UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE PESQUISA EM FÁRMACOS E MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

JORDANA KALINE DA SILVA SANTANA

BIOPROSPECÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS DULCÍCOLAS ISOLADAS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

JOÃO PESSOA
2019

JORDANA KALINE DA SILVA SANTANA

BIOPROSPECÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS DULCÍCOLAS ISOLADAS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sínteticos Bioativos da Unversidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração em Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Sassi

JOÃO PESSOA

2019

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S232b Santana, Jordana Kaline da Silva.
Biopropspecção de cianobactérias dulcícolas isoladas do semiárido brasileiro / Jordana Kaline da Silva Santana. - João Pessoa, 2019.
243f. : il.

Orientação: Marcelo Sobral da Silva .
Coorientação: Roberto Sassi .
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Brasilonema sp. 2. Atividade antioxidante. 3. Alcalóides. 4. Desoxicitidina. 5. Citidina. I. Silva, Marcelo Sobral da Silva. II. Sassi, Roberto Sassi. III. Título.

UFPB/BC

JORDANA KALINE DA SILVA SANTANA

BIOPROSPECÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS DULCÍCOLAS ISOLADAS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sínteticos Bioativos da Unversidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração em Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Sassi

JOÃO PESSOA

2019

JORDANA KALINE DA SILVA SANTANA

BIOPROSPECÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS DULCÍCOLAS ISOLADAS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Tese aprovada em: 24/05/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
Orientador

Prof. Dr. Roberto Sassi
Coorientador

Prof. Dr. Darlan Azevedo Pereira
Examinador Externo

Profa. Dra. Marta Maria da Conceição
Examinador Externo

Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti
Examinador Interno

Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa
Examinador Interno

"Tudo posso Naquele que me fortalece."
(Filipenses 4:13)

Aos meus pais, Anízio† e Benta† e aos meus irmãos, pelo incentivo e compreensão para realização deste sonho, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, refúgio e fortaleza, socorro sempre presente, por nunca me desamparar, por ter me ajudado a transpor as barreiras não me deixando desfalecer diante delas. Obrigado Senhor!

Ao meu Pai por ter me feito realizar as melhores escolhas, pela educação, pela confiança, por ter sido atento ao ouvir minhas longas histórias dos feitos acadêmicos e principalmente por torcer e vibrar, à sua maneira, a cada conquista minha (Como queria que presenciasse mais esta, quando oficialmente me tornarei Doutora!). Te amarei incondicional e eternamente!

À minha Mãe, pelo exemplo de mulher, força e superação incomuns a toda e qualquer pessoa que conheço, fonte incontestável de resiliência, por ter me ensinado que por maior e árdua que seja a luta, ter serenidade e confiança em Deus é primordial para ultrapassá-la, recitando sempre, nos momentos felizes ou angustiantes "Os que confiam no Senhor são como o monte de Sião, que não se abalam, mas permanecem para sempre". A Senhora poderia ter sido eterna neste plano. Te amarei incondicional e eternamente Mãe!

Aos meus irmãos, por me fazerem acreditar no meu potencial, por serem o suporte que são, por todas as conversas e conselhos, longos telefonemas e mensagens que, diariamente, fizeram da distância apenas um limite físico, pois foram e são as pessoas mais presentes em todos os momentos da minha vida. "Ainda bem que a gente tem a gente". Muito Obrigado por Tudo. Amo vocês!

À grande Família Santana, pela torcida e por me fazer guiar pelos caminhos corretos, mostrando-me que honestidade e respeito são essenciais à vida. Amo muito todos vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Sobral por ter aceito minha orientação, pelos conhecimentos e experiências compartilhados com sapiência e sempre com bom humor.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Roberto Sassi, pelo cuidado de pai, pela paciência, incentivo, transmissão de conhecimentos, confiança, por me impulsionar a buscar e ir além daquilo que acredito ser o suficiente e pela parceria nestes onze anos de vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Josean Fechine, que em parceria com o Prof. Braz, não mediram esforços para concretude deste trabalho. Por todo o empenho para descoberta do então inexplorado (para o LMCA) universo das cianobactérias. Por não ter desistido apesar de todas as dificuldades. Como o próprio me falou "A gente suporta muitas coisas porque a gente é do sertão e somos condicionados a persistir e não desistir!".

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela oportunidade de realização deste curso e a CAPES pela concessão da bolsa.

A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) (Processo: 407519/2013-0) pelo apoio financeiro concedido.

Ao Laboratório de Ambiente Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB), nas pessoas do Prof. Roberto e da Profª Cristiane, pelo acolhimento, orientações e espaço laboratorial cedido para realização da pesquisa.

Ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise na pessoa do Prof. Dr. Marcelo Sobral por ter me aberto as portas e dado a oportunidade de conhecer e aprender um pouco desse fascinante universo da química de produtos naturais, fundamentais para desenvolvimento deste trabalho e enriquecimento da minha vida acadêmica.

Às professoras Dra.Cristiane Sassi, Dra. Edeltrudes Lima, Dra.Mariana Sobral e Dra. Maristela pela realização das análises em vossos Laboratórios. Gratidão!

Ao corpo docente do PPgPNSB, pelas contribuições para completude de minha formação.

Ao meu querido Morais, por me fazer acreditar que há um momento certo para tudo e por ter estado comigo na desafiadora reta final. Muito obrigada pela paciência! Amo Tu!

Aos amigos e companheiros do LARBIM: Evandro, Gabriel, Roberta, Patrícia, Viviane Barrros, Viviane Tibúrcio, Rebeca, Jéssica, Andressa e Amanda. Pelos cafés, pelas gargalhadas, por aguentarem meus estresses, pela troca de experiências, o que faz do laboratório um ambiente familiar, a nossa segunda casa. Moram no meu coração e não pagam pedágio!

Aos amigos e companheiros do LMCA, pelo acolhimento do "ser oriundo de Nárnia" e "doutoranda IC no universo fitoquímico", pela paciência ao me instruírem para desenvolvimento das análises e experimentos diversos, pelos incontáveis cafés regados de conversas e risadas (momento terapia), quer durante o dia ou durante as

madrugadas. Vocês são a tradução de que sozinho ninguém faz uma pesquisa/tese. Não chegaria até aqui sem a ajuda de cada um de vocês! Vocês são luz!

Ao meu amigo Anderson Angel (Ângéééél...), literalmente um anjo que Deus colocou na minha vida, propiciando leveza a essa caminhada, por me fazer acreditar que "eu posso", pela amizade e companhia, pela partilha de conhecimentos, pela doação de dias e noites (e dos ouvidos para minhas longas e tantas histórias (risos largos)), fundamentais para a concretude deste trabalho. Você será sempre amado e especial! Gratidão!

À minha amiga Clediana (Cledii...), exemplo de determinação, por tudo! Sempre disposta a me ajudar em todas as instâncias. Do LARBIM para a minha vida inteira!

Aos queridos Katharina e Renato, pela amizade, por atenderem aos meus pedidos e pelos agradáveis momentos família em vossa casa!

Aos técnicos Nonato, Sócrates, Vicente, Evandro, Marcelo e Madalena, pessoas incríveis, por atenderem aos meus pedidos/aperreios ("Paga dez!", "Triplica o tempo do meu próton?" (risos...)), pelas conversas edificantes e cômicas.

À Caroline Mangueira por me 'aguentar' e socorrer a cada chamado (Carooool...). Gratidão, és um ser de muita luz!

Às minhas estimadas amigas-irmãs Cris e Larisse, pela torcida, por estarem sempre à disposição para me ouvir, ajudar e por continuarem sendo presentes. Nossas vidas não se encontraram por acaso lá em 2007. Amo-as ainda mais!

Às amigas de sempre, Patrícia e Aline, pelas nossas longas conversas em nossos então esporádicos encontros com múltiplas pautas, mas que em nada mudam, só a fraternidade e o carinho que aumentam. Amo Vocês!

Aos professores pela gentileza em compor a banca.

Enfim, à todas as pessoas que torceram, incentivaram e oraram comigo para mais esta conquista.

Muito Obrigada a todos!

RESUMO

SANTANA, J. K. S. Biopropspecção de cianobactérias dulcícolas isoladas do semiárido brasileiro. 2019. 243p. Tese (Doutorado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

O objetivo deste trabalho foi testar diferentes espécies de cianobactérias dulcícolas quanto a sua capacidade de produção de metabólitos secundários de interesse biotecnológico na indústria farmacêutica. Os cultivos foram realizados com linhagens do Banco de Cultura de Microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB) que através de análises morfológicas e moleculares foram identificadas como *Arthrospira platensis* (D39Z), *Stanieria cyanosphaera* (D112Z) e *Brasilonema* sp. (D298WC). Nenhuma das linhagens apresentou microcistina. Os teores de proteínas hidrossolúveis (%) foram de 23,3±1,20 (D39Z), 36,7±0,50 (D112Z), 36,0±1,57 (D298WC); para carboidratos totais (%) foram de 8,27±0,68 (D39Z), 13,3±1,55 (D112Z), 17,4±2,35 (D298WC); e para lipídeos totais (%) foram de 6,00±3,31 (D39Z), 6,00±0,00 (D112Z), 14,00±1,09 (D298WC). A análise do perfil de FAMEs para as três linhagens permitiu identificar e quantificar dezoito ácidos graxos distintos (saturados, insaturados e poli-insaturados). Visando extrair e isolar metabólitos secundários foram obtidos extratos metanólicos das três linhagens. Uma pequena fração do extrato bruto foi direcionada para realização de testes de atividade antioxidante e de atividade antimicrobiana. A parte excedente do extrato da D298WC foi desengordurada e submetida a análises por Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP) para fracionamento. As frações foram analisadas por RMN ^{1}H, avaliado o perfil químico e posteriormente purificadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa e preparativa, sendo as frações obtidas analisadas por RMN (^{1}H, ^{13}C, HMBC e HSQC) visando a elucidação estrutural das substâncias obtidas, sendo estas, confirmadas pela técnica de espectrometria de massas e direcionadas para avaliação da atividade citotóxica. Os maiores teores de fenólicos extraíveis totais foi apresentado pela D112Z (33,35±0,05) e D298WC (34,19±0,95). Quanto a determinação da capacidade antioxidante, o resultado do ensaio com DPPH, a atividade foi maior para a D39Z (79,33±013); para o ensaio de ABTS, as melhores capacidade antioxidante total foi para a D39Z (18,16±0,26) e D112Z (10,27±0,69); e para o ensaio FRAP a maior capacidade foi para a D39Z (16,14±0,18). Quanto a atividade antimicrobiana, o extrato metanólico da D39Z, nas concentrações de 512 a1024 µg/mL inibiu o crescimento de seis das oito cepas (75 %) dos microorganismos, incluindo bactérias e fungos, enquanto da D112Z e D298WC apresentaram atividade inibitória sobre três das seis cepas dos micro-organismos utilizados nos ensaios.O estudo fitoquímico da *Brasilonema* sp. permitiu o isolamento e identificação de uma substância derivada da clorofila, o éster trimetílico da clorina-e6 e duas misturas, sendo uma dela uma mistura dos alcalóides aporfínicos metil12-metoxi-7a,8-di-hidro-5H-[1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]benzo[g]quinolina-7(6H)-carboxilato (Sassicina A) e 12-metoxi-7a,8-di-hidro-5H-[1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]benzo[g]quinolino-7(6H)de etilo-carboxilato (Sassicina B), de natureza inédita, e a outra uma mistura de nucleosídeos (desoxicitidina e citidina) e aminoácidos (tirosina, isoleucina eleucina). Quando em avaliação de atividade citotóxica apresentaram atividade moderada, exceto para os alcaloides que a atividade foi baixa para células de carcinoma colorretal (HCT-116) e nulo para as células de adenocarcinoma mamário (MCF-7).

Palavras-chave: *Brasilonema* sp.; Atividade antioxidante; Alcalóides; Desoxicitidina; Citidina.

ABSTRACT

SANTANA, J. K. S. Biopropspecção de cianobactérias dulcícolas isoladas do semiárido brasileiro. 2019. 243p. Tese (Doutorado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

The purpouse of work was test different species of freshwater cyanobacteria as to their ability to produce secondary metabolites of biotechnological interest in the pharmaceutical industry. The cultures were carried out with strains from the Microalgae Culture Bank of LARBIM/UFPB, which through morphological and molecular analyzes were identified as *Arthrospira platensis* (D39Z), *Stanieria cyanosphaera* (D112Z) and *Brasilonema* sp. (D298WC). The strains did not present microcystin. The water-soluble protein contents (%)were 23.3 ± 1.20 (D39Z), 36.7 ± 0.50 (D112Z), 36.0 ± 1.57 (D298WC); for total carbohydrates (%) were 8.27 ± 0.68 (D39Z), 13.3 ± 1.55 (D112Z), 17.4 ± 2.35 (D298WC); and for total lipids (%) were 6.00 ± 3.31 (D39Z), 6.00 ± 0.00 (D112Z), 14.00 ± 1.09 (D298WC). Analysis of the fatty acid methyl esters profile for the three strains allowed the identification and quantification of eighteen different fatty acids (saturated, unsaturated and polyunsaturated). In order to extract and isolate secondary metabolites, crude extracts of the three strains were obtained. A little bit fraction of the crude extract was directed to tests of antioxidant and antimicrobial activity. The excess portion of the D298WC extract was defatted and subjected to Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) analyzes for fractionation. The fractions were analyzed by ^{1}H NMR, the chemical profile evaluated and later purified on preparative and semi-preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The fractions was analyzed by NMR (^{1}H, ^{13}C, HMBC and HSQC) for structural elucidation of the obtained substances, being these, confirmed by the technique of mass spectrometry and directed to evaluate the cytotoxic activity. The highest total extractable phenolic contents were presented by D112Z (33.35 ± 0.05) and D298WC (34.19 ± 0.95). Regarding the determination of the antioxidant capacity, the result of the DPPH assay, the activity was higher for D39Z (79.33 ± 013); for the ABTS assay, the best total antioxidant capacity was for D39Z (18.16 ± 0.26) and D112Z (10.27 ± 0.69); and for the FRAP assay the highest capacity was for D39Z (16.14 ± 0.18). The antimicrobial activity, the D39Z methanolic extract, at concentrations of 512 to 1024 μg / mL, inhibited the growth of six of the eight strains (75%) of the microorganisms, including bacteria and fungi, while D112Z and D298WC showed inhibitory activity on three of the six strains of the microorganisms used in antimicrobial activity assays. The phytochemical study of the cyanobacteria *Brasilonema* sp. allowed the isolation and identification of three substances. A substance derived from chlorophyll, the chlorin-e6-*trimethyl ester* and two mixtures, one of them being a mixture of the aporphonic alkaloids methyl12-methoxy-6,7,7a,8-tetrahydro-5H-benzo[1,10]phenanthro[3,4-d][1,3]dioxole-7-carboxylate (Sassicine A) and ethyl12-methoxy-7a,8-dihydro-5H-[1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]benzo[g]quinolone 7(6H)-carboxylate (Sassicine B). And other a mixture of nucleosides (deoxycytidine and cytidine) and amino acids (tyrosine, isoleucine and leucine). The substance and mixtures when evaluated for cytotoxic activity showed moderate activity, except for the alkaloids that the activity was low for colorectal carcinoma cells (HCT-116) and zero for mammary adenocarcinoma cells (MCF-7).

Keywords: *Brasilonema* sp .; Antioxidant activity; Alkaloids; Deoxycytidine; Cytidine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	*Attached Proton Test*
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLMP	Cromatografia Líquida de Média Pressão
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
dl	Dubleto largo
DMSO	Dimetilsufóxido
DMSO-d_6	Dimetilsufóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribossomal
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAME	Ésteres metílicos de ácidos graxos
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
HMBC	*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HSQC	*Heteronuclear Single Quantum Correlation*
J	Constante de acoplamento
k	Velocidade de crescimento
m	Multipleto
MeOH	Metanol
MeOH-d_6	Metanol deuterado
MHz	Mega-hertz
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
ω-3	Ômega 3
ω-6	Ômega 6
ω-9	Ômega 9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Demonstração de produtos e aplicações das microalgas 36

Figura 2 - Vias celulares de espécies reativas de oxigênio (ERO) em microalgas 40

Figura 3 - Ilustração de cianobactérias unicelulares (A) e filamentosas (B).....42

Figura 4- Classificação das cianobactérias de acordo com Stanier et al. 1979 43

Figura 5 - Árvore filogenética de cianobactérias baseada em 31 seqüências proteicas conservadas. As ordens de cianobactérias incluídas no sistema atual são destacadas na árvore 44

Figura 6 - Estrutura de algumas cianotoxinas. Microscistina-LR, nodularinas, anatoxina-a, homoanatoxina, anatoxina-a(s), saxitoxinas e cilindrospermopsinas.....47

Figura 7 - Representação diagramática de alguns metabólitos secundários de cianobactérias 48

Figura 8 - Estrutura de alguns metabólitos secundários de cianobactérias marinhas. 50

Figura 9 - Metabólitos secundários isolados de cianobactérias dulcícolas (HARADA, 2004) 53

Figura 10 - Estrutura química do alcalóide norharmane. 55

Figura 11 – Cultivo das cianobactérias em frascos mariotes no LARBIM/UFPB. 66

Figura 12- Cromatograma do extrato desengordurado da cepa D298WC em Cromatografia Líquida de Média Pressão.....75

Figura 13 - Eluição do extrato desengordurado da cepa D298WC por Cromatografia Líquida de Média Pressão 76

Figura 14 - Comparação dos espectros de RMN de ^{1}H das frações que reunidas originaram a fração R1.....77

Figura 15 – Fotografia microscópica da linhagem *A. platensis* (A – Aumento de 200x; B - Aumento de 400x; C, D - Aumento de 630x; E, F - Aumento de 1000x).....89

Figura 16 – Fotografia microscópica da linhagem *S. cyanosphaera* (Aumento de 1000x) 91

Figura 17 – Fotografia microscópica da linhagem *Brasilonema* sp. (A – Aumento de 200x; B - Aumento de 400x; C, D- Aumento de 630x; E, F - Aumento de 1000x) 92

Figura 18 - Estruturas dos ésteres metílicos de ácidos graxos 96

Figura 19 – Cromatograma da fração R1 101

Figura 20 - Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1.....109

Figura 21 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de -0,1 a -2,6 ppm.....110

Figura 22 - Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 2,70-1,50 ppm.....111

Figura 23 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 4,50-3,16 ppm.....112

Figura 24 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 6,6-5,96 ppm.....113

Figura 25 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 5,56-5,00 ppm.....114

Figura 26 - Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 7,62-6,98 ppm.....115

Figura 27– Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 9,9-7,9 ppm.....116

Figura 28 - Espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1.....117

Figura 29 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 2,6-0,0 x 65-0 ppm.....118

Figura 30 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 6,4-2,8 x 60-10 ppm.....119

Figura 31 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 6,36-6,10 x 165-120 ppm.....120

Figura 32 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 8,40-7,60 x 134-117 ppm.....121

Figura 33 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 10,5-8,3 x 115-80 ppm.....122

Figura 34 – Espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1.....123

Figura 35 – Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 4,6-0,8 x 190-110 ppm.....124

Figura 36 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 2,1-0,2 x 175-135 ppm.....125

Figura 37 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 1,80-0,80 x 60-15 ppm.....126

Figura 38 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 3,80-3,15 x 165-120 ppm.....127

Figura 39 - Forma estrutural do éster trimetílico da clorina e6.....98

Figura 40 – Cromatograma da fração R1 128

Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 6,75 a 1,00 ppm.....133

Figura 42 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 7,30 a 6,75 ppm 134

Figura 43 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 6,05 a 5,90 ppm 135

Figura 44 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 4,50 a 3,60 ppm 136

Figura 45 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 3,20 a 2,20 ppm 137

Figura 46 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 1,60 a 0,60 ppm 138

Figura 47- Faixas de deslocamentos químicos característicos de alguns hidrogênios de alcalóides aporfínicos. 13824

Figura 48 – Espectro de RMN de 13C-APT (500 MHz, DMSO-d6) de Bs-2 na região de 160 a 10 ppm 139

Figura 49 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (125 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 157 a 125 ppm.....140

Figura 50 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (125 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 130 a 105 ppm.....141

Figura 51 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (125 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 115 a 90 ppm.....142

Figura 52 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (125 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 65 a 36 ppm.....143

Figura 53 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (125 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 41 a 14 ppm.....144

Figura 54 – Espectro de HSQC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 7,5-1,0 x 130-25 ppm.....145

Figura 55 – Expansão do espectro de HSQC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 7,5-5,5 x 136-96 ppm.....146

Figura 56 – Expansão do espectro de HSQC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 4,8-1,0 x 78-10 ppm.....147

Figura 57 – Espectro de HMBC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 8,0-1,0 x 165-55 ppm.....148

Figura 58 – Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 7,5-5,0 x 160-96 ppm.....149

Figura 59 – Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 4,8-1,0 x 165-55 ppm.....150

Figura 60 – Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 6,5-1,0 x 70-1 ppm.....151

Figura 61 - Forma estrutural dos alcalóides Sassicina A e Sassicina B 151

Figura 62 - Cromatograma obtido pela CL-EM da Bs-2 de *Brasilonema sp.* 152

Figura 63 - Espectro de massas de baixa resolução, modo positivo [M+H]+ em 37,5 min da Sassicina A 153

Figura 64 - Proposta de fragmentação de Sassicina A 154

Figura 65 - Espectro de massas de baixa resolução, modo positivo [M+H]+ em 46,0 min de Sassicina B.....155

Figura 66 - Proposta de fragmentação de Sassicina B 156

Figura 67 - Cromatograma da fração e Fr.40%-MP2-pico-2 em CLAE Preparativa de Brasilonema sp. (D298WC) 157

Figura 68 - Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $MeOD_6$) de Bs-3A e Bs-3B.....162

Figura 69 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 8,10-7,92 ppm 163

Figura 70 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 7,56-7,30 ppm 164

Figura 71 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 7,20-6,60 ppm 165

Figura 72 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 6,40-5,55 ppm 166

Figura 73 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 4,59-4,34 ppm 167

Figura 74 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 4,33-4,13 ppm 168

Figura 75 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 4,05-3,85 ppm 169

Figura 76 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 3,83-3,65 ppm 170

Figura 77– Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 3,62-3,34 ppm 171

Figura 78 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 3,28-2,86 ppm 172

Figura 79 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 2,72-2,32 ppm 173

Figura 80 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 2,23-2,06 ppm 174

Figura 81 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 2,04-1,74 ppm 175

Figura 82 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 1,70-1,55 ppm 176

Figura 83 – Espectro de RMN de ^{13}C-APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B 177

Figura 84 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 185-80 ppm 178

Figura 85 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 80-54ppm 179

Figura 86 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 47-11 ppm 180

Figura 87 – Espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B 181

Figura 88 – Espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 9,5-5,5 x 165-70 ppm 182

Figura 89 – Espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 4,7-3,1 x 95-40 ppm.....183

Figura 90 – Espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B.....184

Figura 91– Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 4,5-0,5 x 190-70 ppm.....185

Figura 92 – Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 9,25-5,5 x 165-80,25 ppm.....186

Figura 93– Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região 4,5-0,5 x 105-10 ppm 187

Figura 94 – Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 1,26-0,78 x 65-10 ppm.....188

Figura 95 - Espectro de RMN de 1H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E.....195

Figura 96 - Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E 196

Figura 97 - Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E 197

Figura 98 - Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 3,64-3,36 ppm 198

Figura 99 - Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 2,72-2,32 ppm 199

Figura 100 - Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 2,04-1,74 ppm 200

Figura 101 - Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 1,71-1,52 ppm 201

Figura 102 - Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 1,10-0,89 ppm 202

Figura 103 - Espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B.....203

Figura 104 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 185-80 ppm.....204

Figura 105 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 80-50 ppm.....205

Figura 106 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 47-9 ppm 206

Figura 107 - Espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E 207

Figura 108 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 9,0-5,5 x 165-70 ppm 208

Figura 109 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 4,7-3,0 x 95-40 ppm 209

Figura 110 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 2,8-0,5 x 55-5 ppm 210

Figura 111 - Espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E 211

Figura 112- Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 4,5-0,5 x 190-70 ppm 212

Figura 113- Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 9,0-5,5 x 170-80 ppm 213

Figura 114- Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E 214

Figura 115 - Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 1,26-0,78 x 65-10 ppm 215

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do Meio Zarrouk. 64

Tabela 2 – Composição do Meio WC 65

Tabela 3 – Método de separação em (CLAE semi-preparativa) da fração R1 78

Tabela 4 – Método de separação em (CLAE semi-preparativa) da fração Fr.40% 78

Tabela 5 – Método de separação em (CLAE preparativa) da fração Fr.40%-2 78

Tabela 6 - Constante de crescimento k (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g/L) 86

Tabela 7 - Resultado do sequenciamento para as cepas D39Z, D112Z e D298WC 87

Tabela 8 – Presença de microcistina (µg.mg^{-1} de biomassa seca) nas linhagens de cinaobactérias estudadas 93

Tabela 9 - Teores de proteínas, carboidratos e lipídeos da biomassa das linhagens de ciabobactérias estudadas (D39Z – *A. platensis*, D112Z – *Stanieria* sp. e D298WC – *Brasilonema* sp.) 94

Tabela 10 - Percentual relativo dos FAMEs identificados nas espécies de ciabobactérias estudadas (D39Z – *A. platensis*, D112Z – *Stanieria* sp. e D298WC – *Brasilonema* sp.) 95

Tabela 11 – Teor de fenólicos extraíveis totais para as espécies estudadas 98

Tabela 12 - Determinação da capacidade antioxidante nos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP para os extratos metanólicos das espécies de cianobactérias estudadas 99

Tabela 13 - Resultados da avaliação da CIM (µg/mL) de quatro produtos-algas sobre bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos- Técnica de microdiluição 100

Tabela 14 - Dados de RMN ^{1}H, HSQC e HMBC de Bs-1 (δ, $CDCl_3$, 400 MHz) em comparação com dados de Santos (2013) 104

Tabela 15 - Dados de RMN ^{1}H, RMN ^{1}3C e HMBC de Lb-1 (δ, DMSO-d_6, 500 MHz, 125 MHz) em comparação com dados da literatura 132

Tabela 16 - Dados de RMN de HSQC e HMBC (δ, MeOH-d_6, 400 MHz, 100 MHz) de Bs-3A em comparação com dados de Jones (1970) 161

Tabela 17 - Dados de RMN de HSQC e HMBC (δ, MeOH-d_6, 400 MHz, 100 MHz) de Bs-3B em comparação com dados de Jones (1970) 161

Tabela 18 - Dados de RMN de HSQC e HMBC (δ, MeOH-d_6, 400 MHz, 100 MHz) de Bs-3C em comparação com dados de Pretsch et al., (2000) 190

Tabela 19 - Dados de RMN de HSQC e HMBC (δ, MeOH-d_6, 400 MHz, 100 MHz) de Bs-3D em comparação com dados de Breitmaierand e Voelter (1987) e Pretsch et al. (2000)..191

Tabela 20 - Dados de RMN de HSQC e HMBC (δ, MeOH-d_6, 400 MHz, 100 MHz) em comparação com dados da literatura para Bs-3E.....192

Tabela 21 -Efeito das substâncias na viabilidade das células HCT-116 após 72 h de tratamento. 216

Tabela 22 - Efeito das substâncias na viabilidade das células MCF-7 após 72 h de tratamento. 216

LISTA DE ESQUEMAS

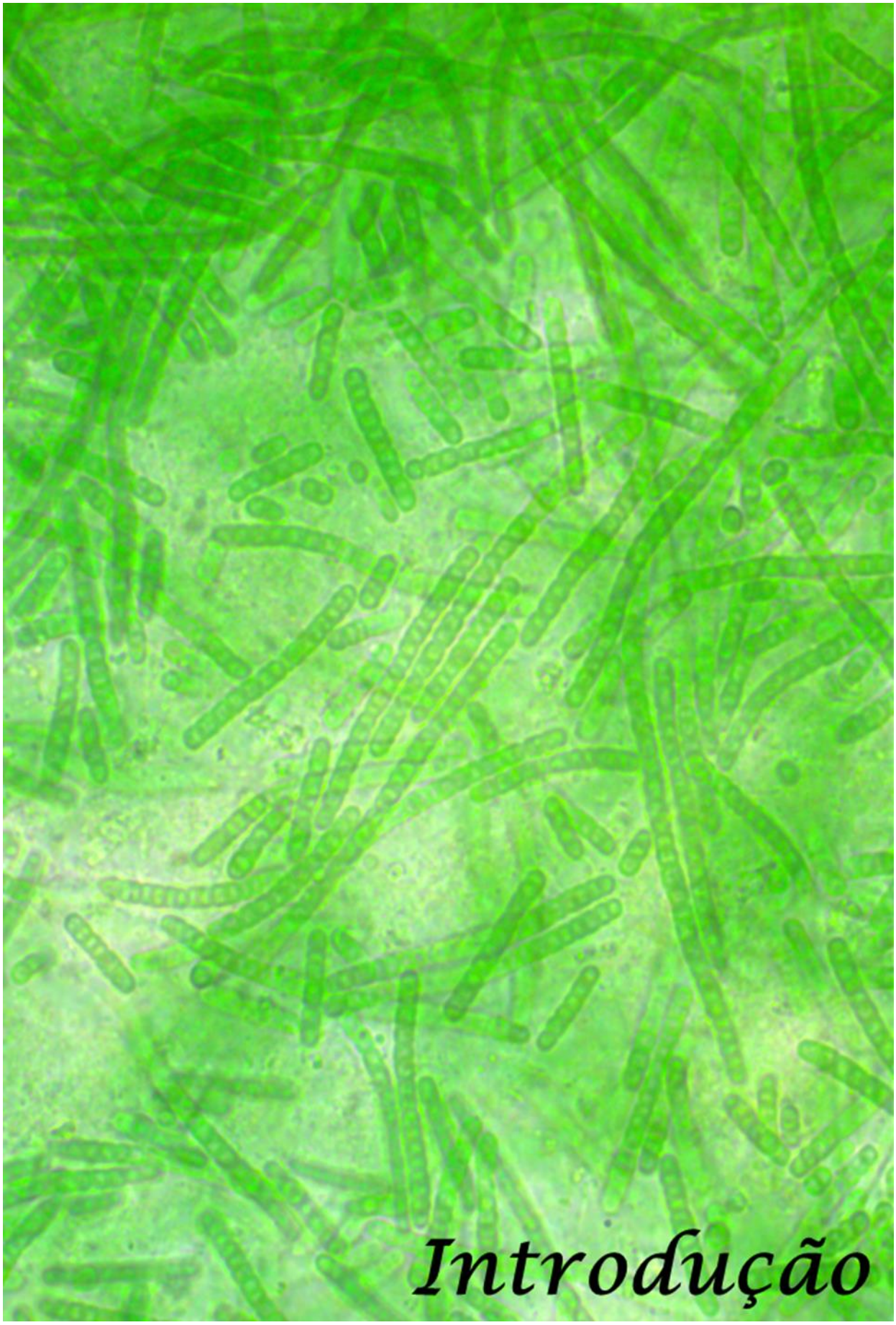
Esquema 1 - Metodologia para obtenção do extrato bruto.....71

Esquema 2 - Esquema Isolamento e purificação dos constituintes químicos 74

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO 24
2 OBJETIVOS 29
2.1 Objetivo geral 29
2.2 Objetivos específicos 29
3 REFERENCIAL TEÓRICO 31
3.1 Cultivo de microalgas 31
3.2 Potencial biotecnológico das microalgas 36
3.3 Cianobactérias 41
3.3.1 Aspectos gerais e taxonômicos 41
3.3.2 Metabólitos secundários 46
3.3.3 Considerações sobre a biossíntese dos metabólitos secundários de cianobactérias . 56
3.4 Considerações sobre técnicas utilizadas para identificação de metabólitos secundários 59
4 METODOLOGIA 63
4.1 Obtenção das culturas: coletas, isolamento, purificação e manutenção dos cultivos .. 63
4.2 Preparação dos meios de cultura 63
4.3 Experimentos laboratoriais de crescimento e produção de biomassa nos meios sintéticos para análise dos metabólitos secundários 66
4.4 Acompanhamento dos cultivos 66
4.5 Taxonomia 67
4.6 Caracterização genotípica 68
4.6.1 Extração do DNA 68
4.6.2 Quantificação e pureza do DNA 69
4.6.3 Amplificação por PCR 69
4.6.4 Sequenciamento 69
4.7 Análise de cianotoxina 70
4.8 Composição bioquímica 70
4.9 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos 70
4.10 Extração dos metabólitos secundários e experimentação de sua atividade antimicroabiana e citotóxica 71
4.10.1 Estudo fitoquímico 71
4.10.2 Estudo farmacológico 81

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 86
5.1 Cultivo das cianobactérias dulcícolas isoladas do semiárido 86
5.2 Sequenciamento genético 87
5.3 Descrição das espécies 88
5.4 Análise de cianotoxina 93
5.5 Composição bioquímica 94
5.6 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos 95
5.7 Teor de fenólicos extratíveis totais 98
5.8 Determinação da capacidade antioxidante 98
5.9 Antimicrobiana dos extratos brutos 99
5.10 Caracterização estrutural de Bs-1 101
5.11 Caracterização estrutural de Bs-2 128
5.12 Caracterização estrutural de Bs-3 157
5.12.1 Caracterização estrutural de Bs-3A e Bs-3B 158
5.12.2 Caracterização estrutural de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E 189
5.13 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* das substâncias isoladas da cianobactéria *Brasilonema* sp. (D298WC) 216
6 CONCLUSÕES 218
REFERÊNCIAS 221


Introdução

1.INTRODUÇÃO

Microalgas ocorrem em todos os ecossistemas da terra, não somente nos aquáticos, mas também terrestres, e englobam uma grande variedade de espécies que vivem em condições ambientais amplamente variáveis (MATA *et al.,* 2010). Elas fixam CO_2 da atmosfera através do processo da fotossíntese e suas taxas de fixação são, até, 10 vezes superiores à das plantas terrestres (OHSE *et al.,* 2009; HOLANDA, 2011).

O uso do termo microalgas é empregado, porém não tem nenhuma conotação taxonômica visto que inclui distintos grupos de protoctistas e é de natureza polifilética, incluindo também clorofíceas, bacilariofíceas, dinofíceas, euglenofíceas, eustigmatofíceas, xantofíceas, glaucofíceas, entre outros.

As cianobactérias, também conhecidas como cianofíceas ou algas azuis, são organismos procariontes, aeróbios e fotossintetizantes, que possuem uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em diversas condições ambientais. O grupo abriga cerca de 150 gêneros, dos quais 40 são potencialmente tóxicos. Surgiram no planeta Terra há cerca de 3,5 bilhões de anos e foram indispensáveis para a conversão da atmosfera primitiva à atual (FERREIRA, 2008).

Os cultivos intensivos de microalgas representam hoje um dos mais modernos processos da biotecnologia, podendo ser usadas na produção de medicamentos e fármacos, alimentos e intermediários químicos para o setor petroquímico, bioplásticos, biocombustíveis e compostos bioativos diversos (DERNER *et al.,* 2006; WANG *et al.,* 2007; AMBROSI *et al.,* 2008; CHU *et al.,* 2010, MUNDT *et al.,* 2014),

Carotenoides, terpenóides, xantofilas, clorofila, vitaminas, ácidos graxos saturados e polinsaturados, aminoácidos, acetogeninas, antioxidantes, alcalóides, polifenóis, compostos halogenados e polissacarídeos diversos (KLISCH; HADER, 2008; SOUZA *et al.,* 2009; CABRITA *et al.,* 2010; CENPACHECO *et al.,* 2010; GUVEN *et al.,* 2010; KELLMANN et al, 2010; GOIRIS *et al.,* 2012; ASSIS *et al.,* 2014) são apenas alguns outros exemplos de metabólitos secundários que podem ser obidos a partir de microalgas, aspectos estes que colocam as microalgas na vanguarda das pesquisas em biotecnologia de ponta.

São muitos os aspectos que viabilizam o cultivo de microalgas: elas podem ser cultivadas em áreas inadequadas à agricultura tradicional; os cultivos em massa podem ser desenvolvidos em pequenos espaços; apresentam produção contínua durante o ano; praticamente não geram danos ambientais; quando realizados em larga escala representam uma prática sustentável e tem importância social, podendo gerar emprego e renda; possuem

necessidades reduzidas de nutrimentos; podem ser desenvolvidos independentemente das mudanças sazonais, não competindo, portanto, com os usos da terra para agricultura; e podem usar águas residuais como meio de cultura (MATA *et al.,* 2010).

O domínio de técnicas de produção de concentrados algáceos a partir de culturas de microalgas também poderá abrir novos campo de investigações acerca de compostos bioativos de importância econômica e científica, particularmente sobre antioxidantes como a astaxantina e corantes naturais como a ficoeritrina, ficocianina e clorofila.

Hoje, diversas unidades de cultivo em massa de microalgas foram implantadas em diversos países como o México, Estados Unidos, Japão, Austrália, Índia e Cuba, sendo que a produção desses países vem aumentando expressivamente a cada ano.

No Brasil, a região Nordeste é onde se insere a maior parte do semiárido que apresenta como fator de destaque o clima com características específicas: temperaturas altas, acima dos 20º C de médias anuais, precipitações escassas, entre 280 a 800 mm e déficit hídrico responsável pela variação dos outros elementos que compõem as paisagens. Ao clima estão adaptados a vegetação e os processos de formação do relevo. Os solos são, em geral, pouco desenvolvidos em função das condições de escassez das chuvas, os rios são em sua maioria intermitentes e condicionados ao período chuvoso (ARAÚJO, 2011).

Considerando-se a existência de regiões com condições climáticas potencialmente adequadas, com temperaturas amenas e sol em abundância, o cultivo em massa de microalgas é um campo de investigação que necessita de mais atenção e sua prática parece ser uma possibilidade socioeconômica muito promissora, particularmente na região Nordeste, uma vez que é possível usar as condições climáticas a favor do desenvolvimento de cultivos em larga escala com espécies resistentes, ou seja, já adaptadas às condições locais e que apresentam diversos potenciais para usos biotecnológicos.

Os produtos naturais têm sido usados para tratar doenças há milhares de anos e são uma fonte útil de compostos bioativos usados na indústria farmacêutica como compostos líderes na descoberta de drogas. Eles podem ser usados como modelos para a síntese de novos fármacos para tratar doenças. As cianobactérias têm sido amplamente pesquisadas para suas aplicações neste campo, por ser apontada uma ampla gama de potenciais atividades como antimicrobianas, anticâncer, antivirais e antiinflamatórias (BALASUNDARAM *et al.,* 2012)

Existem limitações no que diz respeito às drogas com as atividades supracitadas devido ao seu preço e efeitos colaterais. Portanto, uma triagem por produtos naturais nos direcionará à biomoléculas de interesse adequadas.

As quimioterapias usadas atualmente no tratamento do câncer causam sérios efeitos colaterais; alternativas derivadas naturalmente dão oportunidades para sintetizar novas drogas altamente potentes com menos efeitos colaterais (RASTOGI; SINHA, 2009; ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2013). Os metabólitos citotóxicos produzidos por cianobactérias geralmente têm como alvo filamentos de tubulina ou actina em células eucarióticas, o que os torna agentes anticâncer promissores (RASTOGI; SINHA, 2009).

A diversidade química na natureza é baseada na diversidade biológica e geográfica, por isso pesquisadores viajam ao redor do mundo obtendo amostras para analisar e avaliar em telas de descoberta de drogas ou bioensaios e também para compartilhar as descobertas. Esse esforço de busca de produtos naturais é conhecido como bioprospecção. (LAHLOU, 2013).

No tocante as cianobactérias, a seleção de espécies com alto potencial biotecnológico é um aspecto importante a se considerar, pois pode direcionar-se à redução de custos no processo produtivo. Isso justifica a necessidade de estudos das espécies locais visto que uma grande variedade de microalgas ainda permanece bioquímica e metabolicamente inexplorada (YU *et al.*, 2015; CHIAIESE *et al.*, 2018; MONTERO-LOBATO *et al.*, 2018).

Na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) o Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM) possui um banco de microalgas mantido a mais de 20 anos, com aproximadamente 700 cepas variando em espécies marinhas, estuarinas, terrestres e dulcícolas, o que viabiliza o desenvolvimento e a realização dos cultivos necessários para pesquisas desse cunho.

Para nosso propósito, destacamos as cianobactérias, muitas das quais possuem desconhecidos metabólitos secundários que deverão ser promissores para a indústria farmacêutica, além de conhecermos a química desses microrganismos.

Não nos resta dúvidas de que os metabólitos secundários (produtos naturais) foram e serão fontes importantes de novos compostos farmacêuticos. O renovado interesse deverá continuar progressivamente, todavia a menos que tomemos medidas específicas para proteger e desenvolver as fontes destes em condições sustentáveis, a janela de oportunidade para a descoberta de novos agentes medicinais e biológicos tenderá a se fechar.


Objetivos

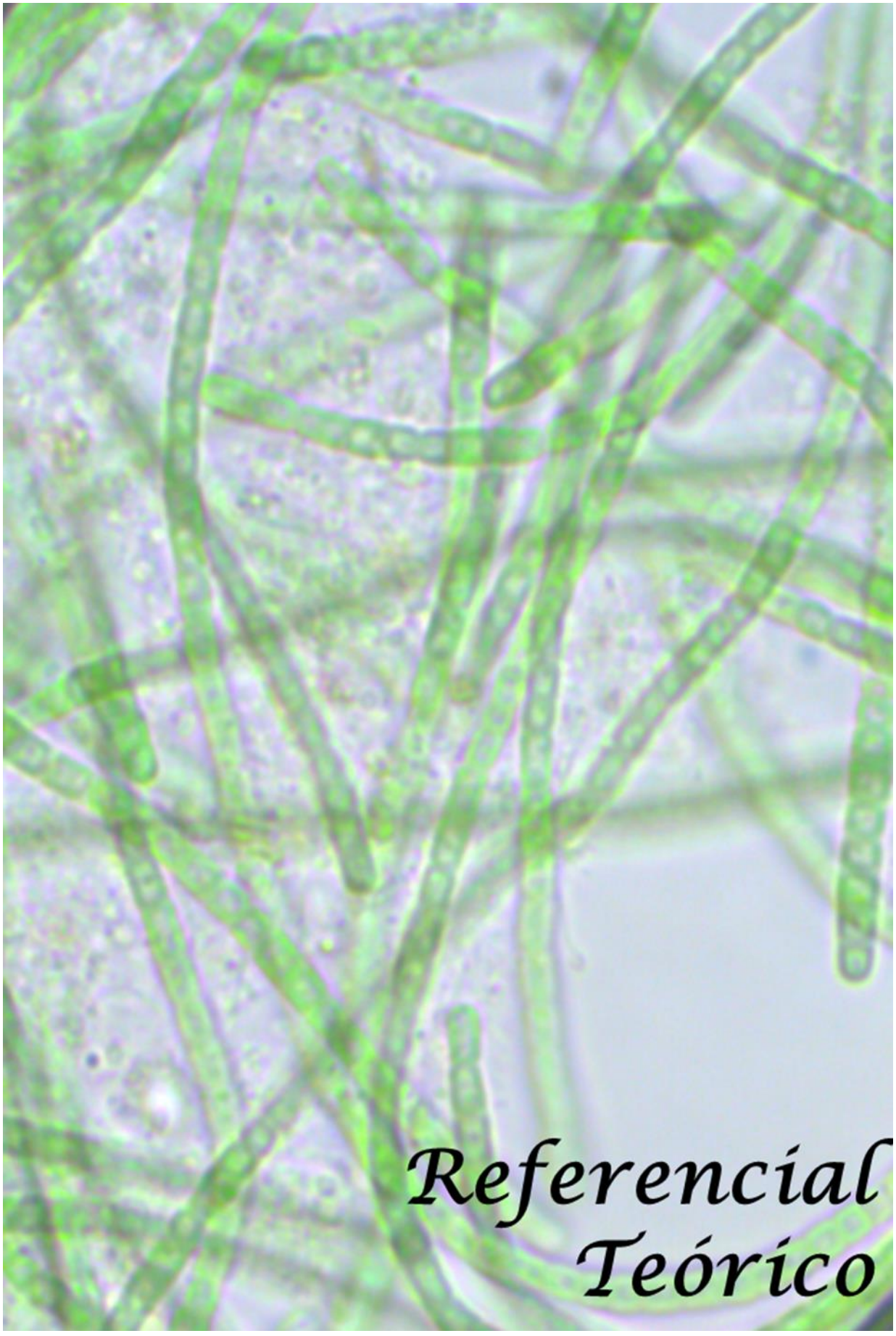
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Testar diferentes espécies de cianobactérias dulcícolas quanto a sua capacidade de produção de metabólitos secundários de interesse biotecnológico na indústria farmacêutica.

2.2 Objetivos específicos

a) isolar e identificar ao menor nível taxonômico espécies de microalgas coletadas em diferentes ambientes dulcícolas da região semiárida do estado da Paraíba, visando obter cultivos monoespecíficos de espécies ainda não estudadas quando ao seu potencial de produção de produtos de interesse biotecnológico;
b) avaliar a produção e a diversidade de metabólitos secundários nas espécies de cianobactérias cultivadas em condições laboratoriais controladas, como subsídio à produção de fármacos;
c) extrair e isolar metabólitos secundários e realizar testes de atividade antimicrobiana e antitumoral.


Referencial
Teórico

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cultivo de microalgas

Microalga é uma denominação geral aplicada a uma vasta gama de microrganismos pertencentes a diversos grupos taxonômicos que não guardam entre si nenhuma relação filogenética. Tais organismos apresentam forma e tamanho variados, medindo desde alguns micrômetros até alguns milímetros e colonizam diferentes tipos de ambientes, podendo viver como seres planctônicos ou sobre diferentes tipos de substratos. A grande variedade de habitats que podem colonizar faz das microalgas organismos ubíquos. Mundialmente, as microalgas contribuem com uma parcela expressiva da biodiversidade global, muito embora o número exato de espécies ainda permaneça desconhecido (DERNER *et al.,* 2006).

Considerando a estrutura celular, estas estão distribuídas entre as Divisões Cyanophyta (cianobactérias) como procarióticos e as Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta como eucarióticos (DERNER *et al.,* 2006; KHAN *et al.*, 2018).

Segundo Margulis e Schwartz (2001), as microalgas eucariotas pertencem ao Reino Protoctista, Super-Reino Eucária, que integram todos os organismos que evoluíram por simbiogênese, enquanto que as cianobactérias fotossintetizantes integram o sub-reino Eubacteria, do Reino Bacteria, Super-Reino Prokaria, que integram todos os organismos que evoluíram sem simbiogênese.

Cada Divisão caracteriza-se por apresentar diferentes tipos de pigmentos, sendo tal aspecto uma das principais características usadas para separar os diferentes grupos de microalgas. É certo que todas possuem clorofila-a, mas juntamente com ela outros pigmentos acessórios estão presentes e auxiliam na fotossíntese, a exemplo das xantofilas, carotenoides, ficocianinas e ficoeritrina. As cianobactérias (Divisão Cyanophyta), por exemplo, por serem procariotas não possuem núcleo organizado, nem mitocôndria e nem cloroplastos, mas contém clorofila-a e outros pigmentos acessórios característicos, como ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina, organizados em tilacóides e responsáveis pela coloração verde-azulada característica do grupo (LORENZI, 2008). As clorofíceas (Divisão Chlorophyta), por sua vez, que integram um grupo muito diversificado encontrado predominantemente em ambientes dulcícolas, possuem clorofila a e b e algumas vezes, carotenoides, enquanto que as

diatomáceas (Bacillariophyceae), muito abundantes e diversificadas no ambiente marinho, contem clorofila-a, clorofila-*c* e carotenóides (xantofilas, dentre as quais a mais abundante é a fucoxantina e o caroteno), já os dinoflagelados (Divisão Dynophyta) predominantemente marinhos, contem clorofila-a e clorofila-*c* associados com caroteno e xantofilas, das quais a mais abundante delas é a peridinina (BELLINGER; SIGEE, 2010).

Nos ambientes aquáticos as microalgas desempenham um papel preponderante, visto que, por serem organismos fotossintetizantes, disponibilizam o uso do carbono para as cadeias alimentares utilizando a luz solar até os limites da zona eufótica para a produção orgânica. A dinâmica e a estrutura das comunidades de microalgas que integram as populações planctônicas dependem da disponibilidade dos nutrientes presentes na coluna d´água, particularmente de nitrogênio, fósforo, sílica e ferro, sendo estes os principais componentes que regulam a produtividade primária nos oceanos, em lagos, reservatórios e ambientes estuarinos. Usualmente, a dinâmica de crescimento do fitoplâncton é previsível, muito embora possa acontecer crescimento explosivo de algumas espécies em determinadas situações, formando florações que persistem por vários dias, e que se distribuem formando manchas na superfície da água visíveis a distância, inclusive através de imagens de satélite, dependendo da escala com que se desenvolvem. (RICHMOND, 1999)

Muitas dessas florações podem ser produzidas por microalgas tóxicas, representando este fato uma grande preocupação mundial devido à capacidade que tais organismos apresentam para produzir e liberar toxinas como metabólitos secundários, que podem ser letais para muitos seres vivos, incluindo o homem, além dos efeitos que tais florações podem causar no equilíbrio dos ecossistemas. Dentre as microalgas capazes de formar florações tóxicas destacam-se os dinoflagelados e as cianobactérias, que produzem potentes toxinas com ações neurotóxicas, hepatóxicas, dermatotóxicas, e aquelas caracterizadas como inibidores potentes de síntese proteica (YUNES *et al.*, 2003). As neurotoxinas apresentam uma ação rápida em vertebrados, através de diferentes mecanismos fisiológicos, causando a morte por parada respiratória, sendo as saxitoxinas um grupo de neurotoxinas comumente observadas em dinoflagelados marinhos responsáveis pelo fenômeno das marés vermelhas. As hepatoxinas, apresentando mecanismo de ação mais lenta, também podem causar a morte de vertebrados em horas ou dias (CARMICHAEL, 1994), e dentre elas destacam-se as microcistinas, que apresentam a maior quantidade de registros no Brasil, especialmente em reservatórios utilizados para o abastecimento público (SASSI, 2013).

Historicamente, o primeiro cultivo monoespecífoco de microalgas foi obtido por Beijerinck in 1890 com *Chlorella vulgaris*, e os primeiros estudos fisiológicos empregando essas culturas foram realizados por Warburg, por volta de 1900. Mas foi somente por volta de 1950 que os cultivos em massa desses organismos começaram a receber mais atenção. O livro clássico de Burlew (1953) procurou sumarizar o conhecimento a respeito na época, e a partir de então o interesse nos cultivos de microalgas tem crescido continuadamente e muitos aspectos da biotecnologia foram desenvolvidos visando aumentar a eficiência de culturas em massa (BENEMANN *et al.*, 1987; CHAUMONT, 1993; RICHMOND, 1986, 1987).

As primeiras fazendas de cultivo em massa de microalgas em escala comercial foram implantadas no início dos anos 60 no Japão, utilizando *Chlorella*. Nos anos 70 foi introduzido o cultivo em massa de *Spirulina*. Nas Américas, o primeiro país a empregar essa técnica foi o México, no Lago Texcoco, pela empresa Sosa Texcoco S.A, em 1977, e no mesmo período a empresa Dai Nippon Ink e Chemicals Inc. estabeleceram o cultivo comercial de *Spirulina* na Tailândia. Por volta de 1980 um total de 46 fábricas de produção em larga escala já operavam na Ásia (KAWAGUCHI, 1980).

As microalgas podem ser cultivadas por diferentes métodos e sob diferentes condições. Como seres autotróficos, elas precisam da luz como fonte de energia para converter a água absorvida e CO_2 em biomassa através da fotossíntese (OZKURT, 2009). Os produtos fotossintéticos se acumulam em várias formas, como componentes celulares ou materiais de armazenamento, e variam de 20 a 50% da biomassa total (CHISTI, 2007), necessitam também de de nitrogênio e fósforo como nutrientes principais, que respondem por 10 a 20% da biomassa microalgal (BENEMANN; OSWALD, 1996).

Para uma eficiência no crescimento as microalgas precisam dipor de macronutrientes (carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, silício e ferro), micronutrientes (os principais são manganês, molibdênio, cobalto, boro, vanádio, zinco, cobre e selênio) e vitaminas (as mais usadas são tiamina (B1), biotina (B7) e cianocobalamina (B12) (LOURENÇO, 2006).

Uma vez inoculada a microalga em um meio de cultura com condições adequadas, se acompanhado o seu crescimento ao longo do tempo obtem-se uma curva com fases características do crescimento, definidas por Borzani (2001) como: 1. Fase de adaptação ou fase lag: consiste do período de adaptação das células extraídas de uma cultura em fase exponencial ou estacionária para um meio fresco; 2. Fase de aceleração do crescimento: período onde as células já estão adaptadas e começam a multiplicar-se; 3. Fase de crescimento

exponencial: fase de crescimento acelerado onde o valor da taxa específica de crescimento se mantém constante, atingindo o seu valor máximo; 4. Fase linear de crescimento: por apresentar a velocidade de reprodução constante, esta fase pode existir sem a previa da fase logarítmica, como é o caso de microrganismo filamentosos onde há limitações no transporte de nutrientes do meio para dentro da célula; 5. Fase de desaceleração do crescimento: nesta fase a concentração de um ou mais nutrientes torna-se limitante, com o consequente decréscimo da taxa específica de crescimento; 6. Fase estacionária: As populações raramente conseguem manter um crescimento exponencial a altas velocidades durante um largo período de tempo, visto que o crescimento está limitado pelo esgotamento dos nutrientes ou pela acumulação de produtos inibitórios do metabolismo, em função disso há um decréscimo na velocidade de crescimento; 7. Fase de morte – A morte resulta do esgotamento de nutrientes da cultura de microrganismos. Neste período acontece o chamado "lise", autólise ou rompimento dos microorganismo, provocado pela ação de enzimas intracelulares.

Diferentes espécies de microalgas podem variar em sua necessidade de meios de cultivo (GROBBELAAR, 2004), porém, o elevado crescimento das células em cultivo é consequência da elevada relação superfície/volume que esses organismos apresentam, além da sua capacidade de se reproduzirem assexuadamente. Este processo reprodutivo pode duplicar o tamanho da população a cada 8 horas, dependendo da espécie (RICHMOND, 1999).

Um dos parâmetros mais importantes no cultivo de microalgas é o tipo de sistema usado. Isto deve ser projetado de acordo com a espécie e o propósito da cultura. Em grande escala, as algas podem ser cultivadas em lagoas abertas (lagoas de alta taxa). Os sistemas de cultura aberta são relativamente baratos, mas se tornam facilmente contaminados. Outros possuem instalações de cultura contínua ou em lote (ADEY *et al.*, 1996, CRAGGS, 2000). Algumas espécies de algas crescem muito bem na cultura heterotrófica (MORALES-SÁNCHEZ *et al.*, 2017). Os cultivos das microalgas podem ser desenvolvidos também através de sistemas estanques, usualmente denominados de cultivos de batelada (*batch cultures*), ou mediante o uso de sacos de diálise, ou, ainda, usando sistemas de culturas contínuas. Desde que existam condições adequadas para o crescimento das células obtém-se altas quantidades de biomassa (ANDERSEN, 2005).

Para o cultivo comercial, é possível cultivar microalgas em estações de tratamento de águas residuais para obter vantagens duplas de tratamento de água e produção de biomassa, todavia há restrição para aplicação da biomassa. O uso de água do mar em vez de água doce para a cultura de microalgas reduzirá o custo de produção, uma vez que evita o custo de

nutrientes e aumenta a produtividade de lipídios e outros produtos úteis na biomassa de microalgas (PARK *et al.*, 2018). Mais recentemente, o sistema de cultivo oceânico tem atraído a atenção para a produção em escala comercial de algas devido às vantagens de misturar a cultura pelas ondas oceânicas, utilizando nutrientes dissolvidos, grande disponibilidade de área, etc. que resultam na redução do custo de cultivo e manutenção (PARK *et al.*, 2018; NOVOVESKA *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2016).

Para tornar a biotecnologia de microalgas sustentável e economicamente viável, é necessário desenvolver tecnologias de cultivo bem-sucedidas para a produção direcionada de biomassa (KHAN *et al.*, 2018), no entanto, o cultivo de microalgas depende da espécie e é afetada por fatores como disponibilidade de nutrientes (N, P, K, etc.), temperatura, pH, salinidade, carbono inorgânico, oxigênio, intensidade de luz e dióxido de carbono (MATA *et al.*, 2010; BERTOLDI *et al.*, 2008). Além de outros fatores importantes que determinam o sucesso da cultura como agitação e mistura, largura e profundidade do biorreator, frequência de colheita e taxa de diluição (KHAN *et al.*, 2018).

Dessa forma, torna-se evidente que os cultivos de microalgas apresentam inúmeras vantagens sobre a agricultura convencional, visto que podem atingir uma produtividade maior do que as culturas tradicionais, não compete com a produção de alimentos além de poder ser desenvolvido em áreas com climas limitantes para a prática agrícola e utilizarem pouquíssima quantidade de água (LOURENÇO, 2006; MATA *et al.*, 2010; SPOLAORE *et al.*, 2006).

Qualquer que seja o sistema de cultivo adotado é necessário monitorarem-se as condições de cultivo, não somente em termos das variáveis ambientais, mas também das variáveis físicas e químicas do meio de cultivo, visto que a melhor eficiência dos cultivos acontece em condições ideais que via de regra variam de espécie para espécie. Algumas variáveis dentre as relacionadas podem limitar o desenvolvimento dos cultivos (RICHMOND, 1999), havendo assim a necessidade de ajustá-las para oferecer as melhores condições de cultivo, visando a sua otimização.

Além disso, para a obtenção de metabólitos secundários a partir de microalgas é preciso que a espécie em cultivo seja de fato uma produtora potencial destes metabólitos. Não basta apenas identificar quais espécies armazenam mais ou menos, é necessário testar em que condições elas produzem mais, visto que fatores ambientais podem mudar o metabolismo das microalgas (GUSHINA; HARWOOD, 2006), e a habilidade que muitas espécies têm para se adaptarem às condições ambientais reflete-se na ampla variedade de padrões metabólicos que

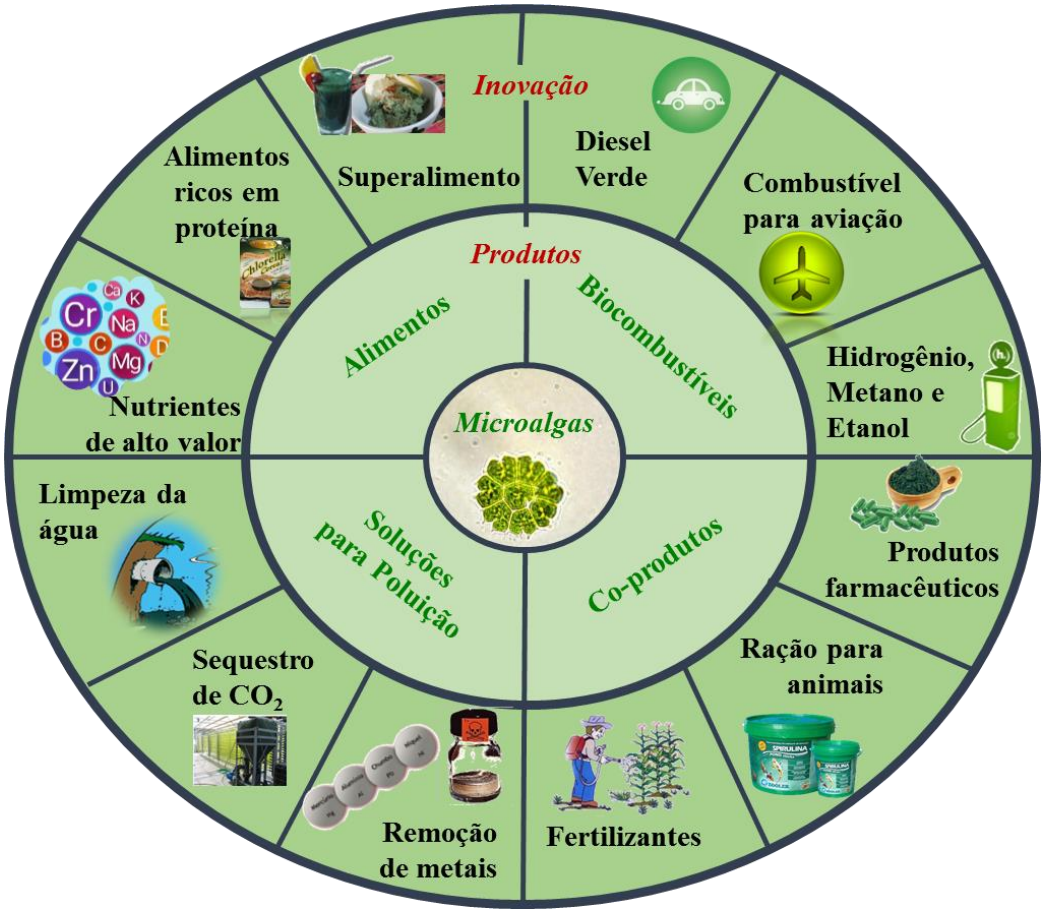
podem apresentar. Assim, para o sucesso dos cultivos em massa visando estas moléculas de interesse, todos esses aspectos precisam ser pesquisados cuidadosamente.

A literatura que trata dos estudos sobre cultivos de microalgas é muito vasta, demonstrando que o tema vem de longo tempo recebendo a atenção de pesquisadores no mundo todo. Hoje, as microalgas têm uma significativa importância comercial porque muitas delas podem ser não somente fonte de alimento para animais e humanos, mas também fontes de uma grande variedade de produtos químicos usados em diversas atividades industriais, inclusive na tecnologia de alimentos e na indústria farmacêutica (BOROWITZKA, 1999b).

3.2 Potencial biotecnológico das microalgas

A obtenção de biomassa a partir de cultivos intensivos de microalgas é um importante processo biotecnológico que se acha em expansão, visto que a partir desses cultivos é possível obter energia, alimento e vários produtos de interesse nutricional, farmacológico e industrial (PULZ; GROSS, 2004; SPOLAORE *et al.*, 2006; GOIRIS *et al.*, 2012; HETTA *et al.*, 2014; SARANYA et al 2014; KHAN *et al.*, 2018) (Figura 1, página 35), a custos que podem ser muito inferiores do que aqueles empregados pela agricultura tradicional, e numa velocidade de produção muito mais rápida (LOURENÇO, 2006; SPOLAORE *et al.*, 2006; KAHN *et al.*, 2018).

Figura 1- Demonstração de produtos e aplicações das microalgas



Fonte: Adaptado de Al-Wathnani *et al.* 2012; Khan *et al.* 2018.

Apesar da enorme possibilidade de que uma grande diversidade de microalgas possa ser utilizada para as mais diversas finalidades tecnológicas, a produção comercial atual de microalgas em larga escala tem se restringido a algumas poucas espécies. Em particular destacam-se *Haematococcus pluvialis* empregada para produzir o pigmento astaxantina; *Dunaliella salina,* que fornecem o pigmento βcaroteno, precursor da vitamina A, e *Chlorella* sp e *Arthospira platensis* (= *Spirulina platensis*), que produzem proteína, empregadas, particularmente, na alimentação humana e em ração animal (BOROWITZKA; BOROWITZKA, 1988).

Desde que muitos produtos das microalgas são metabólitos secundários produzidos quando seu crescimento é limitado, muitas pesquisas estão em andamento visando otimizar os cultivos. A produção de produtos naturais de microalgas requer grandes quantidades de biomassa de algas, e o procedimento de otimização deve ser feito por meio de testes com as melhores linhagens e as estratégias mais eficazes em condições ideais (KRISHNAKUMAR *et al.*, 2013).

Para incrementar o acúmulo de biomoléculas de interesse as microalgas podem ser cultivadas sob condições ótimas de crescimento, seguindo-se a exposição a condições de estresse, como alta intensidade luminosa e privação de nutrientes (SKJÅNES *et al.,* 2013). Quando saudáveis as células usualmente produzem baixas concentrações de substâncias de reserva ricas em lipídios, e quando em cultivos submetidos a estresses momentâneos (em intervalos de tempo de até 48 horas) promovidos por mudanças nas concentrações de nutrientes específicos como o nitrogênio e o fósforo ou nas condições fóticos, as células sofrem alterações no estado fisiológico, fazendo com que armazenem mais substâncias ricas em energia em seus tecidos. Tem-se observado que algumas espécies têm sua produtividade reduzida por fotoinibição (VONSHAK *et al.,* 1988) e que a uréia pode influenciar o crescimento e o teor do ácido graxo linolênico (SASSANO, 1999). Conhecimentos desse tipo são vitais para o sucesso de cultivos quando se tem em mente a extração de produtos comercialmente importantes. Diversas tecnologias de cultivo que são usados para alta produção de biomassa de microalgas têm sido desenvolvidos por pesquisadores e produtores comerciais (KRISHNAKUMAR *et al.,* 2013).

Os ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados (PUFAs) também são valiosos produtos farmacêuticos e ingredientes de alimentos que tem efeitos benéficos na saúde humana (variedade de cânceres e doenças inflamatórias). No presente, PUFAs são comercialmente produzidos de óleo de peixes que é uma fonte insuficiente desses compostos (COHEN, 1994).

Além dos produtos supra referidos outros compostos de importância comercial são extraídos das microalgas, tais como os carotenoides, ß-caroteno, astaxantina e cantaxantina, utilizados em diversas aplicações comerciais quer seja como corantes naturais de alimentos, antioxidantes e como alimentação aditiva em cultivos de peixes salmonídeos (BOROWITZKA, 1988; BEN-AMOTZ, 1999; KHAN *et al.,* 2018).

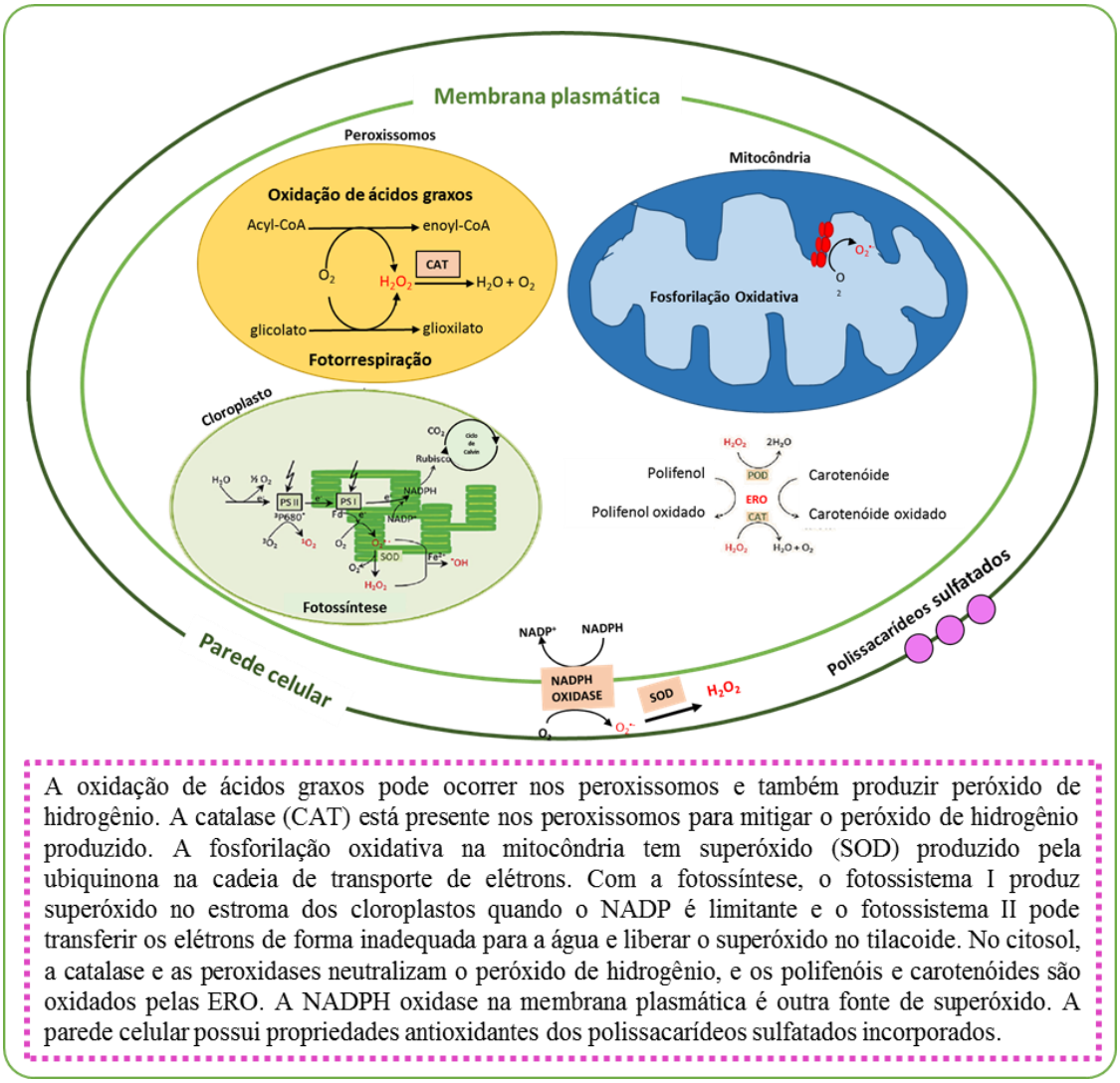
Antioxidantes são substâncias que podem proteger as células dos riscos causados por moléculas instáveis conhecidas como radicais livres. Aqueles interagem e estabilizam estes e podem prevenir alguns danos que os radicais podem causar, agindo como protetores celulares (KHAN *et al.,* 2012; CHINNU *et al.,* 2015). Os pró-oxidantes mais importantes em sistemas biológicos são espécies reativas de oxigênio (ERO), que são formadas em diferentes processos fisiológicos. Nas microalgas (Figura 2, página 38), como subprodutos de várias vias metabólicas, as ERO são produzidos continuamente em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas (CIRULIS *et al.,* 2013; GOIRIS *et al.,* 2012; 2015).

A resistência aos antibióticos em bactérias é um dos problemas relacionados com a saúde emergente no mundo hoje em dia. Microalgas constituem fontes naturais valiosas e eficazes contra agentes infecciosos.

Extensos esforços para a identificação de compostos bioativos derivados de recursos naturais têm sido feitos em todo o mundo, a fim de desenvolver agentes antimicrobianos seguros, não tóxicos e eficazes para a prática valiosa em farmacologia (AL-WATHNANI *et al.,* 2012**)**, e uma pequena quantidade de biomassa produzida em escala laboratorial é suficiente para dispensar esforços para estas descobertas (BURJA *et al.,* 2001; CARDOZO *et al.,* 2007).

Para as microalgas sobreviverem em um ambiente competitivo, elas desenvolvem estratégias de defesa que resultam em um nível significativo de diversas estruturas químicas, a partir de diferentes vias metabólicas (PUGLISI *et al.,* 2004). A exploração destes organismos para fins farmacêuticos revelou importantes protótipos químicos para a descoberta de novos agentes, que estimulam o uso de técnicas físicas sofisticadas para a síntese de compostos com aplicação biomédica (KLEJDUS *et al.,* 2009; CARDOZO *et al.,* 2007; SHANAB *et al.,* 2012).

Figura 2 - Vias celulares de espécies reativas de oxigênio (ERO) em microalgas



A oxidação de ácidos graxos pode ocorrer nos peroxissomos e também produzir peróxido de hidrogênio. A catalase (CAT) está presente nos peroxissomos para mitigar o peróxido de hidrogênio produzido. A fosforilação oxidativa na mitocôndria tem superóxido (SOD) produzido pela ubiquinona na cadeia de transporte de elétrons. Com a fotossíntese, o fotossistema I produz superóxido no estroma dos cloroplastos quando o NADP é limitante e o fotossistema II pode transferir os elétrons de forma inadequada para a água e liberar o superóxido no tilacoide. No citosol, a catalase e as peroxidases neutralizam o peróxido de hidrogênio, e os polifenóis e carotenóides são oxidados pelas ERO. A NADPH oxidase na membrana plasmática é outra fonte de superóxido. A parede celular possui propriedades antioxidantes dos polissacarídeos sulfatados incorporados.

Fonte: Baseado em Cirulis *et al.*, 2013; Laloi *et al.*, 2006 e Goiris *et al.*, 2015.

O advento da biologia molecular levou a uma melhor compreensão da biossíntese e fisiologia das moléculas bioativas em microalgas (CHU, 2012). Projetos de engenharia genética e metabólica também foram investidos para desenvolver microalgas transgênicas como "fábricas celulares verdes" para produzir novos produtos de interesse (LEON-BANARES *et al.*, 2004; AKIYAMA *et al.*, 2011; ANGERMAYR *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013; OLIVER; ATSUMI, 2014; LAN *et al.*, 2015; TAEPUCHAROEN *et al.*, 2017; CARPINE *et al.*, 2017). As microalgas podem produzir uma variedade de substâncias biologicamente ativas com atividade antibactericida, antiviral, antifúgica, inibidores enzimáticos, imunoestimulante e antiplasmódica (GHASEMI *et al.*, 2004; PRADHAN *et al.*, 2014; SANMUKH *et al.*, 2014), sendo as cianobactérias o grupo mais estudado (SKULBERG, 2004; PRADHAN *et al.*, 2014), muito embora, outros grupos de microalgas também contêm compostos ativos de interesse, como os dinoflagelados.

3.3 Cianobactérias

3.3.1 Aspectos gerais e taxonômicos

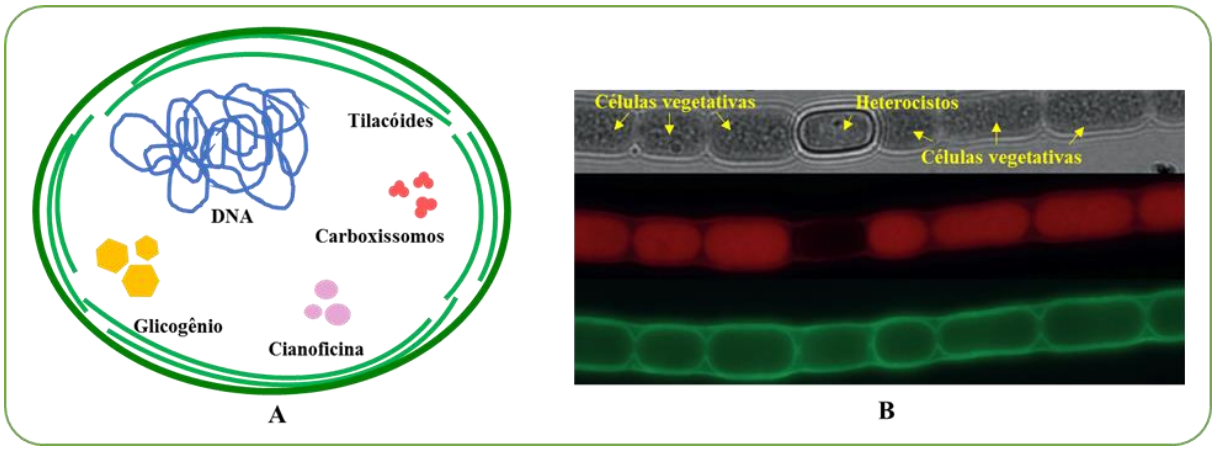
As cianobactérias são um grupo diversificado de procariotoss fotossintetizantes, que coletivamente são responsáveis pela captura de grandes quantidades de CO_2 do oceano aberto e pela fixação de nitrogênio biologicamente disponível no solo (HU *et al.,* 2013; KULTSCHAR; LLEWELLYN, 2018). Elas são considerados um dos mais antigos organismos fotossintéticos, criando as condições que resultaram na evolução do metabolismo aeróbico e fotossíntese dos eucariotos (GUPTA *et al.,* 2013; LAU *et al.,* 2015).

As cianobactérias pertencem a um filo de bactérias caracterizadas pela sua aparência azul-esverdeada e, por vezes, incorrectamente referidas como "algas azuis-verdes". Elas existem como unicelular (Figura 3, esquerda, página 40) ou filamentosa (Figura 3, direita, de cima para baixo; *Fischerella* sp. MV11 (FINSINGER *et al.,* 2008), página 40). Apresentam membrana celular lipoprotéica, ribossomos, material genético, parede celular, membrana tilacóide, ficobiliproteínas, clorofila a e carotenoides, dentre outros componentes (LEE, 1980). Morfologicamente, elas não possuem organelas ligadas à membrana (BEHLER *et al.,* 2018).

Uma vez que as cianobactérias podem utilizar a energia solar para direcionar o CO_2 para a síntese de moléculas orgânicas, nas formas unicelulares (Figura 3–A, página 40), esta conversão de energia ocorre em um sistema membranoso interno conhecido como o tilacóides. O CO_2 é fixado em microcompartimentos especializados chamados carboxissomos. Polímeros de reserva nativa armazenados por muitas cianobactérias são glicogênio e cianofina, um polímero arginina-aspartato. O DNA cromossômico frequentemente ocorre em múltiplas cópias por célula (poliploidia). Já nas formas filamentosas (Fig. 3-B, página 40), além disso, algumas células vegetativas se diferenciam em heterocistos, um tipo celular especializado para a conversão de N_2 em composto nitrogenados orgânicos. Como essas células não possuem o fotossistema II, elas contêm muito menos clorofila e emitem fluorescência vermelha reduzida sob irradiância UV (Figura 3-B – central, página 40) (BEHLER *et al.,* 2018).

A capacidade fotossíntética permitiu que engenheiros microbianos utilizassem cianobactérias como hospedeiros para a produção de produtos químicos. Tal processo, se feito eficiente o suficiente, poderia ser usado para construir uma economia de base biológica centrada no princípio da sustentabilidade e redução da pegada ecológica (BEHLER *et al.*, 2018).

Figura 3 - Ilustração de cianobactérias unicelulares (A) e filamentosas (B)



Fonte: Adaptado de Behler *et al.*, (2018).

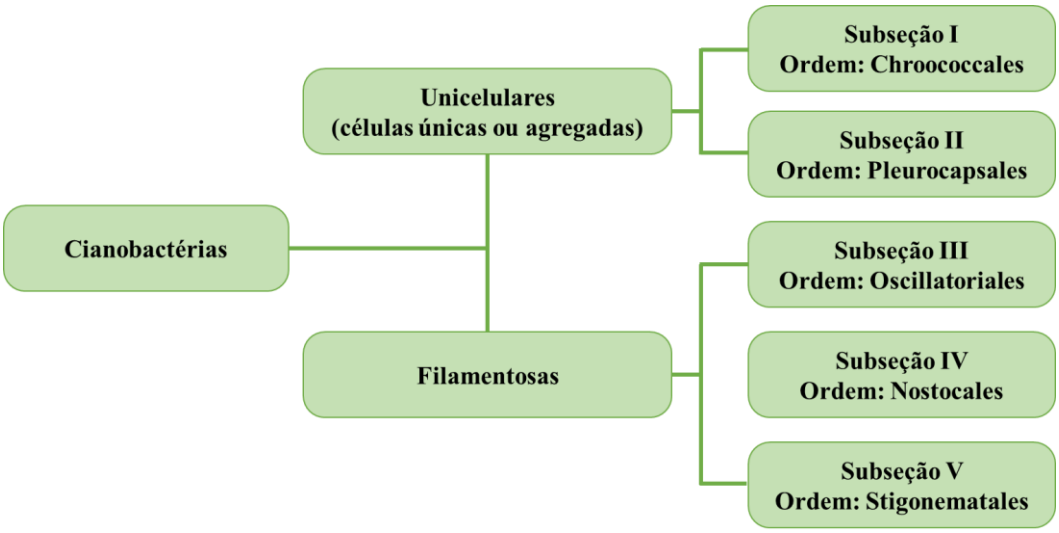
As cianobactérias, assim como as algas e as plantas podem usar a luz solar para capturar dióxido de carbono via Ciclo de Calvin–Benson-Brassham e converter em compostos orgânicos. No entanto, elas também são capazes de crescer sob condições heterotróficas na ausência da luz usando um substrato de carbono orgânico para obter energia (HU *et al.*, 2013; BEHLER *et al*., 2018).

Filogeneticamente, as cianobactérias estão incluídas no grupo das bactérias gram-negativas, com distribuição em uma variedade de nichos biológicos, incluindo ambientes com alta salinidade, com uma ampla faixa de temperaturas e sob altas concentrações de CO_2 (ONO; CUELLO, 2007; HU *et al.*, 2013), o que propicia a existência de espécies com características peculiares, que podem ser encontradas nos ambientes, marinho, estuarino e de água doce, vivendo livremente no plâncton ou associadas a algum tipo de substrato como rochas, sedimento arenosos e lodosos, ou como epífitas, epizóicas e até mesmo como endossimbiontes.

Morfologicamente, as cianobactérias podem ser unicelulares ou filamentosas e ter formas esféricas, em bastonete e em espiral (STANIER *et al.*, 1979; SINGH; MONTGOMERY, 2011). Taxonomicamente elas são amplamente divididas em cinco sub-seções principais (Figura 4, página 41) usando características morfológicas e fisiológicas

como descrito em Stanier *et al.* (1979): Subseção I (ordem: Chroococcales), II (ordem: Pleurocapsales), III (ordem: Oscillatoriales), IV (ordem: Nostocales) e V (ordem: Stigonematales). As subseções I e II são unicelulares como células únicas ou agregadas que se reproduzem por fissão ou brotamento binário (I) e fissão múltipla ou fissão binária e múltipla (II). Já as subseções III-V são filamentosas, que são compostas de tricomas (cadeia de células), reproduzem-se por quebra de tricoma, produzindo pequenos fragmentos móveis conhecidos como hormogônios. As cianobactérias da Subseção III dividem-se apenas em um plano e são compostas apenas de células vegetativas, enquanto as subseções IV e V são capazes de diferenciação celular. Um exemplo inclui a produção de heterocistos na ausência de uma fonte de nitrogênio, que é usada para fixação de nitrogênio (STANIER *et al.*, 1979).

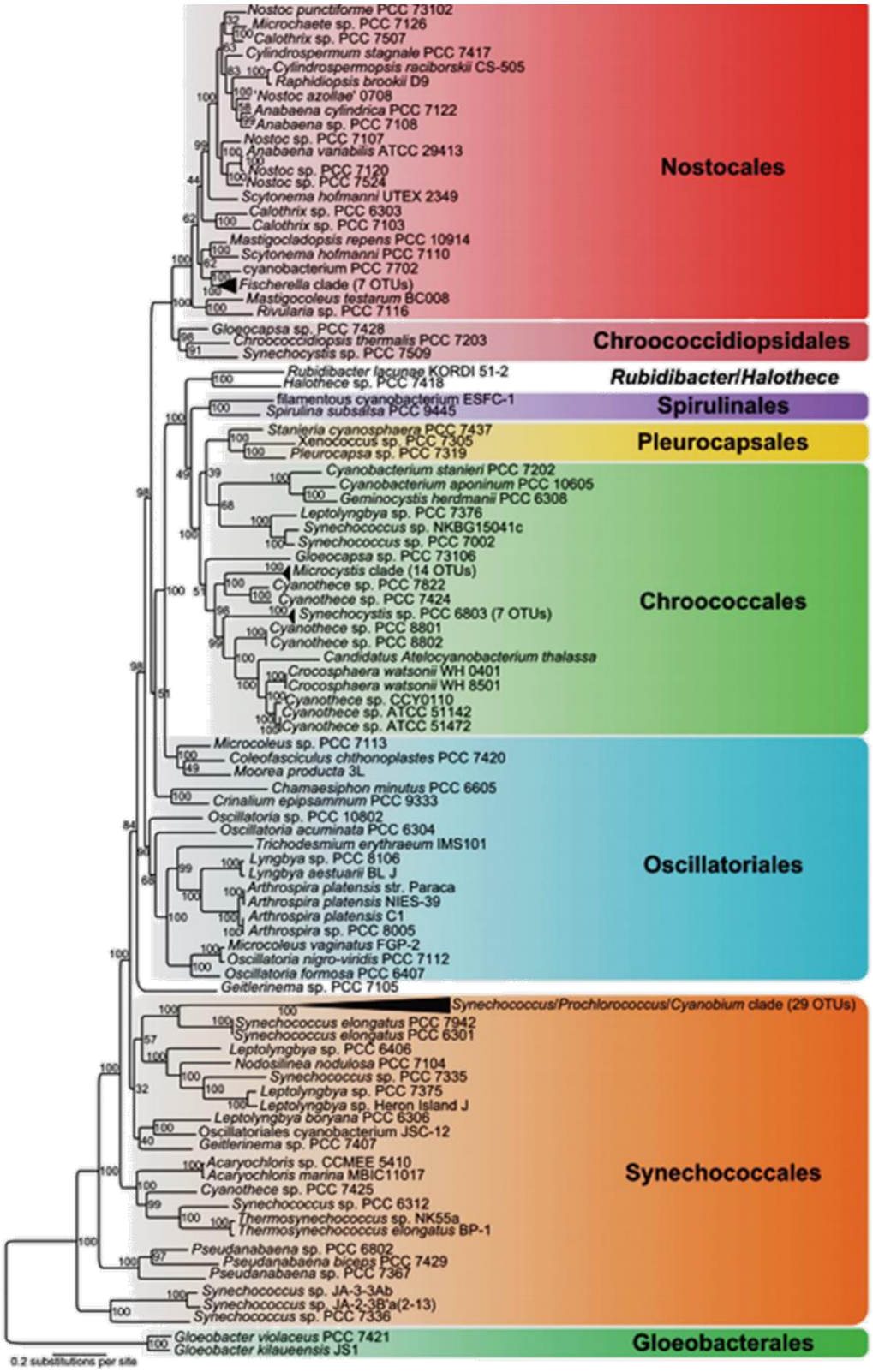
Figura 4- Classificação das cianobactérias de acordo com Stanier et al. 1979



Fonte: Autor.

Todavia, suportado pelos dados de sequência molecular, de acordo com Komárek *et al.* (2014), as cianobactérias atualmente dividem-se em oito ordens (Figura 5, página 42): Gloeobacteriales, Synechococcales, Spirulinales, Chroococcales, Pleurocapsales, Oscilatoriales, Chroococcidiopsidales e Nostocales. Existem mais de 300 gêneros, com mais de 50 descritos desde 2000 e em 2013, 16 novos gêneros foram putativamente propostos ao longo de numerosas espécies (KOMÁREK *et al.*, 2014).

Figura 5 - Árvore filogenética de cianobactérias baseada em 31 seqüências proteicas conservadas. As ordens de cianobactérias incluídas no sistema atual são destacadas na árvore



Fonte: Komárek, 2014.

Os sistemas taxonômicos para identificação contavam com características morfológicas que geralmente não são diagnósticas, mesmo em nível genérico, são primariamente ligadas a morfoespécies de espécimes terrestres e de água doce de regiões temperadas (KOMÁREK, 2011). A recente inclusão de inferências filogenéticas, integrada com as abordagens tradicionais de classificação e identificação, revelou que as características diagnósticas morfológicas são frequentemente limitadas, equivocadas e resultam amplamente na extensa subestimação das diversidades naturais (KOMÁREK 2006, ENGENE *et al.*, 2011).

Desta forma, tanto o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias quanto o Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Fungos e Plantas vêm incorporando hoje as relações filogenéticas como uma estrutura fundamental para sistemas de classificação biologicamente informativos (JOHANSEN; CASAMATTA 2005, KOMÁREK 2006). Esses esforços têm ressaltado o número de gêneros de cianobactérias que são polifiléticos e o elevado grau de diversidade críptica neste filo (PERKERSON *et al.*, 2010, 2011).

O sistema de classificação está em constante evolução, com novos sistemas baseados em análises filogenéticas (KOMÁREK, 2015). Com o advento de novas técnicas de sequenciamento e a conclusão de vários projetos de seqüenciamento de genoma, um número considerável de seqüências completas de genoma de cianobactéria estão disponíveis. Esse número crescente de genomas sequenciados fornece novas oportunidades para o entendimento da diversidade microbiana e da organização metabólica em diversos ambientes (BECK *et al.*, 2012).

Existem vários repositórios para a preservação e acesso a dados genéticos, sendo o mais conhecido o Banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI - National Center for Biotechnology Information) da Biblioteca Nacional dos EUA de medicina. Eles também fornecem ferramentas como a Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLAST - Basic Local Alignment Search Tool).

No entanto, assim como para a maioria dos microorganisos, os caracteres fenotípicos aplicados para classificar as cianobactérias tendem a se repetir e subestimar a diversidade natural (SHERWOOD *et al.*, 2015, DVOŘÁK *et al.*, 2015, SHALYGIN *et al.*, 2017). O número de caracteres morfológicos detectáveis é muitas vezes limitado e muitos fenótipos são plásticos, dependendo das condições ambientais (KOMÁREK, 2011). Todavia, com a recente integração de métodos filogenéticos, os campos da sistemática microbiológica e ficológica começam a ter uma compreensão muito mais abrangente da extensão total da biodiversidade.

Nesse processo, muitos grupos taxonômicos foram encontrados como sendo polifiléticos, e uma tarefa importante e desafiadora para a sistemática moderna tem sido segregar táxons evolutivamente não relacionados (ENGENE *et al.*, 2018).

Apesar do rápido crescimento do número de gêneros e espécies nos últimos anos, relativamente poucos trabalhos de revisão estiveram voltados para o nível da família e menos de um terço dos gêneros possuem dados da sequência do gene 16S rRNA para o "*generitype*" (KOMÁREK *et al.,* 2014), dessa forma, a maioria das famílias contém preponderância de gêneros não seqüenciados e não verificados, baseados principalmente na morfologia, o que implica na não confirmação de famílias de cianobactérias como linhagens (MAI *et al.*, 2018).

Porém, a maioria das famílias contém preponderância de gêneros não seqüenciados e não verificados, baseados principalmente na morfologia, dessa forma, famílias de cianobactérias não são confirmadas como linhagens (MAI *et al.*, 2018).

Tudo isso aponta que mais esforços devem ser dispensados, pois há casos em que os nomes de espécies são meras identificações provisórias e devem ser tomados com cautela, como sustentado por estudos recentes (ENGENE et al. 2012, 2013, MCGREGOR; SENDALL 2015; ENGENE *et al.*, 2018).

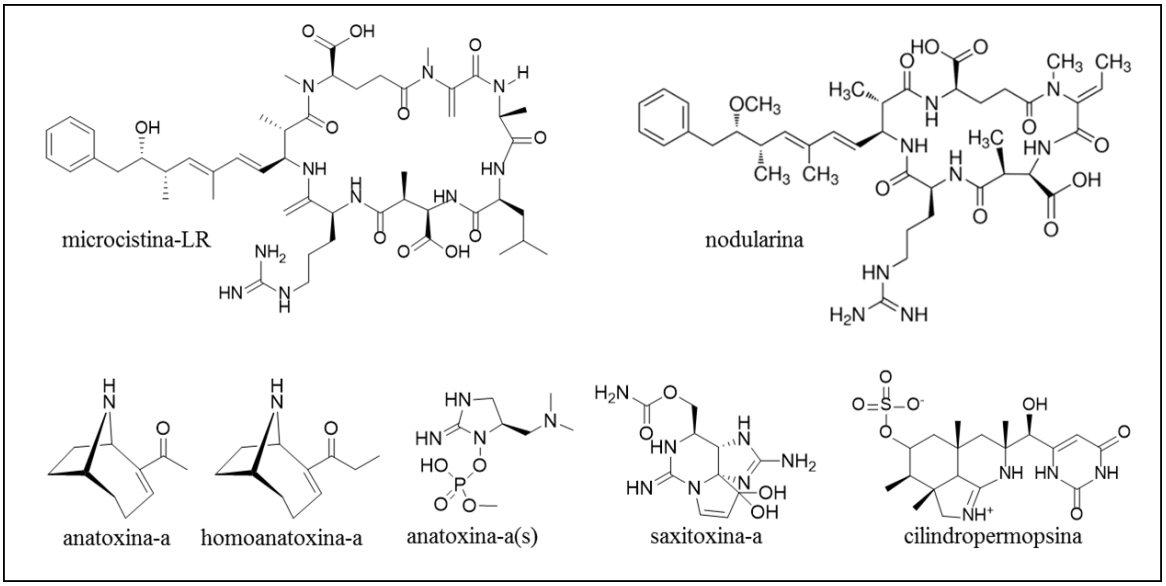
3.3.2 Metabólitos secundários

As cianobactérias demonstraram ser produtoras prolíficas de compostos bioativos (TIDGEWELL *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2011; EL-ELIMAT *et al.*, 2012; CRNKOVIC *et al.*, 2017) como alcalóides, carboidratos, flavonóides, pigmentos, fenóis, saponinas, esteróides, taninos, terpenos e vitaminas que podem ser utilizados na biotecnologia e indústria de alimentos (GUIHÉNEUF *et al.*, 2016)

Alguns metabólitos como cianotoxinas, são relatados apresentando efeitos tóxicos para humanos e animais (AZEVEDO *et al.*, 2002; DITTMANN; WIEGAND, 2006). De acordo com Carmichael (2001), as cianotoxinas (Figura 6, página 45) formam um grupo diverso de substâncias químicas e seu mecanismo tóxico em vertebrados é utilizado para separá-las em hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas), neurotoxinas como alcalóides ou organofosforados (anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas), citotoxinas (cilindrospermopsinas), dermatotoxinas (lyngbyatoxinas) e toxinas irritantes (lipopolissacarídeos).

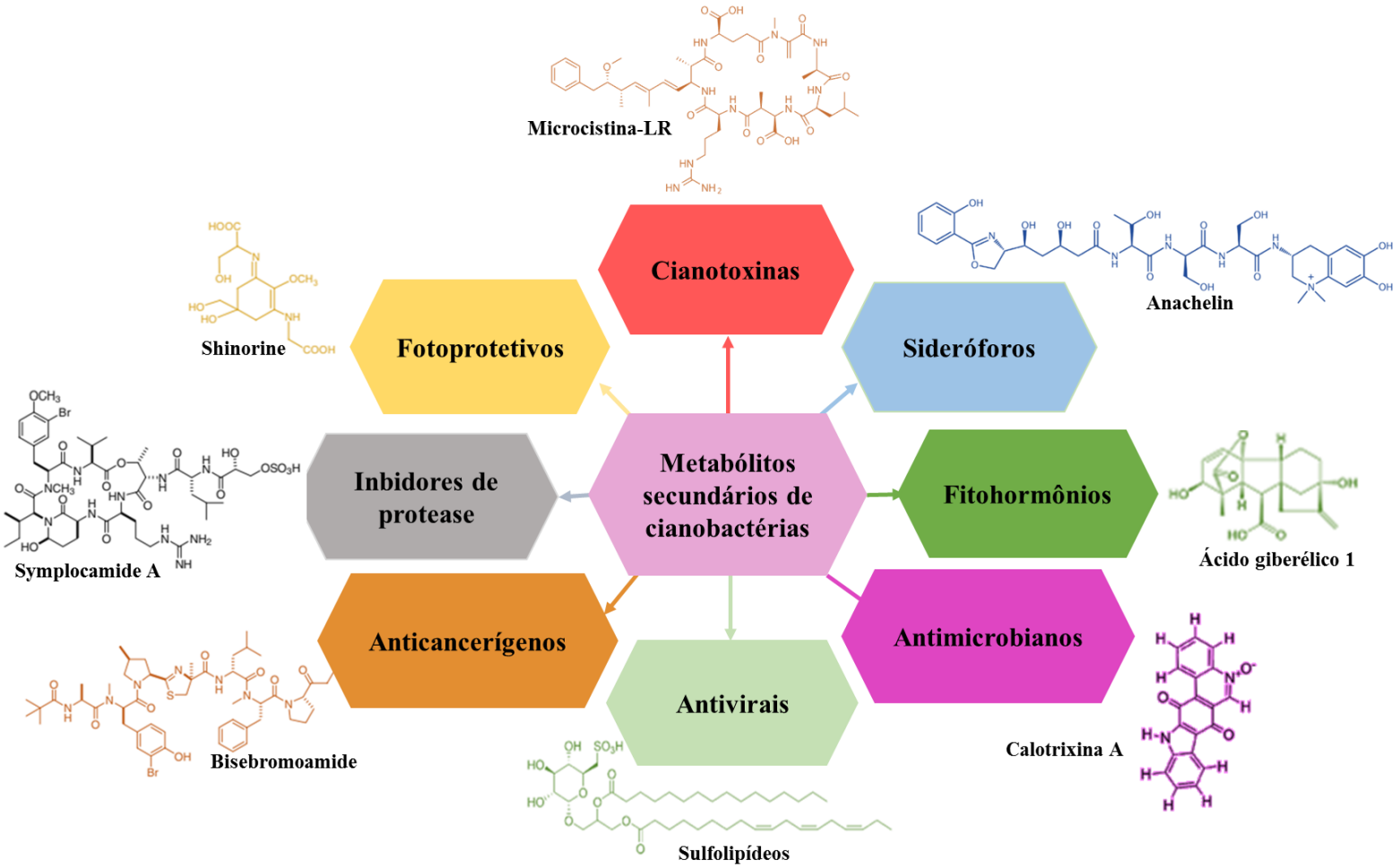
Além da produção de metabólitos tóxicos, outros são produzidos com propriedades terapêuticas (Figura 7, página 46) como: antimicrobiana (GERWICK *et al*., 1994; SHAIEB *et al*., 2014;PANDEY, 2015; NIVESHIKA *et al*., 2016), antifúngicas (VOLKA; FURKERT, 2006; DIXIT; SUSEELA, 2013; RATH; PRIYADARSHANI, 2013), antivirais (DIXIT; SUSEELA, 2013), antioxidante (BHARANIDHARAN *et al*., 2013), anticancerígena (SEMARY; FOUDA, 2015; VIJAYAKUMAR; MENAKHA, 2015; NIVESHIKA *et al*., 2017; FERREIRA *et al*., 2018; TAO *et al*., 2018; CHOI *et al*., 2019), antimalárica (MCPHAIL *et al*., 2007; LININGTON *et al*., 2009; DIXIT; SUSEELA, 2013), antileishmania (KUMAR *et al*., 2013), imunossupressores (KOEHN *et al*., 1992), enzimática (MAZUR-MARZEC *et al*., 2015), hipoglicemiante, relaxante (MUKUND; SIVASUBRAMANIAN, 2014); imunoprofilática (MALATHI *et al*., 2015), entre outras, o que contribui para aumento do interesse em metabólitos secundários de cianobactérias elevando sua utilização no campo da medicina (SINGH *et al*., 2017), concomitantemente, isso direciona esforços para identificação e caracterização destes compostos (MAURYA *et al*., 2019).

Figura 6 - Estrutura de algumas cianotoxinas. Microscistina-LR, nodularinas, anatoxina-a, homoanatoxina, anatoxina-a(s), saxitoxinas e cilindrospermopsinas



Fonte: Adaptado de Cardozo *et al.*, 2007.

Figura 7 - Representação diagramática de alguns metabólitos secundários de cianobactérias



Fonte: Baseado em Cardozo *et al.* 2007.

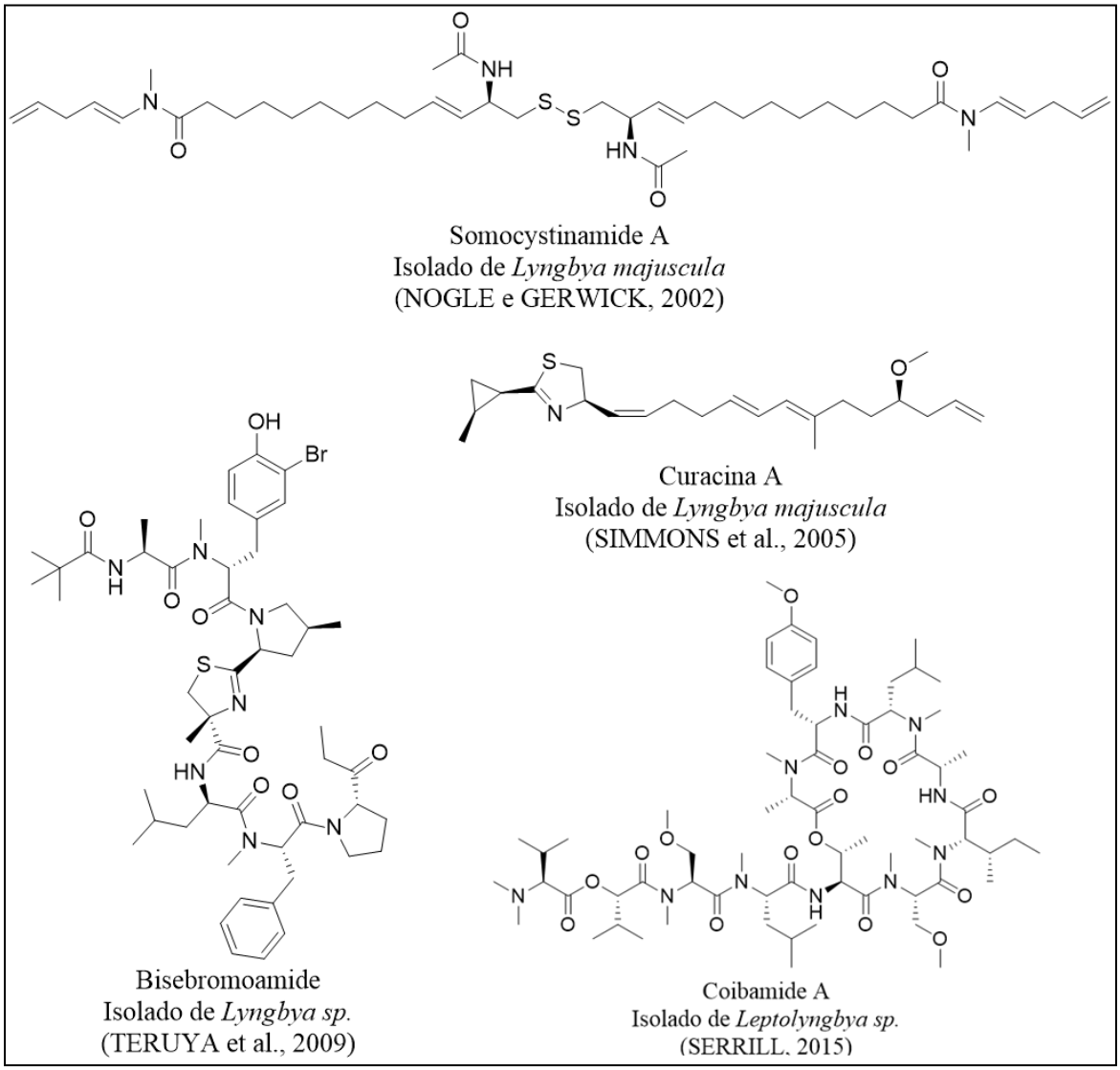
Os estudos voltados para as cianobactérias tornam essencial a exploração de novas espécies existentes na natureza, ou seja, a bioprospecção, bem como o isolamento, purificação, identificação e caracterização dos metabólitos secundários e posteriormente estabelecer um conjunto, que, em seguida, pode ser uma porta para a exploração biotecnológica (SHAH *et al*., 2000; MAURYA *et al.*, 2019).

As cianobactérias marinhas, por exemplo, têm estudos em detaque como produtoras de metabólitos bioativos (TAN, 2007; CARMICHAEL, 2001; GERWICK *et al.*, 2001; NAGARAJAN *et al.*, 2013) e muitos desses compostos têm elevada importância biotecnológica (TAN; GOH, 2009).

Outros compostos (Figura 8, página 48) como Curacina A (SIMMONS *et al.*, 2005), Cobaiamide A (SERRILL, 2016), Bisebromoamide (TERUYA *et al.*, 2009) e Somocystinamide A (NOGLE; GERWICK, 2002) têm sido estudados como drogas anticancerígenas e compostos químicos finos além de muitos outros produtos (DEVRIES *et al.*, 1993; CHACON-DE-POPIOICI, 1994; MUNDT *et al.*, 2001; MI *et al.*, 2017; KULTSCHAR; LLEWELLYN, 2018).

Alguns gêneros de cianobactérias marinhas como *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Symploca*, *Calothrix*, *Leptolyngbya*, *Dichothrix*, *Moorea*, *Geitlerinema*, *Schizothrix*, *Aphanothece*, *Blennothrix* e *Synechocystis* produzem diversas classes de metabólitos como: pepetídeos (WELKER; VON DOHREN, 2006; SANZ *et al*., 2015; MATTHEW *et al*., 2010; LININGTON *et al*., 2009; TERUYA *et al*., 2009), pepetídeos cíclicos (SCHREUDER *et al*., 2016), depsipeptídeos cíclicos (THORNBURG *et al*., 2011; SERRILL *et al*., 2016), hexadepsipeptídeos cíclicos (SALVADOR *et al*., 2011), ciclodepsipeptídeo (LUESCH *et al*., 2001; TAORI *et al*., 2008), lipopetídeo (LAMIAA *et al*., 2013), lipodepsipeptideos (SIMMONS *et al*., 2008), lipopeptídeos lineares, (KOEHN *et al*., 1992; GUNASEKERA *et al*., 2008; NUNNERY *et al*., 2010), alcalóides (VOLKA; FURKERT, 2006; TAN, 2007; GADEMANN; PORTMANN, 2008 ; COSTA *et al*., 2016), macrólidos alogenados (MATTHEW *et al*., 2010), ácidos graxos aminados clorados (LOPEZ *et al*., 2017), flavonoides (MUKUND; SIVASUBRAMANIAN, 2014).

Figura 8 - Estrutura de alguns metabólitos secundários de cianobactérias marinhas.



Fonte: Autor.

Quando comparadas as cianobactérias marinhas, as dulcícolas têm uma atenção mais reduzida, o que não significa que sejam menos prolíficas produtoras de metabólitos secundários. Vale salientar, que a atividade de um metabólito secundário é causada devido a biomoléculas específicas da espécie, bem como pelo metabólito secundário específico, produzido em organismos e em habitats também específicos (NOAMAN *et al.*, 2004; WOOD *et al.*, 2012).

Os trabalhos voltados para espécies que ocorrem em ambientes de água doce, abordam isolamento, identificação e biossíntese de compostos cianobacterianos, bem como seus testes de atividade biológica, como podemos observar a seguir.

Harada (2004), revisou a produção de metabólitos secundários de cianobactérias dulcícolas, destacou que estas produzem muitos peptídeos com diversos esqueletos e reportou atividade biológica para alguns compostos isolados (Figura 9, página 50), como: inibição da protease de serina por anabaenopeptilidas - quimotripsina (depsipeptídeos isolados de *Anabaena* sp.), spumiginas – trombina, tripsina e plasmina (peptídeos isolados de *Nodularia spumigena*) e suomilidea – trombina, tripsina e plasmina (isolado de *N. spumigena*); relaxamento por nostoficina (isolado de *Nostoc* sp.); e citotoxidade por anabaenopeptinas (peptídeos cíclicos isolados de *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena* sp. e *Oscillatoria agardhii*).

Nagarajan *et al.* (2013) em uma análise sobre relação estrutura atividade e potenciais bioativos de cianobactérias de água doce e terrestre, reportaram que compostos cianobacterianos, como a scytonemida A, as lyngbyazothrins C e D e os cilindrociclofanos, inibem o proteossomo 20S. Além das proteases, os metabólitos que bloqueiam os outros alvos das vias de câncer podem apresentar efeito citotóxico.

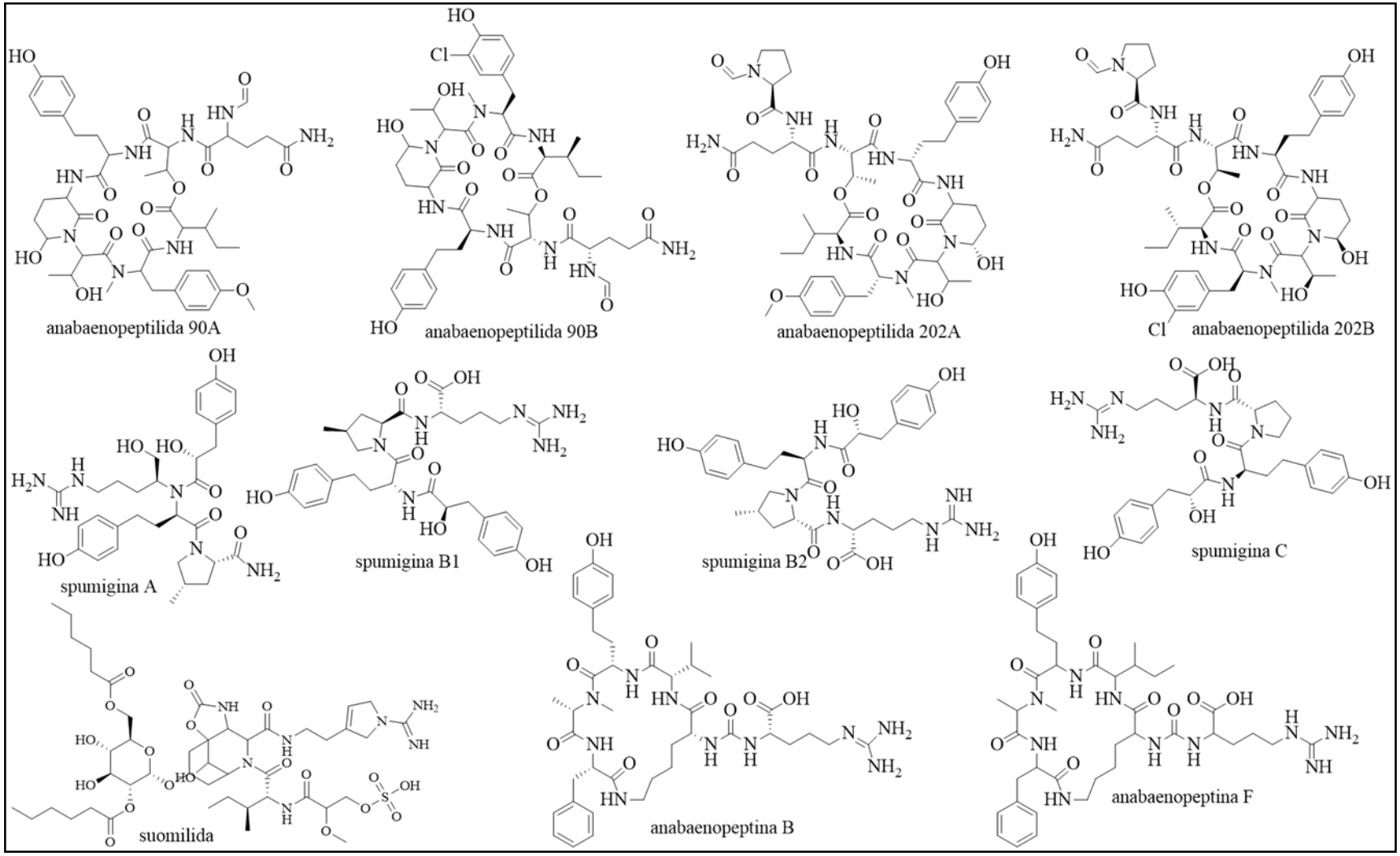
Os cânceres de cólon e reto, mama, pulmão e próstata são os mais graves em humanos e deduzem-se a serem inibidos por compostos peptídicos e não peptídicos. Destacaram ainda, que o crescimento de infecções que causam parasitas como *Plasmodium*, *Leishmania* e *Trypanosoma* são bem controlados por peptídeos: aeruciclamidas A-D, ticonamidas e alcalóides: nostocarboline e calothrixins (NAGARAJAN *et al.,* 2013). Outro metabólito isolado a partir de *Nostoc* ATCC 53789, a criptoficina é um proeminente composto anticâncer.

Estudando a biossíntesse e estrutura de aeruginosinas, ao identificar e sequenciar um cluster do gene NRPS (sintetases de peptídeos não-ribossômicos) no genoma da cianobactéria *Planktothrix agardhii,* ISHIDA *et al.,* (2007) se depararam com mutagênese de inserção de um componente NRPS, o que levou à descoberta e elucidação estrutural de dois glicopeptídeos que foram designados aeruginosídeo 126A e aeruginosídeo 126B, que são caracterizados por uma unidade 2-carboxi-6-hidroxiocta-hidroindolo (Choi).

Em um estudo realizado por Kumar *et al.* (2013), o extrato metanólico bruto da *Aphanotece bullosa* apresentou-se como potente antifúngico, o mesmo foi encontrado para as espécies *Aphanothece pallida* e *Aphanothece stagnina* (GHAZALA *et al.,* 2010). Outros estudos têm relatado a atividade antifúngica para extrato bruto e compostos puros para outros gêneros de cianobactérias dulcíquolas como *Anabaena*, *Nostoc*, *Aphanocapsa*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Calothrix*, *Fischerella* (HAGMANN *et al.*, 1996;

GHAZALA *et al.*, 2010; VOLK; FURKERT, 2005; KIM, 2006; YOON; LEE, 2009; ASADI *et al.*, 2011; DROBAC-ÅIK *et al.*, 2007; PAWAR; PURANIK, 2008).

Figura 9 - Metabólitos secundários isolados de cianobactérias dulcícolas (HARADA, 2004)



Fonte: Autor.

A cianobactéria *Spirulina platensis* pertencente a família Oscillatoriaceae, apresenta um papel de destaque pela sua variedade de atividades e/ou aplicações, em função de sua fórmula especial que consiste de componentes ativos, incluindo minerais, vitaminas e proteínas, beta-caroteno, tocoferóis e ácidos fenólicos, exibindo alto poder anti-inflamatório e atividades antioxidantes (MAO *et al.*, 2000; ABDELKHALEK *et al.*, 2015; HUA *et al.*, 2018), especialmente aminoácidos essenciais (KHAN *et al.*, 2005; ABDEL-DAIM *et al.*, 2015). Portanto, é usada como um suplemento alimentar para humanos e aditivos alimentares para muitas espécies animais, bem como aves e peixes, pois a "*Food and Drug Administration"* (FDA) classificou os produtos de *S. platensis* como "*Generally Recognized as Safe*" (GRAS), ou seja, seguros para o consumo humano e o Comitê de Especialistas em Informações sobre Suplementos Dietéticos concluiu que não há risco grave para a saúde (MARLES *et al.*, 2011).

Além disso, *S. platensis* e seu ingrediente altamente ativo (C-ficocianina) apresenta-se como anti-inflamatório, imunomodulador, hepatoprotetor, nefroprotetor, neuroprotetor, atividades antidiabéticas, antigenotóxicas, antihipertensivas e anticancerígenas (IWATA *et al.*, 1990; UPASANI *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2001; UPASAN; BALARAMAN, 2010; HUA *et al.*, 2018). Estudos pré-clínicos e estudos clínicos sugerem que a *S. platensis* tem um forte efeito terapêutico (FOX, 1996), atuando na redução do colesterol do sangue, proteção contra alguns tipos de câncer, equilíbrio do sistema imunológico, aumento dos lactobacilos intestinais, redução de nefrotoxicidade por metais pesados e drogas, proteção à radiação ultravioleta, redução de hiperlipidemia e obesidade, conforme demonstrado em estudos *in vitro* em ratos e e humanos (ANUSUYA; VENKATARAMAN, 1983; BELAY *et al.*, 1993; MANI; IYER; SUBRAMANIAN, 1998). Tem-se verificado também que em extrato aquoso inibiu parcialmente a replicação do vírus em células T, em células mononucleares periféricas e em células de Langerhans em humanos infectados com HIV1 (AYEHUNIE *et al.*, 1998). Apresenta também, efeito anti-viral especialmente contra *Herpes simplex* (HSV-1) e HIV-1 (AYEHUNIE *et al.*, 1998) e contra diferentes espécies de bactérias patogênicas humanas (MALA *et al.*, 2009). Atua como imunomoduladores em seres humanos e animais, indicando que a biomassa ou os seus extratos podem impedir ou inibir câncer (MISHIMA *et al.*, 1998). Apresenta também atividade antimicrobiana (DEMULE *et al.*, 1996; KUMAR *et al.*, 2013) e antioxidante (ALI *et al.*, 2014).

Em um estudo relizado por Preisitsch *et al.*, (2014) foi elencada a diversidade estrutural (34 compostos) de paraciclofanos biossintetizados por *Nostoc* sp. CAVN2, e

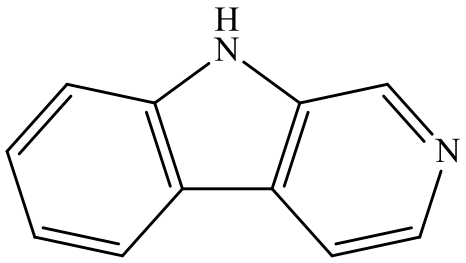
isolaram cinco novos carbamidociclofanos e onze paraciclofanos já conhecidos. A atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) foi testada e indicou que a atividade antibacteriana está relacionada com a presença de unidads de carbamoil. Em outro estudo Preisitsch *et al.,* (2015) isolaram três novos alquilresorcinóis relacionados com o cilindrociclofano, cilindrofridinas A–C (1–3) de *Cylindrospermum stagnale* PCC 7417 e testaram sua atividade antimicrobiana.

Schreuder *et al.* (2016) ao estudar espécies dos gênereos *Planktothrix* e *Nostoc*, descreveram o isolamento e a elucidação da estrutura de 19 anabaenopeptinas e 1 oscilamida, incluindo 13 novos congêneres, bem como suas pronunciadas relações estrutura-atividade com relação à inibição de fibrinólise ativável por trombina (TAFI), tal inibição estimula a degradação dos coágulos de fibrina e pode ajudar a prevenir a trombose.

Um estudo realizado por Teneva *et al.* (2012), demonstra que as espécies de *Nostoc* além da produção de compostos bioativos úteis com ação terapêutica como as criptoficinas, são capazes de produzir outros compostos tóxicos intracelulares e extracelulares como algumas cianotoxinas típicas. Assim, a capacidade que diferentes cepas de cianobactérias têm para produzir compostos potencialmente perigosos deve ser levada em conta quando tais cepas são utilizadas como fonte de diferentes agentes bioativos com potencial farmacêutico.

Outro composto, o norharmane (9H-pirido[3,4-b] indol) (Fig. 10, página 52), um alcalóide que tem na estrutura uma amina heterocíclica derivada do aminoácido triptofano, é encontrado em algumas cianobactérias e tem revelado-se com numerosos efeitos biológicos (KARAN; ERENLER, 2017).

Figura 10 - Estrutura química do alcalóide norharmane



Norharmane

Fonte: Autor.

A presença de norharmane tem sido reportada em nove cianobactérias, *Anabaena cilindrica*, *Anabaena inaequalis*, *Anabaenopsis siamensis*, *Chococcus minutus*, *Nostoc carneum*, *Nostoc commune*, *Nodularia harveyana* e *Phormidium foveolarum* (VOLK, 2007).

Vários efeitos farmacológicos como a inibição da enzima monoamino oxidase, indoleamina 2,3 dioxigenase, óxido nítrico sintase e enzimas acetilcolinesterase foram relatados (CONNOP *et al.,* 1995; CHIARUGI *et al.,* 2000; ROBINSON *et al.,* 2003). Outras propriedades afetam a indução de morte celular por apoptose em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano e o aumento na secreção de insulina de ilhotas de Langerhans em humanos (VOLK, 2008) e como prototóxico, incluindo degeneração dos nervos nigroestriatais na doença de Parkinson (NIKAM *et al.,* 2013).

Em estudo realizado por Karan *et al.* (2017), a cianobactéria *Geitlerinema carotinosum* foi isolada e identificada por morfologia e análise molecular e a presença de norharmane foi analizada quantitativamente no extrato metanólico, apresentando-se como o principal produto de *G. carotinosum*.

Karan e Erenler (2017), utilizando Cromatografia Líquida e Alta Pressão, analizaram quantativamente e detectaram a presença do norharmane nas espécies *Chroococcus minutus, Geitlerinema carotinosum, Nostoc linckia* e *Anabaena oryzae*. Destacaram ainda, que o isolamento de metabólitos secundários bioativos, incluindo o norharmane dessas cianobactérias podem ter eficácia na indústria farmacêutica.

3.3.3 Considerações sobre a biossíntese dos metabólitos secundários de cianobactérias

Muitos microrganismos produzem produtos naturais, alguns dos quais estão diretamente relacionados com o metabolismo do organismo. Outros representam antibióticos potentes ou agentes imunossupressores, tóxicos ou citostáticos que abriram caminho para seu uso como terapêuticos na medicina moderna. O valor dessas substâncias para a linhagem produtora permanece um mistério em muitos casos, e só pode ser especulado que alguns desses produtos naturais podem ser usados para combater microorganismos rivais em seus habitats naturais (WALSH, 2000; LAHLOU, 2013).

O que de fato ocorre, é que os produtos naturais têm uma história biológica, a sua biossíntese, que envolve interação repetida com enzimas moduladoras, e a função biológica real de muitos produtos naturais compreende a ligação a outras proteínas (LUTZ, 2003).

Assim, a capacidade de produtos naturais de interagir com outras moléculas, um pré-requisito indispensável para a produção de uma droga eficaz, pode ser considerada como biologicamente validada. É um fato surpreendente, mas muitas vezes negligenciado, que muitos produtos naturais exibem características de ligação avançadas em comparação com os

sintéticos. Muito provavelmente, a estrutura estericamente mais complexa de produtos naturais contribui para isso (LUTZ, 2003).

Um dos tipos de metabólitos secundários de cianobactérias são os peptídeos não ribossomais que são produzidos através das sintetases peptídicas não ribossomais (NRPS). Os NRPS contêm módulos, que são responsáveis pela integração de aminoácidos específicos em cadeias peptídicas. Cada módulo NRPS adiciona um único aminoácido à cadeia crescente de aminoácidos (KEHR *et al.,* 2011; MARAHIEL, 2016). Estes módulos compreendem domínios que desempenham papéis definidos na biossíntese: O domínio de adenilação seleciona o aminoácido cognato e o ativa como aminoacila adenilato; O aminoácido ativado é então transferido para uma proteína carreadora de peptidila (PCP) que o transfere ao domínio de condensação que, finalmente, catalisa a formação da ligação peptídica. Os módulos podem também conter domínios de adaptação adicionais que modificam o substrato de aminoácido, por exemplo, domínios de oxidação ou domínios de epimerização e o módulo NRPS terminal contém um domínio tioesterase que libera o produto peptídico nascente por meio de ciclização ou hidrólise intra ou inter-molecular (FINKING; MARAHIEL, 2004; KEHR *et al.,* 2011; KULTSCHAR; LLEWELLYN, 2018).

Exemplos de compostos de cianobactérias biossintetizados por NRPS incluem aerugenopeptina (ROUHIAINEN *et al.,* 2010), aeruginosina (ISHIDA *et al.,* 2009), anabaenopeptilida (ROUHIAINEN *et al.,* 2000) e lyngbyatoxin-a (EDWARDS; GERWICK, 2004).

Outra grande classe de metabólitos secundários encontrados em cianobactérias são os policetídeos, que são biossintetizados a partir de acetil-CoA usando policetídeo-sintases (PKS). Similarmente ao NRPS, os módulos de PKS consistem em um domínio de aciltransferase, um domínio de proteína transportadora de acila e um domínio de cetosintase, bem como domínios adicionais para modificação adicional (MICALLEF *et al.,* 2014).

A neurotoxina anatoxina-a de *Anabaena* sp. vincula-se irreversivelmente aos receptores nicotínicos de acetilcolina e é biossintetizado a partir da L-prolina usando três módulos PKS (KEHR *et al.,* 2011). Apesar da grande quantidade de policetídeos encontrados a partir de cianobactérias, apenas algumas biossínteses de agrupamentos de genes e seus produtos foram identificados (WANG *et al*., 2014; DITTMANN *et al.,* 2015).

Dentre os compostos de cianobactérias alguns são produzidos através da via híbrida NRPS-PKS, que consistem em domínios ou módulos PKS e NRPS (KEHR *et al.,* 2011), uma via biossintética combinatória natural para produzir uma matriz de estruturas químicas com

papéis e bioatividade específicos. É através dos aglomerados de genes biossintéticos híbridos que são produzidas muitas toxinas, como a microcistina e a cilindrospermopsina (TILLETT *et al.,* 2000; MIHALI *et al.,* 2008). As dolastatinas encontradas dentro de *Leptolyngbya* e *Simploca* sp. são sintetizados pelas enzimas NRPS-PKS e são capazes de perturbar a formação de microtúbulos. Outros metabólitos de cianobactérias atuam como inibidores de proteases, como as lyngbyastatinas, são derivados depsipeptídicos cíclicos, que se acredita serem inibidores de elastase. Além destes, muitos outros produtos naturais citotóxicos ou anticancerígenos das cianobactérias são produzidos através das vias híbridas NRPS-PKS (ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2015).

Já os peptídeos ribossomais (RPs) são sintetizados no ribossomo e usam apenas aminoácido proteinogênico. Eles são semelhantes aos NRPs devido às suas modificações pós-traducionais (KULTSCHAR; LLEWELLYN, 2018). Um grupo prevalente de peptídeos ribossomais encontrados em cianobactérias é a cianobactina. Estes são peptídeos cíclicos e menos comumente lineares formados através da via de síntese de peptídeos pós-ribossômicos (PRPS), que então sofre pós-modificações para formar suas estruturas complexas finais (SIVONEN *et al.,* 2010), formalmente conhecidas como peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-tradução (RiPP - Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides). Exemplos incluem os peptídeos cíclicos patelamidas, como a patelamida A e o peptídeo linear aeruginosamida (KEHR *et al.,* 2011).

Os alcaloides são compostos naturais que contêm nitrogênio, que geralmente têm propriedades tóxicas, sua diversidade estrutural é devida à ciclização, metilação, oxigenação e cloração de precursores de terpenos (WALTON; BERRY, 2016). Um exemplo inclui as saxitoxinas que são neurotoxinas encontradas em várias cianobactérias (RASTOGI; SINHA, 2009) e os alcalóides indólicos, uma classe de alcalóides contendo uma fração indol, como os hapalindóis hapalindolinonas, ambiguinas, pescindoles e welwitindolinonas, que só são encontrados em cianobactérias da subseção V (KULTSCHAR; LLEWELLYN, 2018).

Uma ampla gama de isoprenóides (também conhecidos como terpenóides) é produzida por cianobactérias, que têm uma via comum utilizando precursores de isopreno difosfato (IDP) e trifosfato de dimetilalilo (DMAPP). Estes têm muitas configurações possíveis, resultando em alta diversidade estrutural, devido à modificação por ciclização, rearranjos e oxidação e são biossintetizados através da via metileritritol-fosfato (MEP). Usando gliceraldeído-3-fosfato e piruvato produzido a partir da fotossíntese, os cinco blocos de construção de carbono IPD e DMADP são formados (PATTANAIK; LINDBERG, 2015).

O aumento rápido da capacidade de sequenciamento e a redução de custos permitiram um enorme aumento na disponibilidade de genomas completos em bancos de dados públicos e uma preferência por todo sequenciamento do genoma visando apenas genes da biossíntese, direcionando o desenvolvimento de múltiplas ferramentas para a identificação de genomas ou genes. Segundo Medema *et al.* (2015), a análise da genética dos dados requer poder computacional e ferramentas *in silico*, como por exemplo, a informação mínima sobre uma especificação de cluster de gene biossintético (MIBiG - Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster) foi desenvolvida para atender às necessidades de aumentar os dados do cluster de genes biossintéticos.

3.4 Considerações sobre técnicas utilizadas para identificação de metabólitos secundários

Produtos naturais, incluindo plantas, animais e microorganismos têm sido a base do tratamento de doenças humanas (PATWARDHAN *et al.,* 2004; LAHLOU 2007, 2013). A maioria dos novos medicamentos tem sido gerada a partir de metabólitos secundários e de compostos derivados e a pesquisa destes continua a explorar uma variedade de estruturas e não há dúvida de que os metabólitos secundários foram e serão importantes fontes de novos compostos farmacêuticos (PATWARDHAN *et al.*, 2004).

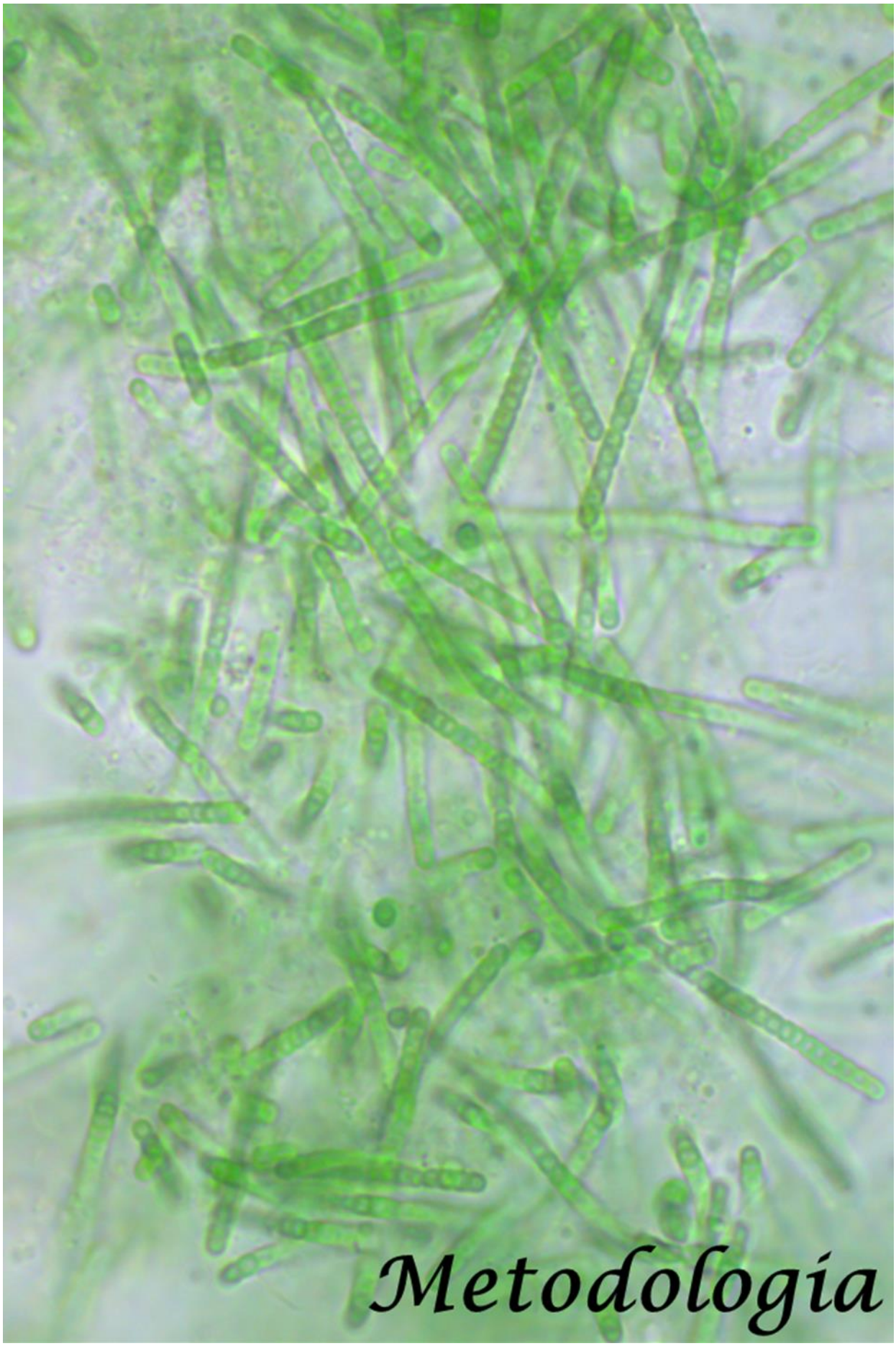
O processo na descoberta de fármacos de produtos naturais usualmente exigiu vários círculos de separação e elucidação da estrutura e foi, portanto, demorada em termos de tempo, no entanto, tecnologias emergentes, como técnicas de separação automatizada, seleção de alta capacidade e química combinatória são poderosas e estão revolucionando a descoberta de drogas. A aplicação dessas tecnologias compensa as limitações inerentes dos produtos naturais e oferece uma oportunidade única para restabelecer os produtos naturais como uma importante fonte de descoberta de medicamentos (LAHLOU, 2013).

O sucesso dos produtos naturais está relacionado com as forças da química de produtos naturais, biologia molecular e celular, química sintética e analítica, bioquímica e farmacologia, para explorar a vasta diversidade de estruturas químicas e atividades biológicas desses produtos (LAHLOU, 2013). No entanto, sua diversidade estrutural torna-os uma fonte valiosa de novos compostos líderes contra alvos terapêuticos recém-descobertos. Avanços técnicos em técnicas analíticas apontam que o uso de produtos naturais é mais fácil do que antes (HARVEY, 1999).

A moderna pesquisa de produtos naturais está passando por uma revolução devido aos recentes avanços na biossíntese combinatória, na genômica microbiana e nos processos de triagem. Todavia, o acesso a técnicas hifenadas como Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa, Cromatografia Líquida-Ressonância Magnética Nuclear levanta a esperança de reduzir drasticamente o tempo e custo envolvidos na pesquisa de produtos naturais usando processos de dereplicação que são combinação de técnicas para evitar os compostos já relatados (LAHLOU, 2013).

Se o composto principal (ou princípio ativo) estiver presente em uma mistura de outros compostos de uma fonte natural, ele deve ser isolado e purificado. A facilidade com que o princípio ativo pode ser isolado e purificado depende muito da estrutura, estabilidade e quantidade do composto.

Não há dúvida de que o sucesso dos produtos naturais na descoberta de drogas está essencialmente relacionado à sua estrutura química complexa, à sua existência em várias espécies na natureza e à existência de métodos de alta tecnologia disponíveis, essencialmente para empresas farmacêuticas e centros de pesquisa.


Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção das culturas: coletas, isolamento, purificação e manutenção dos cultivos

Foram realizadas coletas de de água, sedimento e outros substratos de diferentes pontos do semiárido brasileiro.

O material foi coletado em frascos de vidro ou garrafas PET e transportado ao Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB) em condições herméticas. Alíquotas das amostras foram transferidas para balões de vidro autoclavados contendo os meios de cultura Zarrouk, WC e BG11 Doce, os quais foram mantidos numa câmara de cultivo a 25º C (±1º C) dotadas de sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia, com fotoperiodo natural controlado por uma fotocélula externa.

Constatando-se crescimento de células procedeu-se o isolamento das mesmas em microscópio binocular usando micropipetas capilares, transferindo-se individualmente cada uma das espécies que cresceram nos balões contendo as amostras coletadas nas diferentes localidades para tubos de ensaio autoclavados contendo meio de cultura, sendo os mesmos mantidos na câmara de cultivo. As culturas unialgais obtidas foram codificadas e incorporadas ao Banco de Microalgas do LARBIM/UFPB, sendo mantidas em tubos de ensaio com meio de cultura com repicagens mensais. Clones de cada cepa foram/vem sendo mantidos numa câmara de germinação com sistema de iluminação e fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25º ± 1º C.

4.2 Preparação dos meios de cultura

Como meio básico para os cultivos e manutenção das microalgas usadas na pesquisa foram utilizados os meios sintéticos Zarrouk (ZARROUK, 1966) (Tabela 1, página 60) e WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) (Tabela 2, página 61), preparados com água destilada autoclavada e deixada em repouso por 24 horas em temperatura constante para a re-oxigenação. Após este tempo, foram adicionados à água todos os macronutrientes, micronutrientes e vitaminas presentes nos referidos meios de cultura.

Tabela 1 - Composição do Meio Zarrouk.

Soluções de Trabalho	
Reagentes	**Quantidades (g) dissolvida em água destilada**
1- KNO_3	15,0 em 200 mL
2- NaCl	33,0 em 200 mL
3- $MgSO_4.7H_2O$	1,5 em 200 mL
4- K_2HPO_4	1,5 em 200 mL
5- $CaCl_2.2H_2O$	0,58 em 200 mL
6- Na_2EDTA	6,4 em 100 mL
7- $FeSO_4.7H_2O$	0,5 em 100 mL
8- H_3BO_3	1,142 em 100 mL
9- Solução mista	*
*Solução mista. Dissolver os cinco sais abaixo (g) em 100 ml de água destilada.	
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,049g (pode ser substituído por $CoCl_2.6H_2O$ ou $CoSO_4.7H_2O$)
$MnCl_2.4H_2O$	0,144g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,882g
$CuSO_4.5H_2O$	0,0157g
MoO_3	0,071g (pode ser substituído por $NaMoO_4.2H_2O$)
Preparação de 1,0 litro de meio de cultura (água destilada)	
A - Dissolver em 600 ml de água destilada 15,0 g de $NaHCO_3$.	
B - Na solução anterior, dissolver 2,0 g de Na_2CO_3.	
C - Acrescentar 10,0 mL das soluções 1, 2, 3, 4 e 5.	
D - Acrescentar 1,0 mL das soluções 6, 7, 8 e 9.	
E - Completar o volume a 1.000 mL e autoclavar.	

Fonte: Zarrouk, 1966.

Tabela 2 – Composição do Meio WC

Solução estoque	
Reagentes	**Quantidade**
$CaCl_2$. $2H_2O$	36.8 g
$MgSO_4$. $7H_2O$	37 g
$NaHCO_3$	12.6 g
K_2HPO_4. $3H_2O$	11.4 g
$NaNO_3$	85 g
Água destilada	1000 mL
Solução de silicato	
Reagente	**Quantidade**
Na_2SiO_3. $9H_2O$	21.2 g
Água destilada	1000 mL
Solução de micronutrients	
Reagentes	**Quantidade**
Na_2EDTA	4.36 g
$FeCl_3.6H_2O$	3.15 g
$CuSO_4.5H_2O$	0.01 g
$CuSO_4.5H_2O$	0.022 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0.01 g
$CoCl_2.6H_2O$	0.18 g
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.006 g
H_3BO_3	1 g
Água destilada	1000 mL
Solução de vitaminas	
Reagentes	**Quantidade**
Tiamina HCl	0.1 g
Biotina	0.0005 g
Água destilada	1 L
Composição do meio	
Reagentes	**Quantidades**
Solução estoque	1mL
Solução de silicato	1mL
Solução de micronutrientes	1mL
Solução de vitaminas	1mL
Tri(hidroximetil)-amino metano	0,115g
Água do meio	1000 mL

Fonte: Guillard e Lorenzen, 1972

4.3 Experimentos laboratoriais de crescimento e produção de biomassa nos meios sintéticos para análise dos metabólitos secundários

As espécies isoladas foram cultivadas nos respectivos meios de cultura em que estão mantidas no banco de cultura do LARBIM/UFPB, visando a extração/obtenção dos metabólitos secundários. Para este propósito os cultivos foram efetuados na câmara de cultivo do LARBIM (fotoperíodo de 12 horas, temperatura 25º C± 1ºC) em frascos mariotes de 20 litros contendo 18 litros de meio de cultura (Figura 11, página 62), com aeração fornecida por um minicompressor de membrana Resun AOC3.

Figura 11 – Cultivo das cianobactérias em frascos mariotes no LARBIM/UFPB.



Fonte: Autor.

4.4 Acompanhamento dos cultivos

Todos os cultivos desenvolvidos foram acompanhados por meio de contagens celulares em câmaras de Fuchs Rozenthal e em câmaras de Sedgewick-Rafter (para as espécies filamentosas), em microscópio binocular Leica, ou através de medidas da fluorescência *in vivo* usando um Fluorômetro Turner Design 10005R, em triplicatas.

As curvas de crescimento de cada espécie cultivada foram traçadas utilizando os parâmetros de crescimento acima referidos, a partir das quais foi possível determinar o tempo

de cultivo, a duração da fase exponencial, a velocidade de crescimento (*k*), e o rendimento final em biomassa.

A velocidade de crescimento (*k*), a qual representa o número de divisões celulares da população em estudo por unidade de tempo (dia), foi determinada através da equação 1, citada em Stein (1973):

$$k = \frac{3{,}322}{T_2 - T_1} x \, log \frac{N_2}{N_1} \qquad \textbf{Eq.1}$$

Onde:

3,322 corresponde ao fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10; T_1 e T_2 compreendem o início e o final da fase exponencial de crescimento; e N_1 e N_2 referem-se à densidade celular inicial e final dessa fase, respectivamente.

No final da fase exponencial de crescimento os experimentos foram interrompidos e o material foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 18 ºC, sendo os concentrados congelados (-40 °C), e posteriormente liofilizados num liofilizador Terroni. A biomassa seca das cepas cultivadas foi pesada em balança analítica e guardada em recipiente hermético sob refrigeração para análises posteriores.

4.5 Taxonomia

A identificação das espécies foi feita através de literatura especializada utilizando critérios diacríticos (HINDAK, 1990), realizando-se observações morfológicas dos principais caracteres usados na taxonomia de cada cepa isolada. Nesta etapa foi utilizado um microscópio Leica DM2500 equipado com câmera fotográfica digital e sistema de captura de imagens. Cada espécie foi fotografada em vários aumentos, inclusive em contraste de fase e identificadas a partir de manuais tradicionais de ficologia (GEITLER, 1932; KOMARÉK; ANAGNOSTIDIS, 1999, 2005; BELLINGER; SIGEE, 2010; BICUDO; MENEZES, 2006; FRANCESCHINI *et al.*, 2010), bem como foram usados artigos de referência publicados em revistas especializadas e pesquisas na internet.

4.6 Caracterização genotípica

4.6.1 Extração do DNA

A extração do DNA genômico das cepas de cianobactérias D39Z, D112Z e D298WC foi realizada conforme o método descrito em Morin *et al.* (2010) com modificações. Cerca de 20 a 50 mg de biomassa liofilizada de cada cepa foram colocadas dentro de tubos criogênicos e ressuspendida em 0,5 ml de NaCl a 0,15M e EDTA a 0,1M, sendo os tubos invertidos suavemente por cinco segundos. Em seguida, a biomassa ressuspendida sofreu três ciclos de descongelamento e congelamento, alternando em congelamento em nitrogênio líquido (5 segundos de imersão) e descongelamento em temperatura ambiente. As amostras foram então sonicadas em banho ultrasônico com três (3) pulsos de 60 segundos. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas em temperatura ambiente por 10 min à 8000 rpm e descartou-se o sobrenadante utilizando uma micropipeta.

Após o descarte do sobrenadante as células foram ressuspendidas em 500 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8); em seguida transferiu-se o ressuspendido para novos tubos de eppendorf e adicionou-se 100 µL de lisozima à 50 mg/mL, foi incubado por 30 min à 37°C, afim de promover a lise enzimática celular. Após a lise, acrescentou-se 5 µL de proteinase K, agitou por inversão e adicionou-se SDS à 2%, o ressuspendido foi novamente incubado por 1h à 37°C.

Para se obter uma melhor pureza do DNA, adicionou-se às amostras 150 µL de NaCl à 5M e 0,1 v/v de CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) à 10%, os tubos foram homogenizados levemente por inversão, em seguida foi incubado durante 10 min à 65°C. Depois desse procedimente, os ácidos nucleicos foram extraídos utilizando 1 v/v na proporção de 24:1 de clorofórmio:álcool isoamílico. Para permitir a precipitação dos complexos de CTAB-proteína e CTAB-polissácarideo os tubos ficaram submersos em gelo por 30 min e depois foram centrifugados por 10 min à 8000 rpm.

Feito a precipitação dos complexos de CTAB, o supernadante foi transferido para um novo tubo de eppendorf, acrescentou-se 60% volume de isopropanol e agitou suavemente por inversão até o DNA precipitar. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas por 10 min à 15000 RPM à 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. As amostras foram novamente centrifugadas por 5 min à 15000 RPM à 4°C, depois da centrifugação foram submetidos ao fluxo para secagem, surante 20 min. Por

fim, o pellet foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE com adição de 1 µL de RNAse, incubou por 30 min à 37°C.

4.6.2 Quantificação e pureza do DNA

A quantificação e a pureza do DNA extraído de cada uma das cepas trabalhadas foi acessada por espectrofotometria usando o NanoDrop. As absorbâncias de 230, 260 e 280 nm foram medidas em 2µL de cada amostra. A concentração do DNA foi estimada por quantificações espectrofotométricas na absorbância de 260nm. A pureza total foi calculada pela taxa da absorbância de 260/230. Altos valores para ambas as taxas (260/280 >1.8; 260/230>2) foram aceitas como bom indicador da pureza do DNA. Em contraste, uma baixa razão de 260/280 destaca uma contaminação de proteína e/ou fenol dentro da amostra, enquanto que um baixo razão de 260/230 irá indicar a presença de compostos orgânicos, tal como, fenolato tiocianatos, hidratos de carbono, sais no extracto.

4.6.3 Amplificação por PCR

A amplificação do DNAr 16S das cepas em estudo foi realizada usando os primers: CYA 106F 3´ CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTA A 5´e CYA 781R 3´ GAC TAC WGG ATC TAA TCC CWT T 5´, as condições da PCR seguiram as recomendações de Nubel *et al.* (1997) com algumas modificações. A amplificação gênica ocorreu em termociclador (Perkin Elmer Gene Amp DNA system 2400, EUA), nas seguintes etapas: 94°C por 5 min, 35 ciclos (94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min), com extensão final a 72°C por 10 min e manutenção a 4ºC por no mínimo 15 min. Os produtos da PCR seguiram para o sequenciamento.

4.6.4 Sequenciamento

O sequenciamento do DNA das cepas D39Z, D112Z e D298WC foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (http://ludwigbiotec.com.br/site/Servicos-de-Sequenciamento), e as sequências obtidas foram analisadas quanto à integridade dos cromatogramas, extensão FASTA e foram submetidas ao programa BLAST do NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

4.7 Análise de cianotoxina

Para averiguar a presença de toxicidade nas células das cianobactérias 5mg de biomassa liofilizada de cada espécie foram colocadas em tubos criogênicos com 1,5mL de água Milli-Q autoclavada, posteriormente lisadas em três banhos em nitrogênio líquido (5 segundo cada banho) e usadas diretamente para análise de microcistina utilizando o Kit Abraxis® e seguindo as instruções do fabricante. As leituras das amostras foram efetuadas numa leitora de placa modelo Multiskan Fc (Thermo SCIENTIFIC), com o programa *Skanlt Software 3.1.0.4 RE for Multiskan FC*, do LARBIM/UFPB.

4.8 Composição bioquímica

As proteínas hidrossolúveis foram quantificadas na biomassa seca obtida para cada espécie através do método de Lowry *et al.* (1951) utilizando albumina bovina como padrão. Os carboidratos foram analizados pelo método de Kochert (1978), utilizando glicose como padrão; e os lipídeos totais foram obtidos por gravimetria, de acordo com a metodologia de Folch (1957). As análises foram realizadas no LARBIM/UFPB.

4.9 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos

Para a determinação do perfil de ácidos graxos do óleo foi realizado uma esterificação metílica seguindo a metodologia descrita por Hartman e Lago (1973) e a quantificação obtida por curva de calibração com padrões de ésteres metílicos (Supelco® 37 Component FAME Mix), utilizando um GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna Durabound DB-23 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). A temperatura do injetor e do detector foram fixados em 230 °C e temperatura da coluna em 90 °C. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150 °C (10 °C/min), 150 a 200 °C (2 °C/min), 200 a 230 °C (10 °C/min) em um tempo total de corrida de 39 minutos com um split de 100. O gás transportador foi Hélio. A análise foi realizada no Núcleo de Pesquisa e Extensão - Laboratório de Biocombustíveis (NPE-LACOM/UFPB).

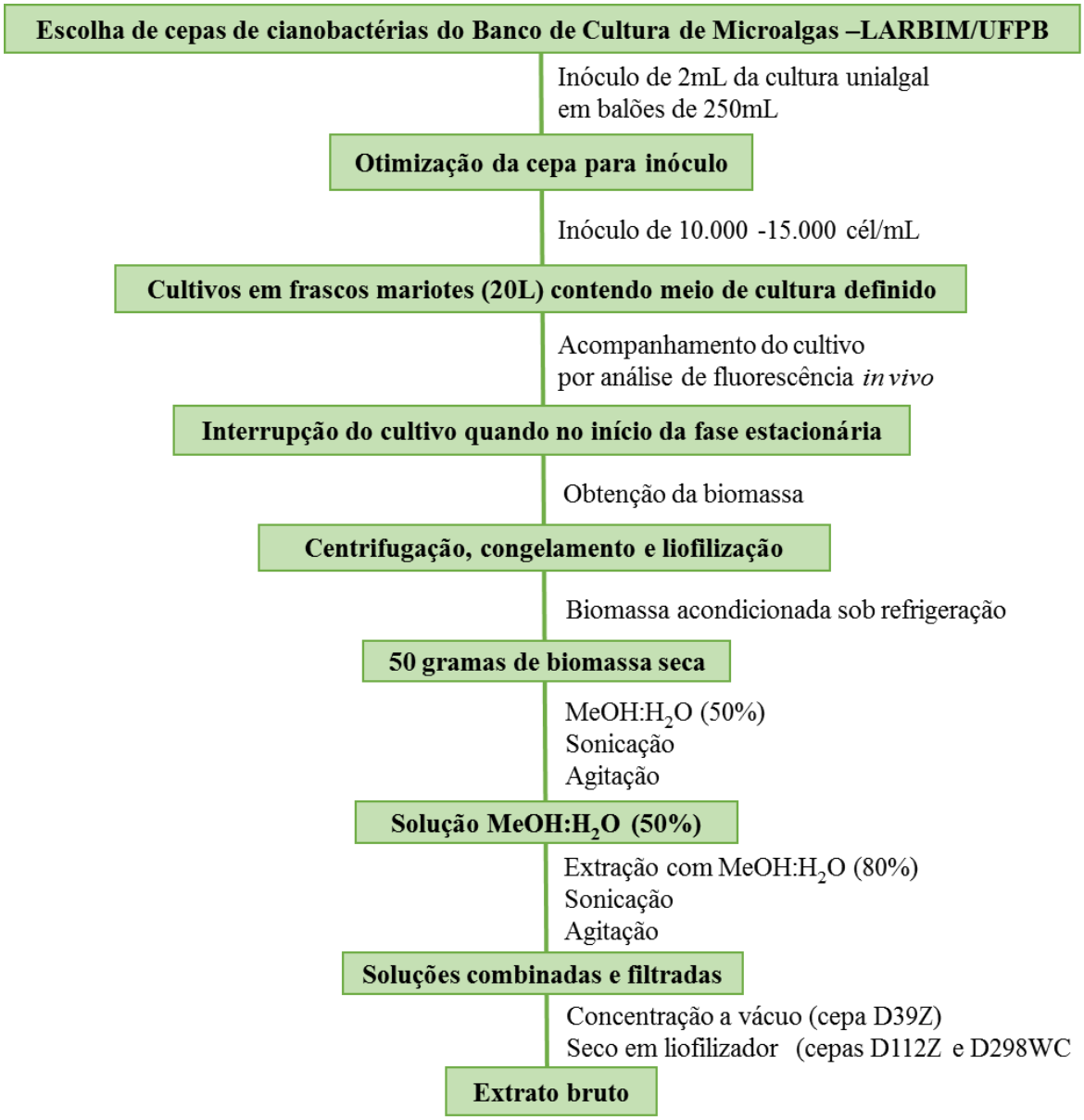
4.10 Extração dos metabólitos secundários e experimentação de sua atividade antimicroabiana e citotóxica

4.10.1 Estudo fitoquímico

4.10.1.1 Obtenção do extrato bruto

Para obenção do extrato bruto, 50g de biomassa seca liofilizada das cianobactérias foram suspensas em MeOH:H_2O a (50%), tratadas com banho de ultrassom (3 ciclos de 30 minutos) e extraídas num agitador durante 150 min. Após decantação, o sobrenadante foi resevado e a biomassa (pelet) foi subsequentemente extraída utilizando MeOH:H_2O (80%) e novamente tratada com banho de ultrassom (3 ciclos de 30 minutos) e extraída num agitador durante 150 min. Em seguida, as soluções foram combinadas, filtradas e secas em vácuo (para a cepa D39Z) e liofilizadas (para as cepas D112Z, D298WC), vide esquema 1 (página 67).

Esquema 1 - Metodologia para obtenção do extrato bruto



Fonte: Autor

4.10.1.2 Isolamento, purificação e identificação dos constituintes químicos da cepa D298WC

O extrato bruto da cepa D298WC foi submetida a um desengorduramento com hexano sob agitação, sendo posteriormente seco em rotaevaporador.

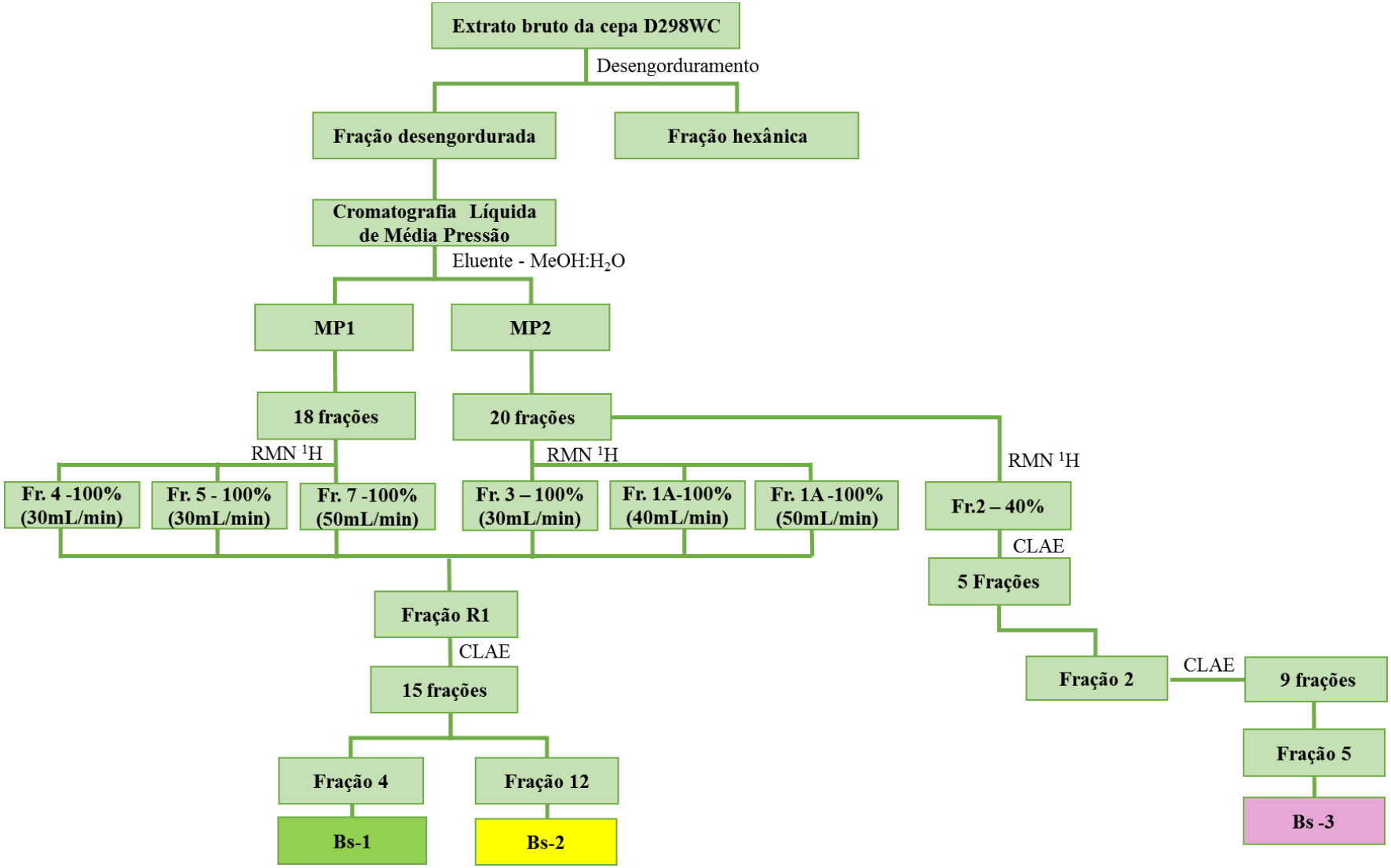
Visando o fracionamento do extrato, uma massa de 3g do extrato desengordurado foi direcionada para um sitema cromatográfico em Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP) (primeira parte do fracionamento - MP1), usando um cromatógrafo de média pressão (Buchi Pump Manager C-615) e uma coluna com sílica gel ultra-pura (C18, 40-63µm – Silicycle) como fase estacionária e como fase móvel usou-se um gradiente de eluição de MeOH:H_2O (40%, 60% e 80%) e MeoH 100%. O fluxo variou de 10mL/min a 50mL/min nos comprimentos de onda de 220 nm, 320 nm e 280 nm. Esse processo foi repetido (segunda parte do fracionamento – MP2) para assim ser fracionado todo o extrato bruto obtido (Esquema 2, figura 12 e figura 13, páginas 69, 70 e 71, respectivamente).

As frações obtidas no processo cromatográfico por CLMP foram submetidas à análise de ressonância magnética nuclear em espectrômetro BRUKER ASCEND^{TM} (400 MHz) do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e assim de todas as frações, seis foram reunidas de acordo com o seu perfil químico (Esquema 2, Figura 14, páginas 69 e 72, respectivamente) originando a fração R1 que posteriormente foi submetida a outro processo cromatográfico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) semi-preparativa, o método utilizado está descrito na tabela 3 (página 73).

Outra fração obtida do segundo fracionamento de CLMP (MP2), a Fr.40%, foi submetida a um processo cromatográfico também em CLAE, o método utilizado está descrito na tabela 4 (página 73). E deste fracionamento foram obtidas 5 frações, das quais a fração Fr.40%-2 foi submetida a separação em CLAE preparativa, o método utilizado está descrito na tabela 5 (página 73).

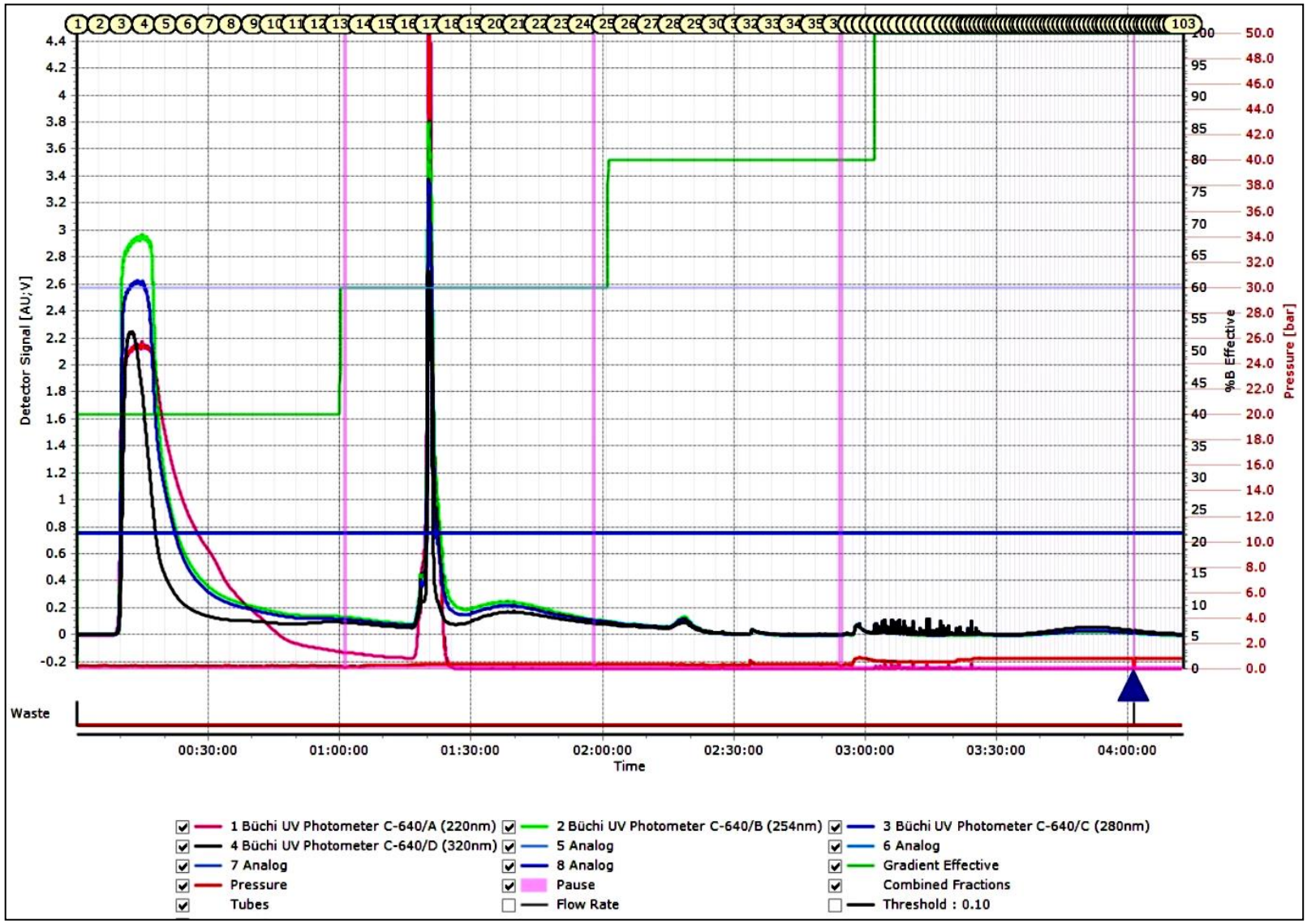
As substância codificada como Bs-2A e Bs-2B foi submetida à análises em um espectrômetro de massas de baixa resolução, da marca Bruker, modelo Íon Trap – amazona X, no LMCA-UFPB.

Esquema 2 - Esquema Isolamento e purificação dos constituintes químicos



Fonte: Autor.

Figura 12- Cromatograma do extrato desengordurado da cepa D298WC em Cromatografia Líquida de Média Pressão



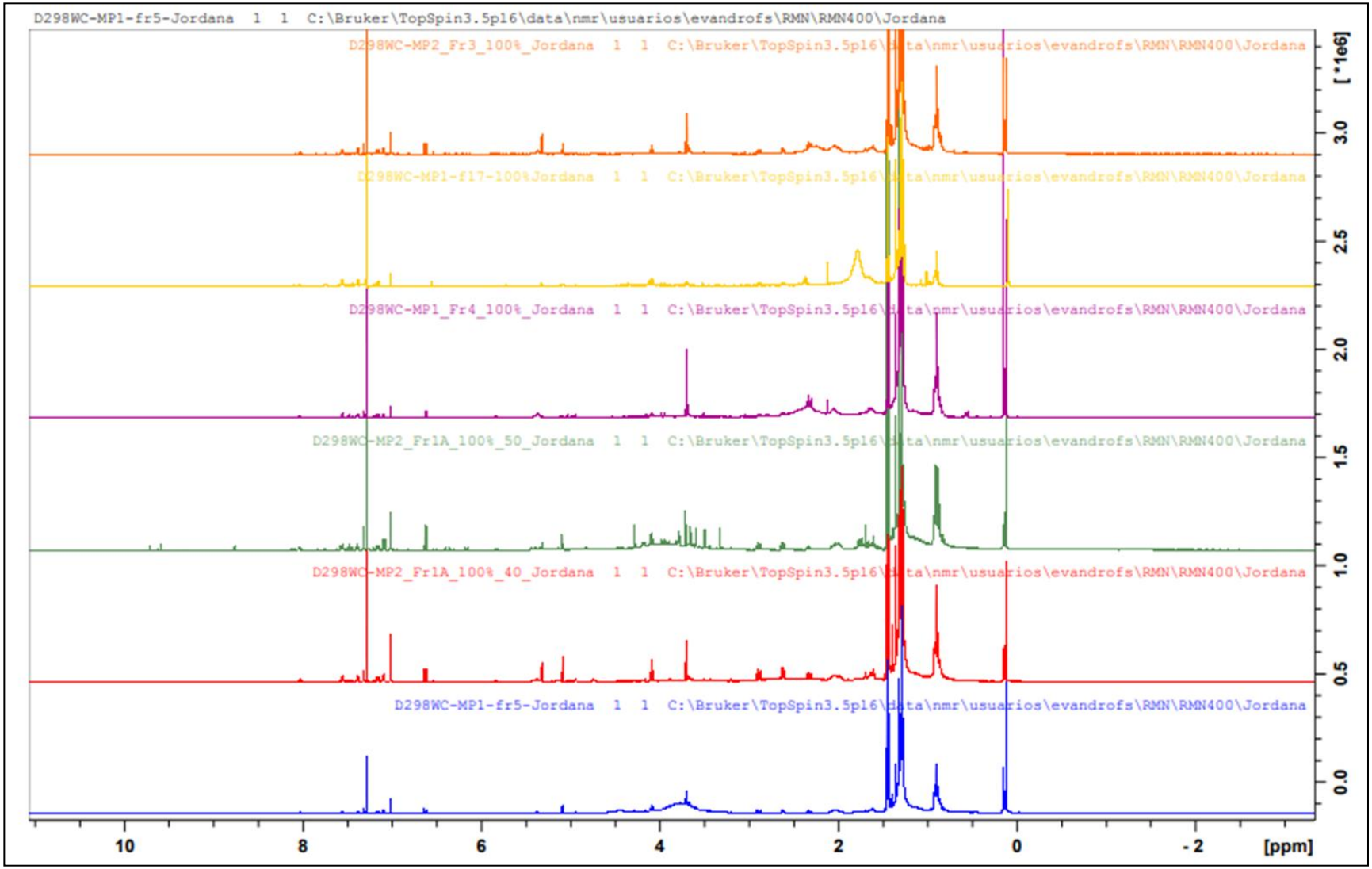
Fonte: Autor.

Figura 13 - Eluição do extrato desengordurado da cepa D298WC por Cromatografia Líquida de Média Pressão



Fonte: Autor.

Figura 14 - Comparação dos espectros de RMN de 1H das frações que reunidas originaram a fração R1



Fonte: Autor.

Tabela 3 – Método de separação em (CLAE semi-preparativa) da fração R1

Tempo (minutos)	Percentual de B - Acetonitrila
0,01	40%
30.00	60%
60.00	60%
100.00	100%
120.00	100%
125.00	40%
145.00	40%
146.00	stop

Fonte: Autor.

Tabela 4 – Método de separação em (CLAE semi-preparativa) da fração Fr.40%

Tempo (minutos)	Percentual de B - Acetonitrila
0,01	10%
20.00	20%

Fonte: Autor.

Tabela 5 – Método de separação em (CLAE preparativa) da fração Fr.40%-2

Tempo (minutos)	Percentual de B - Acetonitrila
0,01	10%
30.00	20%

Fonte: Autor.

4.10.1.3 Obtenção dos extratos para determinação dos compostos fenólicos extraíveis totais e da capacidade antioxidante

O extrato de cada uma das cepas foi preparado com água destilada na concentração de 5mg.mL-1 e armazenado em frasco âmbar, sob refrigeração até à sua utilização.

4.10.1.3.1 Determinação dos compostos fenólicos extraíveis totais

Os teores de fenólicos extraíveis totais foram determinados pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteau (SLINKARD; SINGLETON, 1977). Uma alíquota de 240 µL de cada extrato foi colocada em tubo de ensaio e a elas adicionadas 60 µL do reagente de Folin-Ciocalteau, após 1 min de agitação seguiu-se com a adição de 2520 µL de água destilada e 180 µL de carbonato de sódio a 15%. A mistura foi agitada e mantida ao abrigo da luz durante 7duas horas. A medida de absorbância foi realizada em UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, modelo Evolution 60S), no comprimento de onda de 760 nm. A concentração de compostos fenólicos foi estimada utilizando uma curva de calibração padrão com ácido gálico (2-200 mg.L–1) sendo obtida nas mesmas condições. Os resultados foram expressos em mg EAG.g-1 (miligrama de equivalente de ácido gálico por grama do extrato).

4.10.1.3.2 Determinação da capacidade antioxidante

Capacidade sequestrante do radical livre DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil)

A capacidade antioxidante dos extratos obtidos a partir das microalgas foi determinada de acordo com Brand-Willams, Cuvelier e Berset (1995), que consiste na capacidade que os antioxidantes presentes nas amostras possuem em sequestrar o radical estável DPPH•. A partir de triagem preliminar, a solução de DPPH• (23,6 $\mu g.mL^{-1}$ em EtOH) foi adicionada às amostras do extrato obtendo uma concentração final de 150 $\mu g.mL^{-1}$. Em triplicata, alíquotas de 90 µL dos extratos foram misturadas com 210 µL de etanol e 2.700 µL da solução de DPPH• (23,6 µg.mL-1 em EtOH). Após 30 minutos foi efetuada a leitura a 517 nm, em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, modelo Evolution 60S). A curva controle foi preparada utilizando Trolox em concentrações de 0,5 a 5 $\mu g.mL^{-1}$. Os resultados da capacidade antioxidante

foram expressos em μM Trolox.g^{-1} extrato (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

Capacidade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante dos extratos de microalgas foi estimada pelo ensaio do FRAP, que é baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe3+ para Fe2+. Seguindo a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996). A solução do reagente FRAP foi preparada com 25 mL de tampão acetato 0,3 M, uma alíquota de 2,5 mL da solução TPTZ (2,4,6-Tris(2- piridil)-s-triazina) a 10 mM e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Ao abrigo da luz, adicionou-se 90 μL de cada extrato em tubos, 270 μL de água destilada, seguido de 2,7 mL do reagente FRAP, após homogeneização, os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C. O espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, modelo Evolution 60S) foi calibrado com o reagente FRAP e as leituras da absorbância foram realizadas após 30 minutos da mistura, em 595 nm. A curva controle foi preparada utilizando Trolox (500 a 2000 μM.L 1) sendo obtida nas mesmas condições.

A partir da equação da reta do gráfico concentração (mg.L^{-1}) *versus* absorbância, podese calcular a capacidade antioxidante total. Os resultados da capacidade antioxidante foram expressos em μM Trolox.g-1 extrato (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

Capacidade sequestrante do radical livre ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

A capacidade antioxidante pelo método ABTS•+ (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico)), foi determinada conforme a metodologia descrita por Rufino et al. (2007). O radical ABTS foi formado pela reação de 5 mL da solução ABTS•+ 7 mM com 88 μL da solução de persulfato de potássio 140 mM, mantidos a temperatura ambiente por 16h. Após esse período o radical foi diluído em etanol P.A. (aproximadamente 1:90 v/v) até a obtenção do valor de absorbância de 0,708 a 734 nm. A partir dos extratos de cada microalga, transferiu-se uma alíquota de 30 μL com 3,0 mL do radical ABTS. A leitura foi feita após 6 minutos da reação a 734 nm, e o etanol foi utilizado como branco. A curva controle foi preparada utilizando sulfato ferroso em concentrações de μM. Os resultados da capacidade antioxidante

foram expressos em μM sulfato ferroso g-1 extrato (capacidade antioxidante equivalente ao sulfato ferroso).

Análise estatística

Todos os dados obtidos para cada análise foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o programa *Statistica* 7.0, ao nível de 5% de significância. A homocedasticidade das variâncias de todos os parâmetros analisados foi confirmada utilizando o teste de Levene. As diferenças dos parâmetros analisados entre as espécies pesquisadas foram comparadas utilizando a ANOVA *one-way* e teste *a posteriori* de Tukey HSD.

4.10.2 Estudo farmacológico

4.10.2.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana in vitro para as espécies de cianobactérias estudadas

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos (DCF/CCS/UFPB). Foram utilizados nos ensaios biológicos de atividade antimicrobiana quatro (03) produtos: 1-D112Z, 2-D298WC, 3-D39EB. Os mesmos foram devidamente solubilizados em dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 10 % e Tween 80 a 0,02%. Em seguida, foi completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 3mL) para obter concentração inicial de 1024 até 64 μg/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NASCIMENTO *et al.,* 2007; PEREIRA *et al.,* 2014).

4.10.2.1.1 Antimicrobianos sintéticos

Para o controle de atividade antimicrobiana foi usado cloranfenicol (100 μg/mL) para bactérias, nistatina (100 UI /mL) para leveduras e fluconazol (50 μg/mL) para fungos filamentosos. Os mesmos foram adquiridos comercialmente da SIGMA-ALDRICH® /USA e preparados conforme os protocolos recomendados (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NASCIMENTO *et al.,* 2007; PEREIRA *et al.,* 2014).

4.10.2.1.2 Microorganismos

Nos ensaios para avaliação da atividade biológica do produto, foram incluídas cepas: Bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *S. aureus* LM-177; Leveduras: *Candida albicans* ATCC-90028, *C. albicans* LM-108, *Candida parapsilosis* ATCC-22019, *C. parapsilosis* LM-302; Fungos filamentosos: *Aspergillus fumigatus* ATCC-40640, *A. fumigatus* IPP-210.

As cepas foram adquiridas na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)/RJ, Laboratório de Micologia e de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. As mesmas foram mantidas em meio de cultura apropriado, Agar Sabouraud Dextrose- ASD (DIFCO LABORATORIES/France/USA) e conservadas a 4 ºC e a 35-37 ºC.

A suspensão dos micro-organismos foi preparada conforme o tubo 0.5 da Escala McFarland, ajustada através de leitura espectrofotométrica (Leitz-Photometer 340-800), para 90% T (530 nm), correspondendo, aproximadamente, a 10^6 UFC/mL (HADACECK; GREEGER, 2000; NCCLS, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991).

4.10.2.1.3 Meios de cultura

Os ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados em meio liquido Caldo "Brain Heart Infusion" (Caldo BHI) para bactérias (DIFCO LABORATORIES/France/USA) e RPMI 1640 para leveduras e fungos filamentosos (SIGMA-ALDRICH® /USA). Os meios de cultura foram preparados e usados conforme as instruções de cada fabricante.

4.10.2.1.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM dos produtos testados foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas contendo 96 cavidades com fundo em forma de "U" e em duplicata. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do CN (bactérias) e meio líquido RPMI (leveduras) duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL do produto solubilizado, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 32 µg/mL, de modo que, na primeira linha da placa se encontrará a maior concentração e na última, a menor

concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inoculo de cada micro-organismo nas cavidades, onde cada coluna da placa referiu-se, especificamente, a uma cepa.

Foi feito controle de crescimento do micro-organismo no meio de cultura; com cloranfenicol (100 µg/mL) para bactérias, nistatina (100 UI) para leveduras e fluconazol (50 µg/mL) para fungos filamentosos. As placas foram seladas e incubadas a 35-37 ºC / 24 – 72 h para os ensaios com bactérias e leveduras; e a temperatura ambiente (28-30 ºC)/fungos filamentosos. No ensaio biológico com as bactérias, após 24 h de incubação, foi adicionado 20 µL de solução do corante resazurina a 0,01 % (INLAB), reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998). Após a mudança de coloração do corante (azul para vermelho), considerou-se como indicador de crescimento microbiano; e se a cor permanece azul, significa a ausência de crescimento microbiano. E foi considerada como CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento das cepas bacterianas usadas nos ensaios, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador. A CIM do produto sobre as cepas fúngicas foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano verificado nas cavidades, quando comparado com o crescimento controle.

Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos dois ensaios (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; SOUZA *et al.*, 2007).

A atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; >acima de 1500 µg/mL= fraca atividade ou produto inativo (SARTORATTO *et al.*, 2004; HOUGHTON et al.; 2007).

4.10.2.2 Avaliação da atividade citotóxica in vitro das substâncias isoladas da cianobactéria Brasilonema sp. (D298WC)

O ensaio foi desenvolvido no Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar) no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/CCS/UFPB) sob a supervisão da Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral.

Para a avaliação da citotoxicidade foram utilizadas as linhagens de células tumorais humanas MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e HCT-116 (carcinoma colorretal) mantidas em meio de cultura RPMI-1640. O meio foi suplementado com

10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 ºC, em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO_2.

A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MOSMANN, 1983).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de 3 x 10^5 células/mL para células aderentes (MCF7 e HCT116). Em seguida, foram preparadas soluções estoque de 20 mM das amostras de substâncias isoladas (Lb1 e Lb2) e 2 mg/mL da mistura Lb3, dissolvidas em DMSO (100%), da qual foi produzida a solução de trabalho na concentração de teste (50 µM e 50 µg/mL), diluída em meio RPMI-1640, não ultrapassando a concentração final de 0,5% de DMSO. O DMSO (20%) foi utilizado como controle positivo. Após 72 h de incubação as placas foram centrifugadas (500 g, 5 min, 25 °C), foi removido 110 µL do sobrenadante, sendo adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) (Sigma-aldrich). As placas foram incubadas por 3 h em estufa de 5% de CO_2, a 37 °C, para redução do sal e formação dos cristais de formazan. Após o período de incubação, foi adicionado 100 µL de Dodecil sulfato de sódio (SDS; 10% HCL 0,01 N), para a solubilização dos cristais de formazan. As placas foram cobertas com um papel alumínio e deixadas *overnight* em um agitador. A absorbância foi medida em um leitor de placa, no comprimento de onda de 570 nm.

O experimento foi realizado em triplicata e a porcentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico da amostra testada: amostra sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).



Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo das cianobactérias dulcícolas isoladas do semiárido

Até o presente momento aproximadamente 700 cepas de microalgas tem sido isoladas das diferentes amostras coletadas em diferentes tipos de ambientes aquáticos e tesrrestres, sendo a região Nordeste majoritária em número de espécies, as quais foram codificadas e incorporadas ao Banco de Cultura de Microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB) e mantidas em meios sintéticos a 25º C ± 1º C e fotoperíodo de 12 horas.

Das cepas isoladas das amostras coletadas na região semiárida da Paraíba, 3 foram cultivadas em meio sintético e em condições laboratoriais controladas (25ºC ± 1º C, fotoperíodo de 12 horas) visando à produção de biomassa para análises posteriores.

Considerando-se os valores médios da constante de crescimento (*k*), observa-se que houve diferença entre as espécies, com valor máximo de 0,90 divisões/dia para a cepa D298WC e valor mínimo de 0,33 divisões/dia para a cepa D39Z, ambas com duração de fase exponencial de 4 dias. Porém o rendimento em biomassa total foi maior para D39Z (Tabela 6, página 81).

Tabela 6 - Constante de crescimento k (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g/L)

Código da cepa	**Procedência**	***k*** **(d^{-1})**	**Duração da fase Log (dias)**	**Biomassa (g/L)**
D39Z	Açude de Acauã, Itatuba-PB	0,33±0,12	4	0,63
D112Z	Açude da Quixaba, Frei Martinho-PB	0,71±0,45	6	0,60
D298WC	Rio da Boa Água, Conde-PB	0,90±0,11	4	0,49

Fonte: Autor.

A diferença nos dados da cinética de crescimento sugerem que embora cultivadas nas mesmas condições isso ocorre como reflexo das condições metabólicas e fisiológicas de cada linhagem.

Visando o cultivo em larga escala, este é um parâmetro importante, pois o cultivo da espécie escolhida deverá ser em tempo mais curto em equilíbrio com a elevada produtividade de biomassa e consequentemente elevada obtenção das moléculas de interesse.

5.2 Sequenciamento genético

Os produtos de PCR do fragmento 16S do DNAr (DNA ribossomal) sequenciados indicaram para a cepa D39Z similaridade de 97,48% com a sequência de *Arthrospira platensis* PCC 7345; para a cepa D112Z 91.91% com a sequência de *Stanieria cyanosphaera* PCC 7437; e para a cepa D298WC similaridade de 88.21% com a sequência de *Brasilonema terrestris* CENA116. O valor-E apresentado para o alinhamento de todas as cepas foi zero, o que significa que não foram alinhados ao acaso (Tabela 7).

Para identificar uma linhagem ao nível de espécie é necessário que o percentual de similaridade da sequência obtida e sequências do GenBank esteja entre 95% e 100%, e quando abaixo deste percentual, considera-se apenas o gênero.

Desta forma, o alinhamento das sequências das cepas analisadas nos permitiu identificar a nível de espécie a D39Z como *A. platensis*, e ao nível de gênero a D112Z como *Stanieria* sp. e a D298WC como *Brasilonema* sp.

Tabela 7 - Resultado do sequenciamento para as cepas D39Z, D112Z e D298WC

Cepas	Resultado de Blast (organismo mais próximo)	Identidade	Valor-E	Código de Acesso (GenBank)
D39Z	*Arthrospira platensis* PCC 7345	97.48%	0	NR_125711.1
D112Z	*Stanieria cyanosphaera* PCC 7437	91.91%	0	NR_102468.1
D298WC	*Brasilonema terrestre* CENA116	88.21%	0	NR_116034.1

Fonte: Autor.
Nota: Valor-E é o parâmetro de confiança do alinhamento.

Todavia, o alinhamento acima mencionado foi relizado no ano de 2019 e diferiu do alinhamento realizado em 2017, quando a similaridade das sequências obtidas para as mesmas cepas apresentou percentuais e alinhamento com sequências de linhagens diferentes. Onde a D39Z apresentou 99% de similaridade com *Arthrospira platensis*, a D112Z 99%% com *Synechococcus* sp. e a D298WC 100% com *Leptolyngbya boryana*.

Para uma caracterização e identificação de novas linhagens com melhor acurácea, é preciso que se faça uma abordagem polifásica, utilizando dados morfológicos, moleculares, ecológicos, ultra-estruturais, entre outros (JOHANSEN; CASAMATTA. 2005; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005; KOMÁREK, 2013;LI *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017).

A moderna caracterização das cianobactérias deve ser baseada e revisada de acordo com dados moleculares, em que o gene 16S rRNA tem sido comumente usado e comprovado para discriminar bem em o nível inter-genérico. (ŘEHÁKOVÁ *et al.*, 2014; KOMÁREK *et al.* 2014; DVOŘÁK *et al.*, 2015; JAHODÁŘOVÁ *et al.*, 2017). Porém, menos de um terço dos gêneros possuem dados da sequência do gene RNAr 16S para o *tipo* genérico (KOMÁREK *et al.* 2014).

Contudo, o gene 16S rRNA é muito conservado, e poucas variáveis posições foram detectadas, o que dificulta distinguir no nível intragenérico era difícil, já em no espaçador internamente transcrito entre o RNAr 16S e 23S, os genes rRNA (16S-23S ITS) e genes codificadores de proteínas existem regiões mais variáveis e podem separar espécies morfologicamente similares, bem como detectar espécies crípticas (COMTE *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017).

Com isso, percebe-se que a identificação taxonômica consiste em um dos problemas para o estudo de cianobactérias e atrelar irformações morfológicas e técnicas moleculares mais consistentes se faz necessário.

5.3 Descrição das espécies

Com base em análises morfológicas e após os dados da análise molecular, foi possível fazer algumas considerações taxonômicas das linhagens identificadas.

Cepa: D39Z

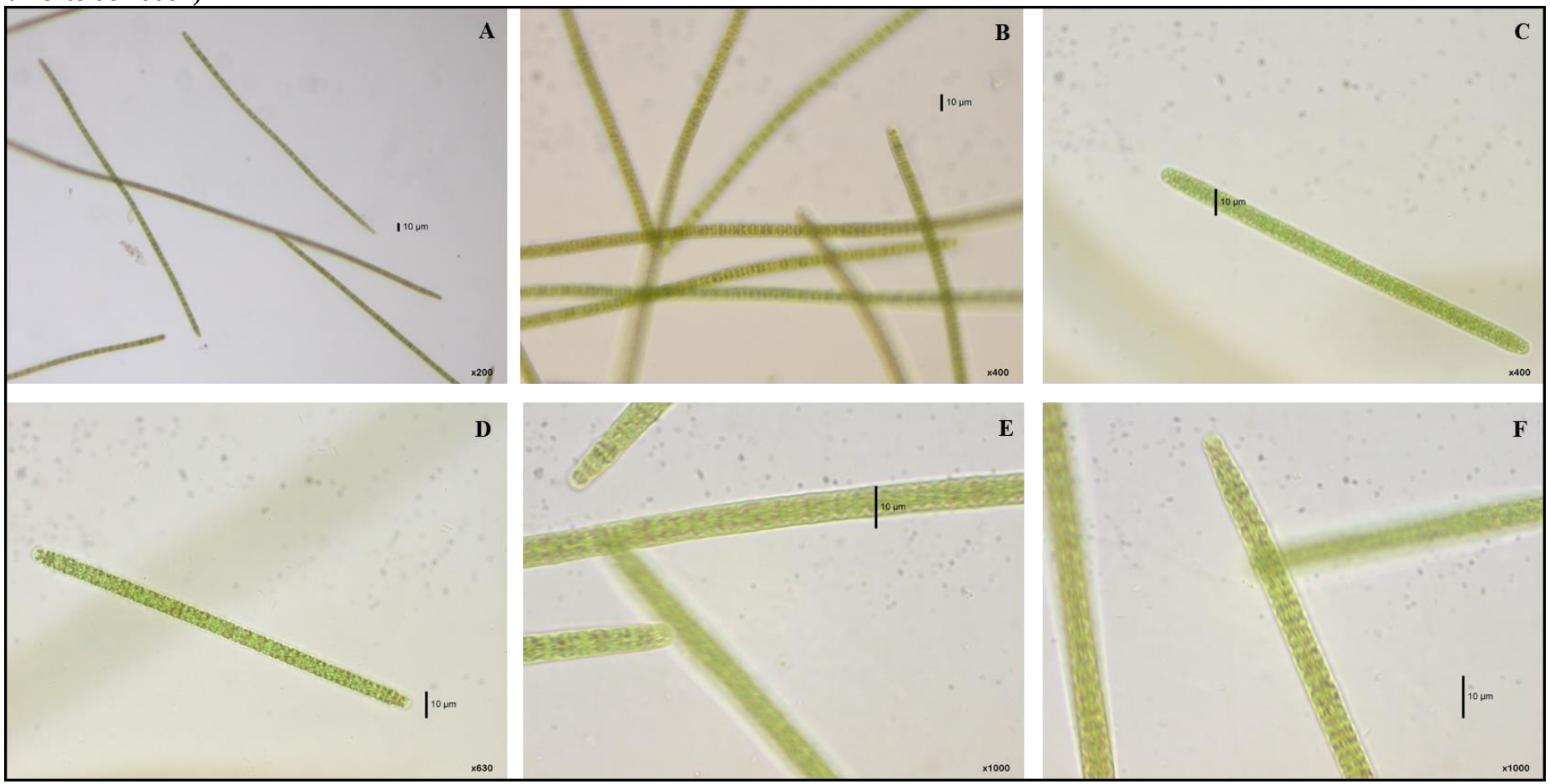
Espécie: *Arthrospira platensis* Gomont 1892

Ordem: Oscillatoriales

Família: Microcoleaceae

Considerações sobre a linhagem: apresenta filamentos solitários, livre-flutuantes, retos, ausência de bainha mucilaginosa e com movimento deslizante. As células são mais curtas que largas, quadráticas ou subquadráticas, com célula apical arredondada, sem caliptra. Aerótopos (vacúolos de gás que auxiliam na flutuação) encontram-se distribuidos por todo conteúdo celular, que é na cor verde oliva, verde acastanhado, verde-azulado ou castanho avermelhado. A parede celular apresenta-se conspícua, algumas vezes espessa (Figura 15, página 84). Pode ser encontrada em ambientes marinhos e de água doce.

Figura 15 – Fotografia microscópica da linhagem *A. platensis* (A – Aumento de 200x; B - Aumento de 400x; C, D - Aumento de 630x; E, F - Aumento de 1000x)



Fonte : Acervo do LARBIM/UFPB.

Cepa: D112Z

Espécie: *Stanieria* sp.

Ordem: Pleurocapsales

Família: Dermocarpellaceae

Considerações sobre a linhagem: apresenta células alongadas, retas, medindo de 2 a 3,5μm de comprimento por 1,2 a 2,4μm de largura; usualmente isoladas ou aos pares e raramente com 4 células juntas. Envelope mucilaginoso ausente e conteúdo celular verde azulado, homogêneo e sem aerótopos (vacúolos de gás que auxiliam na flutuação) (Figura 16, página 86).

O gênero *Stanieria* está entre os mais difíceis de identificar por meio da observação morfológica, o que realça a importância de estudos moleculares sobre essas linhagens (PRIHANTINI; SJAMSURIDZAL; YOKOTA, 2016). Variedades esféricas e moderadamente verde-azuladas geralmente não são atribuídos ao reino das cianobactérias. Devido a estes atributos, a posição de *Stanieria* na Divisão muda frequentemente (KOMAREK; ANAGNOSTIDIS, 1986).

Cepa: D298WC

Espécie: *Brasilonema* sp.

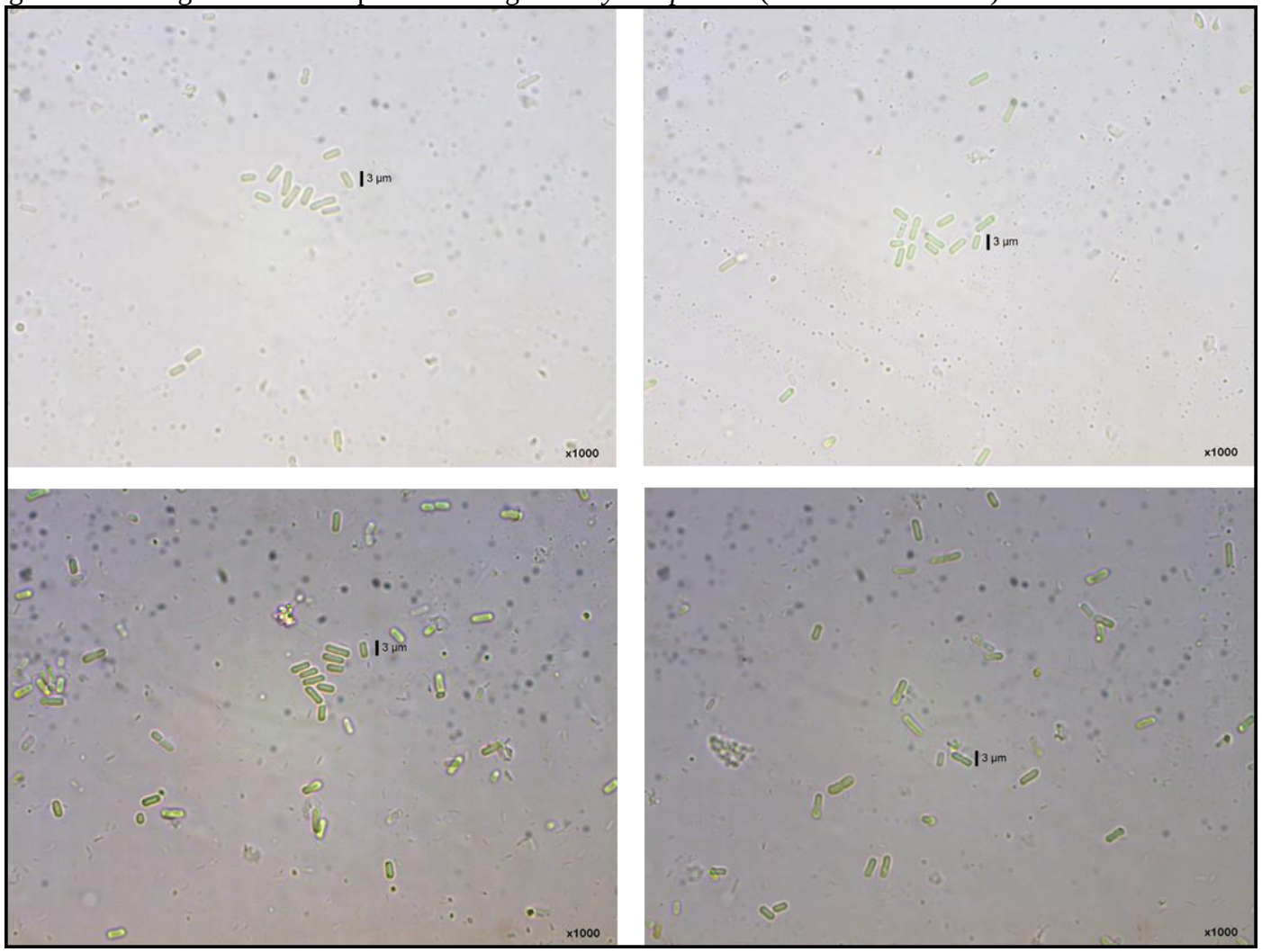
Ordem: Nostocales

Família: Scytonemataceae

Considerações sobre a linhagem: Apresenta talo macroscópico, filamentos longos formando tapete ou fasciculado, de cor azul-verde-acinzentado ou verde-escuro. Bainha fina, firme e ligeiramente ornamentada na superfície. As células, na largura, são mais curtas para as extremidades. Os heterocistos tem formato tipo cilíndrico. células terminais sem paredes celulares espessas ou caliptras (Figura 15, página 87).

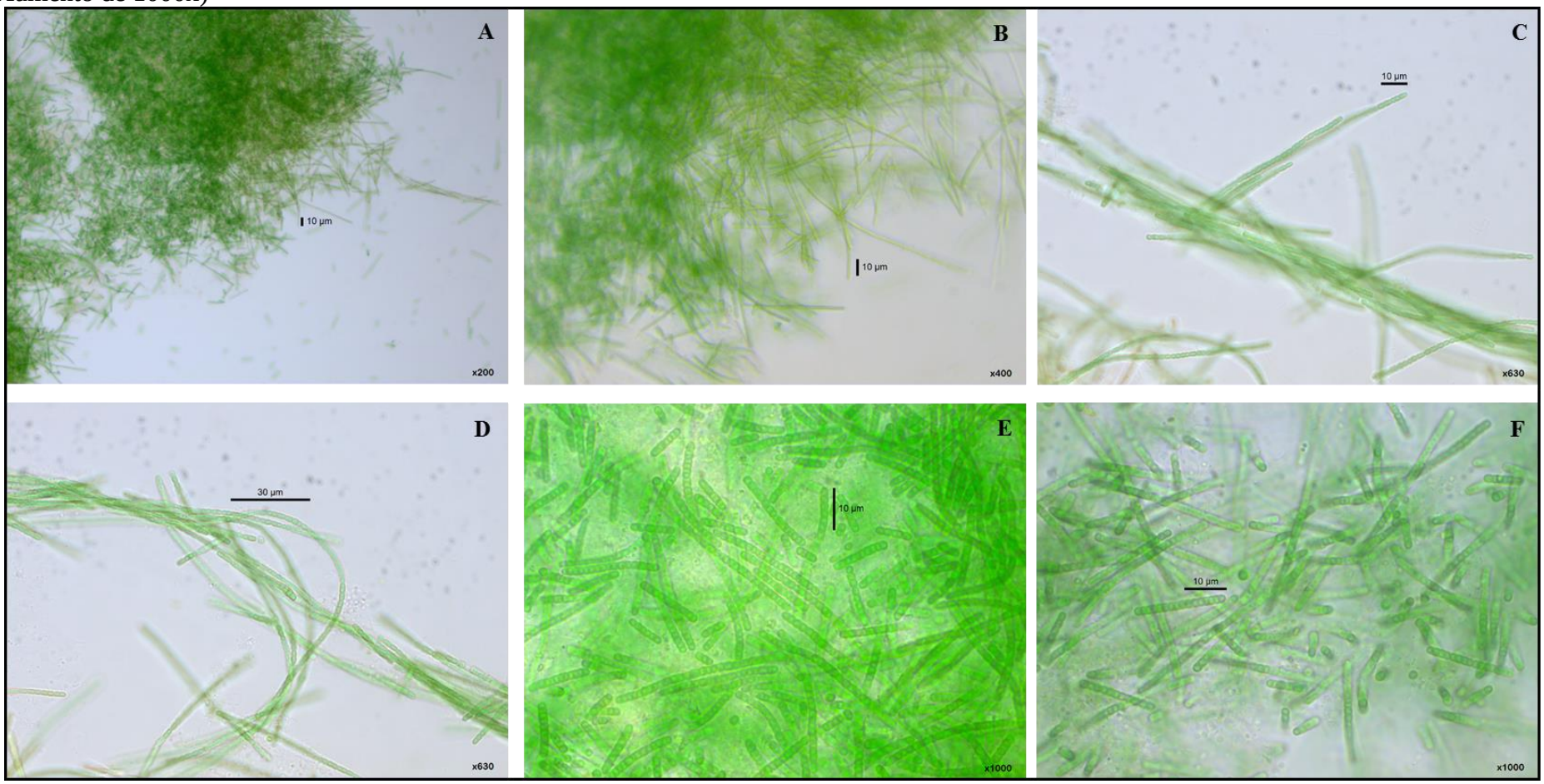
Segundo Sant'Anna *et al.*, (2011), o gênero *Brasilonema*, foi descrito recentemente e é conhecido principalmente de florestas tropicais e subtropicais da região sudeste do Brasil. Ocorre sobre substratos aerofíticos como madeira, pedra e ferro e foi definido de acordo com critérios moleculares e morfológicos.

Figura 16 – Fotografia microscópica da linhagem *S. cyanosphaera* (Aumento de 1000x)



Fonte : Acervo do LARBIM/UFPB.

Figura 17 – Fotografia microscópica da linhagem *Brasilonema* sp. (A – Aumento de 200x; B - Aumento de 400x; C, D- Aumento de 630x; E, F - Aumento de 1000x)



Fonte : Acervo do LARBIM/UFPB.

5.4 Análise de cianotoxina

Os valores obtidos na análise da presença de cianotoxina foram inferiores ao limite mínimo de detecção do Kit Abraxis® para as linhagens de cianobactérias estudadas, ou seja, não detectou-se a presença de microcistina (Tabela 8, página 88). Todavia, não se pode afirmar que essas cepas estejam isentas de toxicidade, pois outros tipos de cianotoxinas não foram avaliados.

Tabela 8 – Presença de microcistina (µg.mg^{-1} de biomassa seca) nas linhagens de cinaobactérias estudadas

Linhagens	Presença de Microcistina
Arthrospira platensis (D39Z)	ND
Stanieria sp. (D112Z)	ND
Brasilonema sp. (D298WC)	ND

Fonte: Autor

Para a linhagem *A. platensis*, esse achado corrobora com a literatura, tendo em vista que esta linhagem é indicada como suplemento não-tóxico e tem sido declarada como instrumento humanitário no combate à grave desnutrição pela Organização Mundial de Saúde (IIMSAM, 2019) em função do seu valor nutritivo e significativo potencial como um ingrediente funcional nos produtos nutracêuticos e farmacêuticos (CASTRO *et al*. 2019).

As cianotoxinas em reservatórios de abastecimentos e para recreação constituem um perigo para a saúde humana e animal devido aos seus efeitos. Elas são metabólitos secundários produzidos por cianobactérias, destes as microcistinas, ciantoxinas hepatotóxicas ocorrem com mais frequência em reservatórios de água usada para abastecimento. Microcistinas são heptapeptideos cíclicos que partilham uma estrutura geral, contendo cinco aminoácidos fixos e duas variáveis de L-aminoácidos (SIVONEN; JONES, 1999).

5.5 Composição bioquímica

A análise da composição bioquímica se refere aqui aos teores de proteínas, carboidratos e lipídeos (Tabela 9, página 89) oriundos do metabolismo primário das cianobactérias quando cultivadas em condições controladas e /ou ideais de cultivo (fotoperíodo constante de 12 horas e temperatura de 25 ºC ± 1 ºC). O maior teor de proteínas hidrossolúveis foi apresentado pela linhagem *Stanieria* sp., mas foi a linhagem *Brasilonema* sp. que apresentou os maiores teores de carboidratos e lipídeos totais. A D39Z apresentou os menores teores nas três análises (Tabela 9, página 89).

Tabela 9 - Teores de proteínas, carboidratos e lipídeos da biomassa das linhagens de ciabobactérias estudadas (D39Z – *A. platensis*, D112Z – *Stanieria* sp. e D298WC – *Brasilonema* sp.)

CEPA	Proteínas hidrossolúveis (%)	Carboidratos Totais (%)	Lipídeos Totais (%)
D39Z	23,3±1,20	8,27±0,68	6,00±3,31
D112Z	36,7±0,50	13,3±1,55	6,00±0,00
D298WC	36,0±1,57	17,4±2,35	14,00±1,09

Fonte: Autor.

Apesar de ter sido baixo o teor de lipídeos totais para D39Z (6,00±3,31), este dado está próximo do que foi obtido por Mata *et al*., (2016) quando realizou cultivo autotrófico da linhagem em cultivo autotrófico *A. platensis*, apresentando 7,1±0.3% de teor de lipídeos totais.

E fazendo uma comparação dos dados obtidos para D39Z com dados citados na literatura, os teores apresentados por *A. platensis*, exibem este mesmo perfil, onde o maior percentual é de proteína seguido pelo de carboidratos, além de lípidos, ficobiliproteínas, carotenóides, vitaminas e minerais. Esta composição bioquímica faz esta linhagem ser um dos procariontes fotossintéticos mais cultivados (MASOJIDEK; TORZILLO, 2014).

A literatura reporta que quando em condições de estresse no cultico de microalgas é possível induzir a produção aumentando assim o teor da molécula de interesse da composição bioquímica, pois esta depende da espécie, do sistema de cultivo utilizado, da temperatura, da luminosidade, da salinidade, do pH e das formulações dos meios de cultura (BROWN *et al.,* 1997; MIAO; WU, 2004; CARDOSO *et al.,* 2011).

5.6 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos

A análise de cromatografia gasosa do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs) das três espécies em estudo (D39Z, D112Z e D298WC) permitiu identificar e quantificar 18 (dezoito) ácidos graxos distintos (saturados, insaturados e poli-insaturados) (Tabela 10, página 90; Figura 18, página 91), sendo 5 (cinco) destes presentes nas três linhagens em concentrações variadas (ácido palmítico, palmitoleico, oleico, linoleico e γ-linoleico). O ácido palmítico apresenta-se como majoritário para as três espécies, o que parece ser comum para cianobactérias (PROTOOMYOT *et al.*, 2005).

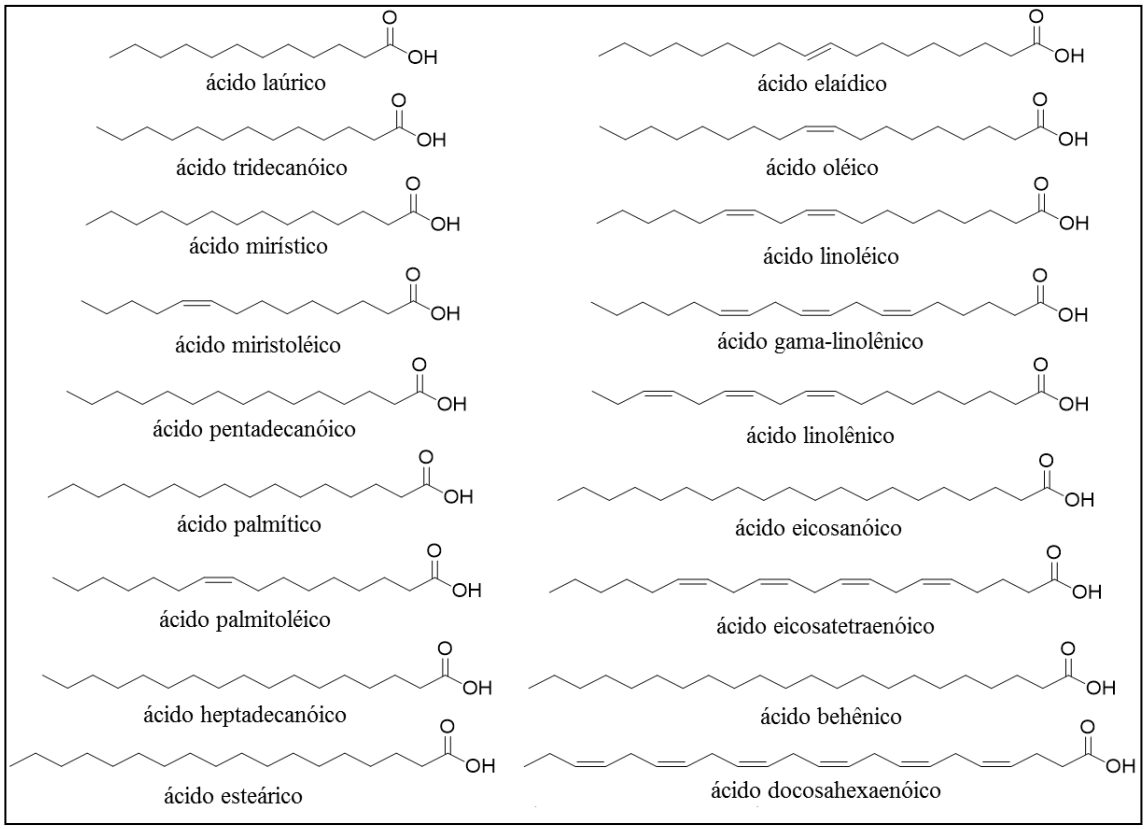
A linhagem D112Z apresentou a maiorr variação em ácidos graxos. A linhagem D39Z apresentou o ácido palmítico (34,5%), o linoleico (30,1%) e o γ-linoleico (18,1%) como substâncias majoritárias. Já a D112Z mostrou o ácido palmítico (31,7%), o linoleico (16,4%) e o palmitoleico (14,8%) majoritariamente, enquanto a D298WC apresentou os mesmos ácidos graxos que a D112Z, variando as concentrações para 29,3%, 27,0% e 23,3%, respectivamente (Tabela 10, página 90).

Tabela 10 - Percentual relativo dos FAMEs identificados nas espécies de ciabobactérias estudadas (D39Z – *A. platensis*, D112Z – *Stanieria* sp. e D298WC – *Brasilonema* sp.)

FAMEs	D39Z	D112Z	D298WC
C12:0 Laúrico	---	0,7	1,1
C13:0 Tridecanóico	---	---	1,1
C14:0 Mirístico	---	2,1	1,1
C14:1 Miristoléico	---	---	1,0
C15:1 Pentadecanóico	---	0,6	---
C16:0 Palmítico	34,5	31,7	29,3
C16:1 c9 Palmitoléico	6,0	14,8	23,3
C17:1 c9 Heptadecanóico	---	1,2	---
C18:0 Esteárico	1,9	2,9	---
C18:1n9t Elaidico	---	2,7	2,8
C18:1 c9 Oléico	7,7	8,1	5,7
C18:2 c9,12 Linoléico	30,1	16,4	27,0
C18:3 c6,9,12 Gama Linolênico	18,1	1,2	5,7
C18:3 c9,12,15 Linolênico	1,7	9,5	---
C20:1 c11 Eicosanóico	---	1,6	---
C20:4 n6 c5,8,11,14 eicosatetraenóico	---	1,8	---
C22:0 Behênico	---	2,6	---
C22:6 c4,7,10,13,16,19-Docosahexaenóico	---	2,0	---

Fonte: Autor.

Figura 18 - Estruturas dos ésteres metílicos de ácidos graxos



Fonte: Autor.

O perfil de ácidos graxos é usado como uma efetiva ferramenta taxonômica para muitas espécies de cianobactérias (KRUGER *et al*., 1995; LI; WATANABE, 2004; RAJESHWARI; RAJASHEKHAR, 2011). No entanto Taipale et al. (2013), sugere que isso deve ser visto com ressalvas, indicando que mais pesquisas são necessárias a este respeito. No tocante as linhagens D112Z e D298WC que tem sua identificação taxonômica complexa, este é um dado que poderá contribuir para tanto, além de serem relatos inéditos da composição bioquímica destas linhagens.

Ressalta-se também a produção de ácidos graxos ω-3 (ácido linolênico e ácido docosahexaenóico (DHA)), ω-6 (ácido linoleico, ácido gama-linolênico e ácido eicosatetraenóico) e ω-9 (ácido elaidico e ácido oléico).

O ácido linoleico (ω-6) e o ácido α-linolênico (ω-3) são ácidos graxos essenciais, uma vez que não pode ser sintetizados por seres humanos ou outros animais superiores. No corpo humano, esses ácidos graxos dão origem ao ácido eicosatetraenóico\ ácido araquidônico (AA - ω-6), ácido eicosapentaenóico (EPA, ω-3) e ácido docosahexaenóico (DHA, ω-3) que desempenham papéis importantes na regulação

homeostase corporal. Os lipídios de sinalização bioativos de ação local chamados eicosanóides derivados desses ácidos graxos também regulam diversos processos homeostáticos. Em geral, o AA dá origem a eicosanóides pró-inflamatórios, ao passo que o EPA e o DHA dão origem a eicosanóides antiinflamatórios (CALDER, 2001; PONTES-ARRUDA, 2006; SINGER *et al*., 2008, SAINI; KEUM, 2018).

Os ácidos graxos ômega-9 geralmente vêm de óleos vegetais e gordura animal e muitas vezes não são considerados essenciais porque muitos animais podem construir essas gorduras a partir de gordura insaturada (KOUTSOS *et al*., 2016).

O ácido gama linolênico (GLA, ω-6) encontrado em *S. platensis* e *Arthrospira* sp. é medicamente importante, uma vez que é convertido no corpo humano em ácido araquidionico e depois em prostaglandina E2. Este composto tem uma ação redutora sobre a pressão arterial e desempenha um papel importante no metabolismo lipídico. (ABED *et al.,* 2009).

Um estudo realizado por Langlois et al., (2018), demonstrou que os ácidos graxos poliinssaturados ômega-3, em particular quando são fornecidas em associação com gama linolênico (GLA) e antioxidantes como infusão contínua, estão associados com uma melhoria significativa na troca gasosa em pacientes com síndrome da dificuldade respiratória aguda (SDRA), caracterizada por uma aguda resposta inflamatória no parênquima pulmonar grave levando à hipóxia.

Estes dados reforçam a possibilidade do uso de cianobactérias no setor produtivo das diversas áreas, desde a alimentação/nutrição humana, saúde animal e humana, obtenção de energia, tratamento de águas e obtenção de compostos químicos e/ou bioativos para a indústria alimentícia, químico-farmacêutica, ente outras (RICHMOND, 2004; ADARME-VEGA *et al.,* 2012). A produção destes ácidos graxos, principalmente os essenciais, coloca as linhagens estudadas como alternativas para aplicações biotecnológicas.

5.7 Teor de fenólicos extratíveis totais

O teor de fenólicos totais das cianobactérias estudadas foi determinado com o objetivo de identificar uma fonte natural de compostos fenólicos. As amostras D112Z e D298WC apresentaram os maiores teores de comostos fenólicos, não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 11, página 93).

Tabela 11 – Teor de fenólicos extraíveis totais para as espécies estudadas

Cepa	Fenólicos (mg Ác Gál/g) Média±DP
D39Z	20,19b±0,10
D112Z	33,35a±0,05
D298WC	34,19a±0,95
p-value	9,59E-06

Fonte: Autor.

Nota: Valores expressos em média e desvio padrão. Na coluna, médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (ANOVA e Teste de Tukey, $p \geq 0,05$).

O benefícios antioxidantes de compostos fenólicos de plantas têm sido estabelecidos e explorados, todavia os compostos fenólicos de cianobactérias ainda são um campo de pesquisa emergente. Ampliar os estudos nessa área seria um benefício para as ciências alimentícias e farmacêuticas para explorar compostos fenólicos incomuns e potentes desses microorganismos (SAADIA; HASNAIN, 2016).

5.8 Determinação da capacidade antioxidante

O ensaio com DPPH não apresentou atividade para a D112Z e foi mais elevado para a D39Z (79,33±013) que para a D298WC (45,62±2,33), diferindo estatisticamente entre si. Já com para o ensaio de ABTS as melhores capacidades antioxidantes foram obtidas nas espécies D39Z (18,16±0,26) e D112Z(10,27±0,69). E para o potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP), a maior capacidade antioxidante total foi para a D39Z (16,14±0,18) (Tabela 12, página 94).

Para avaliar a capacidade antioxidante das amostras, a combinação de diferentes métodos é fortemente recomendada devido às suas diferentes características e aos mecanismos de reação (ČIŽ *et al*,. 2010).

Segundo Hajimahmoodi *et al.*, (2010), espera-se que usando métodos FRAP e DPPH, estes reflitam, com precisão todos os antioxidantes em uma amostra. Ao contrário do ensaio DPPH, o ensaio FRAP não pode detectar compostos que atuam como inibidores radicais por transferência de átomos de hidrogênio, uma vez que é baseado na redução de metais e deve detectar principalmente a atividade antioxidante dos polifenóis (GOIRIS *et al*,. 2012).

Tabela 12 - Determinação da capacidade antioxidante nos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP para os extratos metanólicos das espécies de cianobactérias estudadas

Cepa	DPPH (µmol Tx/g)Média±DP	ABTS (µmol Tx/g)Média±DP	FRAP (µmol SF/g)Média±DP
D39Z	79,33a±013	18,16a±0,26	16,14a±0,18
D112Z	---	10,27a±0,69	10,44b±0,11
D298WC	45,62b± 2,33	5,19b±0,35	6,25c±0,09
p-value	0,00144	0,00042	1,95E-08

Fonte: Autor.
Nota: µmol Tx/g = milimol de trolox por grama do extrato.
µmol SF/g = milimol de sulfato ferroso por grama do extrato
Valores expressos em média e desvio padrão. Nas colunas, médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (ANOVA e Teste de Tukey, $p \geq 0,05$).

Os fitonutrientes e pigmentos presente em cianobactérias agem como antioxidantes. A atividade antioxidante das cianobactérias é uma co-reponsabilidade de pigmentos como as ficobiliproteínas, carotenos, compostos fenólicos e outras substâncias presente nas células (RAJISHAMOL et al., 2016; GEETHU e SHAMINA, 2018). Sendo assim, esses microrganismos podem ser utilizados como fonte de compostos bioativos úteis, quando explorados em sua abundância.

5.9 Antimicrobiana dos extratos brutos

Os resultados para avaliação da atividade biológica dos quatro produtos estão registrados na tabela 13 (página 95). O extrato da linhagem D39Z, na concentração entre 512-1024 µg/mL inibiu o crescimento de 6 das 8 cepas (75%) dos micro-organismos, incluindo bactérias e fungos. Os extratos das linhagens D112Z e D298WC apresentaram atividade inibitória sobre três das seis cepas dos micro-organismos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana.

Tabela 13 - Resultados da avaliação da CIM (µg/mL) de quatro produtos-algas sobre bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos- Técnica de microdiluição

Produtos (µg/mL)	*Staphylococcus aureus* ATCC-25923	*Staphylococcus aureus* M-177	*Candida albicans* ATCC-90028	*Candida albicans* LM-108	*Candida parapsilosis* ATCC-22019	*Candida parapsilosis* LM-302	*Aspergillus fumigatus* ATCC-40640	*Aspergillu fumigatus* IPP-210
D112Z	+	**1024**	+	**1024**	+	+	**512**	+
D298WC	+	**1024**	+	+	**512**	+	+	**512**
D39Z	+	**1024**	**1024**	**1024**	**1024**	**512**	+	**512**
Microorganismo	+	+	+	+	+	+	+	+
Caldo RPMI	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol/50 µg/mL	+	+	-	-	-	-	-	-
Nistatina/100	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluconazol/50µg/mL	-	-	-	-	-	-	+	+

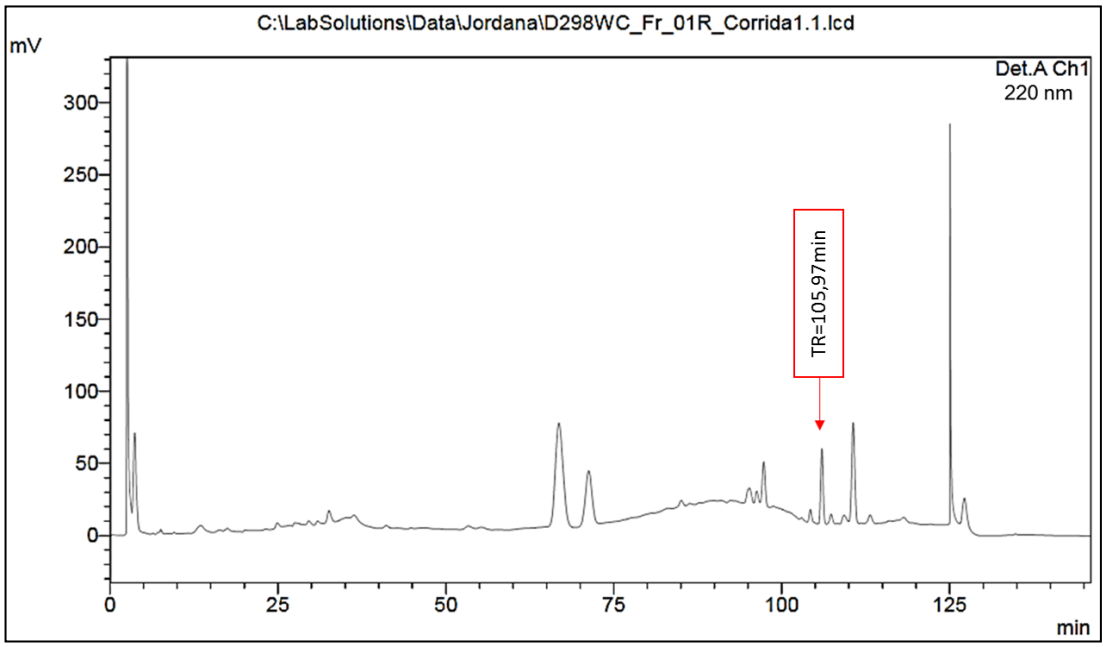
(-): Não houve crescimento do microorganismo (+): Crescimento do micro-organismo

Dessa forma, os resultados da atividade biológica dos extratos na concentração de 500 a 1024 µg/mL, frente às cepas de bactérias, leveduras e de fungos filamentosos mostraram-se com moderada atividade conforme os critérios adotados por Sartoratto *et al.* (2004) Houghton *et al.* (2007).

5.10 Caracterização estrutural de Bs-1

A substância codificada como Bs-1 apresentou-se na forma de um sólido amorfo verde escuro (1,2mg) e foi isolada após processo cromatográfico (CLAE) (Figura 19 – Pico 12, página 96) a partir da fração R1 de *Brasilonema* sp. (D298WC).

Figura 19 – Cromatograma da fração R1



Fonte: Autor

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) (Figura 21, página 104) e suas expansões (Figuras 21 a 27, página 105 a 111) exibiram absorções que levaram a sugerir que a substância possuía um macrociclo porfirínico. Esta sugestão foi fortalecida pelos sinais observados em δ_H 3,44 (CH_3 – 2'), 3,28 (CH_3 – 7'), 3,55 (CH_3 – 12') e 1,73 (CH_3 – 18') (Figura 21, página 105), correspondendo às metilas dos aneis I, II, III e IV do núcleo porfirínico, respectivamente (Tabela 14, páginas 99 a 102).

Os sinais em δ_H 1,73 (H – 18) e δ_H 1,73 (H – 17) (Figura 22, página 106) demonstraram que o macrociclo porfirínico possuía uma das ligações *β*-pirrólicas reduzida, fazendo com que os dois carbonos do anel IV apresentassem hibridização sp^3 (MILGROM, 1997; SMITH, 1975). Assim, levando a sugerir que a substância poderia tratar-se de um derivado reduzido porfirínico: a clorina.

Ainda analisando o espectro de RMN de ^1H e suas expansões, observou-se sinais para hidrogênios vinílicos em δ_H 8,05 (d,d *J*=1,2, *J*=1,2, 18,0, H – 3'), δ_H 6,10 (d,d *J*=1,2, *J*=11,6, H – 3''*α*) e δ_H 6,30 (d,d *J*=1,2, 18,0, H – 3''*β*) (Figuras 24 e 27, página

108 e 111). As atribuições dos acoplamentos *trans*, *cis* e geminados não puderam ser calculados devido a ausência de multiplicidade, assim, os deslocamentos foram atribuídos por comparação com dados da literatura (SCHEER; KATZ; 1975). Foram ainda evidenciados sinais para três hidrogênios olefínicos em δ_H 9,54, δ_H 9,67 e δ_H 8,71 (Figura 27, página 111) condizentes com os hidrogênios H – 5, H – 10 e H – 20, respectivamente, do núcleo porfirínico (FERNANDES *et al.,* 2013).

Outros três singletos largos foram observados em δ_H 4,23, δ_H 3,74 e δ_H 3,60 (Figura 23, página 106), com integrais para três hidrogênios e características de metoxilas. Assim, após comparação com dados da literatura, foi possível atribuir os valores aos hidrogênios 13'', 15''' e 17'''', inferindo que a substância poderia se tratar de um éster trimetílico da clorina (SCHEER; KATZ; 1975). O deslocamento em δ_H -1,49 pode ser atribuído as ligações N – H dos aneis I e II da estrutura.

As atribuições dos valores de ^{13}C foram realizadas a partir dos espectros bidimensionais heteronucleares de HSQC (Figura 28, página 112), HMBC (Figura 34, página 118) e suas expansões (Figuras 28 a 33, página 112 a 122).

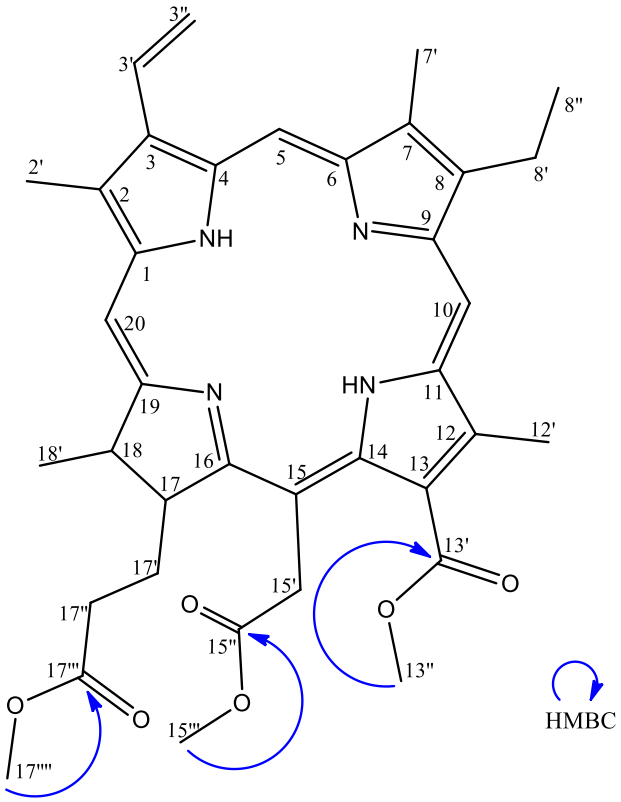
Assim, a proposta foi fortalecida pela identificação de 36 sinais equivalentes a 37 átomos de carbonos e comparados com dados da literatura (Tabela 14, página 99 a 102) (SANTOS, 2013), sendo atribuídos 18 para carbonos não hidrogenados, 6 metínicos, entre os quais um vinílico em δ_C 129,3 (C – 3'), 5 metilênicos, com destaque para um carbono vinílico em δ_C 121,5 (C – 3'') e 8 metílicos, destacando-se três sinais típicos de metoxilas de ésteres em δ_C 53,3 (C – 13''), 52,32 (C – 15''') e 51,71 (C – 17'''').

O espectro de HSQC (Figura 28, página 112) e suas expansões (Figuras 29 a 33, página 113 a 117) demonstraram correlações diretas entre hidrogênios e carbonos, destacando-se as correlações entre H – 3'(δ_H 8,05) com o C – 3' (δ_C 129,36) H – 3''(δ_H 6,10) com o C – 3'' (δ_C 121,56) do grupo vinílico (Figura 32, página 116).

O espectro de HMBC (Figura 34, página 118) e suas expansões (Figura 35 a 38, página 119 a 122) confirmaram a presença de ésteres metílicos por meio das correlações entre H – 17''''(δ_H 3,60) a ^3J com C-17''', H – 15'''(δ_H 3,74) a ^3J com C-15'' e H – 13''(δ_H 4,23) a ^3J com C-13' (Figuras 32, 33, 36). As correlações em H – 17' (δ_H 1,23) a ^2J com C-17 (δ_C 53,24) e H – 15' (δ_H 5,23) a ^2J com C-15 (δ_C 135,84) (Figuras 34 e 38, página 118 e 122) confirmam a inserção das cadeias com ésteres metílicos ligados ao núcleo da clorina.

Desta forma, após comparação com dados obtidos com a literatura (Tabela 14, páginas 99 a 102) constatou-se que a substância Bs-1 tratava-se de um derivado reduzido porfirínico (Figura 39, página 98), o éster trimetílico da clorina-e6 (metil 12-etenil-7-etil-20-(2-metoxi-2-oxoetil)-18-(3-metoxi-3 oxopropil)-3,8,13,17 tetrametil-17,18,22,23-tetrahidroporfirin-2-carboxilato)), isolado pela primeira vez para a cianobactéria *Brasilonema* sp.

Figura 39 – Forma estrutural do éster trimetílico da clorina e6

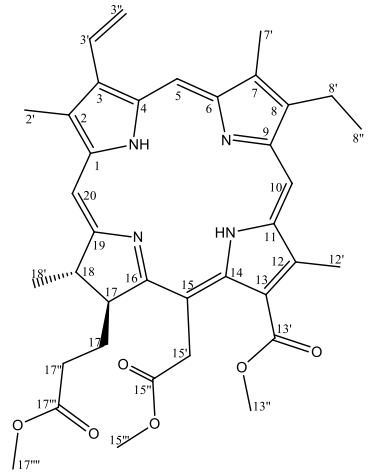


Metil 12-etenil-7-etil-20- (2-metoxi-2-oxoetil)-18-(3-metoxi-3 oxopropil)-3,8,13,17 tetrametil-17,18,22,23-tetrahidroporfirin-2-carboxilato
(éster trimetílico da clorina e6)

Fonte: Autor

Tabela 14 - Dados de RMN ¹H, HSQC e HMBC de Bs-1 (δ, CDCl3, 400 MHz) em comparação com dados de Santos (2013)

(continua)



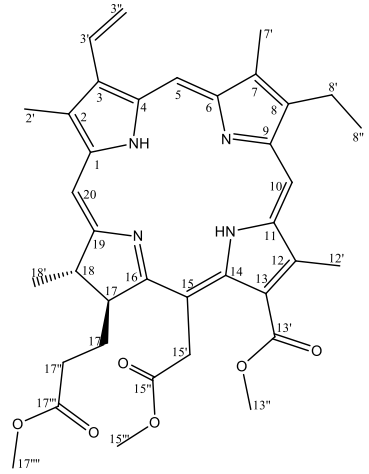
Bs-1				**Literatura ($CDCl_3$, 400 MHz)**		
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$
1	139,25**	---	3,45	139,6	---	3,46; 8,73
2	130,47**	---	3,45	130,7	---	8,73; 3,46; 8,05
2’	12,28*	3,44 (s)	---	12,3	3,46	---
3	134,77**	---	3,45	134,9	---	9,55; 6,13; 3,46
3’	129,36	8,05 (dd, 11,6, 18,0)	---	129,5	8,05	6,13; 6,34
3’’$^{\alpha}$	121,56*	6,10 (dd, 1,2, 11,6)	---	121,9	6,13	---
3”$^{\beta}$	121,56*	6,35 (dd, 1,2, 18,0)	---	121,9	6,34	---
4	136,33**	---	3,55	136,1	---	9,55; 8,05
5	98,71*	9,54	---	98,8	9,55	---
6	154,75**	---	3,28	155,0	---	9,55; 3,29
7	136,33**	---	3,55	136,1	---	9,55; 3,78; 3,29
7’	11,82*	3,28(s)	---	11,5	3,29	---

Fonte: Autor.

Nota: *Valores obtidos por HSQC; ** Valores Obtidos por HMBC

Tabela 14- Dados de RMN ¹H, HSQC e HMBC de Bs-1 (δ, $CDCl_3$, 400 MHz) em comparação com dados de Santos (2013)

(continuação)



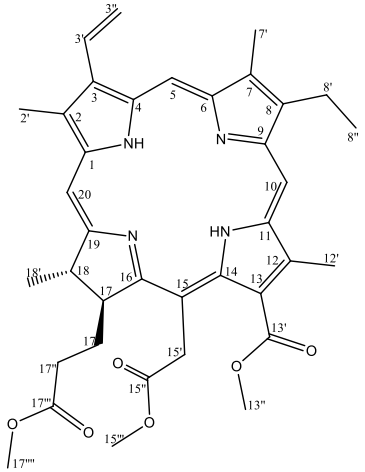
	Bs-1			Literatura ($CDCl_3$, 400 MHz)		
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$
8	145,00**	---	3,28	145,2	---	9,68; 3,78; 3,29; 1,69-1,78
8’	19,88*	3,73	---	19,8	3,78	1,69-1,78
8’’	17,84*	1,68(s)	---	17,81	1,69-1,78	3,78
9	147,40**	---	1,26	149,1	---	3,78; 3,29
10	102,16*	9,67(s)	---	102,3	9,68	---
11	136,59**	---	3,55	136,6	---	9,68; 3,57
12	129,24**	---	3,55	129,5	---	9,68; 3,57
12’	12,77*	3,55	---	12,5	3,57	---
13	123,32**	---	3,55	123,5	---	3,57
13’	169,57**	---	4,23	169,7	---	3,57; 4,40
13’’	53,36*	4,23	---	53,2	4,40	---
14	135,84**	---	5,23	135,5	---	5,23; 5,34

Fonte: Autor.

Nota: *Valores obtidos por HSQC; ** Valores Obtidos por HMBC

Tabela 14- Dados de RMN ^{1}H, HSQC e HMBC de Bs-1 (δ, $CDCl_3$, 400 MHz) em comparação com dados de Santos (2013)

(continuação)



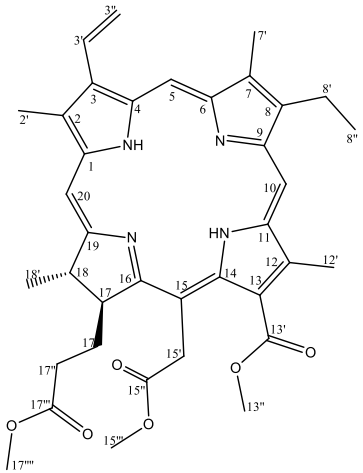
	Bs-1			Literatura ($CDCl_3$, 400 MHz)		
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$
15	135,84**	---	5,23	135,5	---	5,23; 5,34
15’	38,41*	5,23	---	38,7	5,23; 5,34	---
15’’	175,15**	---	3,60	173,2	---	5,23; 5,34; 3,76
15’’’	52,32*	3,74	---	52,2	3,76	3,76
16	169,47**	---	1,73	167,0	---	5,23; 5,34; 4,38-4,46
17	53,34**	---	1,73	53,1	4,38-4,46	4,38-4,46;1,69-1,78
17’	29,59*	1,23	---	29,7		4,38-4,46; 2,14-2,23
17’’	31,51*	1,23	---	31,2	1,69-1,78	---
17’’’	173,55**	---	3,60	173,7	---	3,62; 2,14-2,23; 2,51-2,60; 1,69-1,78
17’’’’	51,71*	3,60	---	51,8	3,62	---

Fonte: Autor.

Nota: *Valores obtidos por HSQC; ** Valores Obtidos por HMBC

Tabela 14- Dados de RMN ^{1}H, HSQC e HMBC de Bs-1 (δ, $CDCl_3$, 400 MHz) em comparação com dados de Santos (2013)

(conclusão)



	Bs-1			Literatura ($CDCl_3$, 400 MHz)		
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$
18	53,34*	1,73	---	49,5	4,38-4,46	8,73; 1,69-1,78
18’	23,06*	1,73	---	23,1	1,69-1,78	4,38-4,46
19	145,08**	---	1,69	169,6	---	1,69-1,78; 4,38-4,46
20	93,62*	8,71	---	93,7	8,73	---
N21	---	-1,49	---	---	---	-1,47
N23	---	---	---	---	---	-1,30

*Valores obtidos por HSQC; ** Valores Obtidos por HMBC

Fonte: Autor.

O éster trimetílico da clorina-e6 membro da família das clorinas, pertencente à classe de substâncias tetrapirrólicos derivados da clorofila-a, é considerada um promissor fotossensibilizador utilizado em terapia fotodinâmica antimicrobiana e tem sido testado contra *Propionibacterium acnes* (ANNUNZIO *et al.*, 2017).

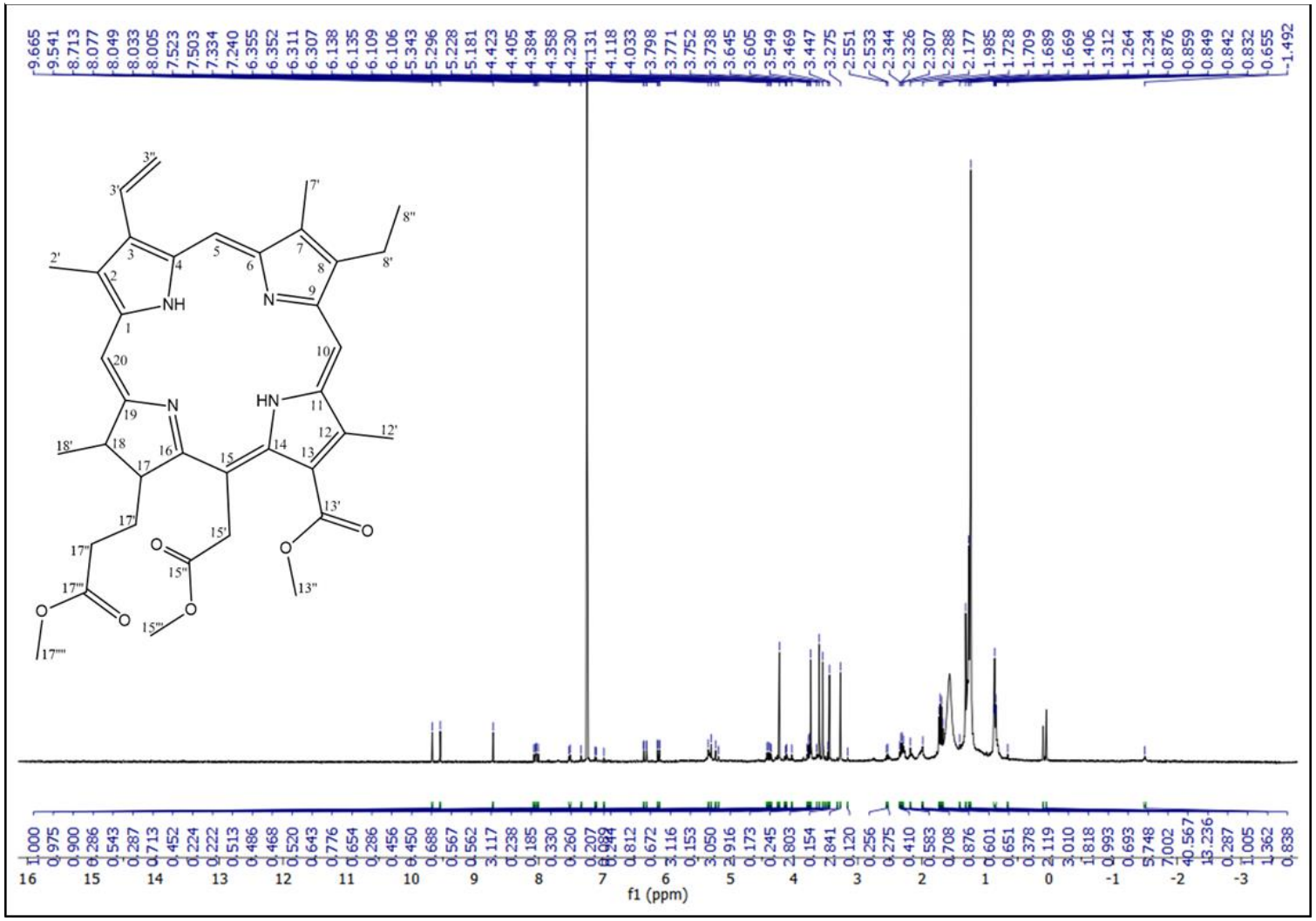
Cunha e Ribeiro (2009) realizaram síntese e caracterização da clorina-e6, extraída a partir da cianobactéria *Spirulina maxima* para realização de testes comparativos de eficiência com o Photodithazine®, uma droga em fase final de testes para aplicação em terapia fotodinâmica.

Segundo Maestrin *et al.* (2009) a clorofila-a tem rendimento de até 2% do peso seco das cianobactérias *Spirulina pacifica* ou *S. máxima,* o que torna este pigmento um ótimo material de partida e acessível para desenvolvimento de novos fotossensibilizadores.

As clorinas e bacterioclorinas, derivados de porfirinas reduzidas, enquadram-se como fotossensibilizador de 2ª geração. Estas substâncias que apresentam algumas propriedades fotofísicas desejáveis, como é o caso das clorinas com uma banda de absorção intensa entre 660 e 690 nm e apresentam grande aptidão para se localizarem rapidamente nas células neoplásicas (CALVETE *et al.*, 2009). O que infere que o uso de fotossensibilizadores que absorvam a um comprimento de onda mais longo originaria uma superior penetração da luz, assim como um maior efeito terapêutico (CUNHA; RIBEIRO, 2009).

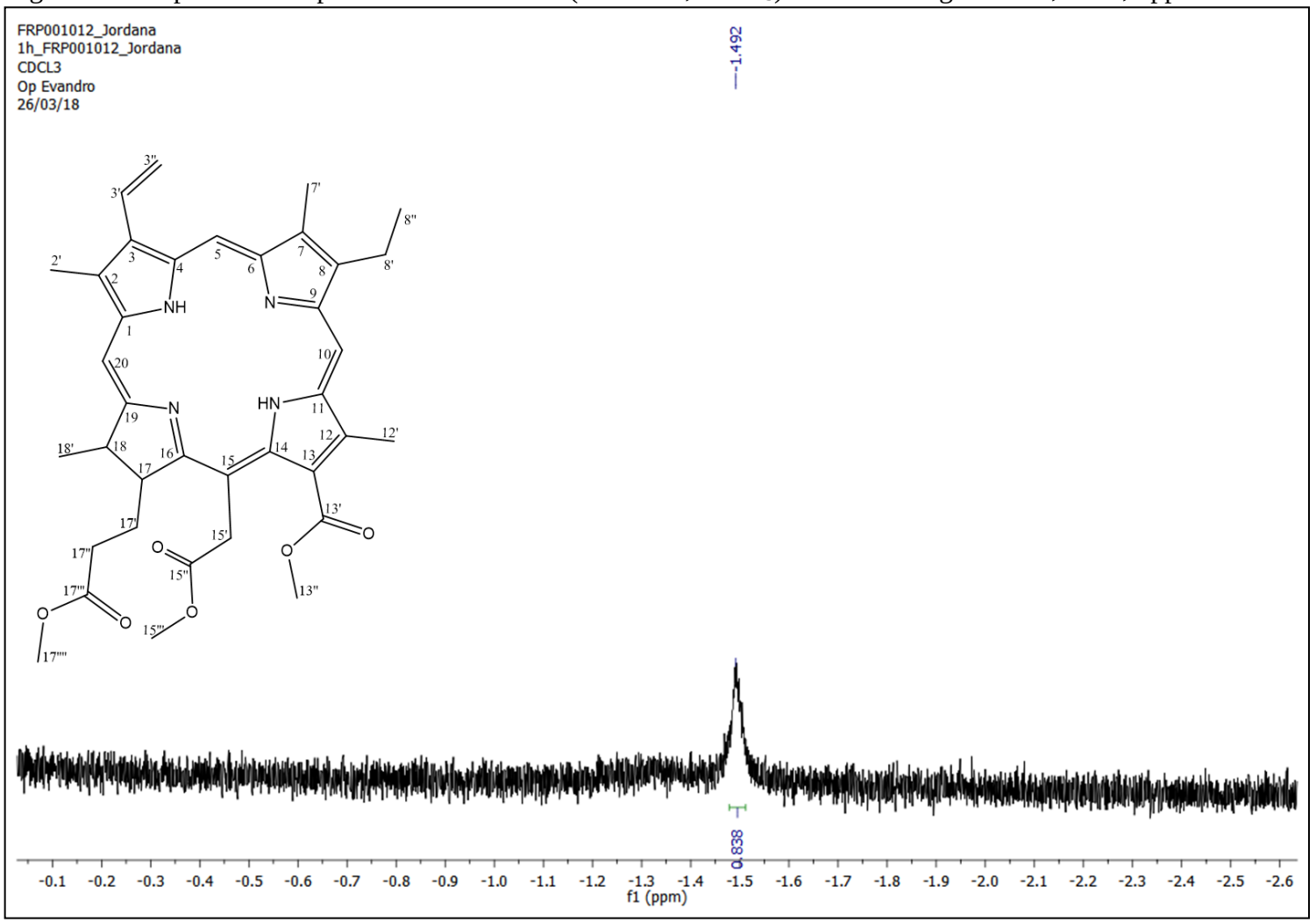
De acordo com Calvete et al. (2009), apesar das porfirinas e clorinas terem muitas semelhanças, a redução de um anel pirrol provoca uma alteração na simetria da molécula assim como na sua conjugação, dando origem a alterações de grande importância para as aplicações destas substâncias em terapia fotodinâmica.

Figura 20 - Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1



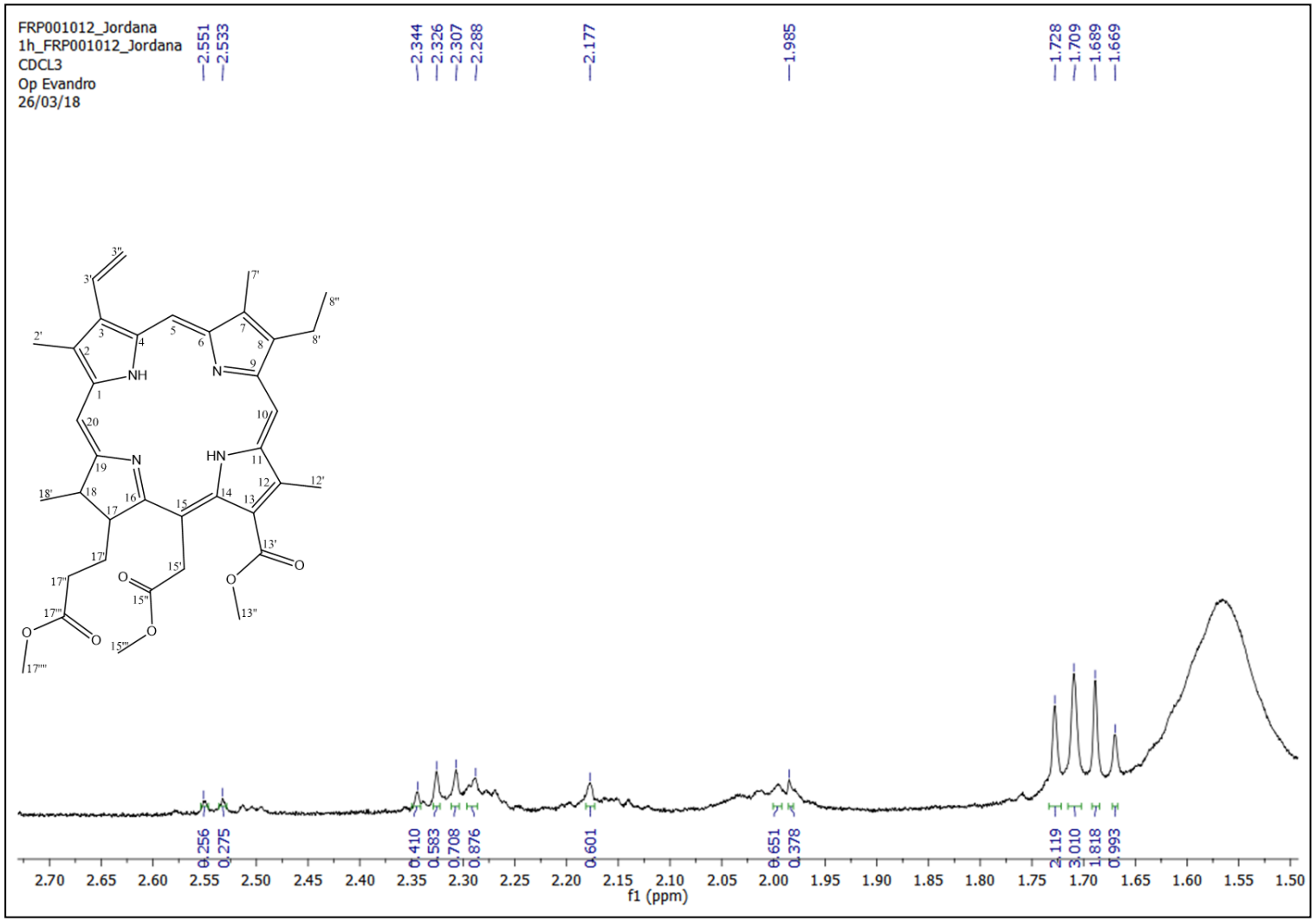
Fonte: Autor.

Figura 21 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de -0,1 a -2,6 ppm



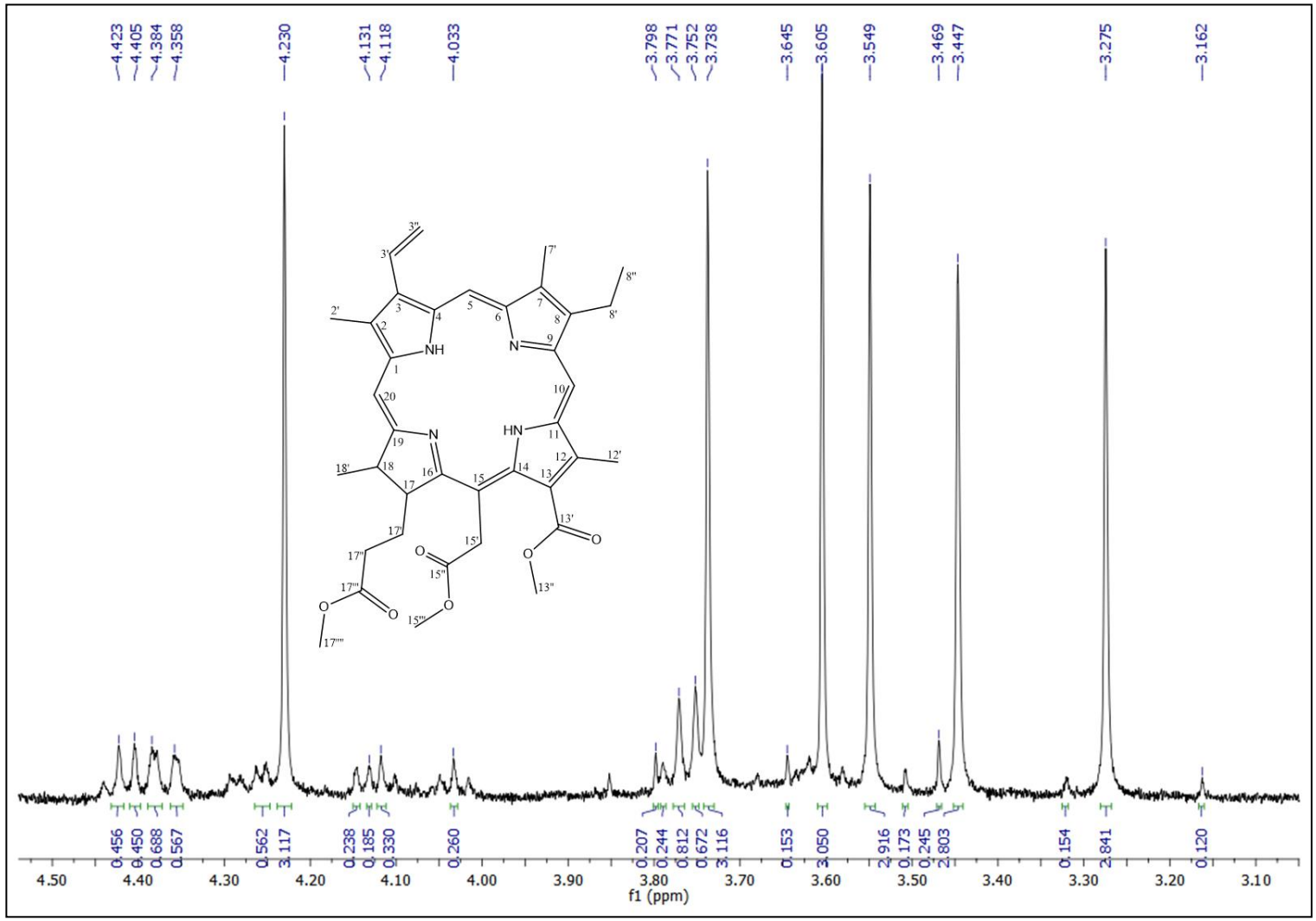
Fonte: Autor.

Figura 22 - Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 2,70-1,50 ppm



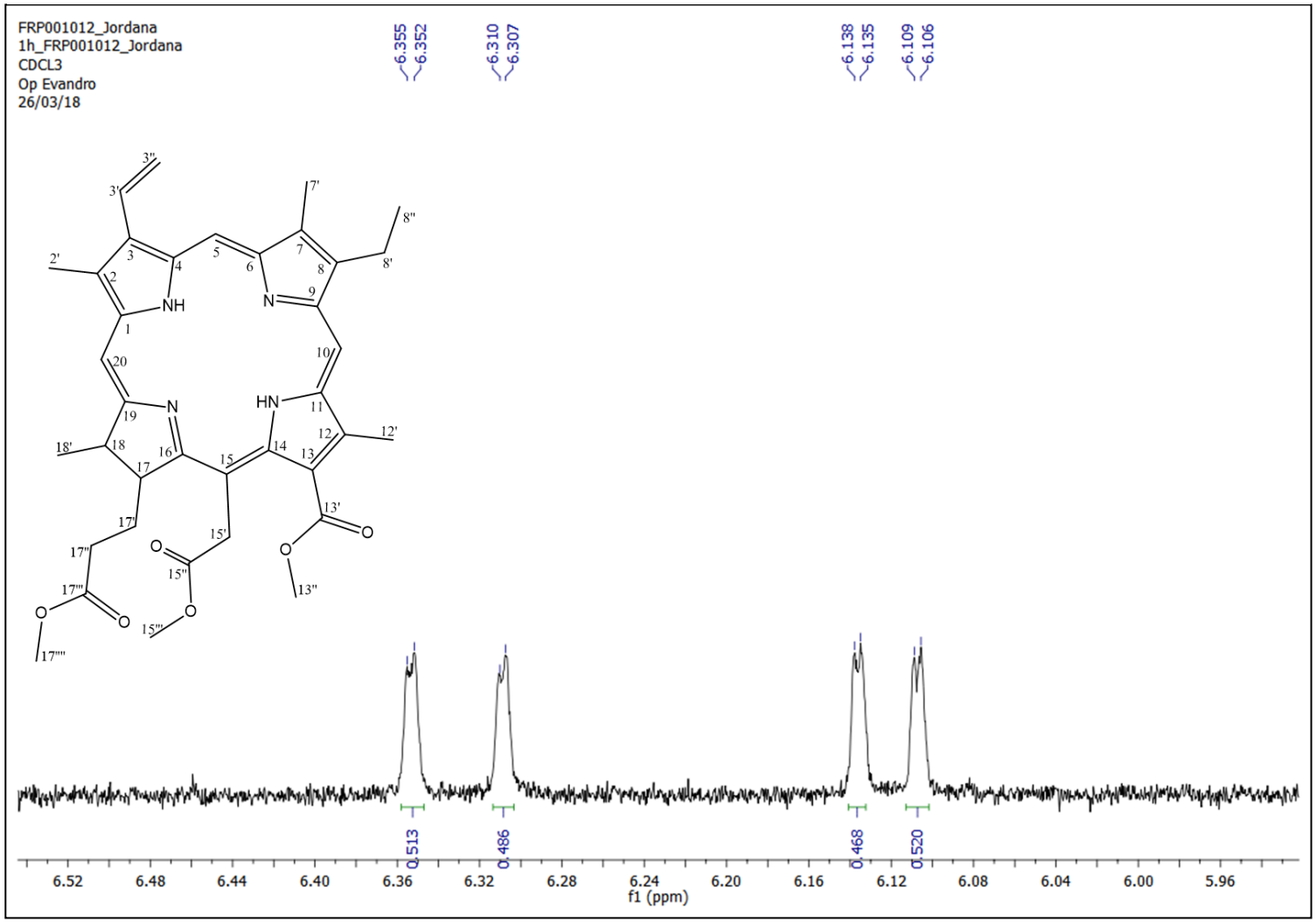
Fonte: Autor.

Figura 23 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 4,50-3,16 ppm



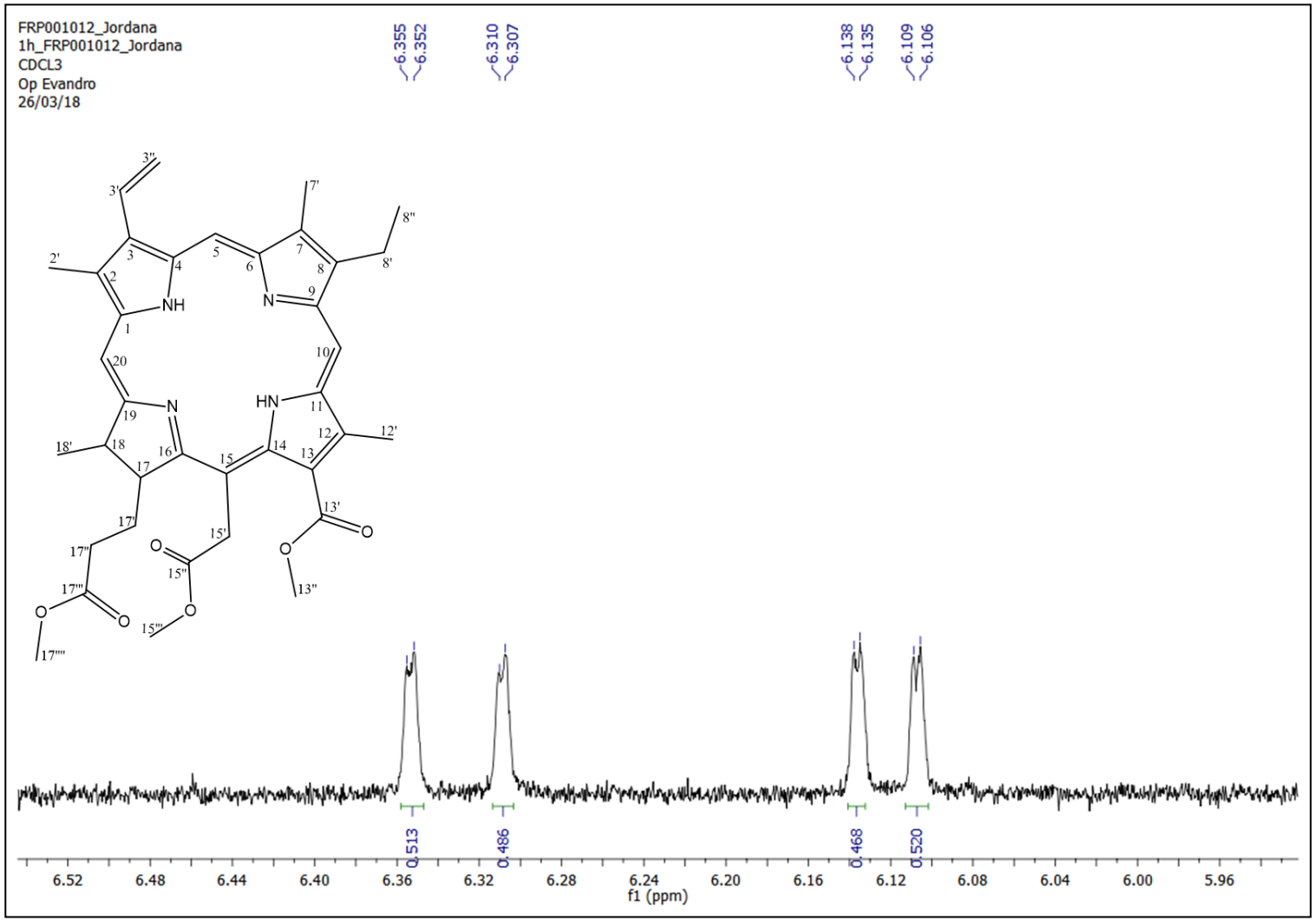
Fonte: Autor.

Figura 24 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 6,6-5,96 ppm



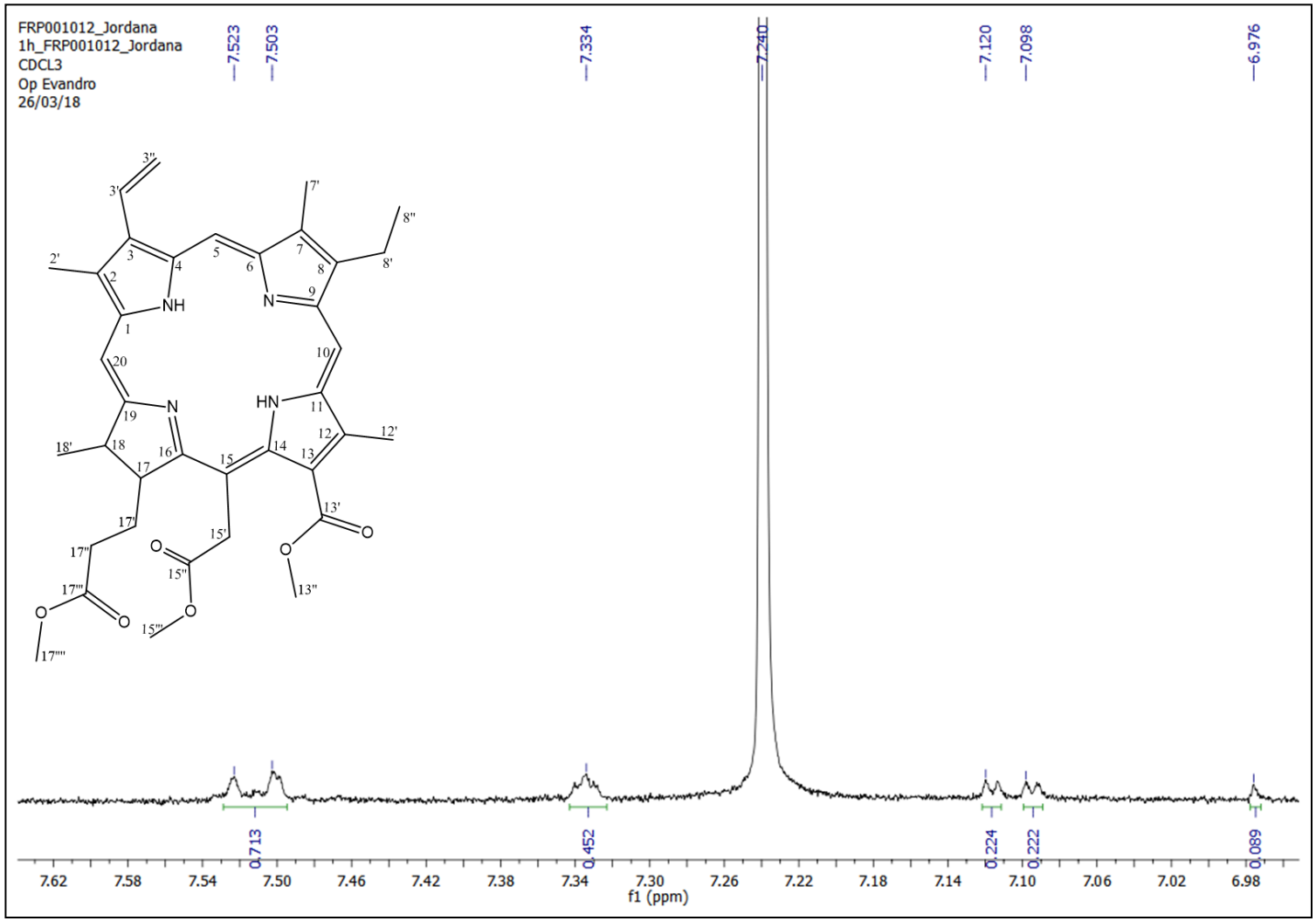
Fonte: Autor.

Figura 25 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 5,56-5,00 ppm



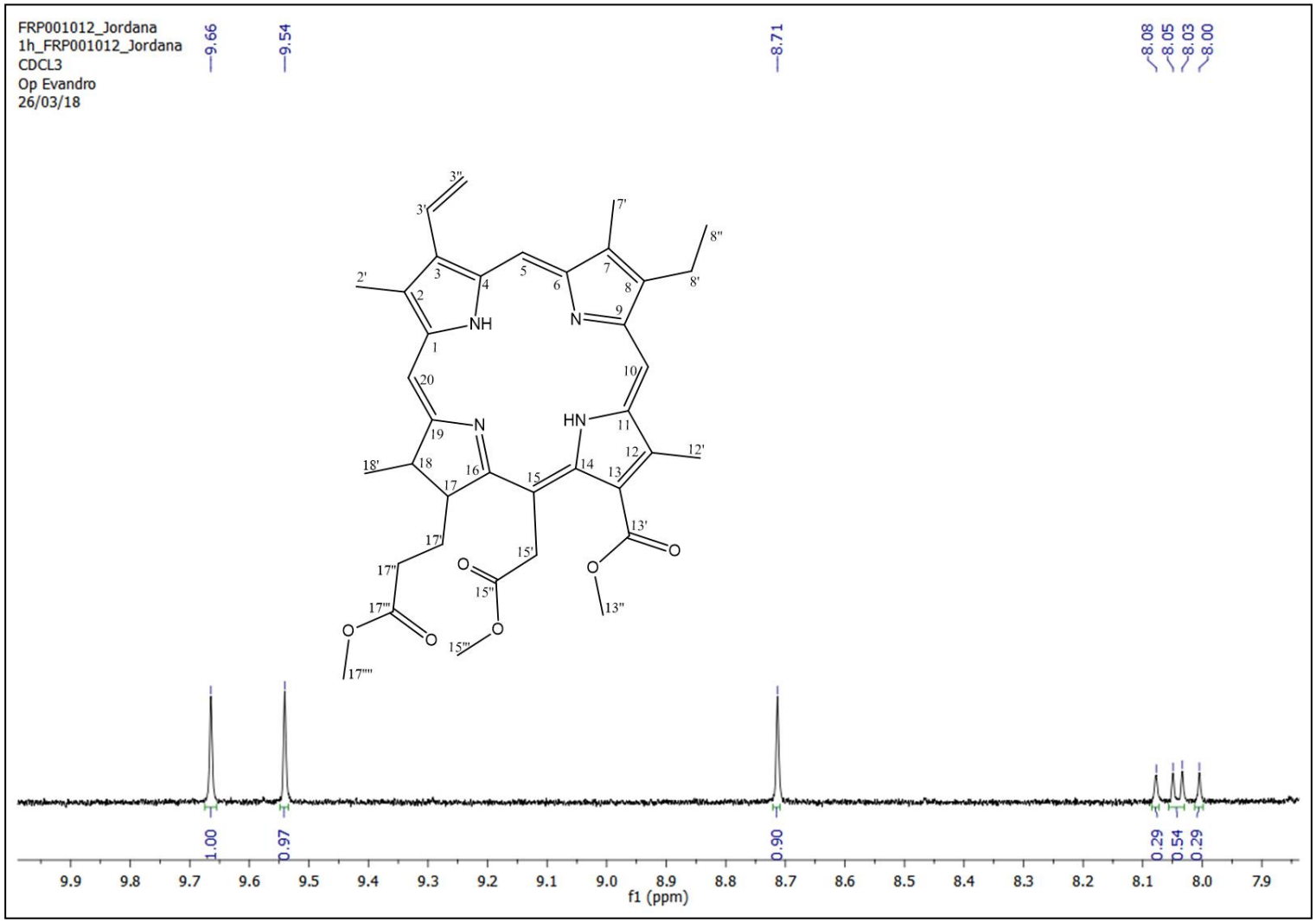
Fonte: Autor.

Figura 26 - Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 7,62-6,98 ppm



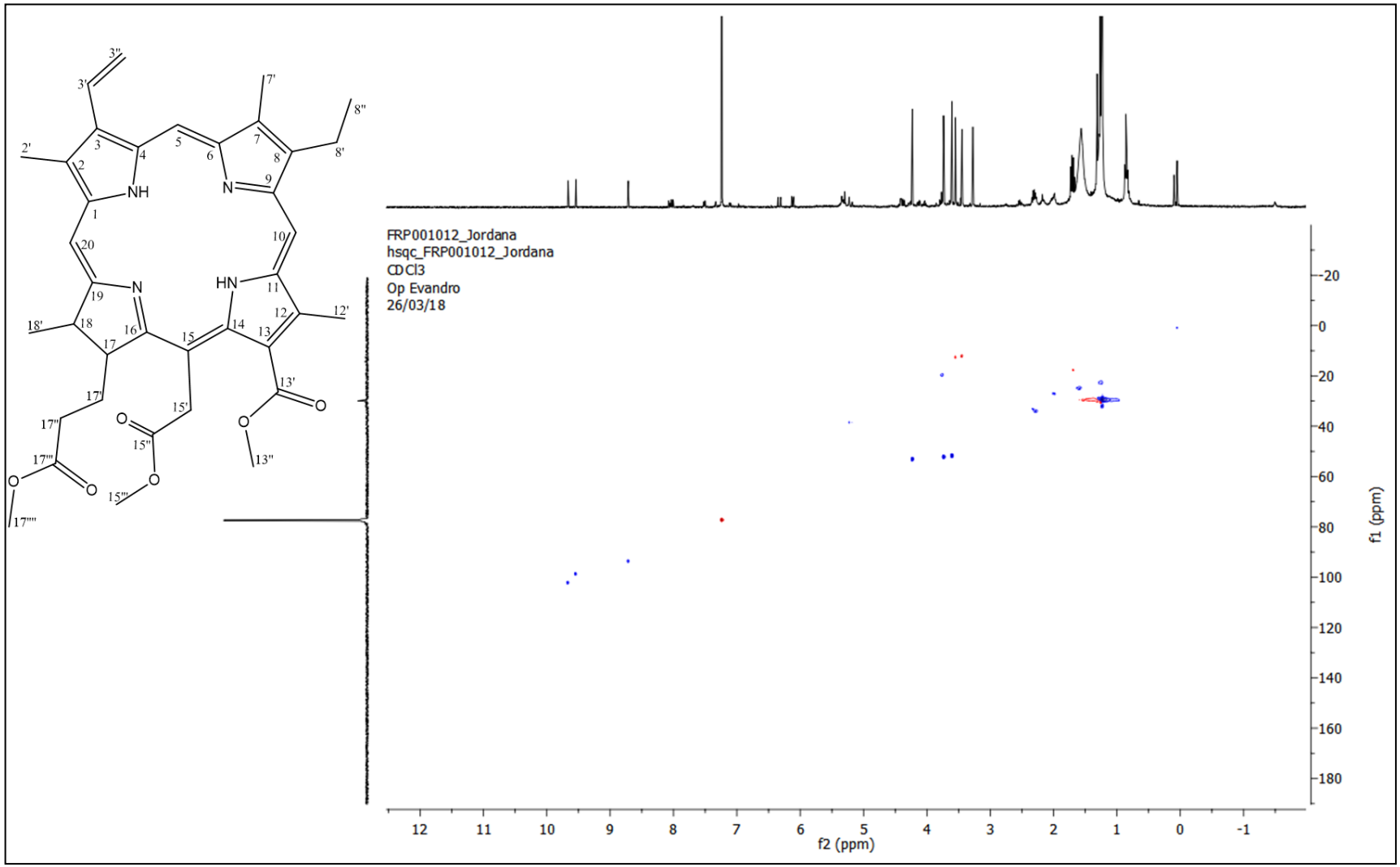
Fonte: Autor

Figura 27– Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 9,9-7,9 ppm



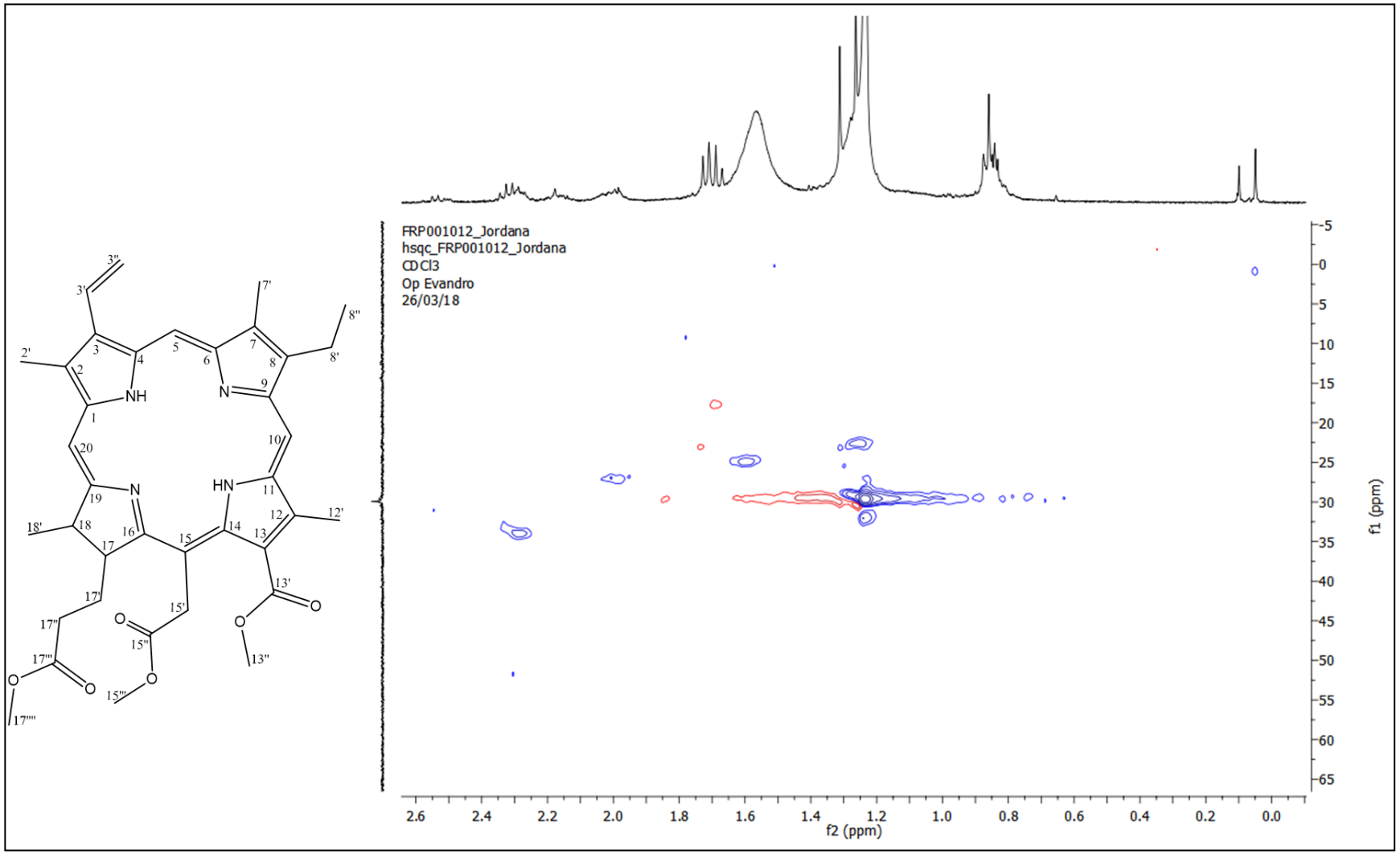
Fonte: Autor.

Figura 28 - Espectro de HSQC (400 MHz, 100MHz, $CDCl_3$) de Bs-1



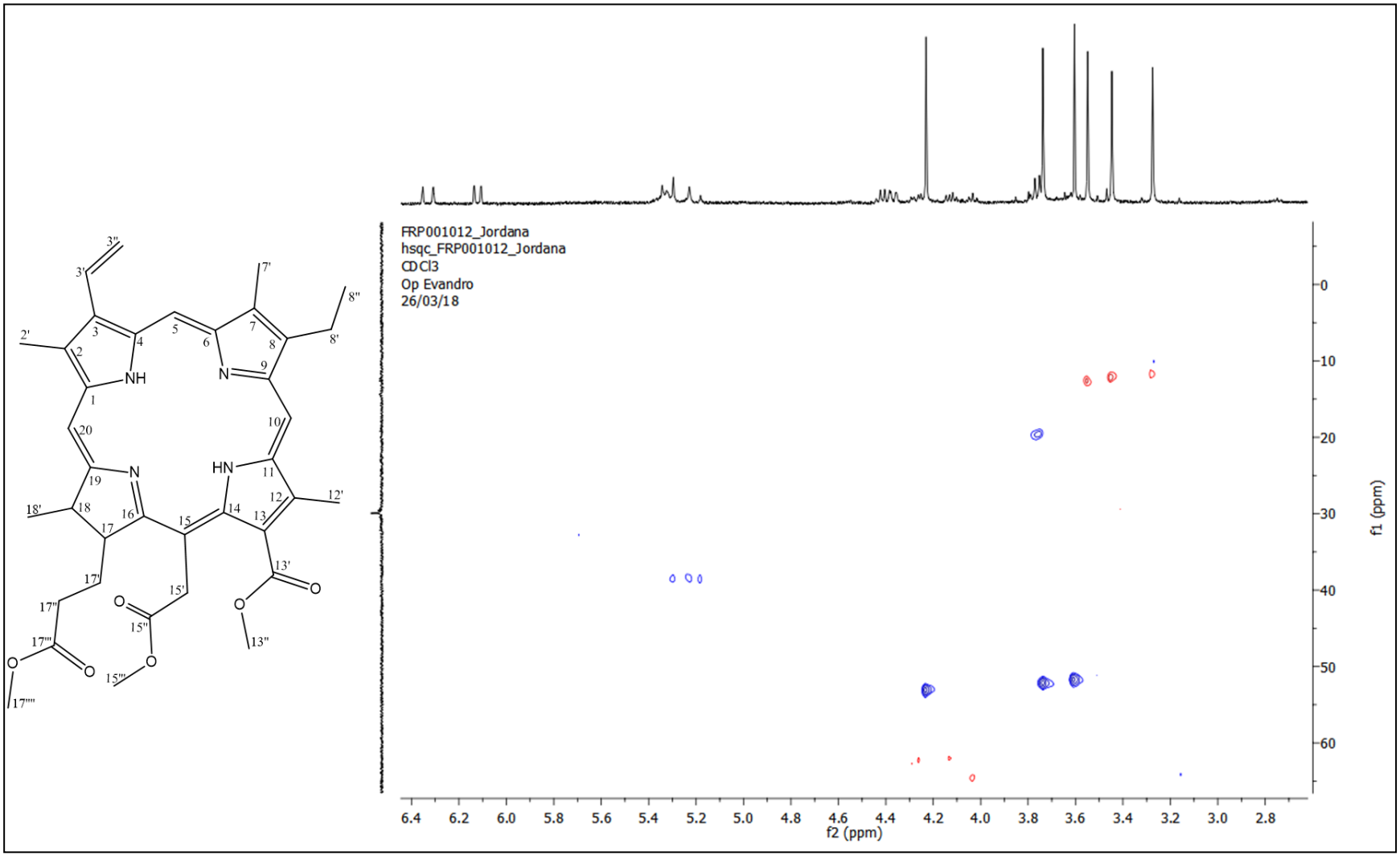
Fonte: Autor.

Figura 29 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 2,6-0,0 x 65-0 ppm



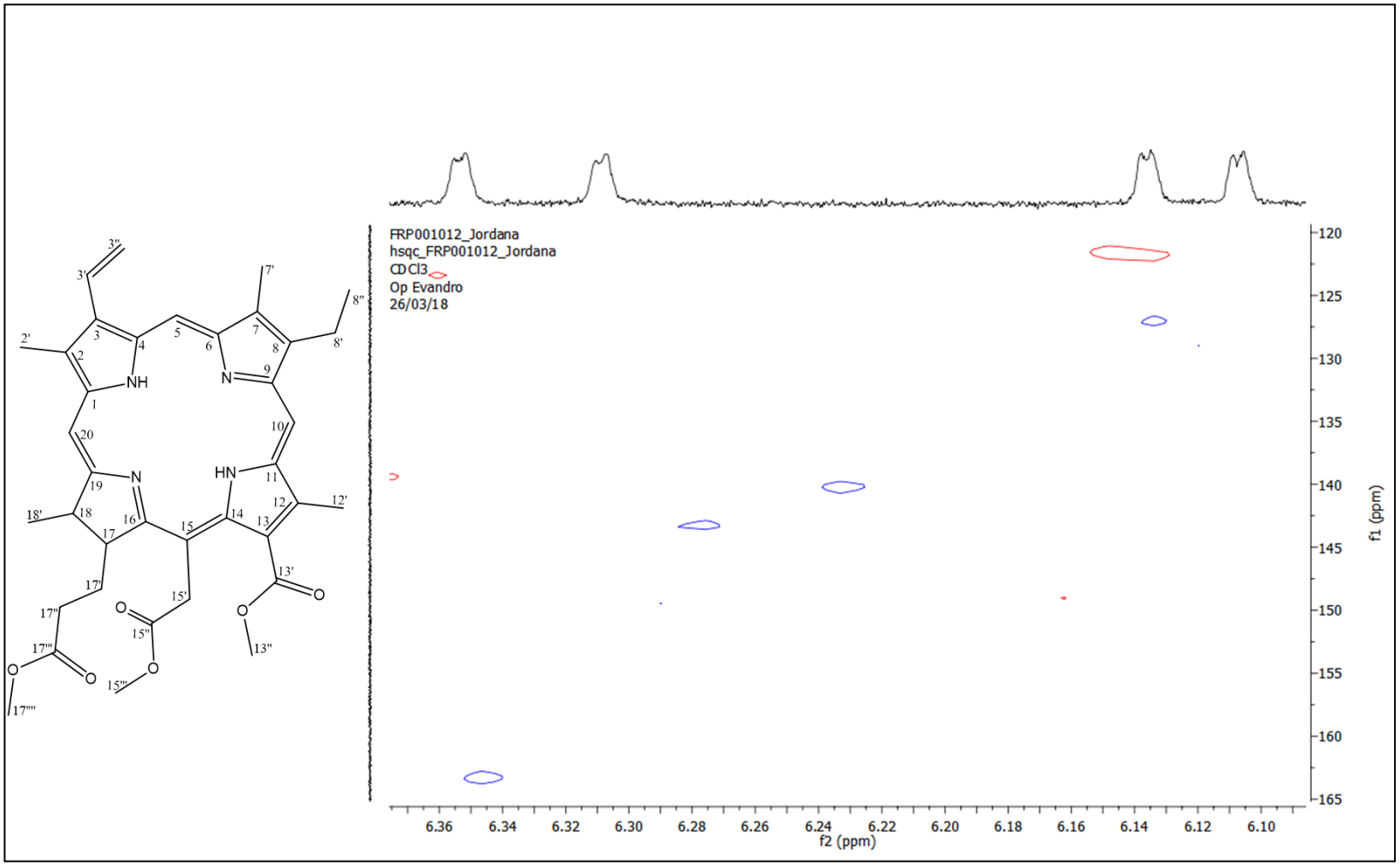
Fonte: Autor.

Figura 30 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 6,4-2,8 x 60-10 ppm



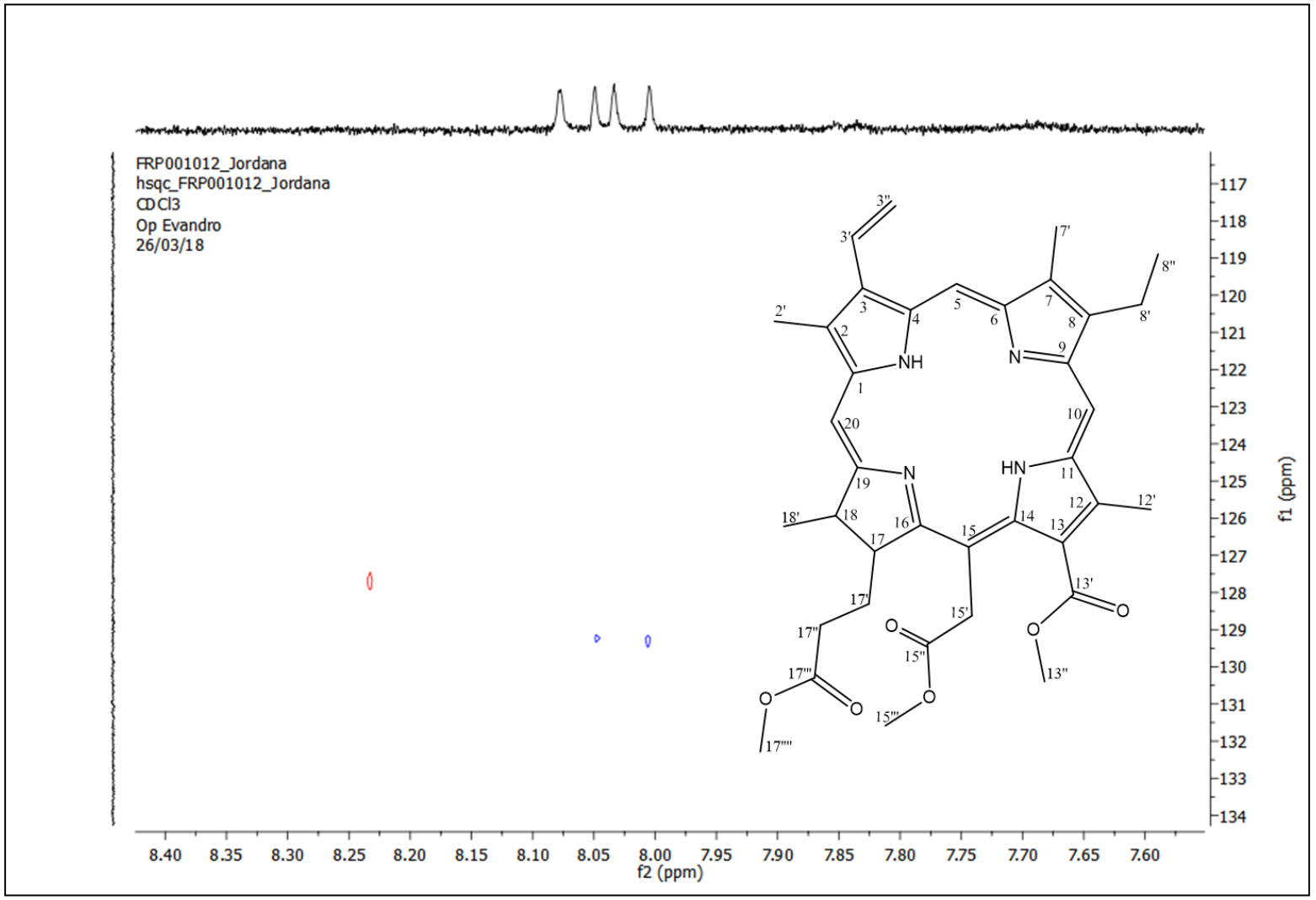
Fonte: Autor.

Figura 31 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 6,36-6,10 x 165-120 ppm



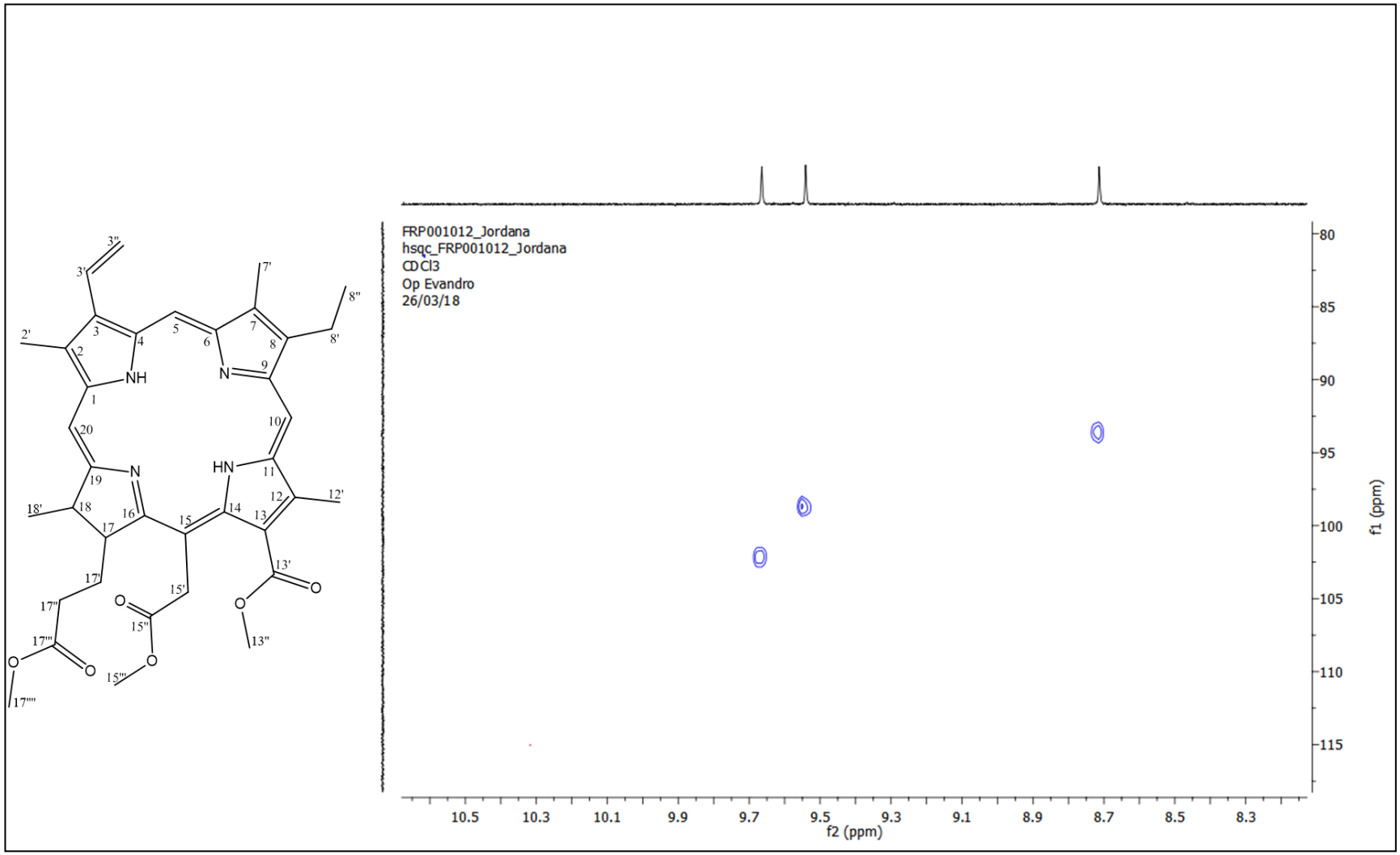
Fonte: Autor.

Figura 32 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 8,40-7,60 x 134-117



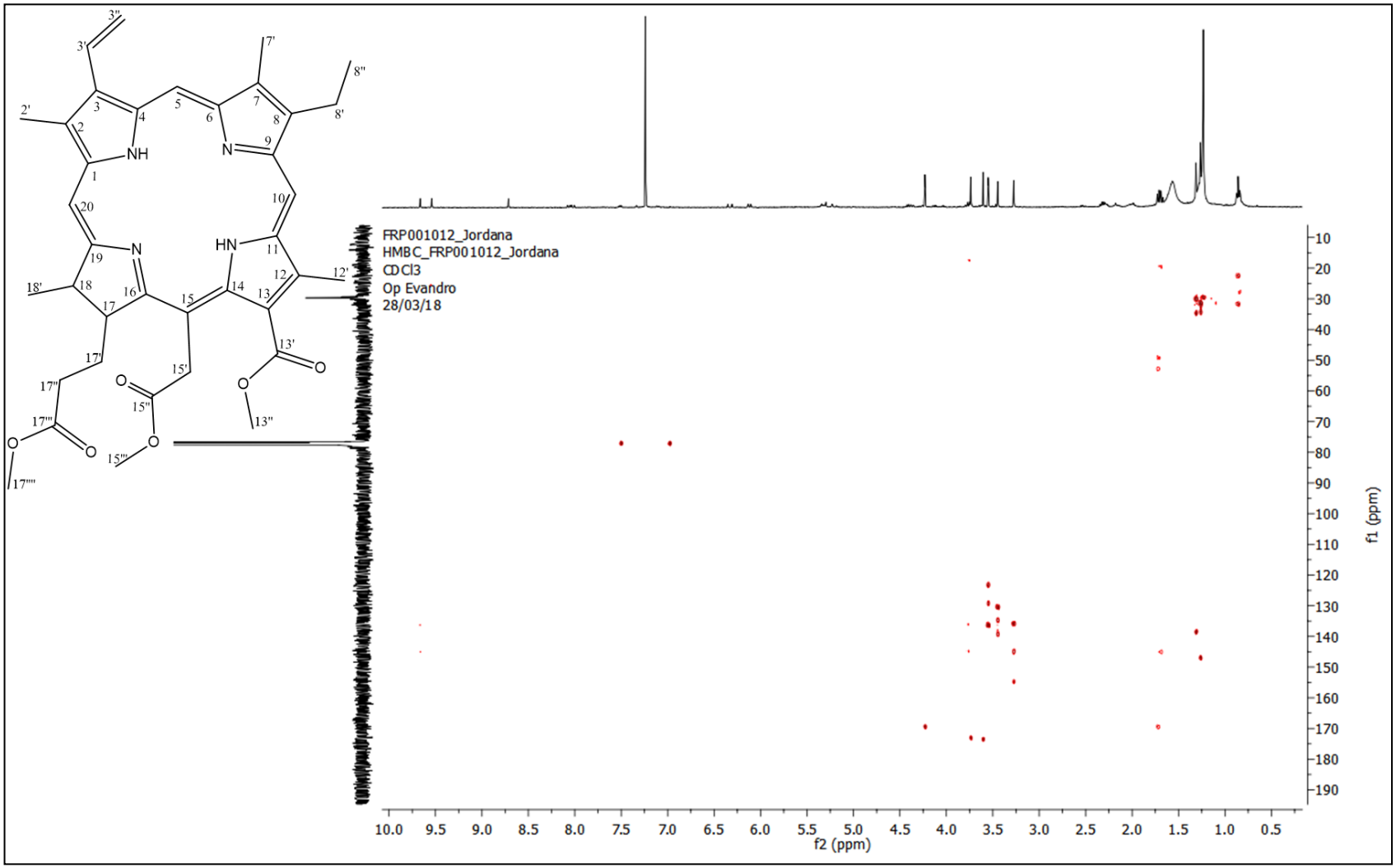
Fonte: Autor.

Figura 33 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 10,5-8,3 x 115-80 ppm



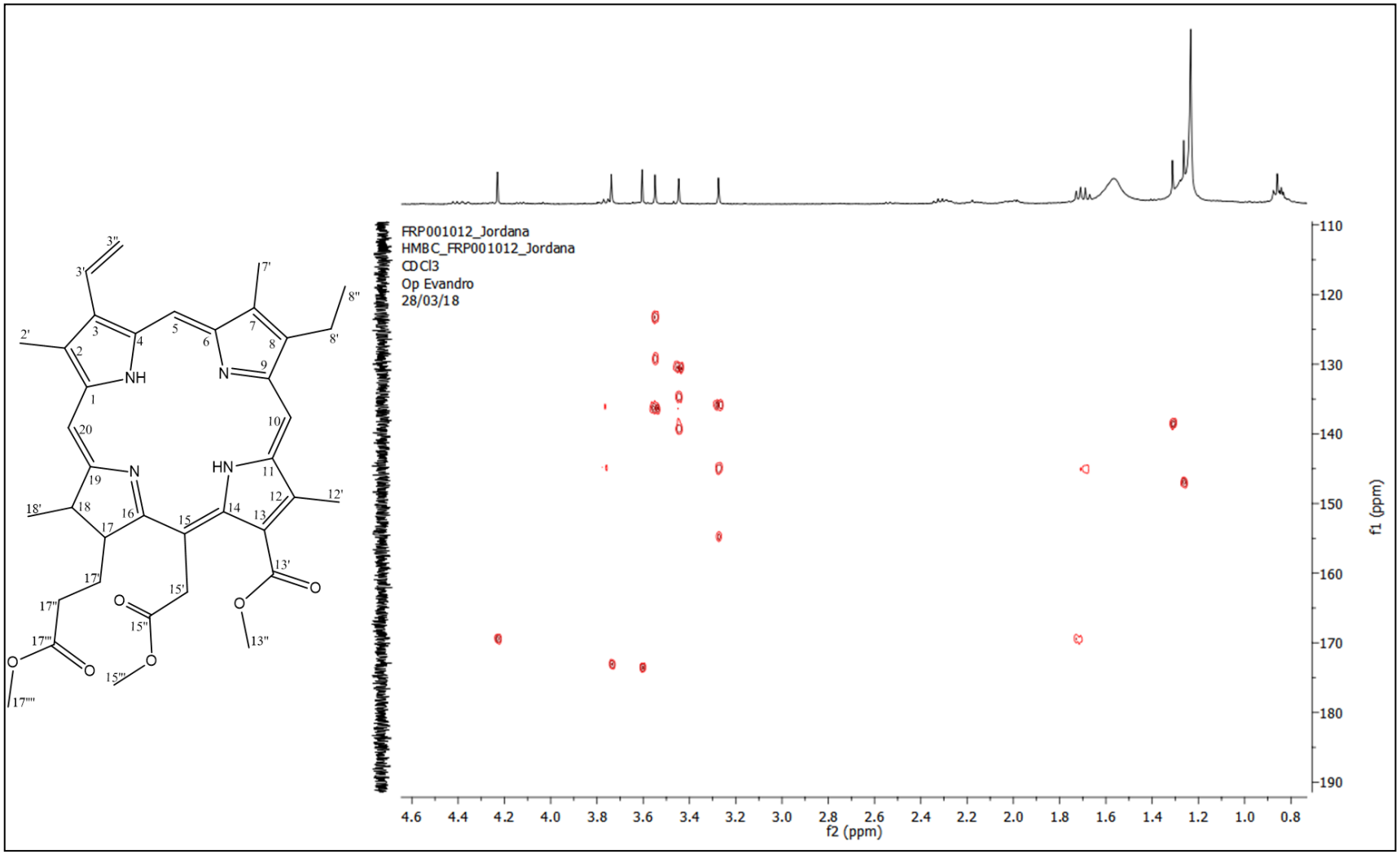
Fonte: Autor.

Figura 34 – Espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1



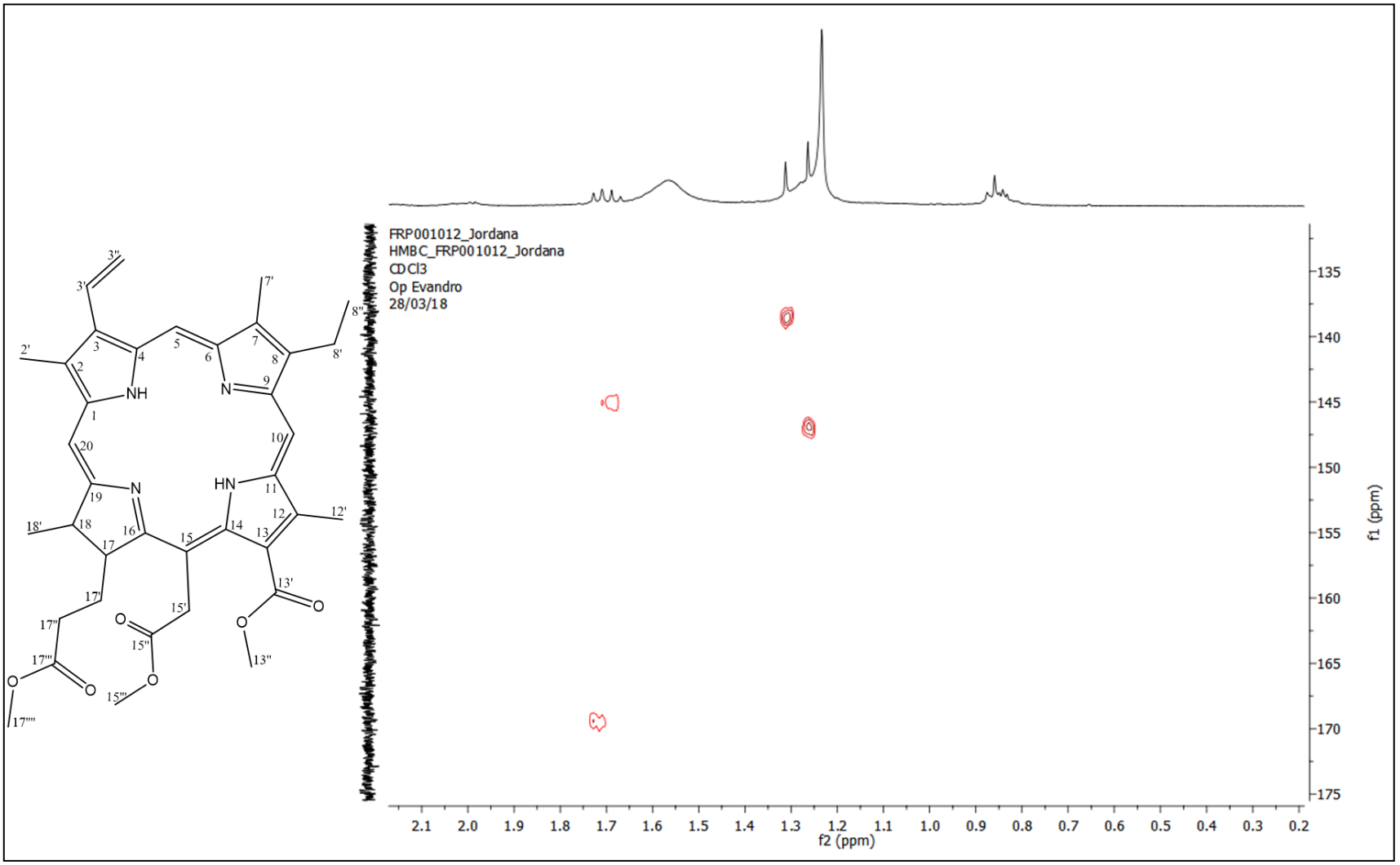
Fonte: Autor.

Figura 35 – Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 4,6-0,8 x 190-110 ppm



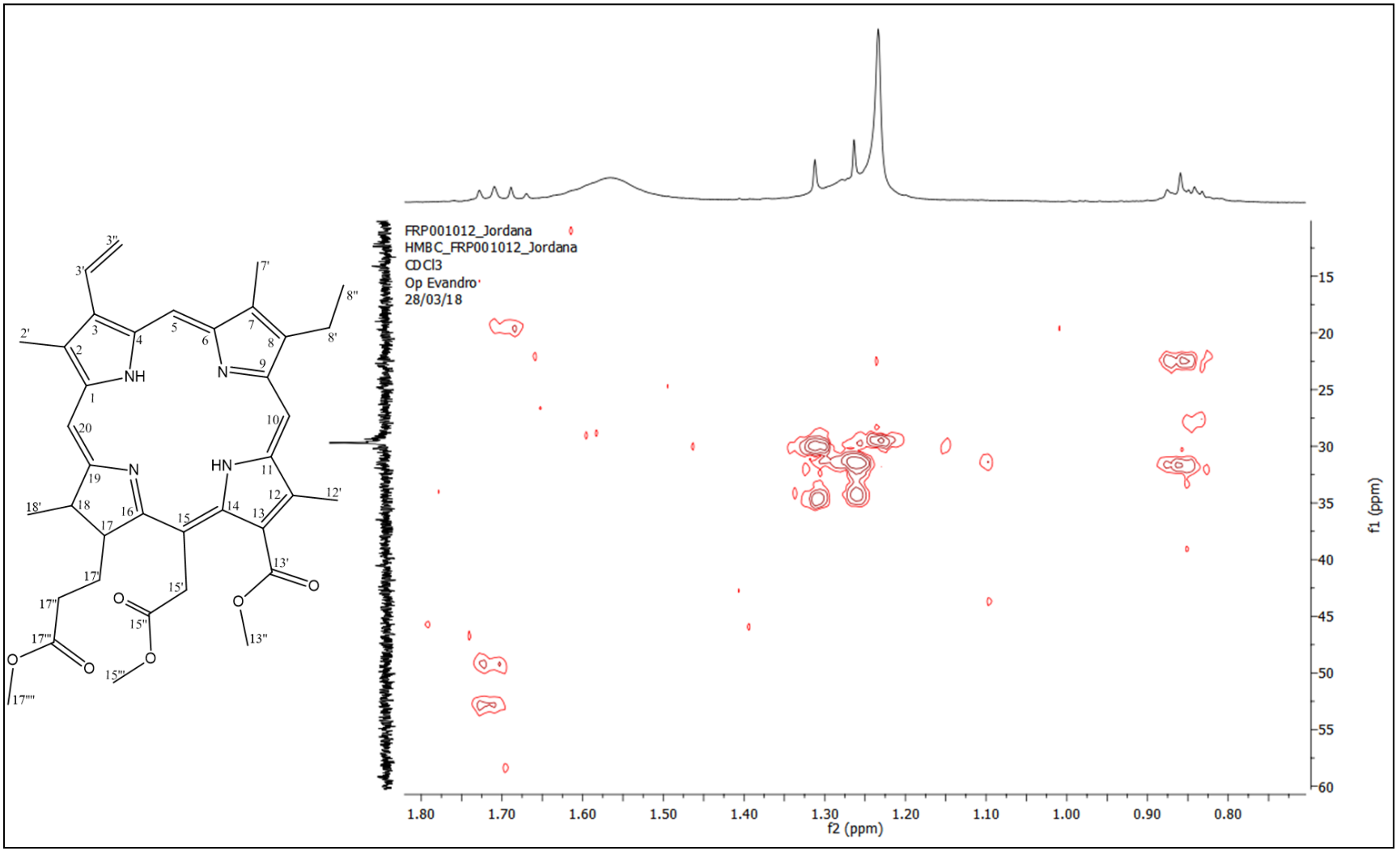
Fonte: Autor.

Figura 36 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 2,1-0,2 x 175-135 ppm



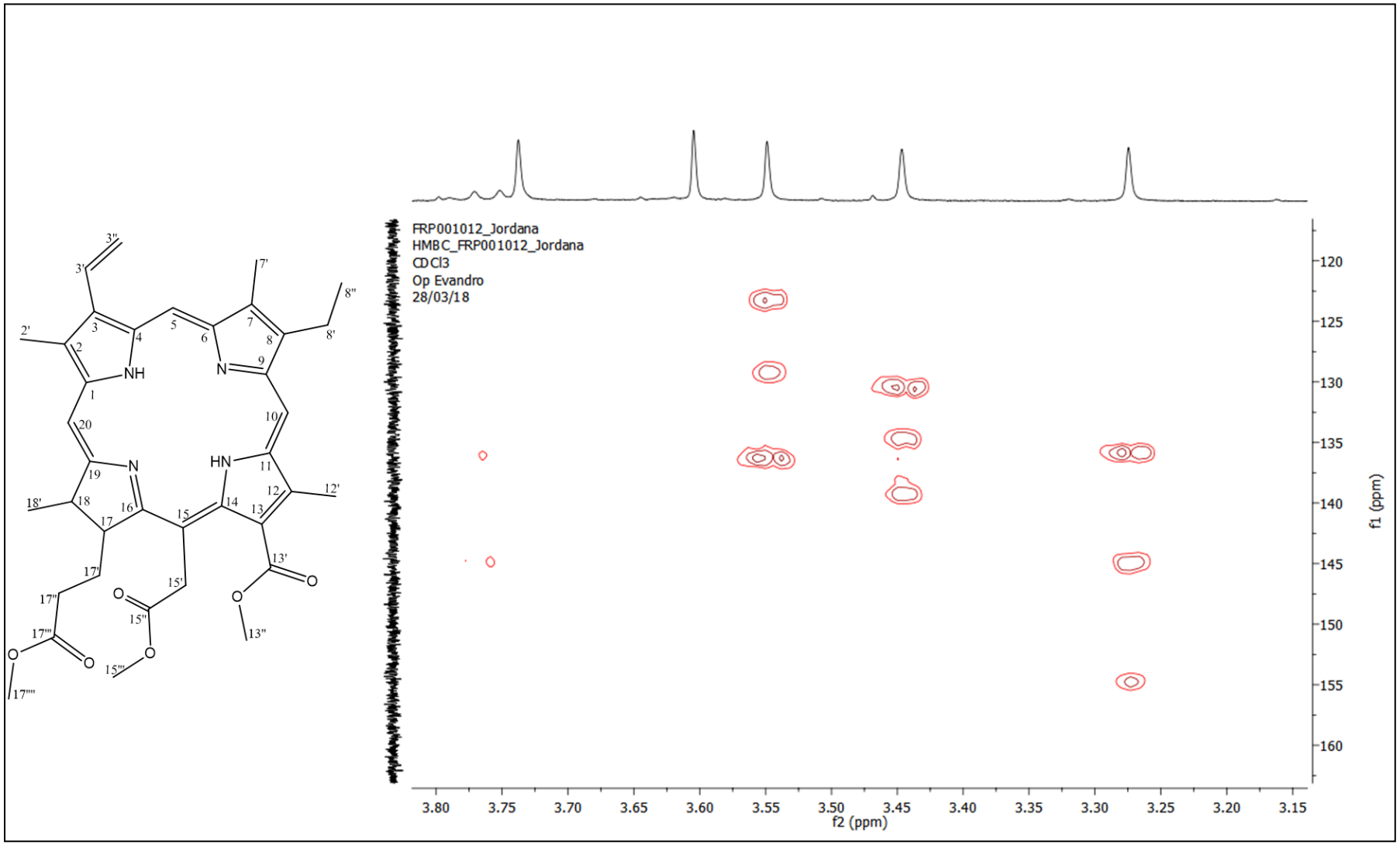
Fonte: Autor.

Figura 37 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 1,80-0,80 x 60-15 ppm



Fonte: Autor.

Figura 38 – Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, $CDCl_3$) de Bs-1 na região de 3,80-3,15 x 165-120 ppm

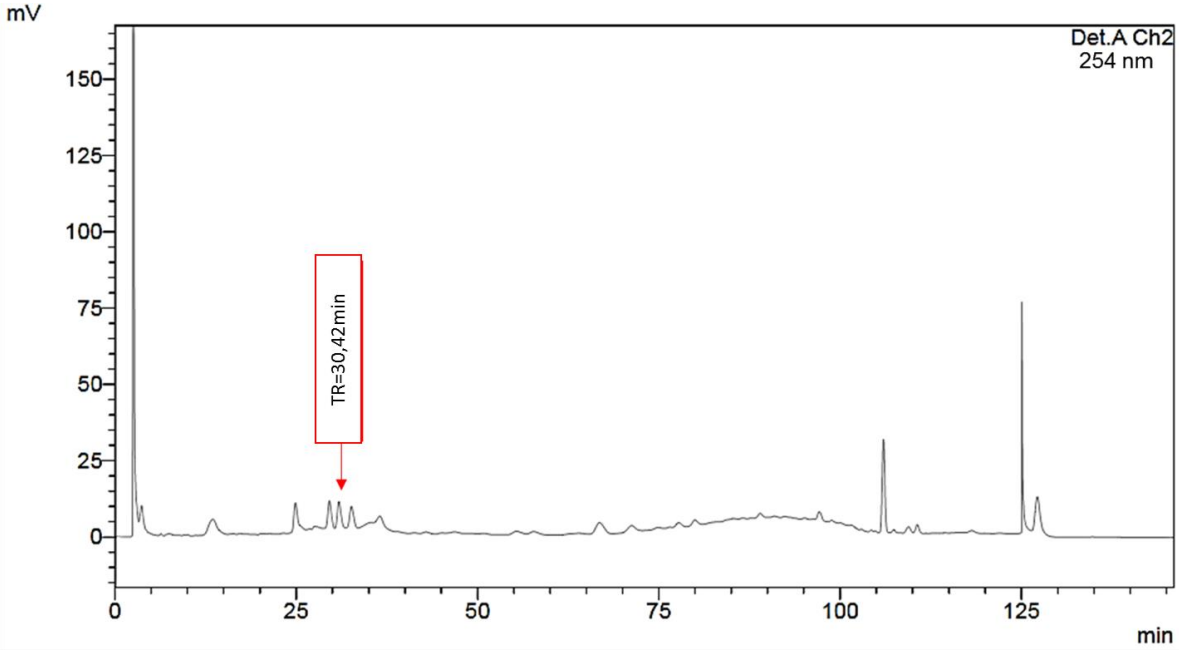


Fonte: Autor.

5.11 Caracterização estrutural de Bs-2

A substância codificada como Bs-2 apresentou-se na forma de um sólido amorfo amarelo (5,2 mg) e foi isolada após processo cromatográfico (CLAE) (Figura 40 – página 123) a partir da fração R1 de *Brasilonema* sp. (D298WC).

Figura 40 – Cromatograma da fração R1



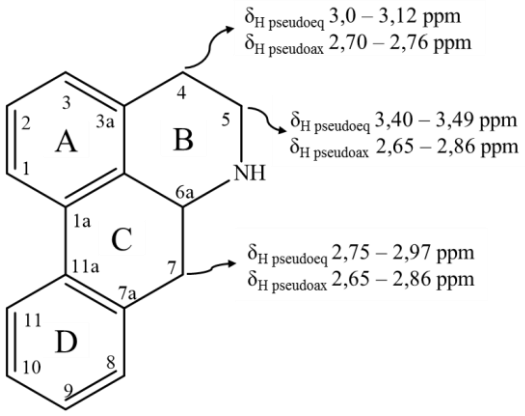
Fonte: Autor.

O espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) (Tabela 15, página 126; Figura 41, páginas 127) e suas expansões (Figuras 42 a 46 páginas 128 a 133) exibiram absorções entre 6,75 – 7,29 ppm (característicos de sinais aromáticos) e entre 2,67 – 4,25 ppm (característicos de alifáticos). Ao comparar com dados da literatura, observou-se uma semelhança com absorções sugestivas para hidrogênios de alcaloides aporfínicos (CHEN *et al.*, 1996) (Figura 47, página 124).

Esta sugestão foi fortalecida pelos sinais observados em δ_H 6,75 (s), 6,92, (d, *J*=7,4), 7,29 (dd, *J*= 7,4, 8,3) e 7,03 (d, *J*=8,3) (Figura 41, páginas 128), atribuídos às posições H-3, H-8, H-9 e H-10, respectivamente.

Além desses, foram observados sinais em δ_H 6,05 e 5,91 (d, *J*=1,0, 1H cada), compatíveis com a presença de um grupo metilenodioxi. Devido à multiplicidade do sinal atribuído ao H-3, o qual apresentou-se na forma de um singleto, pode-se sugerir que esse grupo encontra-se na posição C-1 e C-2.

Figura 47- Faixas de deslocamentos químicos característicos de alguns hidrogênios de alcalóides aporfínicos.



Fonte: Costa *et al.* 2011; Macedo *et al.* 2012; Rabelo *et al.* 2014; Teles *et al.* 2015.

No espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) (Tabela 15, página 127; Figura 44 e 45, páginas 131 e 132) os sinais de hidrogênios alifáticos foram evidenciados em δ_H 4,88 (dd, 13,0, 3,7), 4,25 (m), 2,92 (m), 2,82 (dt, 13,8, 3,4), 2,70 (m) e 2,67 (m, 2H) atribuídos a H-6a, H-5a, H-5b, H-7a, H-7b e H-4a/b. Observou-se um sinal característico de um grupo metoxila em δ_H 3,84 (s, 3H), podendo estar localizado na posição C-11, já que o sinal atribuído ao H-10 apresentou-se na forma de dubleto (CHEN *et al.*, 1996).

Um singleto em δ_H 3,66 (s, 3H) evidenciou a presença de um grupo metoxicarbonil, porém ainda foi possível observar a presença de um tripleto em δ_H 1,20 e um multipleto em δ_H 4,10 sugerindo também a presença de um grupo etoxicarbonil. Sendo que os sinais referentes a esses grupos apresentaram diferentes valores de integração, o que permitiu inferir que tratava-se de um mistura de duas substâncias semelhantes variando apenas no substituinte ligado ao nitrogênio (N-R). As percentagens relativas foram deduzidas com base nas intensidades relativas dos sinais correspondentes ao CH_3O-1' da Bs-2A (δ_H 3,66 (s), integração = 1,3315) e ao CH_3-3' da Bs-2B (δ_H 1.20 (t, J=7.1 Hz), integração = 2,5980): 1.3315 (A) + 2.5980 (B) = 3,9295 = 100 % e, consequentemente, 133,15 dividido por 3,9295 = 33,89 % e 259,8 dividido por 3,9295 = 66,112 %.

O espectro de RMN ^{13}C-APT (125 MHz, DMSO-d_6) (Tabela 15, página 127; Figura 48, página 134) e suas expansões (Figuras 49 a 53, páginas 135 a 139) exibiram absorções para 23 sinais equivalentes a 41 átomos de carbono, sendo 18 não hidrogenados, 10 metínicos, 9 metilênicos e 4 metílicos. Os sinais em δ_C 156,9, 147,0, 143,5 são característicos de carbonos aromáticos ligados a elementos eletronegativos, podendo ser atribuídos, respectivamente, a C-11, C-2 e C-1. Observou-se os sinais em δ_C 139,0, 126,8, 126,4, 119,4 e 114,1, atribuídos aos carbonos aromáticos não hidrogenados C-7a, C-3a, C-3b, C-11a e C-1a, respectivamente. Os sinais em

δ_C 129,6, 120,6, 111,4 e 107,8, relativos aos carbonos aromáticos metínicos C-9, C-8, C-10 e C-3. O espectro mostrou também os sinais em δ_C 51,8, 38,5, 35,5 e 29,8, referentes aos carbonos alifáticos C-6a, C-5, C-7 e C-4. Os sinais em δ_C 100,7 e 56,0 foram atribuídos, respectivamente, aos substituintes metilenodioxi e metoxila. Além desses, foram observados os sinais em δ_C 156,9 e 52,3 que foram atribuídos, respectivamente, à N-carbonila C-1' e à metoxicarbonila C-2' da Bs-2A e os sinais em δ_C 154,9, 61,6, e 14,6, atribuídos à N-carbonila C-1' e aos carbonos C-2' e C-3' da etoxicarbonila, respectivamente, da Bs-2B. Esses sinais corroboram com a sugestão de que se trata de uma mistura de dois alcaloides com esqueleto do tipo aporfínico.

Os espectros bidimendionais de HSQC (Figura 54 a 56, páginas 140 a 142) e HMBC (Figura 57, página 143) e suas expansões (Figuras 58 a 60, página 144 a 146) confirmaram as propostas acima evidenciadas.

O espectro de HMBC (Figura 57, página 143), o H–OCH_2O (δ_H 6,05 e 5,91) apresentou correlações a ^3J com C-1 (δ_C 143,5) e a ^3J com C-2 (δ_C 147,0) (Figura 58, página 144), confirmando a presença do grupo metilenodioxi ao núcleo aporfínico. A presença do grupo etoxicarbonil também foi confirmado pelo espectro de HMBC após demonstrar uma correlação entre H-2' (δ_H 4,10) a ^3J com C-3' (δ_C 14,6) e de outra correlação entre o H-3' (δ_H 1,20) a ^3J com C-2' (δ_C 61,3) (Figura 58, 59 e 60, páginas 144, 145e 146).

Desta forma, constatou-se que a substância Bs-2 tratava-se de uma mistura de alcalóides aporfínicos inéditos (Figura 61, página 126) sendo metil12-metoxi-7a,8-di-hidro-5H-[1,3]dioxolo[4 ',5':4,5]benzo[1,2,3-de]benzo[g]quinolina-7(6H)-carboxilato (Sassicina A) e 12-metoxi-7a,8-di-hidro-5H-[1,3]dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2,3-de]benzo[g]quinolino-7(6H)de etilo-carboxilato (Sassicina B), o primeiro relato destes alcalóides para linhagens de cianobactéria.

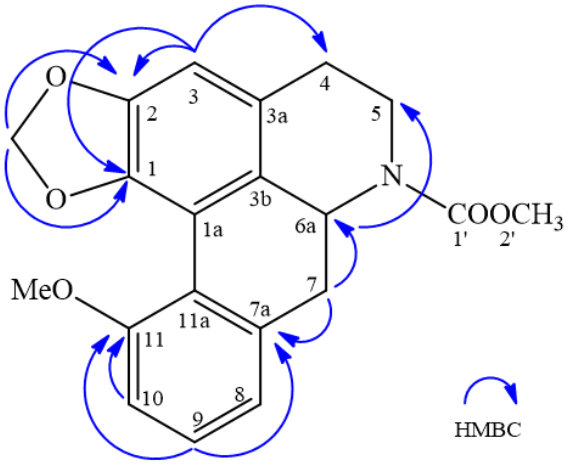
No entanto, entre as plantas, os alcaloides aporfínicos já vem sendo isolado, bem como testadas suas atividades biológicas (RINALDI *et al*., 2017). A classe dos aporfínicos derivam do esqueleto isoquinolínico e é proeminente em diferentes espécies de Annonaceae (LEBOEUF *et al.,* 1982; Cavé et al., 1987), porém é encontrada também em outras famílias (STÉVIGNY et al., 2005).

O Gênero *Annona*, é o maior representante em diversidade estrutural de alcalóides aporfínicos (CHEN et al., 2013; GONZÁLEZ-ESQUINCA *et al*., 2014). Alguns exemplos e suas repectivas atividades biológicas testadas são: Anonaina - antileishmania e tripanocida (QUEIROZ *et al*., 1996); asimilobina – anti-α-glucosidase (MOLLATAGHI *et al*., 2012); estefalagina – atividade inibitória da lipase pancreática, consistindo em um antidiabético

(PEREIRA *et al*., 2017); romucosina – agregação plaquetária induzida pela trombina, pelo ácido araquidônico, pelo colágeno e pelo fator ativador de plaquetas (Kuo *et al*., 2001); e xilopina – antileishmania (MONTENEGRO *et al*., 2003).

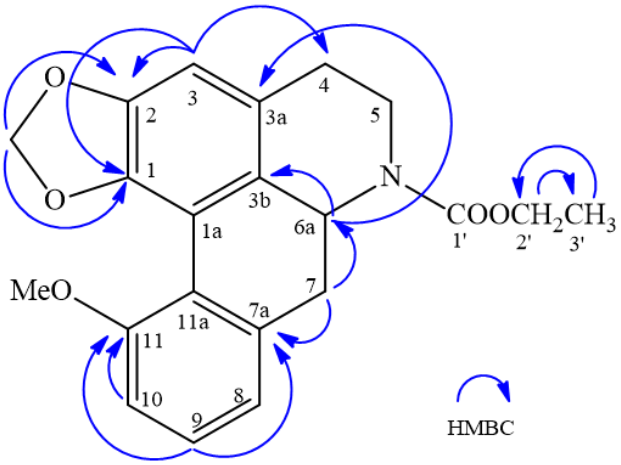
A duguetina está presente no gênero *Duguetia* e como observado por Silva *et al*. (2009) tem propriedades antitumoral, tripanocida e antileishmania.

Figura 61 – Forma estrutural dos alcalóides Sassicina A e Sassicina B



metil12-metoxi-7a,8-di-hidro-5H-[1,3]dioxolo[4 ',5':4,5]benzo [1,2,3-de]benzo[g]quinolina-7(6H)-carboxilato

Sassicina A

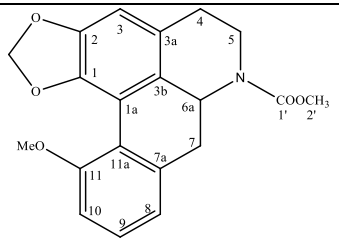


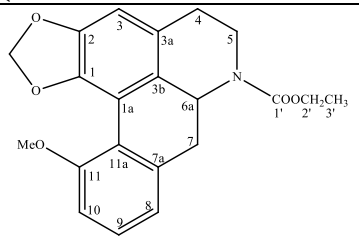
12-metoxi-7a,8-di-hidro-5H-[1,3] dioxolo [4 ',5':4,5]benzo [1,2,3-de]benzo[g]quinolino-7(6H)de etilo-carboxilato

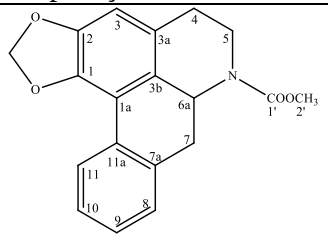
Sassicina B

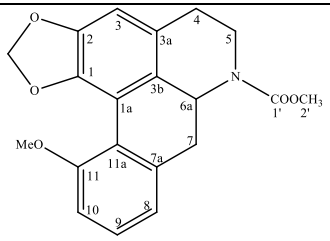
Fonte: Autor

Tabela 15 - Dados de RMN ^{1}H, RMN ^{13}C e HMBC de Bs-2 (δ, DMSO-d_6, 500 MHz, 125 MHz) em comparação com dados da literatura



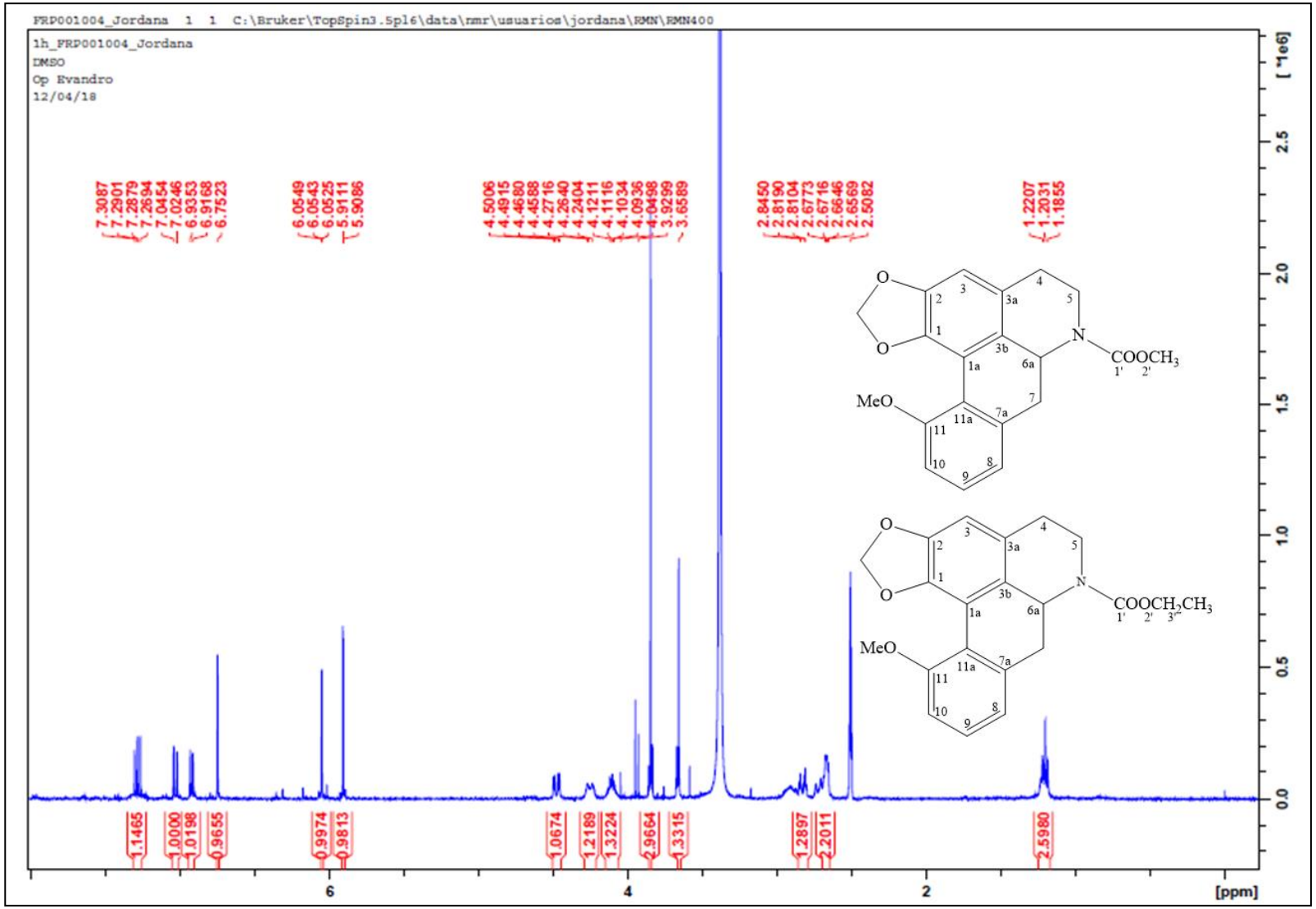






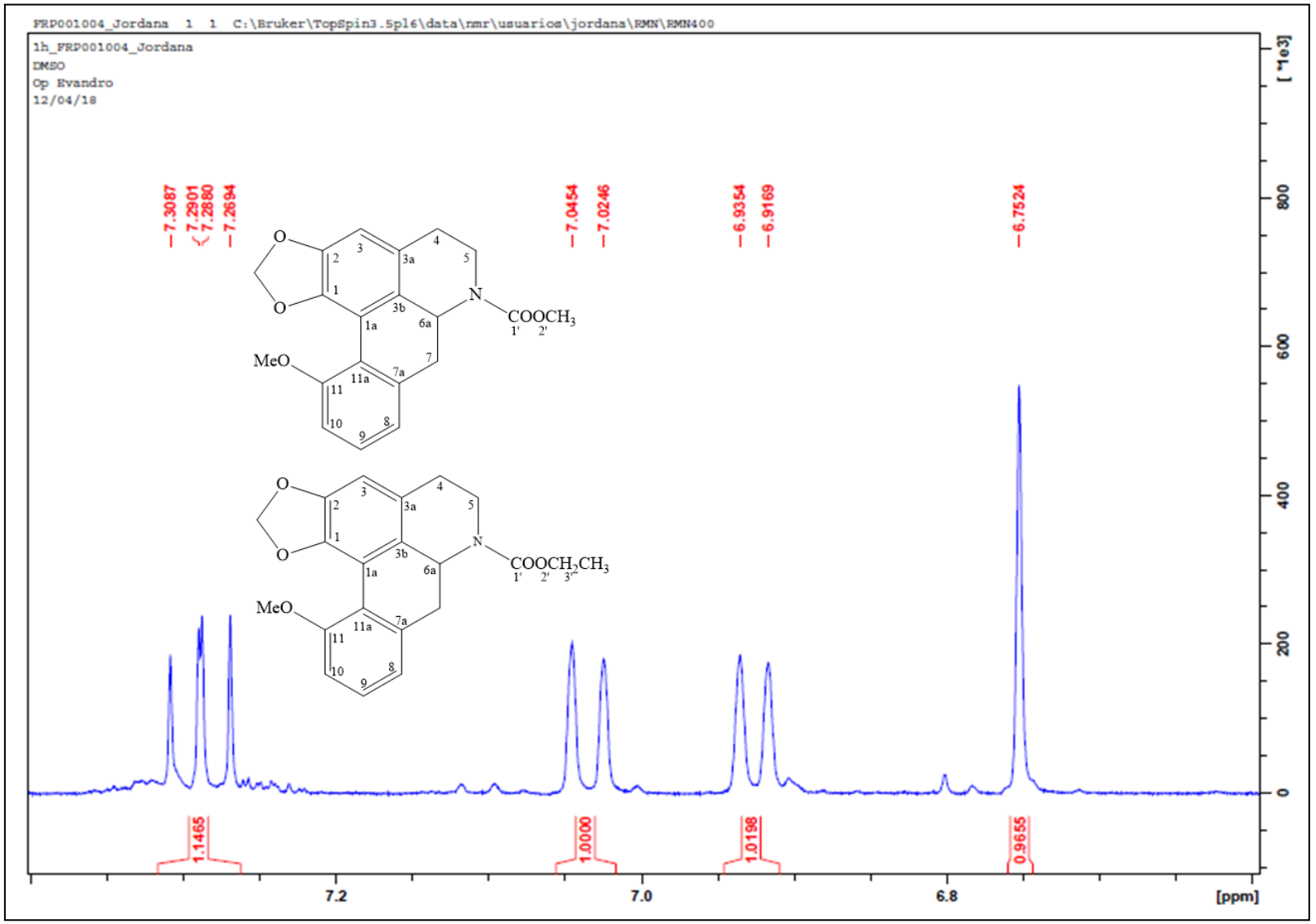
	Lb-2A (33,89%)				Lb-2B (66,11%)				Romucosina CDCl₃, 500 MHz		(-)-N-formilputerina CDCl₃, 250 MHz	
Posição	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
C												
1	143,53	-	-	H-3; OCH_2O	143,53	-	-	H-3; OCH_2O	143,01	-	143,50	-
1a	114,10	-	-	-	114,10	-	-	-	117,31	-	113,60	-
2	147,03	-	H-3	OCH_2O	147,03	-	H-3	OCH_2O	146,84	-	146,50	-
3a	126,80	-	-	H-6a; 2H-7	126,80	-	-	H-6a; 2H-7	127,79	-	125,30	-
3b	126,40	-	H-6a	-	126,40	-	H-6a	-	125,60	-	125,70	-
7a	138,99	-	2H-7	H-9	138,95	-	2H-7	H-9	135,76	-	138,20	-
11	156,88	-	H-10	H-9	156,88	-	H-10	H-9	127,03	8,11 (d, 7,6)	156,40	-
11a	119,37	-	-	-	119,37	-	-	-	130,73	-	120,10	-
1’	156,89	-	-	-	154,95	-	-	-	155,80	-	161,90	-
CH				-				-				
3	107,83	6,75 (s)	-	-	107,83	6,75 (s)	-	-	107,58	6,59 (s)	107,30	6,56 (s)
6a	51,76	4,88 (dd, 13,0, 3,7)	2H-7	-	51,70	4,88 (dd, 13,0, 3,7)	2H-7	-	51,67	4,86 (dd, 13,7, 4,4)	49,10	4,89 (dd, 13,5, 3,75)
8	120,62	6,92 (d, 7,4)	-	H-10	120,62	6,92 (d, 7,4)	-	H-10	128,67	7,27 (m)	120,60	6,94 (d, 9,0)
9	129,58	7,29 (dd, 7,4, 8,3)	-	-	129,58	7,29 (dd, 7,4, 8,3)	-	-	127,78	7,54 – 7,28	128,90	7,25 (dd, 9,0, 7,5)
10	111,37	7,03 (d, 8,3)	H-9	H-8	111,37	7,03 (d, 8,3)	H-9	H-8	127,15	7,54 – 7,28	110,60	6,87 (d, 7,5)
CH_2												
4	29,79	2,67 (m)	-	H-3	29,79	2,67 (m)	-	H-3	30,35	2,82 (m, 4a) 2,61 (m 4b)	30,50	2,85 (ddd, 12,4, 2) ax 2,74 (ddd, 3,2, 2) eq
5	38,46	4,25 (m), 2,92 (m)	-	H-3; H-6a	38,46	4,25 (m), 2,92 (m)	-	H-3; H-6a	39,15	4,44 (m, 5a) 2,99 (m, 5b)	41,90	3,80 (ddd, 12,4, 2,0) eq 3,36 (ddd, 12,12, 3,0) ax
7	35,54	2,82 (dt, 13,8, 3,4) 2,70 (m)	-	-	35,54	2,82 (dt, 13,8, 3,4) 2,70 (m)	-	-	34,53	3,06 (m, 7a) 2,91 (m,7b)	34,50	3,05 (dd, 12,0, 3,7e) eq 2,69 (dd, 14,0, 13,5)ax
OCH_2O	100,67	6,05 (d, 1,0) 5,91 (d, 1,0)	-	-	100,67	6,05 (d, 1,0) 5,91 (d, 1,0)	-	-	100,89	6,10 (d, 1,5) 5,97 (d, 1,5)	100,30	5,88 (ABq, 1,5)
CH_2O-1’	-	-	-	-	61,36	4,10 (m)	3H-3’	-		-	-	-
CH_3						-						
MeO-11	56,01	3,84 (s)	-	-	56,01	3,84 (s)	-	-	-	-	55,60	3,89 (s)
CH_3O-1’	52,26	3,66 (s)	-	-	-	-	-	-	52,66	3,77 (s)	-	-
CH_3-3’	-	-	-	-	14,61	1,20 (t, 7,1)	CH_2O-1’	-	-	-	-	-

Figura 41 - Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 6,75 a 1,00 ppm



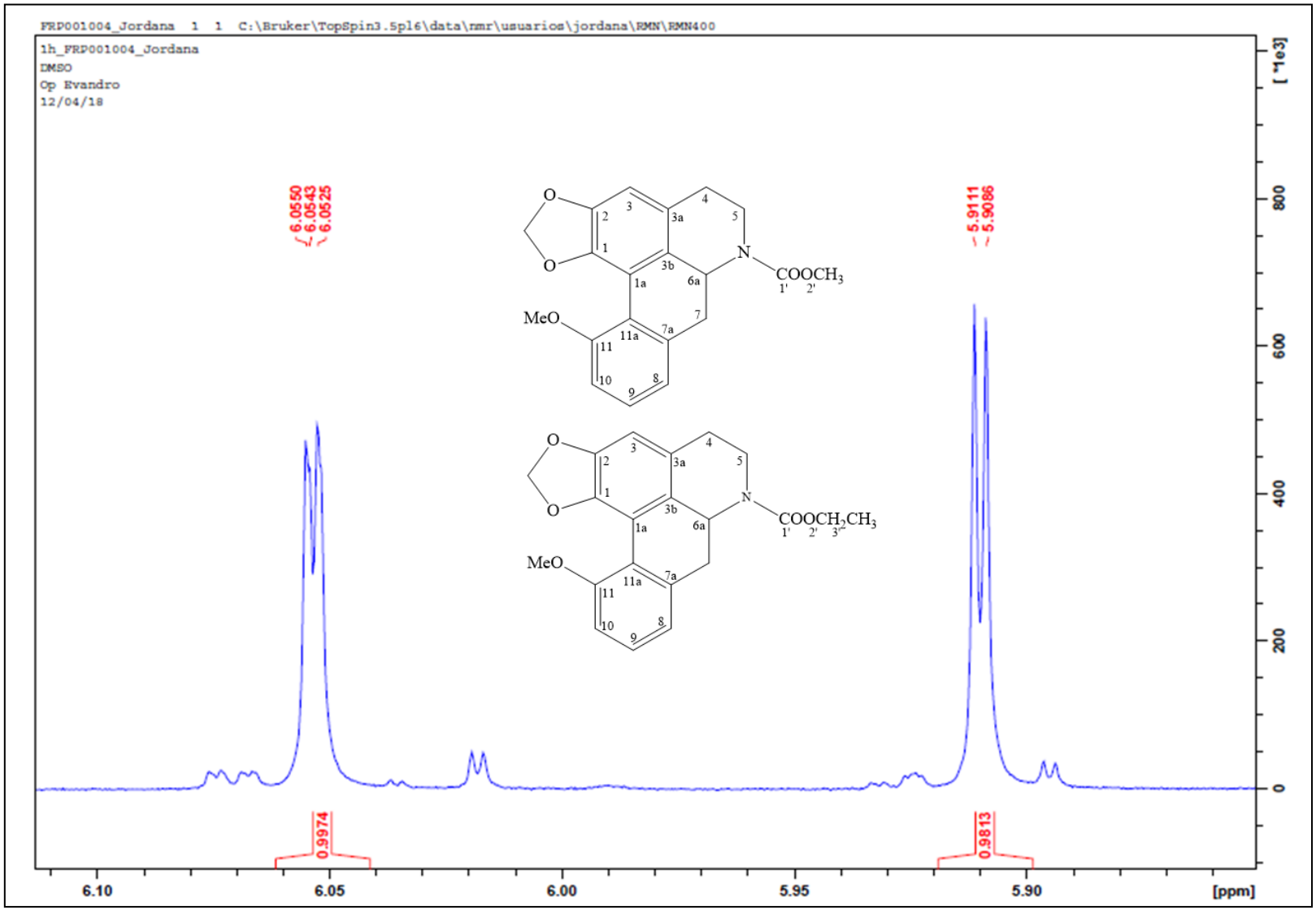
Fonte: Autor.

Figura 42 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 7,30 a 6,75 ppm



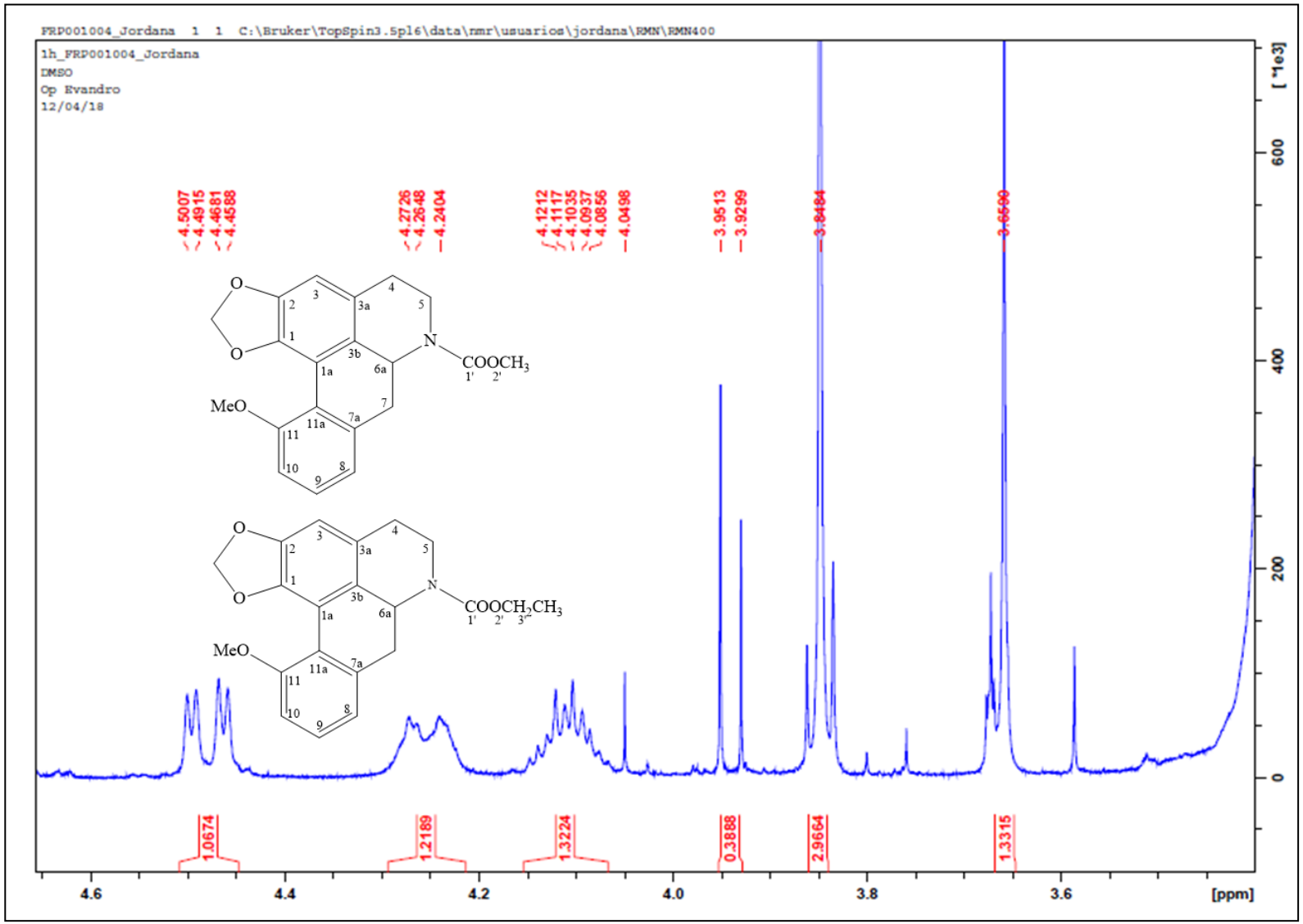
Fonte: Autor.

Figura 43 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 6,05 a 5,90 ppm



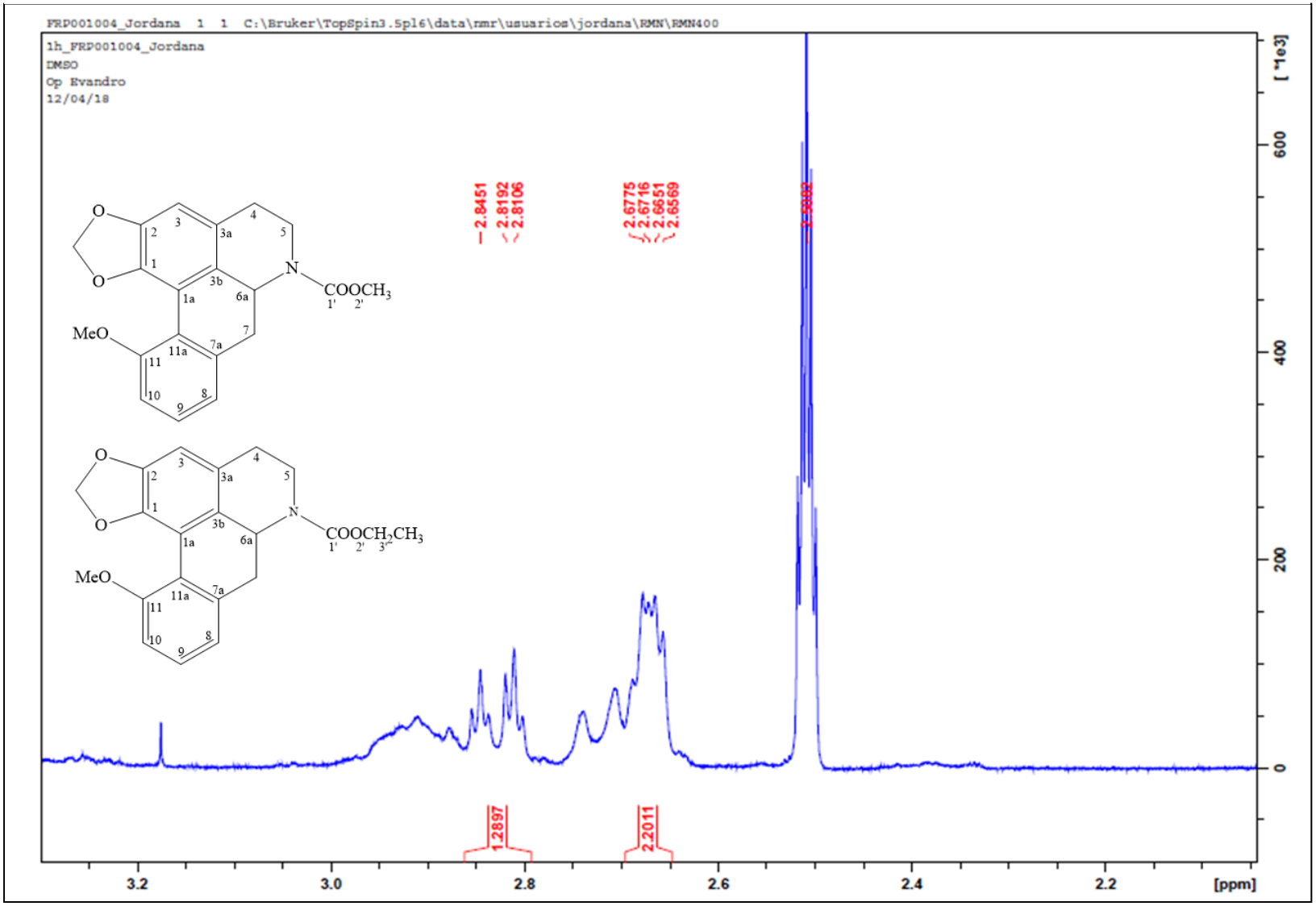
Fonte: Autor.

Figura 44 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 4,50 a 3,60 ppm



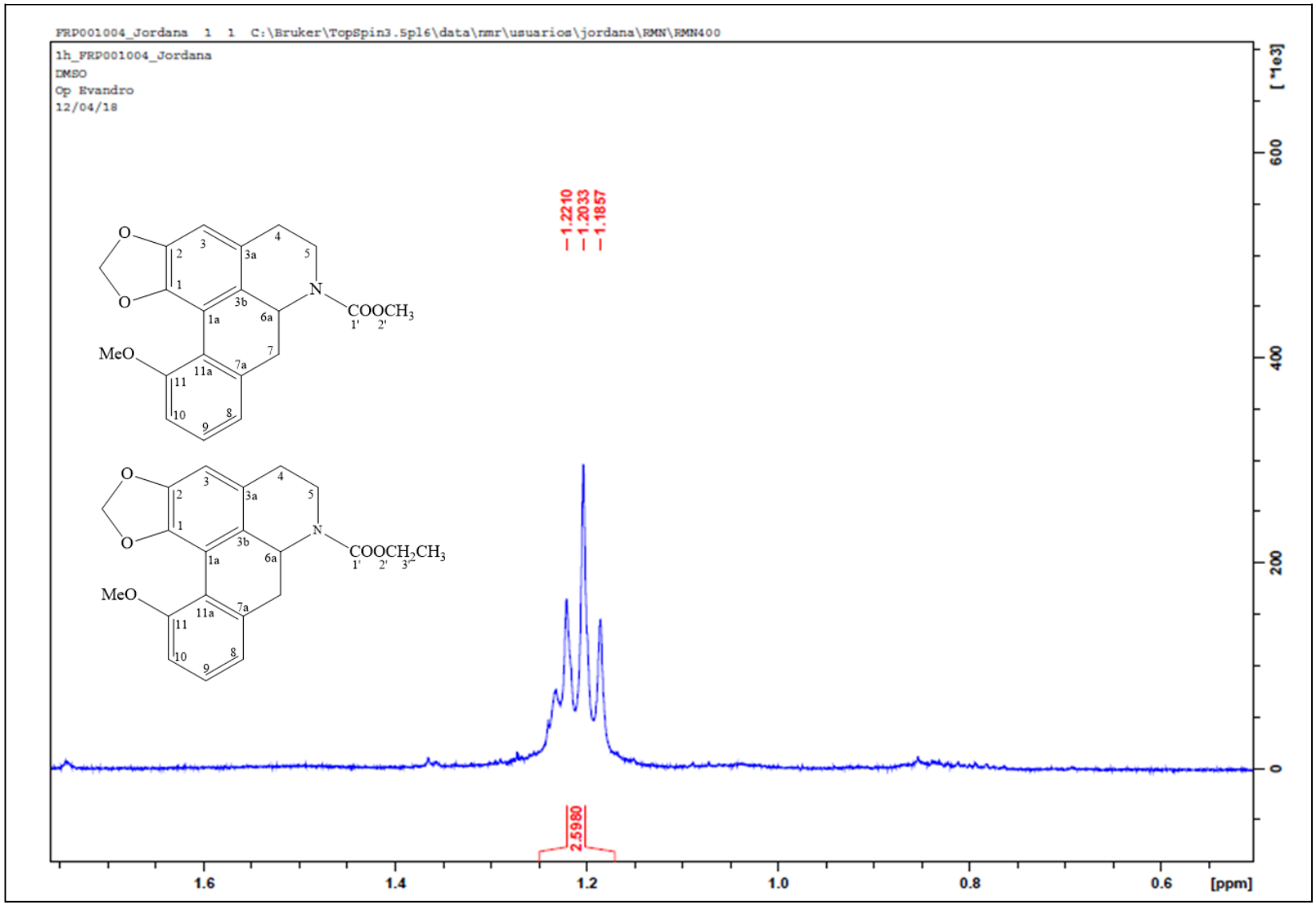
Fonte: Autor.

Figura 45 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 3,20 a 2,20 ppm



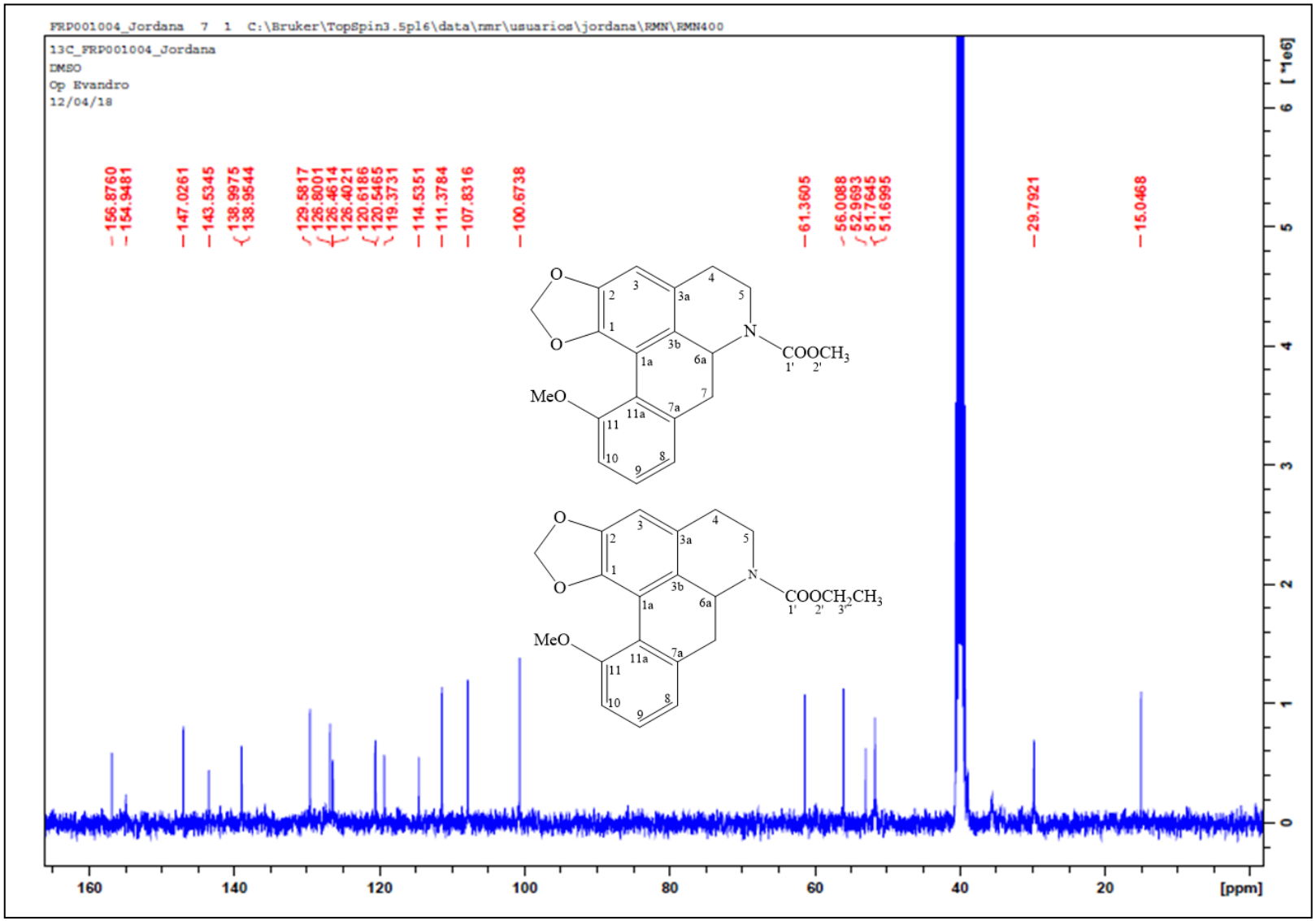
Fonte: Autor.

Figura 46 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 1,60 a 0,60 ppm



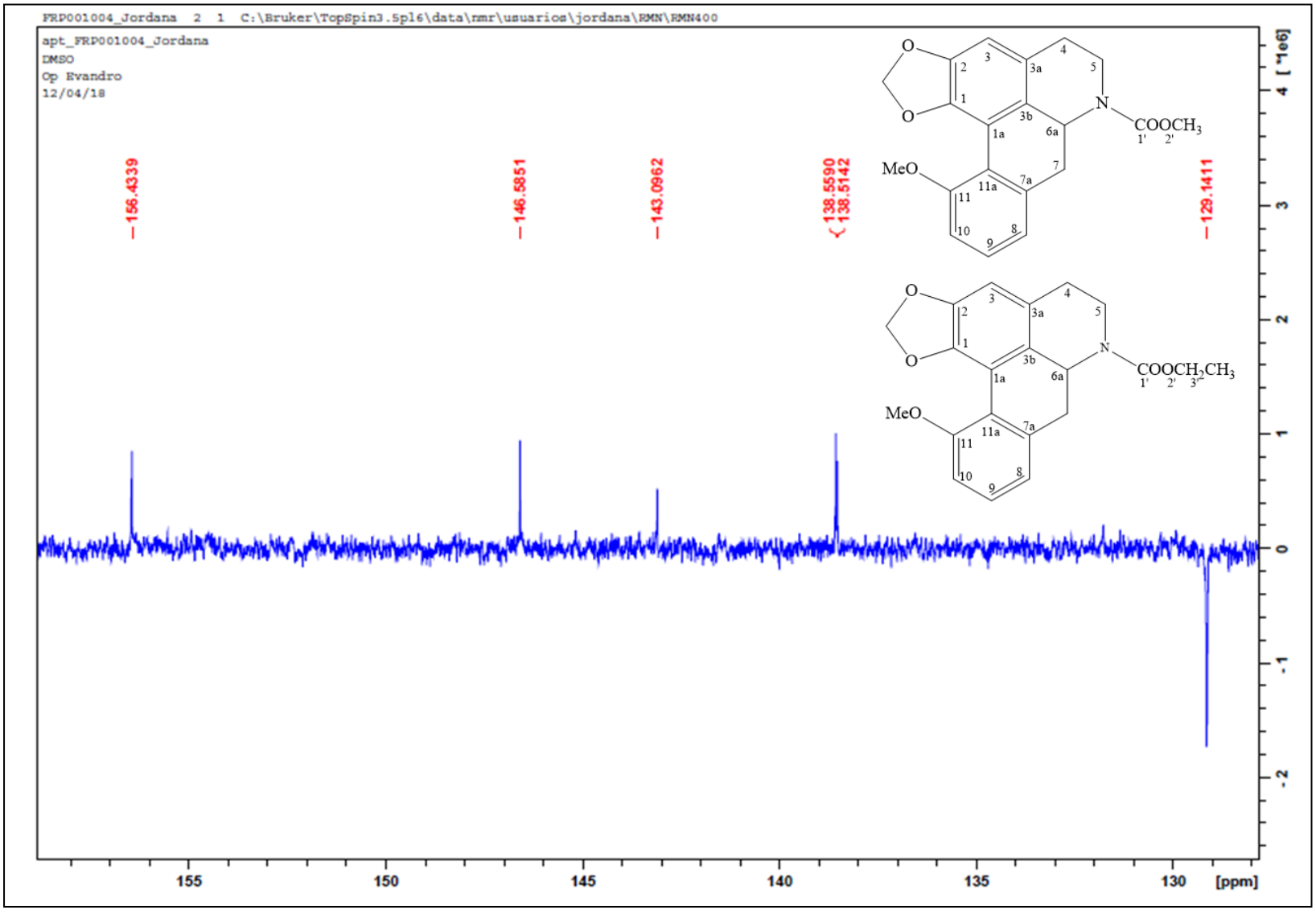
Fonte: Autor.

Figura 48 – Espectro de RMN de ^{13}C-APT (500 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 160 a 10 ppm



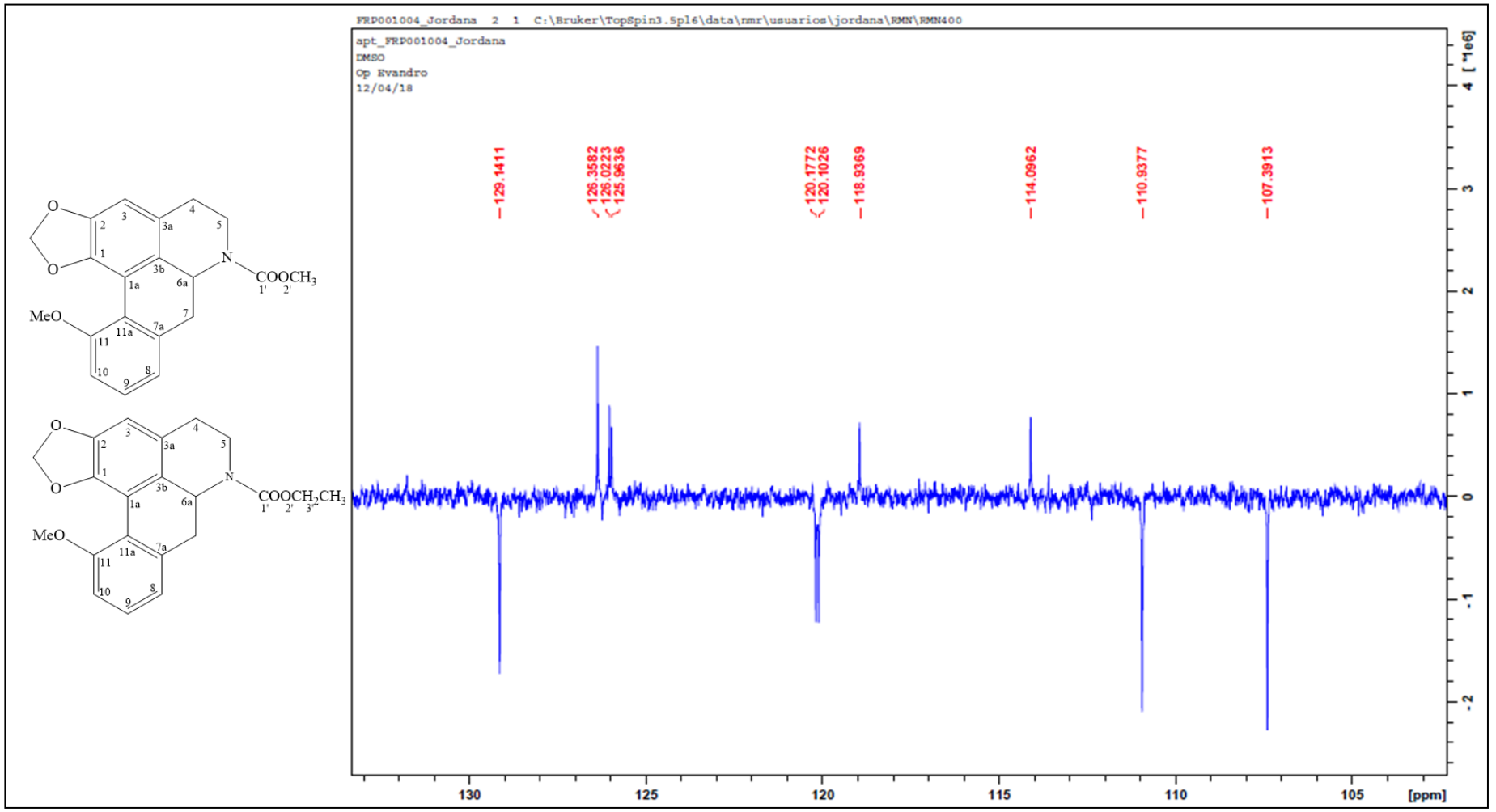
Fonte: Autor.

Figura 49 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (125 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 157 a 125 ppm



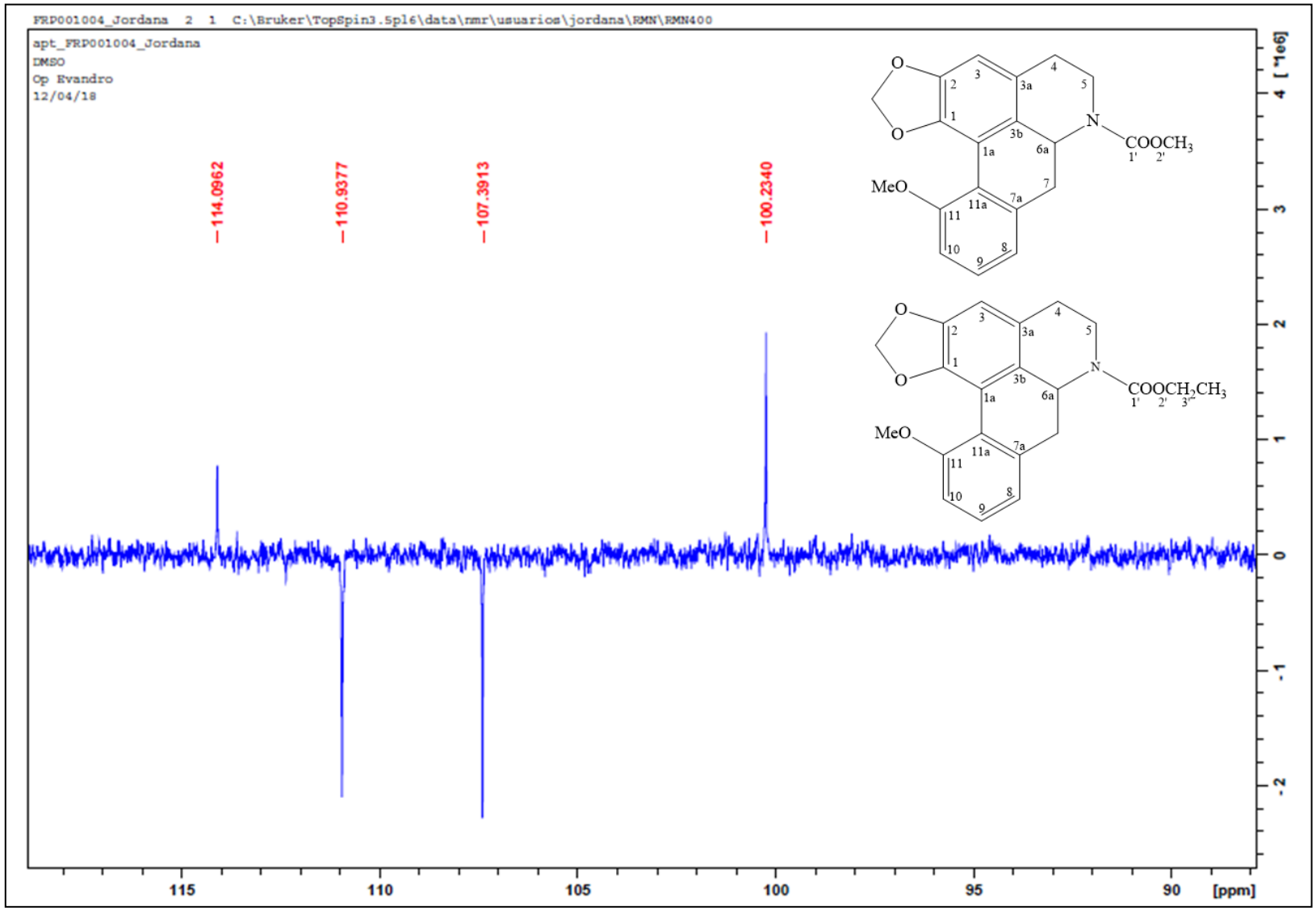
Fonte: Autor.

Figura 50 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (125 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 130 a 105 ppm



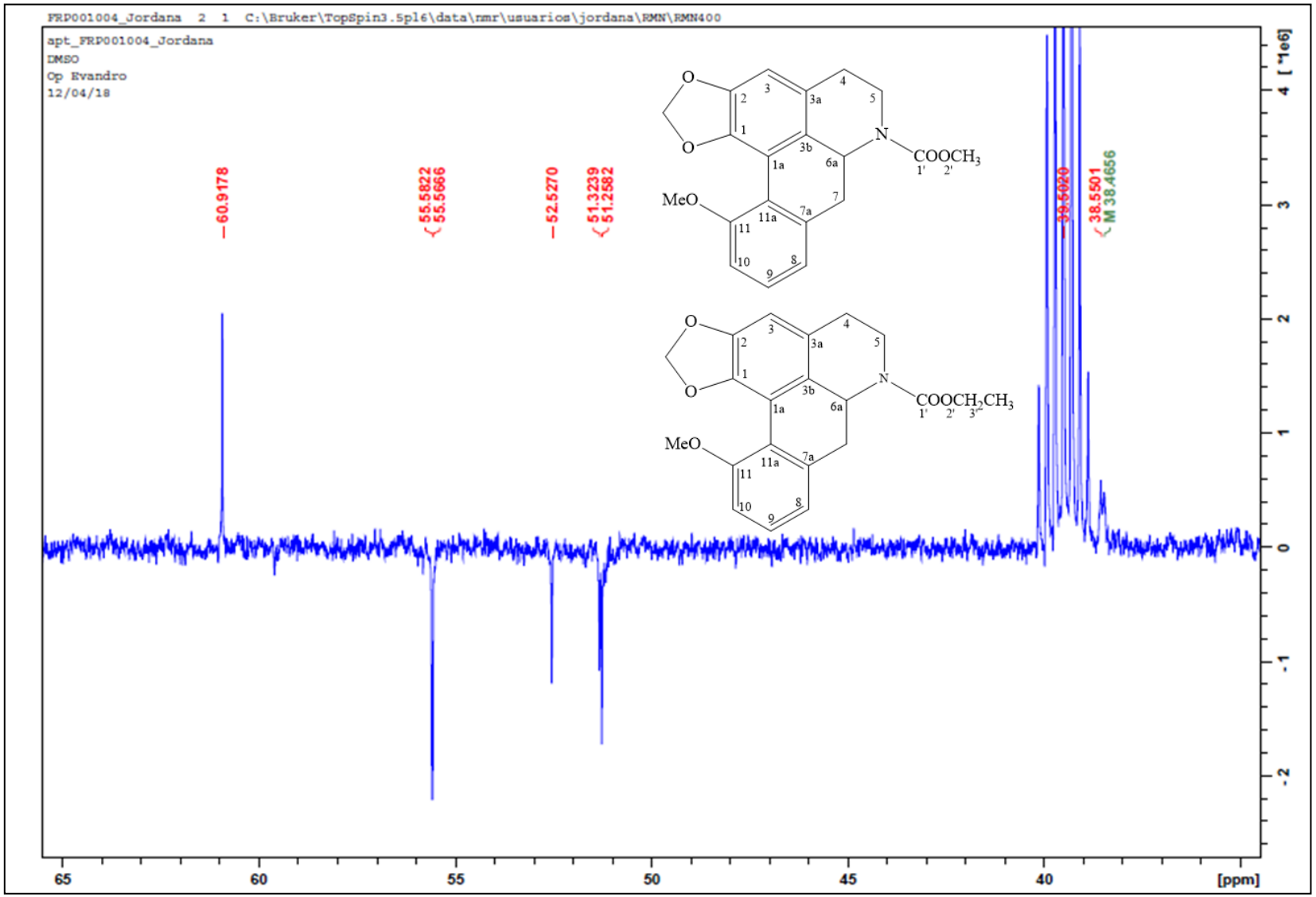
Fonte: Autor.

Figura 51 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (125 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 115 a 90 ppm



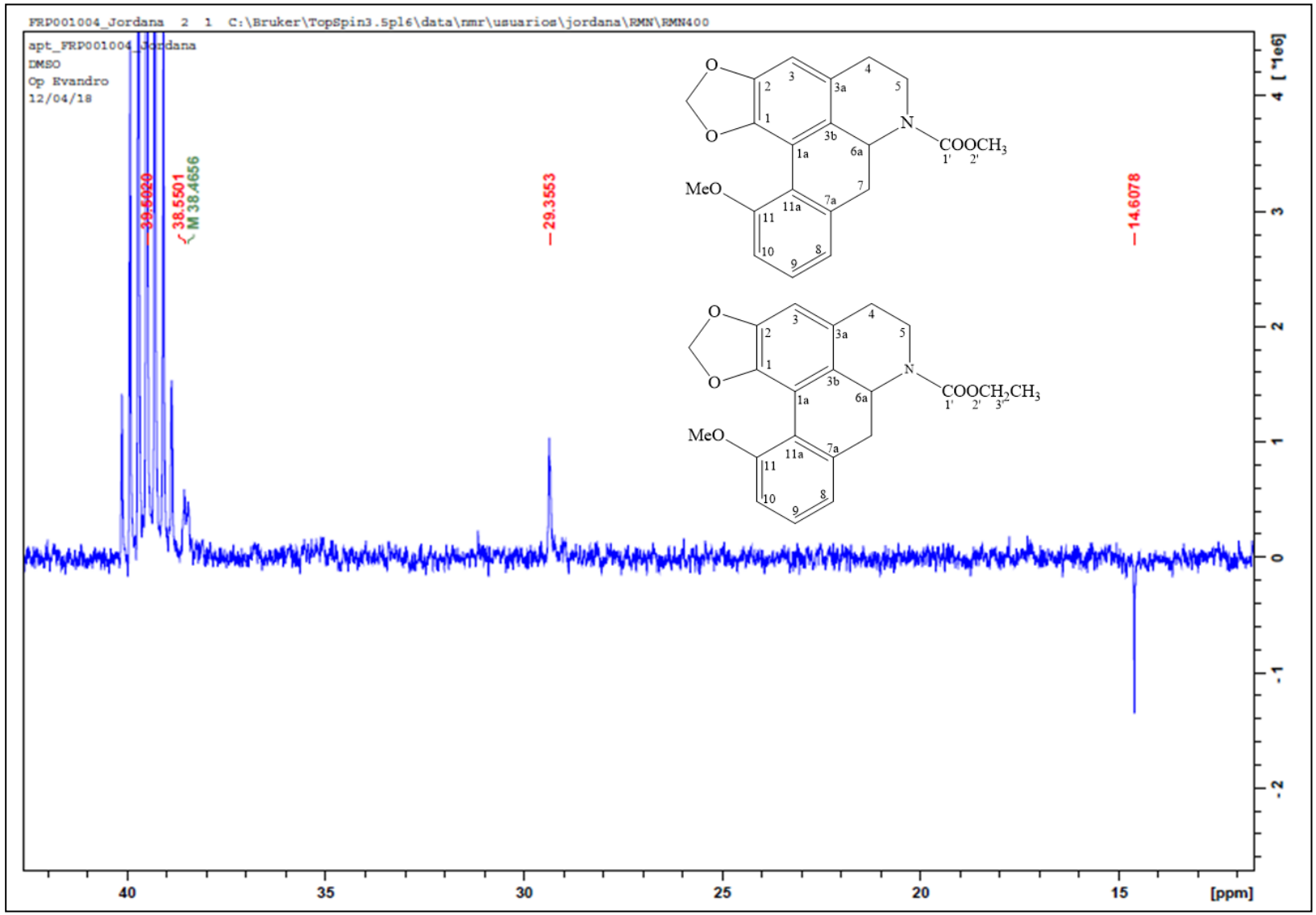
Fonte: Autor.

Figura 52 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (125 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 65 a 36 ppm



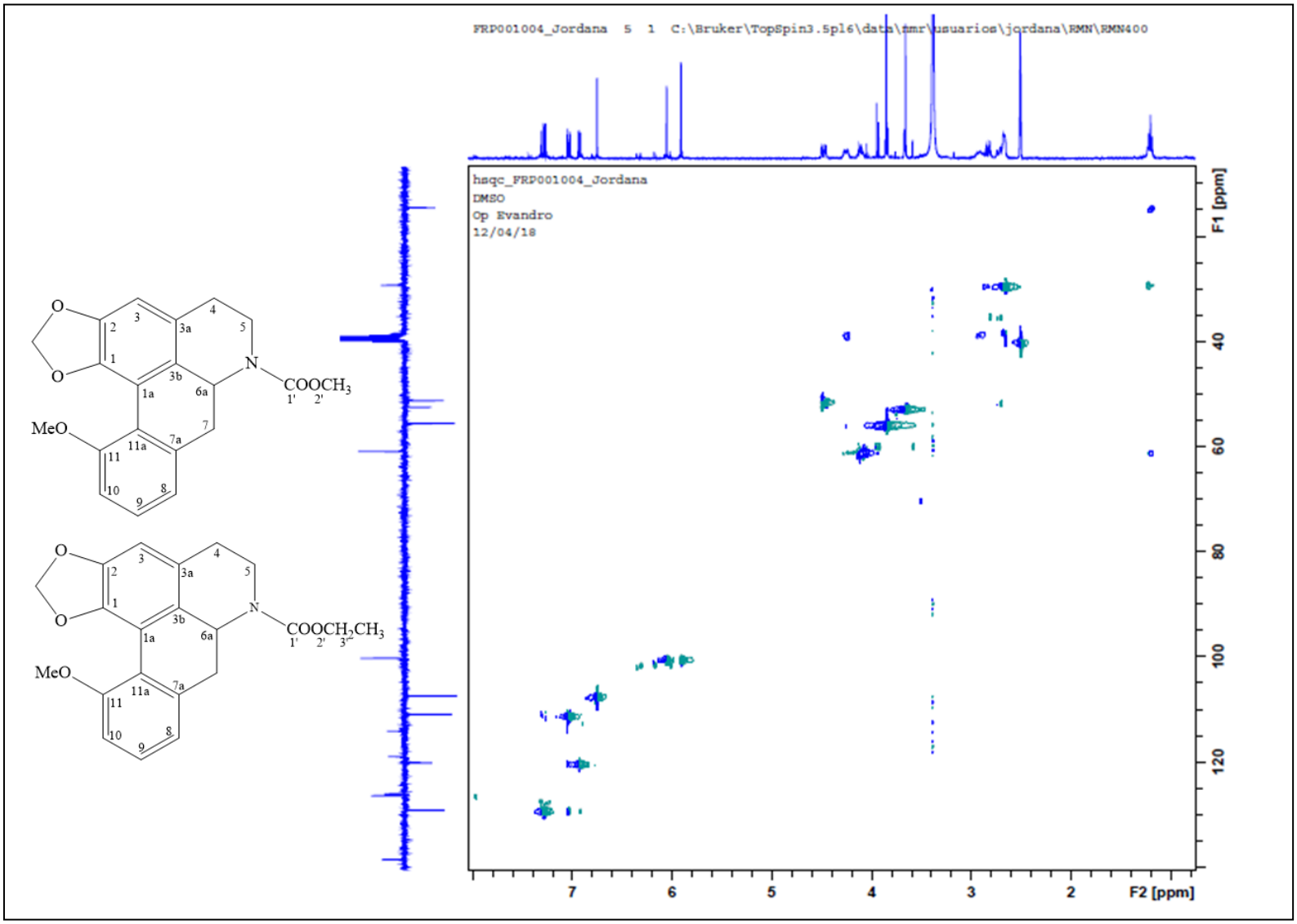
Fonte: Autor.

Figura 53 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (125 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 41 a 14 ppm



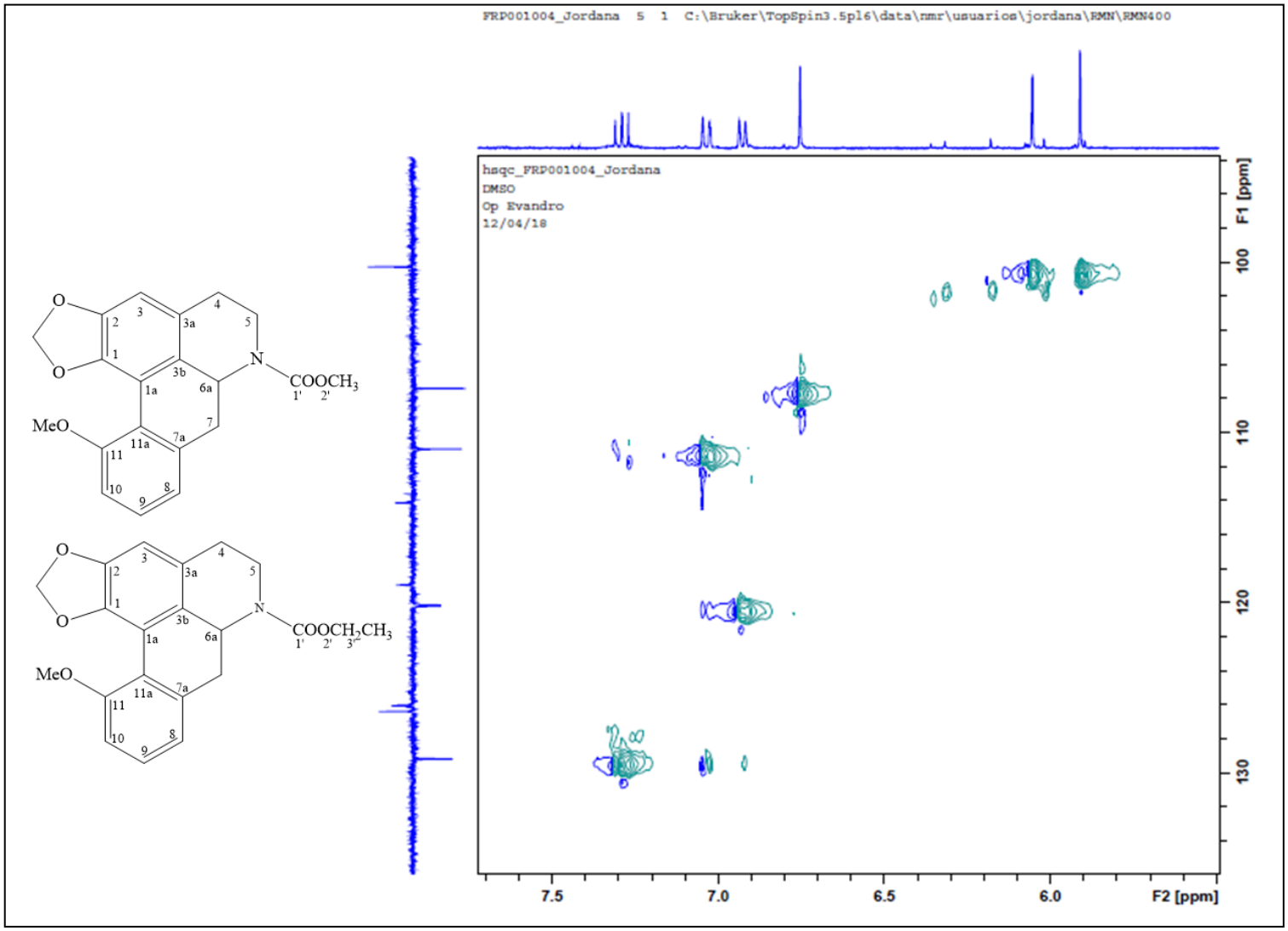
Fonte: Autor

Figura 54 – Espectro de HSQC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 7,5-1,0 x 130-25 ppm



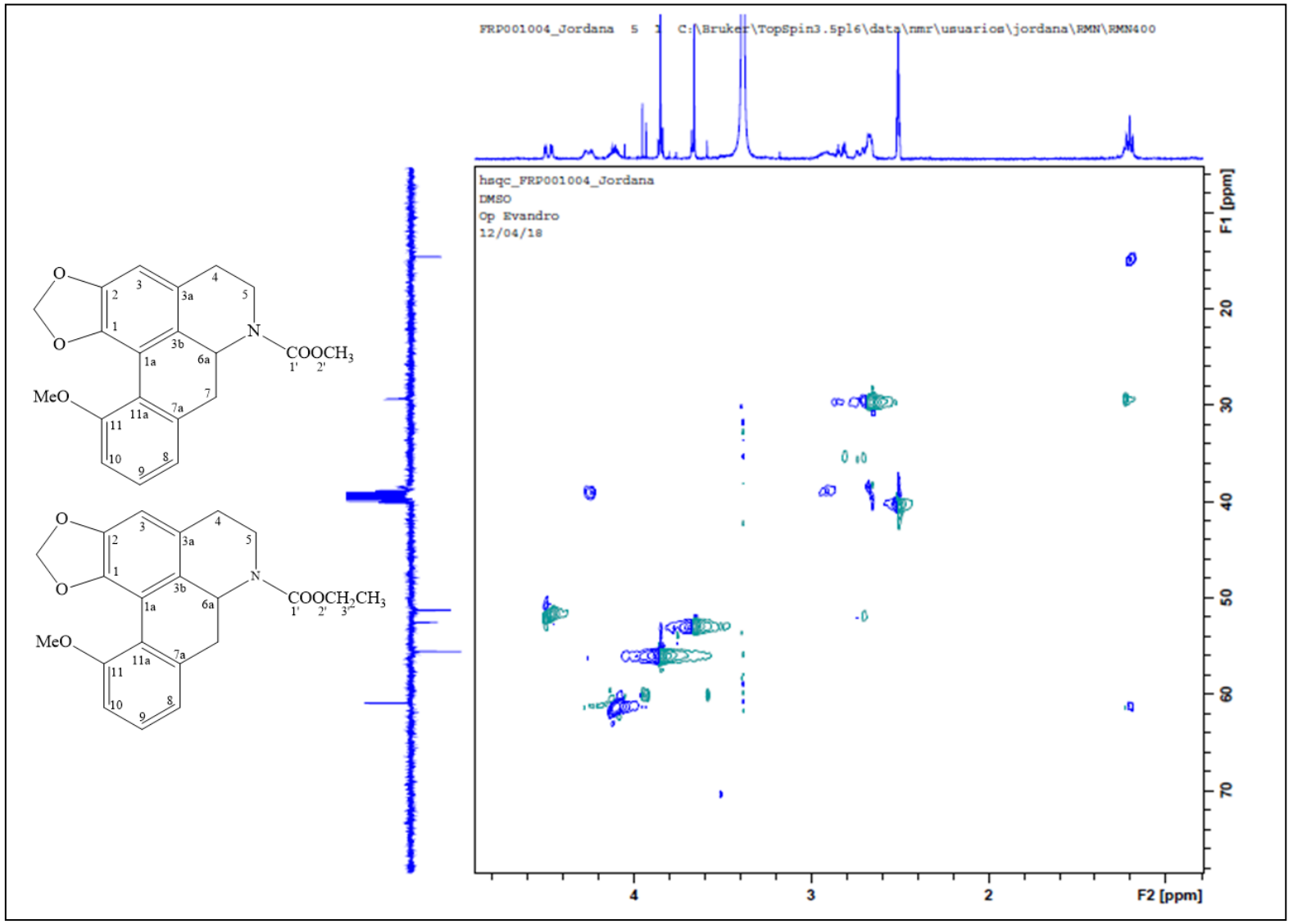
Fonte: Autor

Figura 55 – Expansão do espectro de HSQC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 7,5-5,5 x 136-96 ppm



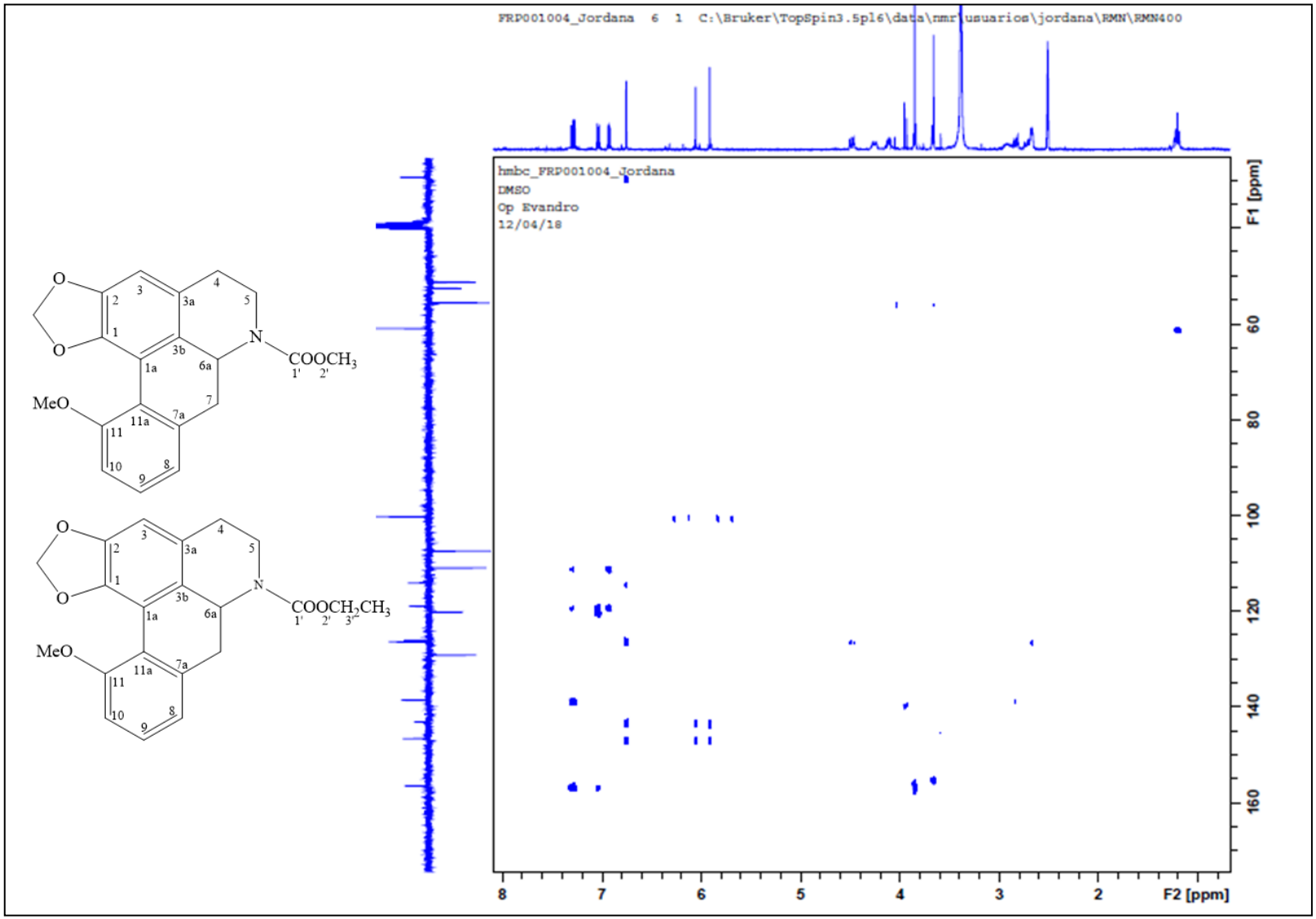
Fonte: Autor

Figura 56 – Expansão do espectro de HSQC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 4,8-1,0 x 78-10 ppm



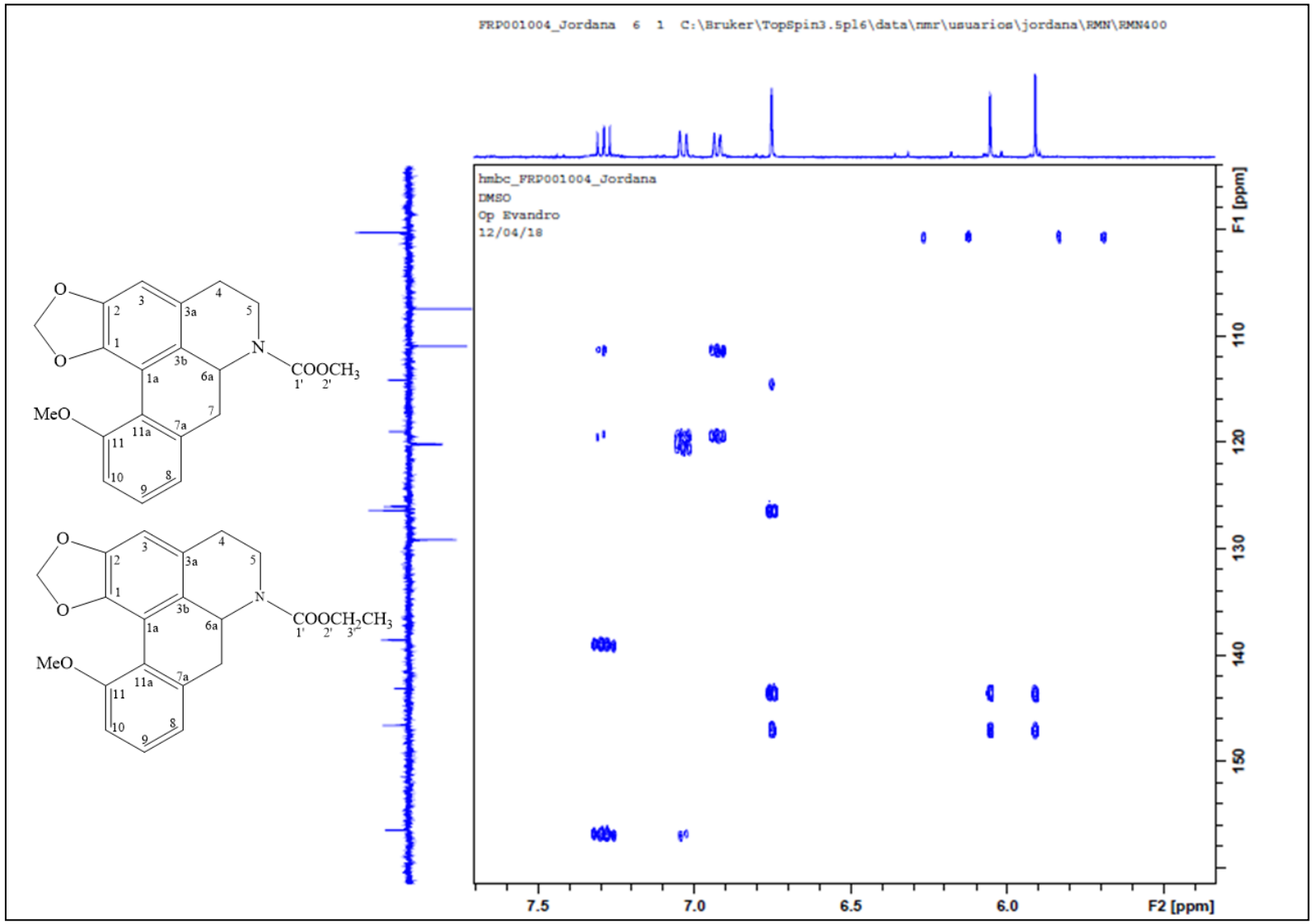
Fonte: Autor

Figura 57 – Espectro de HMBC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 8,0-1,0 x 165-55 ppm



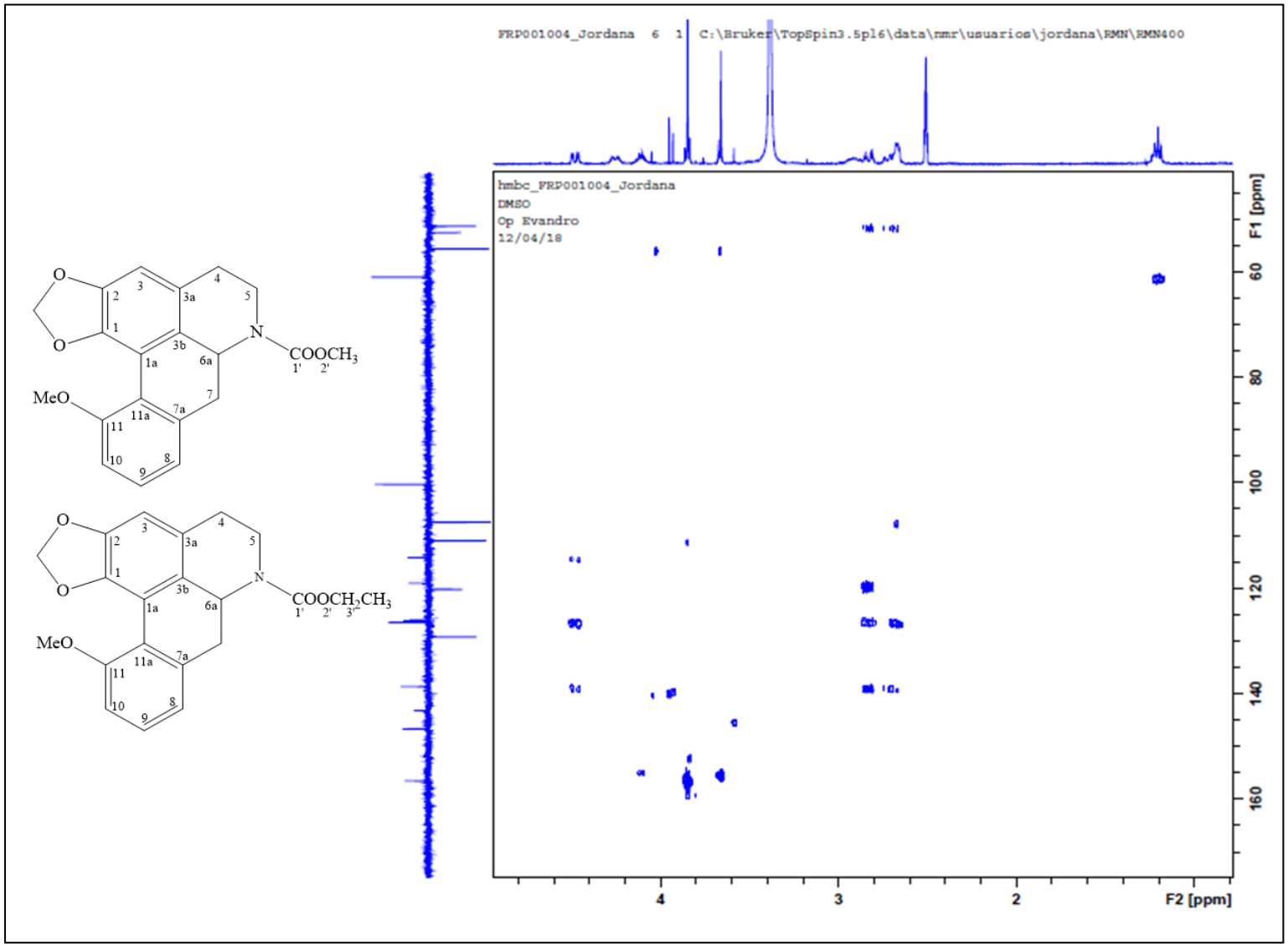
Fonte: Autor

Figura 58 – Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 7,5-5,0 x 160-96 ppm



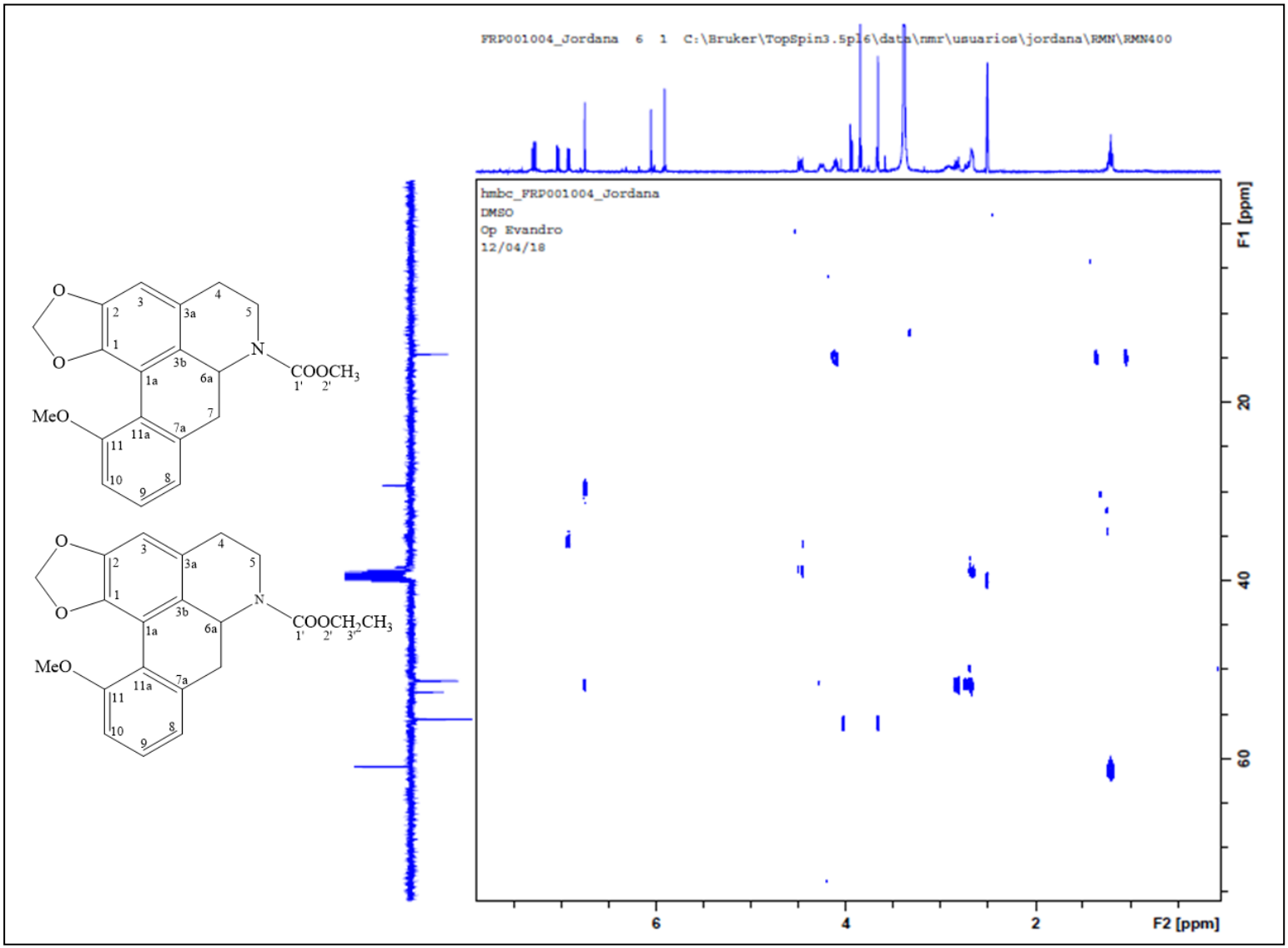
Fonte: Autor

Figura 59 – Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 4,8-1,0 x 165-55 ppm



Fonte: Autor

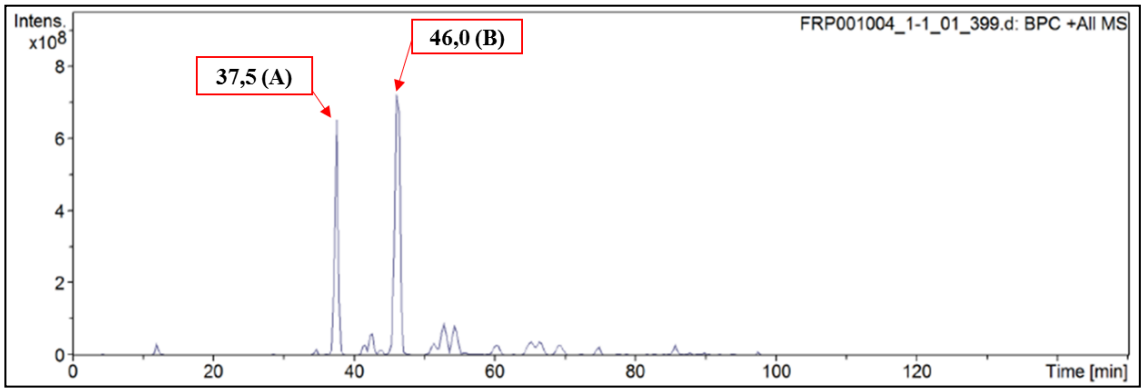
Figura 60 – Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, 100 MHz, DMSO-d_6) de Bs-2 na região de 6,5-1,0 x 70-1 ppm



Fonte: Autor

A análise por CL-EM da amostra Bs-2A apresentou um cromatograma contendo dois picos principais, em 37,5 min (Sassicina A) e 46,0 min (Sassicina B) (Figura 62, página 147), dos quais foram obtidos os espectros de massa, selecionando-se os dois íons com maior intensidade para fragmentações até terceira-ordem, MS^3. Ambos os picos observados no cromatograma apresentaram no espectro de massa íons com valor de *m/z* par (Figura 63, página 148; Figura 65, página 150), sugerindo, de acordo com a regra do nitrogênio (PAVIA *et al.*, 2010), a presença de nitrogênio na estrutura química dos compostos, o que possibilitou inferir se tratar de alcaloides.

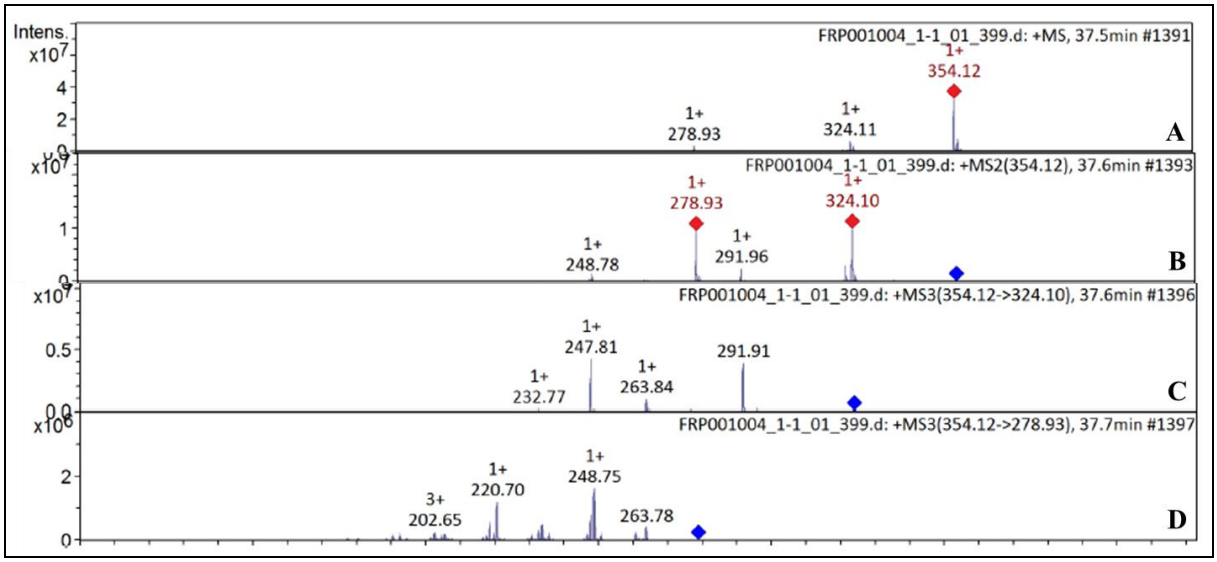
Figura 62 - Cromatograma obtido pela CL-EM da Bs-2 de *Brasilonema sp.*



Fonte: Autor.

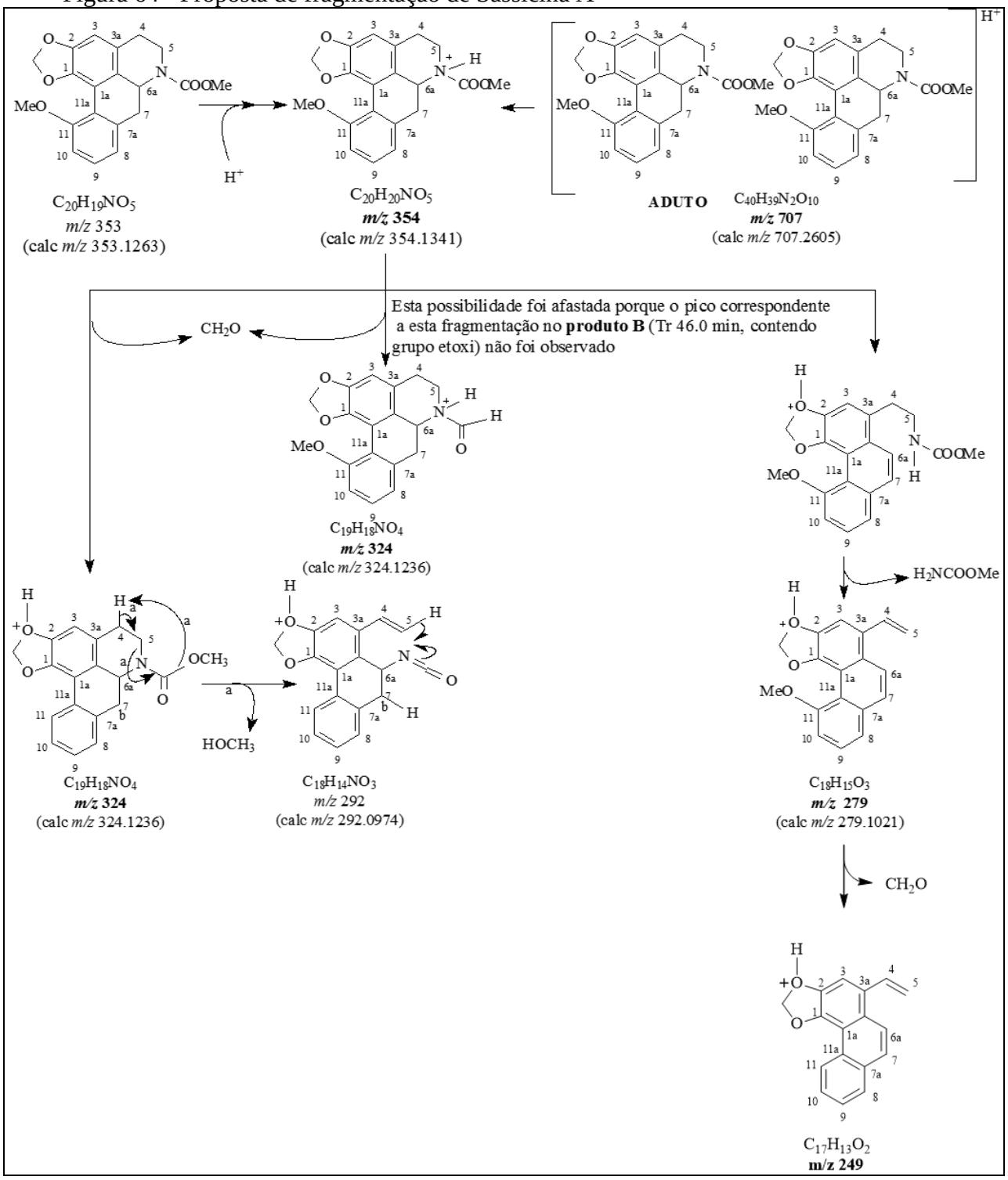
O espectro de massa do pico com tempo de retenção 37,5 min (Sassicina A) mostrou um sinal com *m/z* 354 (Figura 63-A, página 148). O espectro MS^2 deste íon mostrou sinais *m/z* 324 e 279 (Figura 63-B, página 148), com perdas de 30 e 75 Da, respectivamente, sendo atribuídas aos fragmentos CH_2O e $H_2NCOOMe$. O íon de *m/z* 324 apresentou em MS^3 o sinal com *m/z* 292, com perda de 32 Da (Figura 63-C, página 148), referente ao fragmento $HOCH_3$. Por sua vez, o espectro MS^3 do íon *m/z* 279 mostrou perda de 30 Da (Figura 63-D, página 148), relativo ao fragmento CH_2O. A proposta de fragmentação demonstrado na figura 64 (página 149) explica como ocorre a formação dos íons, corroborando dessa forma com a estrutura de Sassicina A sugerida por meio dos dados de RMN.

Figura 63 - Espectro de massas de baixa resolução, modo positivo $[M+H]^+$ em 37,5 min da Sassicina A



Fonte: Autor

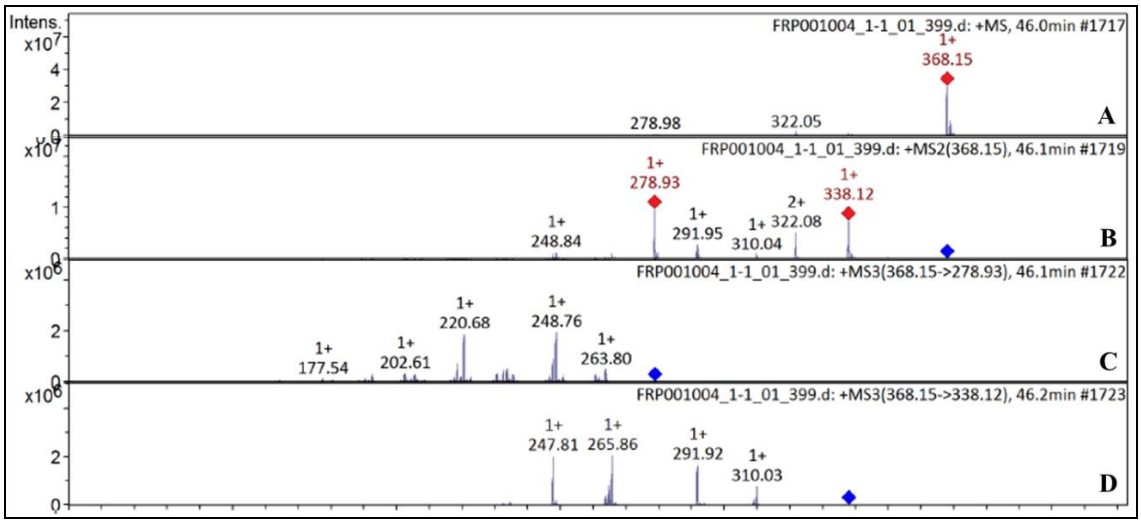
Figura 64 - Proposta de fragmentação de Sassicina A



Fonte: Autor.

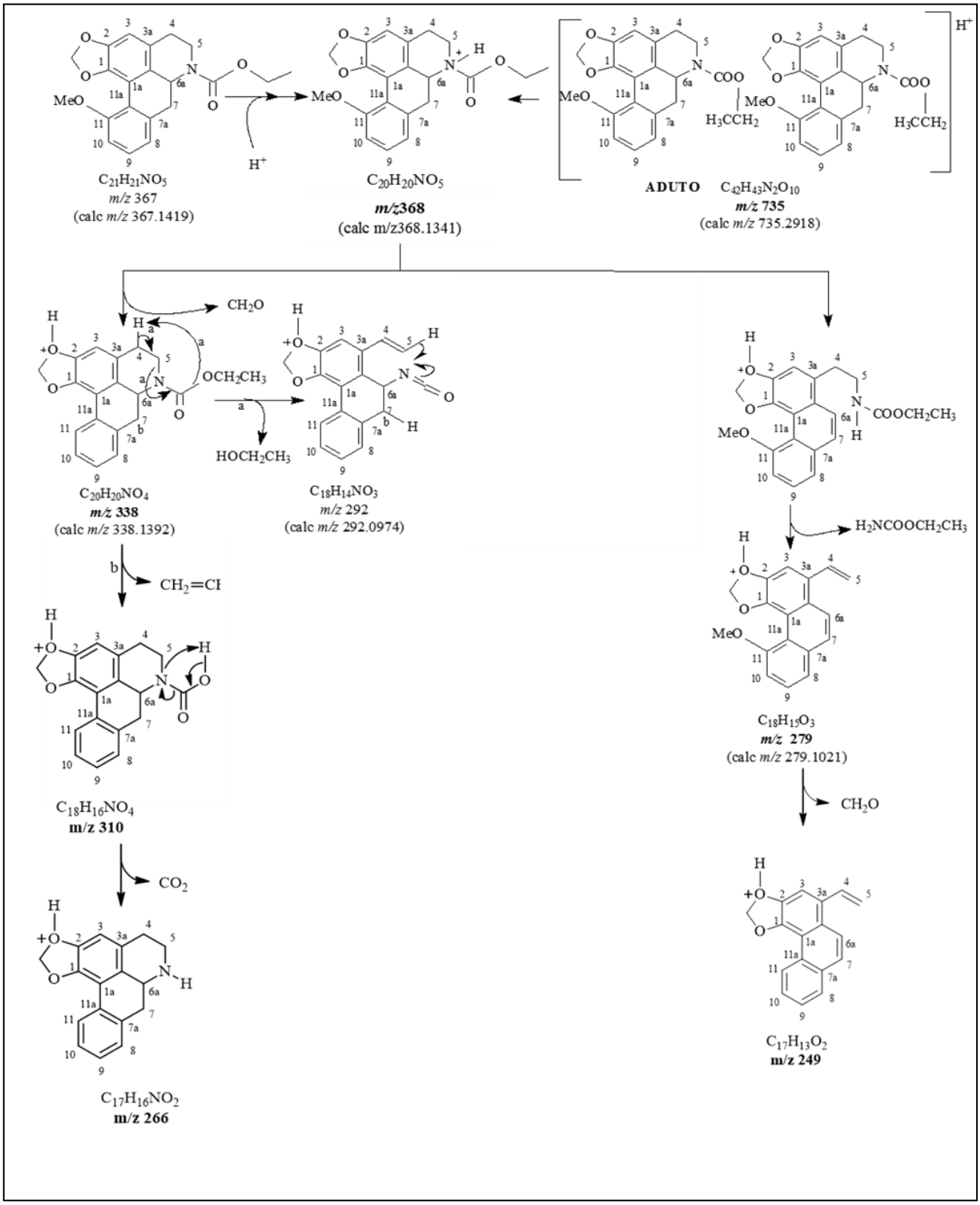
Com relação ao espectro de massa do pico em 46,0 min (Sassicina B) mostrou um sinal com *m/z* 368 (Figura 65-A, página 150). Seu espectro MS^2 apresentou sinais com *m/z* 338 e 279 (Figura 65-B, página 150), com perdas de 30 e 89 Da, respectivamente, relativas aos fragmentos CH_2O e $H_2NCOOCH_2CH_3$. O íon de *m/z* 338 apresentou em MS^3 a perda de 46 Da, referente ao fragmento $HOCH_2CH_3$, já que formou o íon *m/z* 292 (Figura 65-D, página 150). Ainda em MS^3, a fragmentação daquele o íon mostrou os sinais de *m/z* 310 e 266, relativas às perdas sequenciais de 28 e 44 Da, atribuídas aos fragmentos CH_2CH_2 e CO_2, respectivamente (Figura 65-D, página 150). Com relação ao íon *m/z* 279, assim como ocorreu no caso da substância Sassicina A, seu espectro MS^3 mostrou perda de 30 Da, fragmento CH_2O, uma vez que gerou o sinal de *m/z* 249 (Figura 65-C, página 150). A Figura 66 (página 151) demonstra a proposta de fragmentação de Sassicina B, reforçando a estrutura desta, sugerida por meio dos dados de RMN.

Figura 65 - Espectro de massas de baixa resolução, modo positivo $[M+H]^+$ em 46,0 min de Sassicina B



Fonte: Autor

Figura 66 - Proposta de fragmentação de Sassicina B

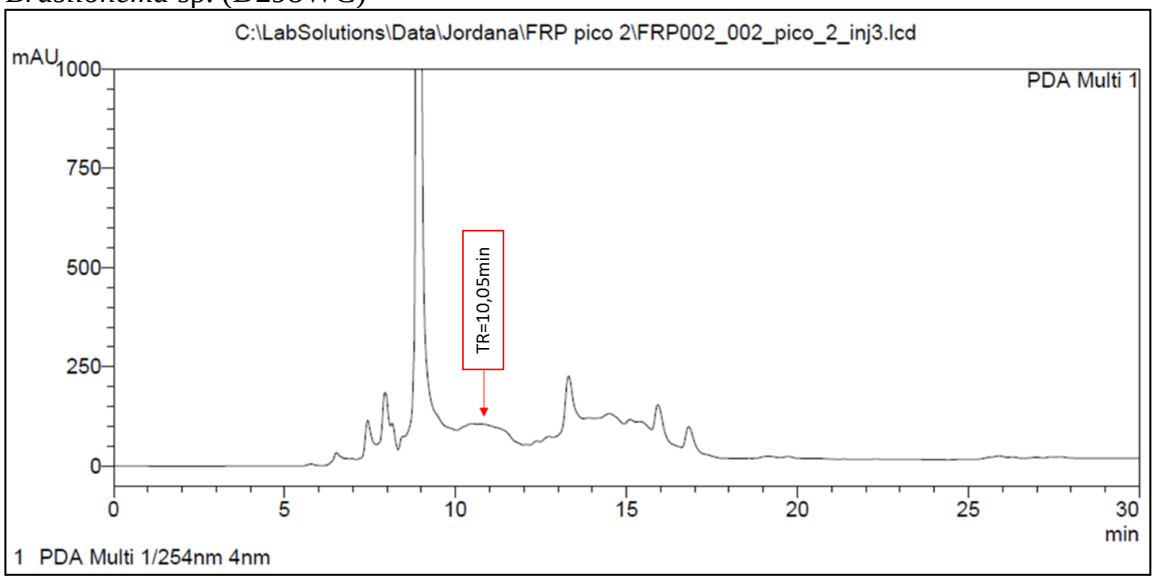


Fonte: Autor.

5.12 Caracterização estrutural de Bs-3

A substância codificada como Bs-3 apresentou-se na forma de um líquido marrom escuro (10,5 mg) e foi isolada após processo cromatográfico (CLAE preparativa) (Figura 67 – página 152), a partir da fração Fr.40%-MP2-pico-2 da linhagem *Brasilonema sp*. (D298WC), com o tempo de retenção de 10,05 minutos.

Figura 67 - Cromatograma da fração e Fr.40%-MP2-pico-2 em CLAE Preparativa de *Brasilonema* sp. (D298WC)



Fonte: Autor.

O espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) (Figura 68, página 157) e de RMN ^{13}C –APT (100 MHz, MeOH-d_6) (Figura 83, página 172), bem como suas expansões (Figuras 84 a 86, páginas 173 a 175), exibiram um conjunto de sinais com alta multiplicidade, levando a sugerir que Bs-3 se tratava de uma mistura de substâncias. Essas substâncias foram codificadas como Bs-3A, Bs-3B, Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E.

5.12.1 Caracterização estrutural de Bs-3A e Bs-3B

A partir da análise do espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) (Figura 68, página 157) e suas expansões (Figuras 69 a 82, páginas 158 a 171) foi possível observar sinais entre δ_H 8,01 – 5,92 e δ_H 6,26–1,60, característicos de uma base nitrogenada (citosina ou uracila) e um açúcar (ribose), respectivamente, típicos de estrutura que compõem um nucleosídeo (PEREIRA, 1994).

A sugestão foi fortalecida ao ser observado dois dubletos em δ_H 8,01 (d, *J*=7,6) (Figura 69, página 158) e 5,92 (d, *J*=7,6) (Figura 72, página 161), sugestivos de hidrogênios vinílicos das posições H – 3 e H – 4 da base nitrogenada, indicando a presença de um sistema AX que poderia ser de um núcleo do tipo citosina ou uracila (PEREIRA, 1994).

A presença de um duplo dubleto em δ_H 6,26 (dd, *J*=6,8 e 6,4) (Figura 72, página 161) pôde ser inferido ao hidrogênio anomérico, fortalecendo a presença de uma unidade osídica (H – 1') na estrutura em questão. A multiplicidade deste sinal permitiu sugerir que há hidrogênios metilênicos na posição H – 2' do açúcar. Somado a isto, absorções visualizadas em δ_H 4,37 (dd, *J*=6,4 e 3,6), δ_H 3,94, δ_H 1,80-1,60 e δ_H 3,95-3,70 (Figuras 73 a 82, página 162 a 171) foram atribuídas as posições H – 3', H – 4', H – 2' e H – 5', respectivamente, de uma unidade de ribose (PEREIRA, 1994; JONES *et al.*, 1970).

O espectro de RMN ^{13}C-APT (Figura 83, página 172) e suas expansões (Figuras 84 a 86, páginas 173 a 175) apresentaram diversos sinais que com o auxílio dos espectros bidimensionais heteronucleares de HSQC e HMBC, foi possível sugerir e confirmar nove sinais de carbono na substância. Assim, observou-se dois sinais para carbonos não hidrogenados em δ_C 158,0 (C – 1) e δ_C 167,1 (C – 5) (Figura 84, página 173) indicando que é uma base nitrogenada do tipo citosina, cinco absorções para carbonos metínicos em δ_C 142,5 (C – 3), δ_C 95,7 (C – 4), δ_C 87,2 (C – 1'), δ_C 71,7 (C – 3') e δ_C 88,5 (C – 4') (Figuras 84 e 85, páginas 173 e 174) e dois sinais para carbonos metilênicos em δ_C 41,3 (C – 2') e δ_C 62,4 (C – 5') (Figura 85 e 86, páginas 174 e 175) (JONES *et al.*, 1970).

A análise dos espectros de HSQC (Figura 87, página 176) e suas expansões (Figuras 88 e 89, páginas 177 a 178) demonstraram correlações diretas entre hidrogênios e carbonos, destacando-se as correlações do sistema AX entre H – 3 (δ_H

8,01) com o C – 3 (δ_C 142,5), H – 4 (δ_H 5,92) com o C – 4 (δ_C 95,7) e do H – 1’ (δ_H 6,26) com o C – 1’ (δ_C 87,6).

O espectro de HMBC (Figura 90, página 179) e suas expansões (Figura 91 a 94, páginas 180 a 183) confirmaram a inserção da unidade osídica na base nitrogenada em H – 1’ (δ_H 6,26) a ^3J com C-1 (δ_C 158,0) e a ^3J com C-3 (δ_C 142,5). Também foi possível observar correlações do H – 1’(δ_H 6,26) a ^2J com C-2’ (δ_C 41,3) e a ^3J com C-3’ (δ_C 71,7) e C-4’ (δ_C 88,5) (Figuras 92 e 93, páginas 181 e 182).

Assim, após análise dos espectros de ^{1}H, ^{13}C APT, HSQC e HMBC, essa substância foi codificada como Bs-3A.

Adicionalmente aos dados acima evidenciados no espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) (Figura 68, página 157)), foi possível inferir a presença de outro nucleosídeo a partir dos seguintes sinais observados em δ_H 8,00 (d, *J*=8,0, H – 3) e δ_H 5,71 (d, *J*=8,0, H – 4) do núcleo citosina. A proposta de uma unidade osídica na estrutura em questão deu-se pelos sinais δ_H 5,91 (d, *J*=4,8H – 1’), δ_H 4,19 (t, H – 2’), δ_H 4,17 (t, H – 3’), δ_H 4,01 (m, H – 4’) e δ_H 3,95 – 3,70 (H – 5’).

Percebe-se uma diferença na multiplicidade e deslocamento químico do hidrogênio anomérico da substância em questão quando comparada com Bs-3A. Dessa forma, foi evidenciado um diferente padrão de substituição da unidade de ribose. Por sua vez, essa substância foi codificada como Bs-3B.

O espectro de RMN ^{13}C APT (Figura 83, página 172) e suas expansões (Figuras 84 a 86, páginas 173 a 175) permitiu identificar dois carbonos não hidrogenados δ_C 153,0 (C – 1) e δ_C 167,1 (C – 5), seis carbonos metínicos δ_C 142,7 (C – 3), δ_C 102,4 (C – 5), δ_C 90,3 (C – 1’), δ_C 75,4 (C – 2’), δ_C 71,0 (C – 3’) e δ_C 86,0 (C – 4’) e um carbono metilênicos δ_C 61,9 (C – 5’).

O espectro de HMBC (Figura 90, página 179) e suas expansões (Figura 91 a 94, páginas 179 a 183) confirmaram a inserção da unidade de ribose na base nitrogenada em H – 1’ (δ_H 5,91) a ^3J com C-1 (δ_C 153,0) e C-3 (δ_C 142,7). Também foi possível observar correlações do H – 3 (δ_H 8,00) a ^3J com C-1’ (δ_C 90,3) e C-5 (δ_C 61,9).

Assim, após a análise dos espectros e a comparação com dados da literatura concluiu-se que Bs-3A se tratava de um nucleosídeo denominado desoxicitidina (Tabela 16, página 156) e Bs-3B de outro nucleosídeo chamado de citidina (Tabela 17, página 156), ambos isolados pela primeira vez em cianobactéria.

Biologicamente, os nucleosídeos, compostos de natureza muito apolar, consistem de uma base de purina ou pirimidina e uma ribose e são essenciais para

muitos processos da vida, pois são blocos de construção para DNA (açúcar desoxirribose) e RNA (açúcar ribose), sendo então necessários para a replicação do genoma e a transcrição da informação genética em RNA (SPARKMAN *et al.*, 2011). A pirimidina é um anel aromático de seis membros que possui átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3. As pirimidinas mais abundantes são o uracila; U, encontrado no RNA; cistosina, C, encontrada tanto no RNA quanto no DNA; e timina, T, encontrada no DNA (OUELLETTE; RAWN, 2018).

De uma maneira geral, trabalhos voltados para o isolamento de nucleosídeos de cianobactérias ainda estão escassos na literatura de produtos naturais. No Brasil, Silva (2016), realizou isolamento de substâncias da linhagem de cianobactéria marinha *Geitlerinema* sp. CENA556, dentre as quais, cinco foram os nucleosídeos 2'-deoxiuridina, timidina, 2'-deoxiadenosina e uridina, conhecidos, porém também isolados pela primeira vez para cianobactérias.

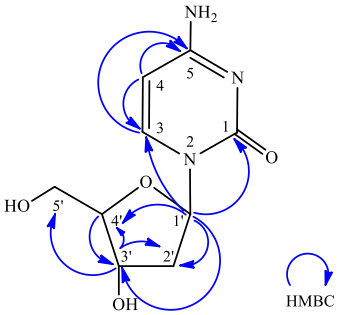
Sobre as aplicações, a desoxicitidina vem sendo aplicada em pesquisa e desenvolvimento (HOSAMANI *et al.*, 2016) e também como intermediário farmacêutico (SABLÓN-CARRAZANA *et al.*, 2007).

A citidina, por sua vez, tem sido usada na área de cosmetologia, como ingrediente em meio de cultura de células humanas, em pesquisa e desenvolvimento e como intermediário farmacêutico (JAHNZ-WECHMANN *et al.*, 2016; BASWAN *et al.*, 2019ª, 2019b; KUMAR *et al.*, 2019).

Baswan *et al.* (2019a), em estudo clínico randomizado, determinaram os efeitos clínicos da aplicação tópica de citidina nas regiões hiperpigmentadas da face e o estudo demonstrou com sucesso a eficácia da citidina na despigmentação da pele de maneira dose-dependente.

Em outro estudo Baswan *et al.* (2019b), confirmaram que a citidina pode efetivamente reduzir o conteúdo de melanina em um ensaio de equivalência de pele, e sugeriram que a citidina pode ser um ótimo candidato para um agente clareador da pele humana.

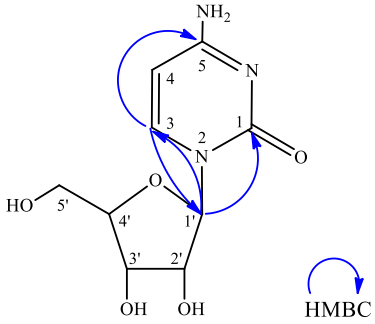
Tabela 16 - Dados de RMN de HSQC e HMBC (δ, MeOH-d_6, 400 MHz, 100 MHz) de Bs-3A em comparação com dados de Jones (1970)



	Bs-3A				Desoxicitidina (Literatura)
	HSQC		HMBC		DMSO-d_6, 60MHz
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C
C					
1	158	-	-	H-1'd; H-3	157,00
5	167,19	-	H-4	H-3	166,96
CH					
3	142,59	8,01 (d, 7,6)	H-4	H-1'	142,45
4	95,72	5,92 (d, 7,6)			95,85
1'	87,23	6,26 (dd, 6,8, 6,4)	H-2'	H-3d; H-4'	86,55
3'	71,70	4,37 (dd, 6.4, 3,6)	2H-2'; H-4'	2H-5'	71,75
4'	88,56	3,94	H-3'		88,55
CH_2					
2'	41,39	1,80, 1,60	-	-	40,60
5'	62,43	3,95 – 3,70	-	-	62,60

Fonte: Autor.

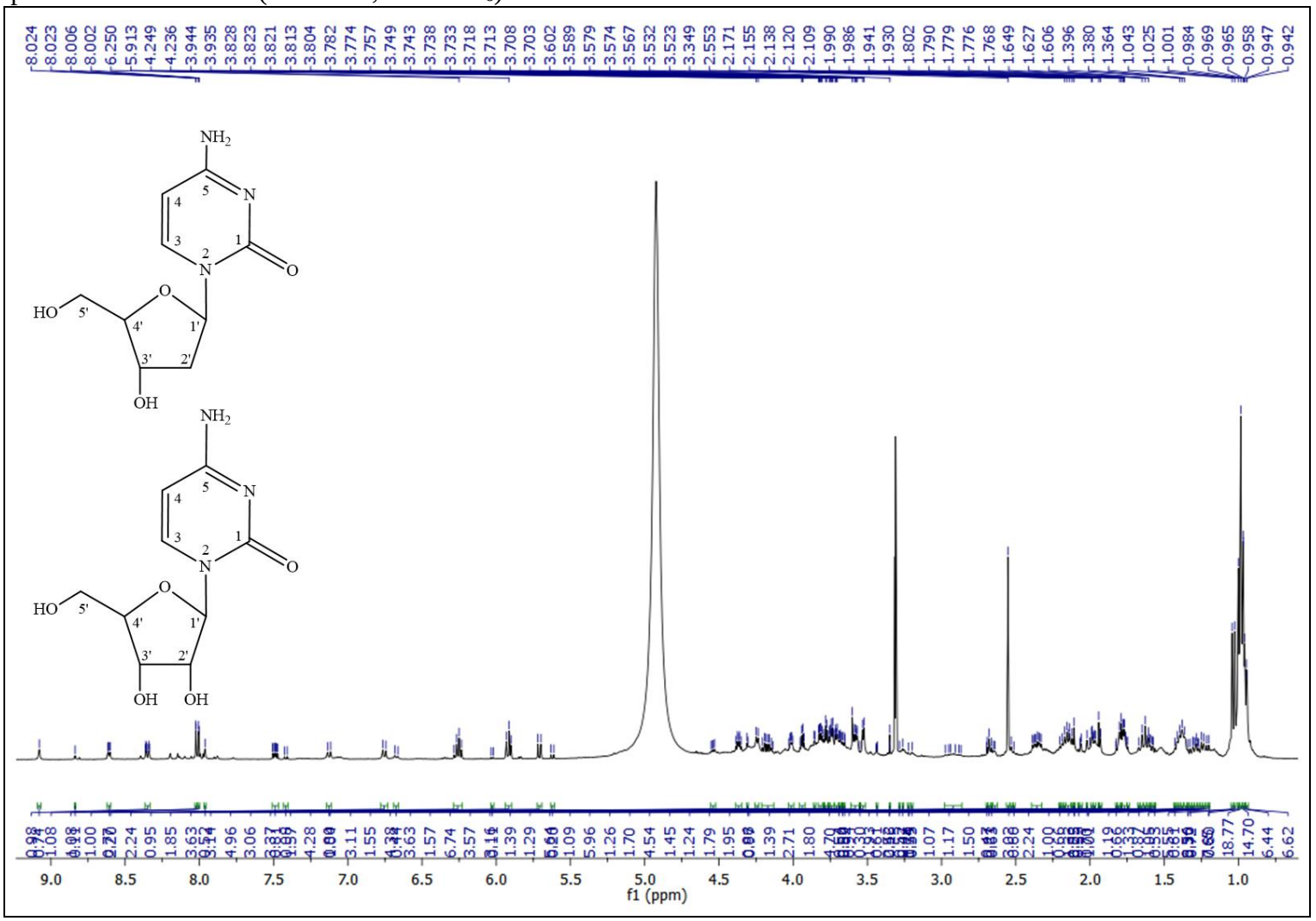
Tabela 17 - Dados de RMN de HSQC e HMBC (δ, MeOH-d_6, 400 MHz, 100 MHz) de Bs-3B em comparação com dados de Jones (1970)



	Bs-3B				Citidina (Literatura)	
	HSQC		HMBC		DMSO-d_6, 60MHz	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
C					D_2O[2]/DMSO [1]	em D_2O
1	153	-		H-1' H-3	155,4/156,90	-
5	167,19	-		H-3	165,5/166,65	-
CH						
3	142,76	8,00 (d, 8,0)	-	H-1'	141,4/142,80	4,22
4	102,42	5,71 (d, 8,0)	H-3	-	93,8/95,65	6,04
1'	90,30	5,91 (d, 4,8)	H-2'	H-3	89,2/90,10	5,91
2'	75,43	4,19 (t)	-	-	73,9/70,55	4,32
3'	71,00	4,17 (t)	-	-	69,3/75.90	4,22
4'	86,07	4,01 (m)	-	-	84,0/85,26	4,15
CH_2						
5'	61,96	3,95 – 3,70	-	-	60,6/61,85	3,95, 2,84

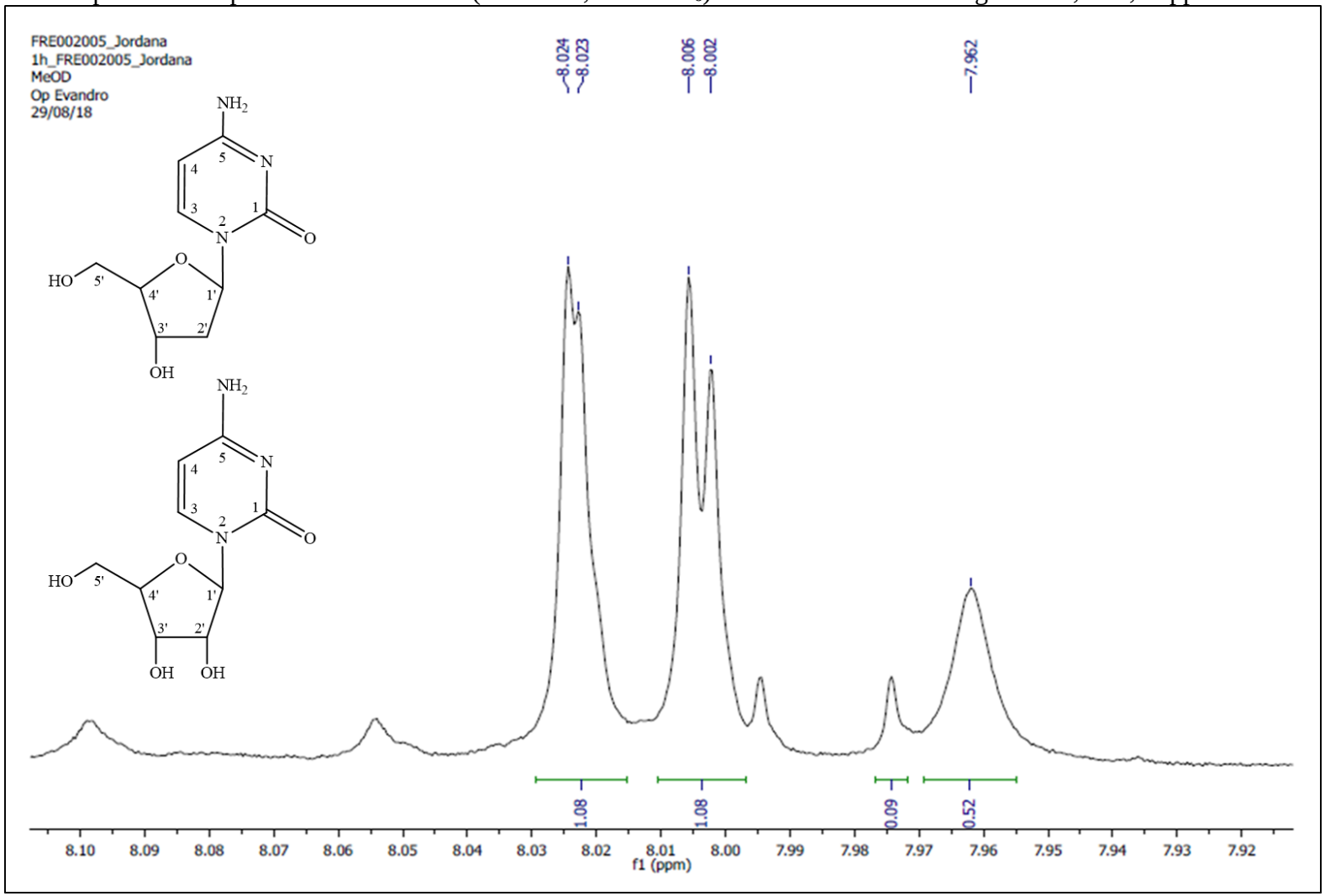
Fonte: Autor.

Figura 68 - Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B



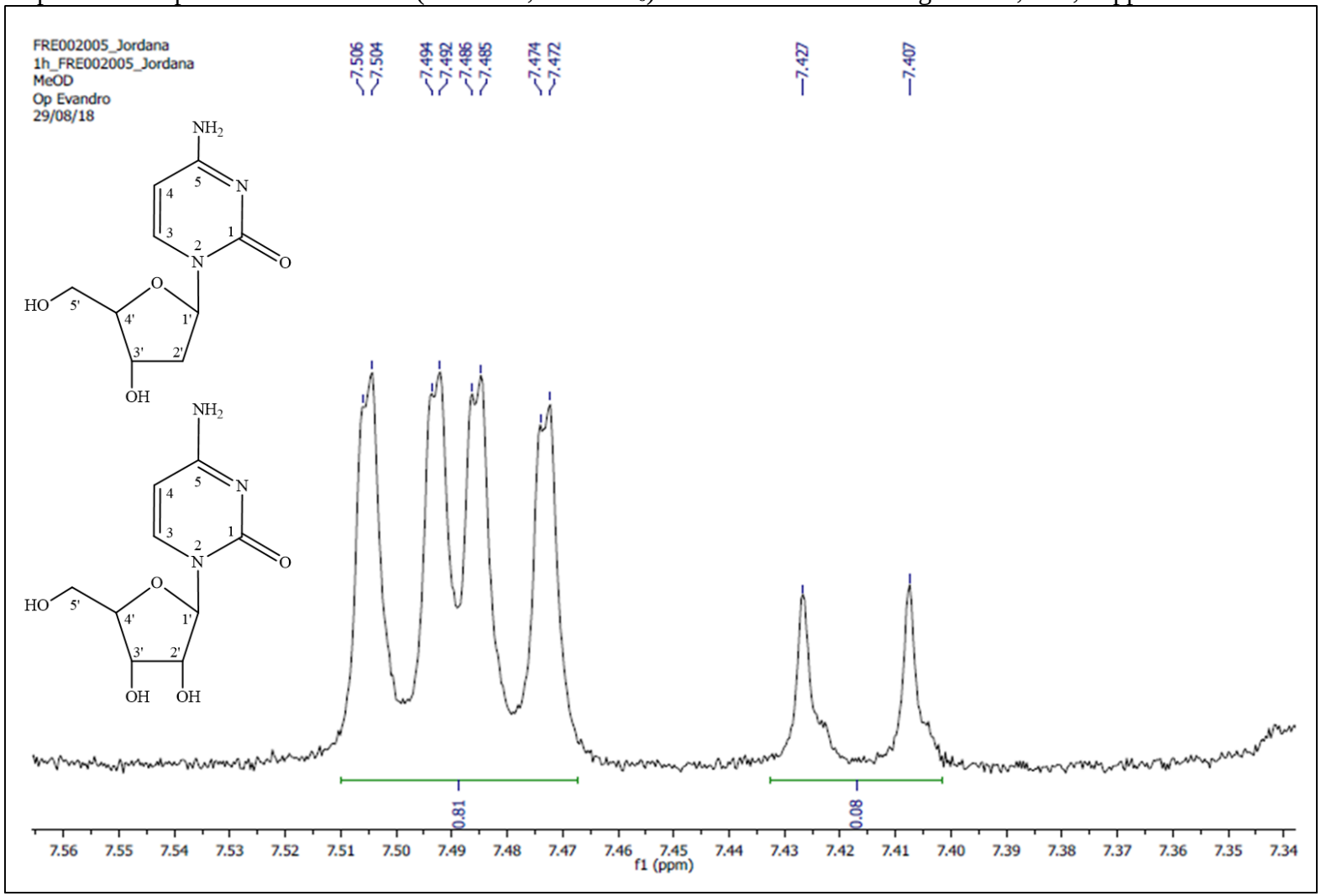
Fonte: Autor.

Figura 69 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 8,10-7,92 ppm



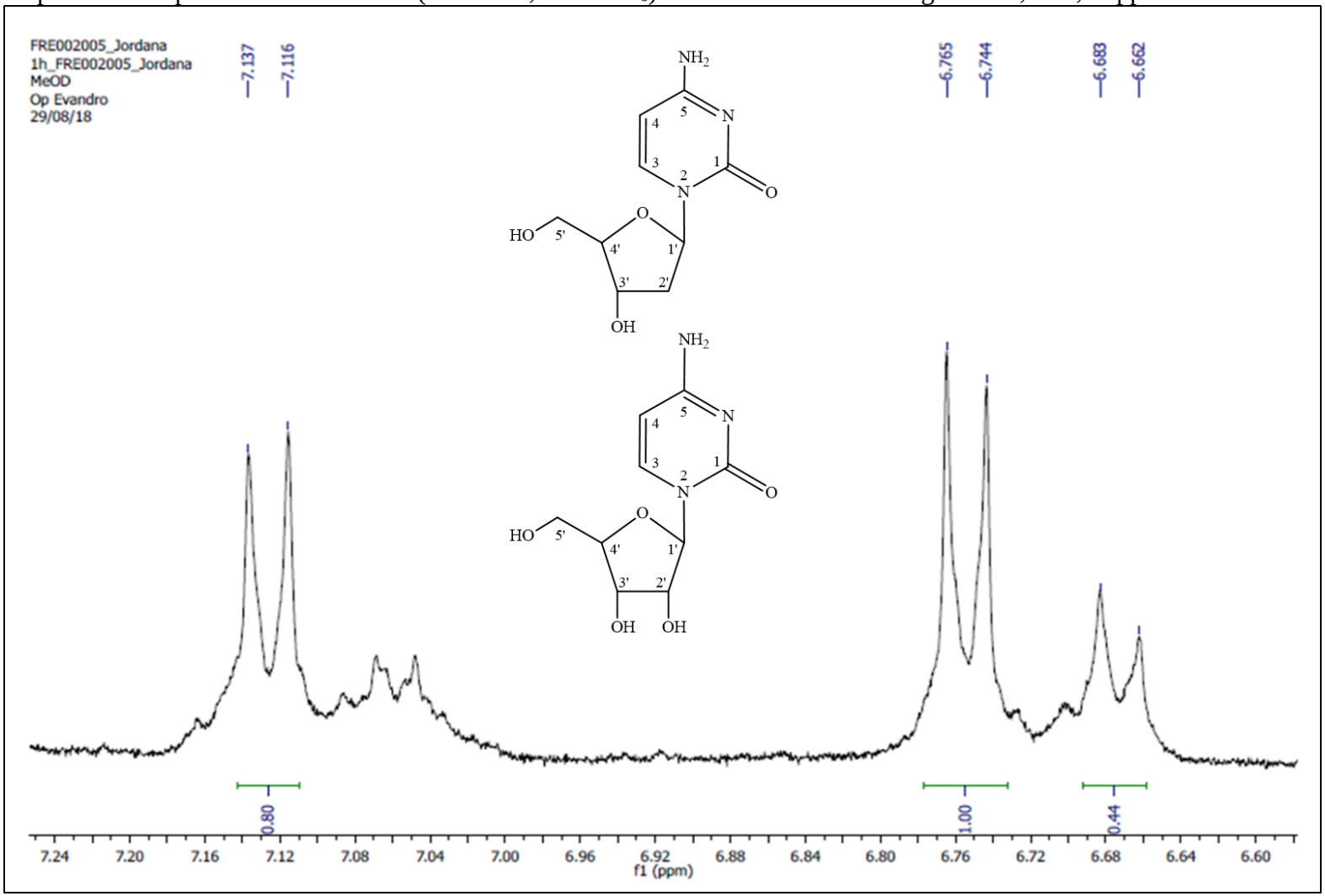
Fonte: Autor.

Figura 70 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 7,56-7,30 ppm



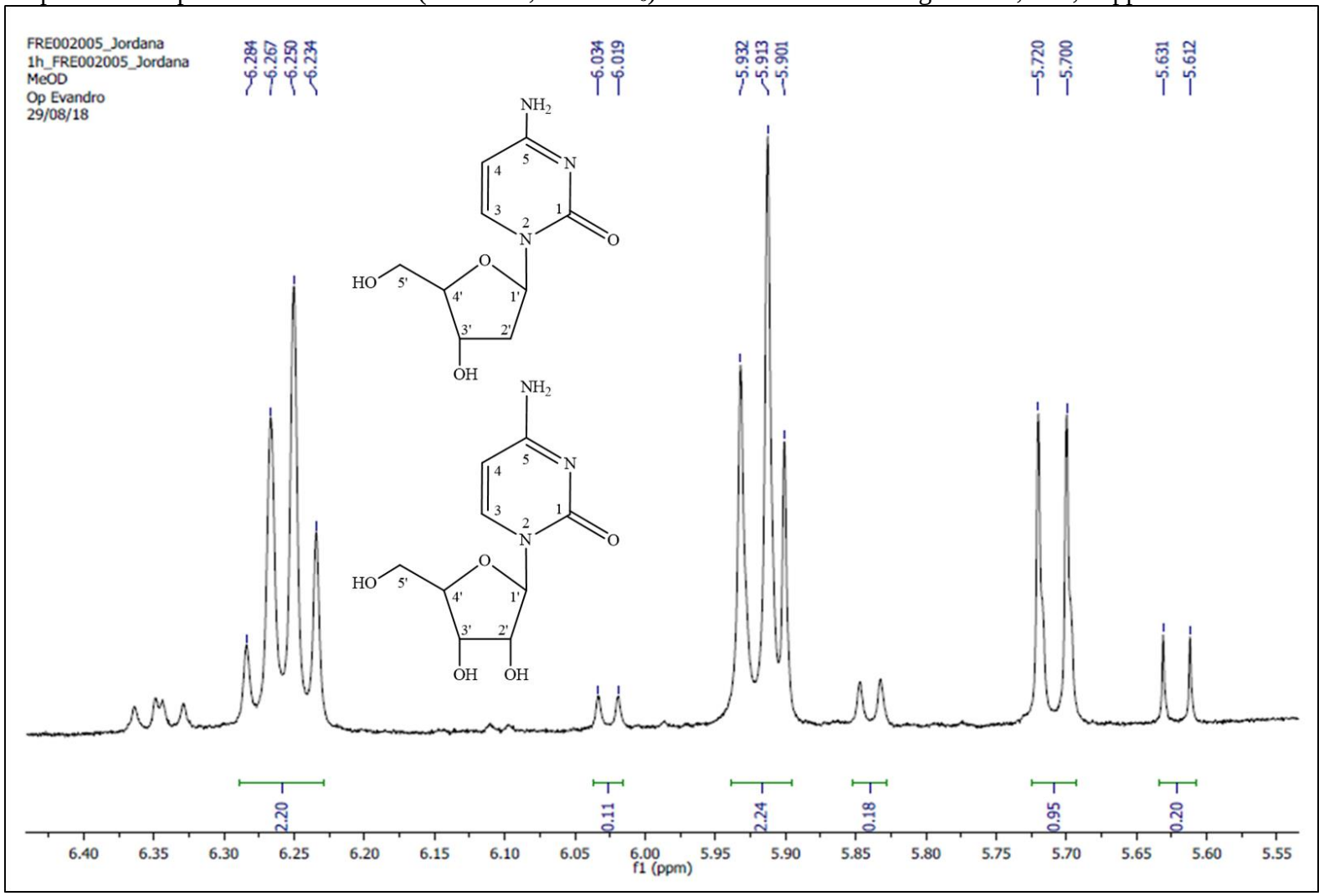
Fonte: Autor.

Figura 71 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 7,20-6,60 ppm



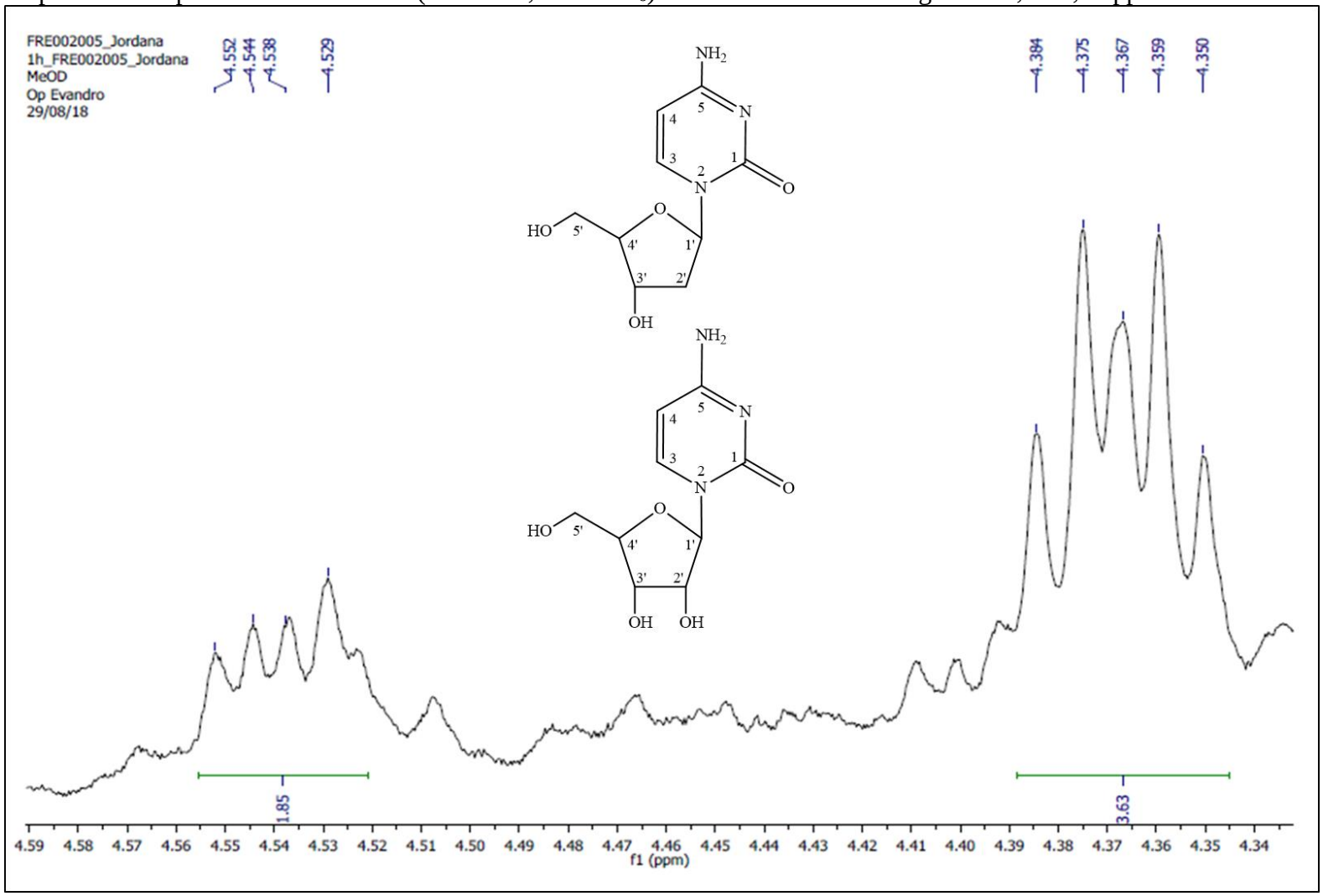
Fonte: Autor.

Figura 72 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 6,40-5,55 ppm



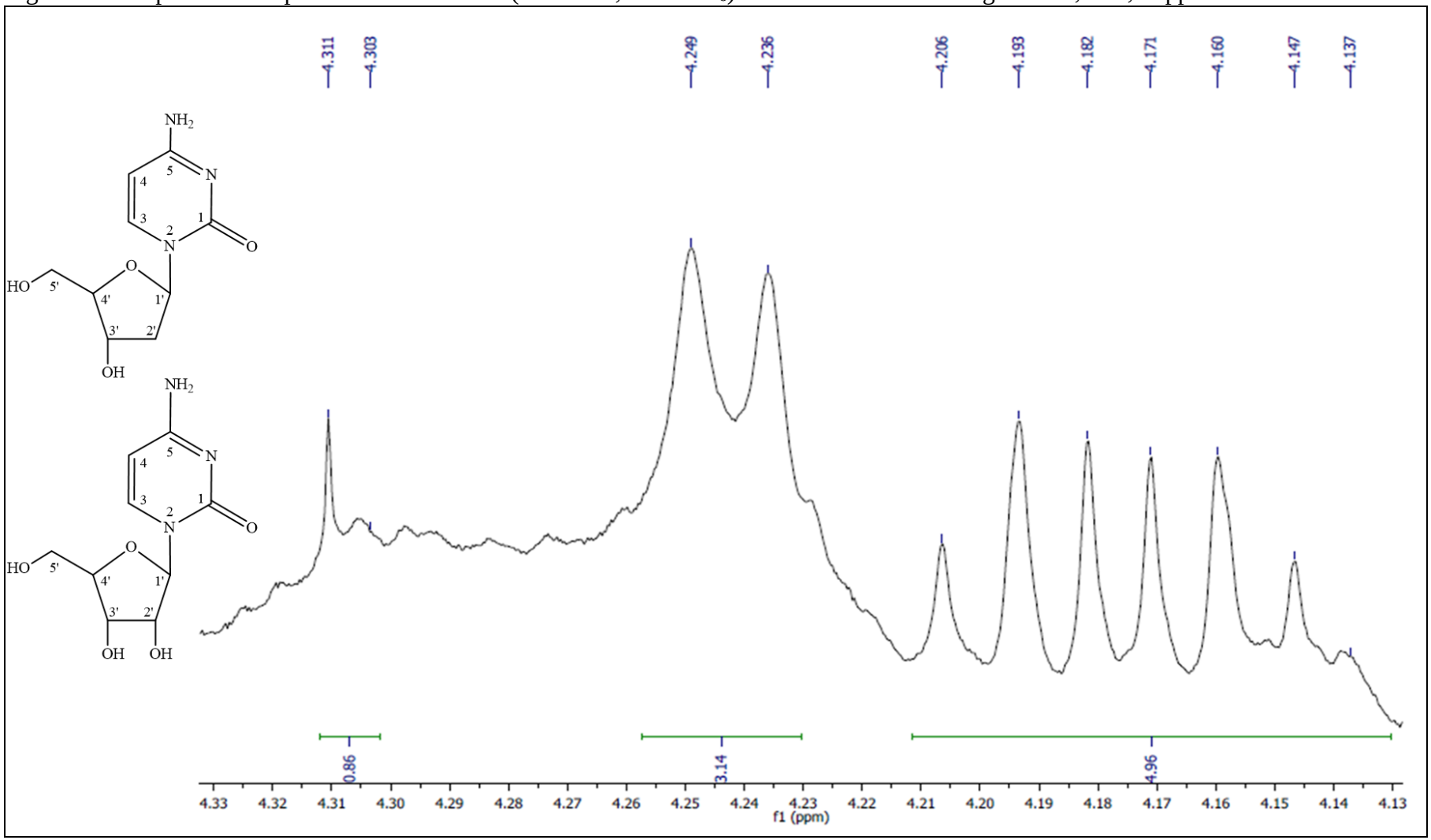
Fonte: Autor.

Figura 73 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 4,59-4,34 ppm



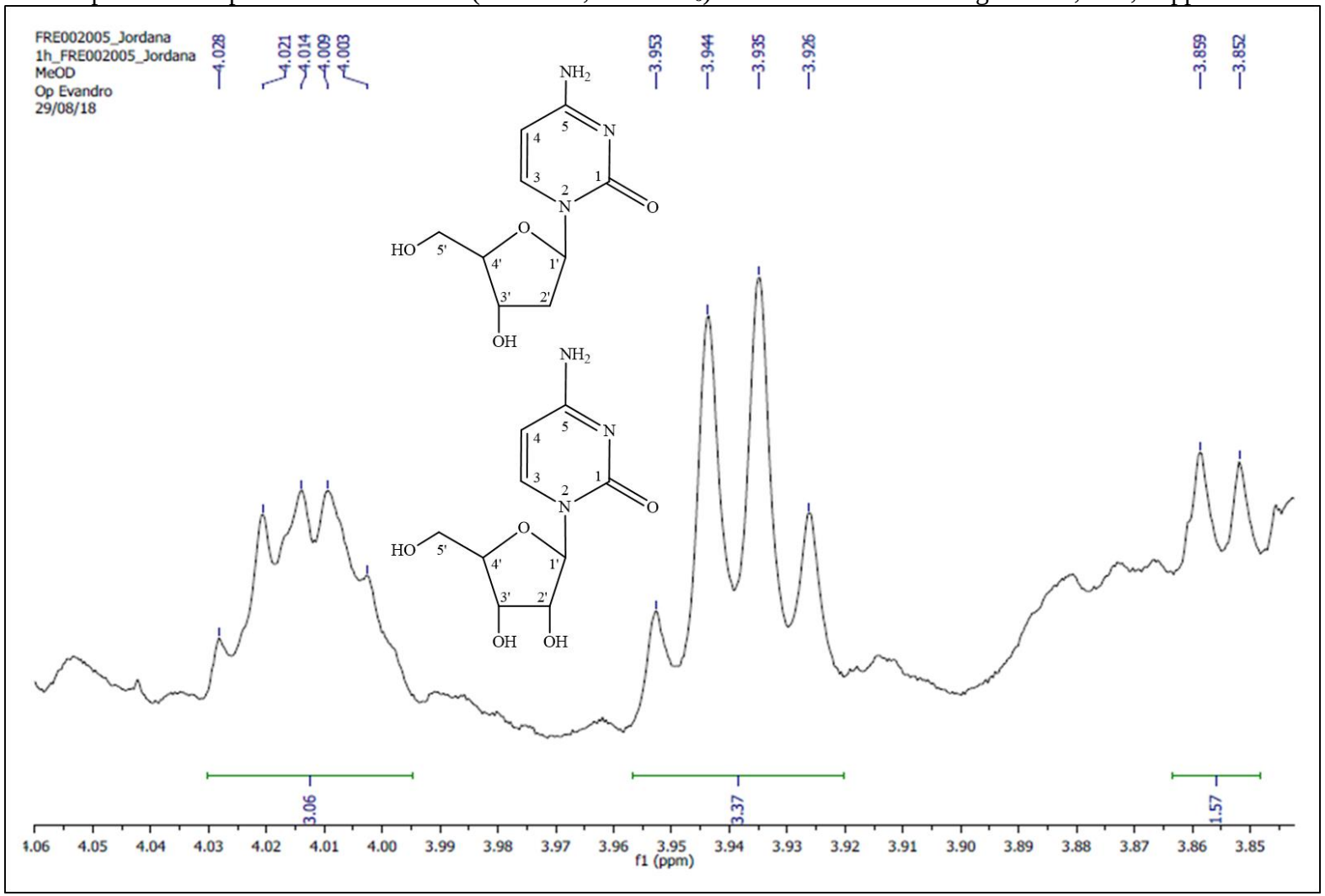
Fonte: Autor.

Figura 74 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 4,33-4,13 ppm



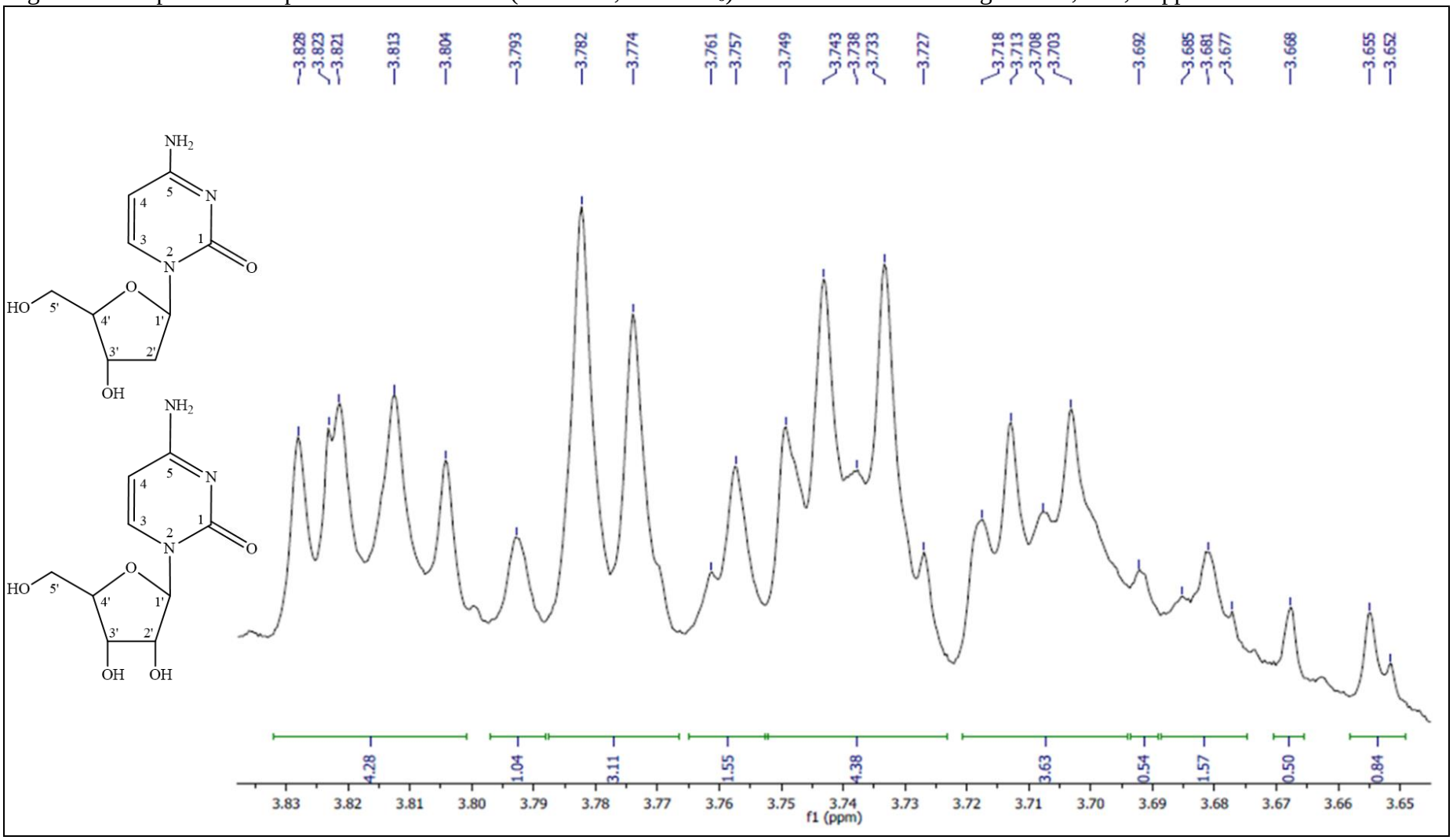
Fonte: Autor.

Figura 75 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 4,05-3,85 ppm



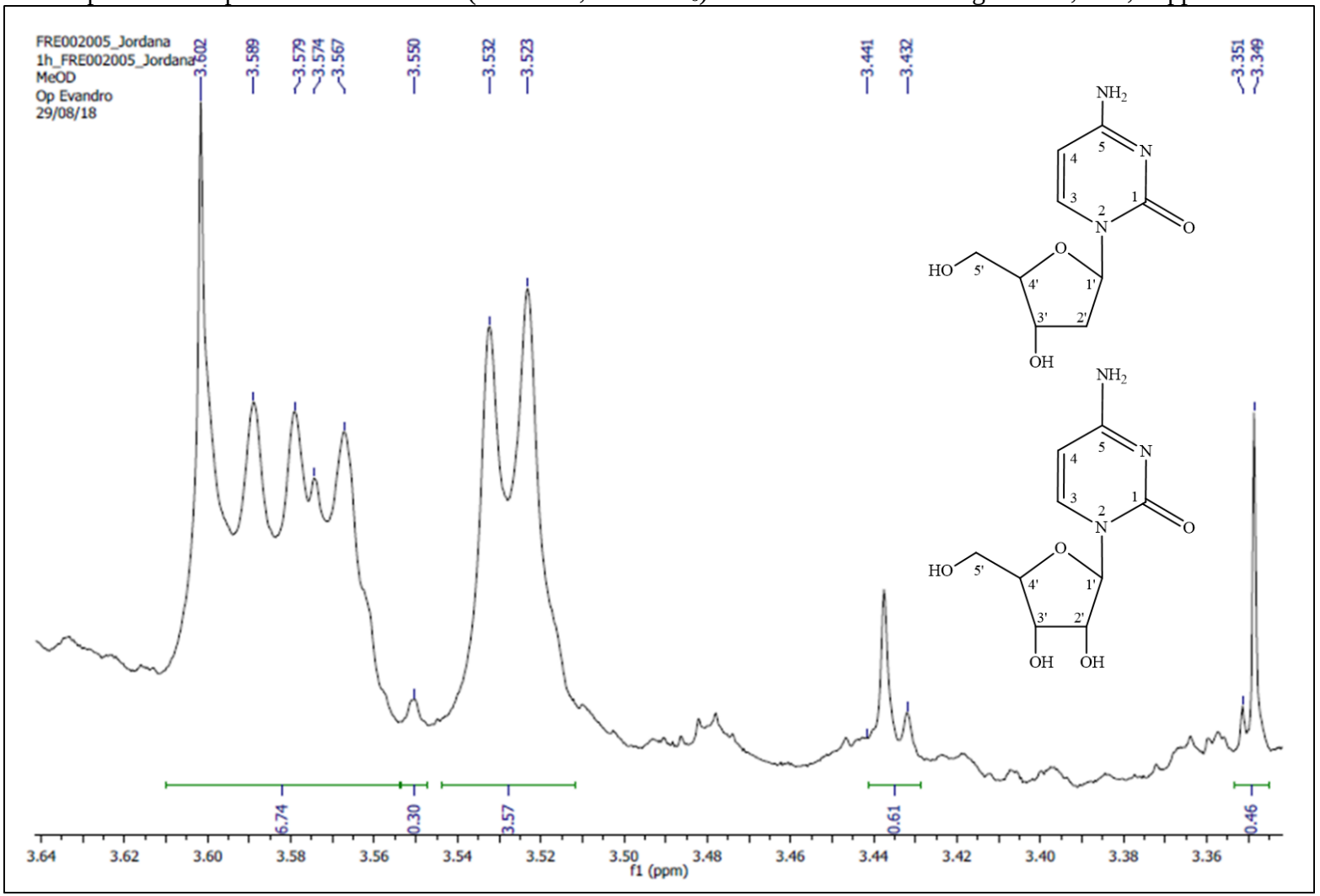
Fonte: Autor.

Figura 76 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 3,83-3,65 ppm



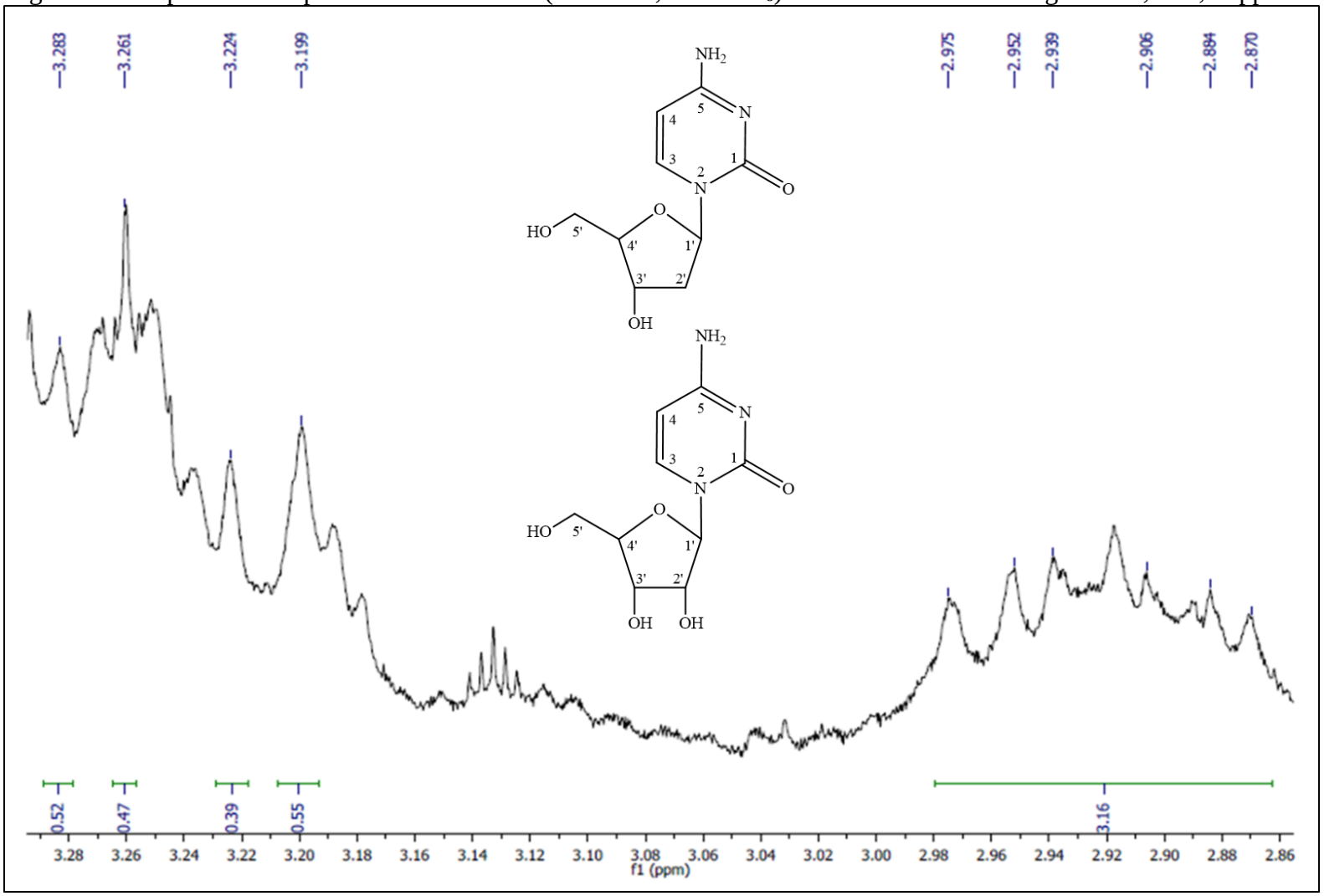
Fonte: Autor.

Figura 77– Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 3,62-3,34 ppm



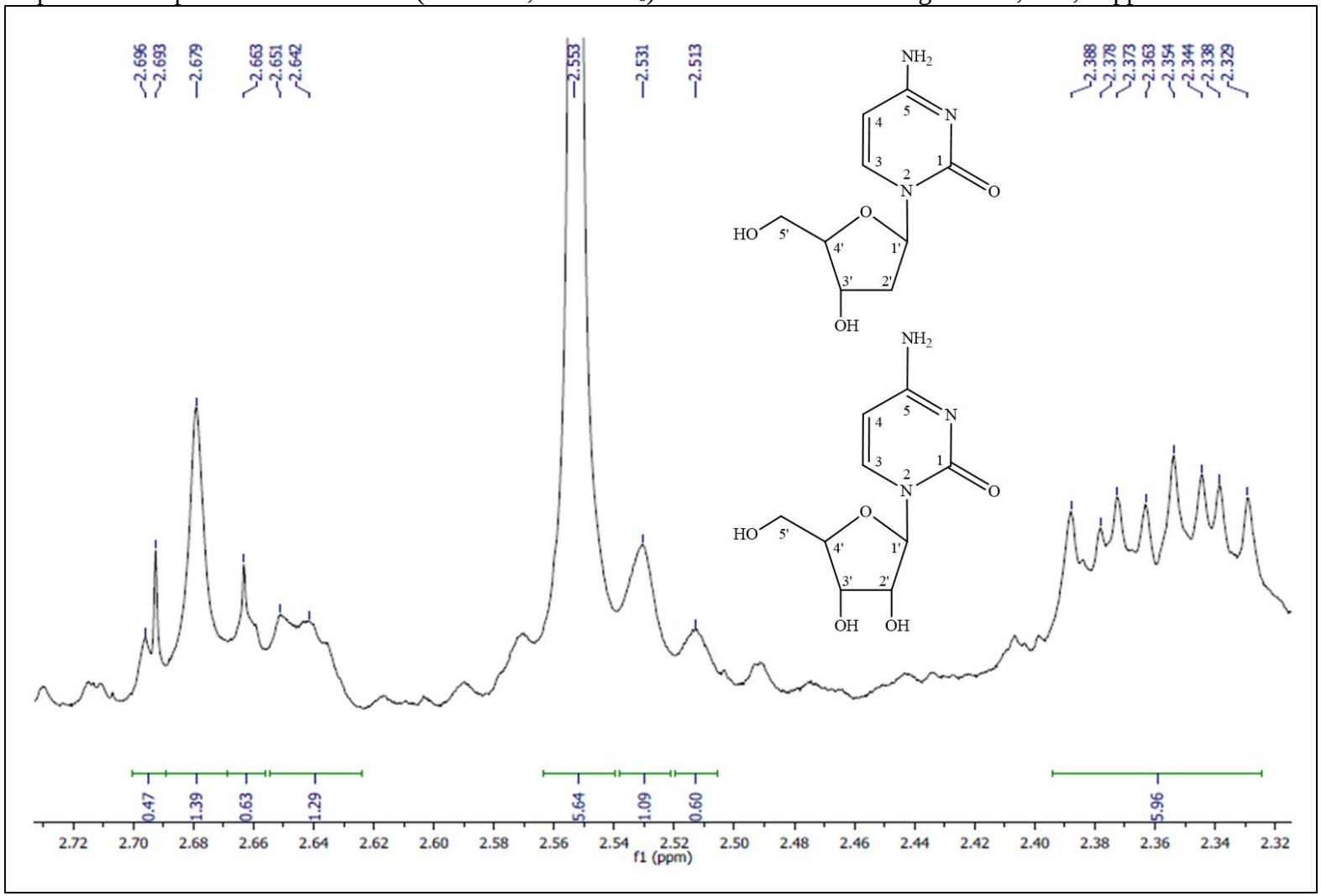
Fonte: Autor.

Figura 78 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 3,28-2,86 ppm



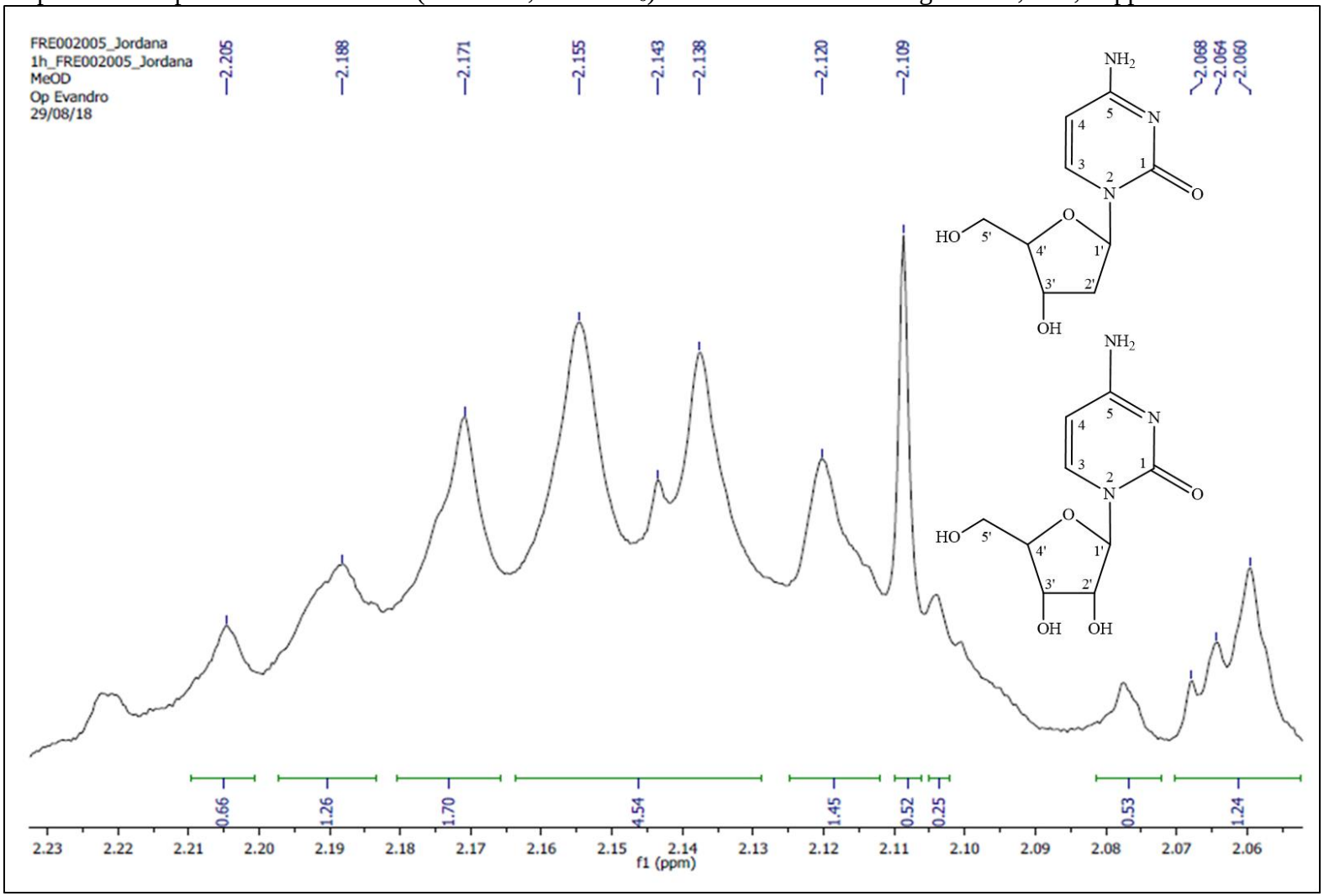
Fonte: Autor.

Figura 79 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 2,72-2,32 ppm



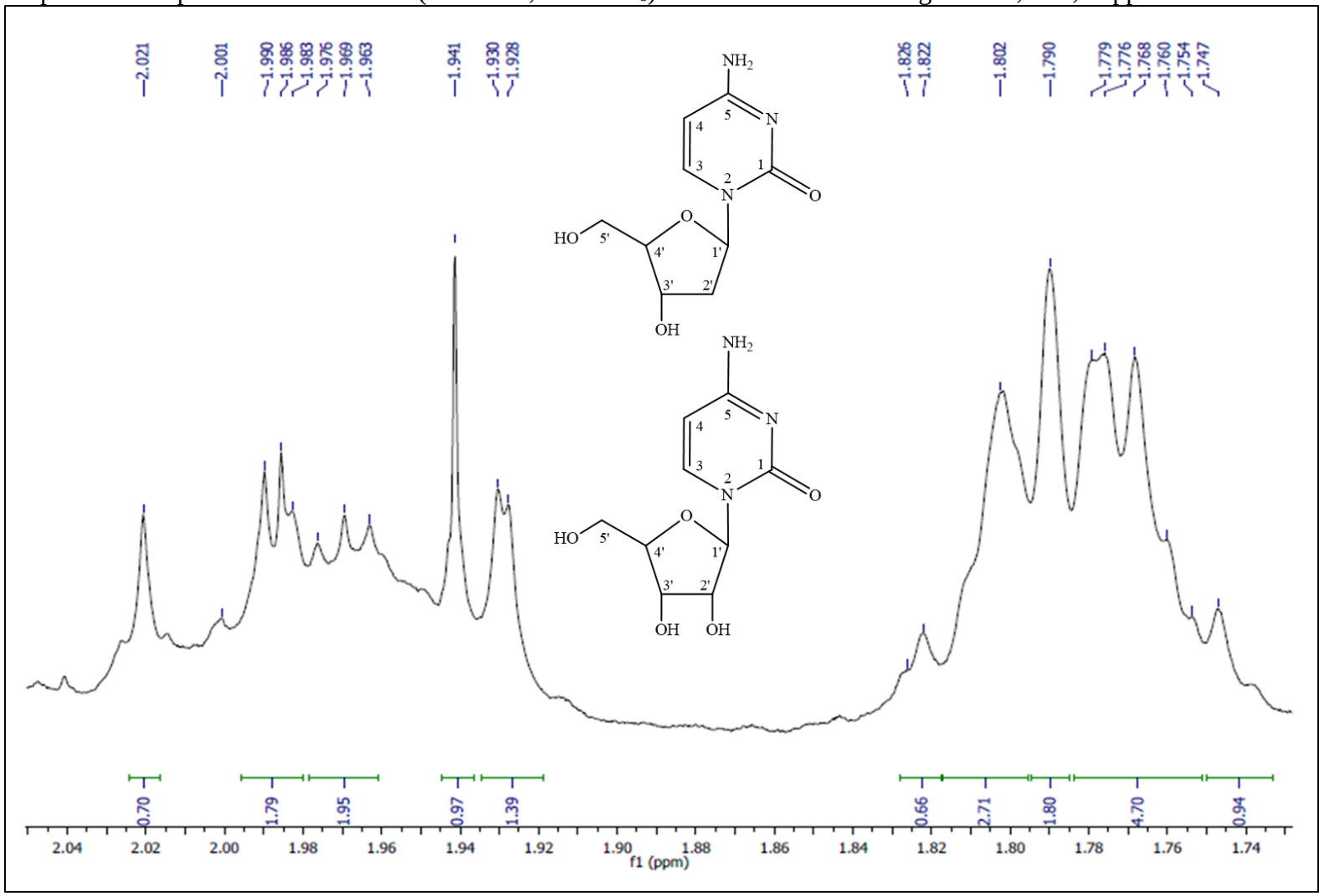
Fonte: Autor.

Figura 80 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 2,23-2,06 ppm



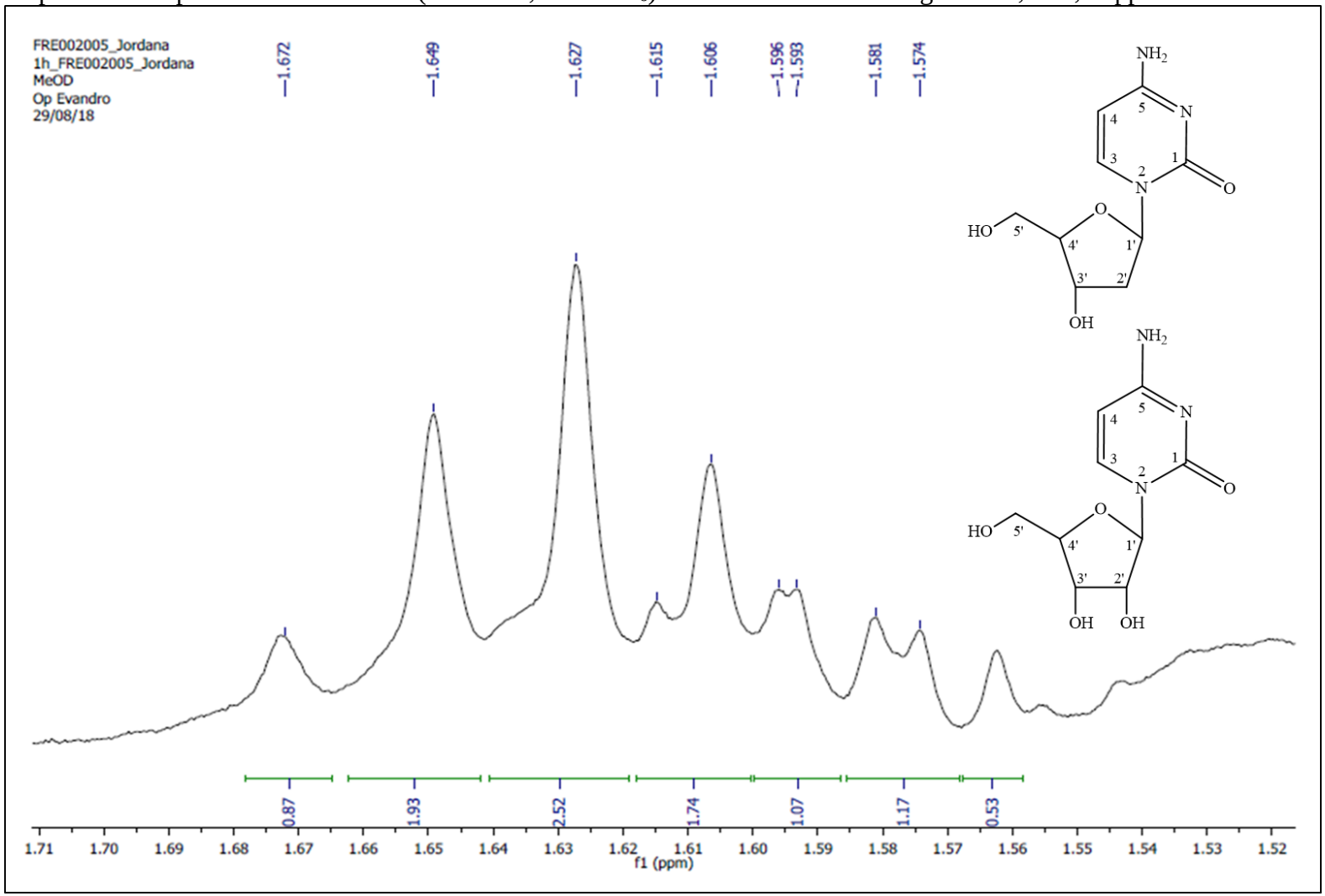
Fonte: Autor.

Figura 81 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 2,04-1,74 ppm



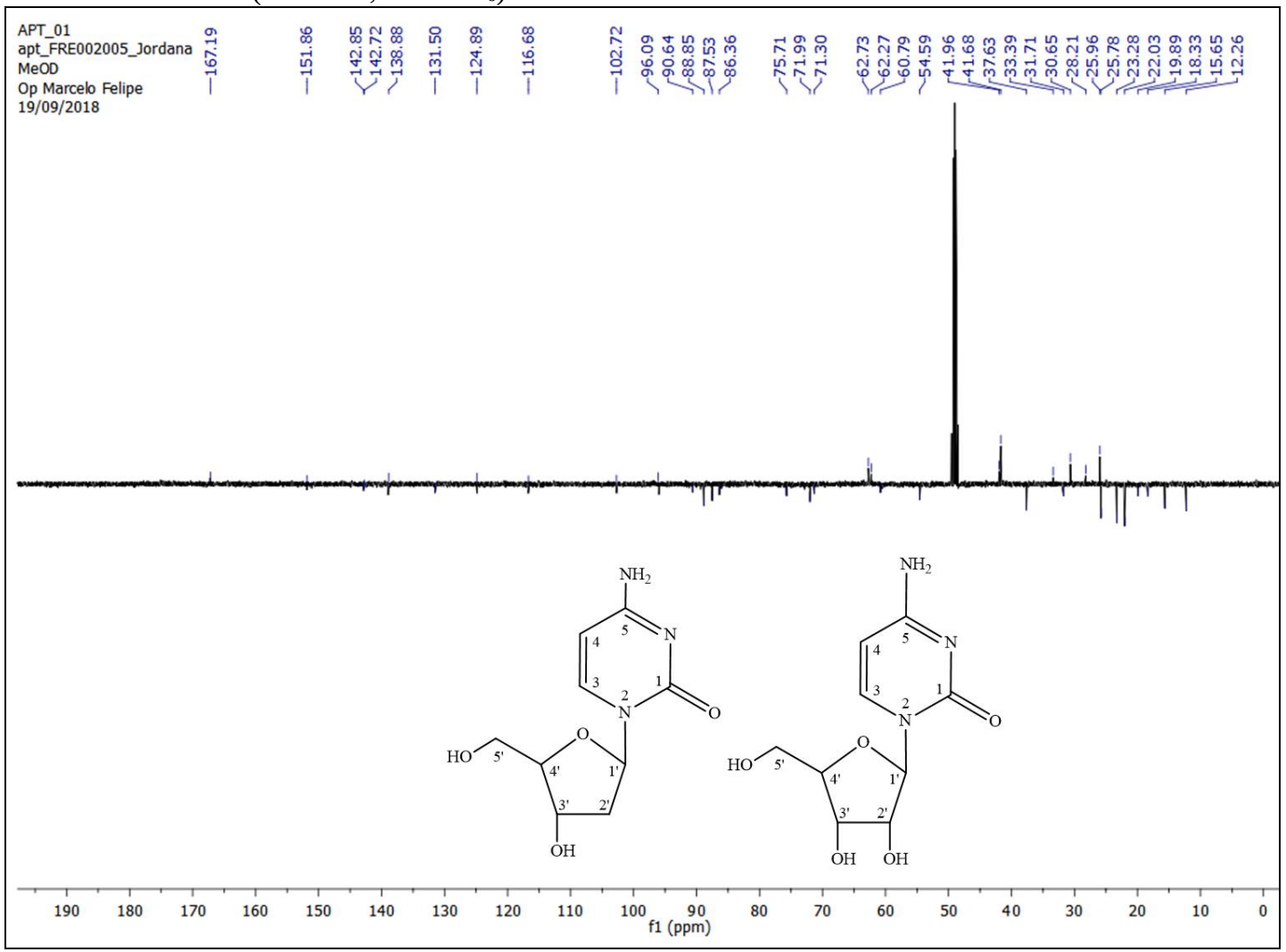
Fonte: Autor.

Figura 82 – Expansão do espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 1,70-1,55 ppm



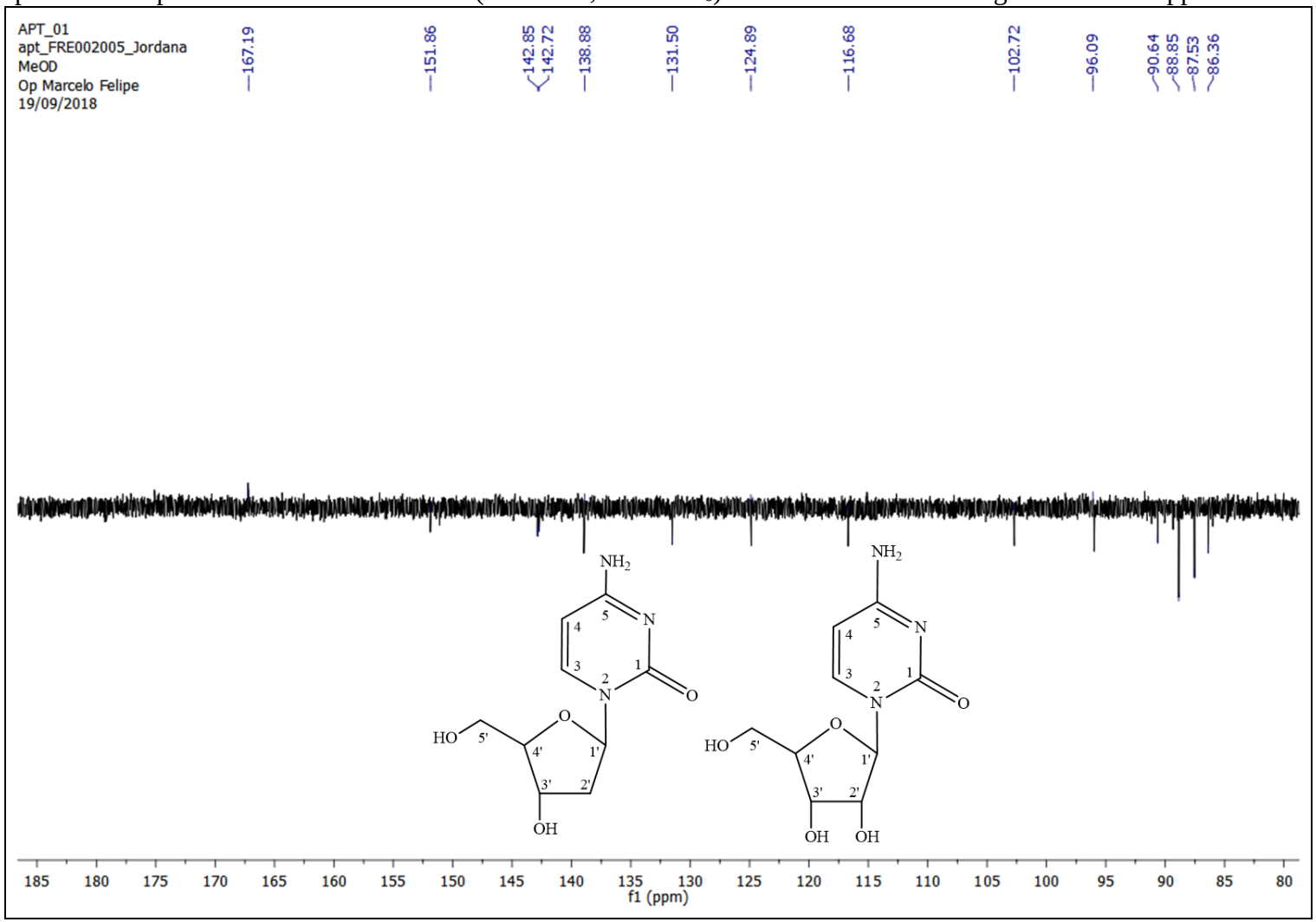
Fonte: Autor.

Figura 83 – Espectro de RMN de ^{13}C-APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B



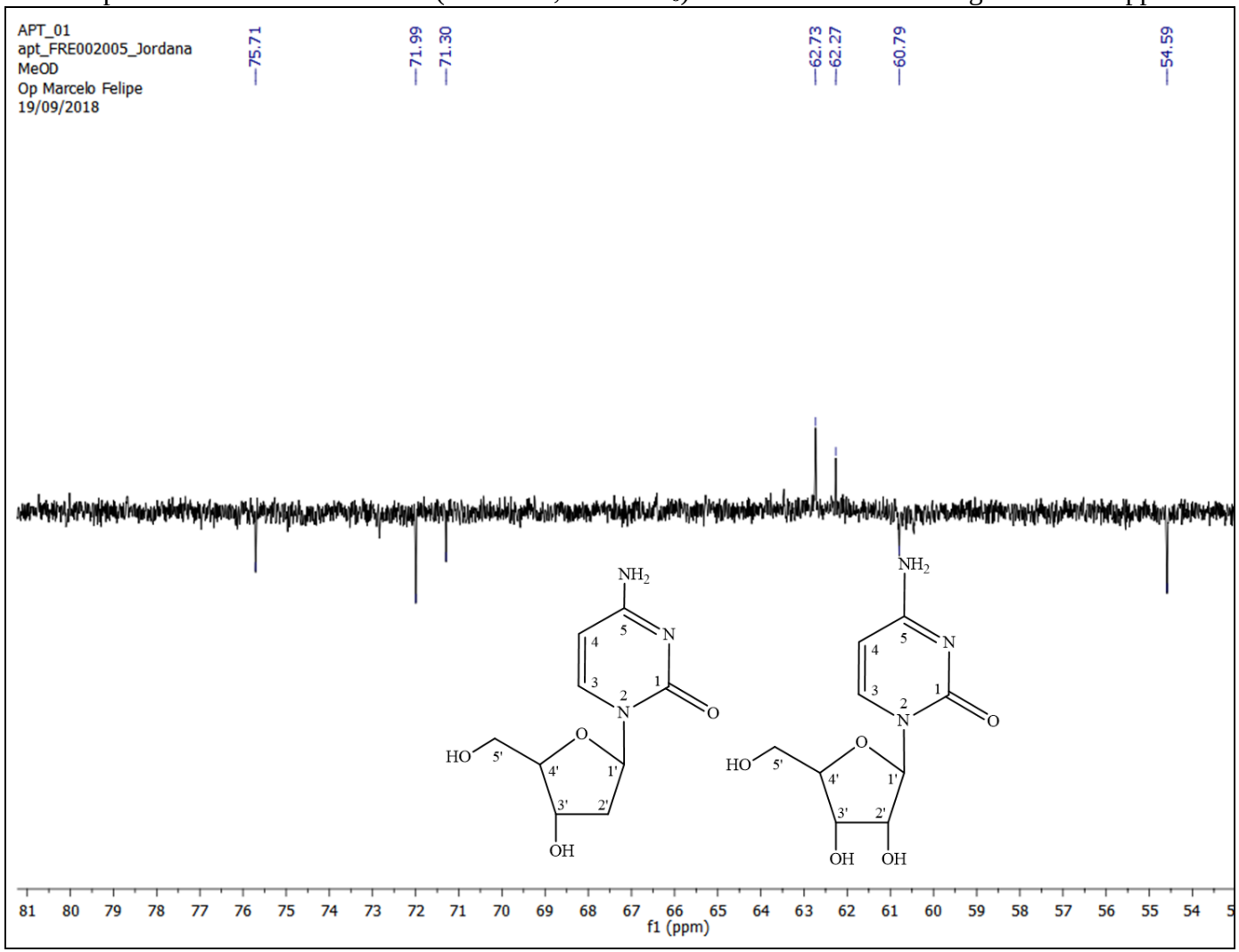
Fonte: Autor.

Figura 84 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C-APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 185-80 ppm



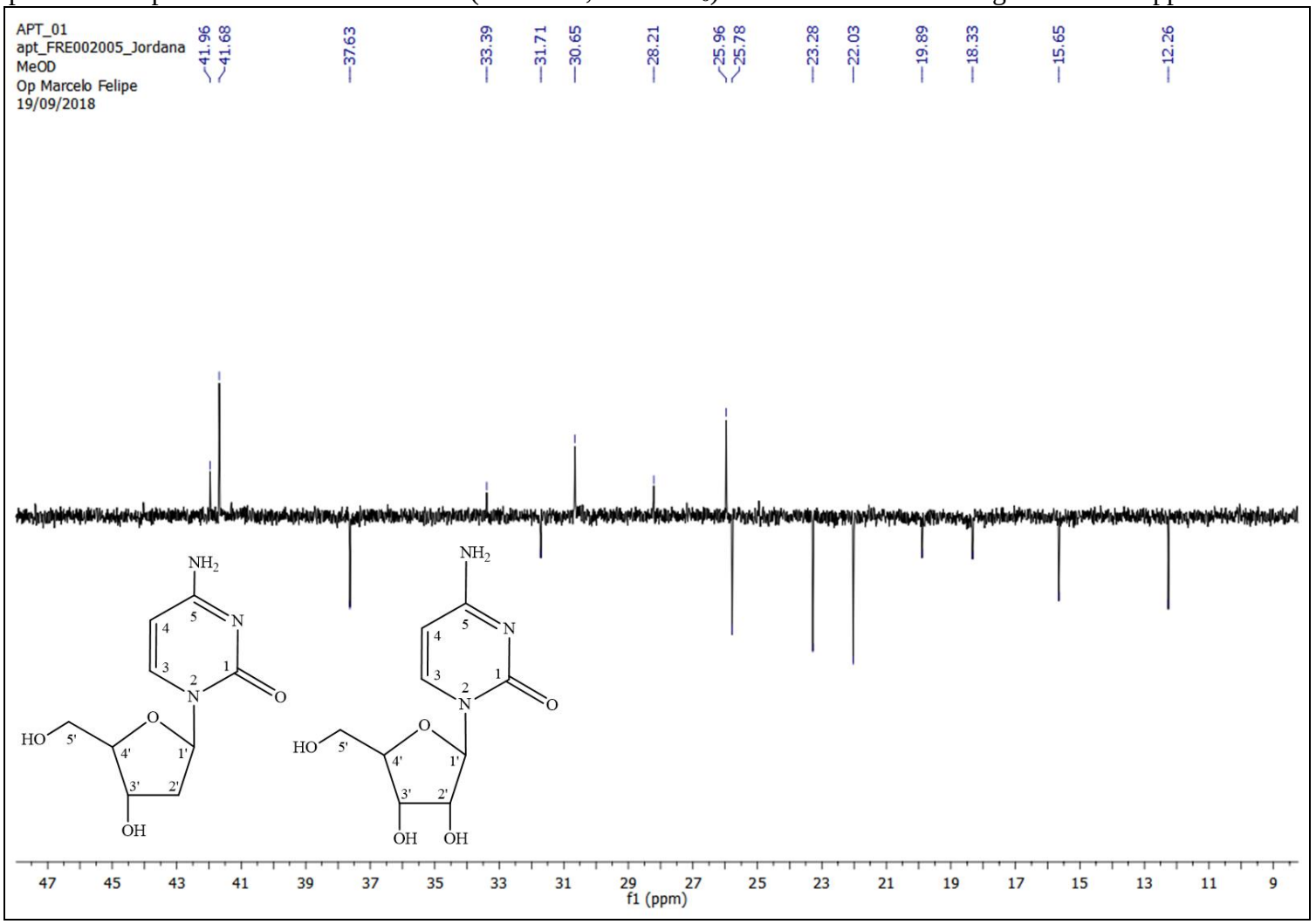
Fonte: Autor.

Figura 85 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 80-54ppm



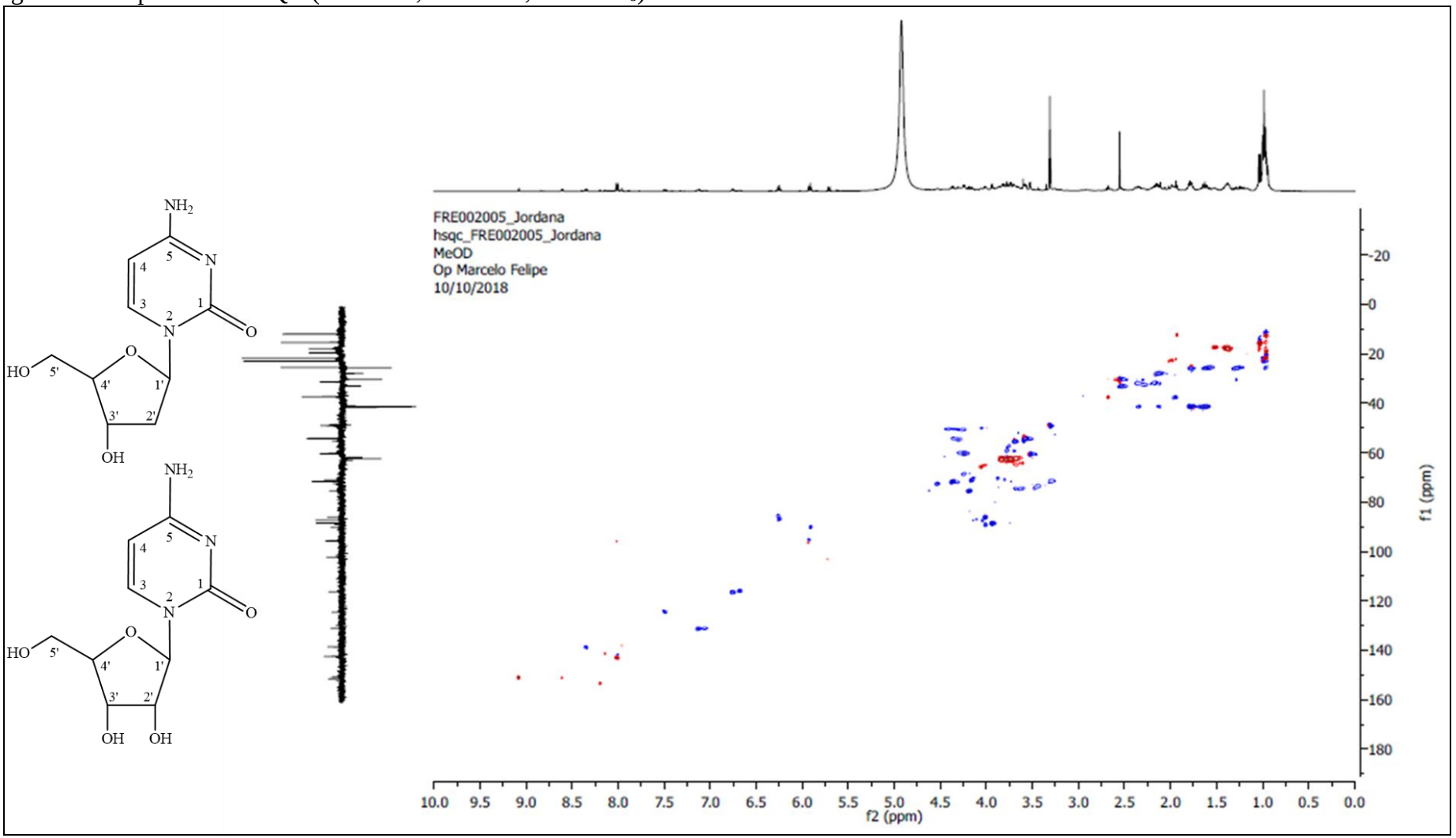
Fonte: Autor.

Figura 86 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 47-11 ppm



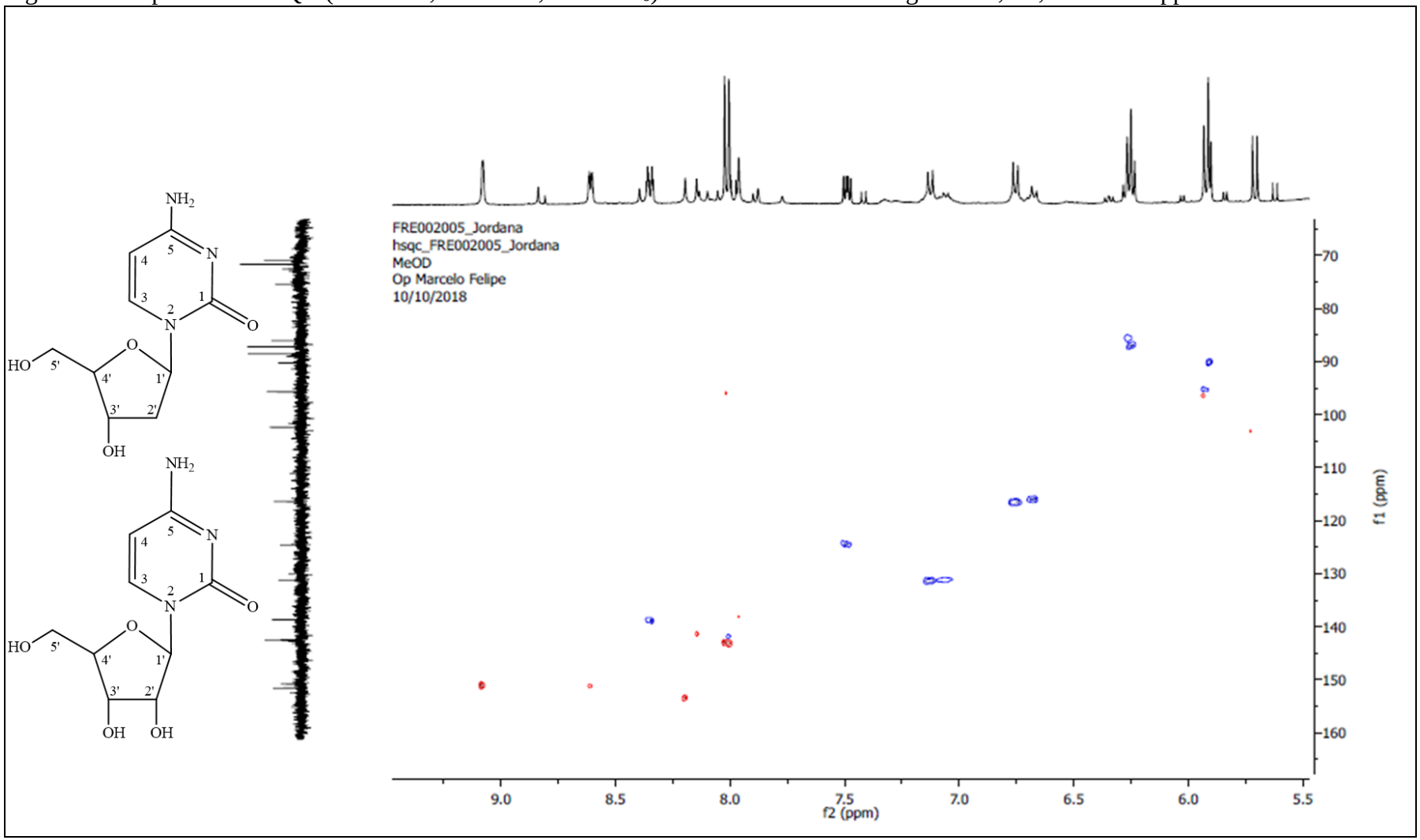
Fonte: Autor.

Figura 87 – Espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B



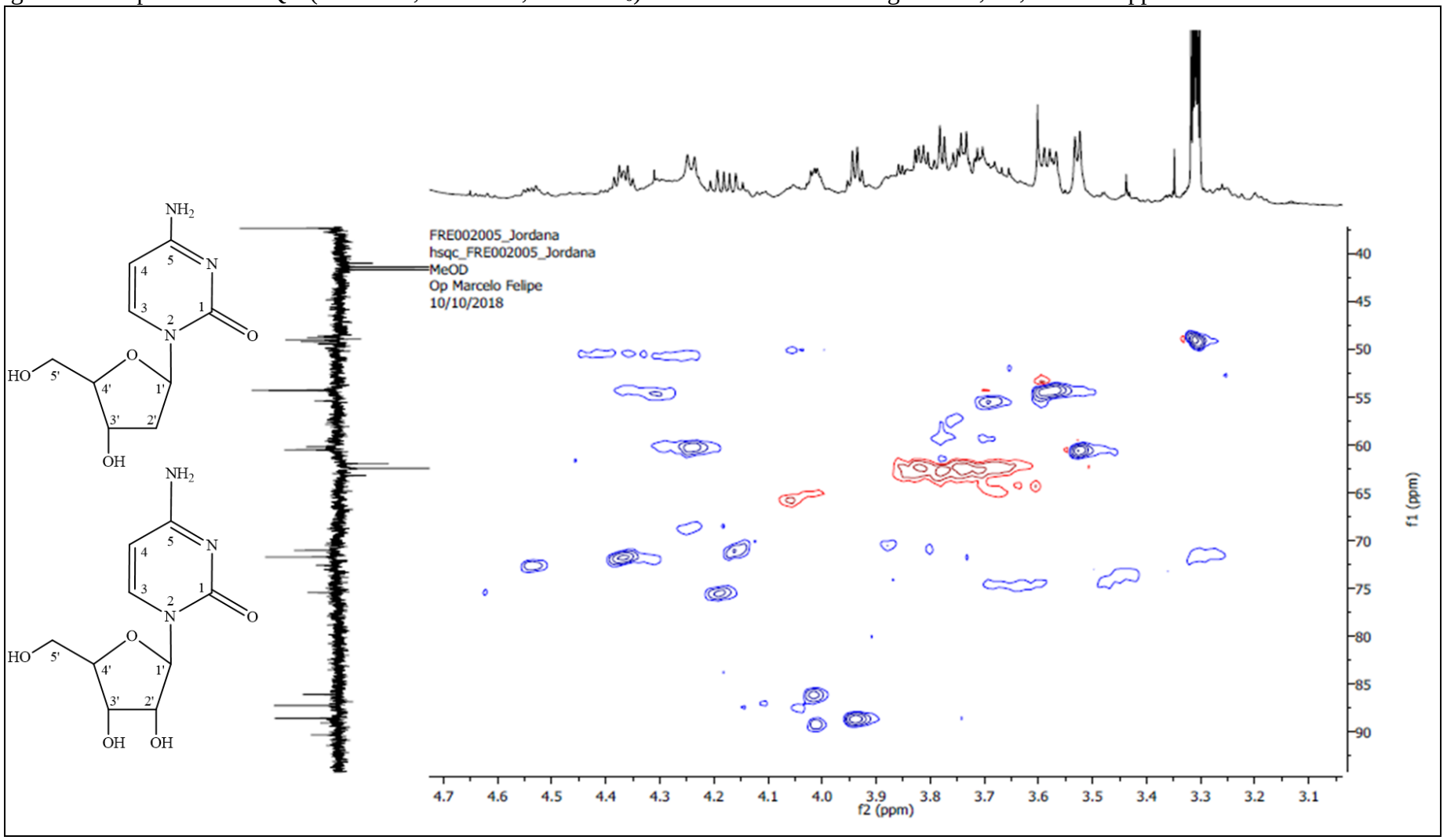
Fonte: Autor.

Figura 88 – Espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 9,5-5,5 x 165-70 ppm



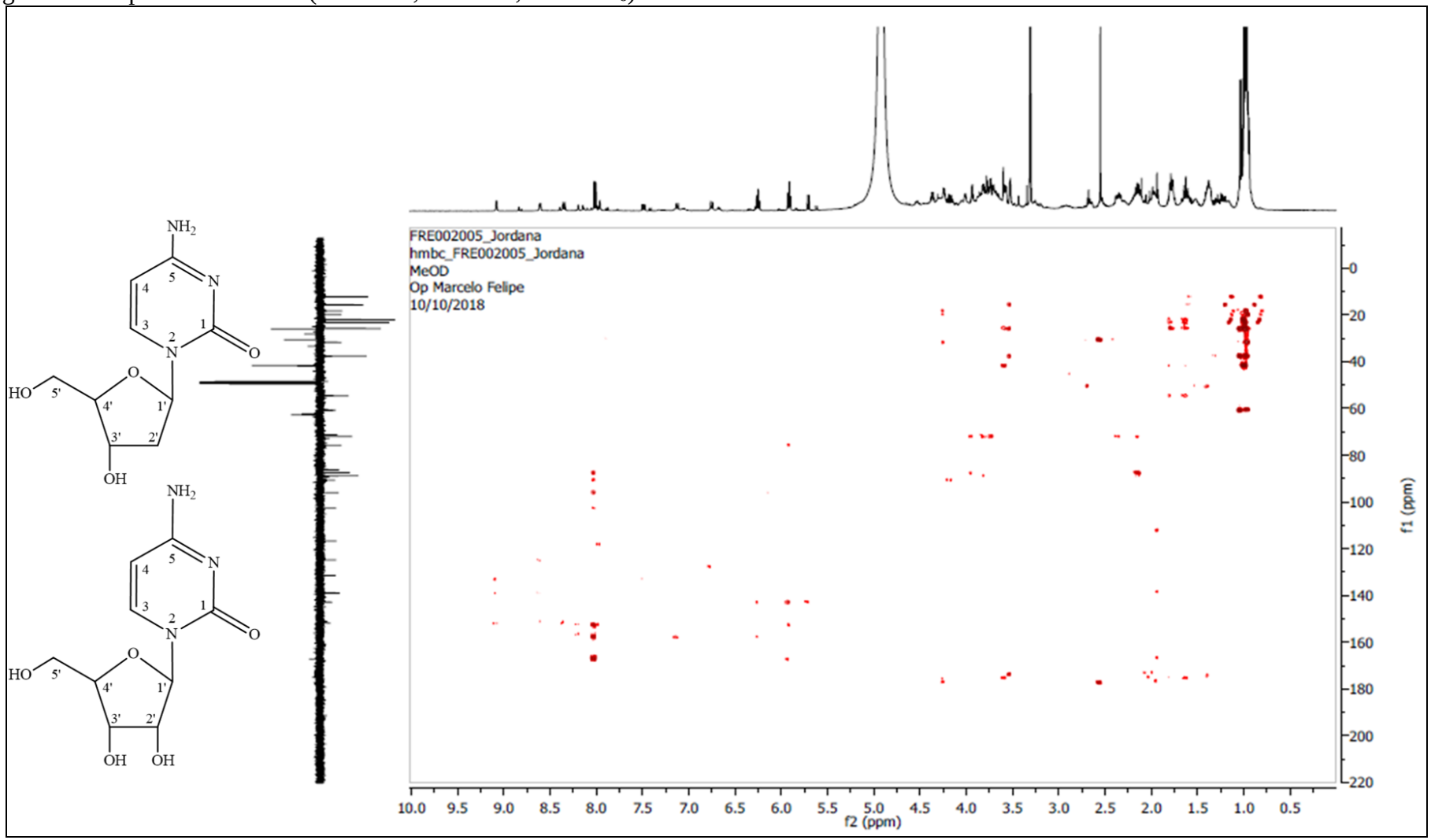
Fonte: Autor.

Figura 89 – Espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 4,7-3,1 x 95-40 ppm



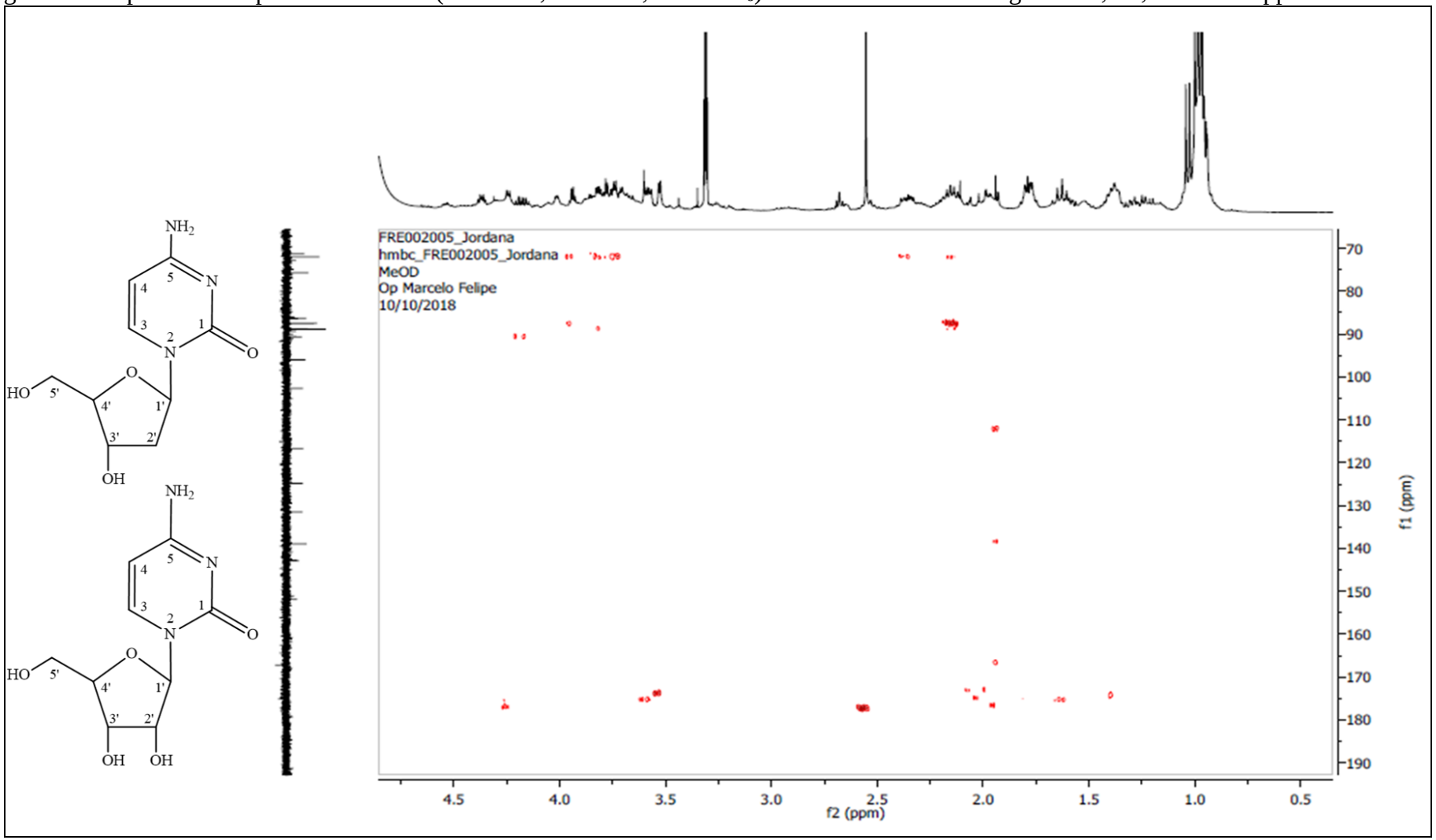
Fonte: Autor.

Figura 90 – Espectro de HMBC (400 MHz, 100MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B



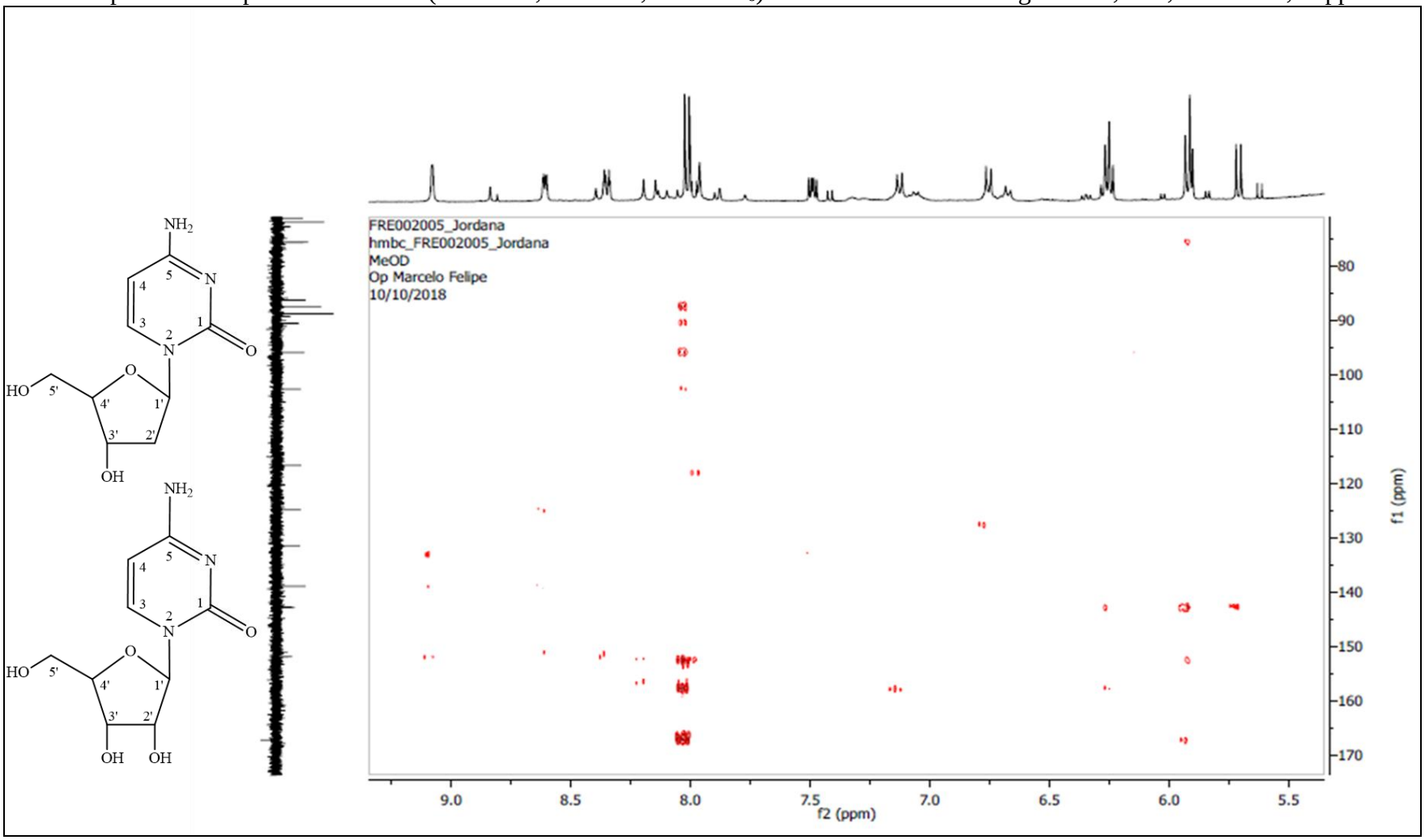
Fonte: Autor.

Figura 91– Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 4,5-0,5 x 190-70 ppm



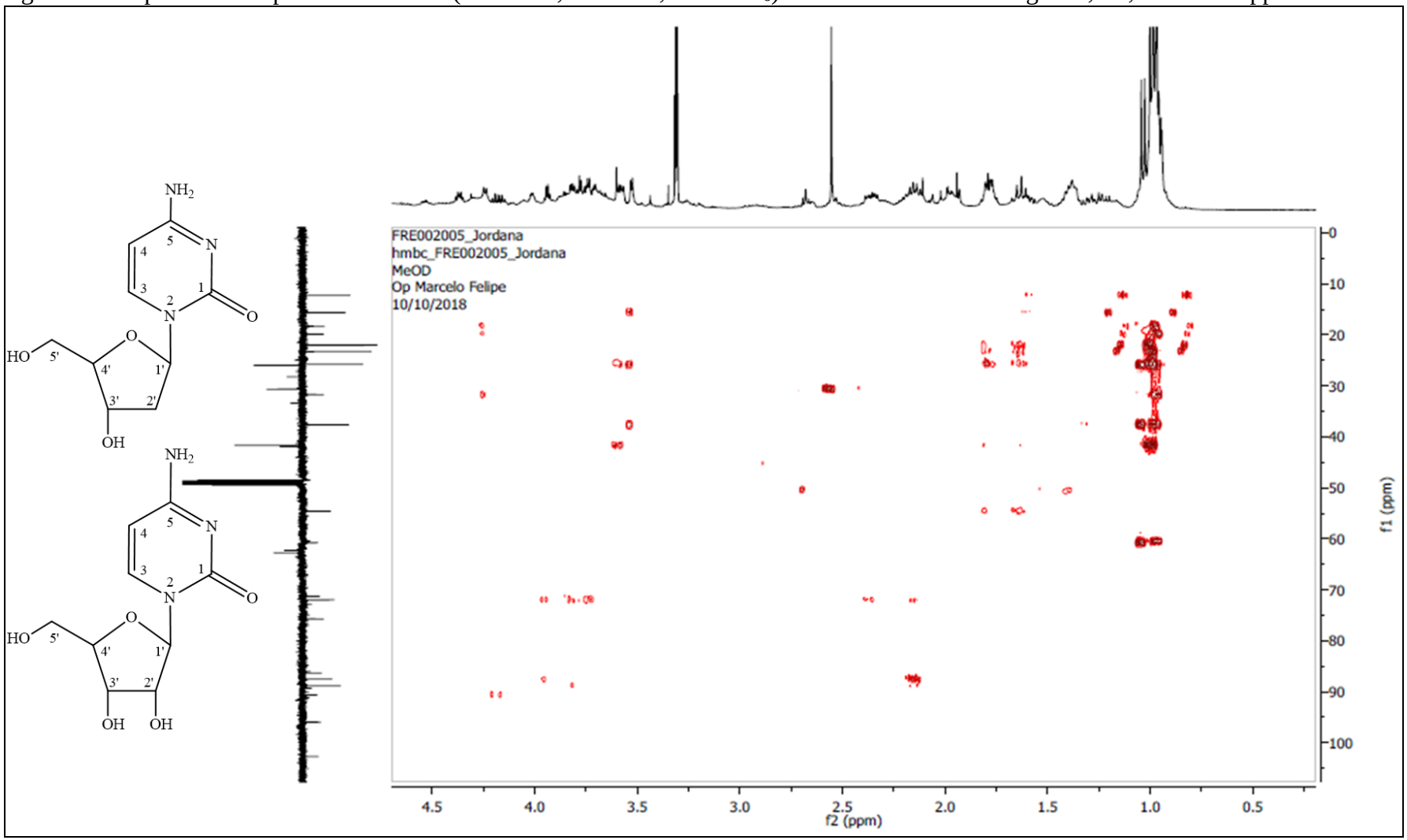
Fonte: Autor.

Figura 92 – Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 9,25-5,5 x 165-80,25 ppm



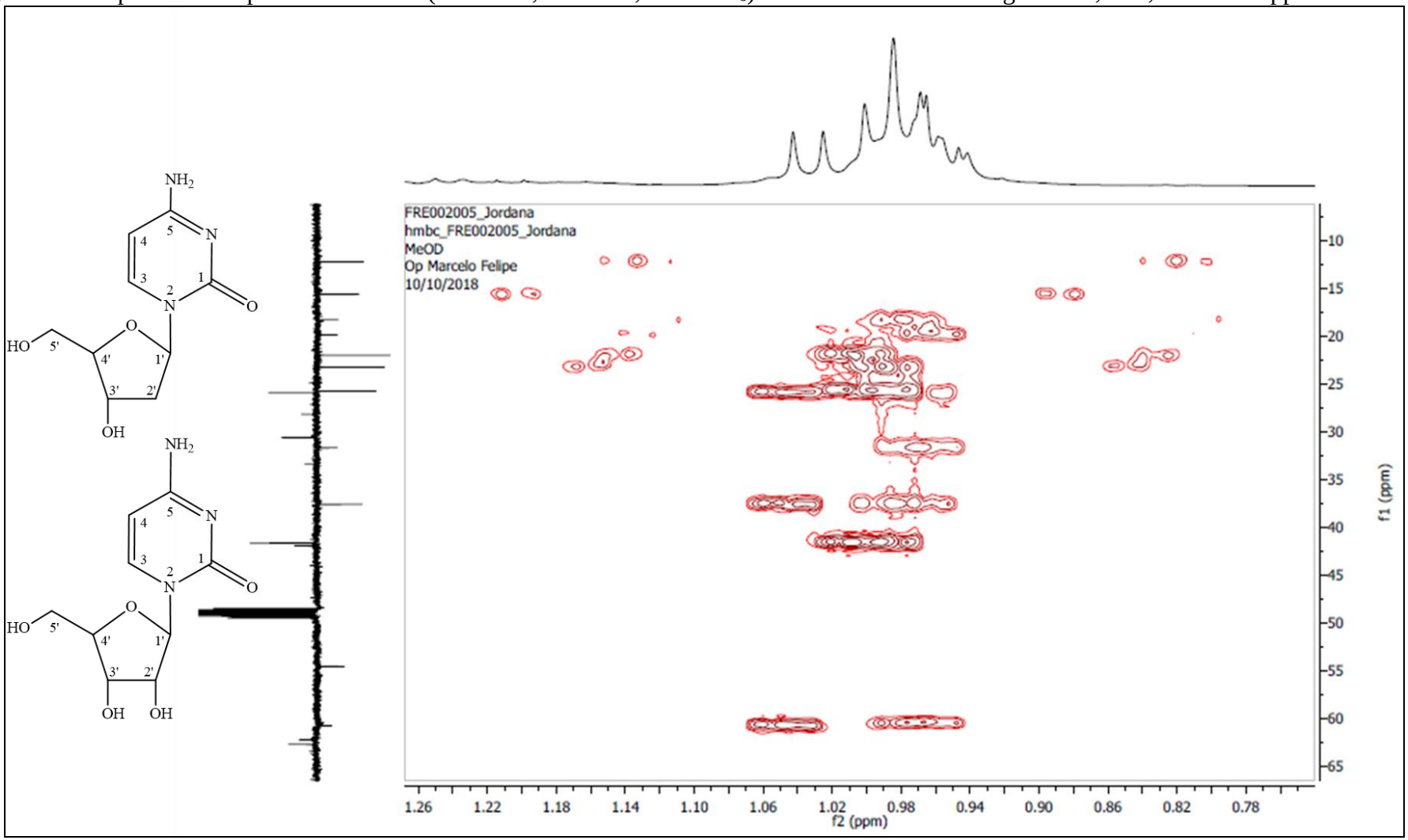
Fonte: Autor.

Figura 93– Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região 4,5-0,5 x 105-10 ppm



Fonte: Autor.

Figura 94 – Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B na região de 1,26-0,78 x 65-10 ppm



Fonte: Autor.

5.12.2 Caracterização estrutural de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E

Até então, outros sinais observáveis no espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) (Figura 95, página 190) e de RMN ^{13}C (100 MHz, M MeOH-d_6) (Figura 103, página 198) e em suas expansões (Figuras 102 a 106, páginas 199 a 201), levaram a sugerir que havia outras substâncias a serem caracterizadas em Bs-3.

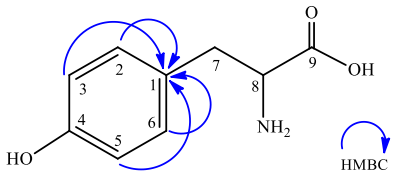
O espectro de RMN ^{1}H apresentou dois dubletos em δ_H 7,12 (d, *J*=8,4) e δ_H 6,75 (d, *J*=8,4), acoplando entre si. Esses sinais apresentaram integrais para dois hidrogênios cada, indicando que tais pares de hidrogênios são quimicamente equivalentes. Assim, sugeriu-se que a molécula poderia conter um anel aromático *p*-substituído. A presença de uma cadeia lateral foi fortalecida devido um singleto largo em δ_H 4,30 (sl) (ALMEIDA et al, 2014).

O espectro de RMN ^{13}C APT (Figura 103, página 198) e suas expansões (Figuras 104 a 106, páginas 199 a 201) apresentaram sinais indicativos de três carbonos não hidrogenados (δ_C 128,0 (C – 1), δ_C 159,1 (C – 4) e δ_C 176,0 (C – 9), destacando-se este último para um carbono carbonílico. Foi observado sinais para carbonos metínicos referentes a cinco átomos de carbonos (δ_C 131,2 (C – 2 e 6), δ_C 116,4 (C – 3 e 5) e δ_C 55,3 (C – 8), além de uma absorção condizente a carbono metilênico (δ_C 49,0 (C – 4) (ALMEIDA *et al.*, 2014).

O espectro de HMBC (Figura 111, página 206) e suas expansões (Figuras 112 a 115, página 207 a 210) confirmaram a presença do anel aromático por meio da correlação H – 3 e H – 5 (δ_H 6,75) a ^{3}J com C-1 (δ_C 128) e H – 2 e H – 6 (δ_H 7,12) a ^{3}J com C-1 (δ_C 128).

Após compilação dos dados de RMN e comparação com dados da literatura (Tabela 18, página 185), definiu-se que Bs-3C se tratava do aminoácido tirosina, isolado pela primeira vez para cianobactéria.

Tabela 18 - Dados de RMN de HSQC e HMBC (δ, MeOH-d_6, 400 MHz, 100 MHz) de Bs-3C em comparação com dados de Pretsch et al., (2000)



	Bs-3C				Tirosina (Literatura) TFA-d_6, 60MHz	
	HSQC		HMBC			
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
C						
1	128	-	-	H-3/H-5	-~138	-
4	159	-	-	H-2/H-6	156,3	-
9	176	-	-	-	175,0	-
CH						
2/6	131,24	7,12 (d, 8,4)	-	-	130,5	7,27
3/5	116,46	6,75 (d, 8,4)	-	-	117,5	7,03
8	55,37	4,30	-	-	57,3	4,64
CH_2						
7	49,0	-	-	-	37,o	3,60, 3.34

Fonte: Autor.

Nos espectros de ^{1}H (400 MHz, MeOH-d_6) (Figura 95, página 190) e suas expansões (Figuras 96 a 102, página 191 a 197) ainda foi possível observar sinais que levaram a sugerir a presença de dois aminoácidos alifáticos, onde, no espectro de ^{1}H apresentaram-se absorções entre δ_H 0,97 – 3,58 (BREITMAIERAND; VOELTER, 1987; PRETSCH *et al.*, 2000).

No espectro de RMN ^{13}C de APT (100 MHz, MeOH-d_6) (Figura 103, página 198) e suas expansões (Figuras 104 a 106, página 199 a 201) observou-se dois sinais para carbonos não hidrogenados (δ_C 174,00 (C – 1d) e δ_C 176,00 (C – 1e), quatro carbonos metínicos (δ_C 60,50 (C – 2d), δ_C 37,24 (C – 3d), δ_C 54,29 (C – 2e) e δ_C 25,48 (C – 4e), dois metilênicos (δ_C 25,66 (C – 4d) e δ_C 41,67 (C – 3e) e quatro metílicos (δ_C 11,99 (C – 5d), δ_C 15,37 (C – 5d), δ_C 21,75 (C – 5e) e δ_C 23,00 (C – 5e) (BREITMAIERAND e VOELTER, 1987; PRETSCH *et al.*, 2000)

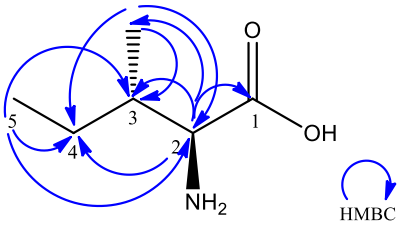
Os dados de HMBC (Figura 111, página 206) e suas expansões (Figuras 112 a 115, páginas 207 a 210) confirmaram correlações de H – 2d (δ_H 3,52) a ^2J com C – 1d (δ_C 174,0) e C – 3d (δ_C 37,2) e a ^3J com C – 6d (δ_C 15,3) e C – 4d (δ_C 25,6), de H – 6d (δ_H 1,03) a ^2J com C – 3d (δ_C 37,2) e a ^3J com C – 2d (δ_C 60,5) e C – 4d (δ_C 25,6) e de H – 5 (δ_H 0,97) a ^2J com C – 4d (δ_C 25,6) e a ^4J com C – 2d (δ_C 60,5).

Ainda foram observados nos espectros de HMBC (Figura 111 a 115, páginas 206 a 210) correlações do H – 2e (δ_H 3,58) a ^2J com C – 1e (δ_C 176,0) e com C – 3e (δ_C

41,6), H – 5e (δ_H 0,97) a ^3J com C – 3e (δ_C 41,6) e com C – 6e (δ_C 23,0) e H – 6e (δ_H 0,99) a ^3J com C – 5e (δ_C 21,7)) e com C – 3e (δ_C 41,6) e a ^4J com C – 2e (δ_C 54,2).

Desta forma, os dados espectrais de RMN uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura, tornaram exequível identificar as substâncias como isoleucina, (Tabela 19, página 186) e leucina (Tabela 20, página 187), codificadas como Bs-3D e Bs-3E, respectivamente, e isolados pela primeira vez em cianobactéria.

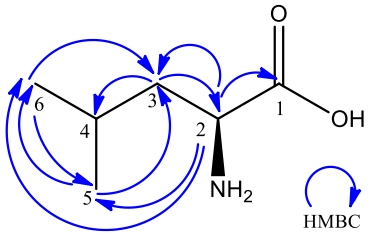
Tabela 19 - Dados de RMN de HSQC e HMBC (δ, MeOH-d_6, 400 MHz, 100 MHz) de Bs-3D em comparação com dados de Breitmaierand e Voelter (1987) e Pretsch et al. (2000)



	Bs-3D				Isoleucina (Literatura) DMSO-d_6, 60MHz	
	HSQC		HMBC			
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
C						
1	174	-	H-2		172,8	-
CH						
2	60,50	3,52 (d, 3,6)		3H-6; 3H-5 ($^4J_{CH}$)	58,7	4,41
3	37,24	1,95	H-2; 3H-6	3H-5	37,1	2,28
CH_2						
4	25,66	1,63, 1,25	3H-5	H-2; 3H-6	25,9	1,70, 1,55
CH_3						
5	11,99	0,97 (t, 7,6)			12,1	1,10 (t, 7,0)
6	15,37	1,03 (d, 7,3)		H-2	15,3	1,21 (d, 7,0)

Fonte: Autor.

Tabela 20 - Dados de RMN de HSQC e HMBC (δ, MeOH-d_6, 400 MHz, 100 MHz) em comparação com dados da literatura para Bs-3E



	Bs-3E				Leucina (Literatura) DMSO-d_6, 60MHz	
	HSQC		HMBC			
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
C						
1	176	-	H-2	-	-	-
CH						
2	54,29	3,58 (dd, 8,8, 4,0)	2H-3	-	52,8	4,28
4	25,48	1.8	2H-3	-	25,1	~2
CH_2						
3	41,67	1,80, 1,60	H-2	3H-5; 3H-6	40,1	~ 2
CH_3						
5	21,75	0,97 (d, 6,0)	-	2H-3; 3H-6	22,1	1,11
6	23,00	0,99 (d, 6,8)	-	2H-3; 3H-5	22,7	1,10

Fonte: Autor.

As cianobactérias contêm uma variedade de aminoácidos juntamente com açúcares, que biologicamente, estão envolvidos na melhoria da textura do solo por atuarem como agentes quelantes para metais pesados, podem estimular o crescimento de bactérias heterotróficas e também atuam como substâncias que promovem o crescimento das plantas (MISRA e KAUSHIK, 1989; RAJESHWARI e RAJASHEKHAR, 2011).

Quimicamente, é sabido também que as cianobactérias são ricas fontes de compostos bioativos, que estruturalmente são de natureza peptídica (BURJA *et al.*, 2001; WELKER e DÖHREN, 2006; CHIPALA *et al.*, 2011). A maioria desses cianopeptídeos está agrupada em sete famílias: anabaenopeptinas, cianopeptolinas, ciclamidas, microcistinas, microgininas, aeruginosinas e microviridinas (WELKER e DÖHREN, 2006).

Em um estudo realizado por Sanz *et al.*, (2015), foram avaliados os perfis peptídicos de 40 cepas de cianobactérias isoladas da filosfera de quatro espécies nativas de plantas na floresta costeira do Sudeste do Brasil, onde a linhagem *Brasilonema* sp., foi apontada como produtora de aeruginosinas, tetrapeptídeos lineares que contêm o aminoácido incomum 2-carboxi-6-hidroxiocta-hidroindol (Choi) na posição central e tipicamente contêm um derivado de arginina no C-terminal e entre outras características

químicas e estruturais, um pequeno aminoácido hidrofóbico (leucina ou isoleucina) está tipicamente presente na posição 2 (SHIN *et al.*, 1997).

Sanz *et al.*, (2015) apontaram ainda que a linhagem *Brasilonema* sp., é também produtora de anabaenopeptina, que são hexapeptídeos que contêm um anel de cinco aminoácidos, onde a posição 3 foi relatada como sendo ocupada primariamente por valina ou isoleucina / leucina (SHIN *et al.*, 1997).

Em nosso estudo não foi possível tornar claro se a presença da isoleucina e da leucina, estaria associada a presença de cianopeptídeos do metabolismo secundário ou se realmente consta como aminoácido essencial do metabolismo pimário da cianobactéria. Mais esforços devem ser dispensados para elucidar estas respostas.

Uma vez que constatado que a linhagem *Brasilonema* sp. é produtora de aminoácidos, estudos posteriores poderão quantificar a sua produção como uma promissora fonte de aminoácidos, direcionando seu cultivo para uma produção industrial de biomassa.

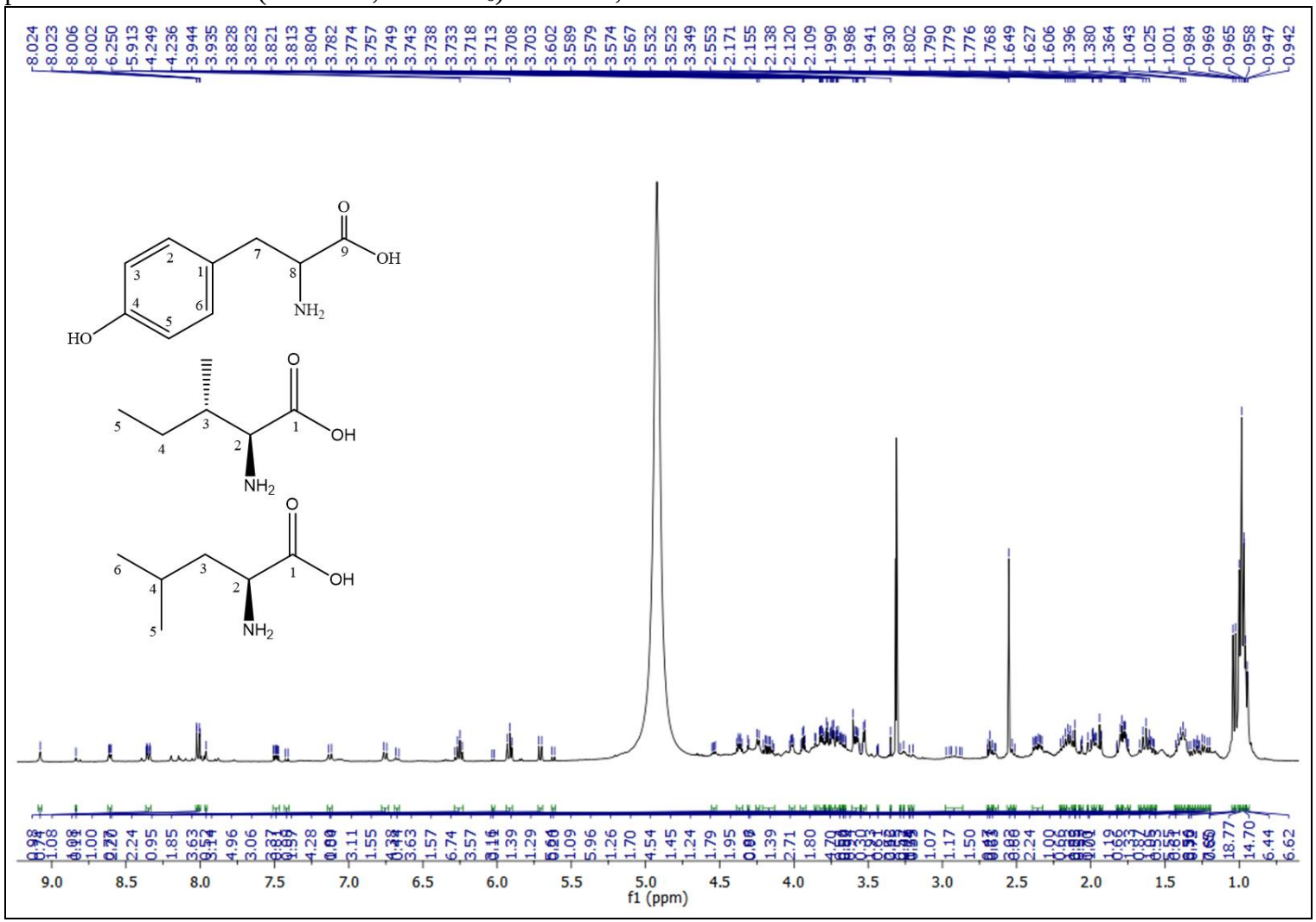
Dos vinte aminoácidos existentes, oito são considerados aminoácidos essenciais, o que significa que não podem ser produzidos pelo organismo em quantidades fisiologicamente significativas e, portanto, são componentes cruciais de uma dieta balanceada, os demais são considerados não essenciais e são sintetizados pelo próprio organismo No entanto, enquanto construtores das proteínas (principais componentes nutricionais) aminoácidos essenciais e não essenciais devem estar presentes em quantidades adequadas para realização da síntese proteica (MATTHEWS, 1999; BLOMSTRAND *et al.*, 2006; WOLFE, 2017).

Quanto a origem, função e aplicação, a tirosina é um aminoácido não essencial e pode ser formada a partir da fenilalanina pela fenilalanina hidroxilase no fígado e no rim, levando à produção de L-tirosina, a forma biologicamente ativa da tirosina. Esta enzima remove qualquer excesso de fenilalanina. Mutações no gene desta enzima levam à fenilcetonúria. A tirosina é metabolizada em substâncias importantes no corpo, como as os neurotransmissores catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), noradrenalina, e dopamina e o pigmento tecidual, a melanina, assim como outros metabólitos (DEIJEN, 2005; WEBSTER; WILDGOOSE, 2010; LITWACK, 2018). Outros estudos indicam que a suplementação de tirosina em humanos melhora os déficits cognitivos e comportamentais induzidos pelo estresse, em particular tarefas de memória, trabalho e foco atencional (DEIJEN, 2005; KAPALKA, 2010; JONGKEES *et al.*, 2014; STEENBERGEN *et al.*, 2015).

A isoleucina e a leucina, juntamente com a valina compreende os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs - Branched-chain amino acids). No tocante a proteína muscular, a leucina não é apenas um precursor para a síntese de proteína muscular, mas também pode desempenhar um papel como um regulador das vias de sinalização intracelular que estão envolvidas no processo de síntese de proteínas (BLOMSTRAND *et al.*, 2006; WOLFE, 2017).

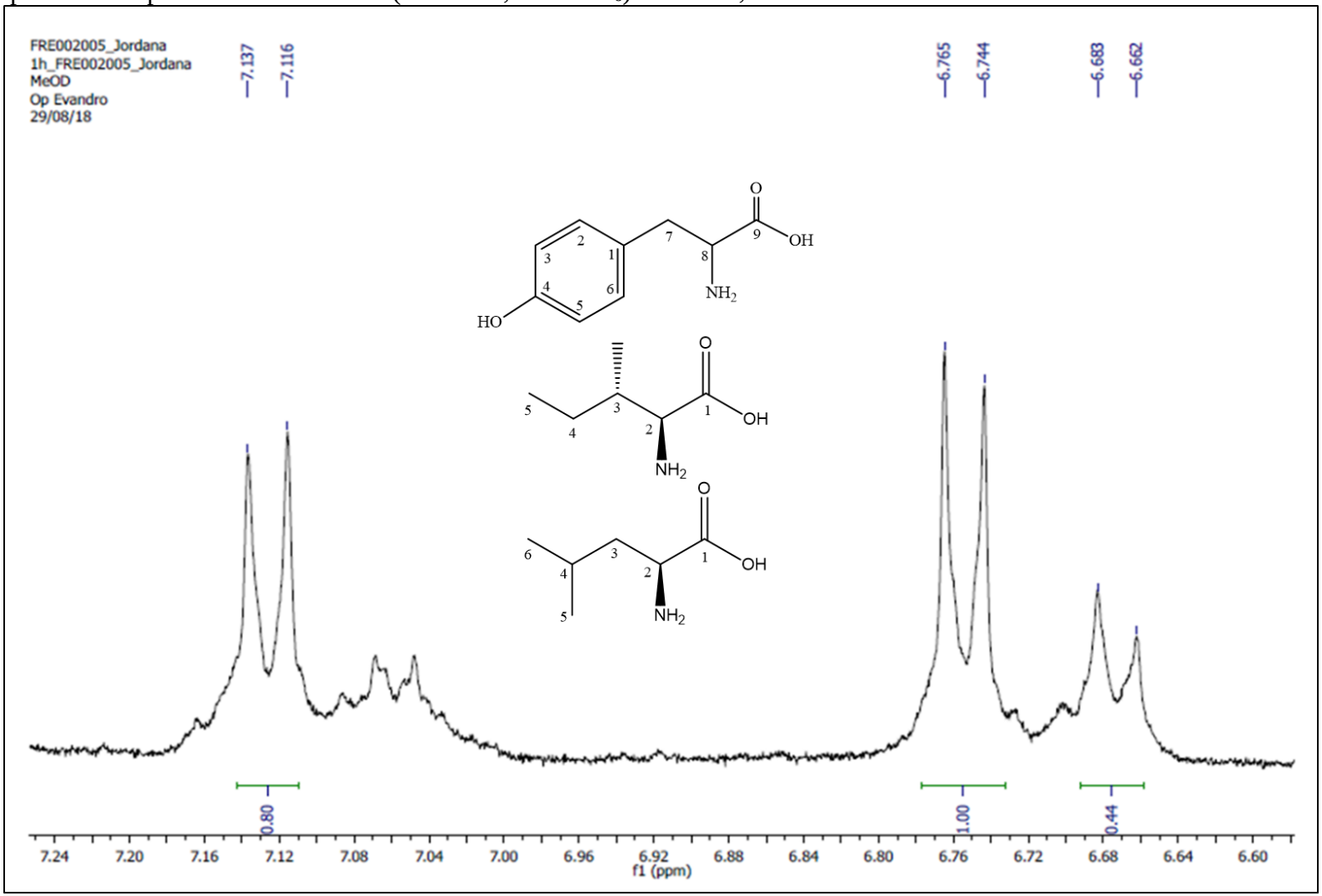
Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) são aminoácidos essenciais e por apresentarem propriedades anabólicas de proteínas, acredita-se que sua suplementação mitigue a caquexia, previna ou trate sinais de encefalopatia hepática, atenuando a fadiga durante o exercício, promova a cicatrização de feridas e estimule a produção de insulina. No entanto, até hoje, não há consenso sobre seu uso como suplementos nutricionais (CHEN *et al.*, 2015; BIFARI; NISOLI, 2017 HOLEČEK, 2018)

Figura 95 - Espectro de RMN de 1H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E



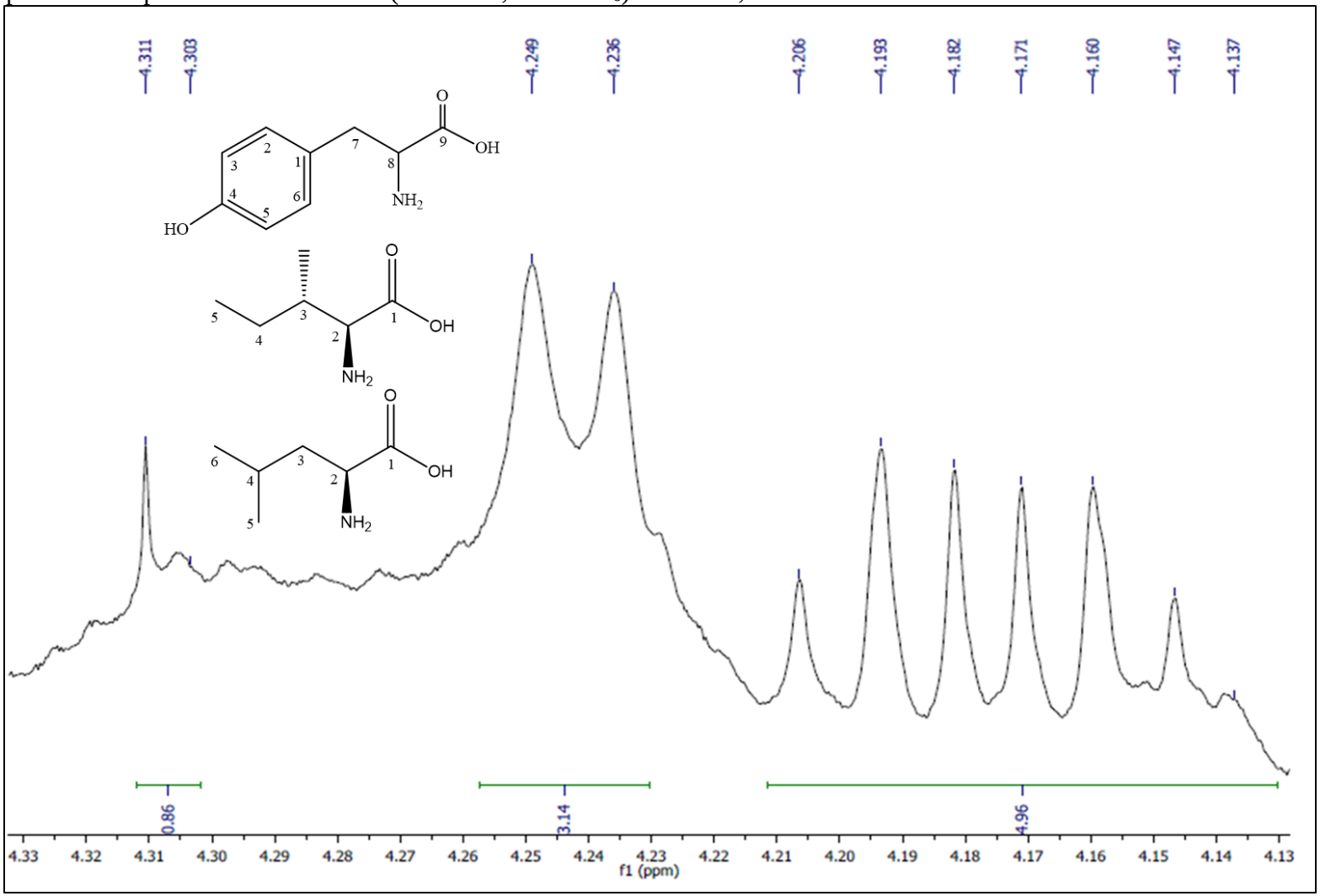
Fonte: Autor

Figura 96 - Expansão do espectro de RMN de 1H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E



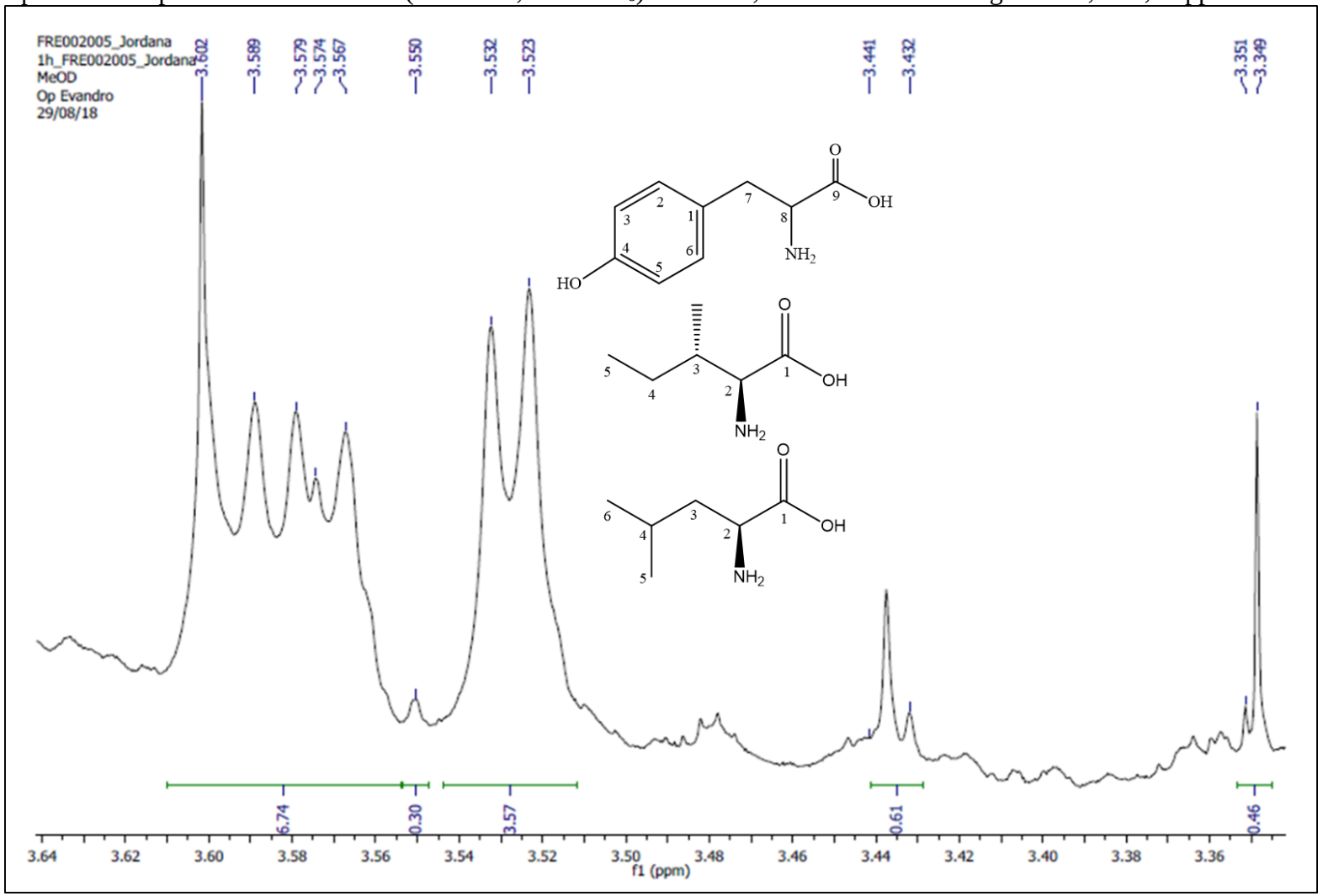
Fonte: Autor

Figura 97 - Expansão do espectro de RMN de 1H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E



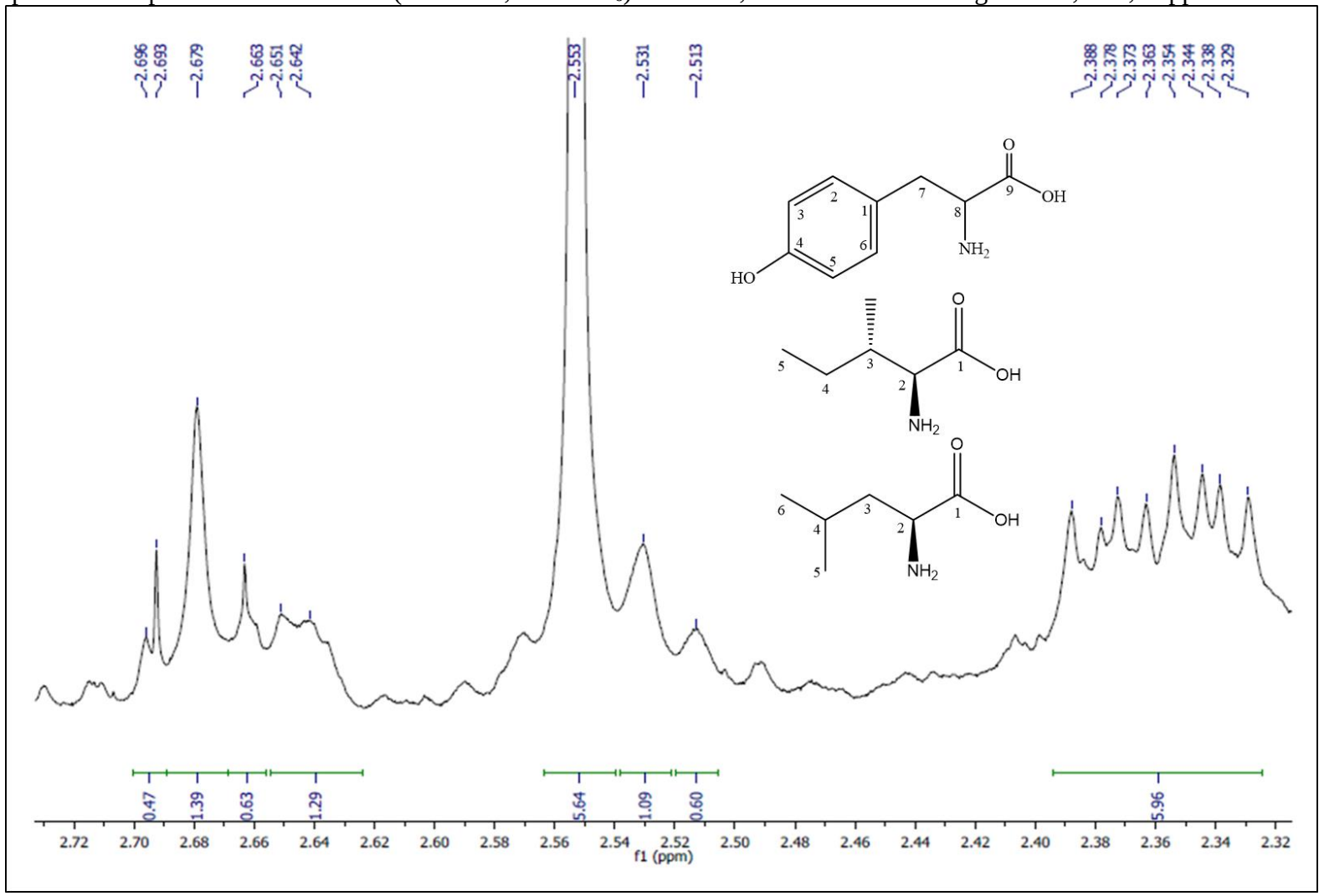
Fonte: Autor

Figura 98 - Expansão do espectro de RMN de 1H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 3,64-3,36 ppm



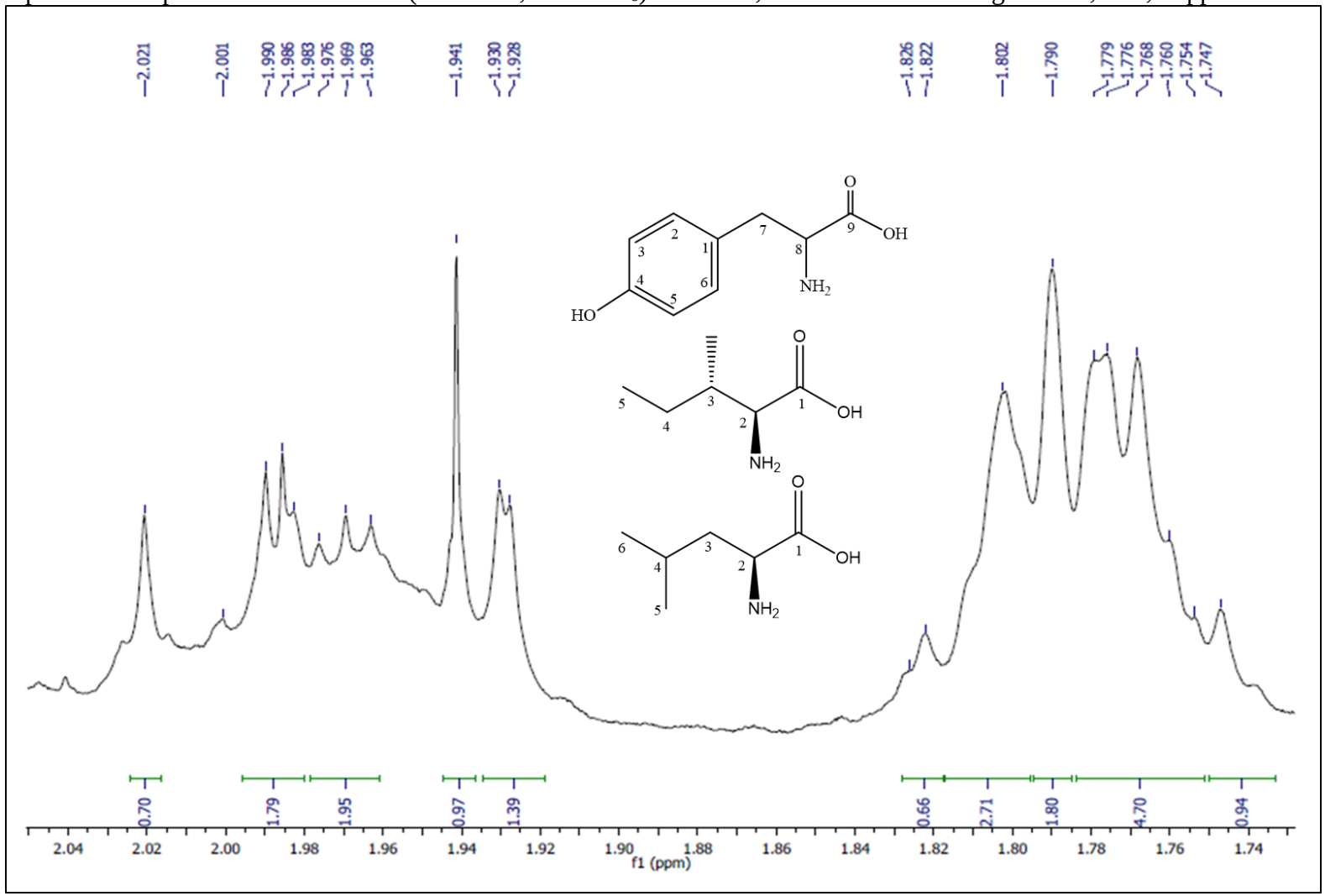
Fonte: Autor

Figura 99 - Expansão do espectro de RMN de 1H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 2,72-2,32 ppm



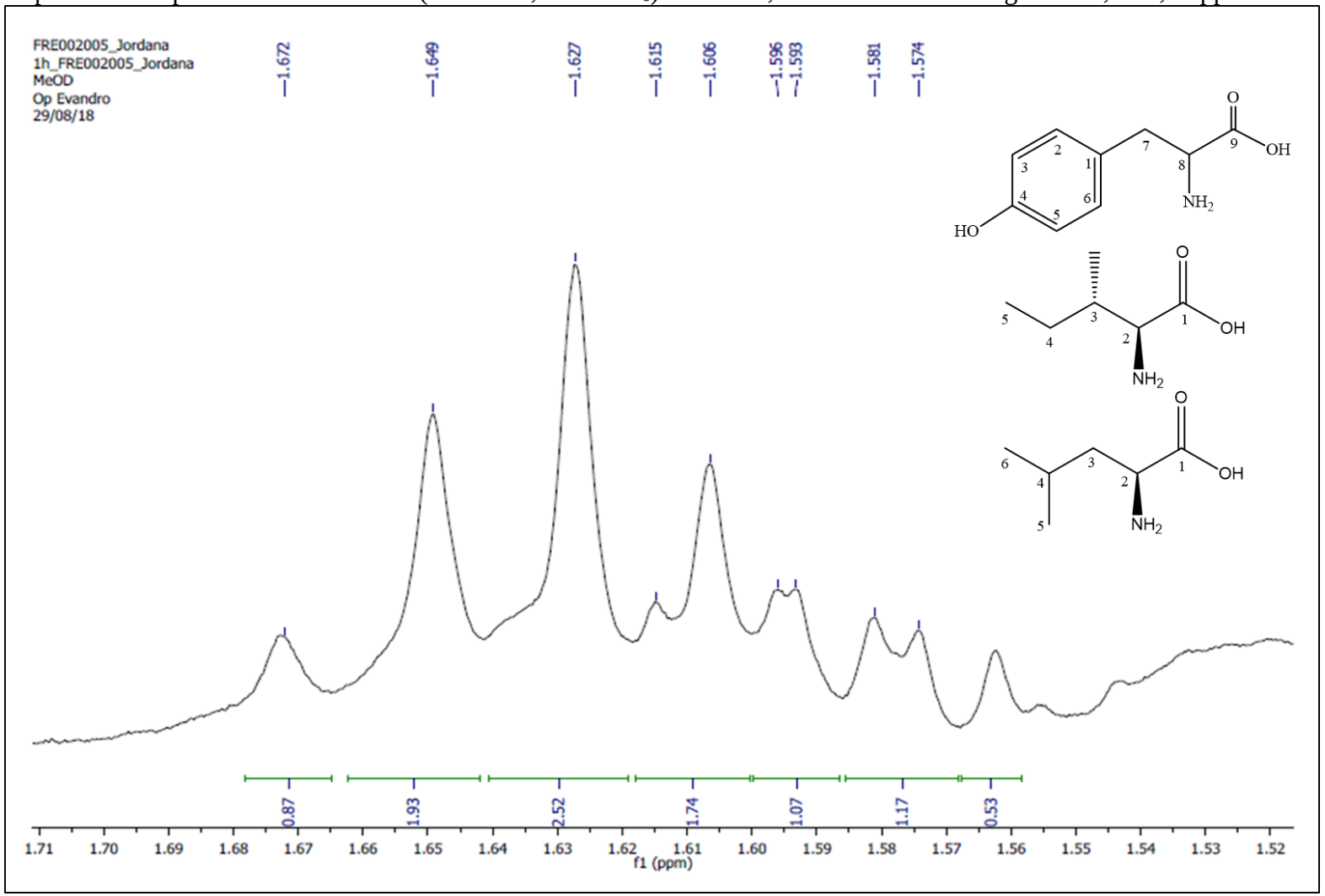
Fonte: Autor

Figura 100 - Expansão do espectro de RMN de 1H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 2,04-1,74 ppm



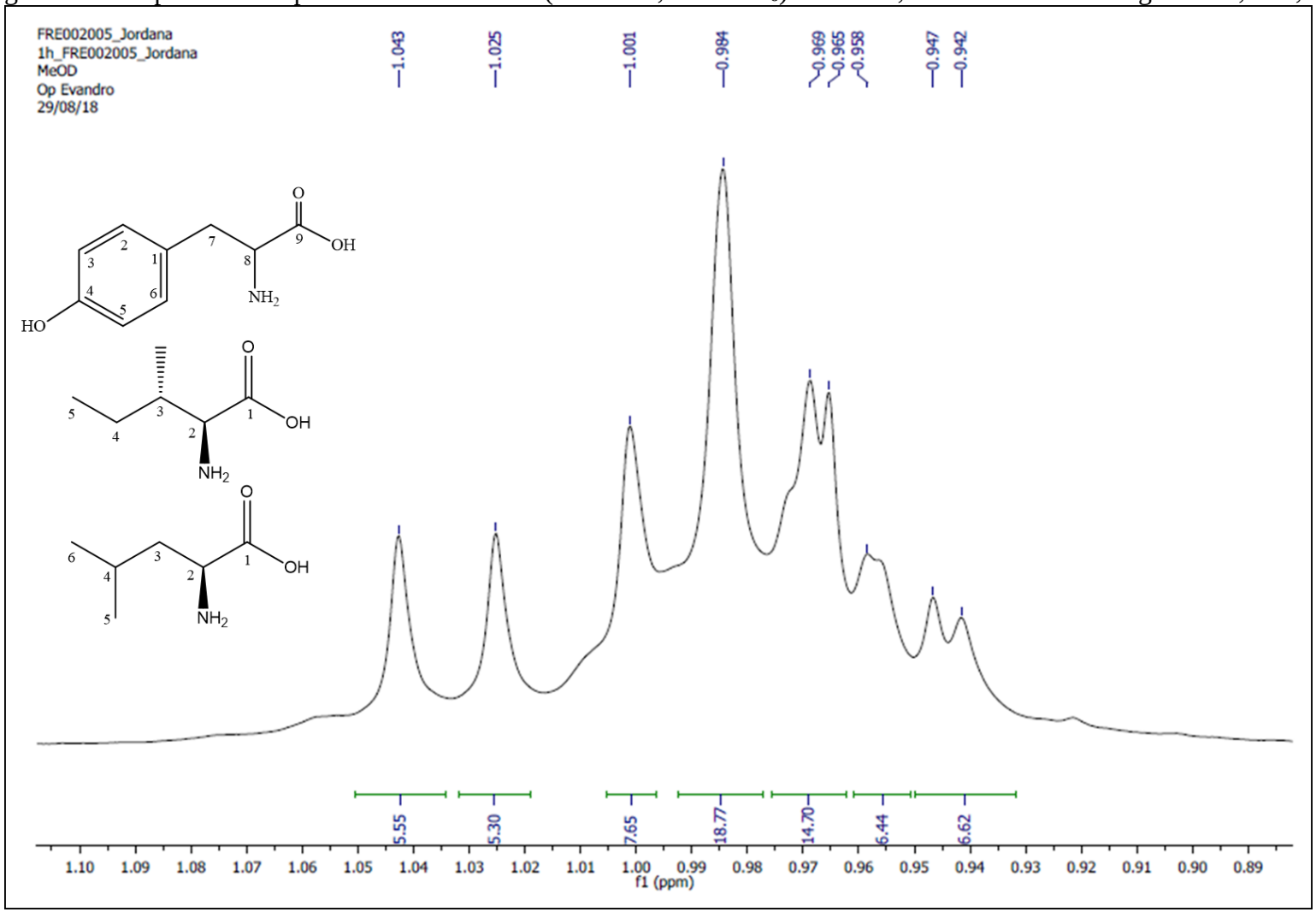
Fonte: Autor

Figura 101 - Expansão do espectro de RMN de 1H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 1,71-1,52 ppm



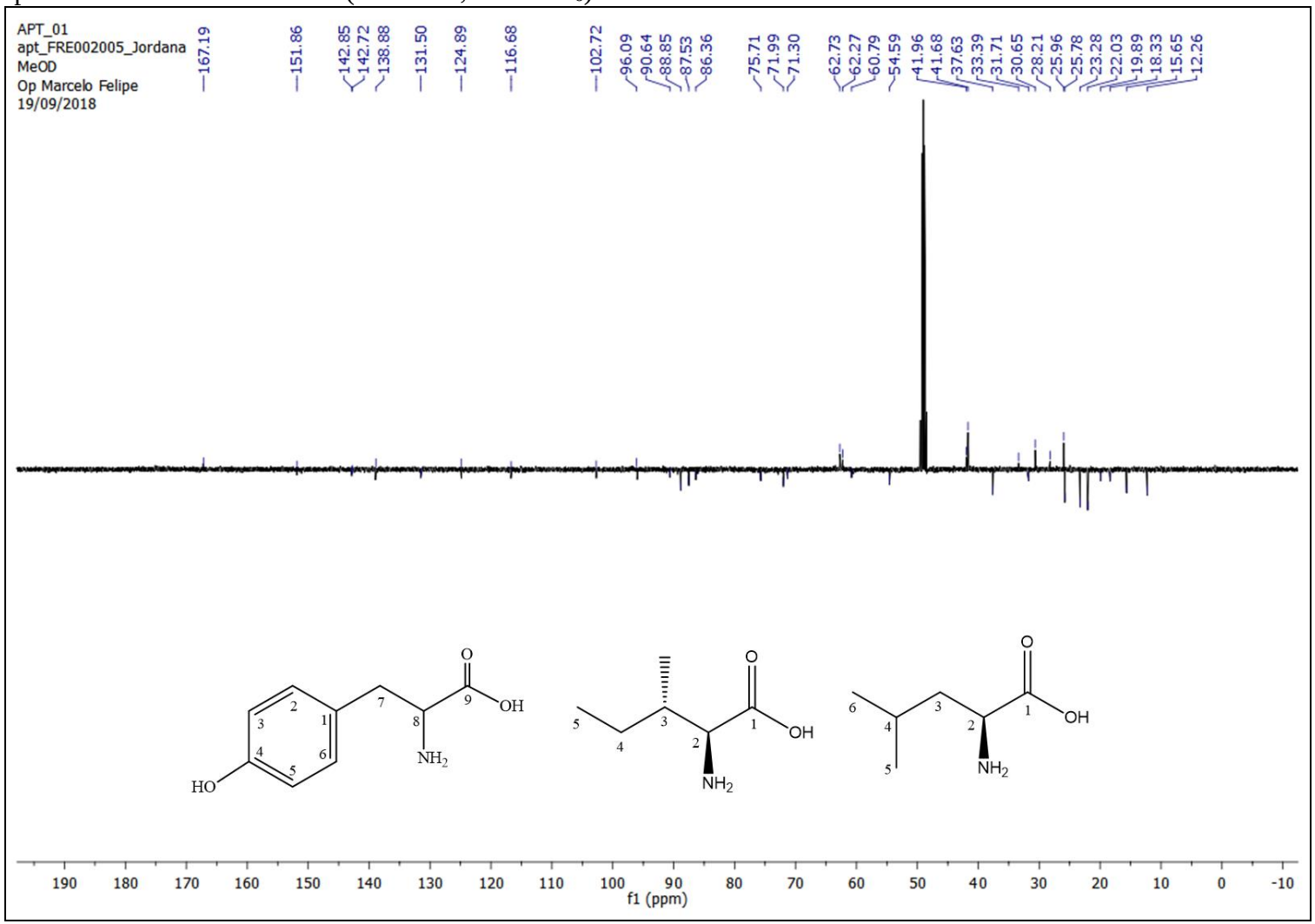
Fonte: Autor

Figura 102 - Expansão do espectro de RMN de 1H (400 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 1,10-0,89 ppm



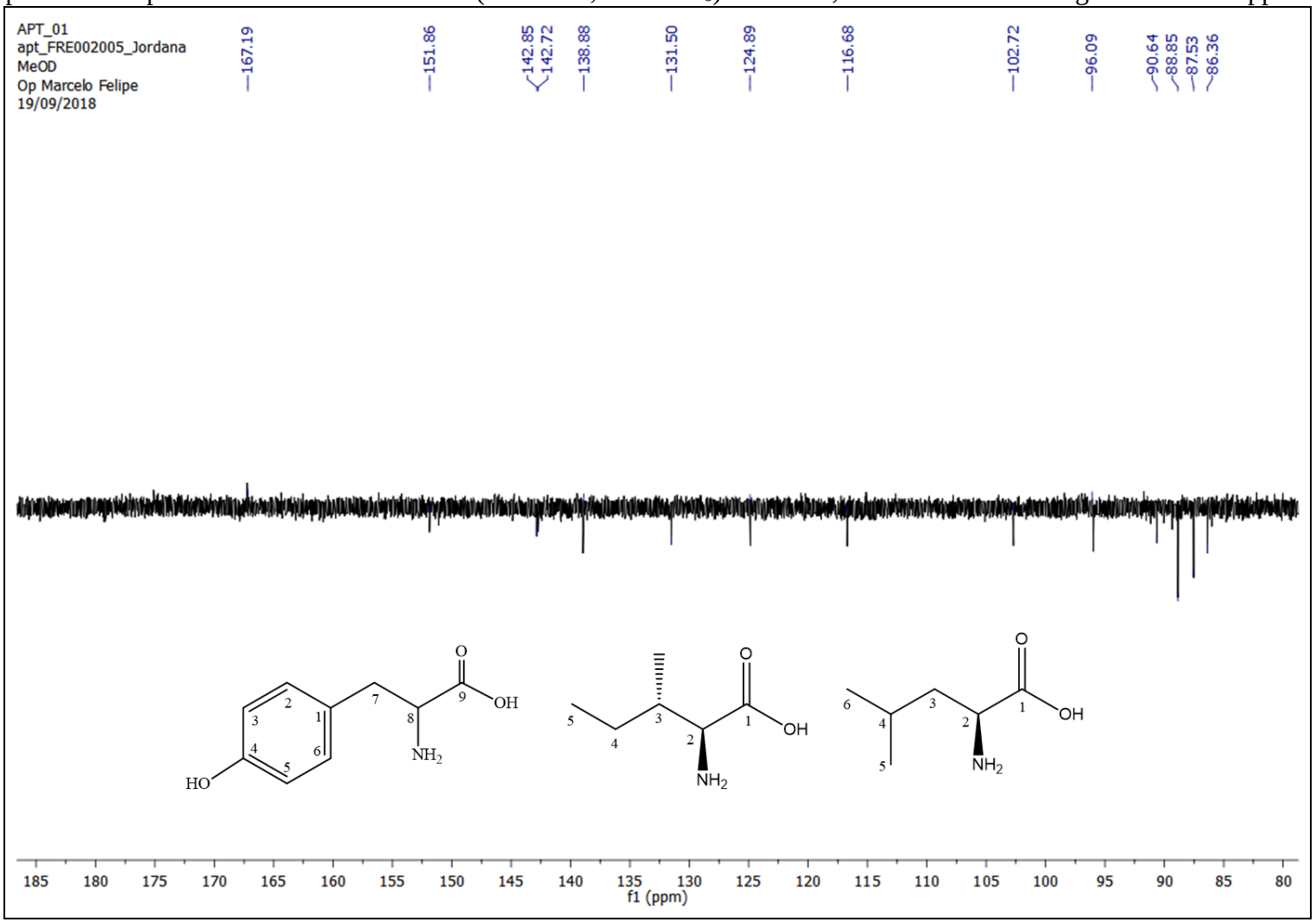
Fonte: Autor

Figura 103 - Espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3A e Bs-3B



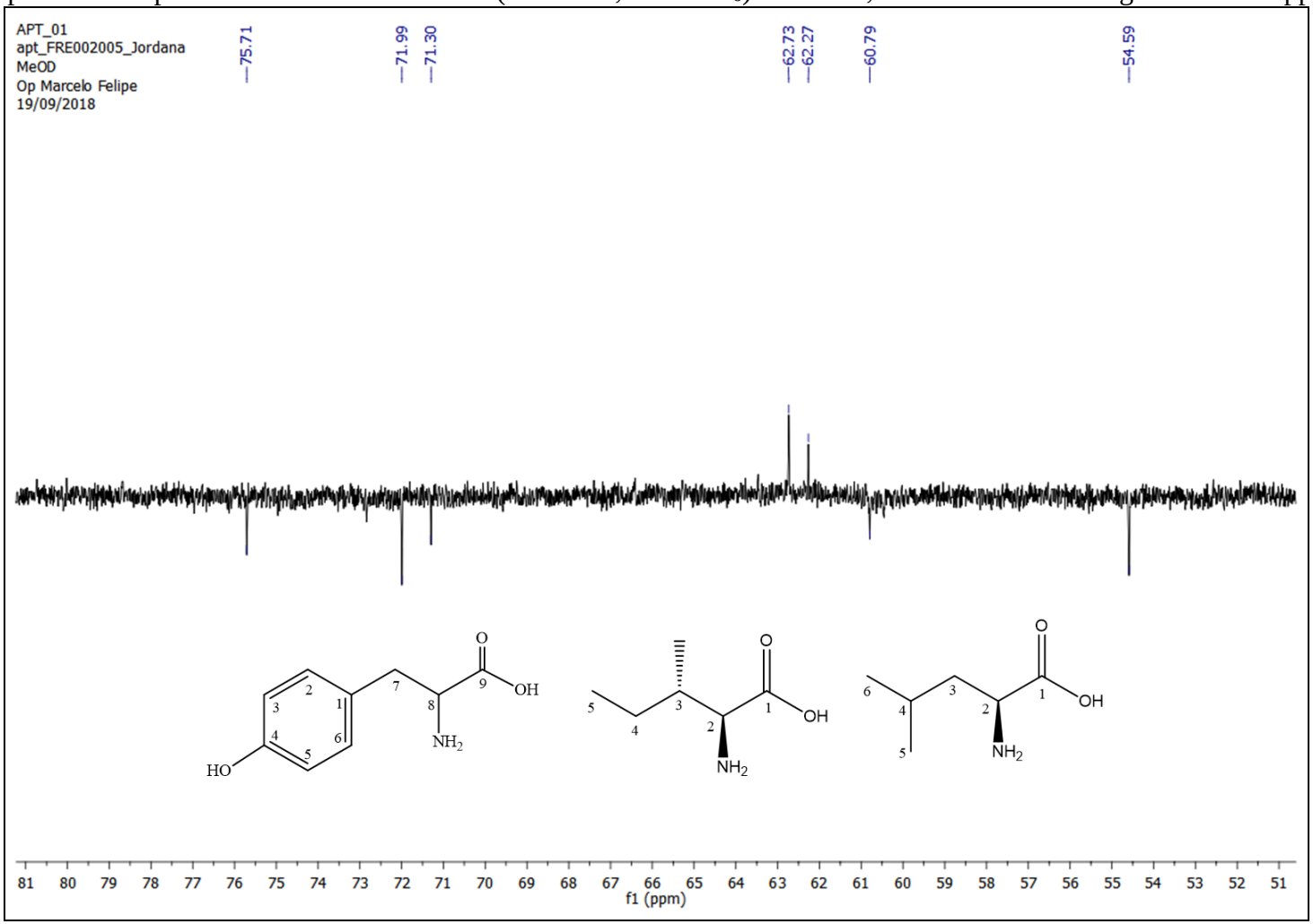
Fonte: Autor

Figura 104 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 185-80 ppm



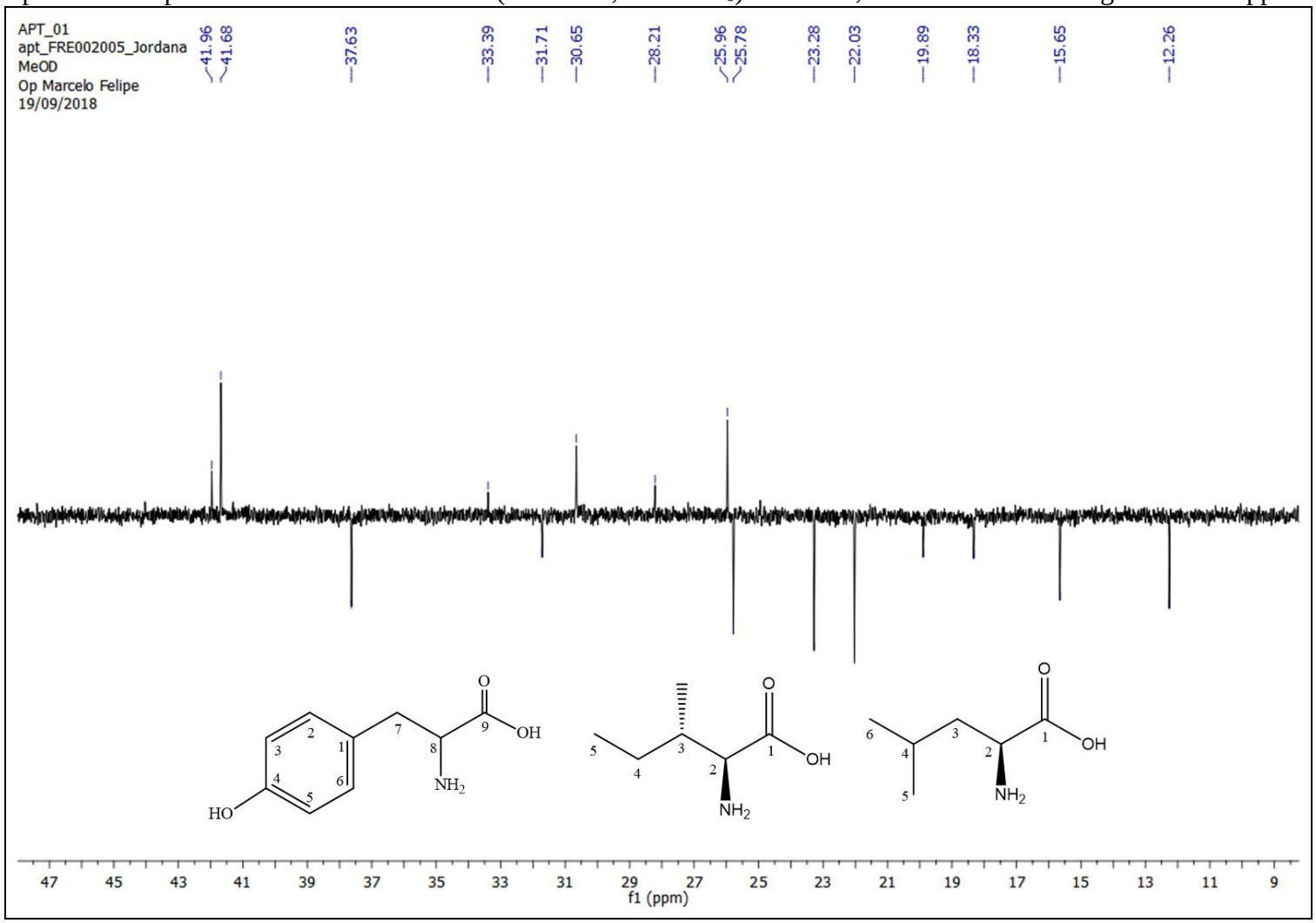
Fonte: Autor

Figura 105 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 80-50 ppm



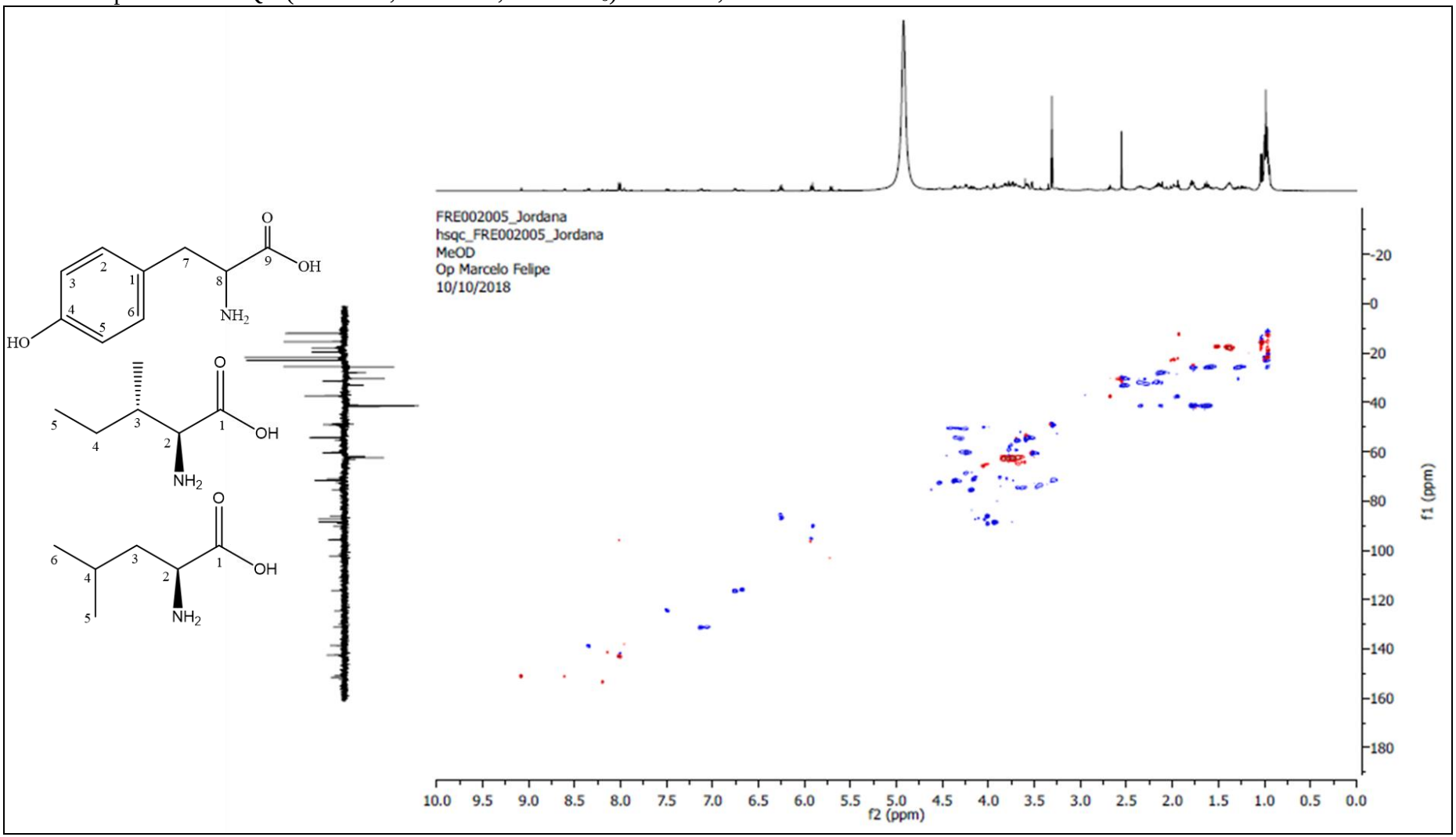
Fonte: Autor

Figura 106 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C APT (100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 47-9 ppm



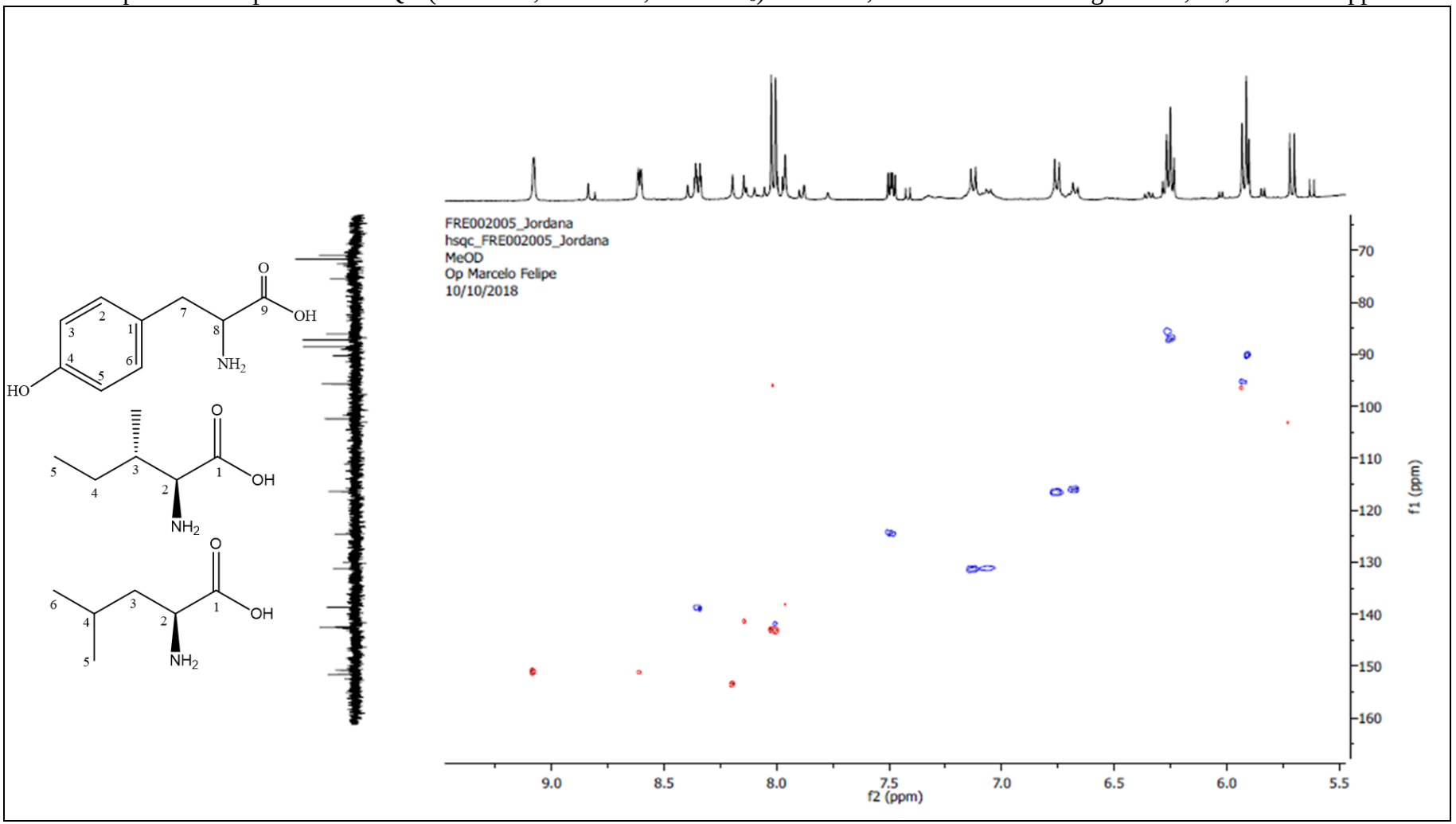
Fonte: Autor

Figura 107 - Espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E



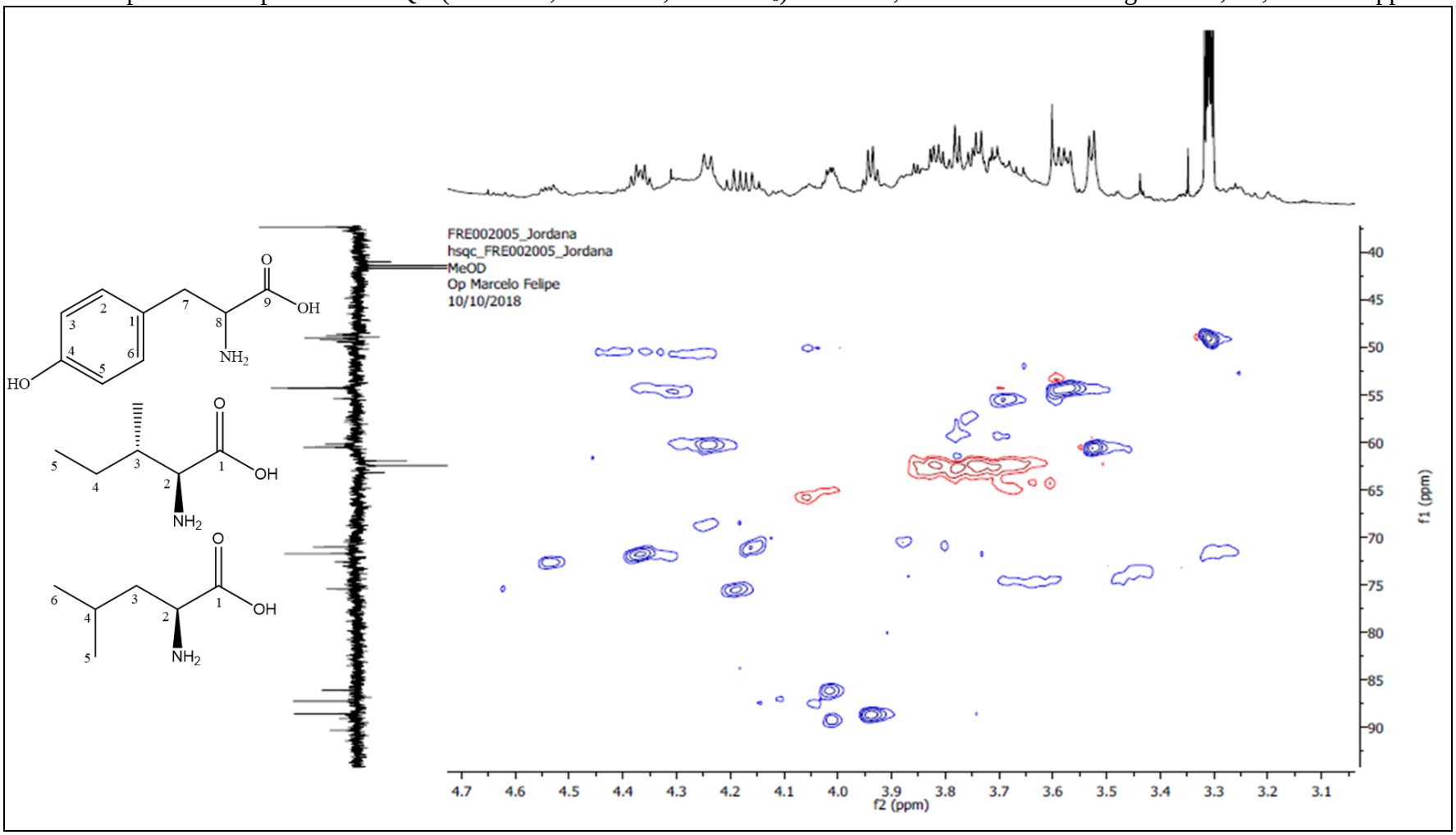
Fonte: Autor

Figura 108 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 9,0-5,5 x 165-70 ppm



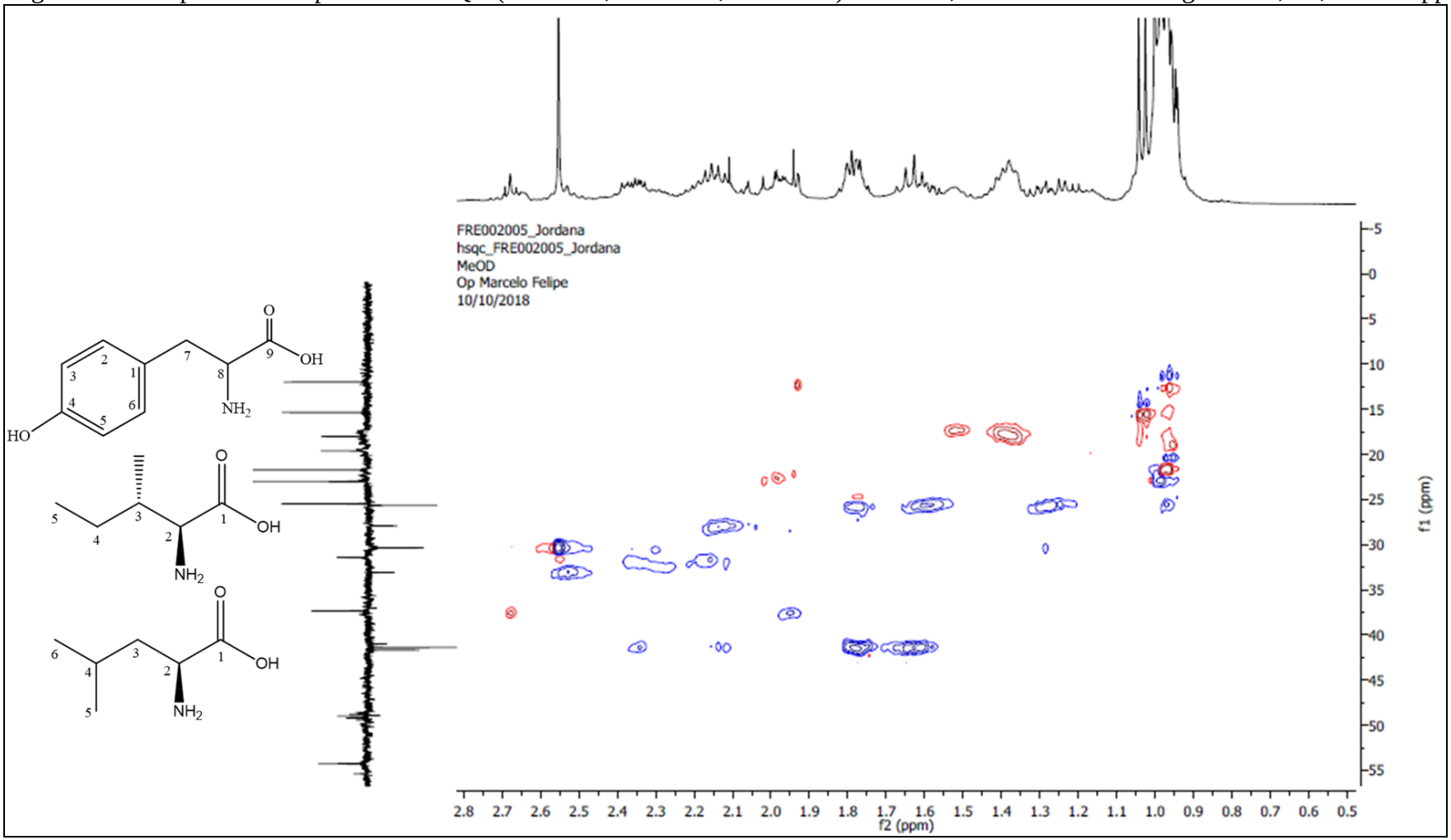
Fonte: Autor

Figura 109 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 4,7-3,0 x 95-40 ppm



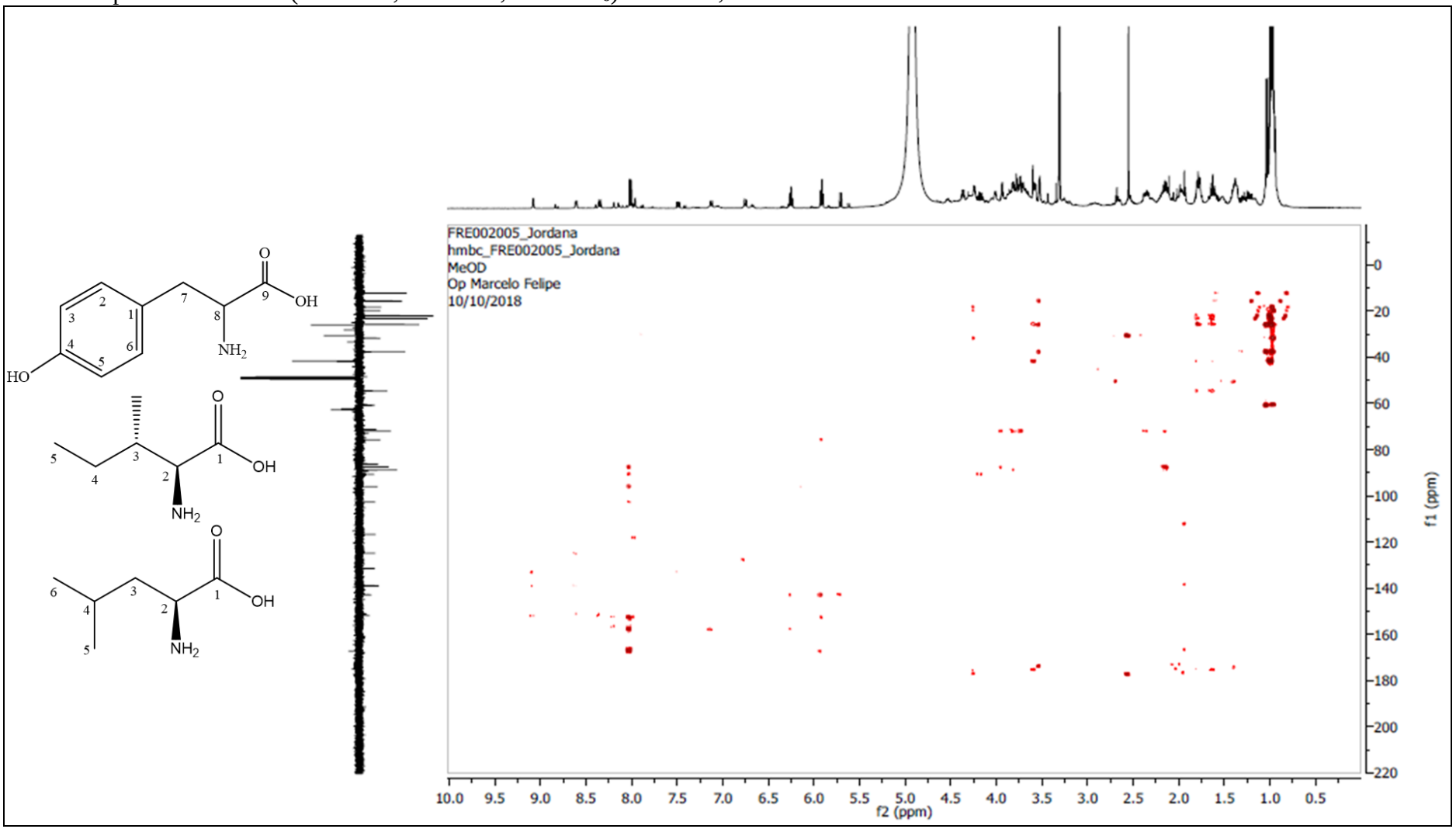
Fonte: Autor

Figura 110 – Expansão do espectro de HSQC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 2,8-0,5 x 55-5 ppm



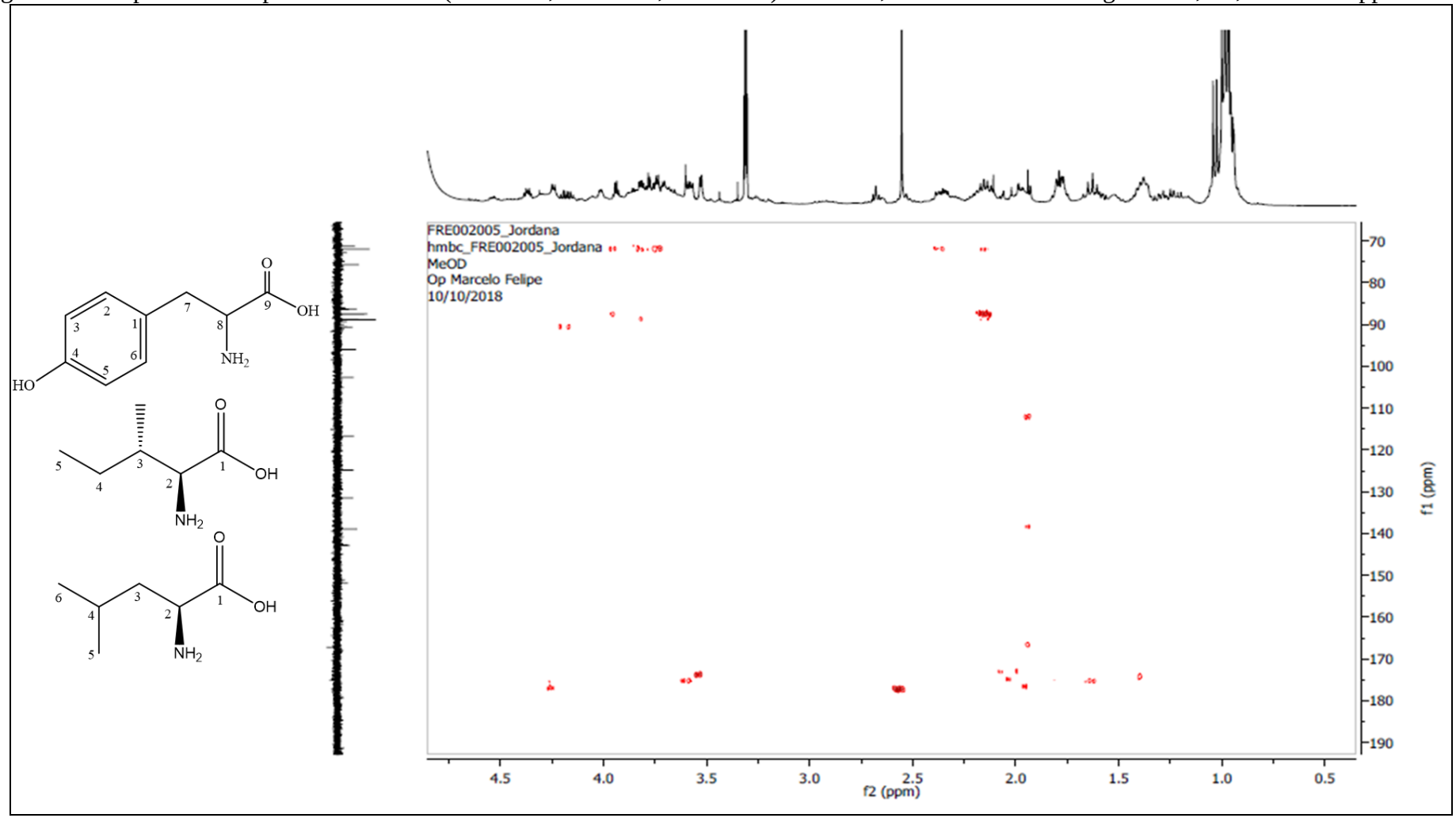
Fonte: Autor

Figura 111 - Espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E



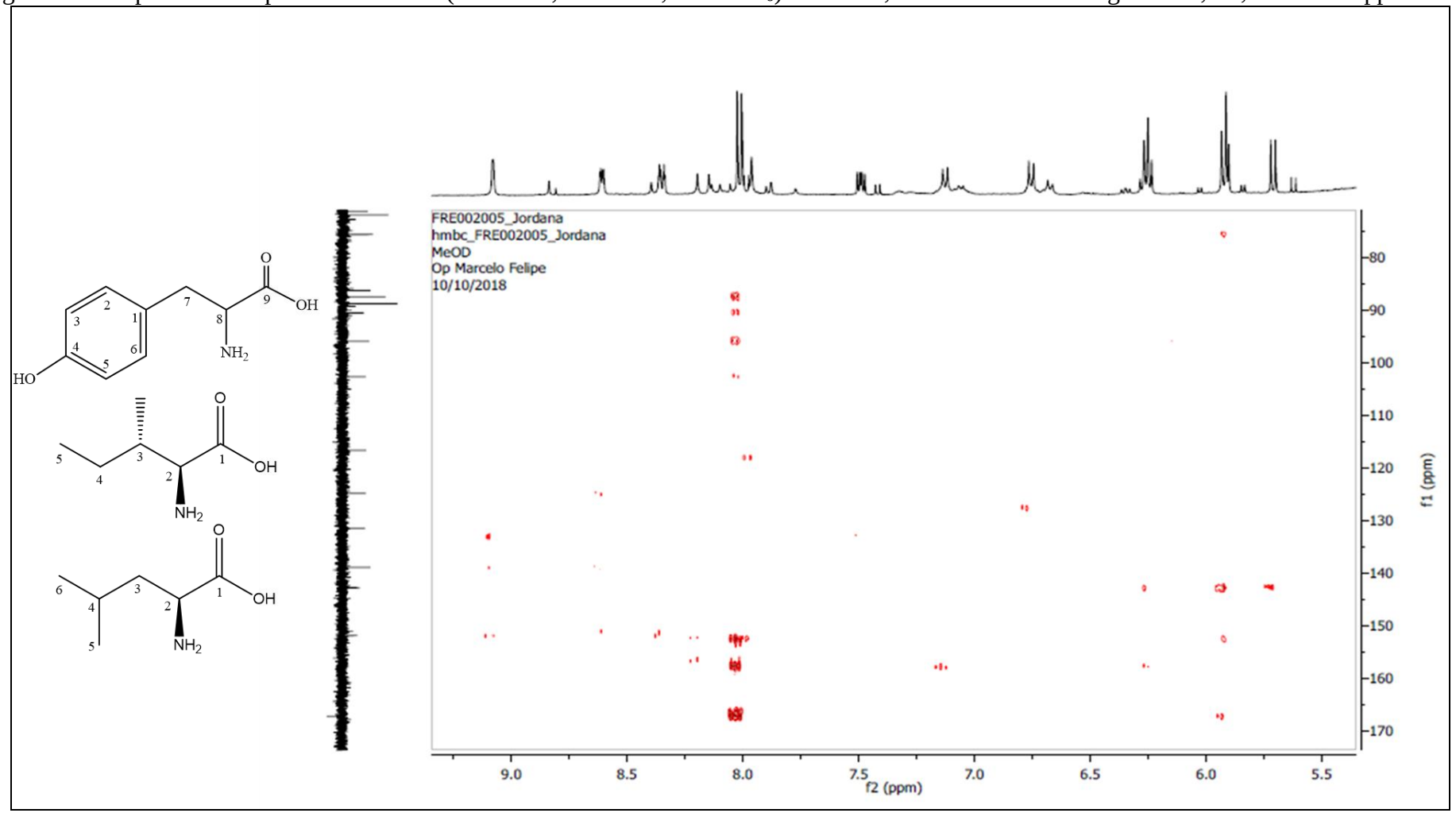
Fonte: Autor

Figura 112- Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 4,5-0,5 x 190-70 ppm



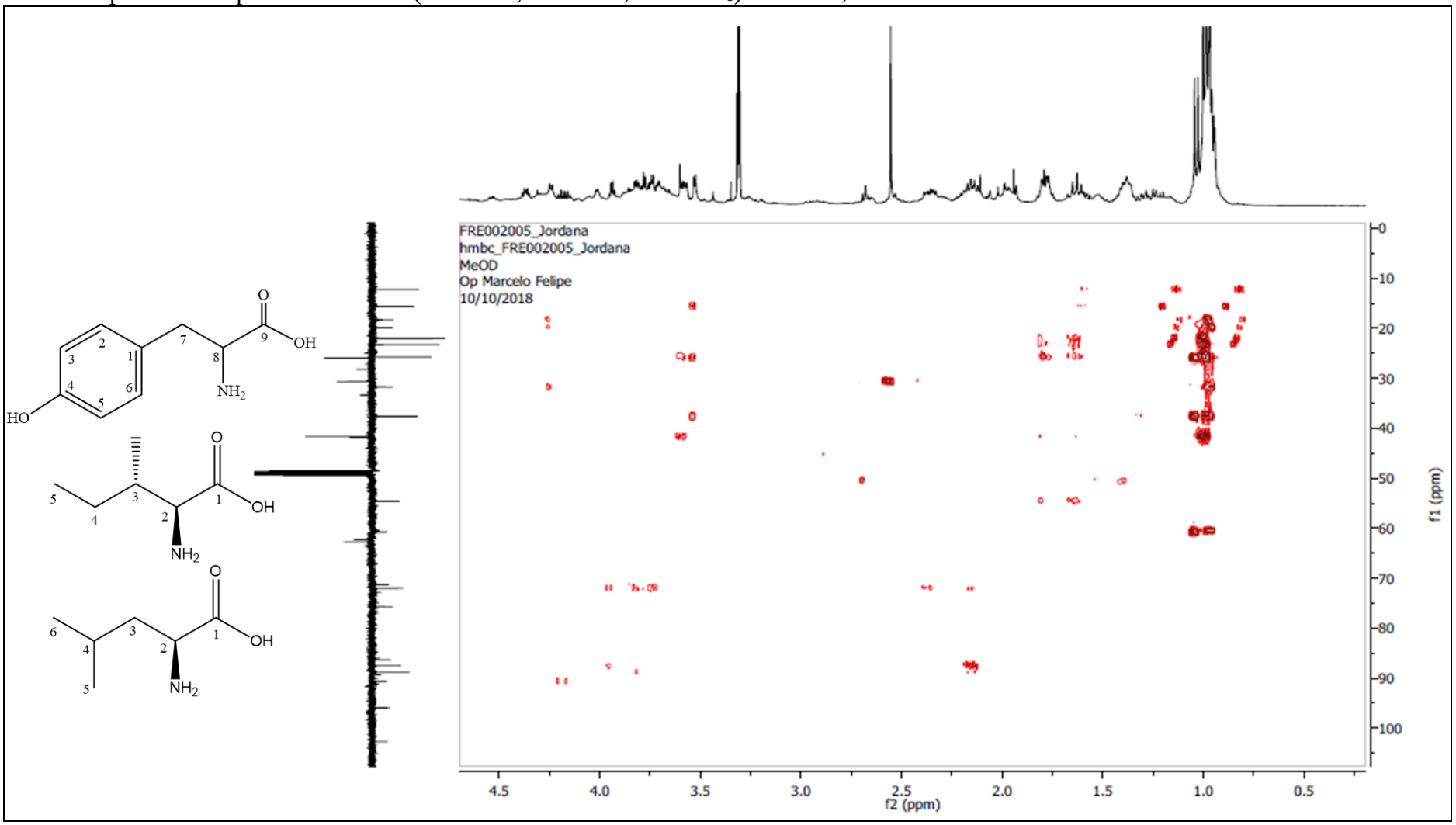
Fonte: Autor.

Figura 113- Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 9,0-5,5 x 170-80 ppm



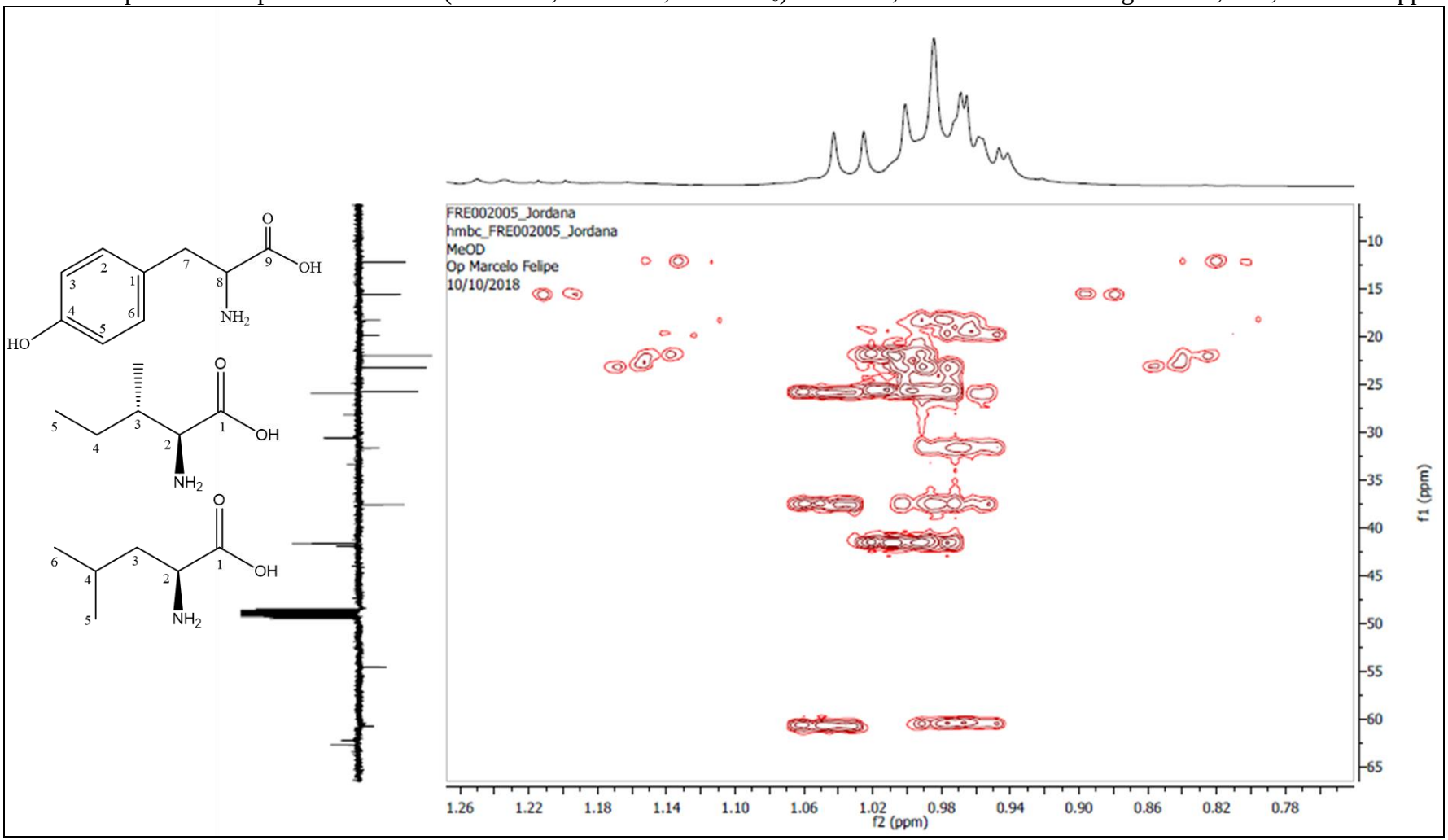
Fonte: Autor.

Figura 114- Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E



Fonte: Autor.

Figura 115 - Expansão do espectro de HMBC (400 MHz, 100 MHz, MeOH-d_6) de Bs-3C, Bs-3D e Bs-3E na região de 1,26-0,78 x 65-10 ppm



Fonte: Autor.

5.13 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* das substâncias isoladas da cianobactéria *Brasilonema* sp. (D298WC)

As amostras foram testadas na concentração de 50 µM (Bs-1 e Bs-2) e 50 µg/mL (Bs-3), não apresentando atividade para Bs-1 e Bs-2 e pouca atividade para Bs-3 quando para as células de carcinoma colorretal (HCT-116) (Tabela 21, página 211). Quando para células de adenocarcinoma mamário (MCF-7), Bs-1 apresentou pouca atividade, Bs-2 não apresentou atividade e Bs-3 apresentou atividade moderada (Tabela 22, página 211).

Logo constata-se que os alcaloides isolados (Bs-2A e Bs-2B) não apresentam atividade citotóxica para essa células. E quanto a substância Bs-1 e a mistura Bs-3, o mecanismo de interação destas com as linhagens precisa ser explorado em pesquisas futuras.

Tabela 21 -Efeito das substâncias na viabilidade das células HCT-116 após 72 h de tratamento.

Produtos teste/ linhagens celulares	**% de inibição**	
	HCT-116	**Erro Padrão**
Bs-1	7,55	0,87
Bs-2	0,27	2,43
Bs-3	29,68	0,63

Fonte: Autor.

Nota: Os resultados são expressos como média ± erro padrão de um experimento independente em triplicata, testado na concentração de 50 µM. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. ***** $p<0,05$ em relação ao controle não tratado.

Tabela 22 - Efeito das substâncias na viabilidade das células MCF-7 após 72 h de tratamento.

Produtos teste/ linhagens celulares	**% de inibição**	
	MCF-7	**Erro Padrão**
Bs-1	28,00	2,52
Bs-2	0	0
Bs-3	40,24	2,29

Fonte : Autor.

Nota: Os resultados são expressos como média ± erro padrão de um experimento independente em triplicata, testado na concentração de 50 µM. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. ***** $p<0,05$ em relação ao controle não tratado.


Conclusões

6 CONCLUSÕES

- As linhagens de cianobactérias *Arthrospira platensis* (D39Z), *Stanieria* sp. (D112Z) e *Brasilonema* sp. (D298WC) cultivadas em meios sintéticos e em condições controladas apresentaram parâmetros cinéticos de crescimento diferenciados, uma vez que são de gêneros diferentes, o que evidencia respostas distintas às condições de cultivo, fator este que deve ser levado em consideração quando na escolha da linhagem para obtenção de moléculas de interesse;

- A microcistina, que é potencialmente letal, não foi detectada em nenhuma das linhagens estudadas, contudo não se pode afirmar que essas cepas estejam isentas de toxicidade, pois outros tipos de cianotoxinas não foram avaliados.

- As linhagens *A. platensis* e *Brasilonema* sp. apresentaram os maiores teores de proteínas hidrossolúveis e a *Brasilonema* sp apresentou os melhores teores de carboidratos e lipídeos totais.

- A análise do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos para as três linhagens permitiu identificar e quantificar dezoito ácidos graxos distintos, incluindo ácidos graxos ω-3, ω-6 e ω-9. A linhagem *Stanieria* sp apresentou maior variação, algo que pode ser justificado em função de sua forma colonial. A produção destes ácidos graxos, principalmente os essenciais, como o ácido eicosatetraenóico (ácido araquidônico), colocam as linhagens como alternativa para aplicações biotecnológicas.

- A linhagem *A. platensis* apresentou os melhores resultados para capacidade antioxidante, porém o resultado de compostos fenólicos foi o menor, o que evidencia que a capacidade antioxidante nas cianobactérias estudadas está relacionada a metabólitos distintos como compostos fenólicos, ácidos graxos e pigmentos.

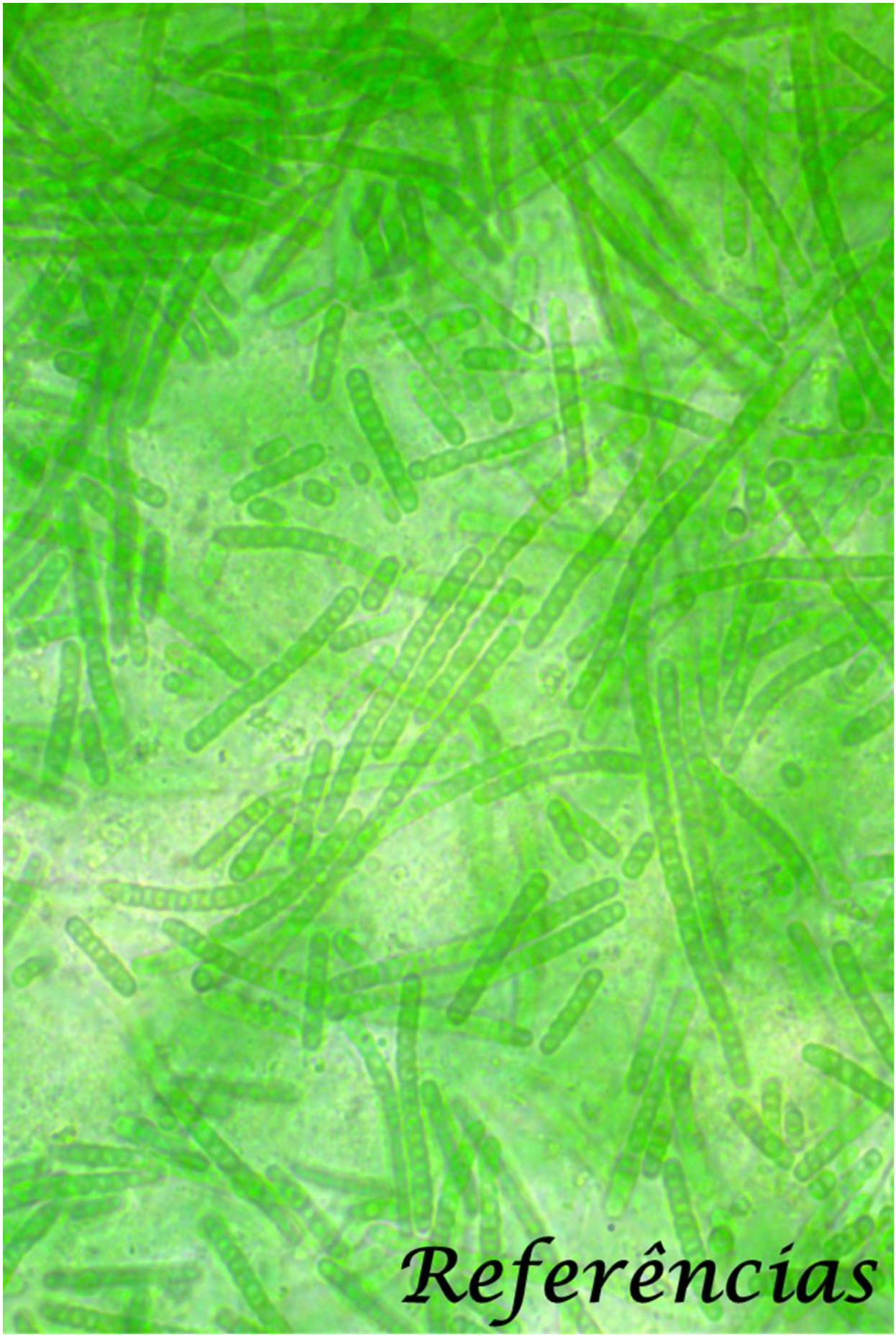
- Os extratos das três linhagens estudadas apresentaram atividade antimicrobiana moderada contra bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos.

- O estudo fitoquímico da linhagem *Brasilonema* sp. permitiu o isolamento e identificação de uma substância derivada da clorofila, o éster trimetílico da clorina-e6 e duas misturas, sendo uma delas uma mistura dos alcalóides aporfínicos sassicina A e sassicina B (de natureza inédita) e uma mistura de nucleosídeos (desoxicitidina e citidina) e aminoácidos (tirosina, isoleucina e leucina), isolados pela primeira vez na espécie.

- A substância e misturas isoladas quando em avaliação de atividade citotóxica apresentaram atividade moderada ou nenhuma atividade, reforçando que o mecanismo de interação destas com as linhagens precisa ser explorado em pesquisas futuras.

- Este é o primeiro estudo realizado com linhagens de cianobactérias dulcicolas do semiárido brasileiro, e constitue uma chave para descoberta e exploração de novas substâncias, podendo tornar-se uma fonte alternativa para obtenção de produtos naturais nesta região.

- A identificação taxonômica consiste em um dos problemas para o estudo de cianobactérias. Atrelar irformações morfológicas e moleculares à informações químicas, como as aqui obtidas é algo que contribui para estudo da diversidade destes microorganismos.


Referências

REFERÊNCIAS

ABDEL-DAIM, M. M.; FAROUK, S. M.; MADKOUR, F. F.; AZAB, S. S. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Spirulina platensis in comparison to Dunaliella salina in acetic acid-induced rat experimental colitis. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, p. 126–139, 2015.

ABDELKHALEK, N. K.; GHAZY, E. W.; ABDEL-DAIM, M. M. Pharmacodynamic interaction of Spirulina platensis and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, Oreochromis niloticus: Impact on lipid peroxidation and oxidative stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 3023–3031, 2015.

ABED R. M. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 06, p. 1-12, 2009.

ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. K.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. ADEY, W. H.; LUCKETT, C.; SMITH, M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial Cell Factors**, v. 11, n. 96, 2012.

ADEY, W. H.; LUCKETT, C.; SMITH, M. Purification of industrially contaminated ground waters using controlled ecosystems. **Ecological Engineering**, v. 7, n. 3, p. 191–212, 1996.

AKIYAMA, H.; OKUHATA, H.; ONIZUKA, T.; KANAI, S.; HIRANO, M.; TANAKA, S.; et al. Antibiotics-free stable polyhydroxyalkanoate (PHA) production from carbon dioxide by recombinant cyanobacteria. **Bioresource Technolog**, v. 102, n. 23, p. 11039-11042, 2011.

ALI, H. E. A.; SHANAB, S. M. M.; ABO-STATE, M. A. M.; EMAD AHMED AHMED SHALABY, E. A. A.; DEMERDASH, U. M. M.; ABDULLAH, M. A. Evaluation of Antioxidants, Pigments and Secondary Metabolites Contents in *Spirulina platensis*. **Applied Mechanics and Materials**, v. 625, p. 160-163, 2014.

ALMEIDA, T. L. *et al.* Estudo químico e atividades antiproliferativa, tripanocida e leishmanicida de *Maxillaria picta*. ***Química Nova*** **[online],** vol.37, n.7, p. 1151-1157, 2014.

AL-WATHNANI, H.; ARA I.; TAHMAZ R. R.; AL-DAYEL ,T. H.; BAKIR M. A. Bioactivity of natural compounds isolated from cyanobacteria and green algae against human pathogenic bacteria and yeast. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 18, p. 3425-3433, 2012.

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L.M. Propriedades de saúde da microalga Spirulina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 115-123, 2008.

ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**, 1º ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.

ANGERMAYR, S. A.; PASZOTA, M.; HELLINGWERF, K. J. Engineering a cyanobacterial cell factory for production of lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 19, p. 7098-106, 2012.

ANNUNZIO, S. R.; FREITAS, L. M.; FONTANA, C. R. ACT. Terapia fotodinâmica antimicrobiana in vitro mediada por clorina-e6 contra *Propionibacterium acnes*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 38, n. 1, 2017

ANUSUYA D. M.; VENKATARAMAN, L. V. Hypochoresterolemic effect of the bluegreen algae Spirulina platensis in albino rats. **Nutrition Reports International**, v. 28, n. 519, 1983.

ARAÚJO, S. M. S. de. A Região Semiárida do Nordeste do Brasil: questões ambientais e possibilidades de uso sustentável dos recursos. Rios Eletrônica - **Revista Científica da FASETE**. Ano 5, n. 5, 2001.

ASADI, A.; KHAVARI-NEJAD, R.; SOLTANI, N.; NAJAFI, F.; MOLAIE-RAD, A. Physiological and antimicrobial characterizations of some cyanobacteria isolated from the rice fields in Iran. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 7, n. 3, p. 649–663, 2011.

ASSIS, L.; MACHADO, A.; SOUZA DA MOTTA, A.; COSTA, J.; SOUZA-SOARES, L. Development and Characterization of Nanovesicles Containing Phenolic Compounds of Microalgae *Spirulina* Strain LEB-18 and *Chlorella pyrenoidosa*. **Advances in Materials Physics and Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 6-12, 2014.

AYEHUNIE, S.; BELAY, A.; BABA, T. W.; RUPRECHT, R. M. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of Spirulina platensis. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v. 18, n. 1, p. 7-12, 1998.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.

BALASUNDARAM, B.; SKILL, S. C.; LLEWELLYN, C. A. A low energy process for the recovery of bioproducts from cyanobacteria using a ball mill. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 48-56, 2012.

BASWAN, S. M.; LEVERETT, J.; PAWELEK, J. Clinical evaluation of the lightening effect of cytidine on hyperpigmented skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, p.278– 285, 2019a.

BASWAN, S. M.; YIM, S.; LEVERETT, J.; SCHOLTEN, J.; PAWELEK, J. Cytidine decreases melanin content in a reconstituted three-dimensional human epidermal model. **Archives of Dermatological Research**, v. 311, n. 3, p. 249-250, 2019b.

BECK, C.; KNOOP, H.; AXMANN, I. M.; STEUER, R. The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. **BMC Genomics**, v. 13, n. 56, 2012.

BEHLER, J.; VIJAY, D.; HESS, W. H.; AKHTAR, M. K. CRISPR-Based Technologies for Metabolic Engineering in Cyanobacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 10, p. 996-1010, 2018.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology,** v. 5, n. 2, p. 235-41, 1993.

BELLINGER, E. G.; SIGEE, D. C. Algas de agua doce: Identificação e uso como bioindicadores. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 4, p. 1265-1266, 2010.

BEN-AMOTZ, A. Dunaliella β-caroteno: from Science to commerce. p. 401-410, 1999. In: SECKBACK, J. **Enigmatic Microorganisms and Life in extreme Environments**. Kluver, Netherlands, 1999.

BENEMANN, J. R.; TILLETT, D. M.; WEISSMAN, J. C. Microalgae biotechnology. **Trends in Biotechnology,** v. 5, n. 2, p. 47–53, 1987.

BENEMANN, J.; OSWALD, W. **Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO_2 to biomass.** Final report. 1996. 201p.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **Boletim do CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.

BHARANIDHARAN M.; V.SIVASUBRAMANIAN V.; NAYAGAM S. R. R. V. Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of cyanobacteria, *Chroococcus turgidus* (Kützing) Nägeli. **International Journal Current Microbiology and Applied Science**, v. 2, n. 10, p. 300-305, 2013.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**. 2º ed. São Carlos: RiMa, 2006.

BIFARI F, NISOLI E. Branched-chain amino acids differently modulate catabolic and anabolic states in mammals: a pharmacological point of view. **Britsh Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 1366–1377, 2017.

BLOMSTRAND, E.; ELIASSON, J.; KARLSSON, H. K. R.; KOHNKE, R. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 269S–73S, 2006.

BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. *Dunaliella*. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. **Microalgal Biotechnology**, Cambridge: Cambridge University Press. p. 27-58, 1988.

BOROWITZKA, M. Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. In: **Chemicals from Microalgae.** Taylor & Francis Ltd, p. 313 – 352, 1999.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE E. Biotecnologia Industrial. Fundamentos, 1ª edição. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001.

BRAND-WILIANS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Thechonology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BREITMAIERAND, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 NMR Spectroscopy – High Resolution Methodsand Aplications in Organic Chemistry and Biochemistry** (Thirdedition), VHC, 1987. p. 405.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUSTAN, G. A. Nutricional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v.151, p. 315-331, 1997.

BUI, H.T.; JANSEN, R.; PHAM, H. T.; MUNDT, S. Carbamidocyclophanes A-E, chlorinated paracyclophanes with cytotoxic and antibiotic activity from the Vietnamese cyanobacterium *Nostoc* sp. **Journal Natural Products**, v. 70, n. 4, p. 499-503, 2007.

BURJA, A. M.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; GRANT BURGESS, J.; WRIGHT, P. C. Marine cyanobacteria—A prolific source of natural products. **Tetrahedron**, *v. 57*, p. 9347–9377, **2001**.

BURLEW, J. S. **Algal culture from laboratory to pilotplant**. Washington: Carnegie Institution of Washington, 1953. 357p.

CABRITA, M. T.; VALE, C.; RAUTER, A.P. Halogenated compounds from marine algae. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2301–2317, 2010.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 1007-1024, 2001.

CALVETE, M.; GOMES, A.; MOURA, N. Clorinas em Terapia Fotodinâmica - Sínteses e Aplicações. **Revista Virtual de Química**, Aveiro – Portugal, v. 1, n.2, p. 92-103, 08 abr. 2009.

CARDOSO, A. S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 542-549, 2011.

CARDOZO, K. H. M, GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemical & Physiology C-Toxicology and Pharmacology**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CARMICHAEL, W.W. Health effect of toxin-producing cyanobacteria: The Cyano HAB. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 7, p. 1393-1407. 2001.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, p. 64–7, 1994.

CARPINE, R.; WEI D. U.; GIUSEPPE, O. W.; POLLIO, A.; HELLINGWERF, K. J.; MARZOCCHELLA, A.; SANTOS, F. B. Genetic engineering of Synechocystis sp. PCC6803 for poly-β-hydroxybutyrate overproduction, **Algal Research**, v. 25, p. 117-127, 2017.

CASTRO, E. M.; SHANNON, E.; ABU-GHANNAM, N. Effect of Fermentation on Enhancing the Nutraceutical Properties of *Arthrospira platensis* (Spirulina). **Fermentation**, v. 5, n. 1, 2019.

CAVÉ, A.; LEBOEUF, M.; WATERMAN, P. G. The aporphinoid alkaloids of the Annonaceae. In: Pelletier, S. (Ed.), Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. John Wiley and Sons, New York, 1987, p. 133–270.

CEN-PACHECO, F.; NORDSTROM, L.; SOUTO, M.L.; MARTIN, M.N.; FERNANDEZ, J.J.; DARANAS, A. H. Studies on polyethers produced by red algae. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1178–1188, 2010.

CHACON-DE-POPOICI, G. Plankton blooms, their effects on the marine organisms for the quantitative analysis of microcystins in cyanobacterial cells. **Phycologia**, v. 35, n. 6, p. 57-61, 1994.

CHAUMONT, D. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 593-604, 1993.

CHEN, J. *et al*. Aporphine alkaloids: a kind of alkaloids' extract source, chemical constitution and pharmacological actions in different botany. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 18, p. 10015-10027, 2013.

CHEN, L.; CHEN, Y.; WANG, X.; LI, H.; ZHANG, H.; GONG, J.; SHEN, S.; YIN, W.; HU, H. Efficacy and safety of oral branched-chain amino acid supplementation in patients undergoing interventions for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. **Nutrition Journal**, v. 14, n. 67, 2015.

CHEN, Y-Y.; CHANG, F-R.; WU, Y-C. Isoquinoline alkaloidsd and lignans from *Rollinia mucosa*. **Journal Ntural Products**, v. 59, p. 904-906. 1996.

CHIAIESE, P.; CORRADO, G.; COLLA, G.; KYRIACOU, M. C.; ROUPHAEL, Y. Renewable Sources of Plant Biostimulation: Microalgae as a Sustainable Means to Improve Crop Performance. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n; 1782, p. 1-6, 2018.

CHIARUGI, A.; SBARBA, P. D.; PACCAGNINI, A.; DONNINI, S.; FILIPPI, S.; MORONI F. et al. Combined inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and nitric oxide synthase modulates neurotoxin release by interferon-gamma-activated macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, n. 260–266, 2000.

CHINNU, K., S.; MUKUND, M. Muthukumaran and V. Sivasubramanian. In vitro antioxidant activity of isolated beta glucan from *Chroococcus turgidus.* **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 6, n.3, p. 1- 6, 2015

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnol Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHLIPALA, G. E.; MO, S.; ORJALA, J. Chemodiversity in freshwater and terrestrial cyanobacteria—A source for drug discovery. **Current Drug Targets**, v. 12, p. 1654–1673, 2011.

CHOI *et al*. Dragocins A−D, Structurally Intriguing Cytotoxic Metabolites from a Panamanian Marine Cyanobacterium. **Organic Letters**, v. 21, p. 266−270, 2019.

CHU, W. Biotechnological applications of microalgae. **International e-Journal Science, Medice & Education**, v. 6, n. 1, p. 24-37, 2012.

CHU, W.L.; LIM, Y. W.; RADHAKRISHNAN, A. K.; LIM, P. E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BCM Complementary and Alternative Medicine**, v. l. n. 53, p. 3-8, 2010.

CIRULIS, J. T.; SCOTT, J. A.; ROSS, G. M. Management of oxidative stress by microalgae. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 91, n. 1, p. 15-21, 2013.

Čiž, M.; Čížová, H.; Denev, P.; Kratchanova, M.; Slavov, A.; Lojek, A. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. **Food Control**, v. 21, p. 518–523, 2010.

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evalution of new antimicrobials "*in vitro*" and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine.** Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

COHEN, Z. Production potential of eicosapentaenoic acid by Monodus subterraneus. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, p. 941–945, 1994.

COMTE K.; COURSIN T.; CARRE-MLOUKA, A. A new genotype in the genus *Arthrospira* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) revealed by a mosaic-like structure of the 16S-23SrRNA intergenic spacer region in strain PCC 9901. **Phycologia**, v. 52, p. 333–337, 2013.

CONNOP, B. P. KALISCH, B. E. BOEGMAN, R. J.; JHAMANDAS, K.; BENINGER, R. J. Enhancement of 7-nitro indazole-induced inhibition of brain nitric oxide synthase by norharmane. **Neuroscience Letters**, v. 190, p. 69–72, 1995.

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; NEPEL, A.; BARISON, A. Isoquinoline alkaloids from the leaves of Xylopia laevigata (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, n. 15440, p. 331–334, 2013.

COSTA, M. F.; REGO, A.; RAMOS, V.; AFONSO, T. B.; FREITAS, S.; PRETO, M.; LOPES,V.; VASCONCELOS, V.; MAGALHÃES, C.; LEÃO, P. N. The conifer biomarkers dehydroabietic and abietic acids are widespread in Cyanobacteria. **Scientific Reports**, v. 6, n. 23436, p. 1-11, 2016.

CRAGGS, R. J. **Wastewater treatment by algal turf scrubbing.** In: 7th international conference on wetland systems for water pollution control, Lake Buena Vista: I Wa Publishing; 2000.

CRNKOVIC, C. M.; MAY, D. S.; ORJALA, J. The impact of culture conditions on growth and metabolomic profiles of freshwater cyanobacteria. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 1, p. 375-384, 2017.

CUNHA, M. C.; RIBEIRO, ANDERSON, O. **Síntese e Caracterização de Clorinas. Estudo das Propriedades da Terapia Fotodinâmica**. II Simpósio de Iniciação Científica da Universidade Federal do ABC (SIC-UFABC 2009), p. 1-5, 2009.

DEIJEN, J. **Tyrosine in Nutritional Neuroscience** (ed. Prasad, C.) (CRC Press, 2005, p. 363–382.

DEMULE, M. C. Z.; DECAIRE, G. Z.; DECANO, M. S. Bioactive substances from Spirulina platensis (cianobacteria). **International Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 93–96, 1996;

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

DEVRIES, S.E.; GALEY, F. D.; NAMIKOSHI, M.; WOO, J. C. Clinical and pathological findings of blue green algae (*Microcystis aeruginosa*) in toxication in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 3, p. 403-408, 1993.

DITTMANN, E.; GUGGER, M.; SIVONEN, K.; FEWER, D. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 10, p. 642-652, 2015.

DIXIT, R. B.; SUSEELA, M. R. Cyanobacteria: Potential candidates for drug discovery. **Antonie Van Leeuwenhoek,** v. 103, p. 947-61, 2013.

DROBAC-ÅIK, A. V.; DULIÃ, T. I.; STOJANOVIÃ, D. B.; SVIRÅEV, Z. B. The importance of extremophile cyanobacteria in the production of biological active compounds. **Matica Srpska Journal for Natural Sciences Novi Sad**, v. 112, p. 57–66, 2007.

DVOŘÁK, P.; JAHODÁŘOVÁ, E.; HAŠLER, P.; GUSEV, E.; POULÍČKOVÁ, A. A new tropical cyanobacterium Pinocchia polymorpha gen et sp. nov. derived from the genus Pseudanabaena. **Fottea**, v. 15, n. 1, p. 113–120, 2015.

DVOŘÁK, P.; POULÍČKOVÁ, A.; HAŠLER, P.; BELLI, M.; DALE, A.; CASAMATTA, D. A.; PAPINI, A. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, p. 739–57, 2015.

EDWARDS D. J.; GERWICK, W. H. Lyngbyatoxin biosynthesis: Sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 1432-1433, 2004.

EL-ELIMAT. T. *et al*. Chemical Diversity of Metabolites from Fungi, Cyanobacteria, and Plants Relative to FDA-Approved Anticancer Agents. **ACS Medicinal Chemical Letters**, v. 3, n. 8, p. 645-649, 2012.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bactéria. **Planta Medica,** v. 64, p. 711-713, 1978.

ENGENE, N.; CHOI, H.; ESQUENAZI, E.; ROTTACKER, E. C.; ELLISMAN, M. H.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, W. H. Underestimated biodiversity as a major explanation for the perceived prolific secondary metabolite capacity of the cyanobacterial genus *Lyngbya*. **Environmental Microbiology**, v.**13,** p.1601–1610, 2011.

ENGENE, N.; GUNASEKERA, S. P.; GERWICK, W. H.; PAUL, V. J. Phylogenetic inferences reveal large extent of novel biodiversity in chemically rich tropical marine cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p.1882–1888, 2013.

ENGENE, N.; ROTTACKER, E. C.; CHOI, H.; BYRUM, T.; KAŠTOVSKÝ, J. H.; KOMÁREK, J.; GERWICK, W. H. *Moorea producens* gen. nov., sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov., tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1172–1179, 2012.

ENGENE, N.; TRONHOLM, A.; PAUL, V. J. Uncovering cryptic diversity of *Lyngbya*: the new tropical marine cyanobacterial genus *Dapis* (Oscillatoriales). **Journal of Phycology**, v. 54, p. 435-446, 2018.

FERNANDES, M. M. M. S.; CHAVES, O. S.; TELES, Y. C.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V. New substance porphyrin to *Bakeridesia pickelli* (H. Monteiro). In: **4th BCNP XXX RESEM.** Natal-RN, 2013.

FERREIRA, A. C. S. **Leitura de minuto: cianobactérias.** Fortaleza: Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos (Governo do Estado do Ceará), Fortaleza, v. 10, 2008.

FERREIRA, L.; SOUSA, M. L.; PRETO, M.; VASCONCELOS, V.; URBATZKA, R. Bioactivity screening of cyanobacteria for the isolation of novel anticancer compounds using 2D and 3D cell culture models. Frontiers Marine Science Conference Abstract: IMMR'18 | **International Meeting on Marine Research 2018**. 2019.

FINKING, R.; MARAHIEL, M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 58, p. 453-488, 2004.

FINSINGER, K. et al. Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 460–473, 2008.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FOX, R. D. **Spirulina production & potencial**. Aix-em-Province: Edisud, 1996, 231 p.

FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; REVIERS, B.; PRADO, J. F.; REZIG, S. H. **Algas**: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Porto Alegre: Artmed, 2010. 332p.

GADEMANN, K.; PORTMANN, C. Secondary Metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities. **Current Organic Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 326–341, 2008.

GAO, K.; HELBLING, E. W.; HÄDER, D. P.; HUTCHINS, D. A. Responses of marine primary producers to interactions between ocean acidification, solar radiation, and warming. **Marine Ecology Progress Series**, v. 470, p. 167–189, 2012.

GEETHU, V; SHAMINA, M. Antioxidant activity of cyanobacterium Nostoc spongiaeforme C. Agardh ex Born. & Flah. **Journal of Algal Biomass Utilisation**, v. 9, n. 1, p. 26-30, 2018.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: RABENHORST, L. **Akademische Verlags- gesellschaft**, Leipzig, v. 14, 1196 p., 1932.

GERWICK, W. H.; TAN, L.; SITACHITTA, N. Nitrogen-containing metabolites from marine cyanobacteria. In: **The Alkaloids**, G.A.Cordell, ed San Diego. Academic Press, p. 75-184, 2001.

GERWICK, W. H.; PROTEAU, P. J.; NAGLE, G. D.; HAMEL, E.; BLOKHIN, A.; SLATE, D. L. Structure of Curacin A, a Novel Antimitotic, Antiproliferative and Brine Shrimp Toxic Natural Product from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Organic Chemistry**, v. *59*, n. 6, p. 1243–1245, 1994.

GHASEMI, Y.; YAZDI, M. T.; SHAFIEE A.; AMINI M.; SHOKRAVI, S. H.; ZARRINI, G. Parsiguine, a novel antimicrobial substance from Fischerella ambigua. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 318–322, 2004.

GHAZALA, B.; NAILA, B.; SHAMEEL, M. Fatty acids and biological activities of crude extracts of freshwater algae from Sindh. **Pakistan Jounal of Botany**, v. 42, p. 1201–1212, 2010.

GOIRES, K.; MUYLAERT, K.; FRAEYE, I.; FOUBERT, I.; DE BRABANTER, J., COOMAN, L. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, 2012.

GOIRIS, K.; COLEN, W. V.; WILCHES, I.; LEÓN-TAMARIZ, F.; COOMAN, L. D.; MUYLAERT, K. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. **Algal Research**, v. 7, p. 51-57, 2015.

GOIRIS, K.; MUYLAERT, K.; FRAEYE, I.; FOUBERT, I.; DE BRABANTER, J.; DE COOMAN, L. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Jounal of Appllied Phycology**, v. 24, p. 1477–1486, 2012.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I.; CASTRO-MORENO, M.; OROZCO-CASTILLO, J. A.; RILEY- SALDAÑA, C. A. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticiltura**, v. 36, p. 01–16, 2014.

GUIHÉNEUF, F.; KHAN, A.; TRAN, L. P. Genetic engineering: a promising tool to engender physiological, biochemical, and molecular stress resilience in green microalgae. **Frontiers in Plant Science,** v. 7, n. 400, p. 1-8, 2016.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllidc. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

GUNASEKERA, S. P.; ROSS, C.; PAUL, V.; MATHEW, S.; LUESCH, H. Dragonamides C and D, two linear lipopeptides from the marine cyanobacterium brown *Lyngbya polychoroa*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 887–890, 2008.

GUPTA, V.; RATHA, S. K.; SOOD, A.; CHAUDHARY, V.; PRASANNA, R. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)-prospects and challenges. **Algal Research**, v. 2, p. 79-97, 2-13.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, p. 160–186, 2006.

GUVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. Alkaloids in marine algae. **Marine Drugs**, v. 8, p. 269-284, 2010.

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HAGMANN, L.; JIITTNER, F.; FISCHERELLIN, A. A novel photosystem-ll-inhibiting allelochemical of the cyanobacterium *Fischerella muscico*la with antifungal and herbicidal activity. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 6539–6542, 1996.

HAJIMAHMOODI, M.; FARAMARZI, M. A.; MOHAMMADI, N.; SOLTANI, N.; OVEISI, M. R.; NAFISSI-VARCHEH, N. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Jounal of Appllied Phycology**, v. 22, p. 43–50, 2010.

HARADA, K. Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 2, n. 8, p. 889-899, 2004.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475- 476, 1973.

HARVEY, A. L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **Trends Pharmacology Science**. 1999 v. 20, n. 5, p. 196-198, 1999.

HETTA, M.; MAHMOUD, R.; EL-SENOUSY, W.; IBRAHIM, M.; EL-TAWELL, G.; ALI, G. Antiviral and antimicrobial activities of *Spirulina platensis.* **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, volume 3, Issue 6, 31-39, 2014.

HIKA, E. V.; MAURYA S. K.; MISHRA, R.; MISHRA, A. K. The Combined Use of *in Silico*, *in Vitro*, and *in Vivo* Analyses to Assess Anti-cancerous Potential of a Bioactive

Compound from Cyanobacterium *Nostoc* sp. MGL001**. Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 873, v. 1-15, 2017.

HOLANDA, L. R. ; RAMOS, F. S. A. ; MEDEIROS, E. R. C. O cultivo de microalgas para a geração de eletricidade.In: **VII Congresso Nacional de Excelência em Gestão**, Rio de Janeiro, p.1-13. 2011.

HOLEČEK, M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. **Nutrition & Metabolism**, v. 15, n. 33, 2018.

HOSAMANI, B.; KALE, R. R.; SHARMA, H.; WACHTEL, E.; KESSELMAN, E.; DANINO, D.; FRIEDMAN, N,; SHEVES, M.; NAMBOOTHIRI, I. N. N.; PATCHORNIK, G. Membrane protein crystallization in micelles conjugated by nucleoside base-pairing: A different concept. **Journal of Structural Biology**, v. 195, n. 3, p. 379-386, 2016.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Etnopharmacology**, v. 110, p. 391-400, 2007.

HROUZEK, P**.** Secondary Metabolites Produced by Cyanobacteria in Symbiotic Associations. In: **Algal and Cyanobacteria Symbioses.** World Scientific**,** p. 611-626, 2018.

HU, P.; BORGLIN, S.; KAMENNAYA, N. A.; CHEN, L.; PARK, H.; MAHONEY, L.; KIJAC, A.; SHAN, G.; CHAVARRÍA, K. L.; ZHANG, C.; QUINN, N. W. T.; WEMMER, D.; HOLMAN, H-I.; JANSSON, C. Metabolic phenotyping of the cyanobacterium Synechocystis 6803 engineered for production of alkanes and free fatty acids. **Applied Energy**, v. 102, p. 850–859, 2013.

HUA, P.; YU, Z.; XIONG, Y.; LIU, B.; ZHAO, L. Regulatory Efficacy of *Spirulina platensis* Protease Hydrolyzate on Lipid Metabolism and Gut Microbiota in High-Fat Diet-Fed Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1-18, 2018.

IIMSAM - Intergovernmental Institution for the Use of Micro Algae Spirulina against Malnutrition. Disponível online: <https://www.who.int/pmnch/about/members/database/iimsam/en/> (Acessado em abril de 2019).

ISHIDA *et al.* 2009. Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2017- 2026, 2009.
ISHIDA *et al.* Biosynthesis and structure of aeruginoside 126a and 126b, cyanobacterial peptide glycosides bearing a 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole moiety. **Chemistry & Biology**, v. 14, p. 565-576, (2007)

IWATA, K.; INAYAMA, T.; KATO, T. Effects of Spirulina platensis on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. *36*, n. 2, p. 165-171, 1990.

JAHNZ-WECHMANN, Z.; FRAMSKI, G. R., JANUSZCZYK, P. A.; BORYSKI, J. Base-Modified Nucleosides: Etheno Derivatives. **Frontiers in Chemistry**, v. 4, p. 1-19, 2016.

JAHODÁŘOVÁ, E. *et al*. Revealing hidden diversity among tropical cyanobacteria: the new genus Onodrimia (Synechococcales, Cyanobacteria) described using the polyphasic approach. **Phytotaxa**, v. 326, n. 1, p. 028–040, 2017.

JOHANSEN, J. R.; CASAMATTA, D. Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. **Algological Studies**, v. 117, p. 71–93, 2005.

JOHANSEN, J. R.; CASAMATTA, D. A. 2005. Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. **Archiv fur Hydrobiologie Suppllementdband Algological Studies**, v. 117, p. 71–93, 2005.

JONES *et al.*, Carbon-13 Magnetic Resonance. XVII.la Pyrimidine and Purine Nucleosides, **Journal of the American Chemical Society**, v. 92, n. 13, p. 4079-4087, 1970.

JONGKEES, B. J., HOMMEL, B., & COLZATO, L. S. People are different: tyrosine's modulating effect on cognitive control in healthy humans may depend on individual differences related to dopamine function. **Frontiers in psychology**, v. 5, n. 1101, 2014.

KAHN *et al.*, The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, v. 36, p. 1-21, 2018.

KAPALKA, G. M. Chapter 4 - Substances Involved in Neurotransmission. In: **Practical Resources for the Mental Health Professional, Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents**, Academic Press, 2010, p. 71-99.

KARAN, T.; ERENLER, R. Screening of Norharmane from Seven Cyanobacteria by High-performance Liquid Chromatography. **Pharmacognosy magazine**, v. *13*, n. 3, p. 723-725, 2017.

KARAN, T.; ERENLER, R.; ALTUNER, Z.; ELMASTAS, M. Molecular Identification and Norharmane Quantification of Cyanobacterium, *Geitlerinema carotinosum.* **Iternational Journal os Pharmacy and Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 3, p. 66-73, 2017.

KAWAGUCHI, K. Microalgae production systems in Asia. p. 25-23. 1980. In: SHELEF, G.; SOEDER, C. J. **Algae Biomass**. Amsterdam: Elsevier/ North-Holland biomedical Press, 1980.

KEHR, J. C.; PICCHI, D. G.; DITTMANN, E.; Natural product biosyntheses in cyanobacteria: A treasure trove of unique enzymes. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 7, n. 1622-1635, 2011.

KELLMANN, R.; STÜKEN, A.; ORR, R. J. S.; SVENDSEN, H. M.; JAKOBSEN, K.S. Biosynthesis and molecular genetics of polyketides in marine dinoflagellates. **Marine Drugs**, v. 8, p.1011–1048. 2010.

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

KHAN, Z.; BHADOURIA, P.; BISEN, P.S. Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, p. 373–379, 2005.

KIM, J. D. Screening of cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy soil for antifungal activity against plant pathogenic fungi. **Microbiology**, v. 34, n.3, p. 138–142, 2006.

KIM, Z. H.; PARK, H.; LEE, C. G. Seasonal assessment of biomass and fatty acid productivity by *Tetraselmis* sp. in the ocean using semipermeable membrane photobioreactors. **Journal of Microbiology Biotechnolgy**, v. 26, p. 1098–1102, 2016.

KLEJDUS, B.; KOPECKÝ, J.; BENESˇOVÁ, L.; VACEKA, J. Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. **Journal of Chromatography**, v. 1216, n. 5, p. 763-771, 2009.

KLISCH, M.; HADER, D.P. Mycosporine-like amino acids and marine toxins – the common and the different. **Marine Drugs**, v. 6, p.147–163. 2008.

KOCHERT, G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric method. In: HELLEMBUST, J. A., CRAIGIE, J. S. (eds.). **Handbook of Phycological Methods**. Physiological and Biochemical Methods. Cambridge: Cambridge University, p. 95-97. 1978.

KOEHN, F. E.; LONGLEY, R. E.; REED, J. K. Microcolins A and B, new immunosuppressive peptide from the blue-green alga *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 613-619, 1992.

KOEN, G.; WILLEM, V. C.; ISABEL, W.; FABIÁN, L.; LUC, D. C.; KOENRAAD, M. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. **Algal Research**, v. 7, p. 51–57, 2015.

KOMÁREK J. Cyanoprokaryota-3. Teil/3rd part: Heterocytous genera. In: **Susswasserflora von Mitteleuropa** (Ed. by B. Bu¨del, L. Krienitz, G. Ga¨rtner & M. Schagerl), pp.1–744. Elsevier/ Spektrum, Heidelberg, Germany, 2013.

KOMAREK J.; ANAGNOSTIDIS K. Cyanoprokaryota-1. Teil/1st part. Chroococcales. In: **Susswasserflora von Mitteleuropa** (Ed. by E.H. Ga¨rtner, H. Heynig & D. Mollenhauer), pp.1–50. Gustav Fischer, Jena, Germany, 1998.

KOMAREK J.; ANAGNOSTIDIS K.Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2. Chroococcales. **Archiv fur Hydrobiolog Algological Studies**, v.43, n. 157-226, 1986.

KOMÁREK, J. Review of the cyanobacterial genera implying planktic species after recent taxonomic revisions according to polyphasic methods: state as of 2014. **Hydrobiologia**, v. 764, n. 1, p.259–270, 2015.

KOMÁREK, J. 2011. Introduction to the 18th IAC Symposium in Ceske Budejovice 2010, Czech Republic. Some current problems of modern cyanobacterial taxonomy. **Fottea**, v. 11, p. 1–7, 2011.

KOMÁREK, J. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. **Algae**, v. 21, p. 349–375, 2006.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales. In: H. ETTL, G. GÄRTNER, H. HEYING; D. MÖLLENHAUER. **Süsswasserflora von Mitteleuropa**, Stuttgar: Gustav Fischer Verlag, 1999. 548 p.

KOMARÉK, J.; ANAGNOSTIDISn, K. Cyanoprokaryota. Teil: Oscillatoriales. In : BÜDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. **Süsswasserflora von Mitteleuropa** München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, 2005. 759 p.

KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; MAREŠ, J.; JOHANSEN, J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, p. 295–335, 2014.

KOUTSOS, E.; GELIS, S.; ECHOLS, M. S. Chapter 4 - Advancements in nutrition and nutritional therapy, Editor(s): BRIAN L. SPEER, **Current Therapy in Avian Medicine and Surgery**, W.B. Saunders, p.142-176, 2016.

KRISHNAKUMAR, S.; BAI, V. DOOSLIN MERCY; RAJAN, R. A**.** Evaluation of bioactive metabolites from halophilic microalgae *Dunaliella salina* by GC-MS analysis. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 4, p. 296-303, 2013.

KRUGER, G. H. J.; DE WET, H.; KOCK, J. L. F.; PIETERSE, A. J. H. (1995), Fatty acid composition as a taxonomic characteristic for *Microcystis* and other coccoid cyanobacteria (blue green alga) isolates. **Hydrobiologia**, v. 308, p. 145 – 151, 1995.

KULTSCHAR, B.; LLEWELLYN, C. Secondary Metabolites in Cyanobacteria. In: **Secondary Metabolites**. London: IntechOpen, 2018. p.23-36.

KUMAR, M., TRIPATHI, M. K., SRIVASTAVA, A., GOUR, J. K., SINGH, R. K., TILAK, R., & ASTHANA, R. K. Cyanobacteria, *Lyngbya aestuarii* and Aphanothece bullosa as antifungal and antileishmanial drug resources. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v.3, n. 6, p. 458-63, 2013.

KUMAR, S.; DEEP, A.; NARASIMHAN, B. A Review on Synthesis, Anticancer and Antiviral Potentials of Pyrimidine Derivatives. **Current Bioactive Compounds**, v. 15, n. 3, 2019.

KUO, R-Y.; CHANG, F.-R.; CHEN, C-Y.; TENG, C-M.; YEN, H-F.; WU, Y-C. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 421–425, 2001.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, p. 17-31, 2013.

LALOI, C.; APEL, K.; DANON, A. Reactive oxygen signalling: the latest news. **Current Opinion in Plant Biology**, 7, p. 323–328, 2004.

LAMIAA, A.; SHAALA, YOUSSEF, D. T. A.; MCPHAIL, K. L.; ELBANDY, M. Malyngamide 4, a new lipopeptide from the Red Sea marine cyanobacterium Moorea producens (formerly *Lyngbya majuscula*), **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 2, 2013, p. 183-188, 2013.
LAN, S.; WU, L.; ZHANG, D.; HU, C. Effects of light and temperature on open cultivation of desert cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 144–150, 2015.

LANGLOIS, P. L.; ARAGON, F. D.; HARDY, G.; MANZANARES, W.Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Critically Ill Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. **Nutrition**, p. 1-26, 2018.

LAU N-S.; MATSUI, M.; ABDULLAH, A. A. Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMILK, P.K.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. Phytochemistry, v. 21, p. 2783–2813, 1982.

LEE, R. E. **Phicology**. 1ª ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1980. p. 33-63.
LEÓN-BAÑARES, R.; GONZÁLEZ-BALLESTER, D.; GALVÁN, A.; FERNÁNDEZ, E. Transgenic microalgae as green cell-factories. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 45-52, 2004.

LI X.; YANG Y.; LI. R. 2015. Phenotypic and genotypic validation of the rare species Sphaerospermopsis eucompacta comb. nov. (Nostocales, Cyanobacteria) isolated from China. **Phycologia**, v. 54, p. 299–306, 2015.

LI, R.; WATANABE, M. Fatty acid composition of planktonic species of *Anabaena* (cyanobacteria) with coiled trichomes exhibited a significant taxonomic value. **Current Microbiology,** v.49, p. 376 – 380, 2004.
LI, X. *et al*. New insights into the taxonomy of the genus Sphaerospermopsis (Nostocales, Cyanobacteria) with the description of Sphaerospermopsis crassa sp. Npv. **Phycologia**, v. 56, n. 2, p. 147–158, 2017.

LININGTON, R. G.; CLARK, B. R.; TRIMBLE, E. E.; ALMANZA, A, UREÑA, L. D.; KYLE, D. E. .; GERWICK, W. H. Antimalarial peptides from marine cyanobacteria: isolation and structural elucidation of gallinamide A. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 14–17, 2009.

LITWACK, G. (2018). **Metabolism of Amino Acids. Human Biochemistry**, 2018. p. 359–394.

LOPEZ**,** J. A. V.; PETITBOIS, J. G.; VAIRAPPAN, C. S.; UMEZAWAT, T.; MATSUDA,F.; OKINO, T. Columbamides D and E: Chlorinated Fatty Acid Amides from the

Marine Cyanobacterium *Moorea bouillonii* Collected in Malaysia. **Organic Letters**, v. 19, n. 16, p. 4231–4234, 2017.

LORENZI, A. S. **Implementação da técnica de PCR Quantitativa Em Tempo Real (qPCR) para o monitoramento Microcystis e genótipos potencialmente produtores de microcistina**. 2008. 174 p. Dissertação (Doutorado em Ciência) - Centro de Energia Nuclear em Agricultura, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 2008

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas**: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUESCH, H.; YOSHIDA, W.Y.; MOORE, R.E.; PAUL, V.J.;CORBETT, T.H. Total structure determination of apratoxin A, a potent novel cytotoxin from the marine cyanobacterium Lyngbya majuscula. J Am Chem Soc. v. 123, p.5418 –5423, 2001

LUTZ, M. K. Putting Nature Back into Drug Discovery, **Nature Biotechnology**, v.21, n.3, p. 602-604, 2003.

MACEDO, L.; VILAÇA, E.; REGINA, V.; MORAES, D. S.; CESAR, P.; NOGUEIRA, D. L.; EVELYN, M.; BARISON, A.; PAULA, A. Chemical constituents from the leaves of Annona pickelii (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 115–118, 2012.

MAESTRIN, A. P. J.; NERI, C. R.; OLIVEIRA, K. T.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y. Extração e purificação de clorofila a da alfa *Spirulina máxima*: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**. n. 32, p. 1670-1672, 2009.

MAI, T. *et al.* Revision of the Synechococcales (Cyanobacteria) through recognition of four families including Oculatellaceae fam. nov. and Trichocoleaceae fam. nov. and six new genera containing 14 species. **Phytotaxa**, v. 365, n. 1, p. 001-059, 2018.

MALATHI, T.; RAMESH BABU, M.; MAUNIKA, T.; RAO, B. D. Antimicrobial activity of Blue-Green Algae, Calothrix braunii (A. Br.) Bornet et Flahault. **International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology**, v.2, n. 8, p. 104-112, 2015.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538-544, 1998.

MAO, T.K.; VAN, D.W.J.; MED, M.E.J. Effect of spirulina on the secretion of cytokines from peripheral blood mononuclear cells. **Food**, v. *3*, p. 135–175, 2000.
MARAHIEL, M. A. A structural model for multimodular NRPS assembly lines. **Natural Product Reports**, v. 33, p. 136-140, 2016.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Cinco Reinos** - Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra. 3ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2001. 497 p.

MARLES, R. J.; BARRETT, M. L.; BARNES, J. et al., United States pharmacopeia safety evaluation of spirulina. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 7, p. 593–604, 2011.

MASOJIIDEK, J.; TORZILLO, G. **Mass Cultivation of Freshwater Microalgae**. Elsevier, 2014.

MATA, T. M. Lipid Content and Productivity of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris* under Mixotrophic Conditions and Salinity Stress. **Chemical Engineering Transactions**, v. 49, p. 187-192, 2016.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 217–232, 2010.

MATTHEW, S.; SALVADOR, L. A.; SCHUPP, P. J.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Cytotoxic halogenated macrolides and modified peptides from the apratoxin-producing marine cyanobacterium *Lyngbya bouillonii* from Guam. **Jornal of Natural Products**, v. 3, n. 9, p. 1544-1552, 2010.

MATTHEWS, D. **Proteins and amino acids.** in: M.E. Shils, J.A. Olson, M. Shike, A.C. Ross (Eds.) **Modern nutrition in health and disease**. 9th ed. Lipincott, Williams and Wilkins, Philadelphia; 1999, p.11–48.

MAURYA S. K.; NIVESHIKA, E. V.; MISHRA, R. Chapter 24 - Importance of Bioinformatics in Genome Mining of Cyanobacteria for Production of Bioactive Compounds,IN: **Cyanobacteria.** Eds. A.K. Mishra, D.N. Tiwari, A.N. Rai, , Academic Press, 2019. p. 477-506.

MAZUR-MARZEC *et al*., Nodularia spumigena peptides—accumulation and effect on aquatic invertebrates. **Toxins,** v. 7, p. 4404–4420, 2015.
MCGREGOR, G. B.; SENDALL, B. C. Phylogeny and toxicology of Lyngbya wollei (Cyanobacteria, Oscillatoriales) from north-eastern Australia, with a description of Microseira gen. nov. **Journal of Phycology**, v. 51, n. 1, p. 109-19, 2015.

MCPHAIL, K. L.; CORREA, J.; INGTON, R. G.; GONZALEZ, J.; ORTEGA-BARRÍA, E.; CAPSON, T. L.; GERWICK, W. H. Antimalarial linear lipopeptides from a Panamanian strain of the marine cyanobacterium Lyngbya majuscula. **Jornal of Natural Products**, v. 70, n. 6, p. 984-988, 2007.

MEDEMA, M. H. *et al*. Minimum Information about a biosynthetic gene cluster. **Nature Chemical Biology**, v. 11, p. 625–631, 2015.

MI, Y. *et al.* New Peptides Isolated from Marine Cyanobacteria, an Overview over the Past Decade. **Marine Drugs**, v. 15, n. 132, p. 1-27, 2017.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella* protothecoides. **Journal of Biotechnology,** v. 13, n. 1; p. 85-93, 2004.

MICALLEF, M. L.; D'AGOSTINO, P. M.; AL-SINAWI, B.; NEILAN, B. A.; MOFFITT, M. C. Exploring cyanobacterial genomes for natural product biosynthesis pathways. **Marine Genomics**. v. 21, p. 1-12, 2015.

MIHALI, T. K., R. KELLMANN, J. MUENCHHOFF, K. D. BARROW & B. A. NEILAN. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 716–722, 2008.

MILGROM, L. R. **The colours of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds**. Oxford, Oxford University Press.1997.
MISRA, S.; KAUSHIK, B. D. Growth promoting substances of cyanobacteria. II. Detection of amino acids, sugars and auxins. Proc. Indian Natn. Sci. Acad., B v. 55, p. 499 – 504, 1989.

MOLLATAGHI, A.; COUDIERE, E.; HADI, A. H. A.; MUKHTAR, M. R.; AWANG, K.; LITAUDON, M.; ATA, A. Anti-acetylcholinesterase, anti-α-glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. **Fitoterapia**, *v. 83, p.* 298-312, 2012.

MONTENEGRO, H.et al. Aporphine alkaloids from Guatteria spp. with Leishmanicidal activity.Planta Med., v. 69, p. 677-679, 2003.

MONTERO-LOBATO, Z. *et al*. Chemically-Induced Production of Anti-Inflammatory Molecules in Microalgae. **Marine Drugs**, 2018, v. *16, n.* 12, p. 478, 2018.

MORALES-SÁNCHEZ, D.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, O. A.; MARTINEZ, A. Heterotrophic cultivation of microalgae: production of metabolites of commercial interest. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, p. 925–36, 2017.

MORIN, N.; VALLAEYS, T.; HENDRICKX, L; NATALIE, L.; WILMOTTE, A. An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 2, p. 148-154, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MUKUND S., MUTHUKUMARAN M., SIVASUBRAMANIAN V. *In-silico* studies on cyanobacterial metabolites against lung cancer EGFR protein. **International Journal of Institutional Pharmacy and Life Science**, v. 4, p. 89–98, 2014.

MUNDT, S. KREITLOW, S.; NOWOTNY, A.; EFFMERT, U. International Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. **Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 203, n. 3, p. 327-334, 2001.

NAGARAJAN, M.; MARUTHANAYAGAM V.; SUNDARARAMAN, M. SAR analysis and bioactive potentials of freshwater and terrestrial cyanobacterial compounds: a review. **Journal of Applied Toxicology**, 2013; v. 33, p. 313–349, 2013.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L.; SANTOS, J. N.; NASCIMENTO, T. P.; NASCIMENTO, M. A.; NETO, J. B. C.; SOUSA, C. S. Microalgas como matéria-prima para biocombustíveis: importância no cenário atual, principais entraves e resultados promissores na Bahia. **DIÁLOGOS & CIÊNCIA – Revista da Rede de Ensino FTC**, 2009.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. P. O.; JÚNIOR, A. M. B., TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NCCLS - NATTIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS- **Perfomance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 7 ed.Villanova. PA: NCCLS, 2000.

NIKAM, T. D. NITNAWARE, K. M. AHIRE, M. L. Alkaloids Derived from Tryptophan: Harmine and Related Alkaloids. In: **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Ramawat KG, Mérillon J-M, editors. [Internet] Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. pp. 553–74.

NIVESHIKA, E. V.; MISHRA, A. K.; SINGH, A. K.; SINGH, V. K. Structural elucidation and molecular docking of a novel antibiotic compound from cyanobacterium *Nostoc* sp. MGL001. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1899, p. 1-15, 2016.

NOAMAN, N. H.; FATTAH, A.; KHALEAFA, M.; ZAKY, S. H. Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*. **Microbiological Research**, v. 159, p. 395–402, 2004.

NOGLE, L. M.; GERWICK, W. H. Somocystinamide A, a novel cytotoxic disulfide dimer from a Fijian marine cyanobacterial mixed assemblage. **Organic Letters**, v. 4, p. 1095–1098, 2002.

NOVOVESKA, L.; ZAPATA, A. K. M.; ZABOLOTNEY, J. B.; ATWOOD, M. C.; SUNDSTROM, E. R. Optimizing microalgae cultivation and wastewater treatment in largescale off shore photobioreactors. **Algal Research**, v. 18, p. 86–94, 2016.

NUNNERY, J. K.; MEVERS, E. GERWICK, W. H. Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 21, p. 787-793, 2010.

OHSE, S. ET AL .Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6., 2009.

OLIVER, J. W. Atsumi S. Metabolic design for cyanobacterial chemical synthesis. **Photosynthesis Research**, v. 120, p. 249–61, 2014.

ONO, E.; CUELLO, J. L. Carbon Dioxide Mitigation using Thermophilic Cyanobacteria. **Biosystems Engineering**, v. 96, n. 1, p. 129-134, 2007

.

OUELLETTE, R. J.; J. RAWN, D. 30 - Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids, , In: **Organic Chemistry (Second Edition),** Editor(s): Robert J. Ouellette, J. David Rawn. Academic Press, 2018, p. 973-1000, 2018.

OZKURT I. Qualifying of safflower and algae for energy. **Energy Education Science and Technology**, v. 23, p. 145–151, 2009.

PANDEY, V. D. Cyanobacterial natural products as antimicrobial agentes. **International Journal of Current Microbiology Applied Science**, v. 4, n. 1, p. 310-317, 2015.

PARK, H.; JUNG, D.; LEE, J.; KIM, P.; CHO, Y.; JUNG, I.; KIM, Z. H.; LIM, S. M.; LEE C. G. Improvement of biomass and fatty acid productivity in ocean cultivation of *Tetraselmis* sp. using hypersaline medium. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 5, p. 2525-2735, 2018.

PATTANAIK, B.; LINDBERG, P. Terpenoids and their biosynthesis in cyanobacteria. **Life**. v.5, p.269-293, 2015.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A.D.B.; CHORGHADE, M. Ayurveda and natural products drug discovery. **Current Science**, v. 86, p. 789-799, 2004.
PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**, Cengage, 4 ed, 2010, p.716.

PAWAR, S. T.; PURANIK, P. R. Screening of terrestrial and freshwater halotolerant cyanobacteria for antifungal activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p.1019–1025, 2008.
PEREIRA, J. A. C. **Aplicação de técnicas de ressonância magnética nuclear ao estudo de processos dinâmicos em solução**.1994. 239p. Tese (Doutoramento em Química) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. 1994.

PEREIRA, M. N. *et al*. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. Industrial Crops and Products, v. 97, p. 324-329, 2017.

PERKERSON III, R. B.; JOHANSEN, J. R.; KOVACIK, L.; BRAND, J.; KASTOVSKY, J.; CASAMATTA, D. A. A unique Pseudanabaenalean (Cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. **Journal of Phycology,** v. 47, n. 1397–412, 2011.

PERKERSON III, R. B.; PERKERSON, E.; CASAMATTA, D. A. Phylogenetic examination of the cyanobacterial genera *Geitlerinema* and *Limnothrix* (Pseudanabaenaceae) using 16S rDNA gene sequence data. **Algological Studies**, v. 134, n. 1–16, 2010.

PONTES-ARRUDA, A.; ARAGAO, A. M.; ALBUQUERQUE, J. D. Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 2325-33, 2006.

PRADHAN, J.; DAS, S.; DAS, B. K. Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 32, p. 809-818, 2014.

PRATOOMYOT, J. P.; SRIVILAS; NOIRAKSAR T. Fatty acids composition of 10 microalgal species. **Songklanakarin Journal of Science and Technology,** v. 27, n. 6, p. 1179 – 1187, 2005.

PREISITSCH, M.; HARMROLFS, K.; PHAM, H.T.L.; HEIDEN, S.E.; FÜSSEL, A.; WIESNER, C.; PRETSCH, A.; SWIATECKA-HAGENBRUCH, M.; NIEDERMEYER, T.H.J.; MÜLLER, R.; *et al*. Anti-MRSA-acting carbamidocyclophanes H–L from the Vietnamese cyanobacterium *Nostoc* sp. CAVN2. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, p. 165–177, 2015.

PREISITSCH, M.; NIEDERMEYER, T. H. J; HEIDEN, S. E.; NEIDHART, I.; KUMPFMÜLLER, J.; WURSTER, M.; HARMROLFS, K.; WIESNER, C.; ENKE, H.; MÜLLER, R.; MUNDT, S. Cylindrofridins A–C, Linear Cylindrocyclophane-Related Alkylresorcinols from the Cyanobacterium *Cylindrospermum stagnale.* Journal of Natural Proucts, v. 79, n. 1, p. 106–115, 2016.

PRETSCH, E.; BUHLMANNAND, P.; AFFOLTER, C. **Structure Determination of Organic Compounds** (thirdedition), Springer, 2000. p. 149.

PRIHANTINI, B.; SJAMSURIDZAL, W.; YOKOTA, A. Description of Stanieria strain of cyanobacteria isolated from hot spring in Indonesia Nining. **AIP Conference Proceedings 1729**, n. 020066, 2016.

PUGLISI, M. P.; TAN, L.T.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Capisterones A and B, effective anti-fungal defenses against the marine pathogen *Lindra thalassiae* from the tropical green alga *Penicillus capitatus*. **Tetrahedron**, v. 60, p. 7035–7039, 2004.

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

QUEIROZ, E. F. *et al*. Pessoine and spinosine, two catecholic berbines from Annona spinescens. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 4, p. 438-440, 1996.

RABELO, D. M.; PINHEIRO, M. B.; BARISON, A.; SALOMÉ, K. S.; COSTA, E. V.; DA SILVA, F. M. A.; CHAVES, Y. O.; BASTOS, I. dos S. Alcaloides isoquinolínicos e investigação das atividades antiplasmódica e antibacteriana de Guatteira citiodora (Annonaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1453–1458, 2014.

RAJESHWARI, K. R.; RAJASHEKHAR, M. Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from different aquatic habitats of Western Ghats, Southern India. **Brazilian Archieves of Biology and Technology**, Curitiba , v. 54, n. 5, p. 849-857, 2011.

RAJESHWARI, K. R.; RAJASHEKHAR, M. Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from different aquatic habitats of Western Ghats, Southern India. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 5, p. 849-857, 2011.

RAJISHAMOL, M. P. *et al*., Antioxidant activity of Cyanobacteria isolated from Cochin estuary. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 45, n. 8, p. 974-977, 2016.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. v.27, p.521-539, 2009.

RATH, B.; PRIYADARSHANI, I. Antibacterial and antifungal activity of marine cyanobacteria from Odisha Coast. **International Journal of Trends in Research**, v. 2, n. 1, p. 248–251, 2013.

ŘEKÁHOVÁ, K.; JOHANSEN, J.R.; BOWEN, M.B.; MARTIN, M.P.; SHEIL, C. S. Variation in secondary structure of the 16S rRNA molecule in cyanobacteria with implications for phylogenetic analysis. **Fottea**, v. 14, p. 161–178, 2014.

RICHMOND A. Physiological principles and modes of cultivation in mass production of photoautotrophic microalgae. In: COHEN, Z. **Chemicals from Microalgae**. London: Taylor & Francis Ltd., 1999.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture**: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566 p.

RICHMOND, A. Microalgaculture. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 4, p. 369-438, 1986.

RICHMOND, A. The challenge confronting industrial microalgaculture: high photosynthetic efficiency in large scale reactors. **Hydrobiologia**, v. 151/152, p. 117-121, 1987.

RINALDI, M. V. N. *et al*. Alkaloids and biological activity of beribá (Annona hypoglauca). **Revista brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 77-83, 2017.

ROBINSON E. S.; ANDERSON, N. J.; CROSBY, J.; NUTT, D. J.; HUDSON, A. L. Endogenous beta-carbolines as clonidine-displacing substances. **Annals of the New York Academic Science**, v. 1009, p. 157–166, 2003.

ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; FEWER, D. P.; URMANN, M.; SIVONEN, K. Two Alternative Starter Modules for the Non-Ribosomal Biosynthesis of Specific Anabaenopeptin Variants in Anabaena (Cyanobacteria), **Chemistry & Biology**, v.17, n.3, p.265-273, 2010.

ROUHIAINEN, L. PAULIN, S. SUOMALAINEN, H. HYYTIÄINEN, W.J.BUIKEMA, R. H ASELKORN, SIVONEN, K. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in Anabaena strain 90. **Molecular Microbiology**, v. 37, p. 156-167, 2000.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre $ABTS^{+}$. Fortaleza: Embrapa, 2007. **(**Comunicado Técnico 128).

SAADIA I.; SHAHIDA. H. Antioxidant potential of indigenous cyanobacterial strains in relation with their phenolic and flavonoid contents, **Natural Product Research, v.** 30, n. 11, p. 1297-1300, 2016.

SABLÓN-CARRAZANA, M.; JIMÉNEZ_ALEMÁN, G.; PÉREZ, R. P.; VÉLEZ_CASTRO, H.; RODRÍGUEZ-TANTY, C. Procedure to obtain the 3',5'-di-O-acetyl-5-formyl-2'-deoxyuridine. **Revista CENIC Ciências Químicas**, v. 38, n. 1. P. 237-242, 2007.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Omega-3 and ômega-6 polyumsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolismo, and significance – A review**. Life Science**, v. 203, p. 255-267, 2018.

SALVADOR, L. A.; BIGGS, J. S.; PAUL, V.J.; LUESCH, H. Veraguamides A–G, cyclic hexa depsipeptides from a dolastatin 16-producing cyanobacterium Symploca cf hydnoides from Guam. **Journal Natural Products**, v. 74, p. 917–927, 2011.

SANMUKH, S.; BRUNO, B.; RAMAKRISHNAN, U.; KHAIRNAR, K.; SANDHYA, S.; PAUNIKAR, W. Bioactive Compounds Derived from Microalgae Showing Antimicrobial Activities. **Jounal of Aquaculture Research and Development,** v. 5, n. 3, p. 1-4, 2014.

SANT'ANNA, C.L. *et al.* Subgeneric diversity of Brasilonema (Cyanobacteria, Scytonemataceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo , v. 34, n. 1, p. 51-62, Mar. 2011.

SANTOS, L. S. **Estudos sobre síntese de novos fotossensibilizadores a partir de produtos naturais porfinóides**. Dissertação de Mestrado.Universidade Federal de São Carlos. 144f. 2013.

SANZ, M.; ANDREOTE, A. P.; FIORE, M. F.; DÖRR, F. A.; PINTO, E. Structural Characterization of New Peptide Variants Produced by Cyanobacteria from the Brazilian Atlantic Coastal Forest Using Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry. **Marine drugs**, v. 13, n. 6, p. 3892-919, 2015.

SARANYA, C.; HEMALATHA, A.; PARTHIBAN, C.; ANANTHARAMAN, P. Evaluation of Antioxidant Properties, Total Phenolic and Carotenoid Content of Chaetoceros calcitrans, Chlorella salina and Isochrysis galbana. **International Journal of Current Microbiology and Appied Sciences,** v.3, n.8, p. 365-377, 2014.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SASSANO, C. E. N. **Influência da uréia no crescimento e no teor do ácido graxo y-linolênico da biomassa de *Spirulina platensis*.** 1999. 144 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SASSI, P. G. P. **Cianobactérias marinhas dos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. Cultivo,Taxonomia e Potencialidades de aplicações em biotecnologia**. 2013. 77p.

Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

SCHEER, S.; KATZ, J. J. **Nuclear magnetic resonance spectroscopy of porphyrins and metalloporphyrins.** IN: Porphyrins and Metalloporphyrins, K.M. Smith, Ed., Elsevier Scientific Publishing Company, New York, N.Y., 1975, 910 p.

SCHREUDER, H.; LIESUM, A.; LONZE, P.; STUMP, H.; HOFFMANN, H.; SCHIELL, M.; KURZ, M.; TOTI, L.; BAUER, A.; KALLUS, C.; KLEMKE-JAHN, C.; CZECH, J.; KRAMMER, D.; ECNKE, H.; NIEDERMEYER, T. H. J.; MORRISON, V.; KUMAR, V.; BRÖNSTRUP. Isolation, Co-Crystallization and Structure-Based Characterization of Anabaenopeptins as Highly Potent Inhibitors of Activated Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFIa). **Scientific Reports**, 6, n. 32958, p. 1-9, 2016.

SECKBACH, J. **Algae and Cyanobacteriain. Extreme Environments**. v. 11, 2007.
SEMARY, N. A. E.; FOUDA, M. Anticancer activity of *Cyanothece* sp. strain extracts from Egypt: first record. Asian Pacific **Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, p. 992–995, 2015.
SERRILL, J. D., WAN, X.; HAU, A. M.; JANG, H. S.; COLEMAN, D. J.; INDRA, A. K.; ALANI, A. W. G.; MCPHAIL, K. L.; ISHMAEL, J. E., Coibamide A, a natural lariat depsipeptide, inhibits VEGFA/VEGFR2 expression and suppresses tumor growth in glioblastoma xenografts. **Investigational New Drugs**, v. 34, p. 24–40, 2016.

SHAH, V.; RAY, A.; GARG, N. AND MADAMWAR, D. Characterization of the extracellular polysaccharides produced by the marine cyanobacterium *Cyanothece* ATCC 51142 and its exploitation toward metal removal from solutions. **Current Microbiolpgy**, v. 40, p. 274 – 278, 2000.

SHAIEB F. A.; ISSA, A. A.; MERAGAA, A. Antimicrobial activity of crude extracts of cyanobacteria Nostoc commune and Spirulina platensis. **Archives of Biomedical Sciences**, v.2, n. 2, p. 34-41, 2014.

SHALYGIN, S.; SHALYGINA, R.; JOHANSEN, J. R.; PIETRASIAK, N.; BERRENDERO GÓMEZ, E.; BOHUNICKÁ, M.; MAREŠ, J.; SHEIL, C. A. *Cyanomargarita* gen. nov. (Nostocales, Cyanobacteria): convergent evolution resulting in a cryptic genus. **Journal of Phycology,** v. 53, p. 762–77, 2017.

SHANAB, S. M.; MOSTAFA, S. S.; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G. I. (2012). Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine,** v. *2*, n.8, p. 608-615, 2012.

SHERWOOD, A. R.; CARLILE, A. L.; VACCARINO, M. A.; JOJANSEN, J. R. Characterization of Hawaiian freshwater and terrestrial cyanobacteria reveals high diversity and numerous putative endemics. **Phycology Research**, v. 63, p. 85–92, 2015.

SHIN, H.J.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, K. Aeruginosins 205A and-B, serine protease inhibitory glycopeptides from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-205). **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 1810–1813, 1997.

SILVA, D. B. *et al*. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from Duguetia furfuracea. Phytomedicine, v. 16, p. 1059-1063, 2009.

SIMMONS, T. L.; ANDRIANASOLO, E. MCPHAIL, K.; FLATT, P. GERWICK, W. H. Marine natural products as anticancer drugs. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 2, p. 333-342, 2005.

SIMMONS, T. L.; ENGENE, N.; UREÑA, L. D.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; GERWICK, L.; GERWICK, W. H. Viridamides A and B, lipodepsipeptides with antiprotozoal activity from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigro-viridis*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1544–1550, 2008.

SINGER, P.; SHAPIRO, H.; THEILLA, M.; ANBAR, R.; SINGER, J.; COHEN, J. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. **Intensive Care Medicine**, v. 34, p. 1580-1592, 2008.
SINGH, R. K.; TIWARI, S. P.; RAI, A. K.; MOHAPATRA, T. M. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. **The Journal of Antibiotics**, v.64, p. 401–412, 2011.

SINGH, S. P.; MONTGOMERY, B. L. Determining cell shape: Adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. **Trends in Microbiology**, v.19, p. 278-285, 2011.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins, in: I. Chorus, J. Bartram (Eds.), **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and** Management, 1st edition, WHO, E & SPON, London, 1999.

SIVONEN, K.; LEIKOSKI, N.; FEWER, D. P.; JOKELA, J. Cyanobactins-ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. A**pplied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1213-1225, 2010.

SKJÅNES, K.; REBOURS, C.; LINDBLAD, P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 172-215, 2013.

SKULBERG, O. M. Bioactive chemicals in microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgae Culture: biotechnology and applied phycology.** Oxford: Blackwell Science, p. 485-512, 2004.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49–55, 1977.

SMITH, K. M. **The Porphyrin Handbook.** Nova Iorque, Academic Press. 2000.
SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

SOUZA, E.T.; LIRA, D.P.; QUEIROZ, A.C.; SILVA, D.J.C.; AQUINO, A.B.; MELLA, E.A.C.; LORENZO, V.P.; MIRANDA, G.E.C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; CHAVES, M.C.O.;

ET AL. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of caulerpin, a bisindole alkaloid isolated from seaweeds of the genus Caulerpa. **Marine Drugs**, v.7, p.689–704, 2009.

SPARKMAN, O. D.; PENTON, Z. E.; KITSON, F. G. Nucleosides (TMS Derivatives). In: **Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide,** 2 ed. Academic, Press, p.369–371, 2011.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

STANIER, R. Y.; DERUELLES, J.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M.; WATERBURY, J. B. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.
STEENBERGEN, L.; SELLARO, R.; HOMMEL, B.; COLZATO, L. S. Tyrosine promotes cognitive flexibility: Evidence from proactive vs. reactive control during task switching performance, **Neuropsychologia**, v. 69, 2015, p. 50-55, 2015.

STÉVIGNY, C.; BLOCK, S.; PAUW-GILLET, M.C.; HOFFMAM, E.; LLABRES, G.; ADJAKIDJÉ, V.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Cassytha filiformis*. **Plantas Medicinais**, v. 68, p. 1042-1044, 2002.

TAEPUCHAROEN, K., TARAWAT, S., PUANGCHAROEN, M., INCHAROENSAKDI, A., MONSHUPANEE, T. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) under photoautotrophy and heterotrophy by non-heterocystous N2-fixing cyanobacterium. **Bioresource Technology,** v. 239, p. 523–527, 2017.

TAIPALE, S.; STRANDBERG, U.; PELTOMAA, E.; GALLOWAY, A. W. E.; OJALA, A.; BRETT, M. T. Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 71, p. 165–178, 2013.

TAKASHI KUDA; M. TSUNEKAWA; H. GOTO; Y. ARAKI. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, n.7, p. 625-633, 2005.

TAN, L. T.; GOH, B. P. L. Chemical ecology of marine cyanobacterial secondary metabolites: a mini-review. **Journal of Coastal Development**, v.3, n.1, p.1-9, 2009.
TAN, L.T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. **Phytochemistry**, v. 68, p. 954-979, 2007.

TAO, Y.; LI, P.; ZHANG, D.; GLUKHOV, E.; GERWICK, L.; ZHANG, C.; MURRAY, T. F.; GERWICK, W. H. Samholides, Swinholide-Related Metabolites from a Marine Cyanobacterium cf. *Phormidium* sp. **Journal of Organic Chemistry**, v.*83*, n. 6, p 3034–3046, 2018.

TAORI, K., V.J. PAUL.; H. LUESCH. Structure and activity of largazole, a potent antiproliferative agent from the Floridian marine cyanobacterium *Symploca* sp. **Journal of the American Chemica. Society**, v.130, p.1806-1807, 2008.

TELES, M. N. de O.; MACEDO, L.; BARISON, A.; VILAÇA, E. Alkaloids from leaves of Annona salzmannii and Annona vepretorum (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 61, p. 465–469, 2015.

TENEVA, I.; STOYANOV, P.; BELKINOVA, D.; DIMITROVA-DYULGEROVA, I.; MLADENOV, R.; DZHAMBAZOV, B. Production of cyanobacterial toxins from two *Nostoc* species (*Nostocales*) and evaluation of their cytotoxicity *in vitro*. **Journal of BioScience and Biotechnol**, v. 1, p. 33–43, 2012.

TERUYA, T.; SASAKI, H.; FUKAZAWA, H.; SUENAGA, K., 2009. Bisebromoamide, a potent cytotoxic peptide from the marine cyanobacterium Lyngbya sp.: isolation, stereostructure, and biological activity. **Organic Letters**, v. 11, p. 5062–5065, 2009.
THORNBURG, C. C.; THIMMAIAH, M.; SHAALA, L. A.; et al. Cyclic depsipeptides, grassypeptolides D and E and Ibu-epidemethoxylyngbyastatin 3, from a Red Sea Leptolyngbya cyanobacterium. **Journal Natural Products**, v. 74, n. 8, p. 1677-1685, 2011.

TIDGEWELL, K.; CLARK, B. R.; GERWICK, W. H. 2.06 The natural products chemistry of cyanobacteria. In: Liu H-W, Mander L, editors. **Comprehensive natural products** {II} Elsevier; Oxford. pp. 141–188., 2010.

TILLETT, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T. and NEILAN, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemical Biology**, v. 7, n. 10, p. 753-764, 2000.

UPASAN, C.D.; BALARAMAN, R. Protective effect of Spirulina on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. **Phytotherapy Research**, v.17, p. 330–334, 2010.

UPASANI, C.D.; KHERA, A.; BALARAMA, R. Effect of lead with vitamin E, C, or Spirulina on malondialdehyde, conjugated dienes and hydroperoxides in rats. **Indian Journal of Experience Biology**, v. 39, p. 70–74, 2001.

VIJAYAKUMAR, S.; MENAKHA, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria - A review. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, p. 15–23, 2015.

VOLK, R. B. Mundt S. Cytotoxic and non-cytotoxic exometabolites of the cyanobacterium Nostoc insulare. **Journal of Applied Phycology**. v. 19, n. 1, p. 55-62, 2007.

VOLK, R. B. Screening of microalgae for species excreting norharmane, a manifold biologically active indole alkaloid. **Microbiological Research**, v.163, p.307–313, 2008.
VOLK, R. B.; FURKERT, F. H. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. **Microbiological Research**, v. 161, p. 180–186, 2005.

VONSHAK, A.; GUY, R.; GUY, M. The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 417–420, 1988.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, **v.** 406, p. 775–81, 2000.

WALTON, K.; BERRY, J. P. Indole alkaloids of the stigonematales (cyanophyta): Chemical diversity, biosynthesis and biological activity. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, 2016.

WANG, H.; ZHANG, H.; ZOU, Y.; MI, Y.; LIN, S.; XIE, Z.; YAN, Y.; ZHANG, H. Structural insight into the tetramerization of an iterative ketoreductase siam through aromatic residues in the interfaces. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. 1-11, 2014.

WANG, Y.; RISCHER, H.; ERIKSEN, N. T.; WIEBE, M. G. Mixotrophic continuous flow cultivation of *Chlorella protothecoides* for lipids, **Bioresource Technology**, v. 144, p. 608-614, 2013.

WEBSTER, D.; WILDGOOSE, J. Tyrosine supplementation for phenylketonuria. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 4, n. 8, 2010.

WELKER, M.; DOHREN, H. V. Cyanobacterial Peptides—Nature's Own Combinatorial Biosynthesis. **Federation of European Microbiological Society Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 530-563, 2006.

WOLFE, R. R. Branched-chain amino acids and muscle protein synthesis in humans: myth or reality? **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, vol. 14 n. 30, 2017.

WOOD, S. A.; KUHAJEK, J. M.; WINTON, M.; PHILLIPS, N. R. Species composition and cyanotoxin production in periphyton mats from three lakes of varying trophic status. **Federation of European Microbiological Society Microbiology Ecology**, v. 79, p. 312–326, 2012.

YOON Y, LEE C. Partial purification and characterization of a novel antifungal compound against *Aspergillus* spp. from *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 14, p. 383–390, 2009.

YU, X.; CHEN, L.; ZHANG, W. Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. **Frontiers in Microbiology**, v. *6*, p. 1–10, 2015.

YUNES, J.S.; CUNHA, N.T.; BARROS, L. P.; PROENÇA, L.A.O.; MONSERRAT, J.M. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazil. **Comments on Toxicology**, v. 9, p. 103-115, 2003.

ZANCHETT, G.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Cyanobacteria and cyanotoxins: From impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. **Toxins (Basel).** v. 5, p. 1896- 1917, 2013.

ZARROUK, C. **Contribution l'e´tude d'une cyanophyce :** influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthe`se de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. 1966. Thesis (PhD) – Faculty of Science, Universityof Paris. France, 1966.

ZHANG, H.Q.; LIN, A. P.; SUN, Y.; DENG, Y.M. Chemo- and radio-protective effects of polysaccharide of Spirulina platensis on hemopoietic system of mice and dogs. **Acta Pharmacologica Sinica,** v. 22, p. 1121–1124, 2001.