

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Cianobactérias de ambiente costeiro: filogenia, prospecção gênica e química
de moléculas bioativas**

Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2014**

Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz
Bacharel em Ciências Biológicas

Cianobactérias de ambiente costeiro: filogenia, prospecção gênica e química de moléculas bioativas

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Vaz, Marcelo Gomes Marçal Vieira

Cianobactérias de ambiente costeiro: filogenia, prospecção gênica e química de moléculas bioativas / Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

136 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Bioprospecção
 2. Filogenia
 3. Bioatividade
 4. Inibidores de proteases
 5. Cianotoxinas
 6. Atividade antitumoral
- I. Título

CDD 589.46
V393c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

Aos meus pais, Eci e Isma
Aos meus irmãos, Roberta, Luís André e Amanda
À minha avó, Raime

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marli de Fátima Fiore, pela oportunidade e orientação.

À Universidade de São Paulo, à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, por toda a infraestrutura e logística oferecidas, as quais foram indispensáveis à realização deste projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos no início do doutorado.

À Professora Dra. Hosana Maria Deboni e aos estudantes de pós-graduação, Rafael de Felício, Ezequiane Machado e Lorene Armstrong, pela colaboração nos estudos de química de produtos naturais e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, pela infraestrutura cedida.

Ao Professor Dr. Ramon Kaneno, pelo auxílio nos ensaios biológicos com linhagens de células tumorais e à Universidade Estadual Paulista, câmpus de Botucatu, pela infraestrutura cedida.

Ao Dr. Itamar Soares de Melo, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna), ao Professor Dr. Ricardo Della Coletta e à doutoranda Ana Camila Messetti, ambos da Universidade Estadual de Campinas (Faculdade de Odontologia de Piracicaba), por auxiliarem nas etapas de sequenciamento de fragmentos de DNA.

Aos Professores Dr. Fernando Dini Andreote e Dra. Simone Possedente de Lira, pela convivência agradável e constantes conversas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (Ecologia Molecular de Cianobactérias), que de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho: Adriana Sturion Lorenzi, Andresa Fonseca, Caroline Hoff, Danillo Alvarenga, Gabriela Machineski, Isabela Ascêncio, Karina Heck, Maria Estela Stenico, Patrícia Schaker, Stella Lima e Ana Cláudia Carraro Alleoni.

À Ana Paula Dini Andreote e à Elaine Crespim, pela colaboração nas atividades científicas, ensinamentos e, principalmente, pela amizade.

À Talita Schiavolin, estudante de iniciação científica, por ter se tornando, neste último ano, o meu braço direito, auxiliando nas diversas tarefas dentro do laboratório.

Um agradecimento especial ao grande amigo Diego Bonaldo Genuário, pelos ensinamentos, discussões quase infinitas sobre os mais variados temas. Agradeço ainda pela companhia constante.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, e todos aqueles que participaram da minha vida nestes últimos quatro anos, em especial, à Lucélia Borgo.

Aos amigos de Viçosa, inesquecíveis, Victor, Luciano, Gilberto e Matheus (CSF) e Lucas Paolucci.

Por fim e, não menos importante, gostaria de agradecer aos meus pais, por tudo que eles representam, pelo amor incondicional durante toda minha vida e por serem sempre pacientes em todos os momentos. Agradecimento mais que especial aos meus irmãos, pela amizade, e companheirismo em todos os momentos, e à minha grande avó, Raime, pela presença marcante. Esse agradecimento é o mínimo que posso fazer em retribuição a tudo de bom que recebi de vocês. Obrigado!

“O homem nasceu para aprender, aprender tanto quanto a vida lhe permita.”
(Guimarães Rosa)

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem!” (Grande Sertão: Veredas, Guimarães Rosa).

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 DESENVOLVIMENTO.....	25
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1.1 Cianobactérias	25
2.1.2 Ambiente Costeiro e de Manguezal.....	26
2.1.3 Produtos naturais e bioatividade em Cianobactérias	27
2.1.4 Cianotoxinas e inibidores de proteases.....	31
2.2 Material e Métodos.....	36
2.2.1 Linhagens usadas nesse estudo: manutenção e repicagem.....	36
2.2.2 Análises moleculares	36
2.2.2.1 Extração de DNA genômico.....	36
2.2.2.2 Amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S	39
2.2.2.3 Amplificação de fragmentos de genes envolvidos na biossíntese de inibidores de proteases e cianotoxinas	39
2.2.2.4 Clonagem.....	41
2.2.2.5 Transformação e PCR usando colônias.....	41
2.2.2.6 Extração de DNA plasmidial.....	43
2.2.2.7 Sequenciamento.....	43
2.2.2.8 Processamento e análise filogenética das sequências.....	44
2.2.3 Análises Químicas	45
2.2.3.1 Produção de biomassa	45
2.2.3.2 Obtenção de extratos e análises para aeruginosina, cianopeptolina e microcistina.....	45
2.2.3.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	48
2.2.3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)	48
2.2.3.6 Análise espectroscópica (Ressonância Magnética Nuclear – RMN ¹ H e RMN ¹³ C)...	49
2.2.3.7 Banco de dados MarinLit	49
2.2.4 Ensaio de bioatividade	50

2.2.4.1 Obtenção de extratos extra e intracelulares.....	50
2.2.4.2 Ensaio antimicrobianos	51
2.2.4.3 Ensaio com linhagens de células tumorais	51
2.3 Resultados e Discussão	53
2.3.1 Sequenciamento e análise filogenética do gene que codifica para o rRNA 16S de linhagens unicelulares	53
2.3.2 Análise molecular e química de substâncias bioativas	64
2.3.2.1 Aeruginosina e Cianopeptolina.....	64
2.3.2.2 Microviridina	67
2.3.2.3 Cianotoxinas.....	73
2.3.2.3.1 Cilindrospermopsina	73
2.3.2.3.2 Microcistina	74
2.3.2.3.3 Saxitoxina.....	78
2.3.3 Análises químicas dos extratos e frações de quatro linhagens de cianobactérias.....	82
2.3.3.1 <i>Oxytoma</i> sp. CENA135 – Fração 3	83
2.3.3.2 <i>Nostoc</i> sp. CENA 175 – Fração 2	91
2.3.3.3 <i>Cyanobium</i> sp. CENA157: fracionamento do extrato bruto.....	94
2.3.3.4 <i>Nostoc</i> sp. CENA184: fracionamento do extrato bruto	97
2.3.4 Ensaio de Bioatividade	98
2.3.4.1 Ensaio antimicrobianos	98
2.3.4.2 Ensaio com linhagens de células tumorais	102
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
REFERÊNCIAS.....	107
ANEXOS	121

RESUMO

Cianobactérias de ambiente costeiro: filogenia, prospecção gênica e química de moléculas bioativas

O filo Cyanobacteria constitui um grupo filogeneticamente coerente, embora, apresente grande diversidade morfológica, sendo sua sistemática constantemente revisada. Esses micro-organismos são, ainda, alvos de estudos biotecnológicos em razão da produção de toxinas e na busca por substâncias de interesse farmacológico. Dentre as linhagens analisadas neste estudo, sete sequências do gene rRNA 16S foram geradas e avaliadas com sequências previamente obtidas. Ao menos dois grupos podem representar novos gêneros de cianobactérias, sendo que um grupo demonstra ser endêmico de manguezais brasileiros. Os genes de inibidores de proteases, aeruginosina, cianopeptolina e microviridina, foram detectados e a produção de aeruginosina foi confirmada por LC-MS nos gêneros *Cyanobium* e *Nostoc*. Sequências de aminoácidos do precursor de microviridina indicaram a produção de três novas variantes em quinze linhagens de cianobactérias dos gêneros *Cyanobium*, *Synechococcus*, *Cyanobacterium*, *Nodosilinea* e *Nostoc*. O potencial genético para produção de cilindrospermopsina (*cyrJ*) foi confirmado em vinte e seis linhagens. Em cinco linhagens dos gêneros *Cyanobium* e *Nostoc* foram encontrados os genes *mcyD*, *mcyE* e *mcyG*, envolvidos na biossíntese de microcistina. A sequência *McyG* da linhagem *Nostoc* sp. CENA175 agrupou-se filogeneticamente com outras de linhagens produtoras de microcistina. Os genes *sxtA* e *sxtI*, envolvidos na biossíntese de saxitoxina, foram encontrados em nove linhagens dos gêneros *Cyanobium*, *Oxynema*, *Leptolyngbya*, *Nodosilinea* e *Nostoc*. A sequência de *SxtI* da linhagem *Leptolyngbya* sp. CENA134 apresentou similaridade ≥ 70 % com proteínas hipotéticas enquanto as de *Nostoc* sp. CENA159 e *Nostoc* sp. CENA160 apresentaram similaridade ≥ 82 % com *O*-carbamoiltransferase. Na análise filogenética, a sequência de *SxtI* da linhagem *Nostoc* sp. 160 agrupou-se com sequências de linhagens produtoras de saxitoxina. Nas análises químicas, a fração 3 do extrato da linhagem *Oxynema* sp. CENA135 revelou uma substância com características de ácidos graxos poli-insaturados e a fração 2 do extrato da linhagem *Nostoc* sp. CENA175 apresentou uma estrutura aromática ligada a uma cadeia alifática. Outros três extratos, obtidos das linhagens *Cyanobium* sp. CENA157, *Nodosilinea* sp. CENA183 e *Nostoc* sp. CENA184 mostraram-se promissores quanto à presença de substâncias nitrogenadas. Os ensaios de bioatividade revelaram que 48 % dos extratos metanólicos inibiram o crescimento de ao menos um isolado de bactéria e/ou levedura. Os extratos das linhagens *Cyanobium* sp. CENA142 e *Cyanobacterium* sp. CENA169 foram eficientes contra o crescimento de seis bactérias patogênicas. Nos ensaios de inibição de células tumorais, o extrato de DCM da linhagem *Cyanobium* sp. CENA154 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) inibiu moderadamente culturas de células 3LL. Os extratos etanólicos de *Oxynema* sp. CENA135 ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e *Cyanobium* sp. CENA154 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) inibiram as células CT-26. Em ensaios conduzidos com linhagens de células de glioma (U251), câncer de mama (MCF-7) e câncer de pulmão (NCI-H460), o extrato de DCM da linhagem *Cyanobium* sp. CENA136 inibiu 50 % do crescimento das respectivas células tumorais nas concentrações 7,8; 27,1 e $14,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Desta forma, além de filogeneticamente diversas, as cianobactérias isoladas de ambiente marinho do Estado de São Paulo constituem fonte promissora de inibidores de proteases, cianotoxinas e substância bioativas com ação antibacteriana, antifúngica e antitumoral.

Palavras-chave: Bioprospecção; Filogenia; Bioatividade; Inibidores de proteases; Cianotoxinas; Atividade antitumoral

ABSTRACT

Cyanobacteria from coastal environment: phylogeny, gene and chemical prospecting of bioactive molecules

The phylum Cyanobacteria is a phylogenetically coherent group, although presenting great diversity, and its systematic have been constantly reviewed. These microorganisms are also targets of biotechnological studies due to the production of toxins and the search for novel substances of pharmacological interest. Among the strains analyzed in this study, sequences of the 16S rRNA gene were generated for seven and, then, analyzed with sequences previously obtained. At least two groups may represent new cyanobacterial genera, while a group of *Cyanobium* proves to be endemic of Brazilian mangroves. Genes of the proteases inhibitors, aeruginosin, cyanopeptolin and microviridin, were detected and the production of aeruginosin was confirmed by LC-MS for *Nostoc* and *Cyanobium*. The amino acid sequences of microviridin precursor indicated the production of three new variants in fifteen cyanobacterial strains of the genera *Cyanobium*, *Synechococcus*, *Cyanobacterium*, *Nostoc* and *Nodosilinea*. The genetic potential for production of cylindrospermopsin (*cyrJ*) was confirmed in twenty-six strains. In five strains of the genera *Nostoc* and *Cyanobium* the *mcyD*, *mcyE* and *mcyG* genes, which are involved in the microcystin biosynthesis, were found. The *McyG* sequence of *Nostoc* sp. CENA175 was phylogenetically grouped with sequences of microcystin-producing strains. The *sxtA* and *sxtI* genes, from saxitoxin biosynthesis, were found in nine strains of the genera *Cyanobium*, *Oxynema*, *Leptolyngbya*, *Nodosilinea* and *Nostoc*. The *SxtI* sequence of *Leptolyngbya* sp. CENA134 showed similarity $\geq 70\%$ with hypothetical proteins, while the sequences of *Nostoc* sp. CENA159 and *Nostoc* sp. CENA160 showed similarity $\geq 82\%$ with *O*-carbamoyltransferase. In the phylogenetic analysis, the *SxtI* sequence of *Nostoc* sp. CENA160 grouped with sequences of strains that produce saxitoxin. In chemical analysis, the fraction 3 of the *Oxynema* sp. CENA135 extract revealed a substance with poly-unsaturated fatty acids characteristics and the fraction 2 of *Nostoc* sp. CENA175 extract indicated an aromatic structure, attached to an aliphatic chain. Other three extracts obtained from *Cyanobium* sp. CENA157, *Nodosilinea* sp. CENA183 and *Nostoc* sp. CENA184 were promising for the presence of nitrogenous substances. Bioactivity assays revealed that 48 % of the methanolic extracts inhibited the growth of at least one isolate of bacteria and/or yeast. The extracts of *Cyanobium* sp. CENA142 and *Cyanobacterium* sp. CENA169 were efficient against six pathogenic bacteria. In the inhibition assays of tumor cells, the DCM extract of *Cyanobium* sp. CENA154 ($100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) moderately inhibited the growth of 3LL cells. Ethanol extracts of *Oxynema* sp. CENA135 ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and *Cyanobium* sp. CENA154 ($100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were able to inhibit cultures of CT-26 cells. In tests conducted with glioma cell lines (U251), breast cancer (MCF-7) and lung cancer (NCI-H460), the DCM extract of *Cyanobium* sp. CENA136 caused 50 % of growth inhibition, respectively, when used at concentrations of 7.8, 27.1 and $14.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Thus, besides their phylogenetically diversity, the cyanobacteria strains from marine environment of the São Paulo state are a promising source of protease inhibitors, cyanotoxins and bioactive compounds with antibacterial, antifungal and antitumor activities.

Keywords: Bioprospection; Phylogeny; Bioactivity; Protease inhibitors; Cyanotoxins, Antitumoral activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Agrupamento gênico de cilindrospermopsina e molécula de cilindrospermopsina	33
Figura 2 - Agrupamento gênico de saxitoxina e molécula de saxitoxina.....	33
Figura 3 - Agrupamento gênico de microcistina e molécula de microcistina	34
Figura 4 - Estrutura química dos inibidores de proteases aeruginosina (A) e cianopeptolina (B)	35
Figura 5 - Coluna de separação acoplada a sistema de filtração à vácuo, utilizada na Cromatografia Líquida à vácuo (CLV)	47
Figura 6 - Exemplo de espectro de massas da fração 2 da linhagem <i>Oxynema</i> sp. CENA135, obtido via LC-MS, em módulo positivo (18,18 – 18,42 min).....	50
Figura 7 - Resultado do retorno da busca por substâncias que apresentam massa semelhante à pesquisada (+/- 1 Da) (A). Seleção de uma substância específica, para visualização de sua estrutura e de seus valores de ressonância (RMN de ¹ H e ¹³ C) (B).....	50
Figura 8 - Análise filogenética de sequências de RNAr 16S das linhagens das ordens Synechococcales e Chroococcales, usando o método de máxima verossimilhança (ML). As sequências originadas a partir de linhagens do Mangue estão marcadas com círculo preenchido de preto; as geradas neste estudo estão em vermelho. Os valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó. A: Sequências de <i>Cyanobium</i> . B: Sequências de <i>Synechococcus</i> . C: Sequências de <i>Cyanobacterium</i> e <i>Geminocystis</i> . D: Sequências de <i>Chlorogloea</i>	58
Figura 9 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos do produto MdnA, precursor da via de biossíntese de microviridina, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). As sequências obtidas neste estudo estão marcadas com um círculo preenchido. As sequências obtidas por ANDREOTE (2014) e HOFF-RISSETI (2012) estão, respectivamente, marcadas com um triângulo e um quadrado. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó	69
Figura 10 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos de MdnB, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). As sequências obtidas neste estudo estão marcadas com um círculo preenchido. As sequências obtidas por ANDREOTE (2014) e HOFF-RISSETI (2012) estão, respectivamente, marcadas com um triângulo e um quadrado. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.....	72
Figura 11 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos de MdnC, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). As sequências obtidas neste estudo estão marcadas com	

um círculo preenchido. As sequências obtidas por ANDREOTE (2014) e HOFF-RISSETI (2012) estão, respectivamente, marcadas com um triângulo e um quadrado. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó	72
Figura 12 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos do produto McyG, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). A sequência obtida neste estudo está marcada com um círculo preenchido. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó	78
Figura 13 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos do produto SxtI, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). As sequências obtidas neste estudo estão marcadas com um círculo preenchido. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.....	80
Figura 14 - Exemplos de estruturas do ácido língbico e derivados (A); e espectros de RMN de ¹ H (B e C) utilizados para comparação com a possível substância isolada na fração 3 da linhagem <i>Oxynema</i> sp. CENA135. A: Espectro de metiloleato. B: Espectro de α-linolenato	84
Figura 15 - Em A, Ácido tetradecanóico (C ₁₄ H ₂₈ O ₂ , PM 228; adicionando-se mais dois grupos CH ₂ = PM 256). Em B, Hexadecanoato de metila (C ₁₇ H ₃₄ O ₂ , PM 270 para este éster, se for ácido PM = 256).....	85
Figura 16 - Espectro de RMN de ¹ H da fração 3 de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, 500 MHz, CDCl ₃	85
Figura 17 - Espectro de RMN de ¹ H da fração 3 de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, 500 MHz, CDCl ₃ (expansão 1)	86
Figura 18 - Espectro de RMN de ¹ H da fração 3 de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, 500 MHz, CDCl ₃ (expansão 2)	86
Figura 19 - Espectro de RMN de ¹ H da fração 3 de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, 500 MHz, CDCl ₃ (expansão 3)	86
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹³ C da fração 3 de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, 125 MHz, CDCl ₃	87
Figura 21 - Espectro de RMN de ¹³ C da fração 3 de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, 125 MHz, CDCl ₃ (expandido).....	87
Figura 22 - Espectro de RMN de experimento COSY ¹ H- ¹ H da fração 3 de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, 500 MHz, CDCl ₃	88
Figura 23 - Espectro de RMN de experimento HSQC da fração 3 de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, 500 MHz, CDCl ₃	88
Figura 24 - Espectro de RMN de ¹ H do éster linoleato de metila.....	89

Figura 25 - Ácido α -linolênico – ALA (ácido - cis-9,12,15-octadecatienoico).....	90
Figura 26 - Placa cromatográfica das frações 1 - 9 de <i>Oxynema</i> sp. CENA135 revelada com cloro-iodoplatinado.....	90
Figura 27 - Exemplo de estrutura de ftalato, na qual os ésteres ocupam os carbonos de posições 1 e 2, e os substituintes R e R' podem ser iguais ou diferentes, como grupamentos etílicos ou metílicos até mesmo longas cadeias alifáticas	91
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H da fração 2 da linhagem <i>Nostoc</i> sp. CENA175, 500 MHz, CDCl_3	92
Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H : fração 2 da linhagem <i>Nostoc</i> sp. CENA175, 500 MHz, CDCl_3 (expansão 1).....	92
Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H : fração 2 da linhagem <i>Nostoc</i> sp. CENA175, 500 MHz, CDCl_3 (expansão 2).....	93
Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração 2 da linhagem <i>Nostoc</i> sp. CENA175, 125 MHz, CDCl_3	93
Figura 32 - Espectro de RMN de experimento COSY ^1H - ^1H da fração 2 da linhagem <i>Nostoc</i> sp. CENA175, 500 MHz, CDCl_3	94
Figura 33 - Placa cromatográfica das frações 1 a 7 da linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA157. Visualização da placa sem revelador.....	95
Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H da fração 3 da linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA157, CDCl_3 , 500MHz	95
Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H da fração 5 da linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA157, CDCl_3 , 500MHz	96
Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H das frações 8 e 9 (agrupadas) da linhagem <i>Cyanobium</i> sp. CENA157, CD_3OD , 500MHz	96
Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto da linhagem <i>Nostoc</i> sp. CENA184, CD_3OD , 500MHz	97
Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H da fração 2 da linhagem <i>Nostoc</i> sp. CENA184, CD_3Cl_3 , 500MHz.....	97
Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H da fração 3 da linhagem <i>Nostoc</i> sp. CENA184, CD_3Cl_3 , 500MHz.....	98
Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H da fração 8-9 da linhagem <i>Nostoc</i> sp. CENA184, CD_3OD , 500MHz	98
Figura 41 - Atividade citotóxica de extratos de DCM sobre células 3LL (tumor de pulmão murino). O eixo Y apresenta os valores de densidade óptica obtidos em leitura a 540 nm. No	

eixo X os códigos indicam as linhagens de cianobactérias analisadas. Deste estudo: *Oxynema* sp. CENA135 e *Cyanobium* sp. CENA154. As barras indicam os valores de desvio-padrão obtidos após médias das três repetições realizadas para cada concentração de extrato. CRTL: controle..... 102

Figura 42 - Atividade citotóxica de extratos DCM sobre células CT26 (tumor de cólon murino). O eixo Y apresenta os valores de densidade óptica obtidos em leitura a 540 nm. No eixo X os códigos indicam as linhagens de cianobactérias analisadas. Deste estudo: *Oxynema* sp. CENA135 e *Cyanobium* sp. CENA154. As barras indicam os valores de desvio-padrão obtidos após médias das três repetições realizadas para cada concentração de extrato. CRTL: controle..... 103

Figura 43 - Atividade citotóxica de extratos etanólicos sobre células 3LL (tumor de pulmão murino). O eixo Y apresenta os valores de densidade óptica obtidos em leitura a 540 nm. No eixo X os códigos indicam as linhagens de cianobactérias analisadas. Deste estudo: *Oxynema* sp. CENA135 e *Cyanobium* sp. CENA154. As barras indicam os valores de desvio-padrão obtidos após médias das três repetições realizadas para cada concentração de extrato. CRTL: controle..... 103

Figura 44 - Atividade citotóxica de extratos etanólicos sobre células CT26 (tumor de cólon murino). O eixo Y apresenta os valores de densidade óptica obtidos em leitura a 540 nm. No eixo X os códigos indicam as linhagens de cianobactérias analisadas. Deste estudo: *Oxynema* sp. CENA135 e *Cyanobium* sp. CENA154. As barras indicam os valores de desvio-padrão obtidos após médias das três repetições realizadas para cada concentração de extrato. CRTL: controle..... 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de cianobactérias usadas nesse estudo.....	38
Tabela 2 - Solventes e misturas de solventes orgânicos utilizados no fracionamento do extrato bruto obtido de linhagens de cianobactérias.....	47
Tabela 3 - Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S geradas neste estudo e sequências ^a depositadas no GenBank	54
Tabela 4 - Matriz de identidade entre as sequências de RNAr 16S de <i>Cyanobacterium</i> sp. CENA169 e sequências depositadas no GenBank	63
Tabela 5 - Matriz de identidade entre as sequências de RNAr 16S das linhagens <i>Chlorogloea</i> sp. CENA150 e CENA152, e sequências depositadas no GenBank	63
Tabela 6 - Avaliação molecular e química da produção de aeruginosina e cianopeptolina.....	65
Tabela 7 - Avaliação molecular da presença dos genes <i>mdnA</i> , <i>mdnB</i> e <i>mdnC</i> , envolvidos na produção de microviridina.....	68
Tabela 8 - Análise comparativa das sequências de aminoácidos de diferentes variantes de microviridina	71
Tabela 9 - Avaliação molecular da presença do gene <i>cyrJ</i>	74
Tabela 10 - Avaliação molecular da presença dos genes <i>mcyD</i> , <i>mcyE</i> e <i>mcyG</i> , envolvidos na produção de microcistina.....	76
Tabela 11 - Matriz de identidade entre as sequências de McyG de <i>Nostoc</i> sp. CENA175 e outras obtidas do NCBI	77
Tabela 12 - Avaliação molecular da presença dos genes <i>sxtA</i> e <i>sxtI</i> , envolvidos na produção de saxitoxina.....	79
Tabela 13 - Matriz de identidade entre as sequências de SxtI obtidas neste estudo e outras obtidas do NCBI.....	81
Tabela 14 – Massa (g) da biomassa de cada linhagem após liofilização	82
Tabela 15 - Massas (mg) dos extratos e frações após Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV)	82
Tabela 16 - Ensaio de bioatividade conduzido com extratos metanólicos de linhagens de cianobactérias contra bactérias e levedura patogênicas.....	100
Tabela 17 - Concentração de extratos de DCM e etanol ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), obtidos culturas de cianobactérias, suficiente para inibir em 50% o crescimento celular (GI50).....	105

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias são micro-organismos pertencentes ao Domínio Bacteria e estudos fósseis e evidências moleculares sugerem que tais organismos existam há aproximadamente 3,5 bilhões de anos (SCHOPF, 1993; ALTERMANN; KAZMIERCZAK, 2003). Estes micro-organismos são amplamente distribuídos em termos geográficos e apresentam adaptações para colonizar diversos habitats (HERDMAN et al., 2001). Todas as cianobactérias são fotoautotróficas, mas, alguns grupos de cianobactérias podem também apresentar metabolismo heterotrófico, sendo designados de mixotróficos. Muitos gêneros realizam, ainda, o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (WOESE, 1985). Em decorrência do seu metabolismo, as cianobactérias são importantes agentes nos ciclos biogeoquímicos do carbono e do nitrogênio (KNOLL, 2008). Esses micro-organismos formam um grupo filogeneticamente coerente (GIOVANNONI et al., 1988; SHI; FALKOWSKI, 2008) mas, apresentam grande diversidade morfológica, existindo tanto cianobactérias unicelulares (solitárias ou coloniais) quanto filamentosas (homocitadas ou heterocitadas com ramificações verdadeiras ou não). Dentre os grupos filamentosos, alguns gêneros são capazes de apresentar células fisiológica e morfológicamente diferenciadas, como os heterócitos, acinetos e células de hormogônios (FLORES; HERRERO, 2010).

O elevado nível de adaptação das cianobactérias é refletido na diversidade de ambientes que elas colonizam: terrestres, aquáticos (água doce e salgada) e ambientes extremos. A maioria das espécies é dulcícola, no entanto, existem representantes marinhos que resistem à alta salinidade e suportam períodos de seca, enquanto as formas terrestres vivem sobre rochas ou em solo úmido. Algumas espécies podem sobreviver em águas de fontes termais com temperaturas de até 74 °C, enquanto outras podem ser encontradas sob a camada de gelo de lagos antárticos a temperaturas próximas de 0 °C (WOESE, 1985).

Embora este grupo seja filogeneticamente coerente, sua sistemática vem sendo constantemente revisada, de forma a melhor entender as relações evolutivas entre os diferentes grupos. A caracterização de linhagens de cianobactérias foi, por muito tempo, feita baseando-se apenas em critérios morfológicos e em amostras ambientais, priorizando informações morfométricas, que se verificou não serem muito estáveis. No entanto, critérios bacteriológicos, como isolamento, manutenção de culturas, estudos fisiológicos e moleculares, estão sendo amplamente usados (HERDMAN et al., 2001). Desta forma, a abordagem polifásica tem sido recomendada para a determinação taxonômica das linhagens. Nesta abordagem, aspectos morfológicos, filogenéticos, ultraestruturais, fisiológicos e

ambientais/ecológicos são utilizados para melhor se caracterizar a linhagem em estudo e, conseqüentemente, permitir um melhor posicionamento taxonômico da mesma (KOMÁREK, 2010; BRITO et al., 2012; ROLDÁN et al., 2013).

As cianobactérias são constantemente alvo de diferentes estudos visando sua aplicação biotecnológica, o que inclui a produção de biomassa para a alimentação e a produção de metabólitos de interesse biotecnológico e/ou industrial (ANGERMAYR et al., 2009). Também se destacam substâncias de interesse farmacológico, com potencial uso em tratamentos contra câncer e tumores, como a criptoficina (MAGARVEY et al., 2006), infecções virais, inibidores de proteases, como aeruginosinas, cianopeptolina e microviridinas, dentre outras (BURJA et al., 2001; CADEL-SIX, et al., 2008; TAN, 2010; ZIEMERT et al., 2010; JONES et al., 2010; SINGH et al., 2011). Algumas espécies também podem produzir cianotoxinas, as quais podem ser responsáveis por sérios problemas para a saúde pública quando há um aumento exagerado das populações destes organismos em lagos, rios ou reservatórios de água (OLIVERA-RAMÍRES et al., 2000; MORENO et al., 2003; PULZ; GROSS, 2004; ESPER; BADURA; RÖGNER, 2006; RUPPRECHT et al., 2006).

A possibilidade de risco à saúde humana e os incidentes em decorrência de intoxicação por cianobactérias e seu produtos vêm estimulando pesquisas bioquímicas detalhadas, visando ao isolamento, caracterização e entendimento do modo de ação de cianotoxinas e outros compostos (RUNNEGAR et al., 1994; SAKER; EAGLESHAM, 1999). Além disso, ensaios de bioatividade contra vírus, bactérias e fungos patogênicos, e ensaios de inibição enzimática, utilizando extratos obtidos a partir de cianobactérias, têm se revelado promissores para a descoberta de novas moléculas. Diversos estudos realizados nos últimos anos indicam que as cianobactérias apresentam elevada produção de substâncias bioativas de diversas classes químicas. Tais substâncias apresentam potencial biotecnológico, mais ainda carecem de uma melhor caracterização (MARTINS et al., 2007, 2009; ZELÍK et al., 2009; LOPES et al., 2010; ZIEMERT et al., 2010; DOGO et al., 2011; SILVA-STENICO et al., 2011; CARVALHO et al., 2013; RANGEL et al., 2013, 2014).

O Brasil, por possuir uma grande diversidade de biomas, pode representar uma fonte promissora para novos produtos naturais bioativos de cianobactérias. Desta forma, isolar, caracterizar e manter culturas de cianobactérias a partir de amostras de diversos ambientes deve ser o primeiro passo para se acessar a diversidade química desses organismos. Em seguida, é de grande importância caracterizar estas linhagens quanto ao seu potencial de produção de substâncias bioativas, a partir de ensaios de bioatividade, estudos genéticos e químicos.

Neste trabalho, cinquenta linhagens de cianobactérias isoladas de ambiente costeiro (GENUÁRIO, 2010; SILVA, 2010) foram analisadas. Uma vez que as linhagens estudadas foram isoladas de um ambiente pouco explorado, levantou-se a hipótese de que tais linhagens são promissoras do ponto de vista biotecnológico, podendo apresentar moléculas com atividades biológicas interessantes, bem como produzir cianotoxinas. Os objetivos deste trabalho foram: (i) caracterizar filogeneticamente, baseando-se nas sequências do gene RNAr 16S, trinta e quatro linhagens unicelulares; (ii) investigar, em cinquenta linhagens, por técnicas moleculares, o potencial genético para produção dos inibidores de proteases aeruginosina, cianopeptolina e microviridina; (iii) investigar, em cinquenta linhagens, por técnicas moleculares, o potencial genético para produção das cianotoxinas cilindrospermopsina, microcistina e saxitoxina; (iv) analisar o potencial de bioatividade contra linhagens de bactérias e de levedura patogênicas; (v) analisar o potencial de inibição do crescimentos de linhagens de células tumorais; e (vi) prospectar, utilizando abordagens químicas, a produção de cianotoxinas e outras moléculas bioativas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Cianobactérias

As cianobactérias são micro-organismos pertencentes ao Domínio Bacteria e apresentam parede celular característica de bactérias gram-negativas. Estudos fósseis e evidências moleculares sugerem que tais organismos existam há aproximadamente 3,5 bilhões de anos (SCHOPF, 1993; ALTERMANN; KAZMIERCZAK, 2003). Estes micro-organismos são amplamente distribuídos em termos geográficos e apresentam adaptações para colonizar diversos habitats, inclusive os mais extremos (HERDMAN et al., 2001). Todas as cianobactérias são fotoautotróficas, capazes de realizar fotossíntese oxigênica de forma similar aos organismos eucarióticos fotoautotróficos. Alguns grupos de cianobactérias podem também apresentar metabolismo heterotrófico, sendo designados de mixotróficos. Muitos gêneros são, ainda, capazes de realizar o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (WOESE, 1985). Em decorrência do seu metabolismo, as cianobactérias são importantes agentes nos ciclos biogeoquímicos do carbono e do nitrogênio (KNOLL, 2008).

Como os primeiros organismos capazes de realizar a fotossíntese oxigênica, as cianobactérias apresentam papel fundamental no processo de evolução da vida na Terra. A fotossíntese oxigênica requer a ação coordenada dos dois fotossistemas, PSI e PSII, de forma a gerar o potencial eletroquímico suficiente para a extração de elétrons da água, produzindo o oxigênio (FLORES; HERRERO, 2010). Este processo e a consequente produção de oxigênio por cianobactérias foi responsável pela oxidação da atmosfera terrestre há 2,4-2,2 bilhões de anos, sendo que este grupo também contribuiu substancialmente para a produção primária durante a Era Proterozóica (KNOLL, 2008).

Esses micro-organismos formam um grupo filogeneticamente coerente, o qual também inclui os cloroplastos (GIOVANNONI et al., 1988; SHI; FALKOWSKI, 2008) mas, apresentam grande diversidade morfológica, existindo tanto cianobactérias unicelulares (solitárias ou coloniais) quanto filamentosas (homocitadas ou heterocitadas com ramificações verdadeiras ou não). Dentre os grupos filamentosos, alguns gêneros são capazes de apresentar células fisiológica e morfológicamente diferenciadas, como os heterócitos, acinetos e células de hormogônios (FLORES; HERRERO, 2010).

Os acinetos são células similares a esporos, frequentemente mais largas que as células vegetativas, apresentando-se com granulação conspícua (MEEKS et al., 2002; ARGUETA et al., 2006). Estas células de resistência se diferenciam a partir das células vegetativas, em resposta a certas condições ambientais adversas, como limitação de luz e desnutrição por fosfato (ADAMS; DUGGAN, 1999). Os acinetos apresentam atividade metabólica reduzida e acumulam glicogênio como reserva de carbono, e cianoficina, como de nitrogênio (LEGANÉS, 1994; FLORES; HERRERO, 2010). Os heterócitos são as células diferenciadas nas quais ocorre a fixação biológica de nitrogênio em cianobactérias filamentosas heterocitadas, sendo, fisiologicamente, consideradas como receptores de carbono reduzido e fontes de nitrogênio reduzido dentro dos filamentos (MEEKS et al., 2002). Já os hormogônios são identificados como filamentos móveis e relativamente pequenos, que não apresentam heterócitos. Estes filamentos constituem um estado transiente, no qual não há produção de biomassa (TANDEAU DE MARSAC, 1994; MEEKS et al., 2002).

Esta diversidade morfológica e fisiológica reflete no elevado nível de adaptação das cianobactérias aos mais diversos nichos, podendo colonizar ambientes terrestres, aquáticos (água doce e salgada) e ambientes extremos. A maioria das espécies é dulcícola, mas existem representantes marinhos que resistem à alta salinidade e suportam períodos de seca, enquanto as formas terrestres vivem sobre rochas ou em solo úmido. Algumas espécies podem sobreviver em águas de fontes termais com temperaturas de até 74 °C, enquanto outras podem ser encontradas sob a camada de gelo de lagos antárticos a temperaturas próximas de 0 °C (WOESE, 1985).

2.1.2 Ambiente Costeiro e de Manguezal

A costa brasileira, que é banhada pelo Oceano Atlântico, apresenta extensão de 7.367 km, dos quais aproximadamente 6.786 km apresentam-se cobertos por vegetação típica de Manguezal. Este ambiente ocorre do extremo norte do país até o Estado de Santa Catarina, sendo o Rio Grande do Sul o único Estado litorâneo a não apresentar tal ecossistema (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2001).

O Manguezal caracteriza-se por ser um ambiente de interface entre terra e mar, em latitudes tropicais e subtropicais, apresentando elevada salinidade, variação de marés, fortes ventos, altas temperaturas e solos anaeróbicos (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Devido à influência da mistura de águas doces e marinhas em decorrência da variação das marés, os

manguezais sofrem amplas alterações diárias na salinidade, o que implica em grande adaptação fisiológica para os organismos que neles vivem (BRANCO et al., 2003).

No Estado de São Paulo, uma das principais áreas de ocorrência de mangues é a Baixada Santista, formada pelos municípios de Bertioga, Cubatão, Guarujá Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente. Essa região possui uma área total de cobertura vegetal de 1.716,6 km², sendo que em torno de 6 % correspondem à vegetação de mangue. No entanto, remanescentes do ecossistema de manguezal podem ser vistos em toda a costa do Estado de São Paulo (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2001).

Os estudos sobre cianobactérias na costa Atlântica brasileira, no entanto, são escassos e restringem-se, essencialmente, a levantamentos florísticos por meio de observações em microscopia óptica das espécies bentônicas (BAETA-NEVES; TRIBUZI, 1992; BRANCO et al., 1996; CRISPINO; SANT'ANNA, 2006). Estudos recentes, realizados no Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA/USP), introduziram, pela primeira vez, análises dependentes e independentes de cultivo no estudo da diversidade de cianobactérias nesse ambiente (GENUÁRIO, 2010; SILVA, 2010; RIGONATO, 2010). Outros ambientes estuarinos têm sido alvo de recentes estudos, indicando alta diversidade de cianobactérias em regiões costeiras de Portugal (BRITO et al., 2012; LOPES et al., 2012) e Cingapura (OHKI et al., 2008). O potencial de produção de substâncias bioativas também tem sido analisado, indicando esses ambientes como promissores para estudos de bioprospecção (MARTINS et al., 2007; MARTINS et al., 2009; LOPES et al., 2010; FRAZÃO et al., 2010; LOPES et al., 2012). Nestes estudos acessaram-se as atividades biológicas de extratos obtidos de linhagens isoladas de cianobactérias sobre diferentes organismos, indicando a produção de substâncias bioativas.

2.1.3 Produtos naturais e bioatividade em Cianobactérias

Em sentido amplo, os produtos naturais podem ser definidos como substâncias encontradas ou isoladas da natureza, que apresentam atividade biológica e/ou farmacológica, podendo ser usada para a descoberta e/ou a síntese de novas drogas. Alguns autores, no entanto, restringem esta definição, caracterizando os produtos naturais como compostos orgânicos produzidos via metabolismo primário, mas predominantemente pelo metabolismo secundário (HANSON, 2003). Tais produtos têm sido investigados e utilizados no alívio e cura de doenças desde os primórdios da humanidade e, atualmente, permanecem como fonte significativa de fármacos e medicamentos. Aproximadamente 60 % dos compostos utilizados

no tratamento de câncer e 75 % daqueles usados para doenças infecciosas são produtos de origem natural ou derivados (MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007; SINGH et al., 2011). Os estudos nesta área, em geral, não visam apenas o isolamento de substâncias biologicamente ativas, mas também a caracterização de produtos estruturalmente inéditos ou taxonomicamente relevantes (NEWMAN; CRAGG, 2007). Neste contexto, a diversidade de organismos existentes no ambiente marinho e em ecossistemas associados constitui uma excelente fonte de substâncias bioativas, das quais muitas diferem dos metabólitos secundários produzidos por organismos terrestres (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; TÜNEY et al., 2006).

O ambiente marinho tem sido reconhecido como fonte de numerosos e complexos compostos químicos. Tal indicação resulta, primeiramente, da observação de que micro-organismos marinhos estão substancialmente envolvidos na biossíntese de produtos naturais isolados a partir de macro-organismos, como invertebrados. No entanto, é relativamente abundante o registro de micro-organismos isolados capazes de sintetizar moléculas biologicamente ativas (BURJA et al., 2001; JONES et al., 2010; TAN, 2010; SINGH et al., 2011; LEÃO et al., 2012, 2013). A partir dos anos 1960, os oceanos começaram a atrair a atenção de pesquisadores, uma vez que constituem mais de 70 % da superfície terrestre. Desde então, esforços têm sido empregados no isolamento e caracterização de macro e micro-organismos presentes neste ambiente, de forma que, aproximadamente, 1 – 10 % da diversidade predita, já é cultivada (BURJA et al., 2001; TAN, 2010).

O uso de cianobactérias em tratamentos medicinais remonta aos anos 1500 antes de Cristo, quando linhagens de *Nostoc* eram utilizadas no tratamento de gota, fístulas e câncer (BURJA et al., 2001; SINGH et al., 2011). No entanto, investigações mais aprofundadas começaram a ser realizadas, predominantemente, a partir dos anos 1950-1970 (RUNNEGAR et al., 1994; SAKER; EAGLESHAM, 1999), quando da busca, isolamento e caracterização de cianotoxinas. Além disso, a partir dos anos 1980-1990, muito grupos, em especial os liderados por Richard Moore e William Gerwick aprofundaram os estudos em busca de compostos bioativos em geral. Dados indicam que estes grupos já avaliaram algo como mais de 4000 linhagens de cianobactérias, permitindo o isolamento de inúmeros compostos biologicamente ativos, dos quais, aproximadamente 6 % apresentam atividade antitumoral (BURJA et al., 2001; LEÃO et al., 2012).

As cianobactérias atraem atenção por duas razões principais: em primeiro, elas são fonte de toxinas e segundo, são potencialmente fontes de novas drogas. Poucos eventos de toxicidade de cianobactérias marinhas têm sido registrados, diferentemente do que ocorre com

as cianobactérias de água doce. No entanto, muitas linhagens classificadas como terrestres e de água doce já foram isoladas em ambientes estuarinos ou de mar aberto (BURJA et al., 2001), indicando a necessidade de melhor estudar os ambientes marinhos. Em geral, incluindo cianobactérias de diferentes habitats, as linhagens filamentosas são mais promissoras do que as unicelulares, como fontes de produtos naturais bioativos. As ordens Oscillatoriales e Pseudanabaenales contribuem com aproximadamente 49 % dos produtos naturais isolados, enquanto a ordem Nostocales, 26 %. A ordem Chroococcales contribui com 15 %, sendo os 10 % restantes divididos nas demais ordens. Aproximadamente 300 substâncias produzidas por cianobactérias de origem marinha foram descritas no período entre janeiro de 2001 a dezembro de 2006, as quais se enquadram em diversas classes químicas (TAN, 2007), sendo que 800 foram descritas até 2010 (JONES et al., 2010).

Entre as substâncias isoladas e caracterizadas, as que apresentam bioatividade estão divididas em inibidores enzimáticos, herbicidas, antimicóticos, inibidores de apetite, antimaláricos, imunossupressores dentre outras (MOORE, 1996; NAMIKOSHI; RINEHART, 1996; BURJA et al., 2001; ETCHEGARAY et al., 2004). Estas substâncias são quimicamente classificadas como amidas, alcaloides, lipopeptídeos, lactonas, peptídeos lineares e cíclicos, entre outras. Exemplos de substâncias produzidas por cianobactérias marinhas, bem estudadas e caracterizadas, são os anticancerígenos curacina A e a dolastatina 10 (GERWICK; TAN; SITACHITTA, 2001). A diversidade desses compostos inclui ainda: potentes ativadores de proteínas kinase C e promotores de tumor (lyngbyatoxina e aplysiatoxina); inibidores de microtubulina, como a curacina A, que também é um anticancerígeno (GERWICK et al., 1994); e um bloqueador do canal de sódio, kalkitoxina (BERMAN; GERWICK; MURRAY, 1999; WU et al., 2000).

Muitos desses metabólitos têm estrutura química bem diferente dos produzidos por outros organismos e apresentam interessantes atividades biológicas. *Lyngbya majuscula*, por exemplo, produz um grande número de metabólitos contendo nitrogênio, policetídeos, lipopeptídeos, peptídeos cíclicos e outros. O peptídeo cíclico wewakazol (NOGLE; MARQUEZ; GERWICK, 2003), por exemplo, é uma substância altamente complexa, sendo formada por 6 heterociclos: 3 anéis oxazóis e 3 pirrolidinas. Outras substâncias de relativa complexidade recentemente descritas são: cianopeptolina 880 de *Planktothrix agardhii* CYA 126/8 (OKUMURA et al., 2009), hantupeptina A de *L. majuscula* (TRIPATHI et al., 2009), e gallinamida A de *Schizothrix* sp. (LININGTON et al., 2009).

Espécies do gênero *Nostoc*, assim como as do gênero *Lyngbya*, são também reconhecidas como produtoras de grande variedade de substâncias naturais que derivam da

biossíntese de policetídeos, terpenóides, alcalóides e peptídeos não ribossômicos. Vários grupos de policetídeos foram isolados de linhagens de *Nostoc*: os ciclofenos, nostocuclopanos A-D. de *N. linckia* (CHEN; MOORE; PATTERSON, 1991); nostociclina A de *Nostoc* sp. (PLOUTNO; CARMELI, 2000) e boroficina de *N. linckia* (HEMSCHEIDT et al., 1994). O depsipeptídeo citotóxico criptoficina (TRIMURTULU et al., 1994), considerado uma droga antitumoral, é outro exemplo da diversa capacidade biossintética deste grupo de cianobactérias. Este composto foi inicialmente isolado de *Nostoc* sp. ATCC53789, sendo considerado um potente antifúngico. Em seguida, foi isolado de outra linhagem de *Nostoc*, GSV224, exibindo potente atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais (BURJA et al., 2001; MAGARVEY et al., 2006). No entanto, este composto mostrou-se tóxico em relação a outras células humanas (MAGARVEY et al., 2006). Tal viés levou ao estudo da via metabólica desta substância, o que permitiu, em um última instância, a síntese de um análogo menos tóxico, a criptoficina 8 (MOORE, 1996), que se encontra em estágio pré-clínico de estudos (MAGARVEY et al., 2006).

As substâncias produzidas por linhagens de cianobactérias, além de estruturalmente diversas, apresentam amplo espectro de bioatividade. De uma forma geral, avaliações utilizando extratos brutos têm se mostrado um meio eficiente para a identificação de organismos que produzem substância potencialmente ativas (BURJA et al., 2001). O alto nível de bioatividade dos extratos de cianobactérias tem relação com o amplo espectro de compostos produzidos por seu metabolismo secundário. Tais substâncias são 40,2 % lipopeptídeos, 5,6 % aminoácidos, 4,2 % ácidos graxos, 4,2 % macrolídeos, entre outros (SINGH et al., 2011).

Extratos de linhagens de cianobactérias ou compostos extraídos destas têm apresentado atividades antimalária, antitumoral, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoários e capacidade de inibir proteases (TAN, 2010; SINGH et al., 2011). Dentre as substâncias capazes de inibir protozoários estão venturamidas A e B, dragomabina, dragonamida e galinamida, que inibem o protozoário causador da malária (MCPHAIL et al., 2007; LININGTON et al., 2009). O inibidor de protease, nostocarbolina, isolado de *Nostoc* também se mostrou ativo contra outros protozoários (BARBARAUS et al., 2008). Diversos compostos com ação antiviral já são bem caracterizados, como os polissacarídeos *spirulan* e *Ca-spirulan*, ambos isolados de *Spirulina* e *nostoflan*, o qual foi isolado de uma linhagem de *Nostoc flagelliforme* (KANEKIYO et al., 2005); os peptídeos cianovirina e scytovirina, isoladas, respectivamente, de *N. elliposporum* e *Scytonema varium* (DEY et al., 2000; XIONG et al., 2006).

Estudos mais recentes desenvolvidos por grupos brasileiros vêm demonstrando a eficiência de extratos brutos, metanólicos e/ou de diclorometano, contra bactérias e leveduras patogênicas. SILVA-STENICO e colaboradores (2011) analisando linhagens de cianobactérias isoladas de diferentes biomas observaram que linhagens dos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Synechococcus*, *Microcystis* e *Fischerella* foram antagônicas ao crescimento de sete linhagens bacterianas e uma de levedura. Trabalhos recentes indicam que duas linhagens, uma de *Pseudanabaena galeata* CCIBt3082e outra de *Geitlerinema splendium* CCIBt3223, embora não produzam nenhuma toxina conhecida, causam toxicidade aguda em ratos, quando administradas oralmente (RANGEL et al., 2014). Em outros trabalhos, extratos metanólicos de três linhagens do gênero *Geitlerinema* (CCIBt 920, CCIBt1044 e CCIBt939) causaram processos inflamatórios agudos quando administrados em ratos (DOGO et al., 2011; RANGEL et al., 2013).

Adicionalmente, os extratos obtidos de cianobactérias vêm sendo analisados quanto ao potencial de inibição de enzimas do grupo acetilcolinesterase. Compostos que atuam impedindo a ação da acetilcolinesterase são importantes alvos no combate de doenças com o Mal de Alzheimer. Esta doença neurodegenerativa está associada com déficits de neurotransmissores, sendo que uma forma de tratamento é a restauração da função colinérgica, inibindo a acetilcolinesterase (FRANCIS et al., 1999; TREVISAN et al., 2003). Linhagens de *Nostoc*, *Calothrix*, *Phormidium* e *Geitlerinema* têm apresentado resultados promissores para a inibição de acetilcolinesterase, tanto em ensaio *in vivo* quanto *in vitro* (ZELÍK et al., 2009; CARVALHO et al., 2013).

2.1.4 Cianotoxinas e inibidores de proteases

O grupo das cianobactérias tem sido amplamente estudado em relação à sua capacidade de produzir toxinas, principalmente pelo fato de serem amplamente encontradas em ambiente aquáticos usados para consumo humano e/ou animal. Dentre as diversas toxinas produzidas, serão abordadas, neste trabalho, as cilindrospermopsinas, microcistinas e saxitoxinas. Estas três toxinas, bem como outras substâncias produzidas por cianobactérias, são sintetizadas via síntese não-ribossômica. Nesta via, vários substratos podem ser usados, sendo que enzimas dos grupos peptídeo sintetases não-ribossômica (NRPS, “non-ribosomal peptide synthetase”) e policetídeo sintases tipo I (PKS, “polyketide synthase”) e/ou híbridos de NRPS/PKS, são responsáveis pela reação (WELKER; VON DÖHREN, 2006). Em razão do alto grau de conservação dos genes que codificam para estas enzimas multifuncionais, tem

sido possível o desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a amplificação de regiões gênicas de interesse.

A cilindropermopsina é uma toxina do tipo alcaloide, formada por uma porção guanidino central funcional e uma hidroximetil uracila ligada a um esqueleto de carbono tricíclico, perfazendo uma massa molecular de 415 Da (OHTANI et al., 1992), Figura 1. O primeiro relato desta toxina foi em 1979, quando indígenas da Ilha de Palm em Queensland, Austrália, foram hospitalizados com sintomas de hepatoenterite após a ingestão de água da represa Solomon (HAWKINS et al., 1985). O mecanismo de ação desta cianotoxina é decorrente da inibição da glutatona, durante a síntese protéica e do citocromo P450. Tais inibições causam efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e em geral citotóxicos, além de ter potencial carcinogênico (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005; FROSCIO et al., 2003; HUMPAGE et al., 2000; TERA0 et al., 1994; RUNNEGAR et al., 1994, 1995, 2002).

A produção de cilindropermopsina já foi verificada em espécies dos gêneros *Anabaena* (SCHEMBRI et al., 2001; MIHALI et al., 2008), *Aphanizomenon* (BANKER et al., 1997; SHAW et al., 1999), *Cylindropermopsis* (HAWKINS et al., 1985), *Lyngya* (SEIFERT et al., 2007), *Oscillatoria* sp. (MAZMOUZ et al., 2010), *Raphidiopsis* (LI et al., 2001) e *Umezakia* (TERAO et al., 1994). O agrupamento gênico, que codifica as enzimas envolvidas na biossíntese de cilindropermopsina (*cyr*), foi inicialmente descrito na linhagem australiana *Cylindropermopsis raciborskii* AWT205 (Figura 1). A sulfatação da molécula final de cilindropermopsina, no C-12 é provavelmente realizada pela ação de uma sulfotransferase, codificada pelo gene *cyrJ* (MIHALI et al., 2008), sendo este o marcador genético usado neste estudo para investigar linhagens potencialmente produtoras de cilindropermopsina.

A saxitoxina e seus derivados são alcaloides neurotóxicos, os quais também são conhecidos como “Paralytic Shellfish Toxin” (PSTs), uma vez que seus efeitos foram inicialmente descritos em humanos envenenados após a ingestão de moluscos contaminados (LLEWELLYN, 2006). Os sintomas mais comuns causados pelo envenenamento por saxitoxinas são dormência progressiva da face e do pescoço, fraqueza e perda de coordenação motora. Em altas concentrações, a ingestão de saxitoxinas leva à paralisia muscular e morte por asfixia (KAO, 1993), sendo que o mecanismo de ação se dá por ligação e bloqueio dos canais de sódio em células nervosas (FERRÃO-FILHO, 2009). Este grupo de toxinas compreende aproximadamente 57 análogos (WIESE et al., 2010), os quais já foram descritos para os gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindropermopsis*, *Lyngbya*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis* e *Scytonema*, e também por dinoflagelados marinhos (NEILAN et al., 2012; LLEWELLYN, 2006). O agrupamento gênico proposto para a biossíntese de saxitoxina está

presente na Figura 2. Dos genes descritos, o *sxtI* será usado como marcador genético para investigar linhagens potencialmente produtoras de saxitoxina, uma vez que este gene é tido como exclusivo em linhagens produtoras desta toxina.

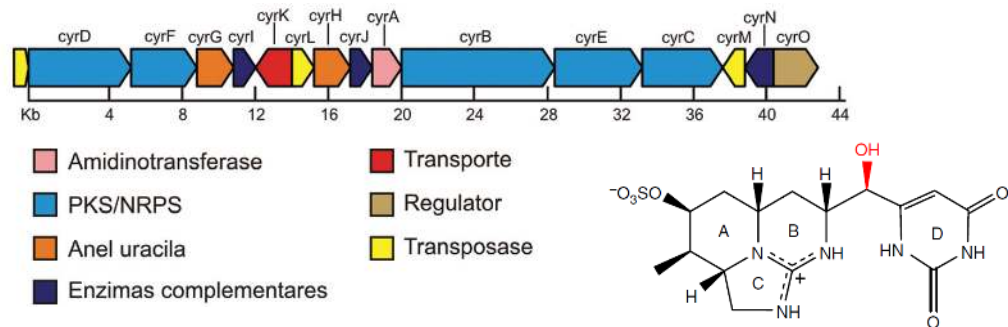


Figura 1 - Agrupamento gênico de cilindrospermopsina e molécula de cilindrospermopsina
Fonte: (FIORE; ALVARENGA; SILVA-STENICO, 2011)

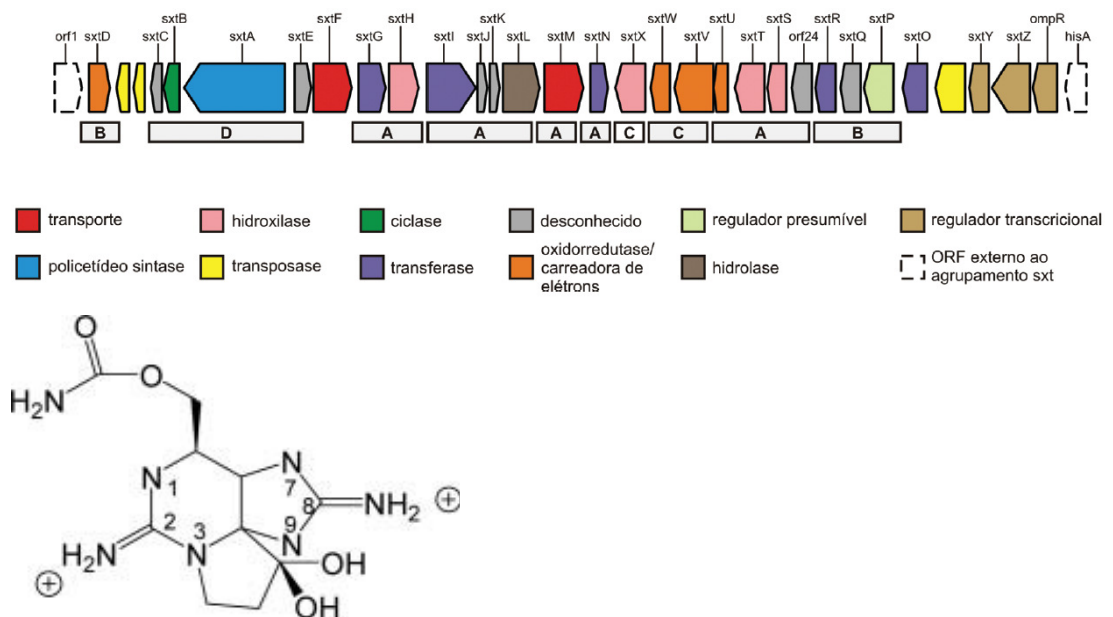


Figura 2 - Agrupamento gênico de saxitoxina e molécula de saxitoxina
Fonte: (FIORE; ALVARENGA; SILVA-STENICO, 2011)

As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos de massas moleculares altamente variáveis. Cerca de 90 isoformas estruturais de microcistinas já foram reportadas, sendo constatadas variações nos grupamentos metila, hidroxila, na sequência de peptídeos e na toxicidade (WELKER; VON DÖHREN, 2006). A ação das microcistinas se dá inibindo enzimas eucarióticas fosfatases do tipo 1A e 2 (CARMICHAEL, 1992; CODD et al., 1999; KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011). Estas toxinas são geralmente sintetizadas por linhagens dos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena* isoladas de ambientes de água

doce (WELKER; VON DÖHREN, 2006), mas, já foram descritas linhagens de *Nostoc* e *Fischerella* como produtoras de microcistina (FIORE et al., 2009; GENUÁRIO et al., 2010). O agrupamento gênico proposto para a biossíntese de microcistina está presente na Figura 3, sendo que os genes *mcyD*, *mcyE* e *mcyG* serão usados, neste estudo, como marcadores moleculares para investigar linhagens potencialmente produtoras de microcistina.

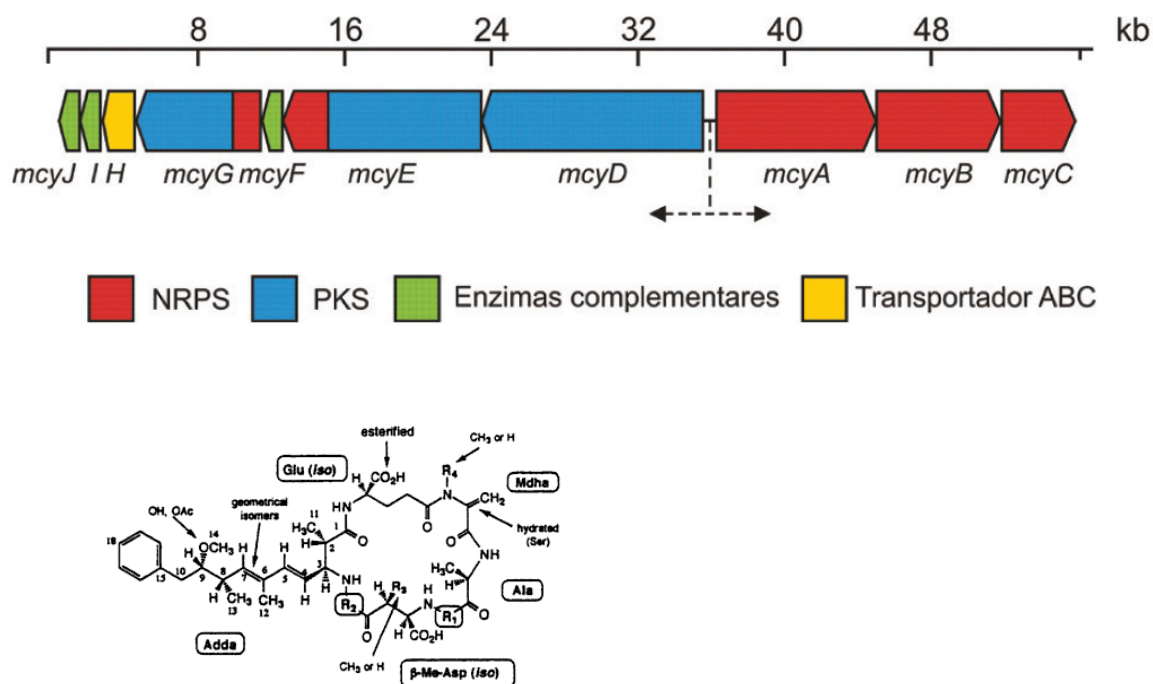


Figura 3 - Agrupamento gênico de microcistina e molécula de microcistina
Fonte: (FIORE; ALVARENGA; SILVA-STENICO, 2011)

Além da produção de toxinas, os inibidores de protease, produzidos por linhagens de cianobactérias, vêm recebendo grande atenção (CADEL-SIX et al., 2008). Esses inibidores são peptídeos capazes de formar complexos com proteases, promovendo a inibição ou a diminuição de sua atividade proteolítica.

As aeruginosinas são sintetizadas por via não ribossômica e constituem uma classe de peptídeos lineares, caracterizados pela presença de quatro subunidades: um grupo aminoácido N-terminal, uma aminoácido hidrofóbico, um resíduo central (Choi) e um grupo guanidínico N-terminal (Figura 4), sendo que 27 variantes já foram descritas (WELKER; VON DÖHREN, 2006; SILVA-STENICO et al., 2012). As aeruginosinas inibem serina proteases, tornando-as importantes moléculas para o desenvolvimento de drogas contra algumas doenças (SILVA-STENICO et al., 2012). A produção deste inibidor de protease já está bem caracterizada em linhagens dos gêneros *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix* e

Radiocystis (MURAKAMI et al., 1994, 1995; FUJII et al., 1997; LOMBARDO et al., 2006; ERSMARK; DEL VALLE; HANESSIAN, 2008).

As cianopeptolinas também são sintetizadas por via não ribossomal e pertencem à classe de peptídeos cíclicos. A estrutura geral destes peptídeos é caracterizada por uma peptogalactona ramificada, contendo sete resíduos de aminoácidos, dos quais seis formam um anel (Figura 4). Cerca de 80 variantes estruturais já são conhecidas, sendo potentes inibidores de proteases (WELKER; VON DÖHREN, 2006). A produção deste composto já foi reportado para linhagens dos gêneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Scytonema*, *Symploca*, *Lyngbya* e *Aphanocapsa* (WELKER; VON DÖHREN, 2006; CHOI et al., 2008). No Brasil, a produção de cianopeptolina foi inicialmente detectada na *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 (SILVA-STENICO et al., 2011, 2012).

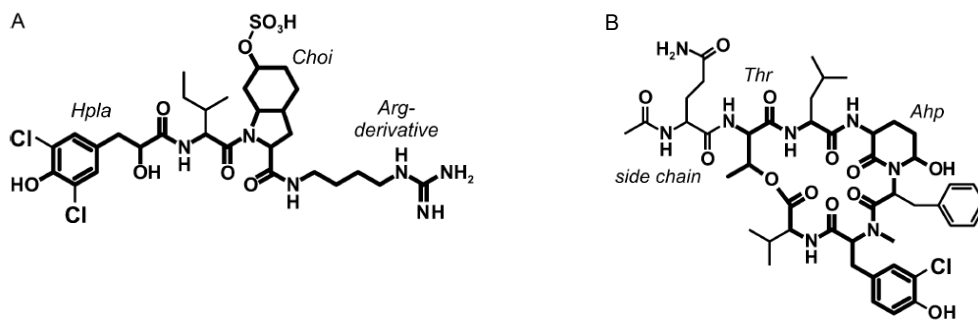


Figura 4 - Estrutura química dos inibidores de proteases aeruginosina (A) e cianopeptolina (B)
Fonte: (CADEL-SIX et al., 2008)

As microviridinas, também inibidoras de proteases, são depsipeptídeos tricíclicos, sintetizados por via ribossômica, diferentemente de aeruginosina e cianopeptolina. A produção de microviridina já foi descrita nos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix* e *Nostoc* (ZIEMERT et al., 2010). Além disso, genes envolvidos na biossíntese deste composto já foram identificados em linhagens brasileiras de *Chroococciopsis*, *Desmonostoc* e duas linhagens da família Nostocaceae (ANDREOTE, 2014). A principal atuação deste inibidor de proteases é sobre o grupo das elastases, sendo que 14 variantes já são conhecidas. A microviridina B tem elevado potencial terapêutico como um inibidor de elastase no tratamento de efisema pulmonar. Já a variante J afeta os processos de motilidade de *Daphnia*, pela da inibição de proteases específicas, levando à morte do animal (ISHITSUKA et al., 1990; OKINO et al., 1995; MURAKAMI et al., 1997; ROHRLACK et al., 2003; RESHEF; CARMELI, 2006; GESNER-APTER; CARMELI 2009; ZIEMERT et al., 2010).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Linhagens usadas nesse estudo: manutenção e repicagem

Cinquenta linhagens de cianobactérias de ambiente costeiro, isoladas de dois manguezais do Estado de São Paulo, Bertioga e Ilha do Cardoso, (GENUÁRIO, 2010) foram analisadas neste estudo. Esses isolados são mantidos em meio líquido específico na Coleção de Culturas de Cianobactérias do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP) (Tabela 1).

A manutenção das linhagens foi realizada por meio de repicagens periódicas em meios de cultura líquido, SWBG-11 (CASTENHOLZ, 1988), MN, MN₀ (CASTENHOLZ, 1988) e ASN-III (RIPPKA et al., 1979), cujas composições são apresentadas nos anexos. A repicagem foi realizada em frascos do tipo Erlenmeyer com 125 mL de volume, contendo 50 mL de meio de cultura apropriado. Após a repicagem as linhagens foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 24 ± 1 °C, sob iluminação fluorescente com irradiância de $30-40 \mu\text{mol.fótons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 14 horas (h) claro:10 h escuro.

2.2.2 Análises moleculares

2.2.2.1 Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de 3 mL de suspensão celular, obtida após 2-3 semanas de cultivo (item 2.2.1). Esse volume foi concentrado por centrifugação a $10.000 \times g$ por 10 minutos (min). O sobrenadante final foi descartado e o pélete formado foi lavado em água ultrapura esterilizada (Millipore, Millipore SAS-67120, Synergy, Molsheim, França), com o intuito de diminuir o conteúdo de bactérias heterotróficas, de restos celulares e de mucilagem de cianobactérias. Essa lavagem consistiu na adição de 1 mL de água, seguida da homogeneização do conteúdo e centrifugação. Esta etapa foi realizada por três vezes consecutivas, alterando-se as velocidades e os tempos de centrifugação na seguinte ordem: $10.000 \times g$ por 5 min, $13.000 \times g$ por 2 min e $12.000 \times g$ por 3 min.

Após esta etapa, as células foram rompidas por choque térmico. Os microtubos contendo os péletes celulares foram mergulhados em banho-maria a 55 °C por 3 min e transferidos, rapidamente, para nitrogênio líquido (-196 °C) até o completo congelamento.

Esse procedimento foi repetido por cinco vezes ou até a visualização do extravasamento do conteúdo intracelular, o que indica o rompimento celular.

A extração do DNA genômico foi realizada seguindo o método descrito por FIORE et al. (2000). Para isso, as células concentradas foram ressuspensas em 1 mL de solução I (EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e NaCl 50 mM), e centrifugadas duas vezes (2 min a $10.000 \times g$), sendo o sobrenadante descartado ao final. O pélete foi ressuspendido em 200 μL de solução II (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e EDTA 50 mM) suplementados com Proteinase K (2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), e incubado por 10 min a 55 °C. A este volume foram adicionados 600 μL de tampão de extração pré-aquecido a 55 °C (CTAB 3 %, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl pH 8,0 100 mM, Sarkosyl 1 % e β -mercaptoetanol 1 %), o qual foi novamente incubado em banho-maria a 55 °C por 30 minutos. Em seguida, 800 μL de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 (v/v) foram adicionados. O conteúdo foi homogeneizado manualmente e submetido à centrifugação por 5 min a $7000 \times g$. Do sobrenadante obtido, 500 μL foram recuperados e transferidos para um microtubo novo e esterilizado, ao qual foram adicionados 1000 μL de NaCl 4 M e 50 μL de sílica (20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tampão PBS), seguido de incubação a 55 °C por 10 min. Os tubos foram centrifugados por 30 s a $7.000 \times g$, o sobrenadante foi descartado e o pélete foi lavado duas vezes com 250 μL da solução de lavagem (NaCl 50 mM, Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 2,5 mM e etanol 50 %). Em seguida, o pélete foi seco a 37 °C e reidratado com 30 μL de água ultrapura esterilizada, sendo incubado em banho-maria a 45 °C durante 10 min. O conteúdo foi centrifugado a $7000 \times g$ por 30 s e o sobrenadante contendo o DNA foi recuperado e transferido para um novo microtubo esterilizado. Este material foi armazenado a -20 °C até a realização das etapas futuras.

Para análise da integridade e estimativa de concentração dos DNAs extraídos (ng/ μL), alíquotas de 5 μL dos mesmos foram acrescidas de 3 μL tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25 %, glicerol 30 % e SYBR[®] Green I 0,1 % – Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). O volume resultante – 8 μL – foi aplicado em gel de agarose 1 % e submetido à corrida eletroforética (85 V, por 30 – 35 min) em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A estimativa de concentração foi feita por comparação com o marcador de tamanho e massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A documentação do gel foi feita usando o programa “Kodak MI Application”, “Kodak Gel Logic 212 Imaging System” (Molecular Imaging System Carestream Health, Inc, Rochester, NY, EUA).

Tabela 1 - Linhagens de cianobactérias avaliadas nesse estudo

Ordem	Linhagem/Código CENA	Origem	Meio de Cultura	
<u>Synechococcales</u>	<i>Cyanobium</i> sp. CENA136	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA138	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA139	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA140	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA141	Ilha do Cardoso/água	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA142	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA143	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA145	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA146	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA148	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA149	Ilha do Cardoso/água	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA151	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA153	Ilha do Cardoso/ perifiton	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA154	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA157	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA162	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CEN163	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA164	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA165	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA166	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA168	Bertioga – solo	SWBG-11	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA170	Ilha do Cardoso/solo	MN	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA171	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA172	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA174	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA177	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA178	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA179	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA180	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA181	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA185	Bertioga – solo	SWBG-11	
	<u>Chroococcales</u>	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA150	Bertioga – solo	SWBG-11
		<i>Chlorogloea</i> sp. CENA152	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11
<i>Cyanobacterium</i> sp. CENA169		Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
<u>Oscillatoriales</u>	<i>Oxynema</i> sp. CENA135	Ilha do Cardoso/solo	ASN-III	
<u>Pseudanabaenales</u>	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA134	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA137	Ilha do Cardoso/ perifiton	SWBG-11	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA144	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA147	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA155	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA156	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA167	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA183	Ilha do Cardoso/solo	SWBG-11	
	<u>Nostocales</u>	<i>Nostoc</i> sp. CENA158	Ilha do Cardoso/solo	ASN-III
<i>Nostoc</i> sp. CENA159		Ilha do Cardoso/solo	ASN-III	
<i>Nostoc</i> sp. CENA160		Ilha do Cardoso/solo	ASN-III	
<i>Nostoc</i> sp. CENA175		Bertioga – solo	SWBG-11	
<i>Microchaete</i> sp. CENA176		Bertioga – solo	SWBG-11	
<i>Nostoc</i> sp. CENA184		Ilha do Cardoso/água	MN ₀	
<i>Nostoc</i> sp. CENA186		Ilha do Cardoso/solo	MN ₀	

2.2.2.2 Amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S

A amplificação, por PCR, do fragmento do gene que codifica para o RNAr 16S (aproximadamente 1400 pb) foi realizada utilizando-se o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3') e 1494Rc (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3'), descritos por Neilan et al. (1997). A reação ocorreu em solução contendo tampão para a reação de PCR 1 X – 20 mM Tris HCl, pH 8,4 e 50 mM KCl); 0,1 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies, Brasil); 10 ng de DNA; 0,2 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada – para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, Inglaterra), nas seguintes condições: 94 °C/4 min; 30 ciclos de 94 °C/20 s, 50 °C/30 s, 72 °C/2 min; extensão final a 72 °C/7min. A verificação do tamanho dos fragmentos resultantes da reação de PCR foi feita em gel de agarose, conforme descrito no item 2.2.2.1.

2.2.2.3 Amplificação de fragmentos de genes envolvidos na biossíntese de inibidores de proteases e cianotoxinas

As reações de PCR descritas abaixo ocorreram em solução contendo tampão para a reação de PCR 1 X – 20 mM Tris HCl, pH 8,4 e 50 mM KCl); 0,1 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies, Brasil); 10 ng de DNA; 0,2 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada – para um volume final de 25 µL. Todas as reações foram realizadas em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, Inglaterra). A verificação dos tamanhos dos fragmentos resultantes das reações de PCR foi feita conforme descrito no item 2.2.2.1.

A seleção de linhagens potencialmente produtoras de aeruginosina e/ou cianopeptolina foi realizada visando a amplificação das sequências dos espaços intergênicos *aerA-aerB* e *mcnC_F-mcnC_R*, respectivamente. Para amplificação da região *aerA-aerB*, (aproximadamente 991 pb) foi utilizado o conjunto de iniciadores *aerA* (5'-GATAGCACCCAGAACGGAAGC-3') e *aerB* (5'-GTAAACGGATGGTTAGAGC-3'). Para o espaço intergênico *mcnC-mcnE* (tamanho esperado de 585 pb) foram utilizados os iniciadores *mcnC-F* (5'-TAAGGATAATTTCTTTGAATTGGGAG-3') e *mcnC-R* (5'-AATAATCTCTAAATCAACAGC – 3'), ambos descritos por Cadel-Six e colaboradores

(2008). As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: 95 °C/2 min; 40 ciclos de 95 °C/45 s, 50 °C/45 s, 72 °C/1 min; e extensão final de 72 °C/7 min.

A investigação de linhagens potenciais produtoras de microviridina foi realizada pela amplificação dos genes *mdnA*, *mdnB* e *mdnC*, os quais codificam para peptídeo precursor da molécula e para ATPgrasp-ligases, respectivamente. Os seguintes conjuntos de iniciadores foram usados: *mdnA*-F (5'GAAGGTTTGCAATTTTGTCCA 3') e *mdnA*-R (5'CGCCAACGGGATTAATTTCT 3'), cujo produto tem aproximadamente 300 pb; *mdnB*-F (5' TTGGCTGGTTTTTGGGATAG 3') e *mdnB*-R (5' CGATCGCATTGGAAATAGGT 3'), com produto de cerca de 700 pb; e *mdnC*-F (5'TCACTCGAAATTACCAGAGGAA 3') e *mdnC*-R (5'CGGTGTAATCAAGAAAAGTGCT 3'), que amplifica um produto de 300 pb (ZIEMERT et al., 2010). As reações de amplificação foram realizadas com as seguintes condições: 95 °C/3 min; 30 ciclos de 95 °C/20 s, 60 °C/1 min, 72 °C/2 min; e extensão final de 72 °C/7 min.

O potencial de produção de cilindrospermopsina foi avaliado pela presença do gene *cyrJ*. A reação de PCR foi realizada com o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores Cynsulf-F (5'-ACTTCTCTCCTTTCCCTATC-3') e Cynsulf-R (5'-GAGTGAAAATGCGTAGAACTTG-3'), cujo produto de amplificação tem tamanho esperado de aproximadamente 780 pb. As seguintes condições foram aplicadas: 94 °C/4 min; 30 ciclos de 94 °C/20 s, 54 °C/1 min, 72 °C/2 min; e extensão final de 72 °C/7min (MIHALI et al., 2008).

Para as análises do potencial de produção de saxitoxina, avaliaram-se as presenças dos genes *sxtA* e *sxtI*. O fragmento gênico *sxtA* foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores *sxtA*-F (5'-GGACTCGGCTTGTTGCTTC-3') e *sxtA*-R (5'-CCAGACAGCACGCT TCATAA-3'), descrito por Hoff-Risseti et al. (2013), os quais geram um produto com tamanho esperado de 200 pb. Para amplificação de fragmentos do gene *sxtI* foram utilizados, independentemente, dois conjuntos de iniciadores. O conjunto OCT-F/OCT-R (5'-TGCCGTTTTGTGCTTAGATG-3'/5'-GGACGGAAGGACTCACGATA-3'), cujo produto de amplificação tem aproximadamente 923 pb (HOFF-RISSETI, 2013) e o conjunto Sxt1-F/Sxt1-R (5'-GCTTACTACCACGATAGTGCTGCCG-3'/5'-GGTTCGCCGCGGACATTA-3'), cujo produto de amplificação tem aproximadamente 1669pb (KELLMANN et al., 2008). As reações de amplificação do fragmento do gene *sxtA* foram conduzidas nas seguintes condições: 94 °C/5 min; 35 ciclos de 94 °C/30 s, 60,2 °C/30 s, 72 °C/30 s; e extensão final a 72 °C/7 min. Já as reações de amplificação do fragmento do gene *sxtI* continham tampão para reação PCR 1X (Tris HCl 20mM, pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2

mM de cada dNTP; 3mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 0,4 μmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada para o volume final de 25 μL. Para o conjunto de iniciadores OCT-F/OCT-R foram utilizadas as seguintes condições: 94 °C/5 min; 35 ciclos de 94 °C/30 s, 61 °C/1 min, 72 °C/90 s; e extensão final a 72 °C/7min. No caso do conjunto de iniciadores Sxt1-F/Sxt1-R utilizaram-se as condições: 94 °C/3 min; 30 ciclos de 94 °C/10 s, 55 °C/20 s, 72 °C/1 min; e extensão final a 72 °C/7min.

O potencial genético para produção de microcistina foi investigado pela presença dos genes *mcyD*, *mcyE*, *mcyG*, cujos produtos apresentam, respectivamente, ~818 pb, ~809-812 pb e ~385-560 pb. Para a amplificação de fragmento do gene *mcyD* utilizou-se o conjunto *mcyDF/ mcyDR* (5'-GATCCGATTGAATTAGAAAG-3'/5'-GTATTCCCCAAGATTGCC-3') e para o gene *mcyE* foram usados os iniciadores *mcyEF2/mcyER4* (5'-GAAATTTGTGTAGAAGGTGC-3'/5'-AATTCTAAAGCCCAAAGACG-3'), descritos por RANTALA, et al. (2004). A amplificação de fragmento do gene *mcyG* foi realizada com o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores *mcyGF* (5'-GAAATTGGTGCGGGAAGTGGAG-3') e *mcyGR* (5'-TTTGAGCAACAATGATACTTTGCTG-3'), descritos por FEWER et al. (2007). As reações de amplificação destes três fragmentos gênicos foram realizadas nas mesmas condições: 95 °C/3min; 30 ciclos de 94 °C/30s, 56 °C/30s, 72 °C/1min; e extensão final a 72 °C/10min.

2.2.2.4 Clonagem

A clonagem dos fragmentos obtidos após as reações de PCR foi realizada usando o kit “pGEM[®]-T Easy Vector Systems” (Promega, Madison, WI, EUA). O vetor utilizado foi o pGEM[®]-T, que possui 3.015 pb e é oferecido linearizado com a enzima de restrição EcoR V e com a adição de 3' terminal timidina nas extremidades. Esse vetor contém sítio de resistência a ampicilina, um sítio para múltipla clonagem e um fragmento LacZ. Os procedimentos para a clonagem foram seguidos conforme as instruções do fabricante, disponíveis no Manual de Instrução do “pGEM[®]-T Easy Vector Systems”.

2.2.2.5 Transformação e PCR usando colônias

A introdução do vetor contendo o inserto de interesse nas células competentes de *Escherichia coli* DH5α foi feita por meio de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH;

reação de PCR com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1X como descrito anteriormente e a reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Techne), nas seguintes condições: 94 °C/5 min; 25 ciclos de 95 °C/20 s, 50 °C/15 s, 60 °C/1 min.

2.2.2.6 Extração de DNA plasmidial

As extrações de DNA plasmidial das culturas de *Escherichia coli* DH5 α que continham os insertos de interesse foram realizadas usando o método de hidrólise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). Um volume de 3 mL de cultura foram centrifugados a $5.000 \times g$ por 7 min. O precipitado formado foi ressuspensionado em 100 μL de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM e glicose 50 mM). Em seguida, 200 μL de solução II foram adicionados (NaOH 0,2 M, SDS 1 %) e os volumes foram gentilmente misturados por inversão. Após 5 min de incubação em gelo, foram acrescentados 150 μL de solução III gelada (Acetato de Potássio 3 M e Ácido Fórmico 1,8 M) e novamente misturados por inversão (20 vezes). As amostras foram mantidas no gelo durante 7 min, e posteriormente centrifugadas a $15.000 \times g$ durante 15 min. O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo e precipitado com 270 μL de isopropanol (100 %), a temperatura ambiente. O volume foi então centrifugado a $15.000 \times g$ durante 7 min. O precipitado formado foi lavado com 250 μL de etanol 70 % gelado e centrifugado a $15.000 \times g$ por 2 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a 37 °C. Após secagem, adicionaram-se 30 μL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore) esterilizada e suplementada com 2 μL de RNase (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), seguida da incubação a 37 °C por 30 min. Os DNAs plasmídiais extraídos foram visualizados em gel de agarose e quantificados usando como referência o marcador molecular Low Mass Ladder (item 2.2.2.1).

2.2.2.7 Sequenciamento

A PCR para o sequenciamento foi realizada com o uso do kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, EUA). Nesta reação foram utilizados 1 μL de BigDye, tampão de reação 1 X (fornecido com o kit), 200 ng de DNA plasmidial e 5 μM do oligonucleotídeo iniciador, num volume final de 10 μL . No caso do sequenciamento de fragmentos do RNAr 16S, foram utilizados iniciadores externos: M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3') e M13R (5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'), além dos internos: 357F (5'-

CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), 357R (5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3'), 704F (5'-GTAGSGGTGAAATSCGTAGA-3'), 704R (5'-TCTACGSATTTACCSCTAC-3'), 1114F (5'-GCAACGAGCGMRACCC-3') e 1114R (5'-GGGTYKCGCTCGTTGC-3'), descritos por LANE (1991). As condições de amplificação foram: 95 °C por 1 min; 35 ciclos de 95 °C/15 s, 50 °C/15 s e 60 °C/2 min. Para os demais fragmentos, apenas os iniciadores M13F e M13R foram usados.

Após a PCR de sequenciamento, as amostras foram precipitadas com a adição de 25 mM de EDTA pH 8 e 60 µL de etanol absoluto em centrifugação refrigerada. O pélete foi lavado com etanol 70 % e centrifugação refrigerada. As amostras foram, por fim, secas no escuro, à temperatura ambiente, por um período de 12 a 16 h. Antes de serem inseridas no sequenciador, as amostras foram ressuspensas em formamida Hi-Di (Applied Biosystems/Life Technologies). Os sequenciamentos foram realizados em equipamento 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Life Technologies), da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), no laboratório do Dr. Ricardo Della Coletta ou na EMBRAPA (Meio Ambiente), de Jaguariúna, no laboratório coordenado pelo Dr. Itamar S. Melo.

2.2.2.8 Processamento e análise filogenética das sequências

As sequências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) e assentadas em *contigs* por meio do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) em sistema operacional Linux. Posteriormente, essas sequências foram comparadas com outras sequências previamente depositadas no *GenBank*, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). Para a construção da árvore filogenética, pelo método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood), as sequências obtidas e outras selecionadas de bancos de dados públicos, foram alinhadas e editadas usando o pacote de programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

2.2.3 Análises Químicas

2.2.3.1 Produção de biomassa

A biomassa foi produzida a partir de culturas-estoque de linhagens de cianobactérias mantidas na Coleção de Culturas de Cianobactérias do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP), conforme condições descritas no item 2.2.1. Após 21-30 dias de cultivo, a biomassa produzida em frascos de 125 mL, contendo 50 mL de meio foi concentrada por centrifugação, a $9.000 \times g$ por 5-7 min, à temperatura ambiente. O precipitado foi lavado pela adição de 20 mL água ultrapura esterilizada seguida de homogeneização em *vortex* e centrifugação. Ao final do procedimento, a biomassa resultante foi dividida e inoculada em dois frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL de volume, contendo 300 mL de meio apropriado. Após essa etapa, as linhagens foram mantidas em câmara de crescimento (condições descritas no item 2.2.1), por um período de 21-30 dias.

A biomassa resultante foi novamente centrifugada e lavada, sendo utilizada para inoculação de seis novos frascos, como descrito acima. O número de repiques e o volume final de meio utilizado foi determinado individualmente para cada linhagem. Para tal, levou-se em consideração a quantidade de biomassa necessária para os experimentos subsequentes, bem como a capacidade de produção de cada linhagem. Ao final, a biomassa foi recuperada por centrifugação ($9.000 \times g$ por 5-7 min, a temperatura ambiente), congelada por 24 h a -180°C , liofilizada e armazenada a -20°C até futuras análises. O processo de liofilização foi realizado em equipamento modelo SNL216V (Thermo Electron Corporation, EUA), operando à temperatura de -52°C e pressão na câmara de vácuo de 10 mbar.

2.2.3.2 Obtenção de extratos e análises para aeruginosina, cianopeptolina e microcistina

Os extratos para as análises de aeruginosina, cianopeptolina e microcistina foram obtidos a partir da biomassa recuperada de 300 mL de cultura. As células coletadas após centrifugação e liofilização (item 2.2.3.1) foram submetidas a rompimento mecânico, utilizando-se pérolas de vidro (ϕ 3 mm) e metanol 100 %. Essa suspensão foi agitada em *vortex* por 2 min, sendo em seguida centrifugada a $9.000 \times g$ por 5 min, à 4°C . O sobrenadante foi coletado, evaporado à 40°C e o extrato mantido a -20°C (SILVA-STENICO et al., 2011). Os extratos secos foram ressuspensos em 1 mL de metanol 100 % e filtrados (Sistema Millipore, ϕ 0,22 μm). As análises foram realizadas em sistema de

Cromatografia Líquida acoplado a Espectrômetro de Massas (Agilent 6410 Triple Quadrupole LC-MS equipado com Agilent 1200 Series Binary Pump SL e Agilent 1200 Autosampler) (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA, USA), sendo que a busca por íons moleculares se deu em uma faixa de 100 a 1.800 Da (SILVA-STENICO et al., 2011).

2.2.3.3 Obtenção de extratos brutos e frações orgânicas

Os experimentos químicos descritos neste item foram realizados nos Laboratórios de Química Orgânica do Ambiente Marinho e de Química Orgânica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, câmpus de Ribeirão Preto, coordenados pela Professora Dra. Hosana Maria Debonsi.

A biomassa obtida como descrito no item 2.2.3.1 foi pesada posteriormente ao processo de liofilização. No caso das linhagens *Oxynema* CENA135 e *Nostoc* sp. CENA175, a massa obtida incluía a biomassa e a massa dos sais utilizados no preparo do meio de cultivo e, portanto, o peso final da biomassa foi calculado subtraindo-se a massa de sal utilizado.

A biomassa de cada linhagem foi submetida à extração utilizando-se 300 mL de uma mistura de solventes orgânicos, diclorometano e metanol (DCM:MeOH), na proporção 2:1. A extração foi realizada por três vezes e os volumes obtidos foram reunidos. O extrato final foi filtrado em papel de filtro seguido de concentração em evaporador rotativo (Tecnal, modelo TE-211), com pressão reduzida e temperatura máxima de 35 °C. O volume de extrato resultante foi transferido para um frasco limpo, mantido a temperatura ambiente e submetido a jato de ar comprimido, até evaporação completa ou redução do volume de extrato. Nos casos em que houve a evaporação completa e obtenção de extratos brutos secos, as massas foram registradas.

O fracionamento dos extratos brutos foi realizado por Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV), em uma coluna de separação composta de sílica HR extra pura e empacotada com o solvente hexano, sendo esse sistema acoplado à bomba de filtração a vácuo. Aos extratos não secos dos isolados *Oxynema* sp. CENA135, *Cyanobium* sp. CENA157 e *Nostoc* sp. CENA175 foram adicionados 2 gramas de sílica gel 60 (70-230 mesh), sendo o material resultante disposto na parte superior da coluna de separação (Figura 5).

Os extratos foram fracionados, com o uso de solventes específicos ou misturas de solventes orgânicos (200 mL de cada), conforme Tabela 2. Ao total, nove frações foram obtidas para cada linhagem de cianobactérias. Os solventes orgânicos empregados nos processos de obtenção de extratos e frações foram de grau técnico (purificados por destilação

fracionada antes de serem utilizados) e de grau analítico (JT Baker, Quimis e F. Maia). As frações obtidas foram concentradas à pressão reduzida em evaporador rotativo, e a temperatura máxima de 40 °C (Tecnal, modelo TE-211).

O volume resultante foi transferido para um frasco limpo, mantido a temperatura ambiente e submetido a jato de ar comprimido, até evaporação completa (GUTIÉRREZ et al., 2012).

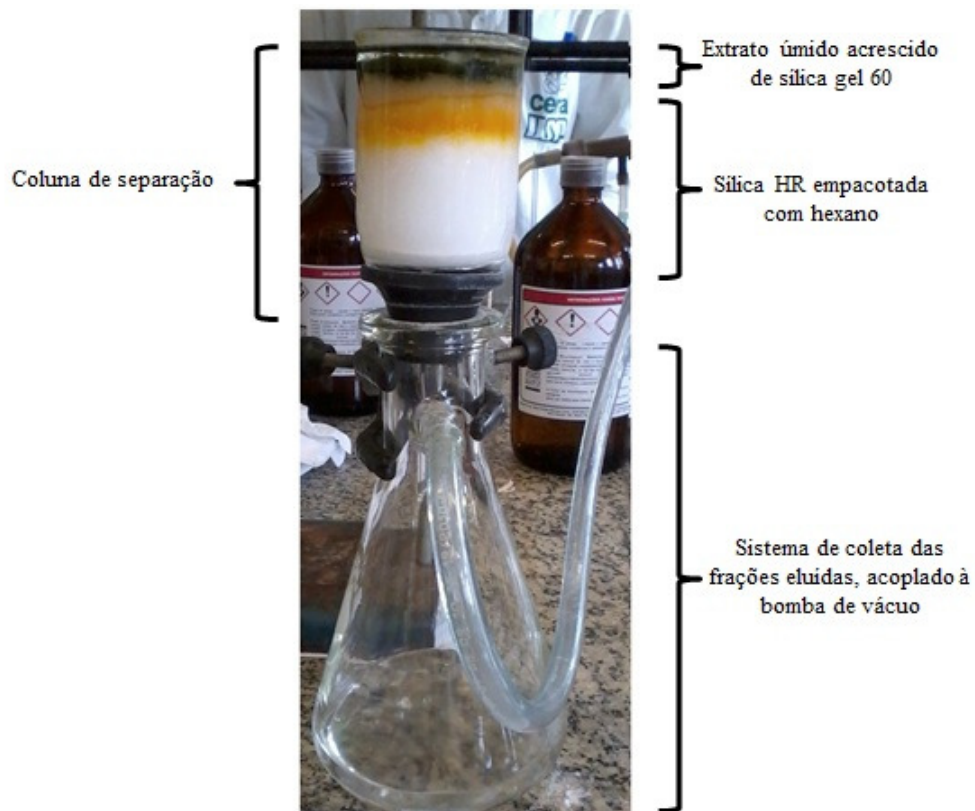


Figura 5 - Coluna de separação acoplada a sistema de filtração à vácuo, utilizada na Cromatografia Líquida à vácuo (CLV)

Tabela 2 - Solventes e misturas de solventes orgânicos utilizados no fracionamento do extrato bruto obtido de linhagens de cianobactérias

Fração	Solvente ou mistura de solventes orgânicos	Proporção (v/v)	Volume eluído
1	Hexano	100	200 mL
2	Hexano:Acetato de Etila	90:10	200 mL
3	Hexano:Acetato de Etila	80:20	200 mL
4	Hexano:Acetato de Etila	60:40	200 mL
5	Hexano:Acetato de Etila	40:60	200 mL
6	Hexano:Acetato de Etila	20:80	200 mL
7	Acetato de Etila	100	200 mL
8	Metanol:Acetato de Etila	25:75	200 mL
9	Metanol	100	200 mL

2.2.3.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As placas cromatográficas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 (GF₂₅₄ – Merck), em água destilada na proporção de 1:2 (p/v), sobre placas de vidro de 5x20 cm, obtendo-se camadas de 0,25 mm de espessura. Os extratos e frações foram solubilizados em diclorometano (DCM) e quando necessário, para as amostras mais polares (frações finais 8 e 9), foi usado metanol (MeOH), na proporção 3:1 (DCM:MeOH). As fases móveis para eluição foram acetato de etila e hexano:acetato de etila, nas proporções 8:2 ou 1:1. Os reveladores utilizados nas análises por cromatografia em camada delgada foram: irradiação UV nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, nebulização com cloro-iodoplatinado, seguida de aquecimento da cromatoplaça a 100 °C por cinco minutos; e câmara saturada com iodo ressublimado. A luz UV é um revelador universal, revelando qualquer tipo de substância, quando utilizadas placas com indicador de fluorescência (fluoresceína). Esse revelador foi empregado para indicar o grau de pureza da amostra, permitindo analisar quantas substâncias estariam presentes, e auxiliar no processo de isolamento das mesmas. As placas de CCD usadas estavam impregnadas com fluoresceína, emitindo fluorescência verde quando expostas a luz UV (254 nm). No entanto, quando visualizadas, as “substâncias” presentes na amostra apareceram como manchas escuras, pois encobrem a fluoresceína. O iodo ressublimado revela a presença de substâncias com duplas ligações e/ou anéis aromáticos; e iodo platinado é específico para compostos orgânicos nitrogenados.

2.2.3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

As amostras analisadas por LC-MS foram ressuspendidas em volume de acetonitrila suficiente para que se obtivesse uma concentração final de 1 mg de extrato bruto ou fração por 1 mL de solvente. As análises realizadas em HPLC-DAD foram feitas em cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo SCL-10A, com detector de arranjo de diodos modelo SDP-M10A, em sistema binário, utilizando solventes grau HPLC, da marca JT Baker e água deionizada obtida do purificador Millipore Sist-Direct-Q5, filtro 0,22 µm. As análises realizadas em LC-MS foram feitas em cromatógrafo (UPLC utilizado como HPLC) da marca Shimadzu (UFLC), modelo SPD-M20A, acoplado a espectrômetro de massas da marca Bruker, modelo micrOTOF II com fonte de ionização em elétron-spray (ESI), com analisador do tipo tempo de voo (TOF), com os seguintes parâmetros fixos: End Plate Offset: -500V;

Capilar: +4500V; Nebulizador: 4,5 Bar; Gás de secagem (N): 6,0 l/min; Temperatura de secagem: 220 C; Transferência na saída do capilar: -70,0 V; Faixa de Massa: 0-1200 m/z ; Calibrante: NaTFA.

2.2.3.6 Análise espectroscópica (Ressonância Magnética Nuclear – RMN ^1H e RMN ^{13}C)

As análises de RMN foram realizadas em equipamento da marca Varian DRX 500, operando em 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , localizado no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, UNESP, câmpus de Araraquara-SP. Além deste equipamento, algumas análises foram realizadas em equipamento da marca Bruker, operando em 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , localizado na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, USP, câmpus de Ribeirão Preto. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) (Sigma-Aldrich), acondicionadas em tubos de vidros da marca Kontes, sendo o tetrametilsilano (TMS) utilizado como padrão interno.

2.2.3.7 Banco de dados MarInLit

O MarInLit (MARINLIT, 2012) é um banco de dados que reúne informações sobre aproximadamente 5.220 substâncias naturais produzidas por organismos marinhos. Esse banco foi desenvolvido e é mantido pela *University of Canterbury*, Nova Zelândia. Com este programa é possível acessar informações sobre estrutura química, espectros de ressonância, bibliografia atualizada, tendo como bases para as buscas, por exemplo, dados de LC-MS.

Os valores de m/z de possíveis substâncias, obtidos a partir dos espectros de LC-MS dos extratos e frações foram confrontados com os disponíveis nesse banco de dados. Nessa etapa foram inicialmente selecionados para análise, picos nos quais foi possível a observação de uma mesma substância protonada (M+H) e “sodiada” (M+Na), quando do uso do espectrômetro de massas em módulo positivo. Um exemplo é apresentado na Figura 6. Dessa forma, foram realizadas buscas por substâncias produzidas por organismos do Filo Cyanobacteria, em uma faixa de massas variando em +/- 1 Da, da massa encontrada no cromatograma. Como retorno dessa busca, eram apresentadas substâncias e suas massas correspondentes, suas estruturas, artigos de referência, além de dados espectrométricos (Figura 7), que foram comparados aos dados obtidos neste trabalho.

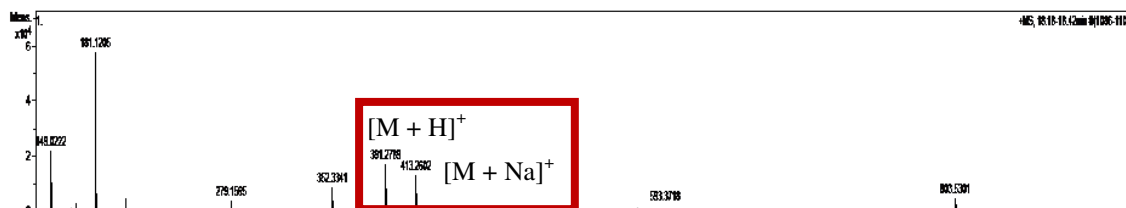
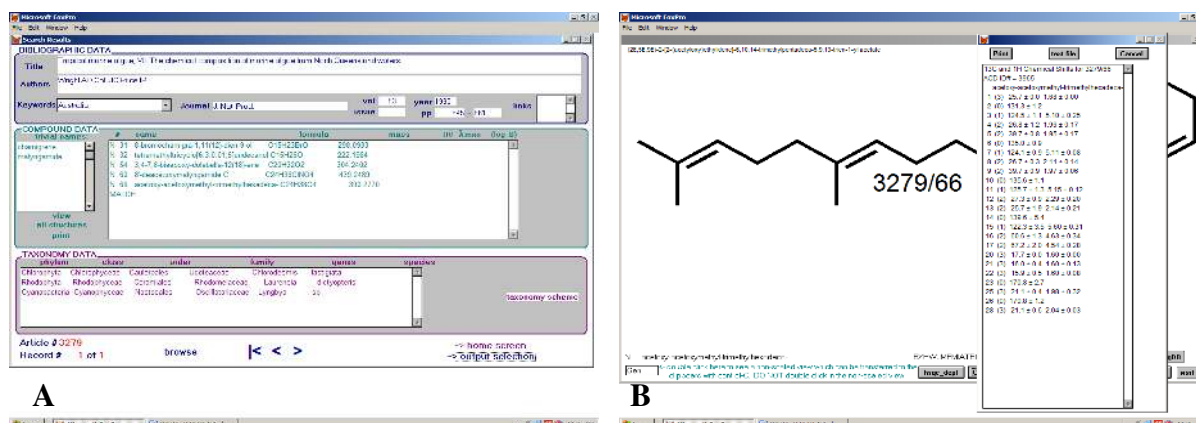


Figura 6 - Exemplo de espectro de massas da fração 2 da linhagem *Oxytyma* sp. CENA135, obtido via LC-MS, em módulo positivo (18,18 – 18,42 min)



transferidos para frascos limpos e mantidos em estufa a 40 °C até evaporação completa. Em seguida os extratos foram pesados e mantidos a -20 °C até o momento dos ensaios de bioatividade (SILVA-STENICO et al., 2011).

O extrato intracelular foi obtido a partir das células coletadas por centrifugação, as quais foram submetidas a rompimento mecânico, adicionando-se ao precipitado pérolas de vidro (ϕ 3 mm) e metanol 100 %. Essa suspensão foi agitada em *vortex* por 2 min, sendo em seguida centrifugada a $9.000 \times g$ por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante resultante foi coletado, evaporado a 45 °C, sendo o pesado e extrato mantido a -20 °C até o momento dos ensaios de bioatividade (SILVA-STENICO et al., 2011).

Desta forma, ao final, foram obtidos três extratos de cada linhagem, um intracelular metanólico e dois extracelulares, sendo um de DCM e outro de etanol.

2.2.4.2 Ensaios antimicrobianos

As bactérias patogênicas utilizadas foram *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus pasteurii*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Serratia indica*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, e uma levedura do gênero *Candida*. Estas linhagens foram obtidas por Silva-Stenico et al. (2011)

Os extratos metanólicos obtidos conforme descrito no item 2.2.4.1 foram diluídos em água, para uma concentração final de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e utilizados para os ensaios. Para estes experimentos utilizaram-se placas de 96 poços, nos quais foram inoculados 200 μL de uma suspensão bacteriana em meio LB ou de uma suspensão de leveduras em meio YPD, adicionados de 20 μL do extrato diluído. Os controles negativos continham o mesmo volume de suspensão bacteriana, sem adição dos extratos. Aos poços correspondentes aos controles negativos foi adicionada água ultrapura esterilizada em volume correspondente ao de extratos. As placas foram incubadas a 28 ou 37 °C e o crescimento microbiano foi determinado por densidade óptica ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$), nos tempos 0, 4, 8 e 17 h após inoculação. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

2.2.4.3 Ensaios com linhagens de células tumorais

Para os ensaios com linhagens de células tumorais foram testados os extratos de diclorometano (DCM) e etanólico obtidos do sobrenadante de cultura das linhagens *Oxynema* sp. CENA135, *Cyanobium* sp. CENA136, *Cyanobium* sp. CENA142, *Cyanobium* sp.

CENA154, *Nostoc* sp. CENA159, *Nostoc* sp. CENA160, *Synechococcus* sp. CENA170 e *Synechococcus* sp. CENA174. Os ensaios foram realizados com células tumorais das linhagens 3LL (células de tumor de pulmão murino) e CT-26 (células de tumor de cólon murino).

Linhagens celulares derivadas de câncer de cólon (CT-26) e carcinoma de pulmão (3LL) foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de FBS, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 0,1 mM de uma solução de aminoácidos não essenciais, 10 mM de HEPES e 0,1 mg·mL⁻¹ de gentamicina, e mantidas a 37 °C, em atmosfera de 5 % de CO₂.

A concentração citotóxica de cada extrato foi determinada com o uso do ensaio de citotoxicidade MTT (com modificações). Para tal ensaio, as células tumorais (2×10^4 células·mL⁻¹) foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano (100 µl·poço⁻¹), durante 24 h. Após a adesão das células à superfície dos poços, elas foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos, 0,8; 4,0; 20 e 100 µg·mL⁻¹, por 24 h. Em seguida, as placas foram centrifugadas e 100 µl de sobrenadante em cada poço foi substituído por 100 µl de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT, Sigma), em concentração de 1 mg·mL⁻¹. As células foram então cultivadas por 2 h, o sobrenadante foi novamente removido e 100 µl de DMSO foram adicionados a cada poço, para dissolver possíveis cristais de formazan formados nas células vivas. As placas foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm e os valores de densidade óptica obtidos foram comparados com os obtidos para culturas controle. Os controles correspondem a lises espontâneas ocorridas em culturas de linhagens de células tumorais cultivadas apenas com meio de cultura.

Adicionalmente, o efeito dos extratos sobre células proliferativas normais foi analisado em culturas de linfócitos humanos. Células mononucleares extraídas de sangue de doadores saudáveis foram enriquecidas por centrifugação para uma suspensão celular final de 2×10^6 células·mL⁻¹. A proliferação de linfócitos T foi induzida pela adição de concanavalina A (Con A) (5 µg·mL⁻¹), por 72 h, juntamente com cada extrato. O efeito dos extratos na proliferação celular e a viabilidade celular foram avaliados seguindo o método MTT, mencionado anteriormente. Esses ensaios foram realizados no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, em parceria com os pesquisadores Ramon Kaneno e Fabiana Albani Zambuzi.

Em outro experimento, os extratos de diclorometano (DCM) e etanólico obtidos do sobrenadante de cultura das linhagens *Cyanobium* sp. CENA136, *Synechococcus* sp.

CENA143, *Chlorogloea* sp. CENA152, *Leptolyngbya* sp. CENA155, *Leptolyngbya* sp. CENA156 e *Nostoc* sp. CENA158 foram analisados quanto ao potencial de inibição de três linhagens de células tumorais: glioma (U251), câncer de mama (MCF-7) e câncer de pulmão – *non small cells* – (NCI-H460).

As células tumorais em estoque foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCOR BRL) suplementado com 5 % de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina. Em uma placa de 96 poços, 100 µl de células foram depositadas em cada poço, as quais foram expostas à DMSO/meio RPMI nas concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 ng·ml⁻¹ e incubadas a 37 °C, em atmosfera com 5 % de CO₂, durante 48 h. Em seguida, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 50 % e a proliferação das células determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm). O composto Doxorubicina foi utilizado com controle positivo da inibição das células tumorais (Cunha et al., 2013). Esses ensaios foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/Unicamp), em parceria com os pesquisadores João Ernesto de Carvalho e Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Sequenciamento e análise filogenética do gene que codifica para o rRNA 16S de linhagens unicelulares

Sete sequências do gene que codifica para o rRNA 16S foram obtidas (1409 – 1410 pb), sendo que a comparação entre estas sequências e outras disponíveis no *GenBank* mostrou valores de identidade que variaram de 97,3 a 99,3 % (Tabela 3). Estes altos valores de identidade foram obtidos com sequências de três linhagens do gênero *Cyanobium* e duas do gênero *Synechococcus*, os quais são amplamente encontrados em ambiente aquáticos e de influência marinha (HERDMAN et al., 2001). Considerando as linhagens das quais estas sequências foram obtidas, com exceção da linhagem *Synechococcus* sp. 2LT05S01, isolada do lago Trasimeno, na Itália (MUGNAI et al., 2008), as demais foram isoladas de ambientes de água salgada. As linhagens *Cyanobium* sp. Y0011, *Synechococcus* sp. PCC7920 e *Cyanobium* sp. PCC7001 foram isoladas de ambiente marinho e a linhagem *Synechococcus* sp. MLCB, de um lago hipersalino (Mono Lake), nos Estados Unidos (ROBERTSON; TEZUKA; WATANABE, 2001; ERNST et al., 2003; BUDINOFF; HOLLIBAUGH, 2007).

Tabela 3 - Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S geradas neste estudo e sequências^a depositadas no GenBank

Código	Tamanho (pb)	Organismo mais próximo no <i>GenBank</i> (nº de acesso)	C* (%)	I** (%)
CENA142	1409	<i>Cyanobium</i> sp. Y0011 (AY183114)	100	98,7
		<i>Synechococcus</i> sp. PCC7920 (AF216948)	99	98,7
CENA145	1409	<i>Cyanobium</i> sp. PCC7001 (AF216948)	100	98,8
		<i>Synechococcus</i> sp. 2LT05S01 (FM177502)	100	98,0
CENA146	1409	<i>Cyanobium</i> sp. PCC7001(AB015058)	100	99,3
		<i>Synechococcus</i> sp. 2LT05S01 (FM177502)	100	98,5
CENA154	1410	<i>Cyanobium</i> sp. PCC7001(AB015058)	100	99,2
		<i>Synechococcus</i> sp. 2LT05S01 (FM177502)	100	98,4
CENA157	1410	<i>Cyanobium</i> sp. PCC7001(AB015058)	100	99,4
		<i>Synechococcus</i> sp. 2LT05S01 (FM177502)	100	98,2
CENA168	1409	<i>Cyanobium</i> sp. Y0011 (AY183114.1)	100	98,7
		<i>Synechococcus</i> sp. PCC7920 (AF216948)	99	98,7
CENA171	1410	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7920 (AF216948)	99	97,4
		<i>Synechococcus</i> sp. MLCB (EF630354)	99	97,3

^aSequências publicadas e obtidas de linhagens cultiváveis, *Cobertura, ** Identidade

Morfológicamente, estes dois gêneros são relativamente similares, apresentando células em formas esféricas ou de bastão, coloração verde azulada e tilacóides com arranjo parietal. No entanto, diferem nas dimensões celulares, sendo que membros do gênero *Cyanobium* têm entre 0,8 – 1,4 µm, enquanto linhagens de *Synechococcus* apresentam de 0,6 – 2,1 µm (HERDMAN et al., 2001; KOMÁREK; HAUER, 2013). Além disso, há diferenças nas porcentagens de conteúdo G+C e no posicionamento filogenético (HERDMAN et al., 2001). O gênero *Synechococcus* está descrito no Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey, com as mesmas características usadas por Nägeli (1849) na descrição botânica. O gênero *Cyanobium* foi descrito em 1983, por Rippka e Cohen-Bazire, a partir de linhagens inicialmente descritas como *Synechococcus*, e que divergiam deste gênero em termos morfológicos e em porcentagem de conteúdo G+C. Adicionalmente, a separação entre estes dois gêneros tem sido amplamente suportada por dados moleculares (HERDMAN et al., 2001; KOMÁREK, 2010).

De maneira geral, as cianobactérias unicelulares com células levemente alongadas e que não apresentam formação de colônias vêm sendo classificadas como pertencentes ao gênero *Synechococcus* (KOMÁREK, 2010). No entanto, muitas linhagens têm tido seu RNAr 16S sequenciado e, filogeneticamente, vários grupos têm sido separados e/ou propostos como

novas entidades genéricas, mesmo quando a identidade entre as sequências é superior a 95 % (HERDMAN et al., 2001; KOMÁREK, 2010).

Segundo Herdman e colaboradores (2001), considerando-se dados morfológicos, fisiológicos e moleculares, o gênero *Synechococcus* deve ser dividido em cinco grupos, os quais são bem suportados filogeneticamente e, portanto, equivaleriam a novos gêneros. O grupo 1, o qual é subdividido em 1.1 (linhagem de referência: *Synechococcus* sp. PCC6301) e 1.2 (linhagem de referência: *Synechococcus* sp. PCC6312), engloba linhagens com diâmetro celular variando de 1 – 1,5 µm, não sintetizadoras de ficoeritrina C e com baixa tolerância a sal, sendo incapazes de crescer em meio salino. Este grupo deve ser considerado como o verdadeiro gênero *Synechococcus*, uma vez que abriga a linhagem PCC6301. Esta linhagem é tida por vários autores como representante de *S. elongatus* Nägeli (1849), a espécie-tipo do gênero *Synechococcus*, de acordo com o Código de Nomenclatura Botânica (KOMÁREK; KOPECKÝ, CEPÁK, 1999). Desta forma, Herdman et al. (2001) sugerem que essa linhagem seja considerada o neótipo e, conseqüentemente, deve ser considerada como linhagem de referência em estudos filogenéticos.

As linhagens do grupo 2 compartilham características morfológicas com as do grupo 1, mas distinguem-se por serem capazes de crescer em temperaturas acima de 53 °C, sendo *Synechococcus* sp. PCC6715, a linhagem de referência. O grupo 3 (linhagem de referência: *Synechococcus* sp. PCC7003) é formado por linhagens capazes de crescer em meios marinhos e de água doce e que podem chegar a 2 µm de diâmetro. O grupo 4 é exclusivamente formado por linhagens marinhas e que requerem altas concentrações de Na⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ para o seu crescimento, sendo que a linhagem de referência, *Synechococcus* sp. PCC7335. O grupo 5 agrega linhagens de origem marinha, sendo subdividido em 5.1, o qual contém linhagens isoladas de áreas costeiras e de mar aberto (linhagem de referência: *Synechococcus* sp. WH8103) e 5.2, formado por linhagens obrigatoriamente isoladas de ambiente costeiro (linhagem de referência: *Synechococcus* sp. WH5701) (HERDMAN et al., 2001).

Adicionalmente a estas divisões propostas, alguns gêneros descritos a partir de linhagens identificadas inicialmente como *Synechococcus* já são formalmente validados, tanto no Código de Nomenclatura Botânico quanto no Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey. O gênero *Cyanobacterium*, cuja linhagem de referência é *C. stanieri* PCC7202, possui células como diâmetros de 1,7 – 2,3 µm, que se dividem em um plano por fissão binária, possuindo tilacóides paralelos localizados no centro da célula. Este gênero diferencia-se de *Synechococcus* por apresentar diâmetro geralmente maior, tilacóides com arranjo diferente e relação filogeneticamente distinta (HERDMAN et al., 2001). O gênero *Cyanobium*

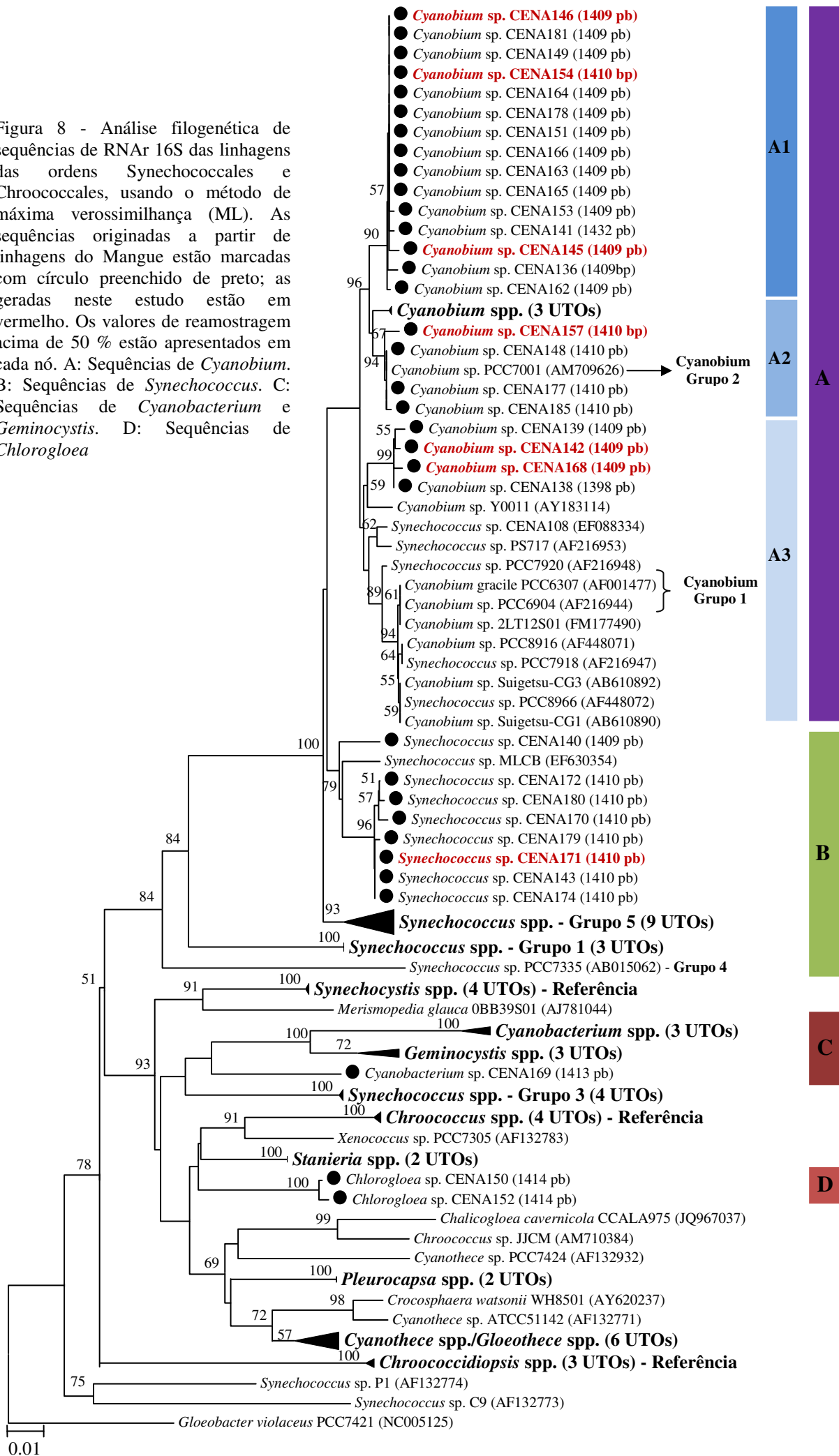
caracteriza-se por possuir células com diâmetro de 0,8 – 1,4 µm, tilacóides periféricos e posição filogenética não relacionada à *Synechococcus*. As linhagens pertencentes a este gênero são divididas em dois grupos, de acordo com a tolerância a sal. O grupo 1 (linhagem de referência: *Cyanobium gracile* PCC6307) é formado por linhagens isoladas de água doce ou salobra, mas incapazes de se desenvolverem em meio contendo água do mar; e o grupo 2 possui linhagens que toleram altas e concentrações de sal (linhagem de referência é a PCC7001) (HERDMAN et al., 2001).

O gênero *Cyanothece*, cuja espécie-tipo é *C. aeruginosa*, foi descrito por Komárek (1976) e engloba linhagens unicelulares com diâmetro de 7 – 16 µm. Esse nome genérico também é usado por bacteriologistas (*Cyanothece sensu* Rippka & Cohen-Bazire, 1983) para designar espécies com diâmetros ≥ 3 µm e que não são capazes de formar bainhas estruturadas, diferenciando-as dos gêneros *Gloeothece* e *Gloeobacter* (HERDMAN et al., 2001). De acordo com o sistema bacteriológico, este gênero deve ser subdividido em três grupos: linhagens isoladas de água doce com baixa tolerância a sal e com diâmetro de 4 – 6 µm (grupo 1, linhagem de referência PCC7424); linhagens isoladas de água doce e com diâmetro celular de 3 – 4 µm (grupo 2, linhagem de referência PCC7425); e linhagens isoladas de campos de salinas, que são capazes de crescer em meio marinho e que toleram até 20 % de NaCl (grupo 3, linhagem de referência PCC7418). No entanto, há algum tempo, este gênero já se apresenta carente de revisão, pois segundo Garcia-Pichel, Nübel e Muyzer (1998), o grupo 3 deve ser considerado um gênero a parte, denominado *Halothece*. Tal constatação é reforçada por Komárek (2010), indicando que o gênero *Cyanothece* em seu sentido bacteriológico (*sensu* RIPPKA; COHEN-BAZIRE, 1983) é muito abrangente e não equivale à descrição do gênero e da espécie-tipo, *C. aeruginosa*. Desta forma, segundo KOMÁREK (2010), em estudos taxonômicos baseados em filogenia do gene rRNA 16S, deve-se considerar a linhagem *Cyanothece* sp. ATCC51142 como referência. Afora esses grupos e gêneros, Fuller et al. (2003) observaram que sequências de algumas linhagens de *Synechococcus* isoladas do Mar Vermelho agrupam-se entre si, sem apresentar filiação à nenhum grupo conhecido. O mesmo estudo indica ainda que as linhagens de *Synechococcus* de origem marinha, incluídas nos grupos 5.1 e 5.2 relacionam-se mais aos grupos de *Cyanobium* de origem marinha (grupo 2) do que aos demais grupos de *Synechococcus*.

As sete novas sequências do gene que codifica para o RNAr 16S geradas neste trabalho, outras vinte e sete obtidas por SILVA (2010) e sequências relacionadas disponíveis no NCBI foram utilizadas para construção da árvore filogenética apresentada na Figura 8. As sequências apresentadas por Silva (2010) também foram obtidas de linhagens de

cianobactérias unicelulares isoladas de ambiente de mangue do estado de São Paulo. Destas sequências, três se destacaram por apresentarem identidade menor do que 95 % com sequências de gêneros descritos, *Chlorogloea* sp. CENA150, *Chlorogloea* sp. CENA152 e a linhagem CENA169. Estas porcentagens estão abaixo do limite estabelecido para separação entre gêneros dentro do grupo de cianobactérias e outros grupos bacterianos (WAYNE et al., 1987; STACKEBRAND; GOEBEL, 1994; KOMÁREK, 2010), indicando a emergência de novas entidades genéricas. No entanto, tem sido recomendado que esse valor não seja o único critério utilizado, devendo ser acompanhado por análises morfológicas, ecológicas, dentre outros, compreendendo uma análise polifásica. (KOMÁREK, 2010). Desta forma, dados morfológicos e filogenéticos, obtidos neste trabalho e nos trabalhos de Genuário (2010) e Silva (2010) foram usados para um melhor posicionamento taxonômico das linhagens em estudo. De acordo com a análise filogenética apresentada na Figura 8, as trinta e quatro sequências de linhagens unicelulares isoladas de ambiente de manguezal estão distribuídas nos clados A, B, C e D.

Figura 8 - Análise filogenética de seqüências de RNAr 16S das linhagens das ordens Synechococcales e Chroococcales, usando o método de máxima verossimilhança (ML). As seqüências originadas a partir de linhagens do Mangue estão marcadas com círculo preenchido de preto; as geradas neste estudo estão em vermelho. Os valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó. A: Seqüências de *Cyanobium*. B: Seqüências de *Synechococcus*. C: Seqüências de *Cyanobacterium* e *Geminocystis*. D: Seqüências de *Chlorogloea*



O clado A reuniu vinte e três sequências de linhagens do mangue, sequências das linhagens de referência para os dois grupos de *Cyanobium* (*C. gracile* PCC 6307 e *Cyanobium* sp. PCC 7001) (HERDMAN et al., 2001; FULLER et al., 2003; KOMARÉK, 2010) e sequências de linhagens identificadas como *Synechococcus* (Figura 8). Este clado foi dividido em três subclados internos, A-1, A-2 e A-3, os quais apresentaram 90, 94 e 62 % de valor de reamostragem (*bootstrap*), respectivamente. No subclado A-1 foram observadas apenas sequências (quinze) das linhagens isoladas de ambiente de mangue. Esse resultado pode indicar o endemismo de certos grupos de cianobactérias, uma vez que não há sequências oriundas de outros ambientes neste subclado.

Em A-2, quatro sequências de linhagens de manguezal agruparam-se com a sequência de *Cyanobium* sp. PCC7001 (referência para o grupo 2 de *Cyanobium*). Esta linhagem foi isolada da costa francesa do mar Mediterrâneo e requer altas concentrações de sal para o seu crescimento. Outras três sequências de linhagens identificadas como *Cyanobium* e, que também estão neste subclado, são provenientes de ambientes marinhos: *Cyanobium* sp. NS01, isolada do Mar do Norte (FULLER et al., 2003), *Cyanobium* sp. LEGE06137 e *Cyanobium* sp. LEGE 07318, isoladas da costa de Portugal (BRITO et al., 2012; LOPES et al, 2012). Dessa forma, o subclado A-2 foi composto exclusivamente por sequências de linhagens do gênero *Cyanobium* isoladas de ambiente marinho.

O subclado A-3 engloba quatro sequências de linhagens isoladas de manguezal, as quais estão relacionadas com a sequência da linhagem de *Cyanobium* sp. Y0011, isolada do Mar Báltico (ERNST et al., 2003). Nesse subclado estão ainda sequências de linhagens de *Cyanobium* do grupo 1 (*C. gracile* PCC6307 e *Cyanobium* sp. PCC8966), *Synechococcus* e de quatro outras linhagens de *Cyanobium*, sendo que duas (*Cyanobium* sp. Suigetsu-CG3 e *Cyanobium* sp. Suigetsu-CG1) foram isoladas de um lago salino no Japão (OHKI et al., 2012).

O clado B (79 % de valor de reamostragem) foi formado por oito sequências de linhagens de *Synechococcus* isoladas de Mangue. Destas, sete estão agrupadas mais proximamente, enquanto que as sequências das linhagens *Synechococcus* sp. MLCB e *Synechococcus* sp. CENA140 estão mais externamente relacionadas. A linhagem *Synechococcus* sp. MLCB foi isolada de um lago alcalino e hipersalino nos Estados Unidos (Monolake, Califórnia,) (BUDINOFF; HOLLIBAUGH, 2007). A sequência da linhagem *Synechococcus* sp. CENA140, embora apresente identidade ≥ 98 % com sequências de gêneros conhecidos (SILVA, 2010), não se agrupou com nenhuma outra sequência, de forma que mais estudos devem ser realizados para esclarecer a classificação dessa linhagem. As

sequências e clados dos grupos de *Synechococcus*, formalmente reconhecidos por Herdman et al. (2001), apresentaram-se distantemente relacionados ao clado B, o qual se relacionou mais proximamente ao clado A, formado por sequências de *Cyanobium* (Figura 8). Esse mesmo padrão foi observado por Fuller et al. (2003), ao descrever que sequências de linhagens de *Synechococcus* isoladas do Mar Vermelho agrupam-se entre si, sem apresentar filiação à nenhum grupo conhecido de *Synechococcus*. Externamente aos clados A e B, está o clado formado por sequências de *Synechococcus* do Grupo 5, o qual engloba linhagens obrigatoriamente marinhas. Mais externamente, encontra-se o clado formado por três sequências de *Synechococcus* do Grupo 1, o qual contém a sequência da linhagem de referência do gênero, *Synechococcus* sp. PCC6301. Estes dados reforçam ainda mais a novidade das sequências de *Synechococcus* apresentadas neste trabalho e no trabalho de Silva (2010), pois, filogeneticamente, são pouco relacionadas aos demais grupos de *Synechococcus*, embora sejam morfológicamente muito semelhantes. Outros dois grupos formados por sequências de *Synechococcus* estão presentes na árvore: a sequência da linhagem PCC7335, representante do Grupo 4 e quatro sequências de representantes do Grupo 3. Estes dois grupos são formados por linhagens marinhas ou eurialinas (HERDMAN et al., 2001), sendo o clado formado por sequências do Grupo 3 mais relacionado a sequências dos gêneros *Cyanobacterium* e *Geminocystis* do que aos grupos conhecidos de *Synechococcus*.

O clado C apresenta sequências dos gêneros *Cyanobacterium* (incluindo a sequência da linhagem de referência, *C. stanieri* PCC7202), *Geminocystis* (estando presente a sequência da linhagem de referência, *G. herdmanii* PCC6308), além da sequência da linhagem CENA169. Morfológicamente, a linhagem CENA169 foi, inicialmente, identificada como *Cyanothece*, caracterizando-se por uma coloração verde amarronzada, células arredondadas ou levemente alongadas (comprimento, 2 – 7 μm ; largura, 4 – 5 μm), as quais se distribuem solitariamente ou frouxamente agregadas em uma mucilagem difluente (GENUÁRIO, 2010). No entanto, esta descrição está de acordo com definição bacteriológica do gênero *Cyanothece* (*sensu* RIPPKA; COHEN-BAZIRE, 1983) e não com a descrição de Komárek (1976). Esta constatação reforça a ideia de que o gênero *Cyanothece* em seu sentido bacteriológico (*sensu* Rippka & Cohen-Bazire, 1983) é muito abrangente e não equivale à descrição do gênero e da espécie-tipo, *C. aeruginosa* (KOMÁREK, 2010). Análises da sequência do RNAr 16S da linhagem CENA169 indicam valores de identidade $\leq 93,0\%$ com sequências de linhagens conhecidas (Tabela 4). O maior valor de identidade obtido foi com a sequência da linhagem *Synechococcus* sp. PCC7002 (92,7 %), sendo que com as sequências das linhagens *Cyanothece* sp. PCC7424 (referência bacteriológica) e *Cyanothece* sp. ATCC51142

(referência botânica) este valor foi de 91,3 e 90,7 %, respectivamente. Além disso, quando se analisa a árvore filogenética (Figura 8), estas duas últimas sequências se encontram distantemente a relacionadas ao clado C. Em estudos filogenéticos conduzidos no decorrer deste trabalho, observou-se que a sequência do RNAr 16S da linhagem CENA169 estava proximamente relacionado ao clado do gênero *Cyanobacterium*, sendo que esta linhagem passou a ser designada como *Cyanobacterium* sp. CENA169. No entanto, apesar desta proximidade filogenética também ser observada na Figura 8, o ramo em que está a sequência da linhagem CENA169 é externo ao clado de *Cyanobacterium*. Este clado, por sua vez, está mais relacionado ao clado de *Geminocystis*, o que já é bem estabelecido (KORELUSOVÁ; KAŠTOVSKY; KOMÁREK, 2009). A linhagem CENA169 tem, ainda, morfologia muito distinta do gênero *Cyanobacterium*, que se caracteriza por diâmetro celular de 1,7 – 2,3 µm e tilacóides organizados paralelamente no centro da célula. Adicionalmente, a sequência desta linhagem compartilha valores de identidade $\leq 90,4$ % com sequências de *Cyanobacterium* e/ou *Geminocystis* (Tabela 4), o que indica que, provavelmente, a linhagem CENA169 deve representar uma nova entidade genérica.

No clado D, sequências de duas linhagens de *Chlorogloea* (CENA150 e CENA152) agruparam-se com valor de reamostragem de 100 %. Esse clado está relacionado com clados contendo sequências de linhagens dos gêneros *Chroococcus*, *Xenococcus* e *Stanieria*. Morfologicamente, as duas linhagens de *Chlorogloea* isoladas de ambiente de manguezal apresentam características em acordo com as descritas por Komárek e Anagnostidis (1999) (GENUÁRIO, 2010). No entanto, não há sequências de linhagens do gênero *Chlorogloea* e nem de linhagens da família Entophysalidaceae, a qual pertence o gênero *Chlorogloea*, o que dificulta a interpretação dos dados obtidos na reconstrução filogenética (Figura 8). No entanto, a proximidade destas duas sequências com outras de linhagens das famílias Chroococcaceae, Xenococcaceae e Dermocarpellaceae é importante, pois, morfologicamente, estas famílias e a família Entophysalidaceae apresentam algumas características em comum (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1999). As linhagens CENA150 e CENA152 foram isoladas de dois manguezais diferentes (GENUÁRIO, 2010) e suas sequências apresentam de identidade 99,5 % entre si. Quando confrontadas com outras sequências obtidas de gêneros conhecidos, os valores de identidade obtidos são $\leq 93,0$ %, sendo que o maior valor foi com a sequência de *Stanieria cyanosphaera* PCC7437, 92,8 % (Tabela 5). Desta forma, o alto valor de reamostragem entre as duas sequências obtidas, associado à baixa identidade com sequências disponíveis no banco de dados e as características morfológicas consistentes com a

descrição original, podem confirmar a que estas linhagens são as únicas representantes do gênero *Chlorogloea* com sequências disponíveis.

Tabela 4 - Matriz de identidade entre as sequências de RNAr 16S de *Cyanobacterium* sp. CENA169 e sequências depositadas no GenBank

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>Cyanobacterium</i> sp. CENA169	-													
2. <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	92,7	-												
3. <i>Synechocystis</i> sp. LEGE 07073	92,6	91,7	-											
4. <i>Pleurocapsa concharum</i> VP4-07	92,5	90,8	91,5	-										
5. <i>Pleurocapsa concharum</i> VP3-02b	92,5	90,8	91,5	100,0	-									
6. <i>Cyanobacterium stanieri</i> PCC7202	89,3	88,4	88,1	86,9	86,9	-								
7. <i>Cyanobacterium</i> sp. PCC8806	89,8	88,8	88,1	87,8	87,8	98,1	-							
8. <i>Cyanobacterium aponinum</i> PCC10605	90,4	90,2	89,9	88,9	88,9	92,7	92,9	-						
9. <i>Cyanobacterium</i> sp. CENA527	89,3	88,6	88,3	87,0	87,0	98,7	98,4	92,9	-					
10. <i>Geminocystis</i> sp. CENA526	89,6	89,9	89,5	88,0	88,0	93,6	93,3	94,9	93,7	-				
11. <i>Geminocystis herdmanii</i> PCC6308	89,9	90,2	89,1	87,7	87,7	93,8	93,4	94,6	93,6	96,3	-			
12. <i>Geminocystis papuanica</i> PAPI	90,0	90,3	89,3	89,3	89,3	92,2	92,9	94,9	92,3	95,3	97,3	-		
13. <i>Cyanothece</i> sp. PCC7424	91,3	89,9	90,9	92,3	92,3	87,4	87,9	89,0	85,6	88,7	88,4	88,4	-	
14. <i>Cyanothece</i> sp. ATCC51142	90,7	91,3	91,9	91,8	91,8	88,1	87,7	88,8	88,5	88,8	88,3	88,2	92,0	-

Tabela 5 - Matriz de identidade entre as sequências de RNAr 16S das linhagens *Chlorogloea* sp. CENA150 e CENA152, e sequências depositadas no GenBank

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>Chlorogloea</i> sp. CENA150	-													
2. <i>Chlorogloea</i> sp. CENA152	99,5	-												
3. <i>Cyanothece</i> sp. SKTU126	92,6	92,5	-											
4. <i>Cyanothece</i> sp. WH8904	92,5	92,3	97,7	-										
5. <i>Gloeotheca</i> sp. KO11DG	92,5	92,3	97,0	97,8	-									
6. <i>Gloeotheca</i> sp. SK40	92,4	92,3	97,5	97,7	98,1	-								
7. <i>Stanieria cyanosphaera</i>	92,3	92,3	92,4	92,9	92,3	92,4	-							
8. <i>Chondrocystis</i> sp. ANT.L59B.1	92,1	92,1	92,7	92,4	92,8	92,7	92,5	-						
9. <i>Gloeotheca</i> sp. PCC6909	92,2	92,0	92,4	92,6	89,8	90,1	91,4	92,2	-					
10. <i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC7437	92,8	92,8	93,1	93,6	93,0	93,1	99,4	93,1	92,1	-				
11. <i>Gloeotheca</i> sp. KO68DGA	92,1	92,0	96,6	97,5	99,2	97,8	91,9	92,5	89,5	92,6	-			
12. <i>Chroococcus</i> sp. 9E-04	92,1	91,9	92,8	92,7	92,7	92,5	91,0	91,1	92,4	91,7	92,5	-		
13. <i>Chroococcus</i> sp. 9E-05	92,1	91,9	92,8	92,7	92,7	92,5	91,0	91,1	92,4	91,7	92,5	100	-	
14. <i>Cyanothece</i> sp. PCC8801	92,0	91,9	96,2	96,2	96,0	96,4	92,7	92,9	92,5	93,4	95,8	92,4	92,4	-

2.3.2 Análise molecular e química de substâncias bioativas

2.3.2.1 Aeruginosina e Cianopeptolina

As cinquenta linhagens em estudo (Tabela 1) foram submetidas a testes de amplificação por PCR do espaço intergênico *aerA-aerB*, das quais dez apresentaram resultados positivos (Tabela 6). Para oito destas linhagens, o fragmento amplificado correspondia ao tamanho esperado (aproximadamente 1.000 pb), enquanto que duas linhagens, *Nodosilinea* sp. CENA144 e *Nostoc* sp. CENA160, apresentaram fragmentos com tamanhos maiores (aproximadamente 2.000 pb). No entanto, a ocorrência de fragmentos com tamanhos maiores do que esperado vem sendo relatada na literatura, como consequência da possível presença do gene *aerJ* nesta região do espaço intergênico *aerA-aerB* (CADEL-SIX et al., 2008). O produto do gene *aerJ* codificaria para uma halogenase, enzima que estaria envolvida na adição de um ou dois átomos de cloro na molécula de aeruginosina, tornando-a mono ou diclorada (CADEL-SIX et al., 2008).

Os produtos de PCR foram sequenciados, mas as sequências obtidas não apresentaram identidade com as sequências da região intergênica *aerA_aerB* disponíveis no NCBI, apresentando identidade com regiões do genoma de *Nostoc* (dados não apresentados). Até o momento, estão disponíveis em bancos de dados públicos sequências da região intergênica *aerA_aerB* de linhagens de *Microcystis*, *Planktothrix* (CADEL-SIX et al., 2008), *Nodularia* (FEWER et al., 2013) e *Radiocystis* (SILVA-STENICO et al., 2012). Por se tratar de uma região intergênica, que apresenta maior variabilidade que regiões codificantes, é possível que as sequências obtidas neste trabalho sejam suficientemente diferentes das já conhecidas, sendo necessário que os próprios genes envolvidos na biossíntese sejam alvo de investigação. Além disso, as regiões do genoma de *Nostoc*, com as quais se observou identidade, podem corresponder aos espaços intergênicos *aerA_aerB*. No entanto, como esta região ainda não foi descrita/anotada neste gênero, dificulta-se a obtenção de conclusões mais robustas. Esse mesmo padrão foi observado para as linhagens *Chroococidiopsis* sp. CENA367 e *Desmonostoc* sp. CENA383, para as quais houve amplificação da região *aerA_aerB*, sendo que as sequências obtidas apresentaram similaridade com regiões não anotadas de genomas de *Nostoc* spp. (ANDREOTE, 2014).

Tabela 6 - Avaliação molecular e química da produção de aeruginosina e cianopeptolina

Ordem	Gênero/Linhagem	Aeruginosina (<i>aerA_aerB</i>)	Aeruginosina (<i>m/z</i>)	Cianopeptolina (<i>mcnC_mcnE</i>)
Synechococcales	<i>Cyanobium</i> sp. CENA136	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA138	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA139	-	-	-
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA140	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA141	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA142	-	-	-
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA143	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA145	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA146	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA148	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA149	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA151	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA153	+	526, 630, 803, 818, 841 e 868	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA154	+	554, 604, 803, 841 e 868	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA157	+	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA162	+	630 e 841	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA163	-	604, 630 e 841	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA164	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA165	-	-	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA166	-	630 e 841	-
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA168	-	-	-
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA170	-	526, 554, 630 e 658	-
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA171	-	-	-
<i>Synechococcus</i> sp. CENA172	-	762, 787, 792, 814 e 1080	-	
<i>Synechococcus</i> sp. CENA174	-	554, 630, 763 e 816	-	
<i>Cyanobium</i> sp. CENA177	-	-	-	
<i>Cyanobium</i> sp. CENA178	-	604 e 630	-	
<i>Synechococcus</i> sp. CENA179	-	-	-	
<i>Synechococcus</i> sp. CENA180	-	-	-	
<i>Cyanobium</i> sp. CENA181	-	-	-	
<i>Cyanobium</i> sp. CENA185	-	-	-	
Chroococcales	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA150	-	-	-
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA152	-	-	-
	<i>Cyanobacterium</i> sp. CENA169	-	-	-
Oscillatoriales	<i>Oxynema</i> sp. CENA135	+	-	+
Pseudanabaenales	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA134	-	-	+
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA137	+	-	+
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA144	+	-	+
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA147	-	-	+
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA155	-	-	+
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA156	-	-	-
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA167	-	-	-
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA183	-	-	-
Nostocales	<i>Nostoc</i> sp. CENA158	-	-	-
	<i>Nostoc</i> sp. CENA159	-	-	+
	<i>Nostoc</i> sp. CENA160	+	-	+
	<i>Nostoc</i> sp. CENA175	+	632	+
	<i>Microchaete</i> sp. CENA176	-	-	-
	<i>Nostoc</i> sp. CENA184	+	-	-
	<i>Nostoc</i> sp. CENA186	-	-	-

-: Resultado negativo nas análises por PCR ou nas análises químicas; +: Resultado positivo nas análises por PCR.

Os extratos metanólicos obtidos das cinquenta linhagens foram analisados por LC-MS, dos quais dez apresentaram resultados positivos, sendo os valores de carga/massa (m/z) apresentados na Tabela 6. Quatro linhagens apresentaram resultados positivos tanto na prospecção molecular quanto na química: *Cyanobium* sp. CENA153, *Cyanobium* sp. CENA154, *Cyanobium* sp. CENA162 e *Nostoc* sp. CENA175. No caso das linhagens *Cyanobium* sp. CENA163, *Cyanobium* sp. CENA166, *Synechococcus* sp. CENA170, *Synechococcus* sp. CENA172, *Synechococcus* sp. CENA174 e *Cyanobium* sp. CENA178 foram obtidos resultados positivos quanto à presença de aeruginosina nos extratos metanólicos, muito embora os testes moleculares tenham apresentado resultados negativos. A produção de aeruginosina tem sido observada e analisada por abordagens químicas em linhagens de diversos gêneros: *Microcystis*, incluindo as espécies *M. aeruginosa* e *M. novacekii* (MURAKAMI et al., 1994; CADEL-SIX et al., 2008; ISHIDA et al., 2009; SILVA-STENICO et al., 2011, 2012, 2013); *Radiocystis fernandoii* e *Geitlerinema splendidum* (SILVA-STENICO et al., 2012); *Nodularia* (FUJII et al., 1997); *Planktothrix* (ERSMARK; DEL VALLE; HANESSIAN, 2008), *Planktothrix rubescens* NIVA-CYA98 (ROUNGE et al., 2007); *Radiocystis* (LOMBARDO et al., 2006); *Sphaerocavum*, *Leptolyngbya*, *Cylindrospermum* e *Fischerella* (SILVA-STENICO et al., 2012).

Desta forma, um total de dezesseis linhagens apresenta potencial para produção de aeruginosina e/ou efetivamente produzem este inibidor de protease, visto que quatro linhagens apresentaram resultados positivos nas duas análises, seis na avaliação por PCR e outras seis por LC-MS. Este trabalho apresenta a primeira descrição do potencial de produção de aeruginosina por linhagens dos gêneros *Cyanobium*, *Nodosilinea*, *Nostoc*, *Oxynema* e *Synechococcus*, demonstrando que linhagens isoladas de ambiente de manguezal são capazes de produzir aeruginosina.

A avaliação molecular por PCR da região gênica *mcnC_mcnE*, indicadora da presença da via de produção de cianopeptolina, resultou em nove resultados positivos (Tabela 6): *Oxynema* sp. CENA135, *Leptolyngbya* sp. CENA134; *Nodosilinea* sp. CENA137; *Nodosilinea* sp. CENA144; *Nodosilinea* sp. CENA147; *Leptolyngbya* sp. CENA155; *Nostoc* sp. CENA159; *Nostoc* sp. CENA160 e *Nostoc* sp. CENA175. Diferentemente do observado nos testes de amplificação de aeruginosina, nenhuma linhagem unicelular (*Synechococcales* ou *Chroococcales*) apresentou resultado positivo na análise da região gênica *mcnC_mcnE*. As análises por LC-MS dos extratos metanólicos não evidenciaram a presença de cianopeptolina. Os produtos de PCR obtidos para as nove linhagens foram sequenciados, no entanto, as sequências obtidas não apresentaram identidade com as sequências correspondentes

disponíveis no NCBI. Neste caso, uma vez que a produção desta substância não foi observada e não houve sucesso nos sequenciamentos, pode-se estar diante de um resultado falso positivo.

Nas análises químicas realizadas por Andreote (2014), duas linhagens produziram um novo congênera de cianopeptolina, identificado como cianopeptolina (Cl-775). No entanto, nenhuma destas duas linhagens foi positiva na amplificação do gene da via biossintética da cianopeptolina. Linhagens de apenas dois gêneros têm sido amplamente descritas como produtoras deste inibidor de protease, *Microcystis* (TOOMING-KLUNDEREED et al., 2007; CADEL-SIX et al., 2008; SILVA-STENICO et al., 2011 e Silva-Stenico et al., 2013) e *Planktothrix* (CADEL-SIX et al., 2008; SOGGE et al., 2013).

2.3.2.2 Microviridina

A prospecção molecular dos genes *mndA*, *mdnB* e *mdnC*, os quais codificam, respectivamente, para o peptídeo precursor da microviridina e para duas ATP-grasp ligases responsáveis pela macrociclização do peptídeo (ZIEMERT et al., 2008), foi realizada via reação de PCR. Fragmentos destes três genes foram amplificados em 22, 21 e 17 linhagens, respectivamente, sendo que os três genes foram amplificados em quinze (Tabela 7). Em todas as reações de amplificação, os produtos obtidos possuíam tamanhos correspondentes aos esperados. Linhagens pertencentes aos gêneros *Cyanobium*, *Synechococcus*, *Cyanobacterium*, *Nodosilinea* e *Nostoc* distribuídas nas cinco ordens em estudo apresentaram resultados positivo de amplificação.

Para as quinze linhagens nas quais foram obtidas amplificações dos três genes avaliados, tais fragmentos foram submetidos à reação de sequenciamento. Em todos os casos houve sucesso nas reações de sequenciamento, sendo as árvores filogenéticas correspondentes à cada gene apresentadas na Figuras 9, 10 e 11.

Tabela 7 - Avaliação molecular da presença dos genes *mdnA*, *mdnB* e *mdnC*, envolvidos na produção de microviridina

Ordem	Gênero/Linhagem	<i>mdnA</i>	<i>mdnB</i>	<i>mdnC</i>	
Synechococcales	<i>Cyanobium</i> sp. CENA136	+	+	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA138	-	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA139	-	+	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA140	-	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA141	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA142	-	+	+	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA143	+	+	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA145	-	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA146	-	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA148	+	+	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA149	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA151	+	+	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA153	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA154	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA157	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA162	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA163	+	+	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA164	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA165	+	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA166	+	+	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA168	+	+	+	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA170	-	-	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA171	-	-	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA172	-	-	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA174	+	+	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA177	+	-	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA178	-	-	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA179	+	+	+	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA180	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA181	+	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA185	-	-	-	
	Chroococcales	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA150	-	-	-
		<i>Chlorogloea</i> sp. CENA152	-	-	-
<i>Cyanobacterium</i> sp. CENA169		+	+	+	
Oscillatoriales	<i>Oxynema</i> sp. CENA135	+	-	-	
Pseudanabaenales	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA134	-	-	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA137	-	-	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA144	+	-	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA147	+	-	-	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA155	+	-	-	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA156	-	-	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA167	-	-	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA183	+	+	+	
	Nostocales	<i>Nostoc</i> sp. CENA158	-	-	-
		<i>Nostoc</i> sp. CENA159	+	+	+
		<i>Nostoc</i> sp. CENA160	+	+	+
		<i>Nostoc</i> sp. CENA175	+	+	+
		<i>Microchaete</i> sp. CENA176	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. CENA184		-	-	-	
<i>Nostoc</i> sp. CENA186	+	+	+		

-: Resultado negativo nas análises por PCR; +: Resultado positivo nas análises por PCR

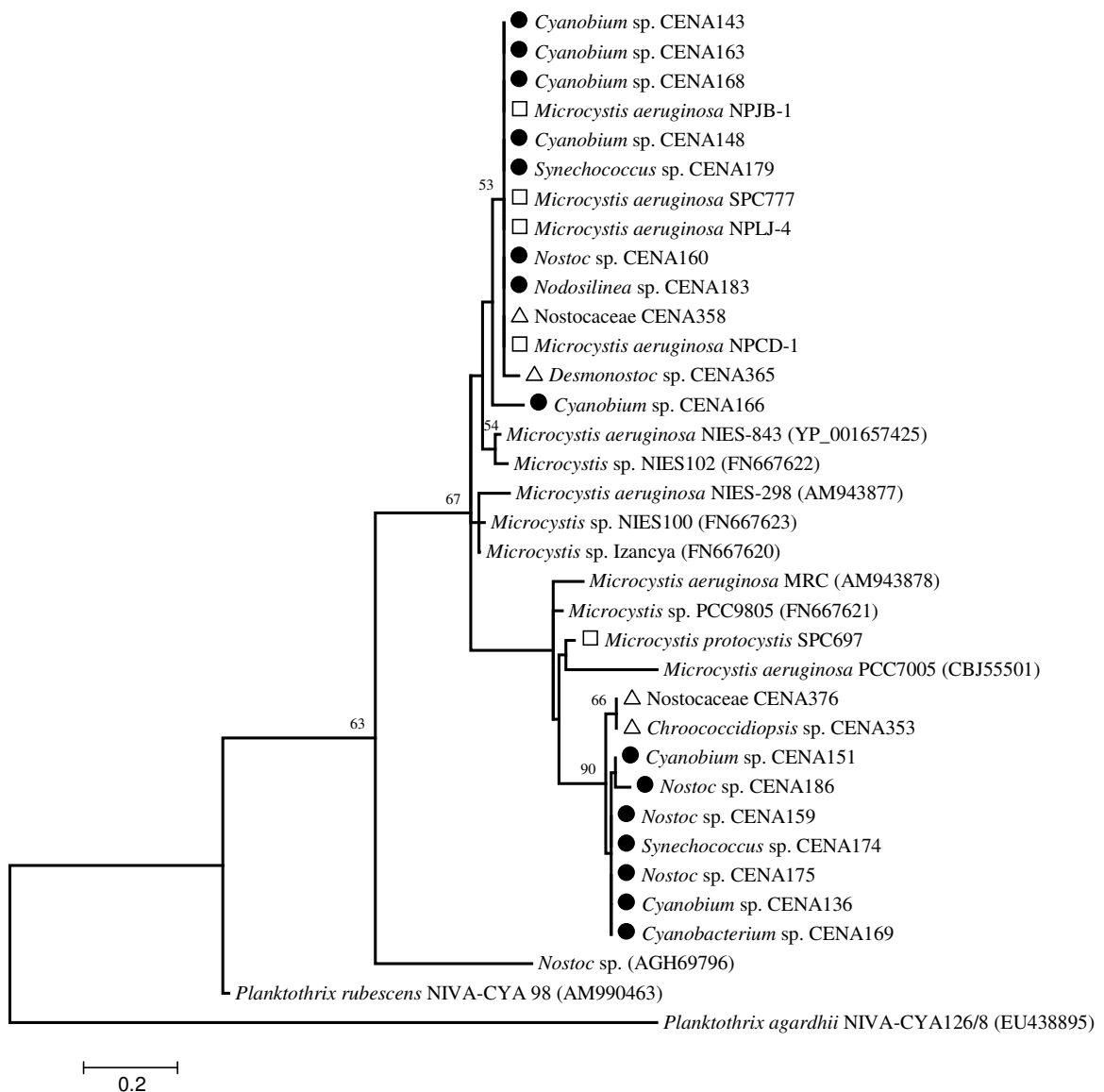


Figura 9 - Árvore filogenética de seqüências de aminoácidos do produto MdnA, precursor da via de biossíntese de microviridina, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). As seqüências obtidas neste estudo estão marcadas com um círculo preenchido. As seqüências obtidas por ANDREOTE (2014) e HOFF-RISSETI (2012) estão, respectivamente, marcadas com um triângulo e um quadrado. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó

As seqüências de aminoácidos de MdnA se distribuíram em dois clados, um contendo oito seqüências e outro, sete (Figura 9). As oito primeiras seqüências ficaram agrupadas com seqüências de linhagens brasileiras de cianobactérias, estudadas por Hoff-Risseti (2012) e Andreote (2014). No entanto, seqüência da linhagem *Cyanobium* sp. CENA166 ficou fora do clado principal (53 % de valor de reamostragem), apresentando-se pouco relacionada com as outras. As demais seqüências agruparam-se com duas seqüências obtidas por Andreote (2014), em um clado com 90 % de valor de reamostragem.

Esta mesma separação observada na árvore filogenética de MdnA (Figura 9) se repetiu na análise dos possíveis variantes produzidas pelas linhagens em estudo (Tabela 8), sendo que alterações na sequência de aminoácidos deste precursor é um indicativo das variantes de microviridina produzidas (ZIEMERT et al., 2010). Considerando-se a sequência de aminoácidos da variante de MdnA produzida pela linhagem *Microcystis aeruginosa* NIES-843 como modelo, tem-se que a sua região C-terminal tem a seguinte composição: TFKYPSDWEDY. Destes aminoácidos, quatro podem ser substituídos, F, W, D e Y, os quais são reconhecidos, respectivamente como, X1, X2, X3 e X4 (Tabela 8).

De acordo com estes dados é possível que as quinze linhagens sejam produtoras de três novas variantes de microviridina. Um primeiro grupo, formado pelas linhagens *Cyanobium* sp. CENA136 e CENA151; *Nostoc* sp. CENA159, CENA175 e CENA186; *Cyanobacterium* sp. CENA169; *Synechococcus* sp. CENA174, tem potencial para produzir uma variante ainda não descrita, na qual as substituições seriam R, W, E e F. Esta variante apresenta as mesmas substituições descritas para linhagem *M. aeruginosa* SPC697 (Hoff-Risseti, 2012). No entanto, há um Y no lugar do F, na posição número 4 na variante aqui descrita. Esta possível variante corresponde às sequências que se agruparam na árvore filogenética com 90 % de valor de reamostragem.

Da mesma forma, as sequências das linhagens *Cyanobium* sp. CENA143, CENA148, CENA163 e CENA168; *Nostoc* sp. CENA160; *Synechococcus* sp. CENA179; *Nodosilinea* sp. CENA183 estão agrupadas na árvore filogenética e indicam a produção de uma mesma variante de microviridina (F,W,D e F). Esta possível variante já foi descrita por Hoff-Risseti (2012) e Andreote (2014), mas sua estrutura química ainda não foi elucidada. Por fim, a sequência da linhagem *Cyanobium* sp. CENA166, a qual ficou distantemente afiliada às demais na filogenia (Figura 5), também indica para uma nova variante. Esta nova variante apresenta as substituições F, W, I e T, além de três aminoácidos adicionais, SEF.

Tabela 8 - Análise comparativa das sequências de aminoácidos de diferentes variantes de microviridina

Linhagem	Sequência de aminoácidos na região C-terminal											Variante <i>mdn</i>	Referência
	T	X1	K	Y	P	S	D	X2	E	X3	X4		
<i>M.aeruginosa</i> NIES-843		F						W		D	Y	L	ZIMERT et al, 2010
<i>M.aeruginosa</i> NIES-298		L						W		E	Y	A,B,C,G,H,I	ISHITSUKA et al., 1990; OKINO et al., 1995; MURAKAMI et al., 1997
<i>Oscillatoria agardhii</i> NIES204		Y						F		D	F	E	SHIN et al., 1996
<i>Oscillatoria agardhii</i> NIES204		M						W		D	Y	D	SHIN et al., 1996
<i>M. aeruginosa</i> IL-215		R						W		HO-	Y	SD	RESHEF; CARMELI, 2006
<i>M. aeruginosa</i> MRC		R						W		E	W	J	ROHRLACK et al., 2003
<i>M. aeruginosa</i> SPC697		R		F				W		E	F	nd	HOFF-RISSETI, 2012
<i>M. aeruginosa</i> SPC777, NPCD-1, NPJB-1 NPLJ-4 e Nostocaceae CENA358		F						W		D	F	nd	ANDREOTE, 2014 e HOFF- RISSETI, 2012
<i>Desmonostoc</i> sp. CENA365		F						C		D	F	nd	ANDREOTE, 2014
Nostocaceae CENA376		R						E		G	F	nd	ANDREOTE, 2014
<i>Chroococidiopsis</i> sp. CENA353		R						W		G	F	nd	ANDREOTE, 2014
<i>Cyanobium</i> sp. CENA136 e CENA151; <i>Nostoc</i> sp. CENA159, CENA175 e CENA186; <i>Cyanobacterium</i> sp. CENA169; <i>Synechococcus</i> sp. CENA174		R		Y				W		E	F	nd	Este estudo
<i>Cyanobium</i> sp. CENA143, CENA148, CENA163 e CENA168; <i>Nostoc</i> sp. CENA160; <i>Synechococcus</i> sp. CENA179; <i>Nodosilinea</i> sp. CENA183		F						W		D	F	nd	Este estudo, ANDREOTE, 2014 e HOFF-RISSETI, 2012
<i>Cyanobium</i> sp. CENA166		F						W		I	TSEF	nd	Este estudo

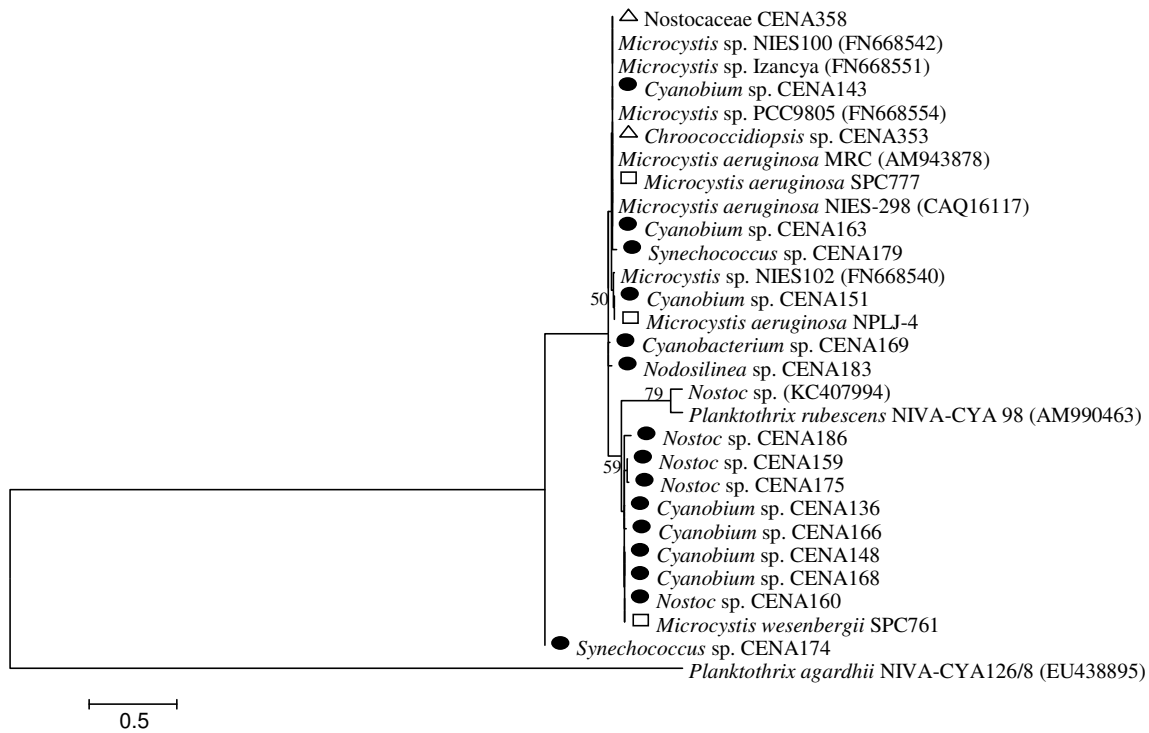


Figura 10 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos de MdnB, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). As sequências obtidas neste estudo estão marcadas com um círculo preenchido. As sequências obtidas por ANDREOTE (2014) e HOFF-RISSETI (2012) estão, respectivamente, marcadas com um triângulo e um quadrado. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó

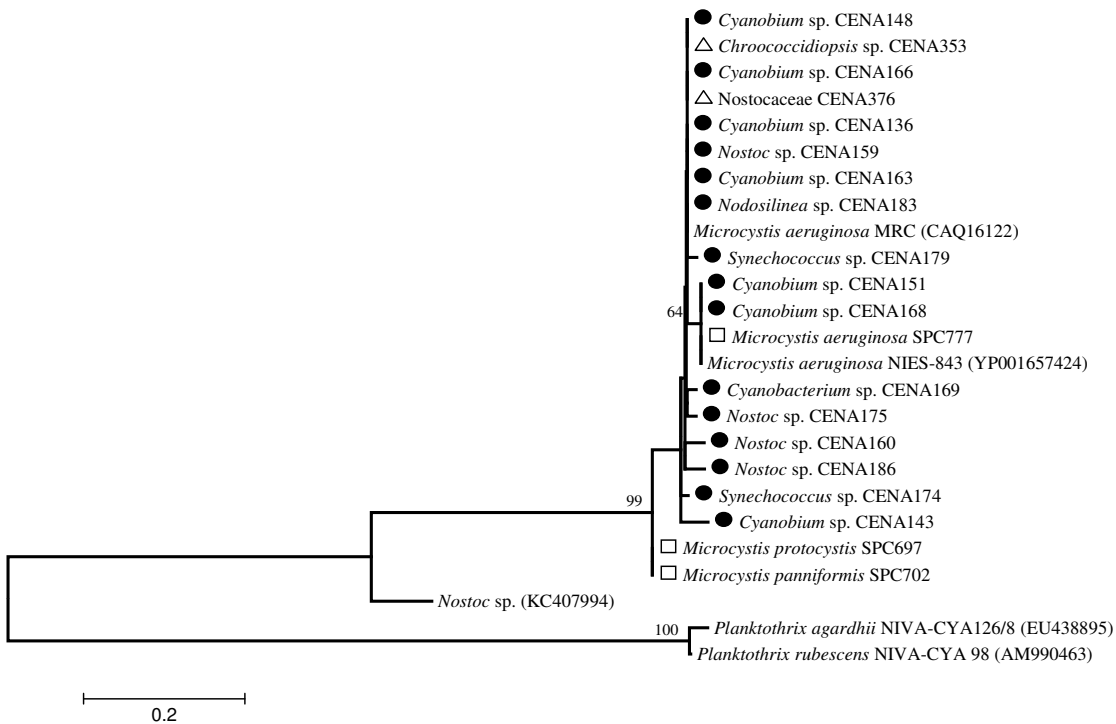


Figura 11 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos de MdnC, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). As sequências obtidas neste estudo estão marcadas com um círculo preenchido. As sequências obtidas por ANDREOTE (2014) e HOFF-RISSETI (2012) estão, respectivamente, marcadas com um triângulo e um quadrado. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó

As sequências MdnB se distribuíram uniformemente na árvore filogenética (Figura 10), sendo a sequência da linhagem CENA174 a única exceção, pois ficou distantemente relacionada com as demais. Um padrão semelhante foi observado na árvore filogenética obtida para as sequências MdnC, na qual as sequências obtidas neste estudo se agruparam em um mesmo clado (Figura 11).

2.3.2.3 Cianotoxinas

As cinquenta linhagens de cianobactérias em estudo foram analisadas quanto à presença de genes envolvidos na biossíntese de cilindrospermopsina, microcistina e saxitoxina os quais são apresentados nas tabelas 9, 10 e 11, respectivamente.

2.3.2.3.1 Cilindrospermopsina

Das cinquenta linhagens analisadas por PCR quanto a presença do gene *cyrJ*, vinte e seis (26) apresentaram fragmentos com tamanho esperado (~ 780 pb). O gene *cyrJ* codifica para uma sulfotransferase, responsável pela sulfatação do carbono 12 (C-12) da cilindrospermopsina, sendo umas das últimas etapas na constituição da toxina (MIHALI et al., 2008). Uma vez, que o produto deste gene atua no final da via biossintética da cilindrospermopsina, acredita-se que sua presença seja um bom indicador do potencial genético de uma determinada linhagem em produzir tal toxina.

A cilindrospermopsina é um alcaloide que contém uma porção guanidino central e uma porção hidroximetil uracila, ligadas a um esqueleto de carbono tricíclico, com massa molecular de aproximadamente 415 Da. Essa toxina tem efeitos hepatotóxicos, citotóxicos e neurotóxicos, além de ser carcinogênica e sua toxicidade é mediada pela inibição da glutatona, durante a síntese protéica e do citocromo P450. Apesar de ter sido identificada em 1979, o grupamento gênico responsável por sua biossíntese só foi completamente sequenciado em 2008 (MIHALI et al., 2008), o qual possui 43 kb e contém 15 genes, responsáveis pela biossíntese e exportação da toxina.

Os resultados apresentados indicam a presença de linhagens potencialmente produtoras de cilindrospermopsina, no entanto, não são conclusivos, pois os produtos de PCR obtidos não foram sequenciados. Ainda assim, análises químicas devem ser feitas para confirmar se potencial genético vem sendo expresso.

Tabela 9 - Avaliação molecular da presença do gene *cyrJ*

Ordem	Gênero/Linhagem	<i>cyrJ</i>	
Synechococcales	<i>Cyanobium</i> sp. CENA136	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA138	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA139	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA140	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA141	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA142	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA143	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA145	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA146	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA148	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA149	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA151	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA153	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA154	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA157	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA162	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA163	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA164	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA165	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA166	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA168	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA170	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA171	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA172	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA174	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA177	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA178	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA179	+	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA180	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA181	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA185	-	
	Chroococcales	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA150	+
		<i>Chlorogloea</i> sp. CENA152	+
<i>Cyanobacterium</i> sp. CENA169		-	
Oscillatoriales	<i>Oxynema</i> sp. CENA135	+	
Pseudanabaenales	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA134	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA137	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA144	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA147	-	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA155	-	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA156	+	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA167	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA183	-	
	Nostocales	<i>Nostoc</i> sp. CENA158	-
		<i>Nostoc</i> sp. CENA159	-
		<i>Nostoc</i> sp. CENA160	+
<i>Nostoc</i> sp. CENA175		+	
<i>Microchaete</i> sp. CENA176		+	
<i>Nostoc</i> sp. CENA184		-	
<i>Nostoc</i> sp. CENA186		-	

-: Resultado negativo nas análises por PCR; +: Resultado positivo nas análises por PCR

2.3.2.3.2 Microcistina

Três genes envolvidos na biossíntese de microcistina foram avaliados nas cinquenta linhagens de cianobactérias. Os alvos destas análises foram o gene *mcyD*, que codifica para

uma PKS modular, e os genes *mcyE* e *mcyG*, que codificam para duas enzimas híbridas contendo módulos NRPS/PKS (TILLET et al., 2000). Sete linhagens apresentaram resultados positivos quanto à amplificação do gene *mcyD*. Para os genes *mcyE* e *mcyG* houve resultados positivos, respectivamente, para doze e dezessete linhagens (Tabela 10). Oito linhagens, *Cyanobium* sp. CENA138, CENA142, CENA178, CENA185, *Synechococcus* sp. CENA170, *Leptolyngbya* sp. CENA134, *Nostoc* sp. CENA160 e CENA186, apresentaram resultados positivos na amplificação de, ao menos, dois dos genes investigados. Em cinco linhagens, *Cyanobium* sp. CENA157, *Nostoc* sp. CENA158, CENA159, CENA175 e CENA184, os três fragmentados gênicos avaliados foram amplificados.

Nas cinco linhagens em que houve amplificação dos três genes, os fragmentos foram submetidos ao sequenciamento. Desta forma, apenas o fragmento do gene *mcyG* amplificado na linhagem *Nostoc* sp. CENA175 foi sequenciado com sucesso (Figura 12; Tabela 11). De acordo com Fewer et al. (2007), os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo permitem a amplificação de um produto do gene *mcyG* com tamanho entre 385 e 560 pb. Este produto corresponde ao domínio da C-metiltransferase do gene *mcyG*. O fragmento gerado para a linhagem CENA175 apresentou 482 pb, sendo que sua tradução resultou em uma sequência de 166 aminoácidos. O tamanho do fragmento gerado neste estudo corresponde ao obtido por Genuário et al. (2010), em estudo conduzido com a linhagem *Nostoc* sp. CENA88, produtora de microcistina, variante YR.

Na análise de similaridade entre as sequências de aminoácidos de McyG da linhagem *Nostoc* sp. CENA175 com outras depositadas no NCBI observou-se identidade variando de 42 – 46 % (Tabela 11). Essa baixa porcentagem também foi observada na comparação das sequências de aminoácidos das linhagens *Nostoc* sp. CENA88/*Microcystis aeruginosa* NIES-478; *Nostoc* sp. CENA88/*Microcystis aeruginosa* PCC 7941; *Microcystis aeruginosa* NIES-478/ *Anabaena* sp. 18B6 e *Anabaena lemmermannii* 66A, entre outras. Apesar desta baixa similaridade, a sequência de McyG da linhagem *Nostoc* sp. CENA175 se agrupou com sequências obtidas das linhagens *Nostoc* sp. CENA88, *Anabaena* sp. 18B6, *Anabaena lemmermannii* 66A e *Anabaena* sp. 90 (Figura 12). Estas quatro linhagens são reportadas como produtoras de diferentes variantes de microcistina (GENUÁRIO et al., 2010). Estes resultados são promissores e um estudo mais aprofundado deve ser conduzido para se determinar se a linhagem CENA175 apresenta todo o aparato genético necessário à síntese de microcistina.

Tabela 10 - Avaliação molecular da presença dos genes *mcyD*, *mcyE* e *mcyG*, envolvidos na produção de microcistina

Ordem	Gênero/Linhagem	<i>mcyD</i>	<i>mcyE</i>	<i>mcyG</i>	
Synechococcales	<i>Cyanobium</i> sp. CENA136	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA138	-	+	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA139	-	-	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA140	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA141	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA142	-	+	+	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA143	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA145	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA146	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA148	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA149	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA151	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA153	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA154	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA157	+	+	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA162	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA163	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA164	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA165	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA166	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA168	-	-	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA170	+	-	+	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA171	-	-	+	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA172	-	-	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA174	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA177	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA178	-	+	+	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA179	-	-	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA180	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA181	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA185	-	+	+	
	Chroococcales	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA150	-	-	-
		<i>Chlorogloea</i> sp. CENA152	-	-	-
<i>Cyanobacterium</i> sp. CENA169		-	-	-	
Oscillatoriales	<i>Oxynema</i> sp. CENA135	-	-	+	
Pseudanabaenales	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA134	-	+	+	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA137	-	-	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA144	-	+	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA147	-	-	-	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA155	-	-	+	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA156	-	-	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA167	-	-	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA183	-	-	+	
	Nostocales	<i>Nostoc</i> sp. CENA158	+	+	+
		<i>Nostoc</i> sp. CENA159	+	+	+
<i>Nostoc</i> sp. CENA160		-	+	+	
<i>Nostoc</i> sp. CENA175		+	+	+	
<i>Microchaete</i> sp. CENA176		-	-	-	
<i>Nostoc</i> sp. CENA184		+	+	+	
<i>Nostoc</i> sp. CENA186		+	-	+	

-: Resultado negativo nas análises por PCR; +: Resultado positivo nas análises por PCR

Tabela 11 - Matriz de identidade entre as sequências de McyG de *Nostoc* sp. CENA175 e outras obtidas do NCBI

Linhagem	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. <i>Nostoc</i> sp. CENA175	-															
2. <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7820	46,0	-														
3. <i>Nostoc</i> sp. CENA88	44,0	73,0	-													
4. <i>Microcystis aeruginosa</i> TAC150	42,0	99,0	50,0	-												
5. <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-478	42,0	100	37,0	99,0	-											
6. <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-298	42,0	99,0	50,0	100	99,0	-										
7. <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7941	42,0	99,0	35,0	99,0	99,0	99,0	-									
8. <i>Anabaena</i> sp. 18B6	44,0	75,0	90,0	42,0	42,0	42,0	42,0	-								
9. <i>Anabaena lemmermannii</i> 66^a	44,0	75,0	90,0	42,0	42,0	42,0	42,0	99,0	-							
10. <i>Anabaena</i> sp. 90	45,0	71,0	91,0	70,0	70,0	70,0	71,0	99,0	99,0	-						
11. <i>Planktothrix prolifica</i> NIVA-CYA 98	45,0	76,0	76,0	74,0	74,0	74,0	73,0	77,0	78,0	75,0	-					
12. <i>Planktothrix agardhii</i> NIVA-CYA 126/8	45,0	76,0	76,0	74,0	73,0	74,0	73,0	77,0	78,0	75,0	99,0	-				
13. <i>Planktothrix agardhii</i> 213	45,0	78,0	76,0	63,0	63,0	63,0	63,0	78,0	78,0	79,0	99,0	99,0	-			
14. <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7806	46,0	99,0	73,0	99,0	100	99,0	99,0	75,0	75,0	71,0	76,0	76,0	78,0	-		
15. <i>Microcystis viridis</i> NIES-102	42,0	96,0	50,0	97,0	96,0	97,0	97,0	42,0	42,0	71,0	74,0	73,0	28,0	96,0	-	
16. <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	45,0	96,0	73,0	97,0	97,0	97,0	97,0	75,0	75,0	71,0	76,0	76,0	78,0	96,0	99,0	-

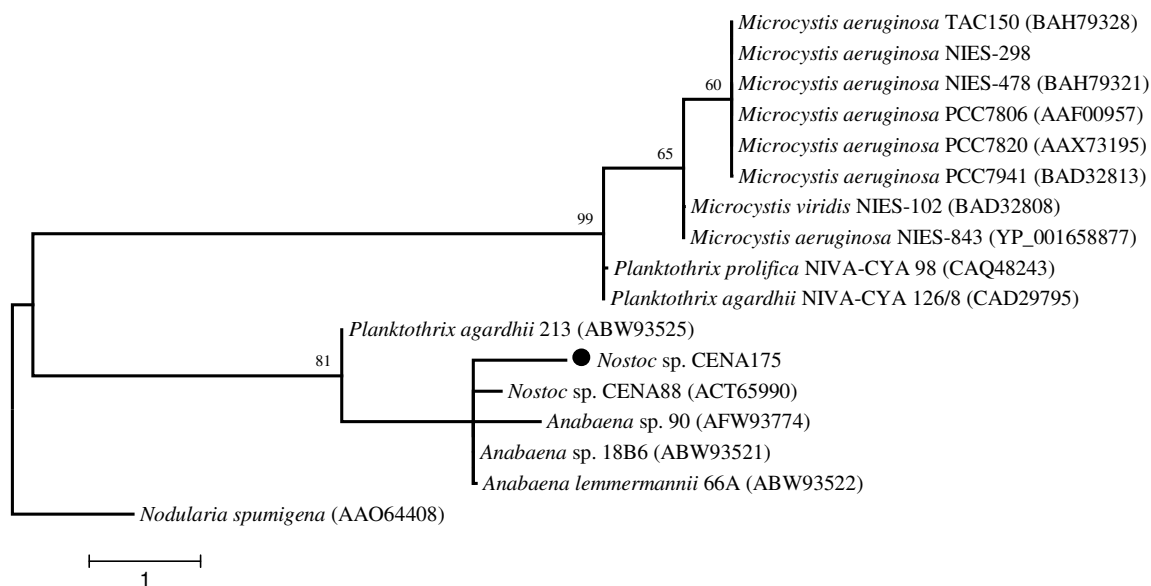


Figura 12 - Árvore filogenética de seqüências de aminoácidos do produto McyG, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). A seqüência obtida neste estudo está marcada com um círculo preenchido. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó

2.3.2.3.3 Saxitoxina

Um total trinta e quatro linhagem apresentou resultado positivo para os testes de amplificação do *sxtA*, trinta e sete para *sxtI* (utilizando os primers octF_R) e nove para *sxtI* (utilizando os primers sxtIF_R) (Tabela 12). As linhagens *Cyanobium* sp. CENA149, *Oxynema* sp. CENA135, *Leptolyngbya* sp. CENA134, *Nodosilinea* sp. CENA144, *Leptolyngbya* sp. CENA155, *Nostoc* sp. CENA158, *Nostoc* sp. CENA159, *Nostoc* sp. CENA160 e *Nostoc* sp. CENA175 apresentaram amplificações nas três avaliações, sendo selecionadas para seqüenciamento.

Os fragmentos gênicos *sxtI* das linhagens *Leptolyngbya* sp. CENA134, *Nostoc* sp. CENA159 e *Nostoc* sp. CENA160 foram seqüenciados com êxito. O fragmento obtido para a linhagem CENA134 possui 789 pb e sua seqüência traduzida, 263 aminoácidos. Quando a seqüência de nucleotídeos foi confrontada com as disponíveis no NCBI não houve retorno de identidade com nenhuma outra seqüência conhecida. Já a comparação da seqüência de aminoácido revelou identidade entre 70 – 72 % com proteínas hipotéticas de diferentes gêneros de cianobactérias. As mesmas análises com o fragmentos obtidos das linhagens CENA159 e CENA160 (1626 pb/345 aminoácidos, 422 pb/128 aminoácidos, respectivamente) revelaram alta identidade com seqüências de *O*-carbamoiltransferase.

Tabela 12 - Avaliação molecular da presença dos genes *sxtA* e *sxtI*, envolvidos na produção de saxitoxina

Ordem	Gênero/Linhagem	<i>sxtA</i>	<i>sxtI</i> ¹	<i>sxtI</i> ²	
Synechococcales	<i>Cyanobium</i> sp. CENA136	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA138	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA139	+	+	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA140	-	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA141	+	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA142	+	+	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA143	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA145	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA146	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA148	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA149	+	+	+	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA151	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA153	-	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA154	-	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA157	-	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA162	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA163	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA164	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA165	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA166	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA168	+	+	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA170	+	+	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA171	-	+	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA172	-	-	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA174	+	+	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA177	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA178	-	-	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA179	+	-	-	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA180	-	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA181	+	-	-	
	<i>Cyanobium</i> sp. CENA185	+	-	-	
	Chroococcales	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA150	-	+	-
		<i>Chlorogloea</i> sp. CENA152	-	+	-
<i>Cyanobacterium</i> sp. CENA169		+	+	-	
Oscillatoriales	<i>Oxynema</i> sp. CENA135	+	+	+	
Pseudanabaenales	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA134	+	+	+	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA137	+	+	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA144	+	+	+	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA147	-	+	-	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA155	+	+	+	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA156	+	-	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA167	-	-	-	
	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA183	+	+	-	
	Nostocales	<i>Nostoc</i> sp. CENA158	+	+	+
		<i>Nostoc</i> sp. CENA159	+	+	+
<i>Nostoc</i> sp. CENA160		+	+	+	
<i>Nostoc</i> sp. CENA175		+	+	+	
<i>Microchaete</i> sp. CENA176		+	+	-	
<i>Nostoc</i> sp. CENA184		-	-	-	
<i>Nostoc</i> sp. CENA186		-	-	-	

-: Resultado negativo nas análises por PCR; +: Resultado positivo nas análises por PCR. ¹Amplificações utilizando o conjunto de oligonucleotídeos OCT_F/R. ²Amplificações utilizando o conjunto de oligonucleotídeos Sxt1_F/R

As sequências de aminoácidos SxtI obtidas para as linhagens *Leptolyngbya* sp. CENA134, *Nostoc* sp. CENA159 e *Nostoc* sp. CENA160 foram comparadas entre si e com outras sequências disponíveis no NCBI (Tabela 13). A relação filogenética entre estas sequências também foi analisada, conforme Figura 13. Todas as sequências de SxtI utilizadas na reconstrução filogenética foram obtidas de linhagens que produzem saxitoxina. A sequência SxtI da linhagem CENA160 se agrupou (94 % de valor de reamostragem) com outras dez sequências de linhagens dos gêneros *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*, muito embora apresente-se em um ramo isolado. A linhagem *C. raciborskii* T3, umas das mais bem estudadas produtoras de saxitoxina, foi isolada de um dos braços do reservatório Billings (HOFF-RISSETI et al., 2013). As outras duas sequências de SxtI obtidas neste estudo agruparam em um clado com 59 % de valor de reamostragem, o qual está distantemente relacionado aos demais clados.

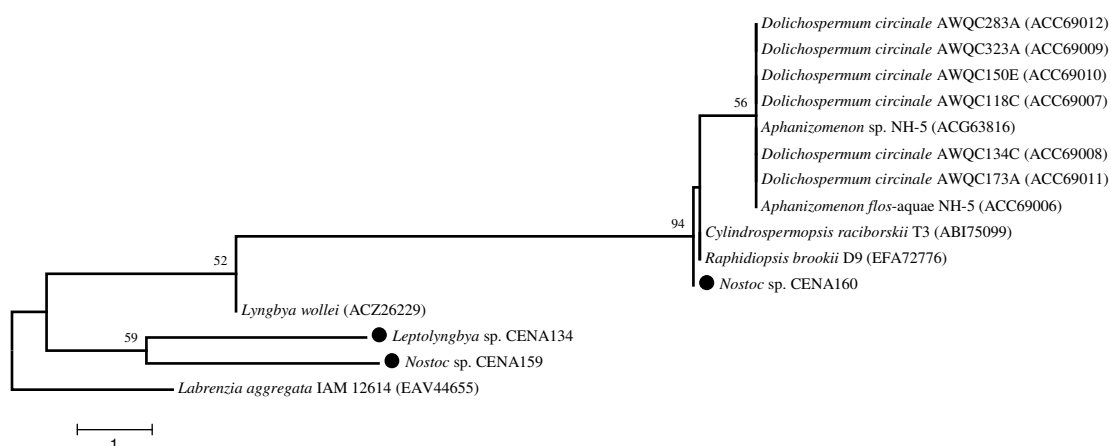


Figura 13 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos do produto SxtI, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). As sequências obtidas neste estudo estão marcadas com um círculo preenchido. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó

A análise de similaridade apresentada na Tabela 13 indicou baixa similaridade entre a sequência SxtI da linhagem CENA134 com as demais, sendo que ela não apresenta similaridade com as sequências das linhagens CENA159 e CENA160. Por outro lado, as sequências de SxtI destas últimas duas linhagens apresentaram valores de similaridade variando entre 71 e 84 % com as sequências de linhagens reconhecidamente produtoras de saxitoxina. Estes resultados indicam fortemente o potencial de produção de saxitoxina por estas duas linhagens do gênero *Nostoc*, sendo que outros genes deverão ser analisados para uma resposta mais conclusiva.

Tabela 13 - Matriz de identidade entre as sequências de SxtI obtidas neste estudo e outras obtidas do NCBI

Linhagem	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>Leptolyngbya</i> sp. CENA134	-													
2. <i>Nostoc</i> sp. CENA159	-*	-												
3. <i>Nostoc</i> sp. CENA160	-*	57,0	-											
4. <i>Dolichospermum circinale</i> AWQC283A	24,0	82,0	82,0	-										
5. <i>Dolichospermum circinale</i> AWQC150E	24,0	82,0	82,0	100	-									
6. <i>Dolichospermum circinale</i> AWQC134C	24,0	81,0	83,0	99,0	99,0	-								
7. <i>Dolichospermum circinale</i> AWQC173A	24,0	82,0	82,0	100	100	99,0	-							
8. <i>Dolichospermum circinale</i> AWQC323A	24,0	81,0	82,0	99,0	99,0	99,0	99,0	-						
9. <i>Aphanizomenon</i> sp. NH-5	26,0	83,0	83,0	97,0	97,0	97,0	97,0	97,0	-					
10. <i>Lyngbya wollei</i>	42,0	84,0	71,0	76,0	76,0	76,0	76,0	76,0	79,0	-				
11. <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> T3	26,0	84,0	83,0	90,0	90,0	89,0	90,0	90,0	92,0	81,0	-			
12. <i>Raphidiopsis brookii</i> D9	26,0	84,0	83,0	90,0	90,0	89,0	90,0	90,0	92,0	81,0	100	-		
13. <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> NH-5	26,0	83,0	83,0	97,0	97,0	97,0	97,0	97,0	100	79,0	92,0	92,0	-	
14. <i>Dolichospermum circinale</i> AWQC118C	24,0	82,0	83,0	100	100	99,0	100	99,0	97,0	76,0	90,0	90,0	97,0	-

*Não houve similaridade significativa entre as sequências de aminoácidos das linhagens *Leptolyngbya* sp. CENA134, *Nostoc* sp. CENA159 e *Nostoc* sp. CENA160

2.3.3 Análises químicas dos extratos e frações de quatro linhagens de cianobactérias

As linhagens *Cyanobium* sp. CENA157, *Oxynema* sp. CENA135, *Nodosilinea* sp. CENA183, *Nostoc* sp. CENA175 e *Nostoc* sp. CENA184 foram selecionadas para cultivo em larga escala. Essas linhagens foram escolhidas em virtude da maior capacidade, em produzir biomassa. Os valores de massa seca, obtidos após processo de liofilização estão apresentados na Tabela 14. A massa seca obtida para cada linhagem foi submetida à extração e fracionamento, conforme descrito no item 2.2.3.3, sendo os valores da massa seca dos extratos e frações apresentados na Tabela 15.

Tabela 14 – Massa (g) da biomassa de cada linhagem após liofilização

Linhagem	Massa liofilizada (g)
<i>Oxynema</i> sp. CENA135	3,9539 ^a
<i>Cyanobium</i> sp. CENA157	1,1154
<i>Nostoc</i> sp. CENA175	5,4964 ^a
<i>Nodosilinea</i> sp. CENA183	2,1957
<i>Nostoc</i> sp. CENA184	2,3209

^aMassa desconsiderando o sal presente no meio de cultivo

Tabela 15 - Massas (mg) dos extratos e frações após Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV)

Massa (mg)	Linhagens				
	<i>Oxynema</i> sp. CENA135	<i>Cyanobium</i> sp. CENA157	<i>Nostoc</i> sp. CENA175	<i>Nodosilinea</i> sp. CENA183	<i>Nostoc</i> sp. CENA184
Extrato	nd ^a *	1.4084*	nd ^a *	322,4	368,4
F1	32,5	2,3	3,0	7,9	1,9
F2	4,6	7,2	2,0	3,9	0,2
F3	7,5	10,4	5,3	10,5	4,2
F4	13,4	18,3	3,6	30,9	3,6
F5	7,9	7,4	10,3	17,5	0,4
F6	2,4	4,7	3,7	9,0	1,5
F7	1.604,4*	4,8	7,6	6,3	2,1
F8	1.650,4*	24,5	1.009,7*	40,3	19,1*
F9	1.664,6*	81,1*	1.092,7*	262,6*	203,3*

^aNão determinado; *Extratos e/ou frações que não secaram completamente

Os rendimentos dos extratos das linhagens *Nodosilinea* sp. CENA183 e *Nostoc* sp. CENA184 foram, respectivamente, de 14,68 e 15, 87 %. Para as demais linhagens não foi possível o cálculo de rendimento devido ao fato de os extratos não terem secado e/ou por não terem sido determinadas suas massas. Da mesma forma, algumas frações, em especial as com características mais polares, não secaram, impossibilitando o cálculo do rendimento de massa das frações em relação à biomassa liofilizada de cada linhagem. No entanto, tanto a massa seca obtida quanto a massa do extrato bruto e das frações foram inferiores ao necessário para experimentos visando o isolamento de produtos naturais bioativos. MALLOY e colaboradores (2012) isolaram duas novas substâncias (Credneraída A e B) usando o mesmo procedimento

deste trabalho, mas a partir de 12,2 gramas de extrato bruto. Este extrato, no entanto, foi obtido a partir de amostra coletada na natureza, caracterizada como uma floração de *Trichodesmium* spp. e não a partir de material isolado e mantido em cultura. Desta forma, é urgente o estabelecimento de métodos de cultivo que visem uma maior produtividade e rendimento de células, a partir de culturas de cianobactérias. Esta dificuldade em se obter biomassa em quantidades significativas tem conduzido a estudos visando o entendimento de rotas metabólicas específicas, permitindo a síntese *in vitro* de compostos com alto interesse (BURJA et al., 2001; MAGARVEY et al., 2006; TAN, 2010; SINGH et al., 2011).

Todas as frações obtidas foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H), com o objetivo de isolar, purificar e identificar substâncias de interesse. As frações das linhagens *Oxynema* sp. CENA135 e *Nostoc* sp. CENA175 foram ainda analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C). Neste contexto, foram isoladas uma substância da linhagem *Oxynema* sp. CENA135, a partir da fração 3 e uma provável mistura de duas substâncias da linhagem *Nostoc* sp. CENA175, obtidas a partir da fração 2. Os demais extratos, exceto o da linhagem *Nodosilinea* sp. CENA183, foram também investigados. Nestes casos, as análises conduzidas não permitiram o isolamento de substâncias.

2.3.3.1 *Oxynema* sp. CENA135 – Fração 3

Análises do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 – 500 MHz) da fração 3 da linhagem *Oxynema* sp. CENA135 (7,5 mg, Tabela 15), obtida após fracionamento com hexano:acetato de etila (80:20), indicaram a presença de sinais característicos de hidrogênios ligados a carbono do tipo sp^3 , cujo deslocamento químico encontra-se na região de 0 a 2 ppm. Tais sinais evidenciaram a presença de grupos metílicos (δ 0,91 e δ 0,81) e grupos metilênicos (δ 1,19-1,29). Sinais de hidrogênios ligados a carbono sp^2 , na região entre 5,26 a 5,33 ppm, e um singlete largo em 5,11 ppm, característico de hidrogênios ligados a heteroátomos, como OH e NH, também foram observados. Desta forma, foi possível inferir que os compostos de cadeia alifática longa, como ácidos graxos, seriam majoritários nesta fração. Na Figura 14 são apresentados exemplos de padrões de estruturas e/ou espectros de RMN de ^1H utilizados para comparação com a possível substância isolada na fração 3 desta linhagem.

A possibilidade de se tratar de um éster foi descartada devido ao fato de o espectro de RMN de ^1H não apresentar nenhum sinal na região de hidrogênios de grupos metoxílicos (OMe ou OCH_3), os quais estariam na região em torno de 3,50-3,80 ppm. Também foi excluída a possibilidade desta molécula ser o ácido límbico, uma vez que este possui um substituinte metoxílico como uma ramificação da cadeia alifática.

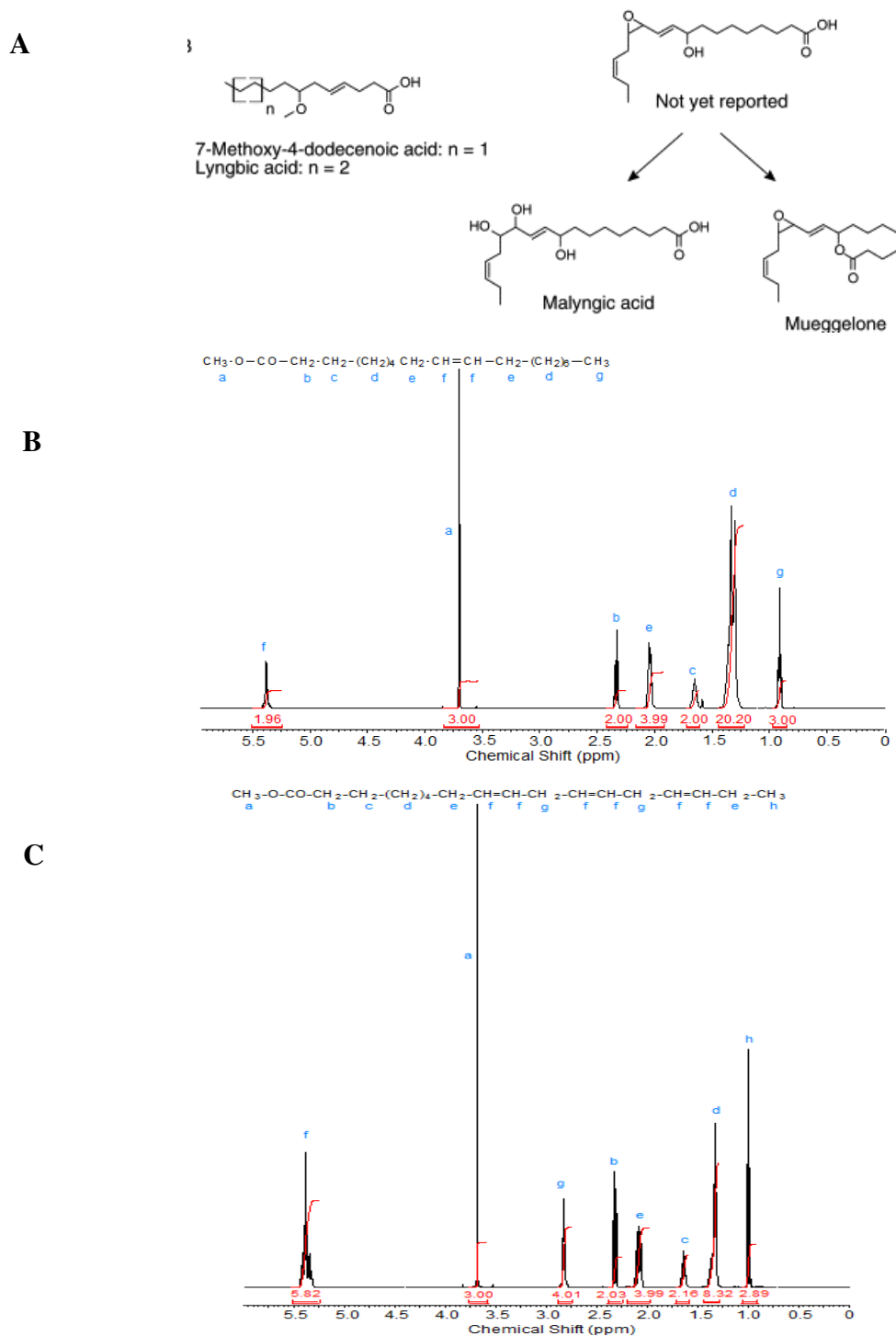


Figura 14 - Exemplos de estruturas do ácido límbico e derivados (A); e espectros de RMN de ^1H (B e C) utilizados para comparação com a possível substância isolada na fração 3 da linhagem *Oxynema* sp. CENA135. A: Espectro de metiloleato. B: Espectro de α -linolenato

Ainda que substâncias com essas características fossem esperadas como majoritárias nas frações de mais baixa polaridade, optou-se pela análise minuciosa desta fração, uma vez que algas e cianobactérias, principalmente aquelas provenientes de ambiente marinho ou de manguezais, produzem derivados de ácidos graxos modificados, os quais apresentam em sua estrutura um ou mais átomos de halogênios e mesmo aminoácidos como continuação da cadeia alifática (FERRÃO-FILHO; KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011). Portanto, para a determinação da estrutura da substância presente nesta fração, os padrões apresentados nas Figuras 14 e 15 foram utilizados como referência para comparar com os dados obtidos dos espectros de RMN unidimensionais (^1H e ^{13}C) e bidimensionais (COSY ^1H - ^1H ; HSQC, HMBC) (Figuras 16 – 23).

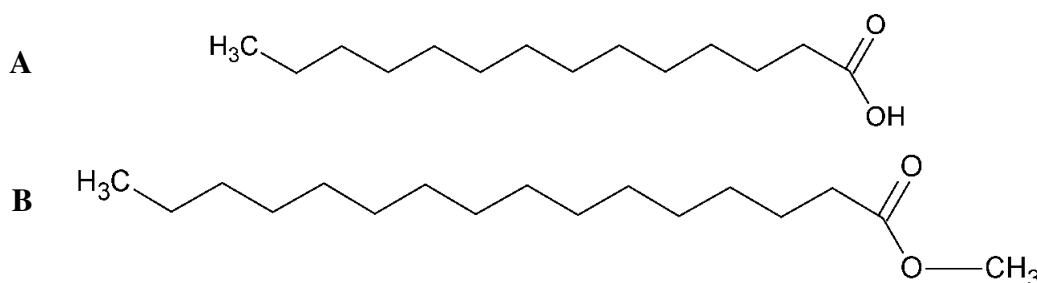


Figura 15 - Em A, Ácido tetradecanóico ($\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$, PM 228; adicionando-se mais dois grupos CH_2 = PM 256). Em B, Hexadecanoato de metila ($\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$, PM 270 para este éster, se for ácido PM = 256)

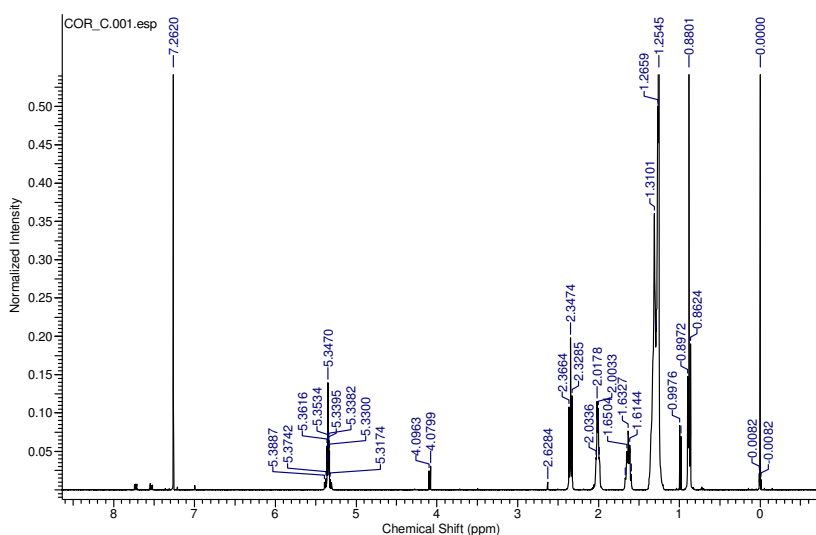


Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H da fração 3 de *Oxynema* sp. CENA135, 500 MHz, CDCl_3

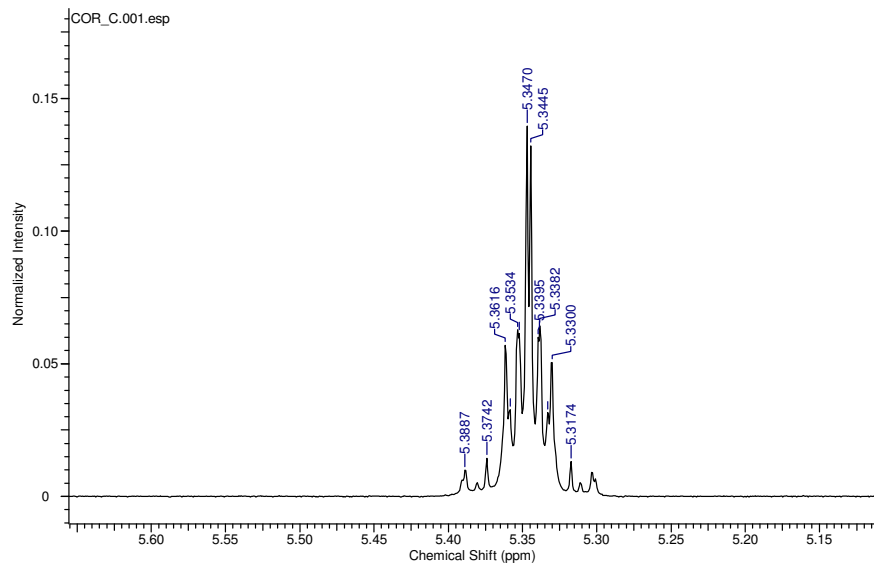


Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H da fração 3 de *Oxyntema* sp. CENA135, 500 MHz, CDCl_3 (expansão 1)

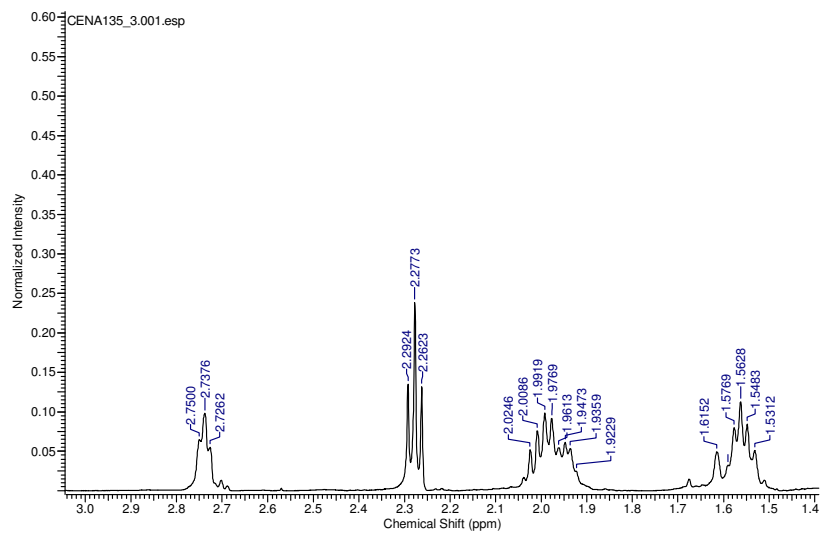


Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H da fração 3 de *Oxyntema* sp. CENA135, 500 MHz, CDCl_3 (expansão 2)

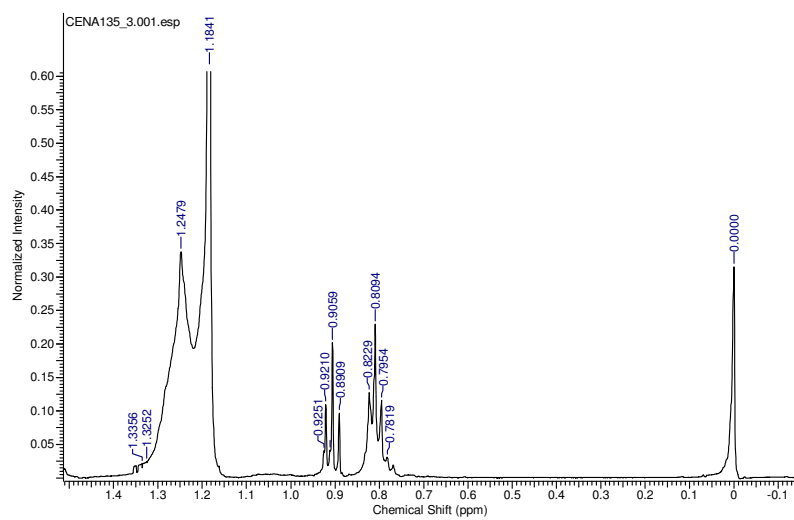
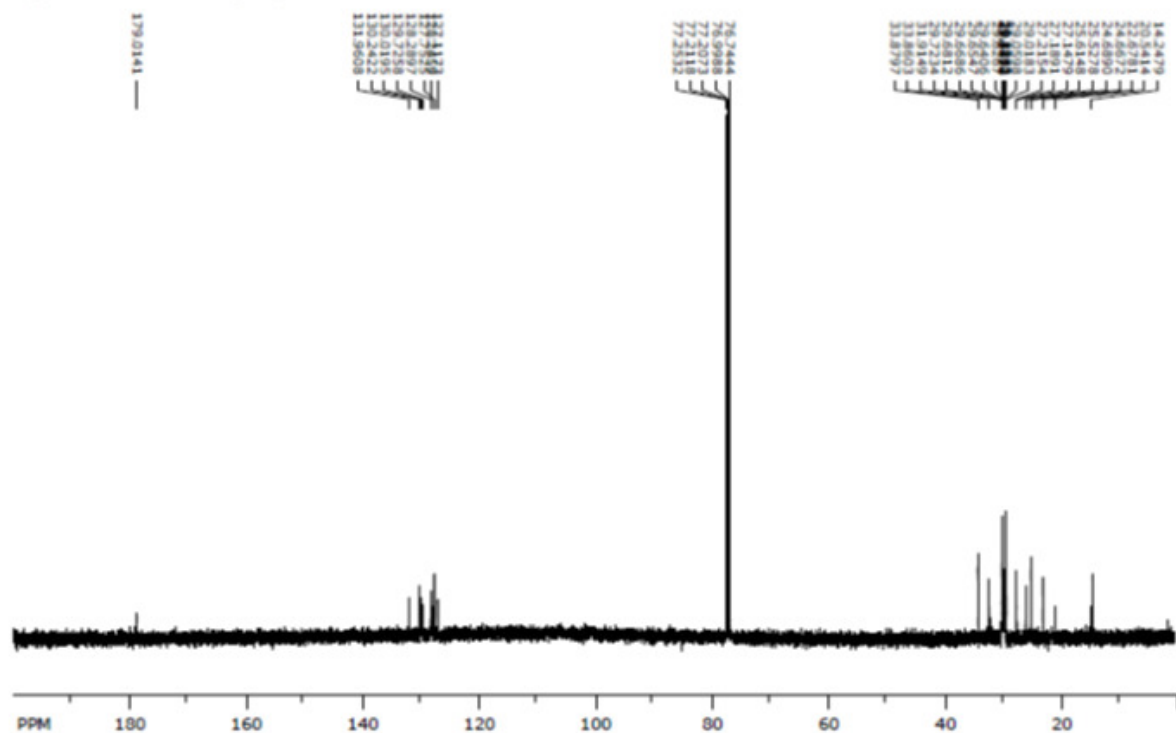


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H da fração 3 de *Oxyntema* sp. CENA135, 500 MHz, CDCl_3 (expansão 3)



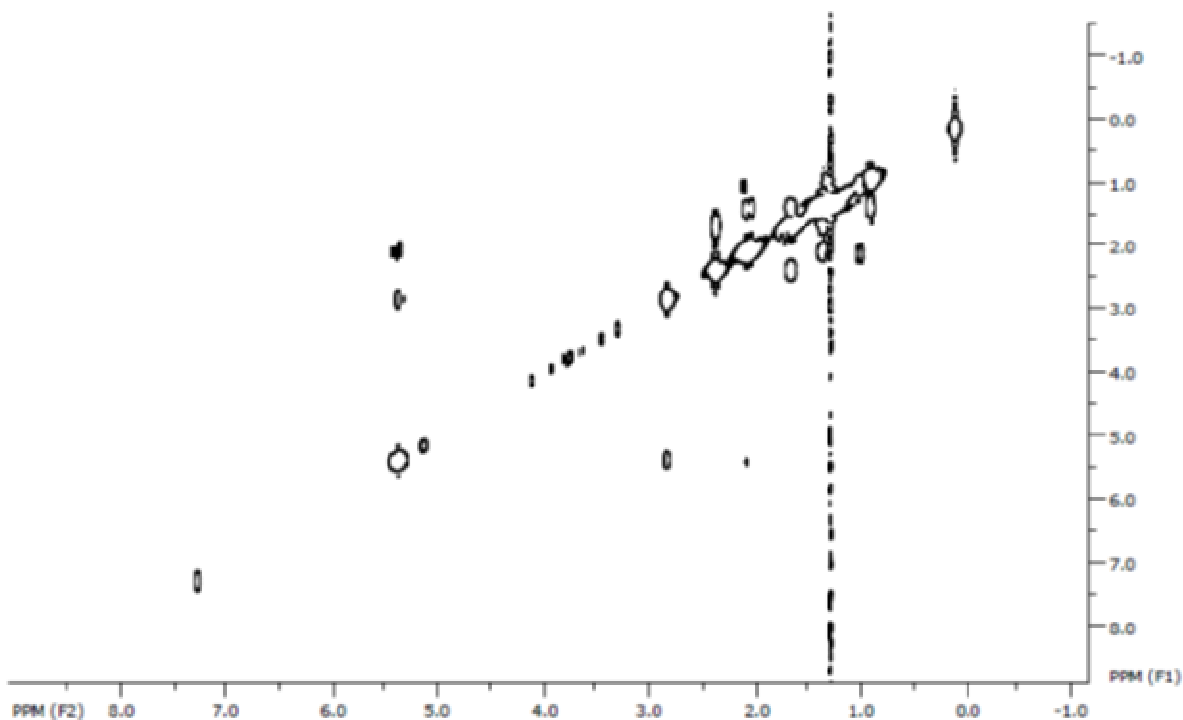


Figura 22 - Espectro de RMN de experimento COSY ^1H - ^1H da fração 3 de *Oxyntema* sp. CENA135, 500 MHz, CDCl_3

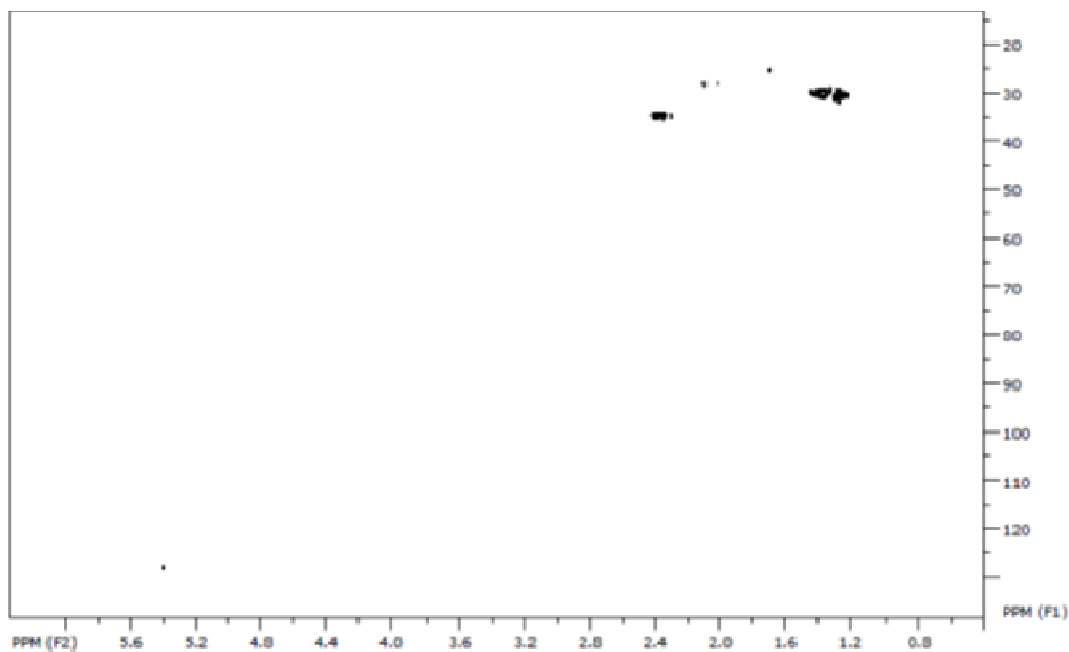


Figura 23 - Espectro de RMN de experimento HSQC da fração 3 de *Oxyntema* sp. CENA135, 500 MHz, CDCl_3

Algumas análises desta fração foram realizadas em LC-MS em modo positivo e negativo, com o intuito de obter informações relativas ao peso molecular da substância. Estes dados foram desreplcados utilizando o Banco de dados MarlinLit. Como descrito anteriormente, foram selecionados para análise picos nos quais foi possível a observação de

uma mesma substância protonada $[M+H]^+$ e sodiada (“aduto com sódio”) $[M+Na]^+$, quando do uso do MS em módulo positivo. Os valores de m/z selecionados e obtidos no modo positivo foram: m/z 898 e 876; 638 e 616; 588 e 566; 556 e 534; 278 e 256; 351 e 329. Os valores selecionados quando da análise em modo negativo foram: m/z 556; 324 e 278, sendo que 556 pode ser oriundo de 2×278 .

Em uma análise preliminar, observou-se que a substância desta fração poderia ser um derivado do linoleato de metila (Figuras 24 e 25), mas em sua forma acidificada (ácido α -linolênico ou mais conhecido como ALA). Tal hipótese pôde ser confirmada com os dados da literatura, nos quais o espectro do éster é semelhante ao espectro obtido neste trabalho. No entanto, existem algumas diferenças, como a ausência do sinal em torno de 3,60 ppm, característico do grupo metila ligado ao éster e a presença de um tripleto em 0,92 ppm, que aparece como um sinal adicional em relação ao ácido α -linolênico (DÍAZ; GAVÍN, 2007). A figura 24 apresenta o espectro de RMN de 1H do éster linoleato de metila.

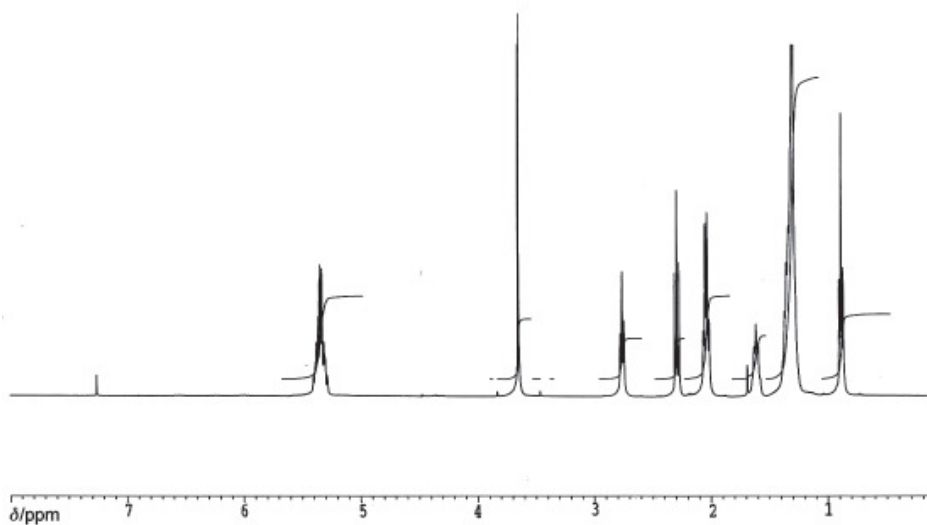


Figura 24 - Espectro de RMN de 1H do éster linoleato de metila
Fonte: (DÍAZ; GAVÍN, 2007)

A análise do espectro de RMN de 1H da fração 3 de *Oxynema* sp. CENA135 (Figuras 16 – 19) permite ainda constatar hidrogênios de ligações duplas, hidrogênios metilênicos (CH_2) e metílicos (CH_3). No entanto, como tais sinais aparecem como multipletos, e até sobrepostos, torna-se difícil a integração dos mesmos (método que seria útil para estabelecer o número de hidrogênios para cada deslocamento químico) e consequentemente estabelecer o número de grupos CH_2 , por exemplo. Os espectros de RMN de ^{13}C forneceram importantes informações (Figuras 20 e 21). A principal delas foi o aparecimento de vários sinais na região de carbonos sp^2 (127 a 131 ppm), ou seja, característicos de insaturações de cadeia alifática ou

de anéis aromáticos. Ao menos 6 sinais foram observados, o que sugere pelo menos 3 ligações duplas na molécula. Não foram observados sinais em torno de 40 a 80 ppm, os quais são característicos de carbonos ligados a heteroátomos, como OMe, por exemplo.

Os ácidos graxos poli-insaturados, mais conhecidos com PUFAs (a Figura 25 apresenta um exemplo, o ácido α -linolênico – ALA), são ácidos graxos essenciais, ricos em ômega 3. Uma vez que os humanos são deficientes nas enzimas envolvidas na sua biossíntese, os mesmos devem ser obtidos pela dieta. Óleos de sementes, como soja, linhaça, nozes entre outros são fontes primárias desses ácidos graxos, mas já há relatos de linhagens de cianobactérias ricas em PUFAs (FERRÃO-FILHO; KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011).

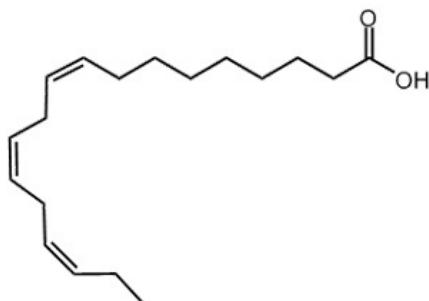


Figura 25 - Ácido α -linolênico – ALA (ácido - cis-9,12,15-octadecatrienoico)

Por fim, pode-se sugerir que esta molécula esteja isolada. No entanto, alguns experimentos de RMN precisarão ser realizados para esta confirmação, como por exemplo, DEPT 135, o qual permite a análise de quais são os carbonos CH, CH₂ e CH₃, além dos quaternários e ainda um experimento de troca isotópica, para confirmar se o sinal em 5,11 ppm é de hidrogênio ligado a heteroátomo. Há ainda, dados obtidos por CCD, os quais revelaram que esta fração 3 de *Oxynema* sp. CENA135 pode conter substâncias nitrogenadas (Figura 26). Desta forma, será necessário constatar se esta substância nitrogenada é uma impureza da amostra ou se faz parte da ALA como um substituinte na cadeia alifática.



Figura 26 - Placa cromatográfica das frações 1 - 9 de *Oxynema* sp. CENA135 revelada com cloro-iodoplatinado

2.3.3.2 *Nostoc* sp. CENA 175 – Fração 2

O fracionamento do extrato da linhagem *Nostoc* sp. CENA175 resultou no isolamento de uma substância, que pode apresentar estrutura aromática ligada a uma cadeia alifática (fração 2 – 2 mg, Tabela 15). Entretanto, há uma possibilidade desta substância ser um ftalato, ou seja, um anel aromático com substituintes carboxilados (acetatos), os quais são muito comuns em algumas espécies de algas marinhas, mas também muito encontrados como contaminantes de solventes orgânicos (oriundos de plásticos presentes no solvente acetato de etila) (Figura 27).

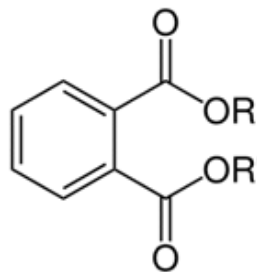


Figura 27 - Exemplo de estrutura de ftalato, na qual os ésteres ocupam os carbonos de posições 1 e 2, e os substituintes R e R' podem ser iguais ou diferentes, como grupamentos etílicos ou metílicos até mesmo longas cadeias alifáticas

O anel aromático desta possível substância possui dois substituintes nas posições 1,2 (anel *orto* substituído) e hidrogênios com deslocamentos químicos em δ 7,54 ($J = 7,2$; H-4, H-5) e δ 7,73 ($J=7,2$; H-3, H-6). Com relação aos substituintes, pode-se propor baseado nos dados de RMN de ^1H (Figuras 28, 29 e 30), que os ésteres desblindam os hidrogênios do anel aromático, sendo que os hidrogênios mais afetados pelo grupo sacador carboxílico são os ^1H adjacentes, ou seja, que ocupam as posições C-3 e C-6 (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2012). Com relação aos substituintes R e R', estes são iguais devido à simetria da molécula, observada por meio dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H já descritos. Entretanto, se pode afirmar se os outros deslocamentos químicos apresentados no espectro, em torno de 4,81 ppm, 4,13 ppm, 2,34 ppm, 2,06 ppm e 0,93 ppm, são de cadeias alifáticas pertencentes a esta molécula ou se fazem parte de um ácido graxo presente na amostra em mistura. Ainda, há uma grande concentração de sinais em torno de 3,44 e 3,72 ppm, os quais são característicos de hidrogênios ligados a carbonos oximetílicos e oximetilênicos, sugerindo a presença de uma substância altamente oxigenada. Finalmente, sugere-se que estes grupos oxigenados possam fazer parte de um derivado de ácido graxo, similar ao descrito para a fração 3 da

linhagem *Oxynema* sp. CENA135, mas contendo grupos OH e/ou OCH₃, como ramificações na cadeia ou mesmo na forma do ácido esterificado (exemplo na Figura 14, na qual são apresentados o ácido límbico e seus derivados).

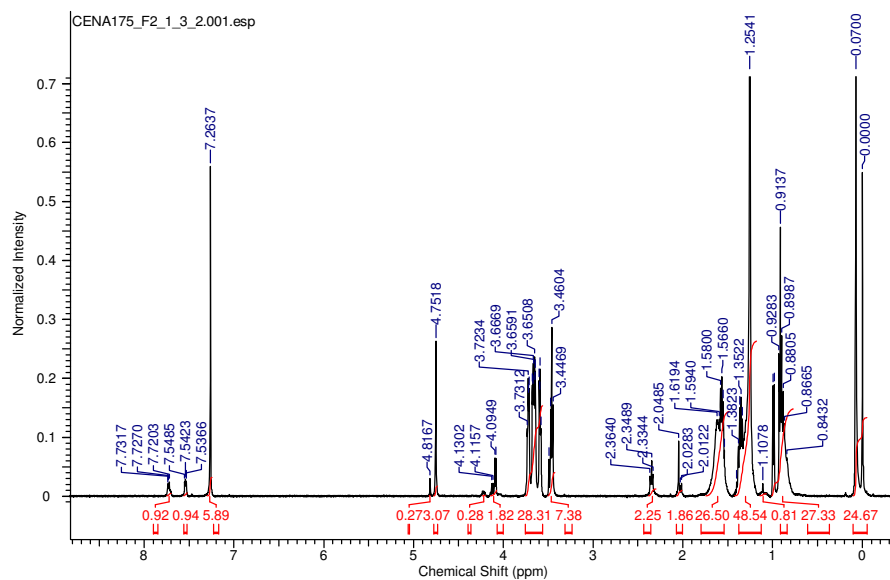


Figura 28 - Espectro de RMN de ¹H da fração 2 da linhagem *Nostoc* sp. CENA175, 500 MHz, CDCl₃

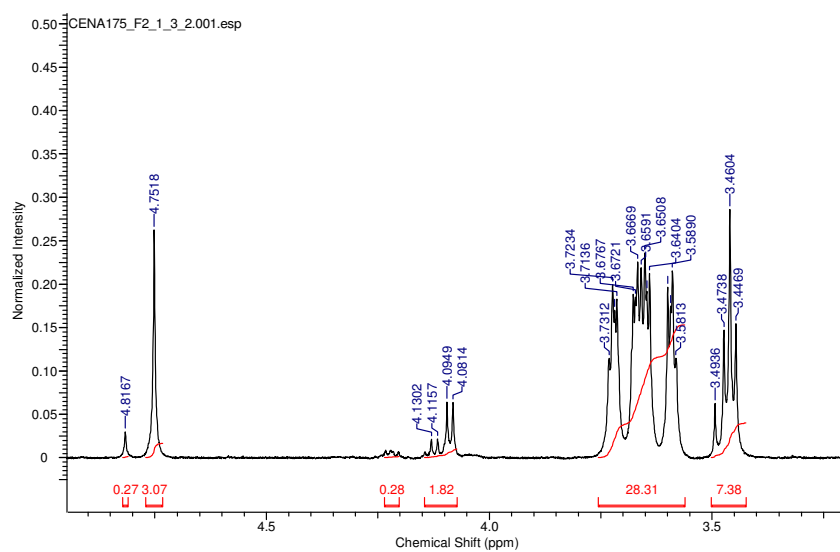


Figura 29 - Espectro de RMN de ¹H: fração 2 da linhagem *Nostoc* sp. CENA175, 500 MHz, CDCl₃ (expansão 1)

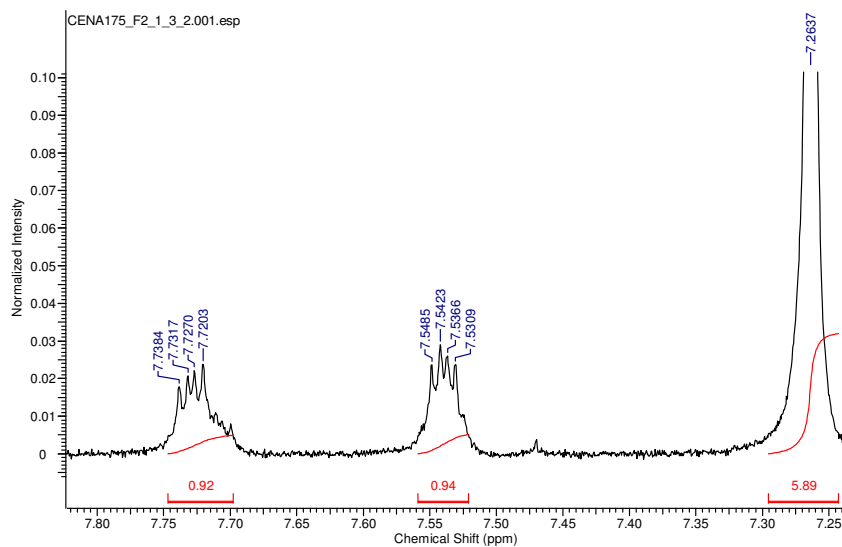


Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H : fração 2 da linhagem *Nostoc* sp. CENA175, 500 MHz, CDCl_3 (expansão 2)

No espectro de RMN de ^1H (Figuras 28 – 30) não aparecem os sinais característicos de ligações duplas em torno de 5,35 ppm, o que é confirmado pela ausência de sinais também no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 31), no qual não aparecem uma série de sinais em torno de 127-131 ppm. Entretanto, os sinais no espectro de carbono em torno de 60 a 80 ppm são característicos de carbonos oxigenados, confirmando as informações obtidas no espectro de RMN de ^1H (Figuras 28 – 30).

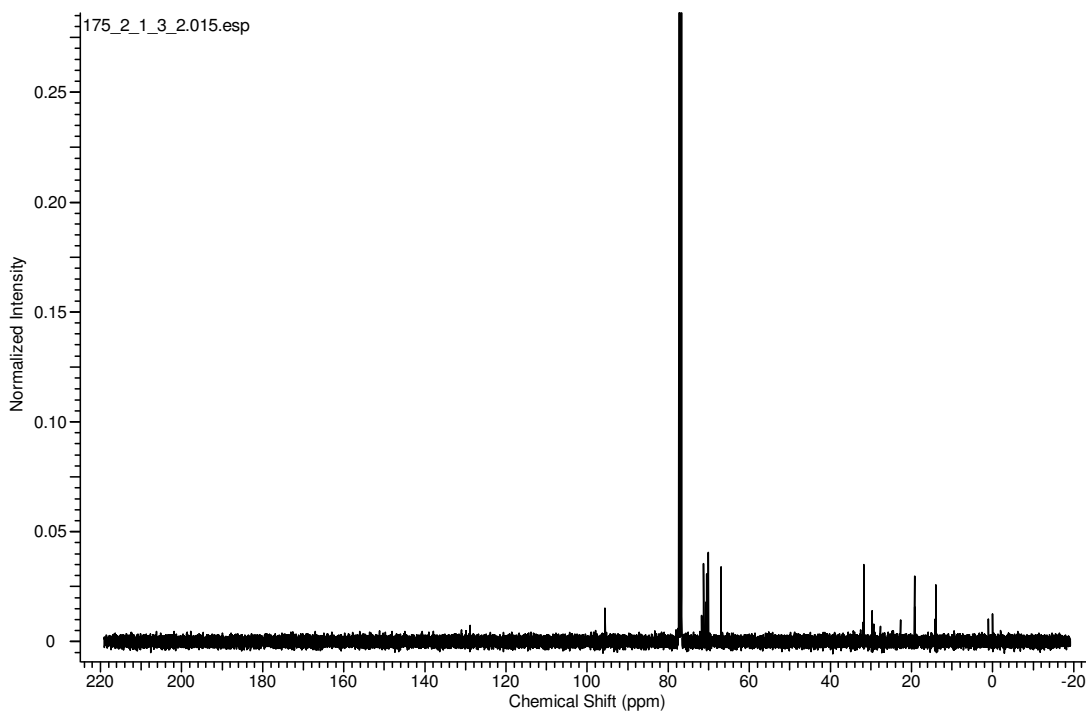


Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração 2 da linhagem *Nostoc* sp. CENA175, 125 MHz, CDCl_3

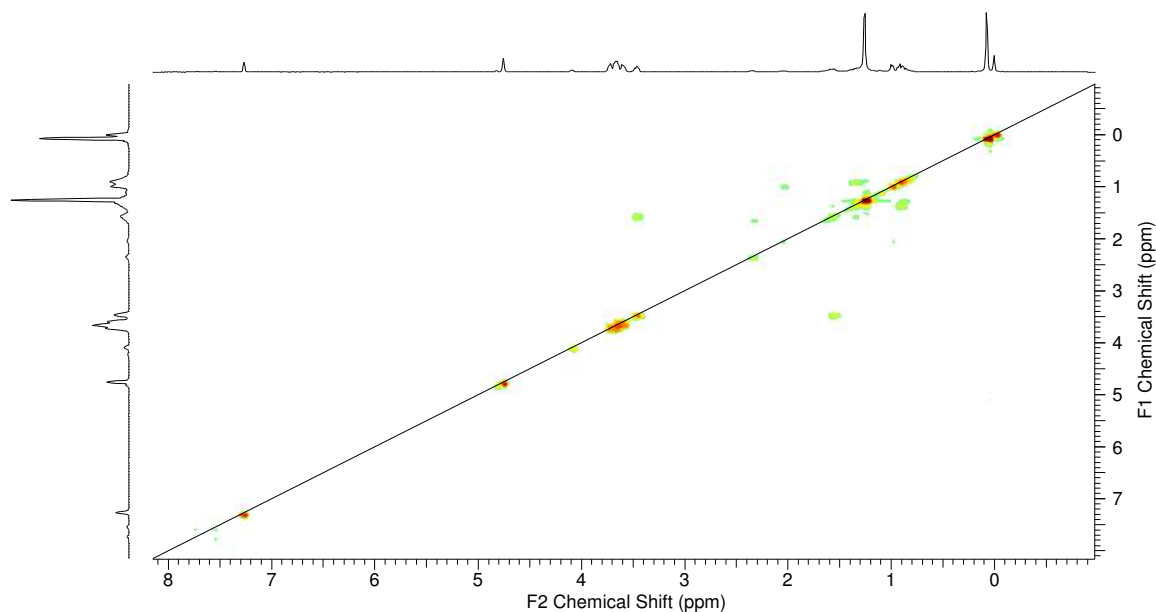


Figura 32 - Espectro de RMN de experimento COSY ^1H - ^1H da fração 2 da linhagem *Nostoc* sp. CENA175, 500 MHz, CDCl_3

O espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H (Figura 32) apresenta as correlações entre os sinais presentes na região entre 3,44-3,72 ppm com aqueles correspondentes a metilenos (CH_2) em torno de 2,00 ppm, indicando fortemente que estes sinais pertencem a mesma molécula, ou seja, um derivado de ácido graxo contendo grupos metoxílicos e hidroxílicos como substituintes da cadeia alifática. Sendo assim, a partir do momento que forem conduzidas análises dos espectros bidimensionais HMQC (correlação ^1H - ^{13}C), mais informações poderão ser obtidas quanto às duas possíveis moléculas presentes nesta fração.

2.3.3.3 *Cyanobium* sp. CENA157: fracionamento do extrato bruto

As análises de Cromatografia em Camada Delgada da linhagem *Cyanobium* sp. CENA157 revelaram que a fração 3 encontra-se com alto grau de pureza, enquanto que a fração 5 possui uma substância majoritária (Figura 33). A fração 3 do extrato desta linhagem também apresenta um perfil de ácido graxo, mas com cadeia carbonílica saturada e sem a presença de hidrogênios ligados a heteroátomos. O mesmo padrão é confirmado para a fração 5 (Figuras 34 e 35). Entretanto, as frações mais promissoras são a 8-9, uma vez que o espectro de RMN de ^1H apresenta uma riqueza de sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oximetilênicos ou oximetilílicos e o sinal em 8,45 ppm (Figura 36), característico de hidrogênios ligados a nitrogênios; além dos sinais em torno de 4,40 ppm, ambos observados frequentemente para peptídeos.

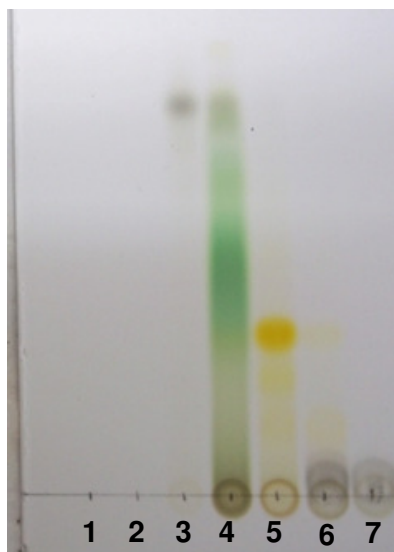


Figura 33 - Placa cromatográfica das frações 1 a 7 da linhagem *Cyanobium* sp. CENA157. Visualização da placa sem revelador

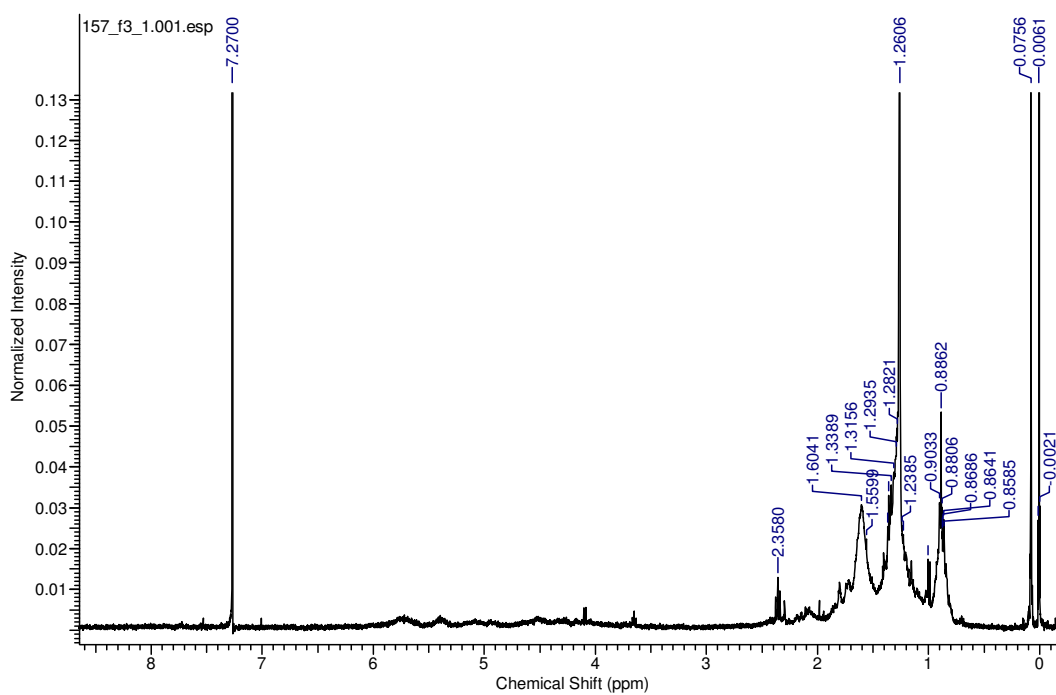


Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H da fração 3 da linhagem *Cyanobium* sp. CENA157, CDCl_3 , 500MHz

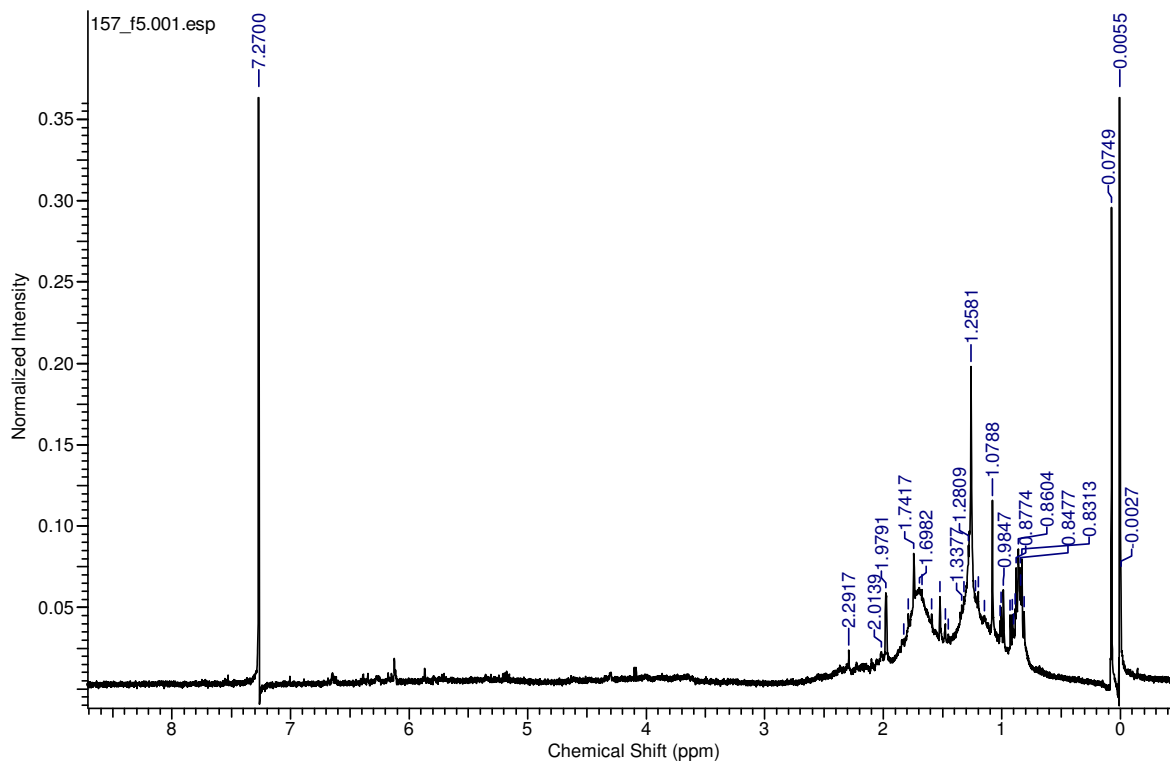


Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H da fração 5 da linhagem *Cyanobium* sp. CENA157, CDCl_3 , 500MHz

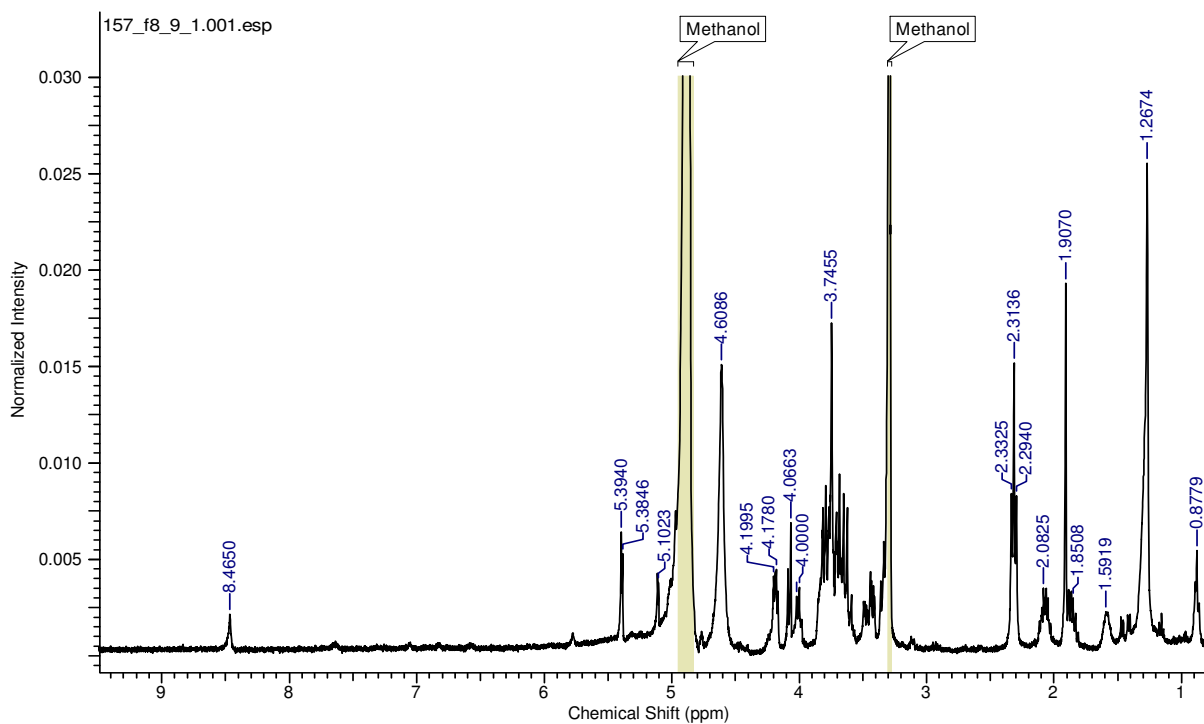


Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H das frações 8 e 9 (agrupadas) da linhagem *Cyanobium* sp. CENA157, CD_3OD , 500MHz

2.3.3.4 *Nostoc* sp. CENA184: fracionamento do extrato bruto

O espectro de RMN de ^1H do extrato bruto da linhagem *Nostoc* sp. CENA184 (Figura 37) não apresenta indícios da presença de anéis aromáticos, indicando que esta linhagem de cianobactéria não é rica na produção de substâncias aromáticas ou que os compostos aromáticos tenham anéis totalmente substituídos por grupos ao invés de hidrogênio. Entretanto, este extrato e suas frações também apresentaram um perfil de substâncias alifáticas, mas como há uma diversidade de sinais em regiões variadas do espectro de RMN de ^1H (Figuras 37, 38 e 39), pode-se especular que tais sinais não sejam de moléculas alifáticas constituídas exclusivamente de carbonos e hidrogênios e, sim heteroátomos.

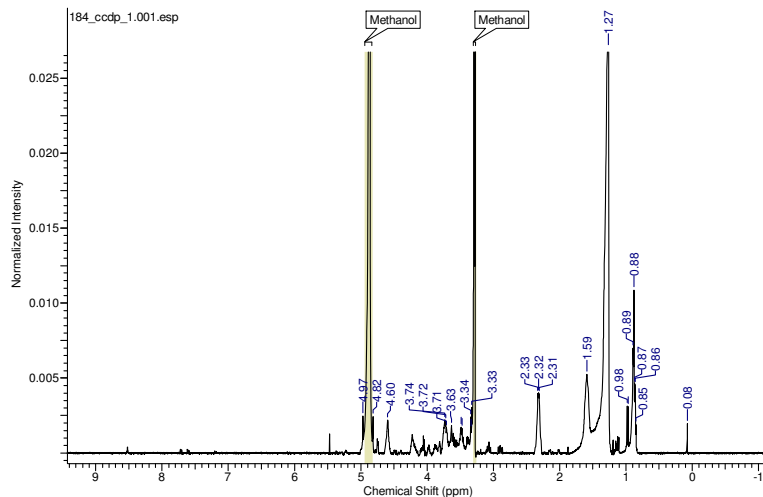


Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto da linhagem *Nostoc* sp. CENA184, CD_3OD , 500MHz

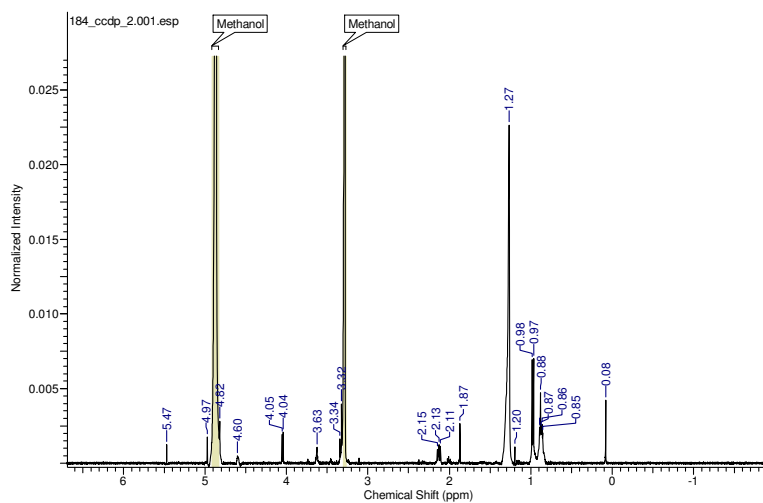


Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H da fração 2 da linhagem *Nostoc* sp. CENA184, CD_3Cl_3 , 500MHz

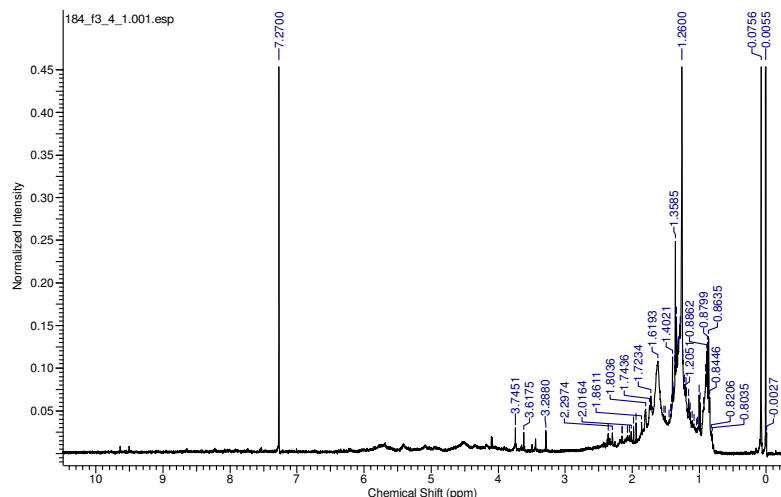


Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H da fração 3 da linhagem *Nostoc* sp. CENA184, CD_3Cl_3 , 500MHz

Nas frações 8 e 9 da linhagem *Nostoc* sp. CENA184, cujo espectro de RMN de ^1H é apresentado na figura 40, novamente há indícios de peptídeos. Tais indícios levarão a estudos mais refinados destas duas frações, visto que os peptídeos são na maioria das vezes bioativos.

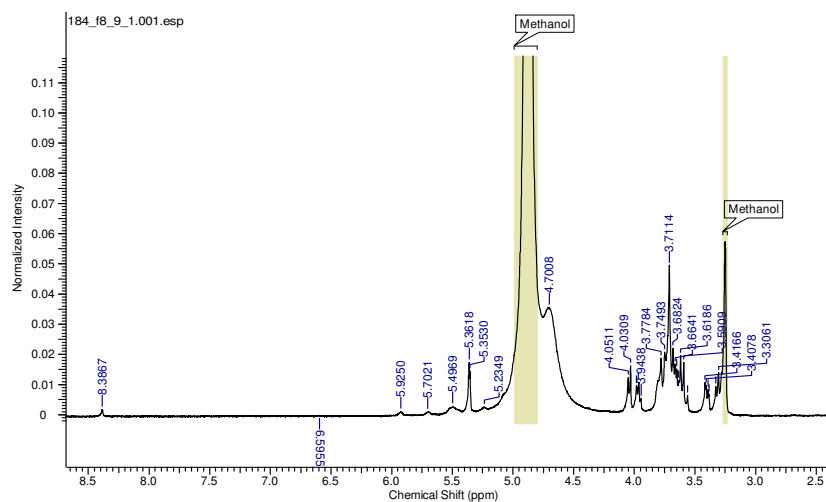


Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H da fração 8-9 da linhagem *Nostoc* sp. CENA184, CD_3OD , 500MHz

2.3.4 Ensaios de Bioatividade

2.3.4.1 Ensaios antimicrobianos

Os ensaios de bioatividade realizados revelaram que 48 % (24) dos extratos metanólicos, obtidos das linhagens de cianobactérias em estudo, inibiram o crescimento de ao menos um isolado de bactéria e/ou levedura analisada (Tabela 16). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Jaki et al. (1999), que encontrou 48.8 % de atividade

antimicrobiana ao analisar extratos de cianobactérias isoladas de ambiente terrestre e aquático. Silva-Stenico e colaboradores (2011) também observaram resultados semelhantes, ao registrarem 50 % de atividade antimicrobiana de extratos obtidos de linhagens de cianobactérias de diferentes biomas brasileiros.

Os extratos metanólicos das linhagens *Cyanobium* sp. CENA142 e *Cyanobacterium* sp. CENA169 inibiram o crescimento de seis bactérias patogênicas, incluindo espécies pertencentes aos grupos gram-negativo e gram-positivo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. pasteurii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia indica*, *Enterococcus faecalis* e *Micrococcus luteus*. Os extratos de *Chlorogloea* sp. CENA150 e *Cyanobium* sp. CENA164 inibiram, respectivamente, os crescimentos de *Candida* sp. e *Serratia indica*, e *Candida* sp. e *Salmonella typhimurium*. O crescimento da levedura *Candida* sp. foi ainda inibido por extratos de outras doze linhagens: *Leptolyngbya* sp. CENA134, *Cyanobium* sp. CENA136, *Nodosilinea* sp. CENA137, *Cyanobium* sp. CENA138, *Synechococcus* sp. CENA140, *Cyanobium* sp. CENA141, *Synechococcus* sp. CENA143, *Nodosilinea* sp. CENA144, *Cyanobium* sp. CENA146, *Cyanobium* sp. CENA148, *Chlorogloea* sp. CENA152 e *Cyanobium* sp. CENA181. Adicionalmente, *Serratia indica*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* tiveram seu crescimento inibido por ao menos um dos extratos analisados (Tabela 16).

Tabela 16 - Ensaio de bioatividade conduzido com extratos metanólicos de linhagens de cianobactérias contra bactérias e levedura patogênicas

(conclusão)

<i>Synechococcus</i> sp. CENA179	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Synechococcus</i> sp. CENA180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cyanobium</i> sp. CENA181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Cyanobium</i> sp. CENA185	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Chlorogloea</i> sp. CENA150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Chlorogloea</i> sp. CENA152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Cyanobacterium</i> sp. CENA169	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Oxynema</i> sp. CENA135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Nodosilinea</i> sp. CENA137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Nodosilinea</i> sp. CENA144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Nodosilinea</i> sp. CENA147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA156	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Nodosilinea</i> sp. CENA167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nodosilinea</i> sp. CENA183	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. CENA158	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. CENA159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. CENA160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. CENA175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microchaete</i> sp. CENA176	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. CENA184	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp. CENA186	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aResultado negativo para inibição do crescimento microbiano; ^bResultado positivo para a inibição do crescimento microbiano

2.3.4.2 Ensaios com linhagens de células tumorais

Os extratos etanólicos e de diclorometano (DCM) obtidos do sobrenadante de quatro isolados de cianobactérias (*Oxynema* sp. CENA135, *Cyanobium* sp. CENA154, *Synechococcus* sp. CENA170 e *Synechococcus* sp. CENA174) foram analisados em relação ao potencial de inibição de duas linhagens de células tumorais (células de tumor de pulmão murino 3LL e células de tumor de cólon murino CT-26). As figuras 41 e 42 apresentam os resultados para os testes realizados com extratos de DCM e as figuras 43 e 44 apresentam os resultados das análises com os extratos etanólicos. Os extratos das linhagens *Synechococcus* sp. CENA170 e *Synechococcus* sp. CENA174 apresentaram efeito de estímulo ao desenvolvimento das duas linhagens de células tumorais, e os dados não são apresentados. Todos os extratos testados foram analisados em quatro concentrações, 0,8; 4,0; 20 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

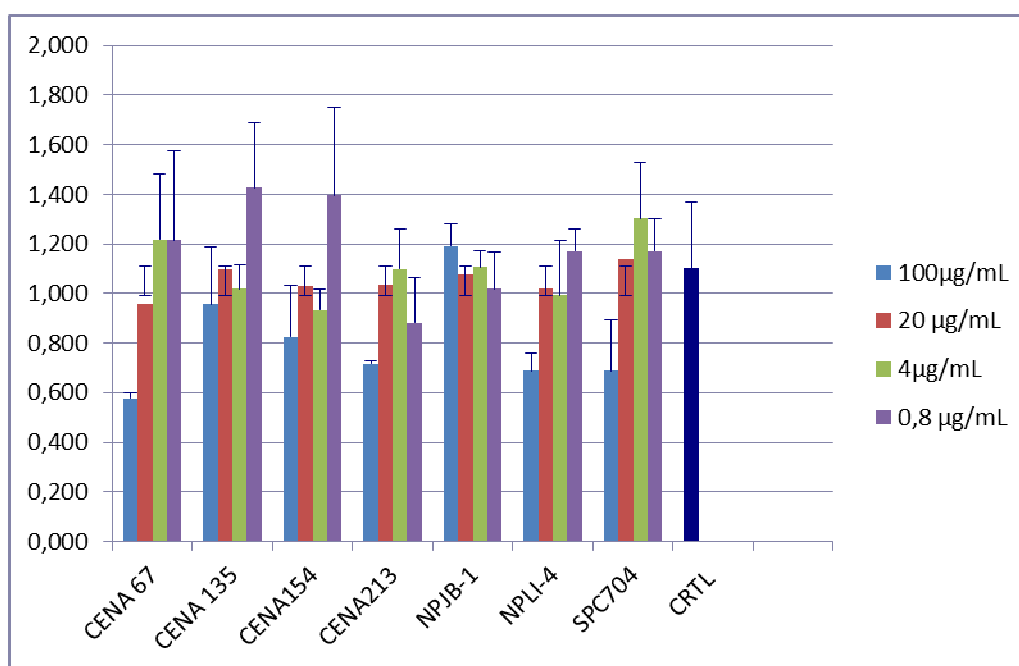


Figura 41 - Atividade citotóxica de extratos de DCM sobre células 3LL (tumor de pulmão murino). O eixo Y apresenta os valores de densidade óptica obtidos em leitura a 540 nm. No eixo X os códigos indicam as linhagens de cianobactérias analisadas. Deste estudo: *Oxynema* sp. CENA135 e *Cyanobium* sp. CENA154. As barras indicam os valores de desvio-padrão obtidos após médias das três repetições realizadas para cada concentração de extrato. CRTL: controle

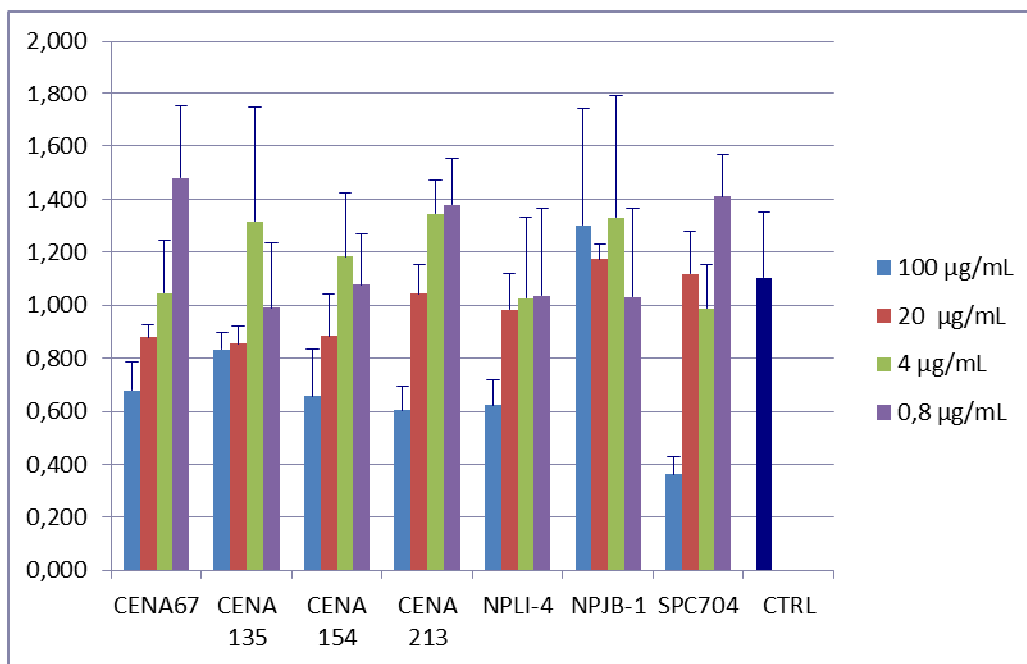


Figura 42 - Atividade citotóxica de extratos DCM sobre células CT26 (tumor de cólon murino). O eixo Y apresenta os valores de densidade óptica obtidos em leitura a 540 nm. No eixo X os códigos indicam as linhagens de cianobactérias analisadas. Deste estudo: *Oxynema* sp. CENA135 e *Cyanobium* sp. CENA154. As barras indicam os valores de desvio-padrão obtidos após médias das três repetições realizadas para cada concentração de extrato. CTRL: controle

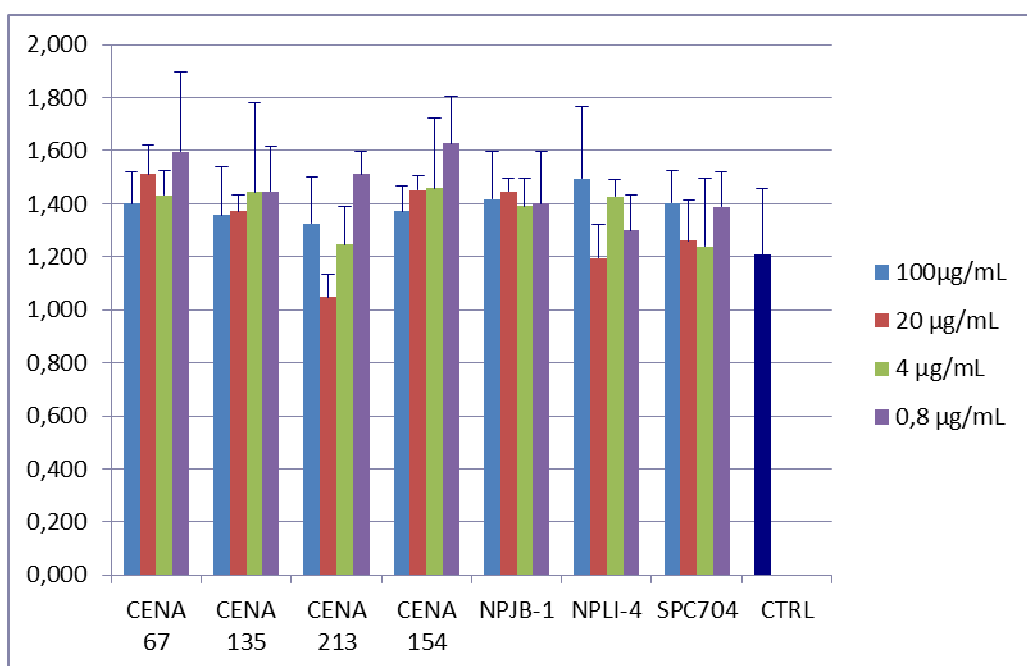


Figura 43 - Atividade citotóxica de extratos etanólicos sobre células 3LL (tumor de pulmão murino). O eixo Y apresenta os valores de densidade óptica obtidos em leitura a 540 nm. No eixo X os códigos indicam as linhagens de cianobactérias analisadas. Deste estudo: *Oxynema* sp. CENA135 e *Cyanobium* sp. CENA154. As barras indicam os valores de desvio-padrão obtidos após médias das três repetições realizadas para cada concentração de extrato. CTRL: controle

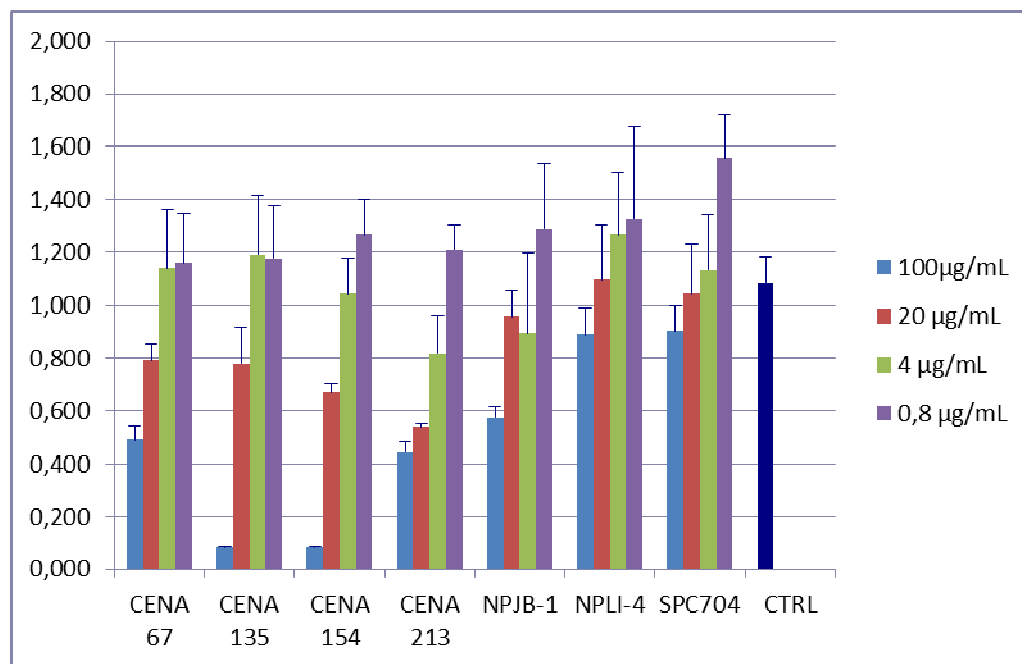


Figura 44 - Atividade citotóxica de extratos etanólicos sobre células CT26 (tumor de cólon murino). O eixo Y apresenta os valores de densidade óptica obtidos em leitura a 540 nm. No eixo X os códigos indicam as linhagens de cianobactérias analisadas. Deste estudo: *Oxynema* sp. CENA135 e *Cyanobium* sp. CENA154. As barras indicam os valores de desvio-padrão obtidos após médias das três repetições realizadas para cada concentração de extrato. CTRL: controle

O extrato de DCM da linhagem *Oxynema* sp. CENA135 não apresentou efeito inibitório significativo sobre as células 3LL (Figura 41). Já o extrato da linhagem *Cyanobium* sp. CENA154 ocasionou uma inibição moderada quando usado na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 41). Os mesmos extratos inibiram moderadamente o crescimento das células CT-26 a partir da concentração de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 42). De outro modo, os extratos etanólicos destas duas linhagens não apresentaram efeito inibitório sobre as células 3LL (Figura 43). As maiores atividade inibitórias foram observadas quando células CT-26 foram submetidas a tratamento com extratos etanólicos. As concentrações de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos extratos de *Oxynema* sp. CENA135 *Cyanobium* sp. CENA154 apresentaram atividades moderada e forte, respectivamente (Figura 44).

Nos ensaios realizados com as linhagens de células tumorais glioma (U251), câncer de mama (MCF-7) e câncer de pulmão – *non small cells* – (NCI-H460), os extratos de diclorometano (DCM) foram mais ativos do que os extratos etanólicos (Tabela 17). O extrato de DCM obtido do isolado *Cyanobium* sp. CENA136 apresentou os melhores resultados quanto ao potencial de inibição do crescimento das linhagens tumorais, sendo necessários 7,8, 27,1 e $14,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extrato para inibir, respectivamente, 50 % do crescimento das células U251, MCF-7 e NCI-H460. O extrato de DCM da linhagem *Synechococcus* sp. CENA143

também apresentou resultados promissores, embora maiores concentrações do extrato sejam necessárias para atingir o mesmo efeito.

Tabela 17 - Concentração de extratos de DCM e etanol ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), obtidos culturas de cianobactérias, suficiente para inibir em 50% o crescimento celular (GI_{50})

Linhagens de células tumorais	U251	MCF-7	NCI-H460
	GI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
Doxorrubicina (controle positivo)	0,029	0,025	0,025
Extrato de DCM			
<i>Cyanobium</i> sp. CENA 136	7,8	27,1	14,0
<i>Synechococcus</i> sp. CENA 143	32,9	69,7	53,2
<i>Chlorogloea</i> sp. CENA 152	>250	>250	>250
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA 155	>250	>250	>250
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA 156	157,5	>250	>250
<i>Nostoc</i> sp. CENA 158	100,6	206,5	>250
Extrato etanólico			
<i>Cyanobium</i> sp. CENA 136	>250	>250	>250
<i>Synechococcus</i> sp. CENA 143	>250	>250	>250
<i>Chlorogloea</i> sp. CENA 152	>250	>250	>250
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA 155	>250	>250	>250
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA 156	>250	>250	>250
<i>Nostoc</i> sp. CENA 158	>250	>250	>250

Algumas substâncias produzidas por cianobactérias já foram isoladas e caracterizadas como drogas com atividade antitumoral. As criptoficinas (depsipeptídeo), produzidas por *Nostoc* sp. GSV 224 são potentes drogas anticâncer (SCHWARTZ et al., 1990; TRIMURTULU et al., 1994; BARROW et al., 1995). Mais de 25 congêneros já foram descritos (EGGEN; GEORG, 2002), os quais agem impedindo o ciclo mitótico via inibição da polimerização de tubulina. Outros compostos promissores com atividade anticâncer são a boroficina, isolada de *Nostoc linkia* (HEMSCHEIDT et al., 1994); *tolyporphyn*, isolada de *Tolypothrix nodosa* (MORLIÈRE et al., 1998) e curacina A, isolada de *Lyngbya majuscula*, e que é capaz de inibir o crescimento de linhagens de células tumorais de cólon, rins e mama (GERWICK et al., 1994; VERDIER-PINARD et al., 1998; WHITE; HANSELMANN; WARDROP, 1999; JONES et al., 2010). No entanto, muitas dessas drogas precisam ser melhor estudadas, uma vez que existem outros efeitos indesejados causados por tais moléculas. Novos ensaios deverão ser realizados com frações dos extratos que apresentaram os maiores efeitos inibitórios, com o objetivo de identificar a(s) possível(eis) substância(s) envolvidas no processo antiproliferativo das células tumorais. Desta forma, as linhagens *Oxynema* sp. CENA135, *Cyanobium* sp. CENA136, *Synechococcus* sp. CENA143 e *Cyanobium* sp. CENA 154 serão alvos de estudos mais detalhados.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo apresenta resultados sobre a filogenia de linhagens unicelulares de cianobactérias isoladas de ambiente costeiro do Estado de São Paulo. Estes resultados juntamente com os obtidos anteriormente (GENUÁRIO, 2010; SILVA, 2010) permitiram o entendimento da relação evolutiva de 50 isolados de ambiente costeiro, bem como um melhor posicionamento taxonômico dos mesmos. Com isso, evidenciou-se pelo posicionamento filogenético das sequências das linhagens identificadas como *Cyanobium* spp. (clado A-1) e *Cyanobacterium* sp. CENA169 (clado C) que elas podem representar novas entidades genéricas.

Os dados de prospecção de genes evidenciaram o potencial de produção de inibidores de protease e cianotoxinas. Destes, foi possível amplificar e sequenciar genes envolvidos nas vias de biossíntese de microviridina, microcistina e saxitoxina. Em relação à produção de microviridina, as linhagens investigadas neste estudo têm potencial para produzirem três variantes ainda não descritas. O potencial genético para produção de microcistina e saxitoxina indica a possibilidade destas cianotoxinas estarem presentes nos ambiente costeiros do Estado de São Paulo, indicando uma preocupação adicional em relação à qualidade das águas.

Duas possíveis substâncias foram isoladas a partir de extratos obtidos de linhagens de cianobactérias. Uma destas é, provavelmente, um ácido graxo do grupo Omega-3, tornando a linhagem que o produz promissora em estudos para suplementação alimentar. A segunda substância, ainda em processo de caracterização, tem uma porção aromática além de uma possível porção alifática. Outros extratos analisados se mostraram promissores quanto à presença de substâncias nitrogenadas, como peptídeos, os quais são promissoras fontes de moléculas bioativas.

Os extratos obtidos das linhagens em estudo foram, ainda, ativos na inibição do crescimento de bactérias e fungo patogênicos. Alguns extratos foram também ativos contra o crescimento de células tumorais. Estes resultados permitem selecionar estas linhagens para uma melhor caracterização dos seus extratos e efeitos.

Desta forma, pode se concluir que, além de diversas filogeneticamente e taxonomicamente, as cianobactérias isoladas de ambiente costeiro do estado de São Paulo constituem fontes promissoras de inibidores de proteases, cianotoxinas e outras substâncias bioativas com ação antimicrobiana, antifúngica e antitumoral.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.G.; DUGGAN, P.S. Heterocyst and akinete differentiation in Cyanobacteria. **New Phytologist**, London, v. 144, p. 1-33, 1999.
- ALTERMANN, W.; KAZMIERCZAK, J. Archean microfossils: a reappraisal of early life on earth. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 611-617, 2003.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANDREOTE, A.P.D. **Filosfera da Mata Atlântica: isolamento e sistemática de cianobactérias, bioprospecção e caracterização da comunidade diazotrófica**. 2014. 151p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- ANGERMAYR, S.A.; HELLINGWERF, K.J.; LINDBLAD, P.; DE MATTOS, M.J.T. Energy biotechnology with cyanobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 20, p. 257-263, 2009.
- ARGUETA, C.; YUKSEK, K.; PATEL, R.; SUMMERS, M.L. Identification of *Nostoc punctiforme* akinete-expressed genes using differential display. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 748-757, 2006.
- BAETA-NEVES, M.H.C.; TRIBUZI, D. Les cyanophycées de la mangrove de la “Ponta do Pai Vitório” de la região de Cabo Frio (RJ, Brésil). **Acta Biológica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 14, p. 29-52, 1992.
- BANKER, R.; CARMELI, S.; HADAS, O.; TELTSCH, B.; PORAT, R.; SUKENIK, A. Identification of cylindrospermopsin *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Phycology**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 613-616, 1997.
- BARBARAUS, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; GADEMANN, K. Potent and selective antiplasmodial activity of the cyanobacterial alkaloid nostocarboline and its dimers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 18, p. 4413-4415, 2008.
- BARROW, R.A.; HEMSCHIEDT, T.; LIANG, J.; PAIK, S.; MOORE, R.E.; TIUS, M.A. Total synthesis of cryptophycins—revision of the structures of cryptophycin-A and cryptophycin-C. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 117, p. 2479-2490, 1995.
- BERMAN, F.W.; GERWICK, W.H.; MURRAY, T.F. Antillatoxin and kalkitoxin, ichthyotoxins from the tropical cyanobacterium *Lyngbya majuscula*, induce distinct temporal patterns of NMDA receptor-mediated neurotoxicity. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 1645-1648, 1999.
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BRANCO, L.H.Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso Island, São Paulo State, Brazil. 1. Chroococales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 80, p. 99-111, 1996.

BRANCO, L.H.Z.; MOURA, A.N.; SILVA, A.C.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Biodiversidade e considerações biogeográficas das Cyanobacteria de uma área de manguezal do estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Porto Alegre, v. 17, p. 585-596, 2003.

BRITO, A.; RAMOS, V.; SEABRA, R.; SANTOS, A.; SANTOS, C. L.; LOPO, M.; FERREIRA, S.; MARTINS, A.; MOTA, R.; FRAZÃO, B.; MARTINS, R.; VASCONCELOS, V.; TAMAGNINI, P. Culture-dependent characterization of cyanobacterial diversity in the intertidal zones of the Portuguese coast: A polyphasic study. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 35, p. 110-119, 2012.

BUDINOFF, C.R.; HOLLIBAUGH, J.T. Ecophysiology of a Mono Lake picocyanobacterium. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 52, n. 6, p. 2482-2495, 2007.

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

CADEL-SIX, S.; DAUGA, C.; CASTETS, A.M.; RIPPKA, R.; BOUCHIER, C.; MARSAC, N.T.; WELKER, M. Halogenase genes in non-ribosomal peptide synthetase gene clusters of *Microcystis* (Cyanobacteria): sporadic distribution and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 9, p. 2031-2041, 2008.

CARVALHO, L.R.; COSTA-NEVES, A.; CONSERVA, G.A.A.; BRUNETTI, R.L.; HENTSCHKE, G.S.; MALONE, C.F.S.; TORRES, L.M.B.; SANT'ANNA, C.L.; RANGEL, M. Biologically active compounds from cyanobacterial extracts: *in vivo* and *in vitro* aspects. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Londrina, v. 23, n. 3, p.471-480, 2013.

CASTENHOLZ, R.W. Culturing methods for cyanobacteria. **Methods in Enzymology**, New York, v. 167, p. 68-93, 1988.

CHEN, J.L.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M.L. Structures of Nostocyclophanes A-D. **J. Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 56, p. 4360-4364, 1991.

CHOI, H.; OH, S.K.; YIH, W.; CHIN, J.; KANG, H.; RHO, J.R. Cyanopeptoline CB071: a cyclic depsipeptide isolated from the freshwater cyanobacterium *Aphanocapsa* sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 56, p. 1191-1193, 2008.

CRISPINO, L.M.B.; SANT'ANNA, C.L. Cianobactérias marinhas bentônicas de ilhas costeiras do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 639-956, 2006.

DEY, B.; LERNER, D.L.; LUSSO, P.; BOYD, M.R.; ELDER, J.H.; BERGER, E.A. Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking HIV type1 gp120 interaction with CD4 co receptor and inhibition of diverse enveloped viruses. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, p. 4562-4569, 2000.

DÍAZ, M.F.; GAVÍN, J.A. Characterization by NMR of Ozonized methyl linoleate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 513-518, 2007.

DOGO, C.R.; BRUNI, F.M.; ELIAS, F.; RANGEL M.; PANTOJA, P. A.; SANT'ANNA, C.L.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CARVALHO L.R. Inflammatory effects of the toxic cyanobacterium *Geitlerinema amphibium*. **Toxicon**, Oxford, v. 58, p. 464-470, 2011.

DUGAN, P.J. **Conservacion de humedales: un análisis de temas de actualidad y acciones necesarias**. Gland: IUNC, 1992. 100 p.

EGGEN, M.; GEORG, G.I. The cryptophycins: their synthesis and anticancer activity. **Medicinal Research Reviews**, New York, v. 22, p. 85-101, 2002.

ERNST, A.; BECKER, S.; WOLLENZIEN, U.I.A.; POSTIUS, C. Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. **Microbiology**, Reading, v. 149, p. 217-228, 2003.

ERSMARK, K.; DEL VALLE, J.R.; HANESSIAN, S. Chemistry and biology of the aeruginosin family of serine protease inhibitors. **Angewandte Chemie International**. Weinheim, v. 47, p. 1202-1223, 2008.

ESPER, B.; BADURA, A.; RÖGNER, M. Photosynthesis as a power supply for (bio-) hydrogen production. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, p. 543-549, 2006.

ETCHEGARAY, A.; RABELLO, E.; DIECKMANN, R.; MOON, D.H.; FIORE, M.F.; VON DÖREN, H.; TSAI, S.M.; NEILAN, B.A. Algicide production by the filamentous cyanobacterium *Fischerella* sp. CENA19. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 16, p. 237-243, 2004.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FERRÃO-FILHO, A.S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. Rio de Janeiro, v. 13, p. 272-312, 2009.

FERRÃO-FILHO, A.S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. **Marine Drugs**, Basel, v. 9, n. 12, p. 2729-2772, 2011.

FEWER, D.P.; ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; LAAKSO, K.; WANG, H.; SIVONEN, K. Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 183, 2007.

FEWER, D.P.; JOKELA, J.; PAUKKU, E.; ÖSTERHOLM, J.; WAHLSTEN, M.; PERMI, P.; AITIO, O.; ROUHIAINEN, L.; GOMEZ-SAEZ, G.V.; SIVONEN, K. New structural variants of aeruginosin produced by the toxic bloom forming, Cyanobacterium *Nodularia spumigena*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, e. 73618, 2013.

FIORE, M.F.; ALVARENGA, D.O.; SILVA-STENICO, M.E. Genética de cianotoxinas. **Microbiologia in Foco**, São Paulo, v. 12, p. 24-35, 2011.

FIORE, M.F.; MOON, D.H.; TSAI, S.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous Cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 39, p. 159-169, 2000.

FIORE, M.F.; GENUÁRIO, D.B.; SILVA, C.S.P.; SHISHIDO, T.K.; MORAES, L.A.B.; CANTÚSIO-NETO, R.; SILVA-STENICO, M.E. Microcystin production by a freshwater spring Cyanobacterium of the genus *Fischerella*. **Toxicon**, Oxford, v. 53, p. 754-761, 2009.

FLORES, E.; HERRERO, A. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. **Nature Reviews**, London, v. 8, p. 39-49, 2010.

FRAZÃO, B.; MARTINS, R.; VASCONCELOS, V. Are Known cyanotoxins involved in the toxicity of picoplanktonic and filamentous north Atlantic marine cyanobacteria? **Marine Drugs**, Basel, v. 8, p. 1908-1919, 2010.

FUJII, K.; SIVONEN, K.; ADACHI, K.; NOGUCHI, K.; SANO, H.; HIRAYAMA, K.; SUZUKI, M.; HARADA, K. Comparative study of toxic and non-toxic cyanobacterial products: novel peptides from toxic *Nodularia spumigena* AV1. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 38, p. 5525-5528, 1997.

FULLER, N. J.; MARIE, D.; PARTENSKY, F.; VAULOT, D.; POST, A. F.; SCANLAN, D. J. Clade-Specific 16S Ribosomal DNA oligonucleotides reveal predominance of a single marine *Synechococcus* clade throughout a stratified water column in the red sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, p. 2430-2443, 2003.

GARCIA-PICHEL, F.; NÜBEL, U.; MUYZER, G. The phylogeny of unicellular extremally halotolerant cyanobacteria. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 169, p. 469-482, 1998.

GENUÁRIO, D.B. **Cianobactérias em ecossistemas de manguezais**: isolamento, morfologia e diversidade genética. 2010. 97 p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

GENUÁRIO, D.B.; SILVA-STENICO, M.E.; WELKER, M.; MORAES, L.A.B.; FIORE, M.F. Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. **Toxicon**, Oxford, v. 55, p. 846-854, 2010.

GERWICK, W.H.; TAN, L.T.; SITACHITTA, N. Nitrogen-containing metabolites from marine cyanobacteria. In: CORDELL, G.A. (Ed.). **The alkaloids**: chemistry and biology. San Diego: Academic Press, 2001. v. 57, p. 75-184.

GERWICK, W.H.; PROTEAU, P.J.; NAGLE, D.G.; HAMEL, E.; BLOKHIN, A.; SLATE, D.L. Structure of curacin A, a novel antimiotic, antiproliferative, and brine shrimp toxic natural product from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 59, p. 1243-1245, 1994.

GESNER-APTER, S.; CARMELI, S. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 72, p. 1429–1436, 2009.

GIOVANNONI, S.J.; TURNER, S.; OLSEN, G.J.; BARNS, S.; LANE, D.J.; PACE, N.R. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 3584-3592, 1988.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GUTIÉRREZ, M.; PEREIRA, A.R.; DEBONSI, H.M.; LIGRESTI, A.; DI-MARZO, V.; GERWICK, W.H. Cannabinomimetic lipid from a Marine Cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 74, p. 2313-2317, 2012.

HANSON, J.R. **Natural products: the secondary metabolites**. London: Royal Society of Chemistry, 2003. 147 p.

HEMSCHIEDT, T.; PUGLISI, M.P.; LARSEN, L.K.; PATTERSON, G.M.L.; MOORE, R.E.; RIOS, J.L.; CLARDY, J. Structure and biosynthesis of borophycin, a new boeseken complex of boric-acid from a marine strain of the blue-green-alga *Nostoc linckia*. **Journal of Organic Chemistry**, Easton, v. 59, p. 3467-3471, 1994.

HERDMAN, M.; CASTENHOLZ, R.W.; ITEMAN, I.; WATERBURY, J.B.; RIPPKA, R. The Cyanobacteria: subsection 1. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2001. p. 493–514.

HOFF-RISSETI, C. **Moléculas bioativas e filogenia de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis***. 2012. 171 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

HOFF-RISSETI, C.; DÖRR, F.A.; SCHAKER, P.D.C.; PINTO, E.; WERNER, V.R.; FIORE, M.F. Cylindrospermopsin and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 8, e. 74238, 2013.

ISHIDA, K.; WELKER, M.; CHRISTIANSEN, G.; CADEL-SIX, S.; BOUCHIER, C.; DITTMANN, E.; HERTWECK, C.; DE MARSAC, N.T. Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. Baltimore, v. 75, p. 2017-2026, 2009.

ISHITSUKA, M.O.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H.; KAYA, K.; WATANABE, M.F. Microviridin, a novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. **Journal of American Chemical Society**, Easton, v. 112, p. 8180–8182, 1990.

JAKI, B.; ORJALA, J.; BURGI, H.R.; STICHER, O. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 37, p. 138–143, 1999.

JONES, A.C.; MONROE, E.A.; EISMAN, E.B.; GERWICK, L.; SHERMAN, D.H.; GERWICK, W.H. The unique mechanistic transformations involved in the biosynthesis of modular natural products from marine cyanobacteria. **Natural Products Report**, Cambridge, v. 27, p. 1048-1065, 2010.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. Biology of mangroves and mangroves ecosystems. **Advances in Marine Biology**. London, v. 40, p. 81-251, 2001.

KELLMANN, R.; MIHALI, T.K.; JEON, Y.J.; PICKFORD, R.; POMATI, F.; NEILAN, B.A. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 4044-4053, 2008.

KANEKIYO, K.; LEE, J.-B.; HAYASHI, K.; TAKENAKA, H.; HAYAKAWA, Y.; ENDO, S.; HAYASHI, T. Isolation of an antiviral polysaccharide, nostoflan, from a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagilliforme*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, p. 1037–1041, 2005.

KNOLL, A.H. Cyanobacteria and earth history. In: HERRERO, A.; FLORES, E. (Ed.). **The Cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution**. Norfolk: Caister Academic, 2008. p. 1-19.

KOMÁREK, J. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). **Hydrobiologia**. Dordrecht, v. 639, p. 245–259, 2010.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl, H.; Gärtner, G.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Stuttgart: Gustave Fisher, 1999. v. 19/1, p. 1-548.

KOMÁREK, J.; HAUER, T. **CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera**. 2013. Disponível em: <<http://www.cyanodb.cz>>. Acesso em: 06 abr. 2014.

KOMÁREK, J.; KOPECKÝ, J.; CEPÁK, V. Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*. **Cryptogamie. Alagologie**, Paris, v. 20, p. 209-222, 1999.

KOMÁREK, J.; CEPÁK, V.; KASTOVSKÝ, J.; SULEK, J. What are the cyanobacterial genera *Cyanothece* and *Cyanobacterium*? Contribution to the combined molecular and phenotype taxonomic evaluation of cyanobacterial diversity. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 113, p. 1-36, 2004.

KORELUSOVÁ, J.; KAŠTOVSKY, J.; KOMÁREK, J. Heterogeneity of the cyanobacterial genus *Synechocystis* and description of a new genus, *Geminocystis*. **Journal of Phycology**, Oxford, v. 45, p. 928-937 2009.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: Wiley, 1991. p. 115–175.

LEÃO, P.N.; ENGENE, N.; ANTUNES, A.; GERWICK, W.H.; VASCONCELOS, V. The chemical ecology of cyanobacteria. **Natural Products Report**, Cambridge, v. 29, p. 372-391, 2012.

LEÃO, P.N.; COSTA, M.; RAMOS, V.; PEREIRA, A.R.; FERNANDES, V.C.; DOMINGUES, V.F.; GERWICK, W.H.; VASCONCELOS, V.M.; MARTINS, R. Antitumor activity of Hierridin B, a Cyanobacterial secondary metabolite found in both filamentous and unicellular marine strains. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, e. 69562, 2013.

LEGANÉS, F. Genetic evidence that hepA gene is involved in the normal deposition of the envelop of both heterocyst and akinete in *Anabaena variabilis* ATCC 29413. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 123, p. 63-68, 1994.

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. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 72, p. 14-17, 2009.

LOMBARDO, M.; PINTO, F.C.R.; VIEIRA, J.M.S.; HONDA, R.Y.; PIMENTA, A.M.C.; BEMQUERER, M.P.; CARVALHO, L.R.; KIYOTA, S. Isolation and structural characterization of microcystin-LR and three minor oligopeptides simultaneously produced by *Radiocystis fernandoii* (Chroococcales, Cyanobacteriae): a Brazilian toxic cyanobacterium. **Toxicon**, Oxford, v. 47, p. 560-566, 2006.

LOPES, V.R.; FERNÁNDEZ, N.; MARTINS, R.F.; VASCONCELOS, V. Primary screening of the bioactivity of brackishwater Cyanobacteria: toxicity of crude extracts to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, p. 471-482, 2010.

LOPES, V.R.; RAMOS, V.; MARTINS, A.; SOUSA, M.; WELKER, M.; ANTUNES, A.; VASCONCELOS, V.M. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 73, p. 7-16, 2012.

MAGARVEY, N.A.; BECK, Z.Q.; GOLAKOTI, T.; DING, Y.; HUBER, U.; HEMSCHEIDT, T.K.; ABELSON, D.; MOORE, R.E.; SHERMAN, D.H. Biosynthetic characterization and chemoenzymatic assembly of the cryptophycins: potent anticancer agents from *Nostoc* cyanobionts. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 1, n. 12, p. 766-779, 2006.

MALLOY, K.L.; SUYAMA, T.L.; ENGENE, N.; DEBONSI, H.; CAO, Z.; MATAINAHO, T.; SPADAFORA, C.; MURRAY, T.F.; GERWICK, W.H. Credneramides A and B: neuromodulatory phenethylamine and isopentylamine derivatives of a vinyl chloride-containing fatty acid from cf. *Trichodesmium* sp. nov. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, p. 60-66, 2012.

MARINLIT. **Marine Natural Product Bibliography Software (update February 2012)**. ChristChurch: University of Canterbury, 2012.

MARTINS, R.; FERNANDEZ, N.; BEIRAS, R.; VASCONCELOS, V.M. Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine *Synechocystis* and *Synechococcus* cyanobacterial strains in marine invertebrates. **Toxicon**, Oxford, v. 50, p. 791-799, 2007.

MARTINS, J.; SAKER, M.L.; MOREIRA, C.; WELKER, M.; FASTNER, J.; VASCONCELOS, V.M. Peptide diversity in strains of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Portuguese water supplies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 82, p. 951-961, 2009.

MCCHESENEY, J.D.; VENKATARAMAN, S.K.; HENRI, J.T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, New York, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

MCPHAIL, K.L.; CORREA, J.; LININGTON, R.G.; GONZÁLES, J.; ORTEGA-BARRÍA, E.; CAPSON, T.L.; GERWICK, W.H. Antimalarial linear lipopeptides from panamanian strain of marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 70, p. 984-988, 2007.

MEEKS, J.C.; CAMPBELL, E.L.; SUMMERS, M.L.; WONG, F.C. Cellular differentiation in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 178, p. 395-403, 2002.

MIHALI, T.K.; KELLMAN, R.; MUENCHHOFF, J.; BARROW, K.D.; NEILAN, B.A. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 716-722, 2008.

MOORE, R.E. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 16, p. 134-143, 1996.

MORENO, J.; VARGAS, M.Á.; RODRÍGUEZ, H.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047. **Biomolecular Engineering**, New York, v. 20, p. 191-197, 2003.

MORLIÈRE, P.; MAZIÈRE, J-C.; SANTUS, R.; SMITH, C. D.; PRINSEP, M.R.; STOBBE, C.C.; FENNING, M.C.; GOLBERG, J.L.; CHAPMAN, J.D. Tolyporphin: a natural product from Cyanobacteria with potent photosensitizing activity against tumor cells in vitro and in vivo. **Cancer Research**, Baltimore, v. 58, p. 3571-3578, 1998.

MUGNAI, M.A.; MARGHERI, M.C.; SILI, C.; TURICCHIA, S.; SOLDATI, E.; MAFFETTONE, E.; FUNARI, E.; SCARDALA, S.; DI BRIZIO, M.; VENTURA, S. The cyanobacterial community of Lake Trasimeno. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 128, p. 37-64, 2008.

MURAKAMI, M.; OKITA, Y.; MATSUDA, H.; OKIND, T.; YAMAGUCHI, K. Aeruginosin 298-A, a thrombin and trypsin inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-298). **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 35, p. 3129-3132, 1994.

MURAKAMI, M.; SHIN, H.J.; MATSUDA, H.; ISHIDA, K.; YAMAGUCHI, K. A cyclic peptide, anabaenopeptin B, from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. **Phytochemistry**, New York, v. 44, p. 449-452, 1997.

MURAKAMI, M.; ISHIDA, K.; OKINO, T.; OKITA, Y.; MATSUDA, H.; YAMAGUCHI, K. Aeruginosins 98-A and B, trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-98). **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 36, p. 2785–2788, 1995.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 17, p. 373-384, 1996.

NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L.L.; HAWKINS, P.R.; COX, P.T.; GOODMAN, A.E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, p. 693-697, 1997.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 70, n. 30, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Report**, Cambridge, v. 17, p. 215-234, 2000.

NOGLE, L.M.; MARQUEZ, B.L.; GERWICK, W.H. Novel cyclic dodecapeptide from a Papua New Guinea *Lyngbya majuscula*. **Organic Letters**, Washington, v. 5, p. 3-6, 2003.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 63, p. 3327-3332, 1997.

OHKI, K.; YAMADA, K.; KAMIYA, M.; YOSHIKAWA, S. Morphological, Phylogenetic and Physiological Studies of Pico-Cyanobacteria isolated from the Halocline of a Saline Meromictic Lake, Lake Suigetsu, Japan. **Microbes and Environments**, Tokyo, v. 27, n. 2, p. 171-178, 2012.

OHKI, K.; KAMIYA, M.; HONDA, D.; KUMAZAWA, S.; HO, K.K. Morphological and Phylogenetic studies on unicellular diazotrophic cyanobacteria (Cyanophytes) isolated from the coastal waters around Singapore. **Journal of Phycology**, Oxford, v. 44, p. 142-151, 2008.

OKINO, T.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, K. New microviridins, elastase inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron**, London, v. 51, p. 10679-10686, 1995.

OKUMURA, H.S.; PHILMUS, B.; PORTMANN, C.; HEMSCHEIDT, T.K. Homotyrosine-containing cyanopeptolins 880 and 960 and anabaenopeptins 908 and 915 from *Planktothrix agardhii* CYA 126/8. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 72, p. 172-176, 2009.

OLIVERA-RAMÍREZ, R.; CORIA-CEDILLO, M.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; PONCE-NOYOLA, T.; RÍOS-LEAL, E. Growth evaluation and bioproducts characterization of *Calothrix* sp. **Bioresource Technology**, Essex, v. 72, p. 121-124, 2000.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy**. 4th ed. Belmont: Thomson Learning, 2012. 745 p.

PLOUTNO, A.; CARMELI, S.J. Nostocyclone A, a novel antimicrobial cyclophane from the cyanobacterium *Nostoc* sp. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, p. 1524-1526, 2000.

RANTALA, A.; FEWER, D.P.; HISBERGUES, M.; ROUHIAINEN, L.; VAITOMAA, J.; BÖRNER, T.; SIVONEN, K. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 101, p. 568–573, 2004.

RANGEL, M.; BRUNETTI, R.L.; GARCIA, A.N.; CAMBUI, C.C.N.; CONSERVA, G.A.A.; NEVES, A.C.; SANT'ANNA, C.L.; CARVALHO, L.R. Acute effects of three *Geitlerinema* spp. (Cyanobacteria) extracts administered in mice: symptoms and histopathological aspects. **Phytochemistry Reviews**, London, v. 12, p. 543-553 2013.

RANGEL, M.; MARTINS, J.C.G.; GARCIA, A.N.; CONSERVA, G.A.A.; COSTA-NEVES, A.; SANT'ANNA, C.L.; CARVALHO, L.R. Analysis of the toxicity and histopathology induced by the oral administration of *Pseudanabaena galeata* and *Geitlerinema splendidum* (Cyanobacteria) extracts to mice. **Marine Drugs**, Basel, v. 12, p. 508-524, 2014.

RESHEF, V.; CARMELI, S. New microviridins from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron**, London, v. 62, p. 7361–7369, 2006.

RIGONATO, J. **Diversidade de cianobactérias em manguezais do Estado de São Paulo**. 2010. 107 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, London, v. 111, p. 1-61, 1979.

ROBERTSON, B.R.; TEZUKA, N.; WATANABE, M.M. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 861–871, 2001.

ROHRLACK, T.; CHRISTOFFERSEN, K.; HANSEN, P.E.; ZHANG, W.; CZARNECKI, O.; HENNING, M.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; NEILAN, B.A.; KAEBERNICK, M. Isolation, characterization, and quantitative analysis of microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 29, p. 1757–1770, 2003.

ROLDÁN, M.; RAMÍREZ, M.; DEL CAMPO, J.; HERNÁNDEZ-MARINÉ, M.; KOMÁREK, J. *Chalicogloea cavernícola* gen. nov., sp. nov. (Chroococcales, Cyanobacteria, from low-light aerophytic environments: combined molecular, phenotypic and ecological criteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 63, p. 2326-2333, 2013.

ROUNGE, T.B.; ROHRLACK, T.; TOOMING-KLUNDERUD, A.; KRISTENSEN, T.; JAKOBSEN, K.S. Comparison of cyanopeptolin genes in *Planktothrix*, *Microcystis*, and *Anabaena* strains: evidence for independent evolution within each genus. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 7322-7330, 2007.

RUNNEGAR, M.T.C.; KONG, S.; ZHONG, Y.; GE, J.; LU, S.C. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, Philadelphia, v. 201, p. 235–241, 1994.

RUPPRECHT, J.; HANKAMER, B.; MUSSGUG, J. H.; ANANYEV, G.; DISMUKES, C.; KRUSE, O. Perspectives and advances of biological H₂ production in microorganisms. **Applied Microbiological and Biotechnology**, Berlin, v. 72, p. 442-449, 2006.

SAKER, M.L.; EAGLESHAM, G.K. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 1065–1077, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1626 p.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L.; DE-ROSA, M.M.P.T. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, New York, v. 3, n. 4, p. 561-570, 2001.

SCHOPF, J.W. Microfossils of the early Archean apex chert: new evidence of the antiquity of life. **Science**, Washington, v. 260, p. 640-646, 1993.

SCHWARTZ, R.E.; HIRSCH, C.F.; SESIN, D.F.; FLOR, J.E.; CHARTRAIN, M.; FROMTLING, R.E.; HARRIS, G.H.; SALVATORE, M.J.; LIESCH, J.M.; YUDIN, K. Pharmaceuticals from cultured algae. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 5, p. 113-123, 1990.

SCHWARZER, D.; FINKING, R.; MARAHIEL, M.A. Nonribosomal peptides: from genes to products. **Natural Products Reports**, London, v. 20, p. 275-287, 2003.

SHI, T., FALKOWSKI, P.G. Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 105, p. 2510-2515, 2008.

SILVA, C.S.P. **Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal do Estado de São Paulo e identificação de produtos Naturais**. 2010. 199 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SILVA-STENICO, M.E.; CANTUSIO NETO, R.; ALVES, I.R.; MORAES, L.A.B.; SHISHIDO, T.K.; FIORE, M.F. Hepatotoxin microcystin-LR extraction optimization. **Journal of Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 535-542, 2009.

SILVA-STENICO, M.E.; KANENO, R.; ZAMBUZI, F.A.; VAZ, M.G.M.V.; ALVARENGA, D.O.; FIORE, M.F. Natural products from Cyanobacteria with antimicrobial and antitumor activity. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Schiphol v. 14, p. 820-828, 2013.

SILVA-STENICO, M.E.; RIGONATO, J.; LEAL, M.G.; VAZ, M.G.M.V.; ANDREOTE, A.P.D.; FIORE, M.F. Non-ribosomal halogenated protease inhibitors from Cyanobacterial isolates as attractive drug targets. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 19, p. 5205-5213, 2012.

SILVA-STENICO, M.E.; SILVA, C.S.P.; LORENZI, A.S.; SHISHIDO, T.K.; ETCHEGARAY, A.; LIRA, S.P.; MORAES, L.A.B.; FIORE, M.F. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 166, p.161-175, 2011.

SINGH, R.K.; TIWARI, S.P.; RAI, A.K.; MOHAPATRA, T.M. Cyanobacteria: an emerging source of drug discovery. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 1, p. 1-12, 2011.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health significance, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p. 41-111.

SOGGE, H.; ROHRLACK, T.; ROUNGE, T.B.; SØNSTEBØ, J.H.; TOOMING-KLUNDERUD, A.; KRISTENSEN, T.; JAKOBSEN, K.S. Gene flow, recombination, and selection in Cyanobacteria: population structure of geographically related *Planktothrix* freshwater strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 2, p. 508–515, 2013.

STACKEBRANDT, P.H.A.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, p. 846-849, 1994.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

TAN, L.T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. **Phytochemistry**, New York, v. 68, p. 954-979, 2007.

_____. Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 22, p. 659-676, 2010.

TANDEAU de MARSAC, N. Differentiation of hormogonia and relationship with other biological process. In: BRYANT, D.A. (Ed.). **The molecular biology of Cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p.825-842.

- TILLET, D.; DITTMAN, E.; ERHARD, M.; VON DOHREN, H.; BORNER, T.; NEILAN, B.A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: as integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemical Biology**, Cambridge, v. 7, p. 753-764, 2000.
- TRIMURTULU, G.; OHTANI, I.; PATTERSON, G.M.L.; MOORE, R.E.; CORBETT, T.H.; VALERIOTE, F.A.; DEMCHIK, L. Total structures of cryptophycins, potent antitumor depsipeptides from the blue-green alga *Nostoc* sp. strain GSV 224. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 116, p. 4729-4737, 1994.
- TRIPATHI, A.; PUDDICK, J.; PRINSEP, M.R.; LEE, P.P.F.; TAN, L.T. Hantupeptin A, a cytotoxic cyclic depsipeptide from a Singapore collection of *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 72, p. 29-32, 2009.
- TÜNEY, I.; ÇADIRCI, B.H.; ÜNAL, D.; SUKATAR, A. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 30, p. 171-175, 2006.
- VERDIER-PINARD, P.; LAI, J.-Y.; YOO, H.-D.; YU, J.; MARQUEZ, B.; NAGLE, D.G.; NAMBU, M.; WHITE, J.D.; FALCK, J.R.; GERWICK, W.H.; DAY, B.W.; HAMEL, E. Structure-activity analysis of the interaction of Curacin A, the potent colchicine site antimitotic agent, with tubulin and effects of analogs on the growth of MCF-7 breast cancer cells. **Molecular Pharmacology**, New York, v. 53, p. 62-76, 1998.
- WAYNE, L.G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, L.H.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M.P.; TRUPER, H.G. Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 463-464, 1987.
- WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides – nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 30, p. 530-563, 2006.
- WHITE, J.D.; HANSELMANN, R.; WARDROP, D.J. Synthesis of epiantillatoxin, a stereoisomer of the potent ichthyotoxin from *Lyngbya majuscula*. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 121, p. 1106-1107, 1999.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1985.
- WU, M.; OKINO, T.; NOGLE, L.M.; MARQUEZ, B.L.; WILLIAMSON, R.T.; SITACHITTA, N.; BERMA, F.W.; MURRAY, T.F.; MCGOUGH, K.; JACOBS, R. Structure, synthesis, and biological properties of kalkitoxin, a novel neurotoxin from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 122, p. 12041-12042, 2000.
- XIONG, C.; O'KEEFE, B.R.; BYRD, R.A.; MCMOHAN, J.B. Potent anti-HIV activity of scytovirin domain 1 peptide. **Peptides**, New York, v. 27, p. 1668-1675, 2006.

ZELÍK, P.; LUKESOVÁ, A.; VOLOSHKO, L.N.; STYS, D., KOPECKÝ, J. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in cyanobacteria of the genus *Nostoc*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, London, v. 24, n. 2, p. 531-536, 2009.

ZIEMERT, N.; ISHIDA, K.; LIAIMER, A.; HERTWECK, C.; DITTMANN, E. Ribosomal synthesis of tricyclic depsipeptides in bloom-forming Cyanobacteria. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 47, p. 7756-7759, 2008.

ZIEMERT, N.; ISHIDA, K.; WEIZ, A.; HERTWECK, C.; DITTMANN, E. Exploiting the natural diversity of microviridina gene cluster for discovery of novel tricyclic depsipeptides. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 11, p. 3568-3574, 2010.

ANEXOS

ANEXO A

Meios de cultura usados no cultivo das linhagens de cianobactérias analisada neste estudo

MEIO ASN-III

Componentes	Concentração no meio (g/L)	Final
1.NaCl	12,5	
2.MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0	
3.KCl	0,25	
4.NaNO ₃	0,75	
5.K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,02	
6.MgSO ₄ .7H ₂ O	3,5	
7.CaCl ₂ .2H ₂ O	0,5	
8.Ácido Cítrico	0,003	
9.Citrato de Amônio Férrico	0,003	
10.Na ₂ EDTA	0,0005	
11.Na ₂ CO ₃	0,02	
12. Micronutrientes	1 mL	

Completar o volume com H₂O deionizada para 1000 mL

Autoclavar e ajustar o pH após autoclavagem e esfriamento: 7,5

Solução de Micronutrientes

H₃BO₃: 2,86 g/L

MnCl₂.4H₂O: 1,81 g/L

ZnSO₄.7H₂O: 0,222 g/L

Na₂MoO₄.2H₂O: 0,39 g/L

CuSO₄.5H₂O: 0,079 g/L

Co(NO₃)₂.6H₂O: 0,049 g/L

MEIO SWBG-11 – Sea Water BG-11

Componentes	Estoque (g/L)	Usar por L	Concentração final (g/L)
1.NaCl	-	-	12,5
2.MgCl ₂ .6H ₂ O	-	-	1,0
3 KCl	-	-	0,25
4.NaNO ₃	150	10 ml	1,5
5.K ₂ HPO ₄	40	1 ml	0,04
6.MgSO ₄ .7H ₂ O	75	1 ml	0,075
7.CaCl ₂ .2H ₂ O	36	1 ml	0,036
8.Ácido Cítrico	6	1 ml	0,006
9.Citrato de Amônio Férrico	6	1 ml	0,006
10.Na ₂ EDTA	1	1 ml	0,001
11.Micronutrientes	-	1 ml	-
12.Carbonato de sódio	20	1 ml	0,02

Completar o volume com H₂O deionizada para 1000 mL

Autoclavar e ajustar o pH após autoclavagem e esfriamento: 7,4

Nota: Se fizer aeração com CO₂, deve-se adicionar 1 M HEPES, pH 8,0 numa concentração final de 10 a 20 mM (ou seja, 10 a 20 ml por litro).

Solução de Micronutrientes

H₃BO₃: 2,86 g/l

MnCl₂.4H₂O: 1,81 g/l

ZnSO₄.7H₂O: 0,222 g/l

Na₂Mo₄.2H₂O: 0,39 g/l

CuSO₄.5H₂O: 0,079 g/l

Co(NO₃)₂.6H₂O: 0,049 g/l

MEIO MN

Componentes	Concentração Final no meio (g/L)
1.NaNO ₃	0,75
2.K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,02
3.MgSO ₄ .7H ₂ O	0,038
4.CaCl ₂ .2H ₂ O	0,018
5.Ácido Cítrico	0,003
6.Citrato de Amônio Férrico	0,003
7.Na ₂ EDTA	0,0005
8.Na ₂ CO ₃	0,02
12. Micronutrientes	1 mL
13. Água marinha	750 mL

Completar o volume com H₂O deionizada para 1000 mL

Autoclavar e ajustar o pH após autoclavagem e esfriamento: 8,3

Nota: Se fizer aeração com CO₂, deve-se adicionar 1 M HEPES, pH 8,0 numa concentração final de 10 a 20 mM (ou seja, 10 a 20 ml por litro).

Solução de Micronutrientes

H₃BO₃: 2,86 g/L

MnCl₂.4H₂O: 1,81 g/L

ZnSO₄.7H₂O: 0,222 g/L

Na₂Mo₄.2H₂O: 0,39 g/L

CuSO₄.5H₂O: 0,079 g/L

Co(NO₃)₂.6H₂O: 0,049 g/L

ANEXO B

Sequências de RNAr 16S de linhagens de cianobactérias unicelulares.

>*Cyanobium* sp. CENA 142 (1408 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGATGGCGGAC
GGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTCAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTAA
TACCCCATATGCCGAGAGGTGAAACGAATTTGCGCTGAGGATGAGCCCGCGTCTGATTAGCT
AGTTGGTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCA
ATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACCT
CTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCCGTGCCA
GCAGCCGCGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGC
AGGCGGCCTTGTAAGTCCGTTGTTAAAGCGTGGAGCTCAACTCCATTTTCAGCAATGGAACT
ATGAGGCTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
TCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAA
GCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGG
TGTCGGGGGAATCGACCCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCTGGGGAGT
ACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTG
GTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAATCCCTTGGAA
ACGAGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCG
TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAGT
TGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCAT
CATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGGGCT
CGCGAGAGTCAGCAAATCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCT
ACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACTCCAACCC
TTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>*Cyanobium* sp. CENA 145 (1409 pb)

GATGATCGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGA
CGGGTGAAGTAAACGCGTGAAGAATCTGCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTA
ATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCTTGGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGC
TAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGAGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC
AATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACC
TCTTTTCTCAGGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTATTTCCGTGCC
AGCAGCCGCGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCG
CAGGCGGCCTTGAAAGTCTGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAAAC
TACAAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
ATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGACGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAA
AGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTGGCCGTAAACGATGAACACTAG
GTGTCGGGGAAATCGACCCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCTGGGGAG
TACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGT
GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAACCCCTTGGAA
AACGAGGGGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAG
TTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCA
TCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAC

TCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCC
 TACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGG
 CCTCGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAACC
 CTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>*Cyanobium* sp. CENA 146 (1409 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGAAACGGCCGCTA
 ATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCCTTGGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGC
 TAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC
 AATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACC
 TCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCCGTGCC
 AGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCG
 CAGGCGGCCTTGAAAGTCTGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAAAC
 TACAAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
 ATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAA
 AGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTTGCCGTAACGATGAACACTAG
 GTGTCCGGGGGAATCGACCCCCCTCGGTGTCTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCTGGGGAG
 TACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGT
 GGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAACCCTTGA
 AACGAGGGGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTC
 GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAG
 TTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCA
 TCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAAC
 TCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCC
 TACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGG
 CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAACC
 CTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>*Cyanobium* sp. CENA 154 (1410 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGAAACGGCCGCTA
 ATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCCTTGGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGC
 TAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC
 AATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACC
 TCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCCGTGCC
 AGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCG
 CAGGCGGCCTTGAAAGTCTGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAAAC
 TACAAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
 ATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAA
 AGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTTGCCGTAACGATGAACACTAG
 GTGTCCGGGGGAATCGACCCCCCTCGGTGTCTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCTGGGGAG
 TACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGT
 GGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAACCCTTGA
 AACGAGGGGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTC
 GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAG
 TTTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTC

ATCATGCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAA
 CTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGC
 CTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGG
 GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAAC
 CTTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>*Cyanobium* sp. CENA 157 (1410 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGGAACGGCCGCTA
 ATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTATCGCCTTGGGATGAGCTCGCGTCTGATTAG
 CTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCG
 CAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGCCTCTGGGCTGTAAAC
 CTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAAGTACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCGCTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCC
 GCAGGCGGCCTTGAAAGTCTGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTAGCAATGAAA
 CTAGAAGGCTAGAGTGTGGTAGGGCAGAGGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 TATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGCCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGA
 AAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTGGCCGTAAACGATGAACACTA
 GGTGTCGGGGGAATCGACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGGA
 GTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCACACAAGCGGTGGAGTATG
 TGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAATCCCTTGG
 AAAGTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
 CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGA
 GTTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTC
 ATCATGCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAA
 CTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGC
 CTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGG
 GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAAC
 CTTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>*Cyanobium* sp. CENA 168 (1409 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTCAGGAGGGGGATAACGGCTGGAACGGCCGCTA
 ATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAACGAATTTGCGCTGAGGATGAGCCCGCGTCTGATTAGC
 TAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC
 AATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGCCTCTGGGCTGTAAACC
 TCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCGCTGCC
 AGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCG
 CAGGCGGCCTTGTAAGTCCGTTGTTAAAGCGTGGAGCTCAACTCCATTTAGCAATGAAAAC
 TATGAGGCTTGAAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
 ATCGGGAAGAACACCAGCGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAA
 AGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTGGCCGTAAACGATGAACACTAG
 GTGTCGGGGGAATCGACCCCTCGGTGTCGACGCAACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGGAG
 TACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACACAAGCGGTGGAGTATGT
 GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAATCCCTTGG
 AACGAGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
 GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAG

TTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCA
 TCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGC
 TCGCGAGAGTCAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCC
 TACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGG
 CCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACTCCAACC
 CTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>*Synechococcus* sp. CENA 171 (1410 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATCCTTCGGGATAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTGAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTA
 ATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAACGAGTCATCGCCTTAGGATGAGCCCGCGTCTGATTAG
 CTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
 GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCG
 CAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTCTGGGCTGTAAAC
 CTCTTTTCTCAAGGAAGAAGACATGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCCGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCC
 GCAGGCGGCCTTGTAAGTCTGCTGTCAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATATCGGCAGTGGAAA
 CTGTAAGGCTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 TATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATCACTGACGCTCATGGACGA
 AAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTA
 GGTGTCGGGGGAATCGACCCCTCGGTGTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGA
 GTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATG
 TGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCGAACCCCTGAG
 AAATCGGGGGTGCCTTCGGGAACGCGGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
 CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTCA
 GTTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTC
 ATCATGCCCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAG
 CTCGCGAGAGTTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGC
 CTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGG
 GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACTCCAAC
 CCTCTGGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

ANEXO C

Sequências dos genes *mdnA*, *mdnB*, *mdnC*, *mcyG* e *sxtI* traduzidas para aminoácidos.

>*mdnA Cyanobium* sp. CENA136

TMAYPNDQQGKAHPFFARFLSVSKEESSIRSPSPEHEFDTRKYPDWEEF

>*mdnA Cyanobium* sp. CENA143

NMAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSPEPTYGVTFKYPDWEDF

>*mdnA Cyanobium* sp. CENA148

NMAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSPEPTYGVTFKYPDWEDF

>*mdnA Cyanobium* sp. CENA151

TMAYPNDQQGKAHPFFARFLSVSKEESSIRSPSPEHEFDTRKYPDWEEF

>*mdnA Nostoc* sp. CENA159

TMAYPNDQQGKAHPFFARFLSVSKEESSIRSPSPEHEFDTRKYPDWEEF

>*mdnA Nostoc* sp. CENA160

NMAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSPEPTYGVTFKYPDWEDF

>*mdnA Cyanobium* sp. CENA163

NMAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSPEPTYGVTFKYPDWEDF

>*mdnA Cyanobium* sp. CENA166

HMAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSPEPTYGVTFKYPDWEITSEF

>*mdnA Cyanobium* sp. CENA168

NMAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSPEPTYGVTFKYPDWEDF

>*mdnA Cyanobacterium* sp. CENA169

TMAYPNDQQGKAHPFFARFLSVSKEESSIRSPSPEHEFDTRKYPDWEEF

>*mdnA Synechococcus* sp. CENA174

TMAYPNDQQGKAHPFFARFLSVSKEESSIRSPSPEHEFDTRKYPDWEEF

>mdnA *Nostoc* sp. CENA175

TMAYPNDQQGKAHPFFARFLSVSKEESSIRSPSPEHEFDTRKYPSDWEEF

>mdnA *Synechococcus* sp. CENA179

NMAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSPEPTYGVTFKYPSDWEDF

>mdnA *Nodosilinea* sp. CENA183

TMAYPNDQQGKALPFFARFLSVSKEESSIKSPSPEPTYGVTFKYPSDWEDF

>mdnA *Nostoc* sp CENA186

TMAYPNDQQGKAHPFFARILSVSKEESSIRSPSPEHEFDTRKYPSDWEEF

>mdnB *Cyanobium* sp. CENA136

GQRSWLDNLAQIEKAKNKLLQLRLASEVGLIIPPTLVTNNPDAAREFFSQVKGRMVSKLLTA
IAHSMESPEFFLYTSRVKAEDLEEAESLRYCPMVFQAEIPKQLELRIVVVNGQTFVGALESS
QYNHSAVGWRRPGIDPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANLGLNFGSDFILTPGGEYVFLEV
PGGEWGMLERDL

>mdnB *Cyanobium* sp. CENA143

SRSARWLDNLAQIEKAKNKLLQLRLASEVGLIIPPTLVTNNPDAAREFFSQVQGRMVSKLLT
AIARSMESPEFFLYTSRVKAEDLEEAESLRYCPMVFQAEIPKQLELRVVVNGQTFVGALES
SQYNNSAVDWRRPGIDPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANIGLNFGAFDFILTPGGEYVFLEV
NPCGEWGMLERDL

>mdnB *Cyanobium* sp. CENA148

LRSARWLDNLAQIEKAKNKLLQLRLASEVGLIIPPTLVTNNPDAAREFFSQVKGRMVSKLLT
AIAHSMESPEFFLYTSRVKAEDLEEAESLRYCPMVFQAEIPKQLELRIVVVNGQTFVGALES
SQYNHSAVGWRRPGIDPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANLGLNFGSDFILTPGGEYVFLEV
NPGGEWGMLERDL

>mdnB *Cyanobium* sp. CENA151

LRSARWLDNLAQIERAKNKLLQLRLAPEVGLIIPPTLVTNNPDAAREFFSQVQGRMVSKLLT
AIAHSMESPEFFLYTSRVKAEDLEEAESLRYCPMVFQAEIPKQLELRVVVNGQTFVGALES

SQYNHSAVDWRRPGIDLGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANLGLNFGAFDFILTPGGGEYVFLEV
NPGGEWGMLERDL D

>mdnB *Nostoc* sp. CENA159

LR SARWLDNLAQIEKAKNKLLQLRLASEVGLIIPPTLV TNNPDAAREFFSQVKGRMVSKLLT
AIAHSMESPEFFLYTSRVKAEDLVEAESLRYCPMV FQAEIPKQLELRIVV VNGQTFVGALES
SQYNHSAVGWRRPGIDPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANLGLNFGS FDFILTPGGGEYVFLEV
NPGGEWGMLERDL D

>mdnB *Nostoc* sp. CENA160

NKLLQLRLASEVGLIIPPTLV TNNPDAAREFFSQVKGRMVSKLLT AIAHSMESPEFFLYTSR
VKAEDLEEAESLRYCPMV FQAEIPKQLELRIVV VNGQTFVGALES SQYNHSAVGWRRPGIDP
GAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANLGLNFGS FDFILTPGGGEYVFLEV NPGGEWGMLERDL D

>mdnB *Cyanobium* sp. CENA163

LR SARWLDNLAQIEKAKNKLLQLRLASEVGLIIPPTLV TNNPDAAREFFSQVQGRMVSKLLT
AIARSMESPEFFLYTSRVKAEDLEEAESLRYCPMV FQAEIPKQLELRVV VVNGQTFVGALES
SQYNNSAVDWRRPGIDPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANI GLNFGAFDFILTPGGGEYVFLEV
NPCGEWGMLERDL D

>mdnB *Cyanobium* sp. CENA166

LR SARWLDNLAQIEKAKNKLLQLRMASEVGLIIPPTLV TNNPDAAREFFSQVKGRMVSKLLT
AIAHSMESPEFFLYTSRVKAEDLEEAESLRYCPMV FQAEIPKQLELRIVV VNGQTFVGALES
SQYNHSAVGWRRPGIDPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANLGLNFGS FDFILTPGGGEYVFLEV
NPGGEWGMLERDL D

>mdnB *Cyanobium* sp. CENA168

LR SARWLDNLAQIEKAKNKLLQLRLASEVGLIIPPTLV TNNPDAAREFFSQVKGRMVSKLLT
AIAHSMESPEFFLYTSRVKAEDLEEAESLRYCPMV FQAEIPKQLELRIVV VNGQTFVGALES
SQYNHSAVGWRRPGIDPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANLGLNFGS FDFILTPGGGEYVFLEV
NPGGEWGMLERDL D

>mdnB *Cyanobacterium* sp. CENA169

LRSARWLDNLAKIERAKNKLLQLRLASEVGLIIPPTLVTTNNPDAAREFFSQQVQGRMVSKLLT
 AIAHSMESPEFFLYTSRVKAEDLEEAESLRYCPMVFQAEIPKQLELRIVVVNGQTFVGALDS
 SQYNHSAVDWRRPGINPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANLGLNFGAFDFILTPGGEYVFLEV
 NPVGEWGMLERDLDD

>mdnB *Synechococcus* sp. CENA174

LRSARWLDNLAKIERAKNKLLQLRLASEVGLIIPPTLVTTNNPDAAREFFLSQQVQGRMVSKLLT
 AIAHSMESPEFFLYTSRVKAEDLEEAESLRHCPMVFQAEIPKQLELRIVVVNGQTFAGALDS
 SQYNHSAVDWRRPGINPGAWQHHALPDSSLQQLQIFMANLGLNFGAFDFILTPGGEYVFLEV
 NPVGEWGMLERDLDD

>mdnB *Nostoc* sp. CENA175

LRSARWLDNLAQIEKAKNKLLQLRLASEVGLIIPPTLVNNNPDAAREFFSQQVQGRMVSKLLT
 AIAHSMESPEFFLYTSRVKAEDLVEAESLRYCPMVFQAEIPKQLELRIVVVNGQTFVGALES
 SQYNHSAVGWRRPGIDPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANLGLNFGSDFILTPGGEYVFLEV
 NPGGEWGMLERDLDDL

>mdnB *Synechococcus* sp. CENA179

LRSARWLDNLAQIEKAKNKLLQLCLASEVGLIIPPTLVTTNNPDAAREFFSQQVQGRMVSKLLT
 AIAHSMESPEFFLYTSRVTAEDLEEAESLRYCPMVFQAEIPKQLELRVVVVNGQTFVGALES
 SQYNNSAVDWRRPGIDPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANIGLNFGAFDFILTPGGEYVFLEV
 NPCGEWGMLERDLDD

>mdnB *Nodosilinea* sp. CENA183

LRSARWLDNLAQIEKAKNKLLQLRLASEVGLIIPPTLATNNPDAAREFFSQQVQGRMVSKLLT
 AIAHSMESPEFFLYTSRVKAEDLEGAESLRYCPMVFQAEIPKQLELRIVVVNGQTFVGALDS
 SQYNHSAVDWRRPGINPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANLGLNFGAFDFILTPGGEYVFLEV
 NPVGEWGMLERDLDDL

>mdnB *Nostoc* sp. CENA186

LRSARWLDNLAQIEKAKNKLLRLRLASEVGLIIPPTLVTTNNPDAAREFFSQQVQGRMVSKLLT
 ATAHSMESEFFLYTSRVKAEDLEEAESLRYCPMVFQAEIPKQLELRIVVVNGQTFVGALES

SQYNHSAVGRPRPGIDPGAWQHHTLPDSSLQQLQIFMANLGLNFGSFDLILTPGGGEYVFLEV
NPGGEWGMLERDL

>mdnC *Cyanobium* sp. CENA136

TFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALHQWQWPYDLPKTIKQL
LELMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIF

>mdnC *Cyanobium* sp. CENA143

TFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALRQQWQWPYDLPKTIKQL
LELMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYSLF

>mdnC *Cyanobium* sp. CENA148

TFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALHQWQWPYDLPKTIKQL
LELMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIF

>mdnC *Cyanobium* sp. CENA151

TFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALHQWQWPYDLPKTIKQL
LELVKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIF

>mdnC *Nostoc* sp. CENA159

MTFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALHQWQWPYDLPKTIKQL
LLELMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIF

>mdnC *Nostoc* sp. CENA160

TFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQSDGAICDWRKEGRALHQWQWPYDLPKTIKQL
LELMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIF

>mdnC *Cyanobium* sp. CENA163

TFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALHQWQWPYDLPKTIKQL
LELMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIF

>mdnC *Cyanobium* sp. CENA166

TFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALHQWQWPYDLPKTIKQL
LELMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIF

>mdnC *Cyanobium* sp. CENA168

TFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALHQWQPYDLPKTIKQL
LELVKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIF

>mdnC *Cyanobacterium* sp. CENA169

TFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRAPHQQWQPYDLPKTIKQL
LELMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIF

>mdnC *Synechococcus* sp. CENA174

MTFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALHQWQPYDLPKTIKQL
LLGLMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIFLEINP

>mdnC *Nostoc* sp. CENA175

TFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALHQWLPYDLPKTIKQL
LELMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIFLEINP

>mdnC *Synechococcus* sp. CENA179

TFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDCAIYDWRKEGRALHQWQPYDLPKTIKQL
LELMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIF

>mdnC *Nodosilinea* sp. CENA183

MTFQENIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALHQWQPYDLPKTIKQL
LLELMKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIFLEINP

>mdnA *Nostoc* sp. CENA186

TFQGNIPKALELRITIVGEQIFTAAINSQQLDGAIYDWRKEGRALHQWQPYDLPKTIKQL
LES MKYFGLNYGAIDMIVTPDERYIF

>mcyG *Nostoc* sp. CENA175

TTAYVLPQLV NKSVEYVFTDISPVFLAKARQQFSEYEFVSYQTLNIEQTLTNKDITPHSFDI
VIAANVLHATENLSHAITNVKSL LKNHGLLILLEGTIPSIWIDLIFGLTEGWWR FQDKDLRP
HHPLISTTAWQSL LQQHGFTKVAKITPDSILPGALA

>sxtI *Leptolyngbya* sp. CENA134

RLQQGLGTDEQTLQGLSDRQAKQKVNLYSGAIADKQCQEHFSDLVPARTDKESLYTHIFRAV
 YATIAAHWYCPSPVPEHQFKAEIQGHFTLTQEGKLPNYAARSNYDDYAIIGDGQGNRDGRLG
 IKLGQVPHLEIIKACRRPQYHREAPPVVGTTGGETETAPTTLASEKSDHTLTDLNPQGKTTMTE
 PDAAKPTTKRPSVYADDLERITNLMAHQGITGTTADVLHALIQEFEDEAAQAERQEVKTARE
 FAQAINWFTQEIEAL

>sxtI *Nostoc* sp. CENA159

LNVDGEIVAAAQEERFSRKKHDARFPKSAIAYCLKQVNIQLREVDQIVFYDKPLVKFERLLE
 TYLAYAPKGLASFIAAMPVWLEEKLYLKSLKKELATLGDCKKTQLPQLLFTTEHHQAHAAASA
 FFPSPFERAAVLCCLDGVGEWATTSVWLGEDNQLTPQWEIDFPHSLGLLYSAFTYYTGFKVNS
 GEYKLMGLAPYGEPKYVDHILNHLDDLKEDGTFRLNMDNFNYTTGLTMTTPKFHQLFGGAPR
 ESEGKTDSTRNGYCAFHPRGDGGSRFAGGENGEGTGHRLSLFSWGSRPKLCRQWPHFTRNK
 FSRHLDSTSSRRRRGSHWGSISYLASISWRAAHSS

>sxtI *Nostoc* sp. CENA160

PREFDYPRSSKMQSVMNLKIKYRESFRPFAPSVIAEQVSNYFELDRPSPYMLLVAPIHPELR
 ISMTQEQEELFGIDKLNVKRSHIPAVTHVDYSARIQTVHQQTNPYYELLRHFQAKTGCAVL
 VNTS