95	-80.30	-4.87	1.85
PhaB16	-98.73	-33.86	-5.48	2.23
Phab17	-111.98	-79.07	-8.56	1.77
PhaB18	-85.67	-33.41	-6.78	1.92
PhaB21	-109.24	-63.12	-5.99	1.70
Phab24	-126.75	-79.36	-8.83	1.75
Phab25	-86.31	-51.31	-3.54	2.17
PhaB26	-107.23	-81.93	-7.20	1.37
PhaB28	-121.74	-64.04	-14.38	1.21
3VZS	-142.73	-90.54	-11.56	0.86
4RZI	-117.09	-84.08	-6.63	1.91

4.5 Dinâmica molecular

Nessa etapa, foram realizadas simulações de DM dos complexos proteína-ligante obtidos na etapa de ancoramento molecular. Cada complexo foi simulado em triplicata para obter resultados mais confiáveis. Para avaliar a estabilidade estrutural da proteína, substrato e cofator, foram gerados gráficos de RMSD e para avaliar as regiões flexíveis da proteína, foram gerados gráficos de RMSF. Os modelos com melhor desempenho em termos de energia livre de ligação foram selecionados para apresentação em triplicata, enquanto os demais resultados estão disponíveis no Apêndice B..

As duas enzimas controle (“4RZI” e “3VZS”) foram essenciais para parametrizar as análises. Avaliando a triplicata de RMSD da 3VZS, percebe-se que a enzima manteve uma variação de 1 a 2 Angstroms (Å) em todas as réplicas. O CAA apresentou oscilações entre 1 a 1,5 Å, enquanto o NADPH teve mais picos de oscilações, variando entre 1 a 3 Å. Nos gráficos de RMSF, poucos resíduos mostraram flutuações acima de 2 Å. Os resíduos entre 90 e 110 tiveram maior variação, correspondendo a uma região de loop que faz parte da base do domínio *Clamp-base* e interage com o NADPH e o CAA. No estudo

de Kim e colaboradores, essa região foi descrita sem grandes alterações conformacionais durante a ligação com o substrato. A região do *Clamp-lid*, entre os aminoácidos 185 e 210, responsável por manter o ligante estável, variou entre 1 a 1.5 Å (KIM et al., 2014).

Avaliando o segundo controle, a enzima 4RZI também manteve uma variação de 1 a 2 Å. O NADPH apresentou uma estabilidade semelhante à da enzima, variando entre 1 a 2 Å, enquanto o CAA teve dificuldade de se estabilizar, com oscilações de até 6 Å. Segundo o RMSF, os resíduos entre 30 e 45 apresentaram maior flutuação, que variaram até 4 Å. Esta região é um loop próximo à adenosina 3'-fosfato do NADPH. Outras regiões que variaram próximo de 2 Å foram a região *Clamp-base* e o *Clamp-lid*.

Esses resultados servirão como parâmetros para comparar com as enzimas de cianobactérias estudadas, permitindo compreender como a enzima PhaB de uma bactéria já aplicada a produção industrial e de uma cianobactéria, bastante estudada na produção de PHA, se comportam. Os resultados estão apresentados nas figuras 12 e 13.

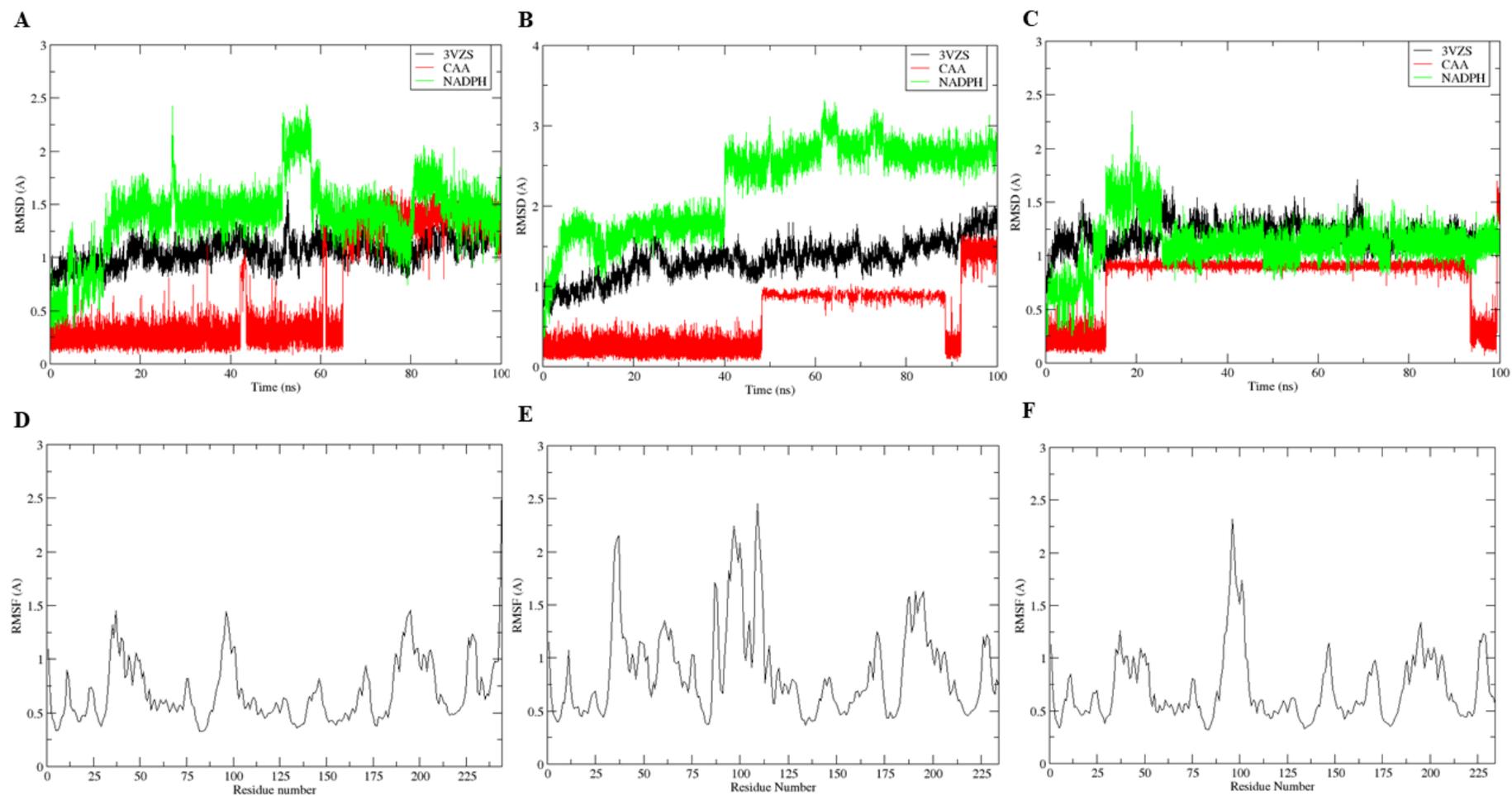


Figura 12 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) do controle 3VZS no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.

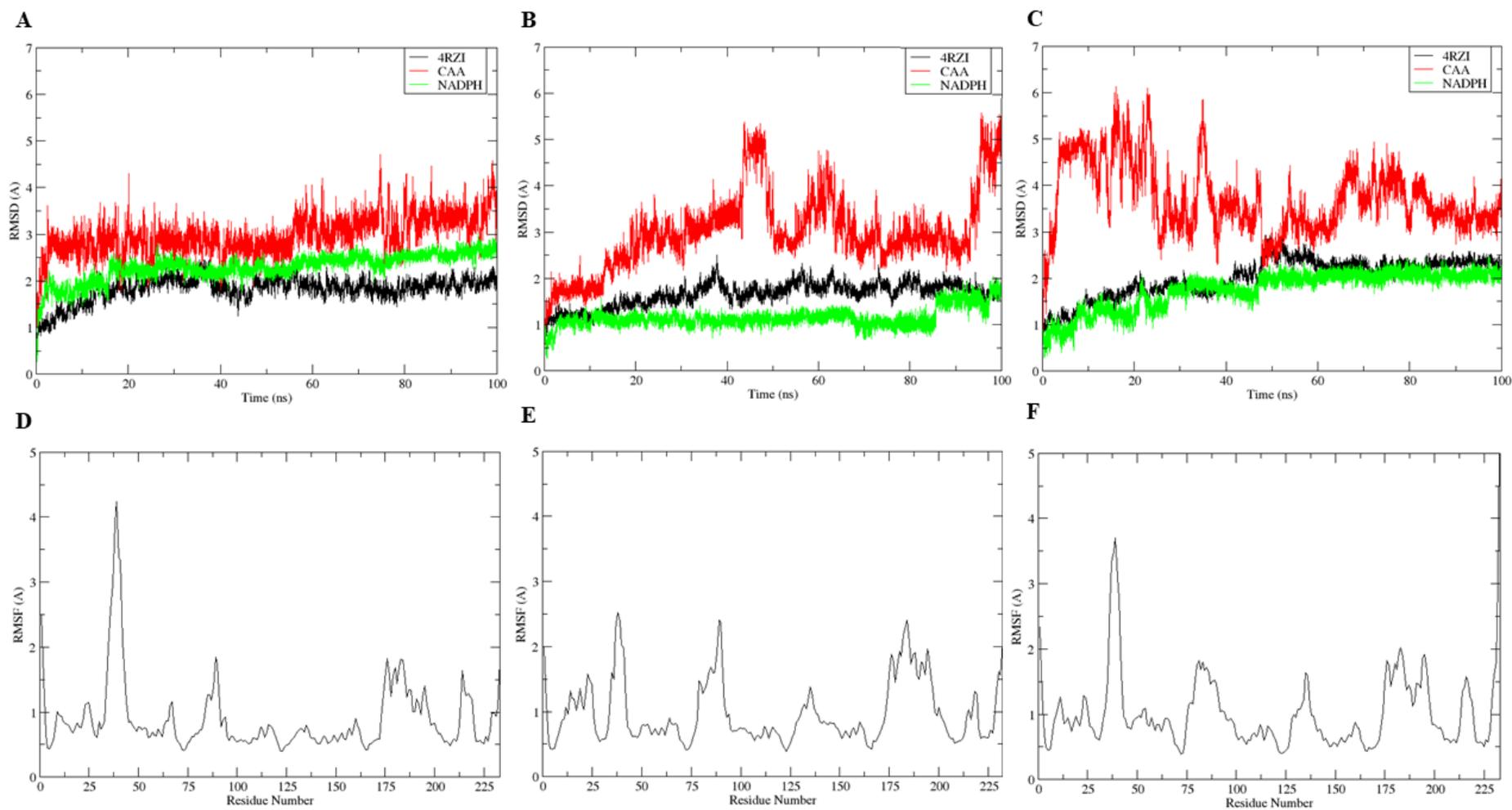


Figura 13 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) do controle 4RZI no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.

Avaliando os resultados das cianobactérias, observa-se que o RMSD das enzimas, na maioria das dinâmicas, manteve uma variação de 1 a 2 Å, sem oscilações abruptas. O NADPH, na maioria delas, manteve variações de até 3 Å, sendo a PhaB21 a que mais teve dificuldade em estabilizar o NADPH. Em relação ao CAA, as cianobactérias apresentaram maior dificuldade em manter a estabilidade, similar ao controle 4RZI, com oscilações de até 6 Å.

Nos gráficos de RMSF, os picos de destaque foram em regiões semelhantes às apresentadas pelos controles, com os maiores picos na região do loop em contato com a adenosina 3'-fosfato do NADPH, enquanto a região da *Clamp-base* e *Clamp-lid* mantiveram-se, na maioria, com variações próximas a 2 Å. Os resultados estão apresentados nas figuras 14, 15 e 16.

Foi descrito que o CAA se liga de forma menos rigorosa ao PhaB em comparação com o NADPH (KIM et al., 2014). Enquanto o grupo acetoacetil fica mais enterrado na proteína, próximo à nicotinamida do NADPH, a porção adenosina 3'-fosfato permanece exposta na superfície. Na figura 18, é apresentada a conformação do ligante CAA na enzima PhaB5, representada pelo alinhamento da conformação final de duas réplicas e pela mudança de conformação durante a trajetória de 100ns de uma réplica.

Avaliando a trajetória, é possível perceber que as maiores mudanças conformacionais ocorreram na porção adenosina 3'-fosfato, devido à sua localização mais exposta e à menor interação com a proteína. Assim, pode-se presumir que a região acetoacetil, onde ocorre a reação de oxirredução, se manteve estável, enquanto a região mais exposta, teve maior dificuldade de ser estabilizada pela proteína.

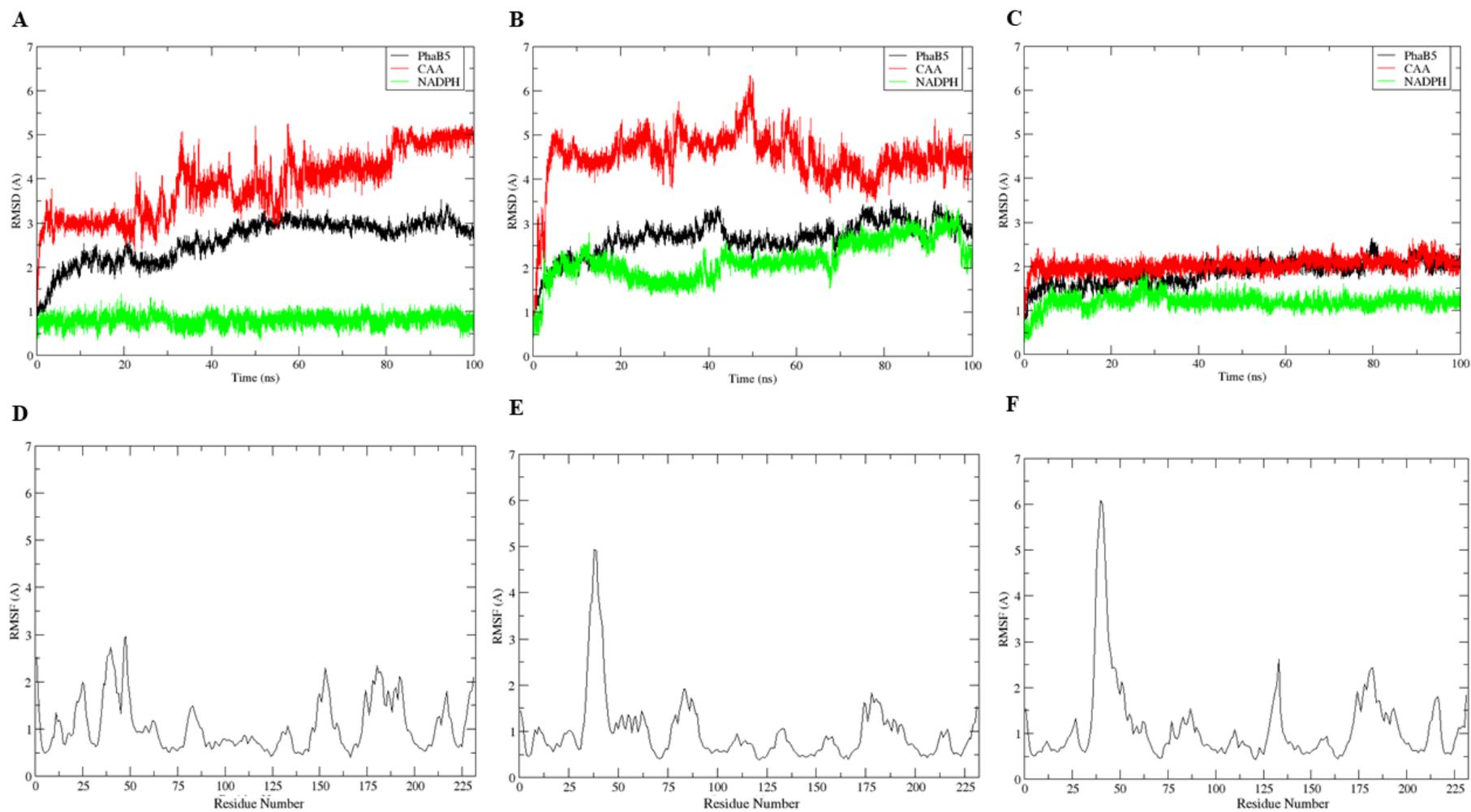


Figura 14 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) da PhaB5 no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.

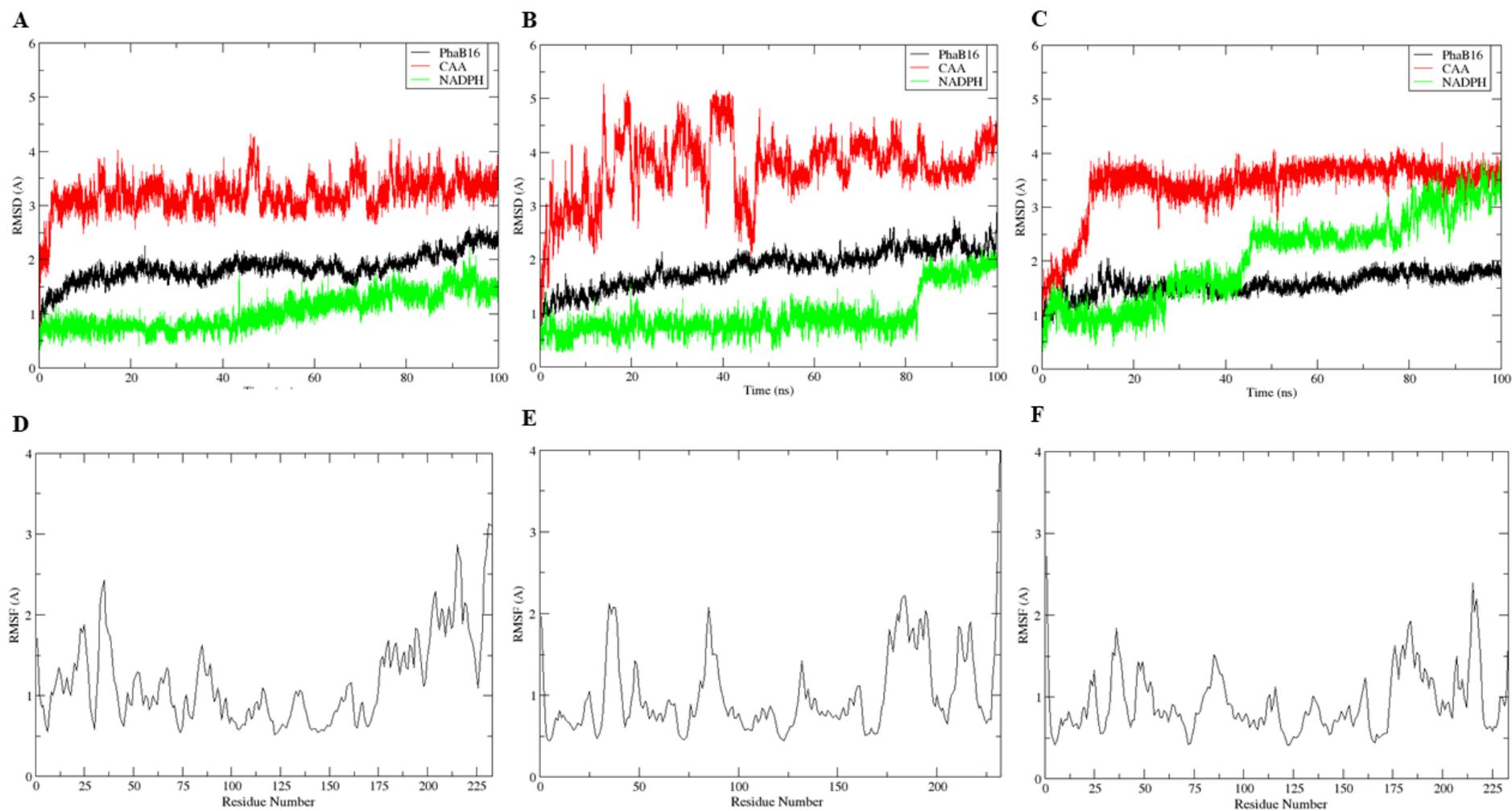


Figura 15 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) da PhaB16 no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.

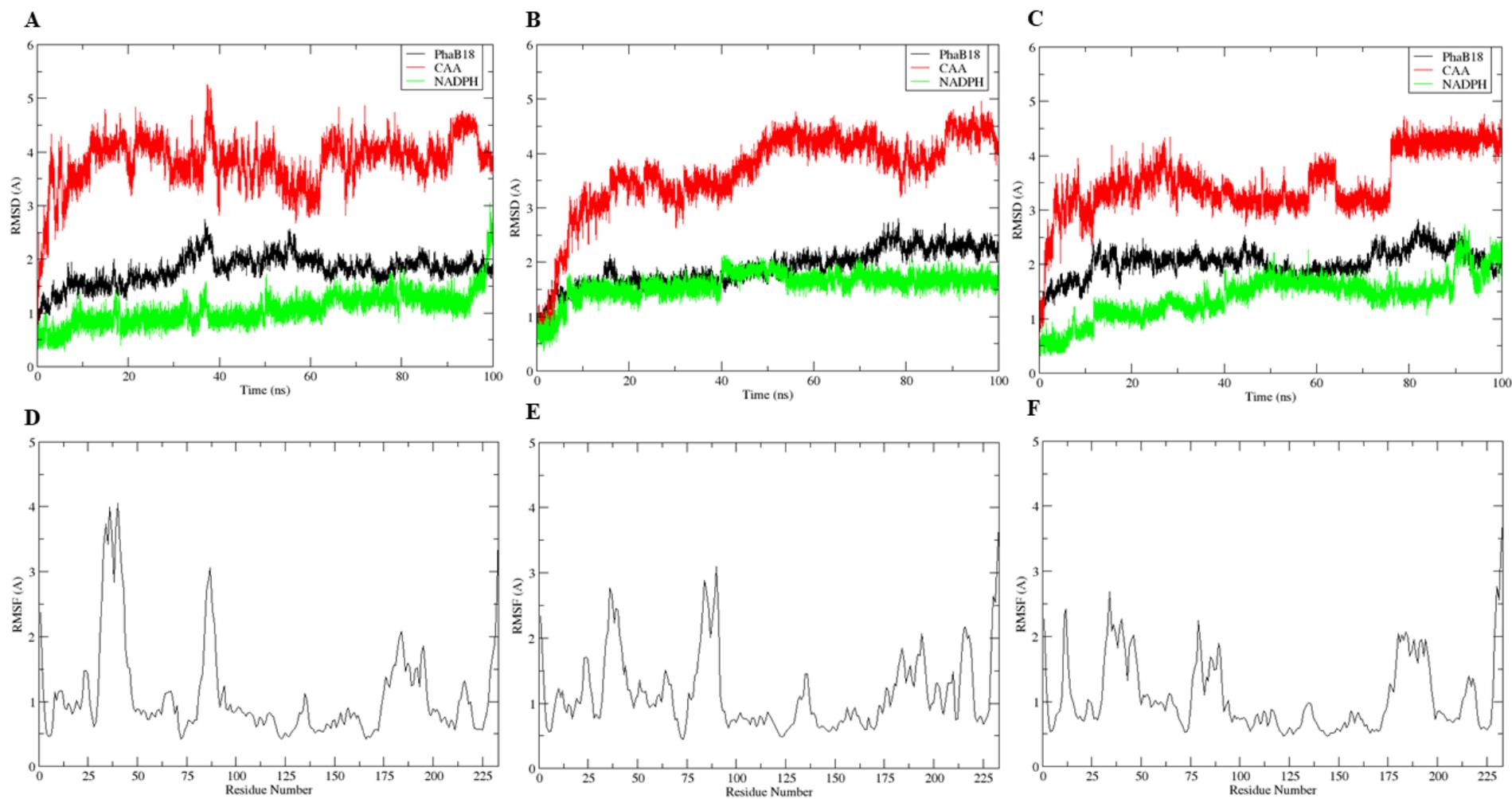


Figura 16 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) da PhaB18 no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.

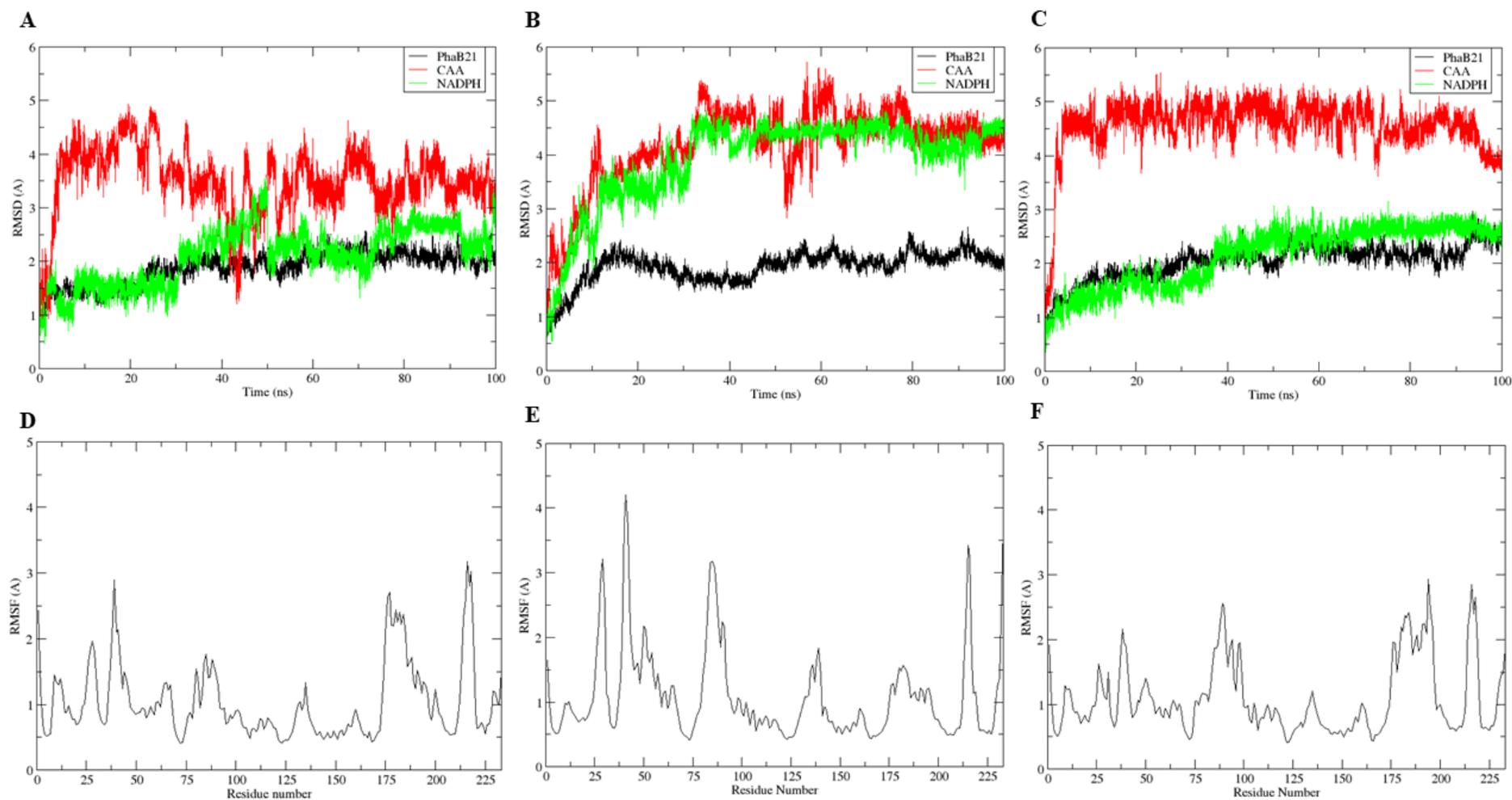


Figura 17 - Gráficos de RMSD (A, B e C) e RMSF (D, E e F) da PhaB21 no decorrer de 100 ns de simulação, cada gráfico apresenta uma réplica.

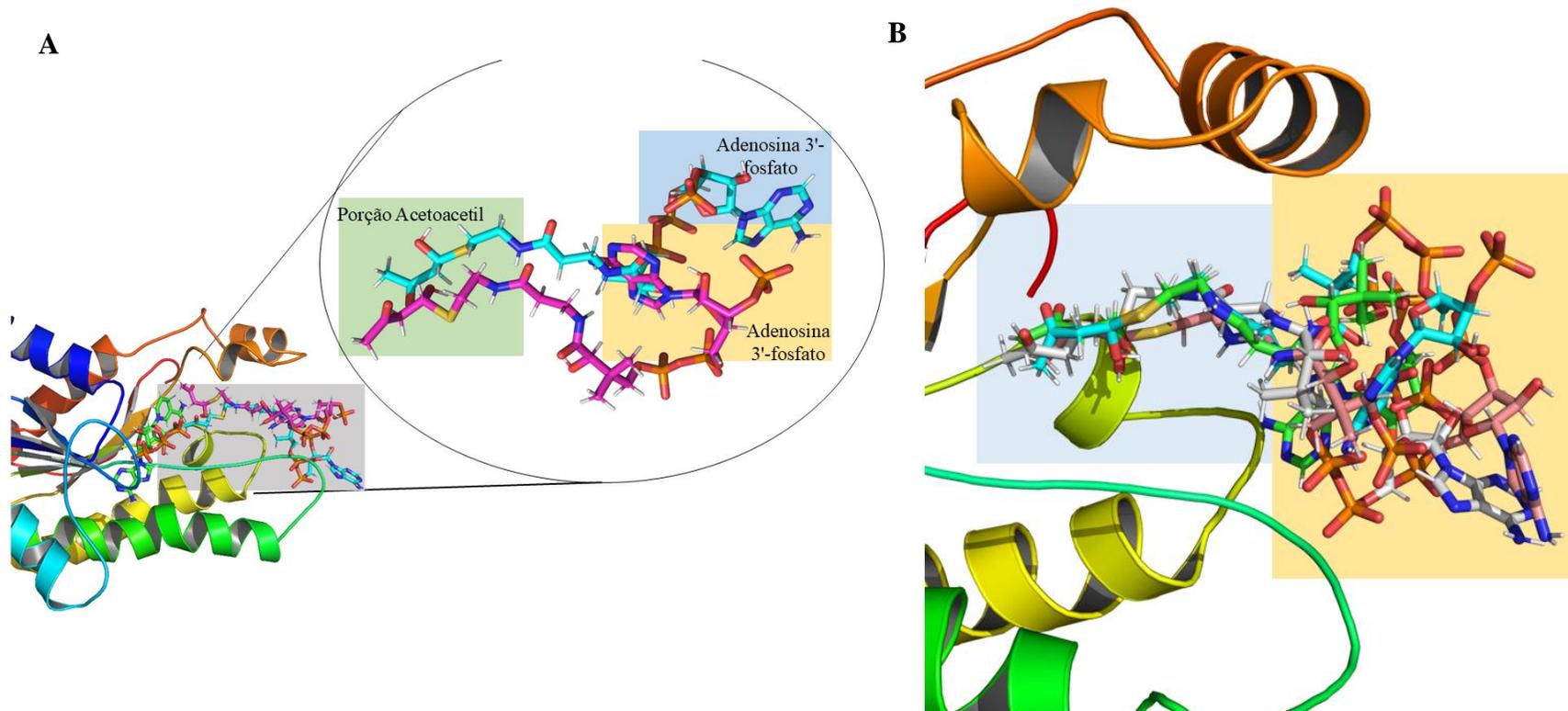


Figura 18 - Visão geral da conformação do acetoacetil-CoA na enzima PhaB5. (A) Alinhamento tridimensional da conformação final do ligante CAA após 100 ns de DM, das réplicas 1 (ciano) e 3 (rosa). (B) Representação da conformação tridimensional do CAA durante 100ns da réplica 1. O bloco azul claro está destacando a região acetoacetil e o bloco laranja está destacando a porção adenosina 3'-fosfato.

4.6 Cálculo de energia livre de ligação

A energia livre de ligação fornece uma estimativa quantitativa da afinidade de ligação entre moléculas, permitindo estimar a estabilidade estrutural e avaliar as contribuições de resíduos individualmente por meio da análise de decomposição de energia livre, assim prevendo a eficácia de interações moleculares.

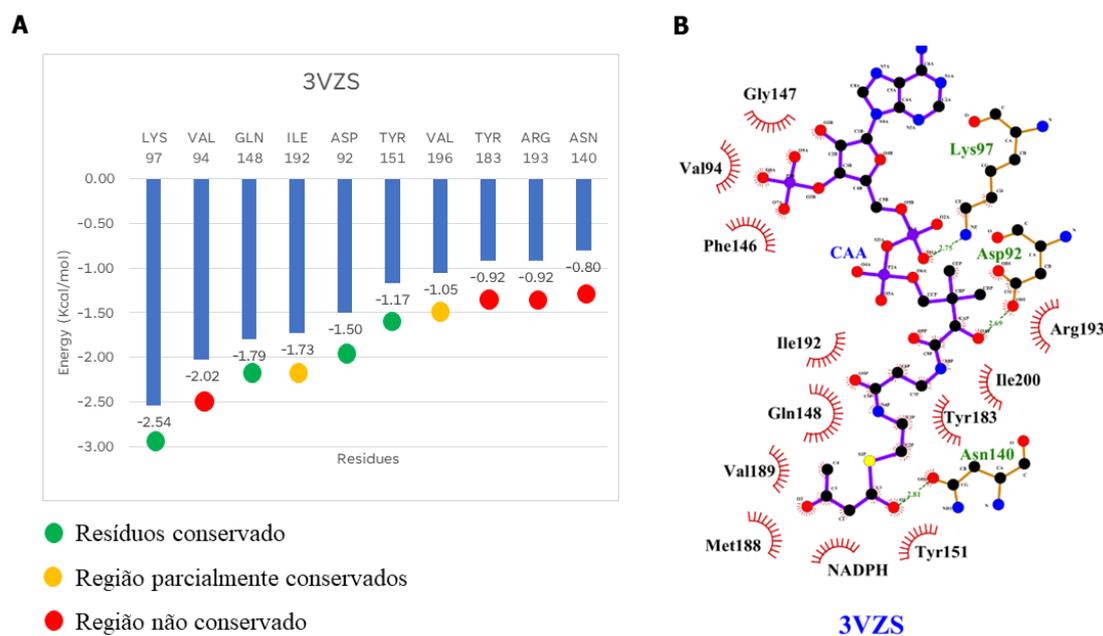
Os resultados apresentados na tabela 8 mostram as triplicatas de cada enzima, incluindo os valores médios, desvio padrão e erro padrão da média da energia livre de ligação. Os melhores resultados foram aqueles que apresentaram a menor energia média nos cálculos MM-PBSA e MM-GBSA, juntamente com menores discrepâncias entre as réplicas. Avaliando os resultados dos controles, foi observado que a enzima 3VZS obteve valores de energia mais negativos em comparação com a enzima 4RZI, ficando em torno de -30 kcal/mol. Esses resultados foram utilizados como parâmetro para selecionar as enzimas apresentadas na tabela.

Tabela 8 - Resultado dos cálculos de energia livre pelos métodos MM/PBSA e MM/GBSA, em kcal/mol.

ID	MMGBSA	Std. Dev.	Std. Err. of Mean	MMPBSA	Std. Dev.	Std. Err. of Mean
3VZS	-27.1826	3.4275	0.3411	-31.7061	3.2573	0.3241
	-30.038	3.7586	0.3740	-31.0868	5.2168	0.5191
	-30.0804	4.3011	0.428	-34.6778	5.2898	0.5264
4RZI	-24.6277	3.2765	0.326	-25.6445	4.1208	0.41
	-18.3068	2.5768	0.2564	-21.8675	3.8555	0.3836
	-17.707	3.8976	0.3878	-18.0355	6.4128	0.6381
PhaB5	-41.5517	4.3733	0.5599	-39.0299	4.1586	0.5325
	-39.2922	3.4799	0.3463	-40.4533	4.2165	0.4196
	-51.7638	3.4378	0.3421	-42.9738	4.7482	0.4725
PhaB16	-35.119	3.6885	0.367	-44.3699	4.0658	0.4046
	-33.8187	4.4835	0.4461	-40.0528	4.9309	0.4906
	-34.7447	4.2693	0.4248	-35.0565	7.0995	0.7064
PhaB18	-35.6995	3.6192	0.4634	-33.8019	4.1888	0.5363
	-37.135	4.078	0.4058	-31.7535	4.5149	0.4492
	-37.4455	4.4033	0.4381	-39.6286	4.7205	0.4697
PhaB21	-39.2148	3.3086	0.4236	-35.2111	3.3962	0.4348
	-30.4867	2.7566	0.3529	-30.9048	3.9203	0.5019
	-34.574	4.2728	0.4252	-35.9489	4.8002	0.4776

Os resultados indicam que a enzima PhaB5 é a mais promissora, pois obteve os valores de menor energia em comparação com as outras enzimas. Todas as outras enzimas mencionadas na tabela apresentam valores acima do controle 3VZS. Isso indica que, embora as enzimas não tenham conseguido manter o CAA completamente estável, ainda assim houve uma grande afinidade no complexo proteína-ligante, sugerindo que essas enzimas podem ser potenciais candidatas para a aplicação na via biossintética de PHA em cianobactérias.

Para entender de forma mais detalhada as interações, foi realizada a decomposição de energia dos resíduos entre os estados ligado e não-ligado ao CAA. Isso permitiu avaliar a contribuição de cada resíduo da proteína, de forma que, quanto menor a energia média, maior a contribuição do respectivo resíduo para a interação com o ligante. Além disso, foi elaborado um mapa de interação dos resíduos com o ligante utilizando o software LigPlot+, a partir dos arquivos obtidos ao final da simulação (100 ns). Este mapa permite demonstrar e compreender os tipos de interações intermoleculares que ocorreram nos complexos. Foram selecionados os resultados que tiveram menor energia e maior estabilidade para serem apresentados, as figuras 19 e 20 mostram os resultados dos controles.



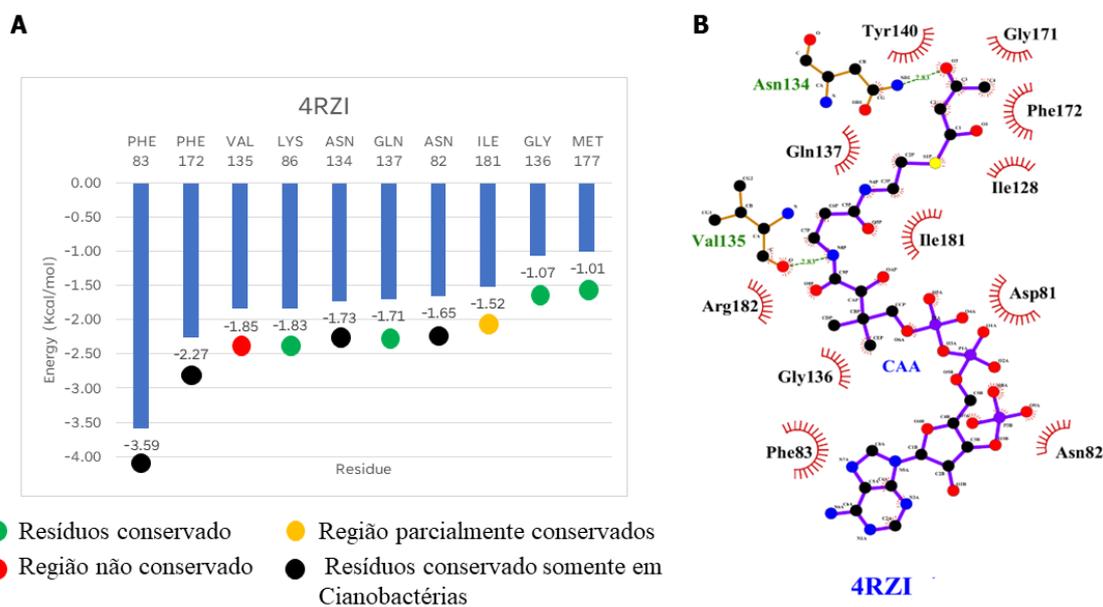


Figura 20 - Representação detalhada da interação intermolecular entre o ligante CAA e o controle 4RZI. (A) Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 10 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante. Os círculos coloridos indicam o nível de conservação dos resíduos, conforme a legenda. (B) Mapas de interações 2D entre os resíduos e o ligante CAA.

Avaliando os resultados dos controles, observa-se que as interações hidrofóbicas foram mais frequentes do que as interações por pontes de hidrogênio. A decomposição de energia da enzima 3VZS revelou quais resíduos tiveram as interações mais importantes. Os círculos coloridos indicam o nível de conservação desses resíduos, sendo que seis dos dez resíduos estavam conservados e parcialmente conservados.

Para compreender melhor o comportamento do complexo, o mapa de interação mostrou que os resíduos interagiam principalmente com a porção acetoacetil e o grupo pantoteína, enquanto a porção adenosina 3'-fosfato teve poucas interações hidrofóbicas. Também foi observado a interação hidrofóbica do cofator NADPH. Das pontes de hidrogênio formadas, apenas o resíduo Asn 140, que interage com a porção acetoacetil, não é conservado.

Os resíduos discutidos anteriormente no tópico de atracamento molecular apareceram no mapa de interação, indicando que a dinâmica foi bem-sucedida. Observa-se que quatro dos resíduos que apresentaram as maiores contribuições energéticas não são conservados nas cianobactérias.

Em relação à enzima 4RZI, a avaliação da decomposição de energia mostrou que a maioria dos resíduos correspondiam às regiões de destaque na figura 9, indicando que a dinâmica ocorreu de forma similar à 3VZS. Entre os círculos coloridos, foi adicionado a cor preta que indica a conservação dos resíduos somente em cianobactérias. Observa-se que quatro resíduos estão destacadas dessa forma, indicando que esses resíduos não estão presentes na enzima 3VZS. Isso fornece um parâmetro sobre a importância dos resíduos encontrados em cianobactérias para a interação.

Avaliando os resultados das cianobactérias de uma perspectiva geral, observam-se algumas similaridades com os controles. As interações hidrofóbicas foram as mais frequentes, e poucas pontes de hidrogênio. A porção central do CAA apresentou mais interações hidrofóbicas, enquanto a porção adenosina 3'-fosfato teve menos interações com as proteínas. Além disso, foram observadas interações hidrofóbicas envolvendo o NADPH em todas as enzimas. As figuras 21 - 24 mostram os resultados das cianobactérias.

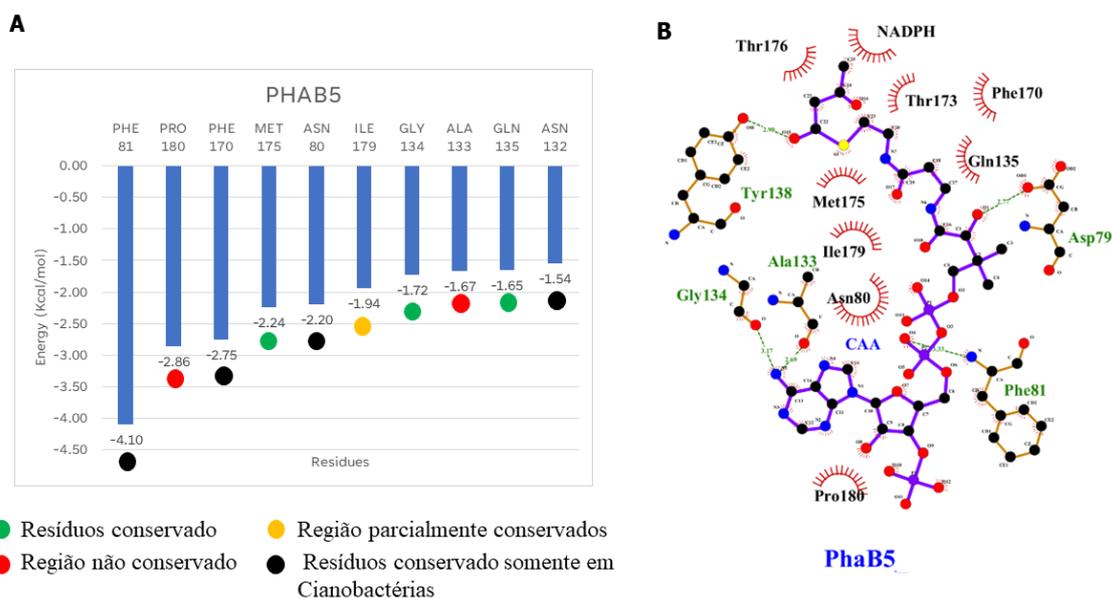


Figura 21 - Representação detalhada da interação intermolecular entre o ligante CAA e a enzima PhaB5. (A) Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 10 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante. Os círculos coloridos indicam o nível de conservação dos resíduos, conforme a legenda. (B) Mapas de interações 2D entre os resíduos e o ligante CAA.

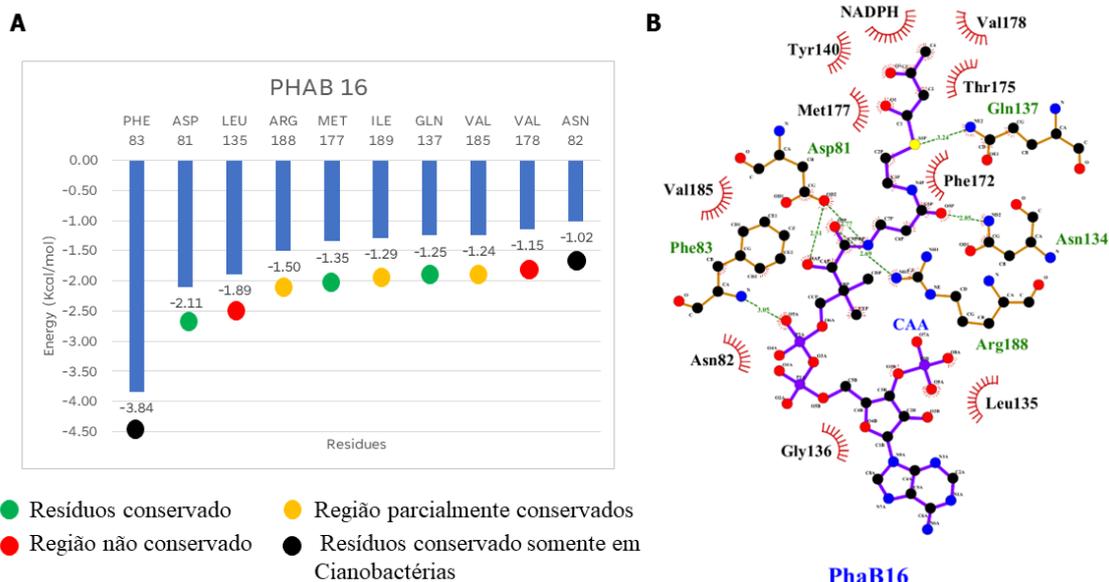


Figura 22 - Representação detalhada da interação intermolecular entre o ligante CAA e a enzima PhaB16. (A) Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 10 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante. Os círculos coloridos indicam o nível de conservação dos resíduos, conforme a legenda. (B) Mapas de interações 2D entre os resíduos e o ligante CAA.

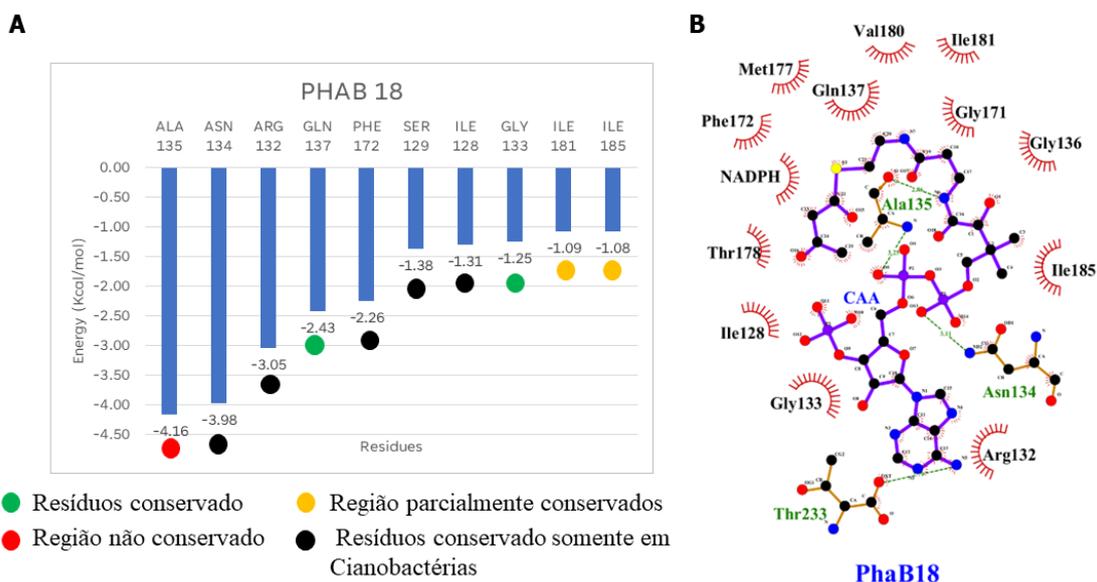


Figura 23 - Representação detalhada da interação intermolecular entre o ligante CAA e a enzima PhaB18. (A) Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 10 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante. Os círculos coloridos indicam o nível de conservação dos resíduos, conforme a legenda. (B) Mapas de interações 2D entre os resíduos e o ligante CAA.

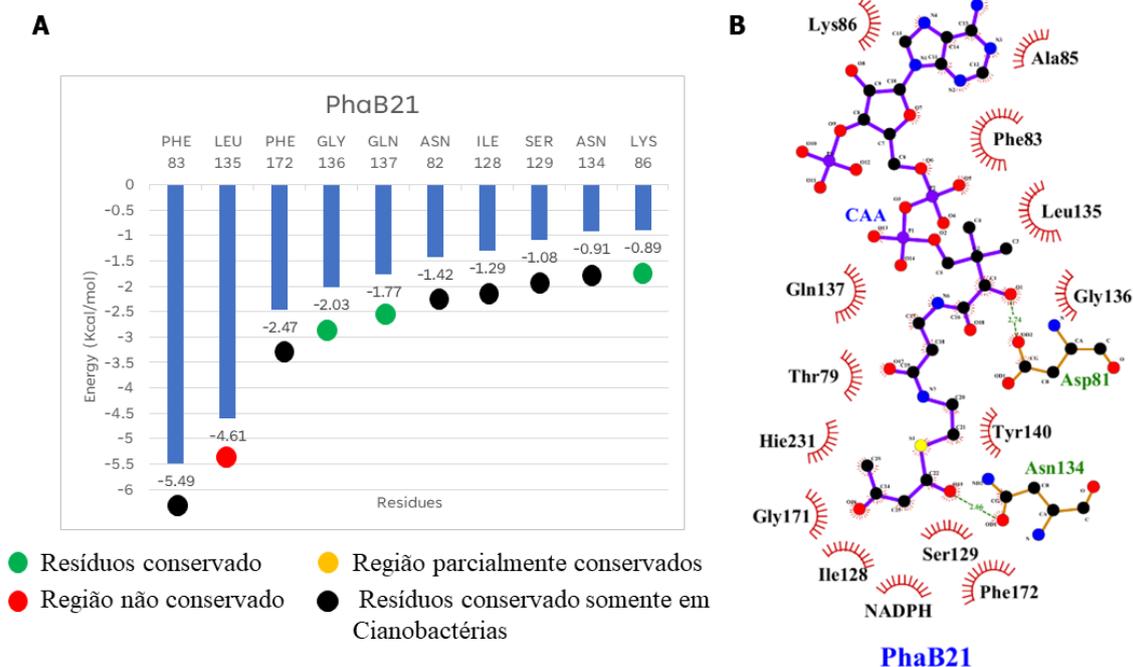


Figura 24 - Representação detalhada da interação intermolecular entre o ligante CAA e a enzima PhaB21. (A) Decomposição de energias pelo método MM/PBSA, com os 10 resíduos de aminoácidos que mais contribuíram com a interação ao ligante. Os círculos coloridos indicam o nível de conservação dos resíduos, conforme a legenda. (B) Mapas de interações 2D entre os resíduos e o ligante CAA.

Pelo gráfico de decomposição de energia, observou-se que certos resíduos estavam presentes na maioria das interações, incluindo nas amostras de controle. Estes resíduos já haviam sido destacados anteriormente pelo alinhamento, evidenciando sua relevância nas interações estudadas. A exemplo disso, o Gln 144 (posição de acordo com o alinhamento da figura 9) é um resíduo conservado que participa da estabilização do grupo pantoteína e está presente em todos os gráficos de decomposição de energia. Alguns resíduos conservados apenas em cianobactérias também foram prevalentes, como Asn89 (polar), Phe90 (apolar), Asn141 (polar) e Phe179 (apolar). Na 3VZS, esses resíduos correspondem a Val89 (apolar), Val90 (apolar), Gln141 (polar) e Try179 (polar), respectivamente. Esses resíduos também são responsáveis por estabilizar o grupo pantoteína.

A região 142 é uma região não conservada que também foi destaque desses resultados. Na 3VZS, ela é representada por uma Phe, na 4RZI por Val, na PhaB5 e na PhaB18 por Ala, e nas enzimas PhaB16 e PhaB21 por Leu, todos resíduos com características apolares que interagem com a porção adenosina 3'-fosfato.

5 DISCUSSÃO

Para melhorar a produção de PHA em cianobactérias, é fundamental entender e otimizar as vias metabólicas, os mecanismos regulatórios e os ambientes controlados em que essas cianobactérias operam (AFREEN et al., 2021b). A compreensão estrutural e a diversidade das enzimas envolvidas na via metabólica são aspectos fundamentais para alcançar essa melhoria. Há poucos estudos focados na funcionalidade e estrutura da enzima PhaB em cianobactérias. A exploração da biodiversidade dentro deste filo pode revelar informações valiosas sobre a variabilidade genética e funcional das enzimas, oferecendo diferentes capacidades para a síntese de PHA. Este estudo busca detalhar a estrutura e função da enzima PhaB, identificar variantes mais eficientes e contribuir para o entendimento geral da biologia e potencial biotecnológico das cianobactérias.

Este estudo iniciou-se com a análise de 128 espécies diferentes de cianobactérias, das quais apenas 28 apresentaram o gene *phaB*, alvo da pesquisa. Este resultado sugere que muitas cianobactérias podem não possuir o potencial genético para a produção de PHA, além de indicar que a capacidade de produção de PHA está distribuída entre diversas ordens e gêneros. No entanto, a ausência do gene *phaB* não pode ser atribuída exclusivamente à falta de potencial genético, pois a qualidade dos genomas disponíveis também pode influenciar. Genomas fragmentados ou incompletos podem dificultar a prospecção e detecção de genes de interesse.

A árvore gênica, na figura 7, mostrou que as enzimas PhaB das cianobactérias formaram um clado monofilético, distinto das enzimas da mesma família provenientes de espécies de bactérias heterotróficas. Isso sugere que as enzimas das cianobactérias tiveram uma evolução distinta das enzimas bacterianas, adaptando-se ao seu ambiente fotossintético e às suas necessidades metabólicas particulares (VEAUDOR et al., 2020).

Em um estudo que destaca a importância da transferência horizontal de genes para os genes envolvidos na biossíntese de PHA em microrganismos, observou-se que os genes *phaB* em cianobactérias estão agrupados na mesma ramificação filogenética e próximo de espécies de bactérias verdes não sulfurosas e de microalgas unicelulares (KALIA; LAL; CHEEMA, 2007), evidenciando a distinção evolutiva entre as enzimas das cianobactérias e as enzimas bacterianas heterotróficas. Além disso, outro estudo evidenciou a transferência horizontal do gene *PhaC* entre gêneros distantes de cianobactérias (HONG et al., 2021).

Esses achados reforçam os resultados encontrados na análise da árvore filogenética deste estudo, que revelou um clado cianobacteriano sem ramificações claramente definidas entre a maioria das ordens, sugerindo uma maior conservação das enzimas entre diferentes espécies. A exceção foi a ordem Nostocales, que apresentou sequências mais distintas das demais ordens, formando uma ramificação separada. Esses resultados indicam que a transferência horizontal de genes desempenhou um papel significativo na evolução dos genes envolvidos na via biossintética do PHA no filo Cyanobacteria, contribuindo para a distribuição e conservação observadas.

A construção estrutural *in silico* das enzimas proporcionou modelos de alta qualidade e validados em todos os testes. Os modelos revelaram que apesar da grande diversidade na sequência primária entre as enzimas de cianobactérias e de bactérias heterotróficas, a estrutura terciária demonstrou uma significativa identidade estrutural, conforme indicado pelo RMSD.

Foram identificadas apenas duas diferenças na estrutura secundária, no qual houve a substituição da hélice $\alpha 2$ e da folha $\beta 3$ por uma região flexível nas cianobactérias, esta região interage a região adenosina 3'-fosfato do NADPH. Esses elementos estruturais conferiram maior flexibilidade a essa região, conforme evidenciado pelos picos no RMSF. No entanto, o RMSD não revelou grandes variações que pudessem ser atribuídas a essa região, com todas as enzimas mantendo uma estabilidade estrutural similar ao controle e preservando a estabilidade do cofator na maioria dos sistemas.

Outro resultado observado no RMSD revelou que o ligante acetoacetyl-CoA apresentou instabilidade nas cianobactérias. Ao analisar a trajetória de 100 ns, foi identificado que essa instabilidade estava concentrada na porção adenosina 3'-fosfato localizado na região mais externa da enzima (Figura 18), resultando em uma maior variabilidade conformacional nessa região. Em contraste, a porção acetoacetyl, onde ocorre a reação catalítica, permaneceu próxima ao NADPH e enterrada na proteína, sugerindo uma estabilização efetiva dessa área. Esses achados indicam que, embora a extremidade externa do ligante seja mais flexível, a porção reativa mantém-se adequadamente posicionada, o que pode ser o principal determinante da afinidade entre a enzima e o ligante, e também o que garante a ocorrência da reação.

A dinâmica molecular identificou quatro enzimas com os melhores resultados de afinidade em comparação ao controle 3VZS: *Microcystis aeruginosa* FD4 (PhaB5), *Microcoleus vaginatus* PCC9802 (PhaB16), *Planktothrix mougeotii* LEGE 06226

(PhaB18), *Hydrococcus rivularis* NIES-593 (PhaB21), que são, respectivamente, das ordens *Chroococcales*, *Oscillatoriales* e *Pleurocapsales* e apresentam uma diversidade de 66-74% de identidade entre eles.

Os resultados das análises de MMGBSA e MMPBSA revelaram que estas cianobactérias apresentaram valores de afinidade superiores ao modelo 3VZS. A repetição das simulações mostrou que esses valores permanecem consistentes, o que confere maior confiabilidade aos dados obtidos. Além disso, observou-se uma similaridade nas interações residuais em comparação ao modelo 3VZS, o que reforça a estabilidade do complexo. Dentre as enzimas analisadas, o PhaB5 se destacou por apresentar os maiores valores de afinidade.

Kim *et al.* (2014) destacaram que os resíduos Asp88, Lys93, Gln141, Phe142, Gln144, Tyr179 e Arg189 (posição de acordo com o alinhamento da figura 9) são biologicamente relevantes para a atividade da enzimática da *Ralstonia eutropha*. Algumas dessas regiões também se destacaram nas análises de decomposição de energia realizadas neste estudo, sugerindo sua importância na estabilidade e função das enzimas cianobacterianas. Os resíduos Asp88, Lys93 e Gln144, que estão envolvidos na interação com o grupo pantotéina, são conservados nas cianobactérias. Essa conservação sugere que esses resíduos desempenham um papel importante na estabilização dessa região, o que pode explicar sua alta preservação ao longo da evolução.

O resíduo Gln141 foi substituído por Asn141 nas cianobactérias. Embora ambos sejam resíduos polares, Asn141, predominante nas cianobactérias, apresentou maior energia de ligação em comparação a Gln141, além de formar pontes de hidrogênio mais frequentemente, conforme observado nos mapas de interação. Essa diferença sugere que, apesar das características químicas semelhantes, Asn141 pode influenciar de maneira distinta a interação com o CAA.

A instabilidade observada na região final do substrato nas cianobactérias pode estar relacionada à falta de conservação dos resíduos Arg183 e Phe142, que são críticos para a interação com a porção terminal do CAA. O resíduo Arg183 é fundamental para a atividade enzimática, pois contribui para a estabilidade do ligante, participando do movimento do *Clamp-lid*. No entanto, nas cianobactérias, Arg183 é substituído por resíduos como prolina e serina, que possuem propriedades apolares e polares, respectivamente, o que pode impactar essa estabilidade. Quanto ao resíduo Phe142, o

estudo de Liu (2015) destacou sua importância para a atividade enzimática, com Phe e Val desempenhando papéis críticos nessa região. Nas cianobactérias analisadas, resíduos como leucina e alanina foram identificados nessa posição. A substituição de Phe por Ala já mostrou anteriormente a diminuição da atividade da enzima. Portanto Arg183 e Phe142 são regiões importantes para a estabilidade desse ligante.

Uma região interessante, embora não tenha sido destacada como crítica em outros artigos, é o resíduo Phe90, conservado nas cianobactérias. Na estrutura da 3VZS, esse resíduo é representado por Val. Ambos os resíduos, Phe90 e Val, possuem características apolares, o que pode influenciar suas interações na estrutura proteica. No entanto, na análise de decomposição de energia, Phe90 apresentou uma contribuição significativa para a energia livre de ligação na maioria das cianobactérias, indicando um papel importante na estabilização da estrutura da enzima. Apesar de ambos serem apolares, o Phe90, com seu anel aromático, pode formar interações hidrofóbicas adicionais, oferecendo uma estabilidade estrutural mais eficiente em comparação com o Val.

Os organismos investigados nesta pesquisa ainda são pouco explorados quanto ao seu potencial para a produção de PHA. Dentre os gêneros identificados, apenas *Microcystis* foi previamente estudado como potencial produtor de PHA (BHATI et al., 2010; HONDO et al., 2015; PHAM et al., 2024). As demais espécies de cianobactérias analisadas nesta pesquisa ainda carecem de estudos que demonstrem seu potencial para a produção desse biopolímero. Em particular, *Microcoleus vaginatus* PCC9802 (PhaB16) apresentou a maior distância na árvore gênica, sugerindo que pode ser um alvo interessante para futuras investigações devido à sua distinção evolutiva.

A simples presença de genes envolvidos na biossíntese de PHA não garante a eficiência na produção desse biopolímero, pois essa eficiência depende de outros fatores genéticos. Como resultado, esses organismos, assim como outros, podem ter sido subestimados em seu potencial para a produção de PHA. Pesquisas como esta, que focam na caracterização estrutural têm o potencial de revelar informações importantes sobre as enzimas ainda não exploradas.

6 CONCLUSÃO

Este estudo ampliou o entendimento da estrutura e função da enzima PhaB em cianobactérias, revelando características cruciais para a biossíntese de PHA nesse filo. A análise filogenética mostrou uma forte conservação evolutiva das enzimas PhaB entre as cianobactérias, destacando diferenças marcantes em relação às bactérias heterotróficas. A modelagem estrutural e as simulações de dinâmica molecular identificaram variações importantes nas regiões de interação com os ligantes, como a instabilidade na extremidade do substrato, que pode afetar a atividade enzimática e a eficiência na produção de PHA. Entretanto, algumas enzimas cianobacterianas apresentaram resultados promissores, com valores de MM/PBSA e MM/GBSA superiores aos dos controles, indicando um grande potencial biotecnológico. Com melhorias estratégicas, como mutações direcionadas para otimizar a estabilidade e a afinidade de ligação, essas enzimas podem ser aprimoradas para maior eficiência. Assim, os resultados deste estudo ajudam a preencher lacunas no conhecimento sobre a dinâmica estrutural da PhaB em cianobactérias, oferecendo novos *insights* para pesquisas futuras e aplicações industriais.

7 REFERÊNCIAS

ACHARJEE, S. A. et al. PHA-Based Bioplastic: a Potential Alternative to Address Microplastic Pollution. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 234, n. 1, p. 21, 29 dez. 2022.

AFREEN, R. et al. Challenges and Perspectives of Polyhydroxyalkanoate Production From Microalgae/Cyanobacteria and Bacteria as Microbial Factories: An Assessment of Hybrid Biological System. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021a.

AFREEN, R. et al. Challenges and Perspectives of Polyhydroxyalkanoate Production From Microalgae/Cyanobacteria and Bacteria as Microbial Factories: An Assessment of Hybrid Biological System. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021b.

AGARWAL, P. et al. Cyanobacteria as a Promising Alternative for Sustainable Environment: Synthesis of Biofuel and Biodegradable Plastics. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 939347, 13 jul. 2022.

AGNIHOTRY, S. et al. Chapter 11 - Protein structure prediction. Em: SINGH, D. B.; PATHAK, R. K. (Eds.). **Bioinformatics**. [s.l.] Academic Press, 2022. p. 177–188.

ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, abr. 2019.

ANANDAKRISHNAN, R.; AGUILAR, B.; ONUFRIEV, A. V. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W537–W541, 1 jul. 2012.

ANDREEVA, N. A.; MELNIKOV, V. V.; SNARSKAYA, D. D. The Role of Cyanobacteria in Marine Ecosystems. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 46, n. 3, p. 154–165, 1 maio 2020.

ANJUM, A. et al. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 161–174, 1 ago. 2016.

AUGUSTINE, R. et al. Cerium Oxide Nanoparticle Incorporated Electrospun Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Membranes for Diabetic Wound Healing Applications. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 6, n. 1, p. 58–70, 13 jan. 2020.

BABOS, G. et al. Poly(3-Hydroxybutyrate)-Based Nanoparticles for Sorafenib and Doxorubicin Anticancer Drug Delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7312, jan. 2020.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343–350, 1 fev. 2011.

- BHATI, R. et al. Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria under photoautotrophy. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 11, p. 1181–1185, 2010.
- BHATIA, S. K. et al. Biowaste-to-bioplastic (polyhydroxyalkanoates): Conversion technologies, strategies, challenges, and perspective. **Bioresource Technology**, v. 326, p. 124733, 1 abr. 2021.
- BIASINI, M. et al. OpenStructure: an integrated software framework for computational structural biology. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. Pt 5, p. 701–709, 1 maio 2013.
- BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F. Molegro Virtual Docker for Docking. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2053, p. 149–167, 2019.
- BITTRICH, S. et al. RCSB Protein Data Bank: improved annotation, search and visualization of membrane protein structures archived in the PDB. **Bioinformatics**, v. 38, n. 5, p. 1452–1454, 1 mar. 2022.
- BOURGADE, B.; STENSJÖ, K. Synthetic biology in marine cyanobacteria: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 994365, 16 set. 2022.
- BUDDE, C. F. et al. Roles of Multiple Acetoacetyl Coenzyme A Reductases in Polyhydroxybutyrate Biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 20, p. 5319–5328, out. 2010.
- CARPINE, R. et al. Industrial Production of Poly- β -hydroxybutyrate from CO₂: Can Cyanobacteria Meet this Challenge? **Processes**, v. 8, n. 3, p. 323, mar. 2020.
- CARR, N. G. The occurrence of poly- β -hydroxybutyrate in the blue-green alga, *Chlorogloea fritschii*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biophysics including Photosynthesis**, v. 120, n. 2, p. 308–310, 8 jun. 1966.
- CASE, D. A. et al. **AMBER 22 reference manual**. , 2022.
- CHEK, M. F. et al. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5312, 13 jul. 2017.
- CHORUS, I.; WELKER, M. (EDS.). **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. [s.l.] Taylor & Francis, 2021.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, set. 1993.
- DE AZEVEDO, W. F. MolDock applied to structure-based virtual screening. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 3, p. 327–334, mar. 2010.
- DE OLIVEIRA, D. T. et al. Advances in the Biotechnological Potential of Brazilian Marine Microalgae and Cyanobacteria. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2908, 24 jun. 2020.

DEMAY, J. et al. Natural Products from Cyanobacteria: Focus on Beneficial Activities. **Marine Drugs**, v. 17, n. 6, p. 320, jun. 2019.

DEVIRAM, G. et al. Applications of microalgal and cyanobacterial biomass on a way to safe, cleaner and a sustainable environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 253, p. 119770, 20 abr. 2020.

DVOŘÁK, P. et al. Diversity of the Cyanobacteria. Em: HALLENBECK, P. C. (Ed.). **Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 3–46.

EDMONDSON, S.; GILBERT, M. Chapter 2 - The Chemical Nature of Plastics Polymerization. Em: GILBERT, M. (Ed.). **Brydson's Plastics Materials (Eighth Edition)**. [s.l.] Butterworth-Heinemann, 2017. p. 19–37.

ENGH, R. A.; HUBER, R. Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. **Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography**, v. 47, n. 4, p. 392–400, 1 jul. 1991.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83–89, 1 jun. 2019.

FERNANDES, M. et al. Factors affecting polyhydroxyalkanoates biodegradation in soil. **Polymer Degradation and Stability**, v. 182, p. 109408, 1 dez. 2020.

FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl_2, p. W29–W37, 1 jul. 2011.

FOONG, C. P.; HIGUCHI-TAKEUCHI, M.; NUMATA, K. Optimal iron concentrations for growth-associated polyhydroxyalkanoate biosynthesis in the marine photosynthetic purple bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* under photoheterotrophic condition. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0212654, 29 abr. 2019.

FU, L. et al. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 23, p. 3150–3152, 1 dez. 2012.

GABRIELLI, F.; ANTINUCCI, M.; TOFANELLI, S. Gene Structure Evolution of the Short-Chain Dehydrogenase/Reductase (SDR) Family. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 110, 30 dez. 2022.

GAHLAWAT, G. Challenges in PHAs Production at Mass Scale. Em: GAHLAWAT, G. (Ed.). **Polyhydroxyalkanoates Biopolymers: Production Strategies**. SpringerBriefs in Molecular Science. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 25–30.

GENHEDEN, S.; RYDE, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 5, p. 449–461, 4 maio 2015.

- GOVINDASAMY, R. et al. Emerging Trends of Nanotechnology and Genetic Engineering in Cyanobacteria to Optimize Production for Future Applications. **Life**, v. 12, n. 12, p. 2013, dez. 2022.
- GRÄFF, M. et al. The Short-chain Dehydrogenase/Reductase Engineering Database (SDRED): A classification and analysis system for a highly diverse enzyme family. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 87, n. 6, p. 443–451, 2019.
- GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–87, 1 mar. 2014.
- GUO, W. et al. Polyhydroxyalkanoates in tissue repair and regeneration. **Engineered Regeneration**, v. 3, n. 1, p. 24–40, 1 mar. 2022.
- HADDAD, Y.; ADAM, V.; HEGER, Z. Ten quick tips for homology modeling of high-resolution protein 3D structures. **PLOS Computational Biology**, v. 16, n. 4, p. e1007449, 2 abr. 2020.
- HAGEMANN, M.; HESS, W. R. Systems and synthetic biology for the biotechnological application of cyanobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, Food biotechnology • Plant biotechnology. v. 49, p. 94–99, 1 fev. 2018.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. v. Vol. 41, p. 95–98, 1999.
- HAMMERSCHMIDT, K. et al. The Order of Trait Emergence in the Evolution of Cyanobacterial Multicellularity. **Genome Biology and Evolution**, v. 13, n. 2, p. evaa249, 1 fev. 2021.
- HAN, J. et al. Identification of the Polyhydroxyalkanoate (PHA)-Specific Acetoacetyl Coenzyme A Reductase among Multiple FabG Paralogs in *Haloarcula hispanica* and Reconstruction of the PHA Biosynthetic Pathway in *Haloferax volcanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6168–6175, out. 2009.
- HOANG, D. T. et al. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 2, p. 518–522, fev. 2018.
- HONDO, S. et al. Genetic engineering and metabolite profiling for overproduction of polyhydroxybutyrate in cyanobacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 510–517, 1 nov. 2015.
- HONG, J. et al. Crystal structure of an acetyl-CoA acetyltransferase from PHB producing bacterium *Bacillus cereus* ATCC 14579. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 533, n. 3, p. 442–448, 10 dez. 2020.
- HONG, K. et al. Screening and characterization of polyhydroxyalkanoate granules, and phylogenetic analysis of polyhydroxyalkanoate synthase gene PhaC in cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 57, n. 3, p. 754–765, 2021.

- JAU, M.-H. et al. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, n. 3, p. 144–151, 1 ago. 2005.
- JIN, H.; NIKOLAU, B. J. Evaluating PHA Productivity of Bioengineered *Rhodospirillum rubrum*. **PLOS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96621, 19 maio 2014.
- KALIA, V. C.; LAL, S.; CHEEMA, S. Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: Horizontal gene transfer. **Gene**, v. 389, n. 1, p. 19–26, 1 mar. 2007.
- KALYAANAMOORTHY, S. et al. ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. **Nature methods**, v. 14, n. 6, p. 587–589, jun. 2017.
- KASAR, P.; SHARMA, D. K.; AHMARUZZAMAN, M. Thermal and catalytic decomposition of waste plastics and its co-processing with petroleum residue through pyrolysis process. **Journal of Cleaner Production**, v. 265, p. 121639, 20 ago. 2020.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 19 jul. 2019.
- KETTNER, A.; NOLL, M.; GRIEHL, C. *Leptolyngbya* sp. NIVA-CYA 255, a Promising Candidate for Poly(3-hydroxybutyrate) Production under Mixotrophic Deficiency Conditions. **Biomolecules**, v. 12, n. 4, p. 504, abr. 2022.
- KIM, J. et al. Crystal structure of (R)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase PhaB from *Ralstonia eutropha*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, n. 3, p. 783–788, 17 jan. 2014.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. Molecular Modeling of Proteins: A Strategy for Energy Minimization by Molecular Mechanics in the AMBER Force Field. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 1991.
- KISELEV, E. G. et al. Effectiveness of slow-release fungicide formulations for suppressing potato pathogens. **Pest Management Science**, v. 78, n. 12, p. 5444–5455, 2022.
- KOCH, M. et al. **Maximizing PHB content in *Synechocystis* sp. PCC 6803: development of a new photosynthetic overproduction strain**. bioRxiv, , 22 out. 2020. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.22.350660v1>>. Acesso em: 9 abr. 2023
- KOLLER, M. Chapter 22 - “Bioplastics from microalgae”—Polyhydroxyalkanoate production by cyanobacteria. Em: JACOB-LOPES, E. et al. (Eds.). **Handbook of Microalgae-Based Processes and Products**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 597–645.
- KOMÁREK, J. et al. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, n. 4, p. 295–335, dez. 2014.

KOURMENTZA, C. et al. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. **Bioengineering**, v. 4, n. 2, p. 55, jun. 2017.

KUMAR, J. et al. Chapter 16 - Cyanobacteria: Applications in Biotechnology. Em: MISHRA, A. K.; TIWARI, D. N.; RAI, A. N. (Eds.). **Cyanobacteria**. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 327–346.

KUMAR, V.; SEHGAL, R.; GUPTA, R. Blends and composites of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and their applications. **European Polymer Journal**, v. 161, p. 110824, 5 dez. 2021.

LAKSHMANAN, M. et al. Biosynthesis and characterization of co and ter-polyesters of polyhydroxyalkanoates containing high monomeric fractions of 4-hydroxybutyrate and 5-hydroxyvalerate via a novel PHA synthase. **Polymer Degradation and Stability**, v. 163, p. 122–135, 1 maio 2019.

LAOUTID, F. et al. Impact-Resistant Poly(3-Hydroxybutyrate)/Poly(ϵ -Caprolactone)-Based Materials, through Reactive Melt Processing, for Compression-Molding and 3D-Printing Applications. **Materials**, v. 15, n. 22, nov. 2022.

LI, J. et al. Multifunctional Electrospinning Polyhydroxyalkanoate Fibrous Scaffolds with Antibacterial and Angiogenesis Effects for Accelerating Wound Healing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 15, n. 1, p. 364–377, 11 jan. 2023.

LI, M. et al. Tailor-Made Polyhydroxyalkanoates by Reconstructing *Pseudomonas Entomophila*. **Advanced Materials**, v. 33, n. 41, p. 2102766, 2021.

LIN, J.-H. et al. Cloning of phaCAB genes from thermophilic *Caldimonas manganoxidans* in *Escherichia coli* for poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 16, p. 6419–6430, 1 ago. 2017.

LIU, Y. et al. Structure-directed construction of a high-performance version of the enzyme FabG from the photosynthetic microorganism *Synechocystis* sp. PCC 6803. **FEBS Letters**, v. 589, n. 20PartB, p. 3052–3057, 2015.

LOAN, T. T. et al. A fermentation process for the production of poly(3-hydroxybutyrate) using waste cooking oil or waste fish oil as inexpensive carbon substrate. **Biotechnology Reports**, v. 33, p. e00700, 1 mar. 2022.

LOPEZ-ARENAS, T. et al. Analysis of the fermentation strategy and its impact on the economics of the production process of PHB (polyhydroxybutyrate). **Computers & Chemical Engineering**, In honor of Professor Rafiqul Gani. v. 107, p. 140–150, 5 dez. 2017.

LU, S. et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D265–D268, 8 jan. 2020.

MADDEN, T. **The BLAST Sequence Analysis Tool**. [s.l.] National Center for Biotechnology Information (US), 2013.

MANIKANDAN, N. A.; PAKSHIRAJAN, K.; PUGAZHENTHI, G. Preparation and characterization of environmentally safe and highly biodegradable microbial polyhydroxybutyrate (PHB) based graphene nanocomposites for potential food packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 866–877, 1 jul. 2020.

MATSUMOTO, K. et al. Directed Evolution and Structural Analysis of NADPH-Dependent Acetoacetyl Coenzyme A (Acetoacetyl-CoA) Reductase from *Ralstonia eutropha* Reveals Two Mutations Responsible for Enhanced Kinetics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 6134–6139, out. 2013.

MCFADDEN, G. I. Origin and Evolution of Plastids and Photosynthesis in Eukaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 4, abr. 2014.

MEHDIZADEH ALLAF, M.; PEERHOSSAINI, H. Cyanobacteria: Model Microorganisms and Beyond. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, p. 696, abr. 2022.

MENDHULKAR, V. D.; SHETYE, L. A. Synthesis of Biodegradable Polymer Polyhydroxyalkanoate (PHA) in Cyanobacteria *Synechococcus elongatus* Under Mixotrophic Nitrogen- and Phosphate-Mediated Stress Conditions. **Industrial Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 85–93, abr. 2017.

MENG, D.-C. et al. Engineering the diversity of polyesters. **Current Opinion in Biotechnology**, Cell and Pathway Engineering. v. 29, p. 24–33, 1 out. 2014.

MENG, D.-C.; CHEN, G.-Q. Synthetic Biology of Polyhydroxyalkanoates (PHA). Em: ZHAO, H.; ZENG, A.-P. (Eds.). **Synthetic Biology – Metabolic Engineering**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 147–174.

MINH, B. Q. et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 1 maio 2020.

MITRA, R. et al. An updated overview on the regulatory circuits of polyhydroxyalkanoates synthesis. **Microbial Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 1446–1470, 2022.

MUNEER, F. et al. Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of Synthetic Polymers. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 9, p. 2301–2323, 1 set. 2020.

NASER, A. Z.; DEIAB, I.; DARRAS, B. M. Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. **RSC Advances**, v. 11, n. 28, p. 17151–17196, 2021.

NIELSEN, T. D. et al. Politics and the plastic crisis: A review throughout the plastic life cycle. **WIREs Energy and Environment**, v. 9, n. 1, p. e360, 2020.

OBRUCA, S. et al. Novel unexpected functions of PHA granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 11, p. 4795–4810, 1 jun. 2020.

ODENIYI, O. A.; ADEOLA, O. J. Production and characterization of polyhydroxyalkanoic acid from *Bacillus thuringiensis* using different carbon substrates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 407–413, 1 nov. 2017.

OECD. **Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060**. [s.l.] OECD, 2022.

O'LEARY, N. A. et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D733–D745, 4 jan. 2016.

PANDEY, A. et al. Sustainable applications of polyhydroxyalkanoates in various fields: A critical review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 221, p. 1184–1201, 30 nov. 2022.

PAYSAN-LAFOSSE, T. et al. InterPro in 2022. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D418–D427, 6 jan. 2023.

PERNICOVA, I. et al. Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. **Polymers**, v. 12, n. 6, p. 1235, jun. 2020.

PHALANISONG, P.; PLANGKLANG, P.; REUNGSANG, A. Photoautotrophic and Mixotrophic Cultivation of Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Microalgae Consortia Selected under Nitrogen and Phosphate Limitation. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7613, jan. 2021.

PHAM, T. T. H. et al. Selection of microalgae and cyanobacteria to produce polyhydroxyalkanoates (PHAs) - A case study in Vietnam. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 10, p. 100808, 1 dez. 2024.

POTTER, S. C. et al. HMMER web server: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W200–W204, 2 jul. 2018.

PRATT, S. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Bioplastics from Organic Waste. Em: BASTIDAS-OYANEDEL, J.-R.; SCHMIDT, J. E. (Eds.). **Biorefinery: Integrated Sustainable Processes for Biomass Conversion to Biomaterials, Biofuels, and Fertilizers**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 615–638.

REN, Q. et al. FabG, an NADPH-Dependent 3-Ketoacyl Reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, Provides Precursors for Medium-Chain-Length Poly-3-Hydroxyalkanoate Biosynthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2978–2981, maio 2000.

RIPPKA, R. et al. Nitrogen fixation by unicellular blue-green algae. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 76, n. 4, p. 341–348, 1 dez. 1971.

ROBIN, X. et al. Continuous Automated Model EvaluatiOn (CAMEO)—Perspectives on the future of fully automated evaluation of structure prediction methods. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 89, n. 12, p. 1977–1986, 2021.

SACHDEVA, V.; ROY, A.; BHARADVAJA, N. Current Prospects of Nutraceuticals: A Review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 884–896, 1 ago. 2020.

SAEED, M. U. et al. Bioprospecting microalgae and cyanobacteria for biopharmaceutical applications. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 1110–1124, 2022.

SALAHUDDIN, N. et al. Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(amine)-coated nickel oxide nanoparticles for norfloxacin delivery: antibacterial and cytotoxicity efficiency. **RSC Advances**, v. 10, n. 56, p. 34046–34058, 2020.

SANDYBAYEVA, S. K. et al. Prospects of cyanobacterial pigment production: Biotechnological potential and optimization strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 187, p. 108640, 1 nov. 2022.

SARATALE, R. G. et al. Developing Microbial Co-Culture System for Enhanced Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production Using Acid Pretreated Lignocellulosic Biomass. **Polymers**, v. 14, n. 4, p. 726, jan. 2022.

SHAH, M. et al. Nanoscale poly(4-hydroxybutyrate)-mPEG carriers for anticancer drugs delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 11, p. 8416–8421, nov. 2014.

SHAHID, S. et al. Polyhydroxyalkanoates: Next generation natural biomolecules and a solution for the world's future economy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 297–321, 1 jan. 2021.

SHARMA, V.; SEHGAL, R.; GUPTA, R. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. **Polymer**, v. 212, p. 123161, 6 jan. 2021.

SHESTAKOV, S. V.; KARBYSHEVA, E. A. The origin and evolution of cyanobacteria. **Biology Bulletin Reviews**, v. 7, n. 4, p. 259–272, 1 jul. 2017.

SILVA, F. et al. Development of a layered bacterial nanocellulose-PHBV composite for food packaging. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 103, n. 3, p. 1077–1087, 2023.

SIMONAZZI, M. et al. Production of polyhydroxybutyrate by the cyanobacterium cf. *Anabaena* sp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 92–99, 30 nov. 2021.

SINGH, A.; DAS, M.; GROVER, A. Molecular mechanism of acetoacetyl-CoA enhanced kinetics for increased bioplastic production from *Cupriavidus necator* 428. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 38, n. 3, p. 827–840, 11 fev. 2020.

SINGH, A. K. et al. Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 3, p. 1213–1232, 1 jun. 2017.

SINGH, A. K. et al. Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 5, p. 2007–2032, 1 mar. 2019a.

SINGH, A. K.; MALLICK, N. Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 20, p. fnx189, 1 nov. 2017.

SINGH, M. K. et al. Poly- β -Hydroxybutyrate Production by the Cyanobacterium *Scytonema geitleri* Bharadwaja under Varying Environmental Conditions. **Biomolecules**, v. 9, n. 5, p. 198, maio 2019b.

SINGH, S.; BANI BAKER, Q.; SINGH, D. B. Chapter 18 - Molecular docking and molecular dynamics simulation. Em: SINGH, D. B.; PATHAK, R. K. (Eds.). **Bioinformatics**. [s.l.] Academic Press, 2022. p. 291–304.

ŚLIŹEWSKA, A.; ŻYMAŃCZYK-DUDA, E. Cyanobacteria as Valuable Tool in Biotechnology. **Catalysts**, v. 11, n. 11, p. 1259, nov. 2021.

STUDER, G. et al. Modeling of Protein Tertiary and Quaternary Structures Based on Evolutionary Information. Em: SIKOSEK, T. (Ed.). **Computational Methods in Protein Evolution**. New York, NY: Springer, 2019. p. 301–316.

STUDER, G. et al. ProMod3—A versatile homology modelling toolbox. **PLOS Computational Biology**, v. 17, n. 1, p. e1008667, 28 jan. 2021.

SWANSON, J. M. J.; HENCHMAN, R. H.; MCCAMMON, J. A. Revisiting Free Energy Calculations: A Theoretical Connection to MM/PBSA and Direct Calculation of the Association Free Energy. **Biophysical Journal**, v. 86, n. 1, p. 67–74, jan. 2004.

TAN, I. K. P. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase genes and PHA-associated gene clusters in *Pseudomonas* spp. and *Janthinobacterium* spp. isolated from Antarctica. **Journal of Biotechnology**, v. 313, p. 18–28, 10 abr. 2020.

THOMSEN, R. **Flexible ligand docking using differential evolution**. The 2003 Congress on Evolutionary Computation, 2003. CEC '03. **Anais...** Em: THE 2003 CONGRESS ON EVOLUTIONARY COMPUTATION, 2003. CEC '03. dez. 2003.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 1 jun. 2006.

TIAN, C. et al. ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 16, n. 1, p. 528–552, 14 jan. 2020.

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, n. 2, p. 26, jun. 2017.

UMESHA, S.; K. SINGH, P.; P. SINGH, R. Chapter 6 - Microbial Biotechnology and Sustainable Agriculture. Em: SINGH, R. L.; MONDAL, S. (Eds.). **Biotechnology for Sustainable Agriculture**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2018. p. 185–205.

UTHARN, S. et al. Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 lacking *adc1* gene produces higher polyhydroxybutyrate accumulation under modified nutrients of acetate

supplementation and nitrogen-phosphorus starvation. **Biotechnology Reports**, v. 31, p. e00661, 1 set. 2021.

VEAUDOR, T. et al. Recent Advances in the Photoautotrophic Metabolism of Cyanobacteria: Biotechnological Implications. **Life**, v. 10, n. 5, p. 71, maio 2020.

VICENTE, D.; PROENÇA, D. N.; MORAIS, P. V. The Role of Bacterial Polyhydroalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 4, p. 2959, jan. 2023.

VOLOVA, T. G. et al. Assessment of the efficacy of slow-release formulations of the tribenuron-methyl herbicide in field-grown spring wheat. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 14, p. 20249–20264, 1 mar. 2022.

VUONG, P. et al. Small investments with big returns: environmental genomic bioprospecting of microbial life. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 641–655, 3 set. 2022.

WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 2004.

WANG, T. et al. Acetoacetyl-CoA reductase PhaB as an excellent anti-Prelog biocatalyst for the synthesis of chiral β -hydroxyl ester and the molecular basis of its catalytic performance. **Molecular Catalysis**, v. 514, p. 111854, 1 set. 2021.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl_2, p. W407–W410, 1 jul. 2007.

WILLIAMS, C. J. et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 293–315, 2018.

WU, X. et al. Application of molecular dynamics simulation in biomedicine. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 99, n. 5, p. 789–800, maio 2022.

XIONG, Y.; SHABANE, P. S.; ONUFRIEV, A. V. Melting Points of OPC and OPC3 Water Models. **ACS Omega**, v. 5, n. 39, p. 25087–25094, 6 out. 2020.

YADAV, B. et al. Concomitant production of value-added products with polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis: A review. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 125419, 1 out. 2021.

YASHAVANTH, P. R.; MEENAKSHI, D.; SOUMEN K., M. Recent progress and challenges in cyanobacterial autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB), a bioplastic. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105379, 1 ago. 2021.

YEO, J. C. C. et al. Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 92, p. 1092–1116, 1 nov. 2018.

YOKOO, T. et al. Enhanced poly(3-hydroxybutyrate) production in transgenic tobacco BY-2 cells using engineered acetoacetyl-CoA reductase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, n. 6, p. 986–988, 3 jun. 2015.

ZHANG, X. et al. Synthetic Biology and Genome-Editing Tools for Improving PHA Metabolic Engineering. **Trends in Biotechnology**, Special Issue: Metabolic Engineering. v. 38, n. 7, p. 689–700, 1 jul. 2020.

ZHUO, X.-Z.; CHOU, S.-C.; LI, S.-Y. Producing medium-chain-length polyhydroxyalkanoate from diverse feedstocks by deregulating unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 365, p. 128078, 1 dez. 2022.

ŻUR-PIŃSKA, J. et al. Smart and sustainable: Exploring the future of PHAs biopolymers for 3D printing in tissue engineering. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 38, p. e00750, dez. 2023.

APÊNDICE A – Alinhamento completo das sequências PhaB.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90		
3VZS_1	MR.....GSHH.....	HHHGGSTQRIAYVTGGMGG	GTATCQRLA	KDGFRRVAG	CGP.NSPRREKWLEQQKA	LGDFDIA	SEGNVA	ADWDS	TKTAFDK	VKS	EVGEVDVLINN	
Controle	MLSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVKLLQ	EMGAKVAF	DLA.TD.....GGNTEAL	GVVANVT	DLESMT	AAAAE	ITD	KLGPVYGIVAN	
phaB1	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLT	ELGAKVAY	DIN.ID.....EQNNQAL	GIKADVT	DITSMEE	AART	IKE	KLGTVYGIVAN	
phaB2	MISLGLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLQ	QLGAKVAF	YRP.VNSYYE.GDLPEGAL	PIAADVT	DRAGME	LAAKIT	TEE	KLGPVYGIVAN	
phaB3	
phaB4	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAAMVSLT	ELGAKVAY	DIS.ID.....EKDNKAL	GIKADVT	DITSMEE	AAKT	IKE	KLGPVYGIVAN	
phaB5	MISLGLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAATVNLQ	QLGAKVAF	YRP.VNSYYE.GEILEGAL	PIAADVT	DPAAME	KAAARL	AEE	KLGPVYGIVAN	
phaB6	MVSLGLEEKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLI	DLGAKVAY	DLV.AD.....NPQGL	GIVADVT	KLESME	AAAQ	IEAE	KLGPVYGIVAN	
phaB7	MVSLGLEEKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLI	DLGAKVAY	DLA.TD.....NPQGL	GIVADVT	KLESME	AAAQ	IEAE	KLGPVYGIVAN	
phaB8	MVSLGLEEKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLI	DLGAKVAY	DLA.TD.....NPQGL	GIVADVT	KLESME	AAAQ	IEAE	KLGPVYGIVAN	
phaB9	MVSLGLEEKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLI	DLGAKVAY	DLV.AD.....NPQGL	GIVADVT	KLESME	AAAQ	IEAE	KLGPVYGIVAN	
phaB10	MVSLGLEEKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLI	DLGAKVAY	DLV.TD.....NPQGL	GIVADVT	KLESME	AAAQ	IEAE	KLGPVYGIVAN	
phaB11	MVSLGLEEKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLI	ELGAKVAY	DLV.AD.....NPQGL	GIVADVT	KLESME	AAAQ	IEAE	KLGPVYGIVAN	
phaB12	MASLQLEDKVVVLTGGNRG	GAIVALLK	ELGAKVAY	HRS.DS.....DRQHGAL	AIPADVT	DKAAME	AVAEQ	VEEQ	KLGPVYGIVAN	
phaB13	MAPLGLGLEDQVIVVTGGNRG	GAIVNLLL	ELGSKVAY	YRSHDE.....NSLMGMT	AIPADVT	DETAMQ	AVVEQ	VED	KLGPVYGIVAN	
phaB14	MAPLGLGLEDQVIVVTGGNRG	GAIVNLLL	ELGSKVAY	YRSHDE.....NSLMGMT	AIPADVT	DETAMQ	AVVEQ	VED	KLGPVYGIVAN	
phaB15	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVALLQ	ELGAKVAY	DIK.IS.....EGKSGAF	AVEADVT	NLASME	AAAQ	IEE	KLGPVYGIVAN	
phaB16	MN.....	YLRGLGLEDKVVVLTGGNRG	GAIVNLL	EMGSQVAY	YRS.DP.....NIESSAL	AIPADVT	DPAAMV	EVVDK	VEQ	KLGPVYGIVAN	
phaB17	MVSLGLENKVVVLTGGNRG	GAIVSLL	ELGAKVAY	YRS.DR.....NGQNKAL	AIQADVT	DSAAEM	KAAEQ	VEEQ	KLGPVYGIVAN	
phaB18	MASLQLEDQVIVVTGGNRG	GAIVNLLL	ELGAKVAY	YRS.DY.....NPQMGSL	AISADVT	DKAAME	EVTKQ	VEEQ	KLGPVYGIVAN	
phaB19	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVKLLV	ELGAKVAY	DVI.DG.....ETPPGGL	ALKADVT	KLDSME	SAAKE	I	KLGPVYGIVAN	
phaB20	MTSLGLEDKVVVLTGGNRG	GAIVSLLQ	ELGAKVAY	YRS.SS.....EDQHRAL	AIQADVT	DKAAME	AVAQ	VEEQ	KLGPVYGIVAN	
phaB21	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVTLLT	ELGAKVAY	DIE.ID.....DSDSGAL	AVKADVT	DLGSM	AAAQ	IEE	KLGPVYGIVAN	
phaB22	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLT	ELGAKVAF	DIN.IP.....DNHPAAF	AMKADVT	NLEEME	AVGKE	I	KLGPVYGIVAN	
phaB23	MISLGLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLT	ELGAKVAF	DIN.IP.....DNHPAAF	AMKADVT	NLEEME	AVGKE	I	KLGPVYGIVAN	
phaB24	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLT	ELGAKVAF	DIN.IP.....DDHPAAF	ATKADVT	NLEEME	AVGKE	I	KLGPVYGIVAN	
phaB25	M.....	MVSLGLEDKVVVVTGGNRG	GAIVKLLQ	ELGAKVAY	DIA.ID.....GGPSGVL	AIQADVT	KLESME	AAAQ	IEE	KLGPVYGIVAN	
phaB26	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLQ	QLGAKVAY	YRS.SNHYYD.GDLPNGAL	PIEADVT	DAAALE	AAAQ	VEE	KLGPVYGIVAN	
phaB27	MTKDKGEAEAGSLRPGERRTNDKGGI	MVSLGLEDKVVVVTGGNRG	GAIVKLLQ	ELGAKVAY	DIA.ID.....GGPSGVL	AIKADVT	KLESME	AAAQ	IEE	KLGPVYGIVAN	
phaB28	MLSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLQ	QLGAKVAY	YRS.SNHYYD.GDLPNGAL	PIEADVT	DAAALE	AAARR	VEE	KLGPVYGIVAN	
phaB29	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVSLLS	DLGAKVAY	DIK.VT.....EGKSGAL	ALQADVT	KLEEMQ	AAAQ	TE	KLGPVYGIVAN	
phaB30	MAE	VEEQ	KLGPVYGIVAN
phaB31	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVNLLL	DLGAKVAY	DIV.IS.....DDDQKAL	AVEADVT	SLESME	AAAQ	ITE	KLGPVYGIVAN	
phaB32	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVNLLL	DLGAKVAY	DIV.IS.....DDDQKAL	AVEADVT	SLESME	AAAQ	ITE	KLGPVYGIVAN	
phaB33	MVSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVKLLQ	EMGAKVAF	DLA.TD.....GGNAEAL	GVVANVT	DLESMT	AAAAE	ITD	KLGPVYGIVAN	
phaB34	MLSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVKLLQ	EMGAKVAF	DLA.TD.....GGNAEAL	GVVANVT	DLESMT	AAAAE	ITD	KLGPVYGIVAN	
phaB35	MLSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVKLLQ	EMGAKVAF	DLA.TD.....GGNAEAL	GVVANVT	DLESMT	AAAAE	ITD	KLGPVYGIVAN	
phaB36	MLSLGLEDKVIIVVTGGNRG	GAIVKLLQ	EMGAKVAF	DLA.TD.....GGNAEAL	GVVANVT	DLESMT	AAAAE	ITE	KLGPVYGIVAN	

	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210																											
3VZS_1	AGITRDVVFR	KMT	RA	DWDAVI	D	TNLTSL	FN	VTKQV	D	GMADR	GW	GRIVN	ISS	NGQKQGF	QNTNY	6	TAK	AG	LH	G	FTMALA	QEV	ATK	KG	VTVNTV	SPGYI	A	ADMV	KA	TR	QDVL	LDKI	VA	TIP	V				
Controle	AGITKDNFFP	KLT	P	ADWDAVL	N	VNLKGV	AY	SIKPF	IE	GMYER	KA	GSIVA	ISS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AG	VI	G	MMKSLARE	GARY	G	VRANAV	P	PGFI	D	TEMT	LA	IR	EDI	REKI	TK	EIP	F				
phaB1	AGITRDNFFP	KLT	P	EDWDAVI	N	VNLKGV	VN	TVKPF	ME	GMYEQ	NE	GSIVC	ISS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	IVKSLARE	CARY	N	VRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	KA	IP	DKVK	DKI	TA	EIP	F				
phaB2	AGITKDNFYS	KLT	D	DWDKVI	N	VNLKGV	NH	TIKPF	IN	GMYER	QE	GSIVC	CVSS	QERKVI	LVKRT	Q	PR	K	RR	LS	G		
phaB3		
phaB4	AGITRDNFFP	KLT	S	QDWDVAI	N	VNLKGV	VN	TIKPF	LE	GMYEQ	NA	GSIVC	CVSS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	MVKS	LARE	GARY	N	VRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	QA	IP	EKVR	DKI	TA	EIP	F			
phaB5	AGITKDNFYS	KLS	F	EDWDQVI	D	VNLKGV	NH	TIKPF	IN	GMYER	LE	GSIVC	CVSS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	SARY	N	IRANV	V	S	P	PGFI	E	TEMT	KG	LP	DKVK	DKI	TA	EIP	V			
phaB6	AGITRDNFFP	KLT	P	LDWDLVI	N	VNLKGV	NH	TIKPF	IE	GMYER	QA	GSIVC	CVSS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	IRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	LA	IP	DKVR	DKI	TA	EIP	C				
phaB7	AGITRDNFFP	KLT	P	LDWDLVI	N	VNLKGV	NH	TIKPF	IE	GMYER	QA	GSIVC	CVSS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	IRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	LA	IP	EKVR	DKI	TA	EIP	C				
phaB8	AGITRDNFFP	KLT	P	LDWDLVI	N	VNLKGV	NH	TIKPF	IE	GMYER	QA	GSIVC	CVSS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	IRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	LA	IP	DKVR	DKI	TA	EIP	C				
phaB9	AGITRDNFFP	KLT	P	LDWDLVI	N	VNLKGV	NH	TIKPF	IE	GMYER	QA	GSIVC	CVSS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	IRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	LA	IP	DKVR	DKI	TA	EIP	C				
phaB10	AGITRDNFFP	KLT	P	LDWDLVI	N	VNLKGV	NH	TIKPF	IE	GMYER	QA	GSIVC	CVSS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	IRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	LA	IP	DKVR	DKI	TA	EIP	C				
phaB11	AGITRDNFFP	KLT	P	LDWDLVI	N	VNLKGV	NH	TIKPF	IE	GMYER	QA	GSIVC	CVSS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	IRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	LA	IP	DKVR	DKI	TA	EIP	C				
phaB12	AGINRDNFFP	KLT	P	ADWDAVI	D	TNLKGV	YN	TLMPV	IP	KMYER	GE	GSVV	CITS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	VRVNS	V	P	PGFI	E	TEMT	LA	IP	DKVR	DKI	TA	EIP	C				
phaB13	AGITKDNFFP	KLT	T	ANWDEVI	D	TNLKGV	YN	TLKPV	IP	RMAYER	RS	GSVV	CITS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	VRANAV	P	PGFI	E	TEMT	LA	IP	DKVK	QRI	LS	EIP	L					
phaB14	AGITKDNFFP	KLT	T	ANWDEVI	D	TNLKGV	YN	TLKPV	IP	RMAYER	RS	GSVV	CITS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	VRANAV	P	PGFI	E	TEMT	LA	IP	DKVK	QRI	LS	EIP	L					
phaB15	AGITRDNFFP	KLT	P	EDWDAVI	N	VNLKGV	NH	TIKPF	IS	GMYER	Q	GSVV	CITS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	TARY	N	VRVNA	V	P	PGFI	D	TEMT	RA	IP	DKV	KEKI	TA	EIP	F				
phaB16	AGITRDNFFP	KLA	I	DDWDTVI	E	TNLKGI	YN	TLKPV	IP	KMYER	RE	GSVV	CITS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	GARY	G	VRANAV	P	PGFI	E	TEMT	QA	IP	DKV	KEKI	TA	EIP	L					
phaB17	AGITRDNFFP	KLK	V	DDWDEVI	D	TNLKGV	YN	TLMPV	IP	KMYER	RE	GSVV	CITS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	VRANAV	P	PGFI	E	TEMT	KS	VP	DKV	KEKI	LS	EIP	L					
phaB18	AGITRDNFFP	KLT	T	ADWDAVI	D	TNLKGV	YN	TLKPV	IP	KMYER	RS	GSVV	CITS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	VRANT	V	S	P	PGFI	E	TEMT	LP	IS	DKVK	QRI	LS	EIP	L			
phaB19	AGITRDNFFP	KLT	D	EDWDQVI	A	VNLKGV	KN	TIQPF	I	Q	GMYD	Q	NA	GSIVA	ISS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	MMKSI	IARE	GARF	N	VRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	QK	IP	DKVR	DKI	TA	EIP	F	
phaB20	AGITRDNFFP	KLA	I	EDWDAVI	D	TNLKGV	YN	TLMPV	IP	KMYER	GE	GSVV	CITS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	VRVNA	V	P	PGFI	E	TEMT	KS	VP	DKV	KEKI	VS	EIP	L				
phaB21	AGITRDNFFP	KLT	D	ADWDAVI	N	VNLKGV	NH	TIKPF	V	Q	GMYDR	G	A	I	V	G	ISS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LIKSLARE	AARY	G	VRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	KF	LP	DKVK	DKI	TA	EIP	F
phaB22	AGITRDNFFP	GKL	S	PADWDAVI	N	VNLKGV	VN	TIKPF	V	A	GMYEQ	K	S	I	V	A	ISS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	VRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	KV	IAD	NI	KEKI	IA	EIP	F
phaB23	AGITRDNFFP	KLS	P	ADWDAVI	N	VNLKGV	VN	TIKPF	V	A	GMYEQ	K	S	I	V	A	ISS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	VRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	KV	IAD	NI	KEKI	IA	EIP	F
phaB24	AGITRDNFFP	KLS	P	ADWDAVI	N	VNLKGV	VN	TIKPF	V	A	GMYEQ	K	S	I	V	A	ISS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	N	VRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	KV	IAD	NI	KEKI	IA	EIP	F
phaB25	AGITKDNFFP	KLT	P	EDWDAVI	N	VNLKGV	AY	TIKPF	IA	GMYER	GE	GSIV	G	ISS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	MMKSLARE	GARY	K	VRANAV	P	PGFI	D	TEMT	LA	MP	EKVR	DKI	TA	EIP	F				
phaB26	AGITKDNFFP	KLT	H	DDWDAVI	D	VNLKGV	NH	TIKPF	IS	GMYER	GE	GSIV	C	VSS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	FVKS	LARE	AARY	G	VRANV	S	P	PGFI	E	TEMT	KG	LP	DKVK	DKI	TA	EIP	F		
phaB27	AGITKDNFFP	KLT	P	EDWDAVI	N	VNLKGV	AY	TIKPF	IA	GMYER	GE	GSIV	G	ISS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	MMKSLARE	GARY	K	VRANAV	P	PGFI	D	TEMT	LA	MP	EKVR	DKI	TA	EIP	L				
phaB28	AGITKDNFFP	KLT	H	DDWDAVI	D	VNLKGV	NH	TIKPF	IS	GMYER	GE	GSIV	C	VSS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	G	VRANV	S	P	PGFI	E	TEMT	KG	LP	DKVK	DKI	TA	EIP	F			
phaB29	AGITRDNFFP	KLT	P	QDWDLVI	N	VNLKGV	DH	TIRPF	ID	GMYER	GS	GSIV	C	VSS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	G	VRANA	I	P	PGFI	D	TEMT	KV	IP	DKV	KEKI	IA	EIP	F			
phaB30	AGITRDNFFP	KLA	I	DDWDAVI	D	TNLKGI	YN	TLKPV	IP	KMYDR	RE	GSIV	C	VSS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	LVKSLARE	AARY	G	VRANA	I	P	PGFI	E	TEMT	GA	IP	DKV	KEKI	TA	EIP	F			
phaB31	AGITRDNFFP	KLT	D	ADWDAVI	N	VNLKGV	KN	TIQPF	IE	GMYEQ	NG	GSIVA	ISS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	IVKSLARE	CARY	G	VRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	QA	IP	DKVR	DKI	TA	EIP	F				
phaB32	AGITRDNFFP	KLT	D	ADWDAVI	N	VNLKGV	KN	TIQPF	IE	GMYEQ	NG	GSIVA	ISS	SGDRGNAG	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	IVKSLARE	CARY	G	VRANA	I	P	PGFI	I	TEMT	QA	IP	DKVR	DKI	TA	EIP	F				
phaB33	AGITKDNFFP	KLT	P	ADWDAVL	N	VNLKGV	AY	SIKPF	IE	GMYER	KA	GSIVA	ISS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	MMKSLARE	GARY	G	VRANAV	P	PGFI	D	TEMT	LA	IR	EDI	REKI	TK	EIP	F					
phaB34	AGITKDNFFP	KLT	P	ADWDAVL	N	VNLKGV	AY	SIKPF	IE	GMYER	QS	GSIVA	ISS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	MMKSLARE	GARY	G	VRANAV	P	PGFI	D	TEMT	LA	IR	EDI	REKI	TK	EIP	F					
phaB35	AGITKDNFFP	KLT	P	ADWDAVL	N	VNLKGV	AY	SIKPF	IE	GMYER	KA	GSIVA	ISS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	MMKSLARE	GARY	G	VRANAV	P	PGFI	D	TEMT	LA	IR	EDI	REKI	TK	EIP	F					
phaB36	AGITKDNFFP	KLT	P	ADWDAVL	N	VNLKGV	AY	SIKPF	IE	GMYER	QS	GSIVA	ISS	SGDRGNV	QNTNY	6	TAK	AAVI	G	MMKSLARE	GARY	G	VRANAV	P	PGFI	D	TEMT	LA	IR	EDI	REKI	TK	EIP	F					

	220	230	240	250
3VZS_1	KRLGL	PEEIASI	CAW.LSSEESGFSTGADFS	LNGGLHMG
Controle	RRFGK	PEEIAWA	AFLLSPVASSYVTGEVLRV	NGAHT.
phaB1	RRFGE	PEDIAWA	AYLLSPVASRYVSGEVL	RVNGAQHT.
phaB2
phaB3	RRFGE	PEDIAWA	AFLLSPVANSFVTGEV	LRVNGAHT.
phaB4	RRFGE	PQDIAWA	AYLLSPVASSYVSGE	VLRVNGAHT.
phaB5	RRFGE	PEDIAWA	AFLLSPVANSFVTGE	VLRVNGAHT.
phaB6	RRFGE	PADIAWA	AYLLSPVASSYVSGE	VLRVNGAHT.
phaB7	RRFGE	PADIAWA	AYLLSPIASSYVSGE	VLRVNGAHT.
phaB8	RRFGE	PADIAWA	AYLLSPVASSYVSGE	VLRVNGAHT.
phaB9	RRFGE	PADIAWA	AYLLSPVASSYVSGE	VLRVNGAHT.
phaB10	RRFGE	PADIAWA	AYLLSPVASSYVSGE	VLRVNGAHT.
phaB11	RRFGE	PADIAWA	AYLLSPVASSYVSGE	VLRVNGAHT.
phaB12	RRFGK	PEEVAWA	AFLLSPIASSYITGT	VVRVNGAHT.
phaB13	SRFGE	PEDVAWA	AFLLSPVASSYVTGT	VVRVNGAHT.
phaB14	SRFGE	PEDVAWA	AFLLSPVASSYVTGT	VVRVNGAHT.
phaB15	RRFGK	PEEIAWA	AFLLSPIASSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB16	RRFGK	PEEIAWA	VFLLSPIASSYVSGT	VLKVNGAHT.
phaB17	RRFGK	PEEVAWA	AFLLSPIASSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB18	SRFGE	PEEVAWA	AFLLSPIASSYVTGT	VVRVNGAHT.
phaB19	RRFGE	PEDIAWA	AFLLSPVASSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB20	RRFGK	PEEVAWA	AFLLSPIASSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB21	RRFGE	PEDIAWA	AYLLSPVASSYVSGE	VLRVNGAHT.
phaB22	RRFGE	PEDIAWA	AFLLSPVANSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB23	RRFGE	PEDIAWA	AFLLSPVASSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB24	RRFGE	PEDIAWA	AFLLSPVASSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB25	GRFGK	PEEVAWA	AFLLSPVASSFVTGE	VLRVNGAHT.
phaB26	RRFGK	PEDVAWA	AFLLSPIANSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB27	GRFGK	PEEVAWA	AFLLSPVTSSFVTGE	VLRVNGAHT.
phaB28	RRFGK	PEDVAWA	AFLLSPVANSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB29	RRFGK	PEDIAWA	AYLLSPVASFVSGE	VLRVNGAHT.
phaB30	RRFGK	PEEVAWA	GFLLSPIASSFVTGT	VLQVNGGHT.
phaB31	RRFGE	PQDIAWA	AYLLSPVASSYVSGE	VLRVNGAHT.
phaB32	RRFGE	PQDIAWA	AYLLSPVASSYVSGE	VLRVNGAHT.
phaB33	RRFGK	PEEIAWA	AFLLSPVASSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB34	RRFGK	PEEIAWA	AFLLSPVASSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB35	RRFGK	PEEIAWA	AFLLSPVASSYVTGE	VLRVNGAHT.
phaB36	RRFGK	PEEIAWA	AFLLSPVASSYVTGE	VLRVNGAHT.

APÊNDICE B – Resultado dos cálculos de energia livre pelos métodos MM/PBSA e MM/GBSA, em kcal/mol.

ID	MMGBSA	Std. Dev.	Std. Err. of Mean	MMPBSA	Std. Dev.	Std. Err. of Mean
3VZS	-27.183	3.4275	0.3411	-31.706	3.2573	0.3241
	-30.038	3.7586	0.3740	-31.087	5.2168	0.5191
	-30.08	4.3011	0.428	-34.678	5.2898	0.5264
4RZI	-24.628	3.2765	0.326	-25.645	4.1208	0.41
	-18.307	2.5768	0.2564	-21.868	3.8555	0.3836
	-17.707	3.8976	0.3878	-18.036	6.4128	0.6381
Phab1	-35.918	4.2707	0.5468	-40.071	4.4065	0.5642
	-20.156	4.0932	0.5241	-22.679	4.572	0.5854
	-31.82	2.9384	0.2924	-26.766	4.0979	0.4078
Phab3	-22.943	3.1423	0.3127	-20.104	4.7217	0.4698
	-34.501	2.8557	0.2842	-37.982	3.6501	0.3632
	-18.299	3.0517	0.3037	-23.419	3.5781	0.356
Phab5	-41.552	4.3733	0.5599	-39.03	4.1586	0.5325
	-39.292	3.4799	0.3463	-40.453	4.2165	0.4196
	-51.764	3.4378	0.3421	-42.974	4.7482	0.4725
Phab10	-21.141	2.8037	0.359	-29.188	3.7492	0.48
	-22.482	3.1767	0.3161	-26.634	3.9739	0.3954
	-28.812	6.6054	0.6573	-30.994	5.8327	0.5804
Phab11	-19.94	3.2848	0.3269	-30.28	3.8457	0.3827
	-30.397	4.2582	0.4237	-30.937	5.3792	0.5352
	-23.72	4.0726	0.4052	-25.875	4.3589	0.4337
phab13	-34.458	4.3771	0.4355	-35.665	6.811	0.6777
	-21.765	2.989	0.2974	-23.069	4.5535	0.4531
	-22.706	3.0013	0.2989	-25.454	4.6305	0.4608
Phab15	-24.477	2.6063	0.3337	-27.097	3.0354	0.3886
	-31.937	2.9747	0.3809	-30.128	4.637	0.5937
	-24.789	2.7065	0.2693	-28.832	3.2487	0.3233
Phab16	-35.119	3.6885	0.367	-44.37	4.0658	0.4046
	-33.819	4.4835	0.4461	-40.053	4.9309	0.4906
	-34.745	4.2693	0.4248	-35.057	7.0995	0.7064
Phab17	-28.696	3.1727	0.3157	-37.531	3.6239	0.3606
	-33.916	3.781	0.3762	-31.572	5.0186	0.4994
	-26.421	5.353	0.5326	-25.619	7.0758	0,7041
Phab18	-35.700	3.6192	0.4634	-33.802	4.1888	0.5363
	-37.135	4.078	0.4058	-31.754	4.5149	0.4492
	-37.446	4.4033	0.4381	-39.629	4.7205	0.4697
Phab21	-39.215	3.3086	0.4236	-35.211	3.3962	0.4348

	-30.487	2.7566	0.3529	-30.905	3.9203	0.5019
	-34.574	4.2728	0.4252	-35.949	4.8002	0.4776
Phab25	-11.082	2.4437	0.3129	-20.223	3.0901	0.3956
	-19.348	3.2729	0.3257	-17.569	6.174	0.6143
	-21.031	3.3158	0.3598	-28.156	5.0299	0.5005
Phab26	-30.054	3.1542	0.4039	-34.759	3.6905	0.4725
	-21.572	3.0875	0.3953	-28.672	4.6652	0.5973
	-24.049	2.9253	0.2911	-29.636	4.0388	0.4019
Phab28	-15.329	3.1271	0.3112	-21.942	4.5646	0.4562
	-27.409	2.7508	0.2737	-33.982	3.425	0.3408
	-24.634	2.7537	0.274	-28.459	4.7439	0.472