

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO



FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Cianobactérias marinhas: toxicidade face a fitoplâncton
e invertebrados marinhos; toxicidade face a bactérias;
citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e
normais humanas**

Maria Sofia Ramos Costa

Dissertação de Mestrado em Contaminação e Toxicologia
Ambientais

2011

Maria Sofia Ramos Costa

Cianobactérias marinhas: toxicidade face a fitoplâncton e invertebrados marinhos; toxicidade face a bactérias; citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e normais humanas

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Contaminação e Toxicologia Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientador – Professora Doutora Maria do Rosário Martins

Categoria - Professor Adjunto

Afiliação – Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto (ESTSP)

Co-Orientador – Professor Doutor Vítor Vasconcelos

Categoria – Professor Catedrático

Afiliação – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Agradecimentos

A tese, apesar de um trabalho individual, conta com os contributos de várias pessoas, sem as quais a sua realização não seria possível. Por isso, não posso deixar de expressar os meus agradecimentos:

À Professora Doutora Rosário Martins, minha orientadora, por todo acompanhamento e disponibilidade ao longo do meu trabalho, assim como, por todas as correções e sugestões que foram elemento indispensável na minha evolução. Muito obrigada Rosário!

Ao Professor Doutor Vítor Vasconcelos, pela oportunidade de integração no laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução (LEGE) e por todo o apoio laboratorial indispensável para a evolução do meu trabalho.

A todas as pessoas ligadas ao Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução (LEGE), gostaria de agradecer pelo ótimo ambiente e boa disposição e por toda a ajuda.

Em particular, do LEGE, gostaria ainda de agradecer:

À Margarida, companheira essencial de bancada, agradeço por todo o auxílio no trabalho, sugestões, boa disposição e amizade. Além disto, apesar do pouco tempo que nos conhecemos, é de ressaltar a grande sintonia que sempre tivemos.

Ao Pedro Leão, pela ajuda com os extratos, nas colheitas, por ter sempre disponibilidade para as minhas dúvidas, pela paciência e pelos ensinamentos científicos.

Ao António, por toda a ajuda que me deu na parte molecular e pela disponibilidade a qualquer momento.

Ao Vítor Ramos por me ter cedido as estirpes de cianobactérias usadas neste trabalho.

À Micaela por toda a ajuda para as medições e pelas suas palavras de afeto.

Ao João Morais, pela ajuda e incentivo nas medições, conselhos e pela boa disposição sempre presente.

Ao Marcos e ao Jorge pela boa disposição e pela partilha de conteúdos científicos.

À Professora Olga Lage e Flávia Viana pela estirpe de bactéria *Pseudomonas* sp. NB3L.

Ao Bruno por ter estado sempre ao meu lado apesar das minhas alterações de humor e por me ter incentivado nos momentos mais críticos.

Por último mas não menos importante, à minha Mãe, a quem dedico este trabalho, porque é graças ao seu esforço que cumpri mais esta etapa, por toda a paciência e conselhos neste período. Obrigada Mãe!

Um muito obrigada a todos!

Resumo

As cianobactérias são conhecidas pela sua ubiquidade, variedade morfológica propriedades fisiológicas e pela produção de compostos tóxicos. Recentemente, a produção de compostos bioativos com aplicações farmacológicas tem também vindo a aumentar o interesse no estudo destes organismos.

Até há cerca de uma década, o estudo sobre cianobactérias incidiu ativamente na sua ocorrência em meios dulciaquícolas, devido à produção de toxinas com efeitos nefastos a nível dos ecossistemas e do Homem. Nos últimos anos, o interesse no estudo destes organismos em meio marinho tem registado um incremento considerável, em parte devido ao seu potencial em termos biotecnológicos.

Este trabalho teve como objetivos principais, o estudo da ecotoxicologia e do potencial farmacológico de cianobactérias dos géneros *Cyanobium*, *Leptolyngbya* e *Synechococcus*, isoladas da costa Portuguesa. A partir de biomassa liofilizada obteve-se um extrato bruto com metanol e diclorometano, a partir do qual se prepararam três frações utilizando hexano, acetato de etilo e metanol, de forma a testar frações com compostos de diferentes polaridades. De forma a avaliar os possíveis efeitos ecotoxicológicos das cianobactérias foram realizados bioensaios utilizando organismos do meio, neste caso a microalga marinha *Nanochloropsis* sp., o crustáceo *Artemia salina* e ovos fertilizados do ouriço do mar *Paracentrotus lividus*. No sentido de avaliar a potencial produção de compostos interessantes do ponto de vista farmacológico foram realizados ensaios de inibição do crescimento da bactéria *Pseudomonas* sp. e ensaios de citotoxicidade em células de carcinoma de pulmão, mama e cólon e em fibroblastos normais.

Em termos ecotoxicológicos os resultados obtidos no ensaio com *Nanochloropsis* sp., *Artemia salina* e *Paracentrotus lividus* revelaram uma toxicidade baixa ou nula das estirpes, pelo que para as concentrações de extrato testadas, as estirpes não parecem constituir uma ameaça em termos de equilíbrio dos ecossistemas. Os ensaios com *Pseudomonas* sp. também não demonstraram toxicidade evidente das cianobactérias nesta estirpe de bactéria. Do ponto de vista de citotoxicidade nas linhagens celulares humanas verificou-se uma diminuição da viabilidade de células tumorais para algumas das estirpes testadas. O efeito citotóxico nos fibroblastos foi menos evidente, o que acentua a importância das cianobactérias enquanto produtoras de compostos com aplicabilidade anticancerígena. De entre o extrato bruto e as frações preparadas, a fração obtida usando acetato de etilo foi a que revelou maior percentagem de inibição do crescimento de células tumorais, sendo portanto promissor em termos de isolamento de compostos.

Fez também parte do estudo a identificação molecular das estirpes de cianobactérias de forma a complementar a sua identificação morfológica e a pesquisa de genes envolvidos na produção de microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina. No caso da análise molecular para identificação das estirpes verificou-se que esta foi de encontro à identificação morfológica. No caso da identificação de genes envolvidos na produção de toxinas os resultados foram negativos.

Abstract

Cyanobacteria are well known for their ubiquity, morphological and physiological properties and for the production of toxic compounds. Recently, the production of bioactive compounds with pharmacological applications has led to an increasing interest in the study of these organisms.

Until about a decade the study on cyanobacteria was focused on its occurrence and toxicity in freshwater ecosystems. In recent years the interest in the study of these organisms in the marine environment increased, partially due to its potential in biotechnology interest.

This study had as main objectives the study of the ecotoxicology and the pharmacological potential of cyanobacteria from the genera *Cyanobium*, *Leptolyngbya* and *Synechococcus* isolated from the Portuguese coast. From freeze dried biomass, a crude extract was obtained with a methanol and dichloromethane solution, and after three more fractions with hexane, ethyl acetate and methanol. In order to evaluate the potential toxic effects of cyanobacteria on other marine organisms, bioassays were performed with the marine microalgae *Nanochloropsis* sp., the brine shrimp *Artemia salina* and fertilized eggs of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. In order to evaluate the potential production of interesting pharmacological compounds, bioassay were performed with the bacteria *Pseudomonas* sp. and cytotoxicity assays were performed using human lung, breast and colon carcinoma cell lines and normal fibroblasts.

In terms of ecotoxicology, results with *Nanochloropsis* sp., *Artemia salina* and *Paracentrotus lividus* revealed low or no toxicity of the cyanobacteria strains. No evident toxic effects were also registered on the assay with *Pseudomonas* sp.. With human carcinoma cell lines, a decrease in cells viability with some extracts of some of the cyanobacteria strains was observed. The cytotoxic effect was less evident in fibroblast, which accentuates the importance of cyanobacteria as producers of compounds with anticancer applicability. From the crude extract and fractions prepared, the fraction obtained using ethyl acetate revealed the highest percentage of inhibition of tumor cell growth, and is therefore promising in terms of isolation of bioactive compounds.

It was also an objective of the study the molecular identification of cyanobacteria strains and the identification of genes involved in the production of microcystins, nodularins and cylindrospermopsin. The molecular identification of strains revealed to be in accordance with the morphological identification. Results concerning the detection of toxigenic genes were negative.

Índice

1. Introdução.....	1
2. Objetivos do trabalho.....	10
3. Material e métodos	12
3.1. Estirpes de cianobactérias	12
3.2. Cultura de cianobactérias.....	13
3.3. Preparação dos extratos das estirpes de cianobactérias.....	13
3.4. Avaliação da toxicidade dos extratos face a organismos marinhos	15
3.4.1. Avaliação da toxicidade face à microlaga <i>Nanochloropsis</i> sp.....	17
3.4.2. Avaliação da toxicidade face a náuplios de <i>Artemia salina</i>	17
3.4.2. Avaliação da toxicidade em ovos fertilizados de <i>Paracentrotus lividus</i>	17
3.5. Avaliação do potencial antibacteriano dos extratos face a <i>Pseudomonas</i> sp. ..	18
3.6. Avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e células normais humanas	19
3.6.1. Linhagens celulares e cultura das células.....	19
3.6.2. Ensaio de toxicidade.....	20
3.7. Identificação molecular das estirpes.....	20
3.7.1. Extração de DNA	20
3.7.2. Obtenção de produtos de PCR	21
3.8. Identificação de genes envolvidos na produção de toxinas	23
3.9. Preparação das amostras para sequenciação e alinhamento das sequências ..	25
4. Resultados e Discussão.....	26
4.1. Avaliação da toxicidade face à microlaga <i>Nanochloropsis</i> sp.	26
4.2. Avaliação da toxicidade face a náuplios de <i>Artemia salina</i>	28
4.3. Avaliação da toxicidade em ovos fertilizados de <i>Paracentrotus lividus</i>	30
4.4. Bioatividade face a <i>Pseudomonas</i> sp. NB3L	32
4.5. Citotoxicidade face a linhagens celulares tumorais e normais humanas.....	32
4.6. Identificação molecular das estirpes de cianobactérias e genes envolvidos na produção de cianotoxinas.....	40
5. Discussão geral e conclusões.....	44
6. Referências.....	47
7. Anexos.....	55

Índice de figuras

Fig. 1 - Atividade biológica de 128 compostos isolados de cianobactérias marinhas (Tan, 2007).....	5
Fig. 2 – Percentagem de metabolitos produzidos por cianobactérias marinhas de diferentes ordens num total de 800 metabolitos (Gerwich <i>et al.</i> , 2008).....	7
Fig. 3 – Cianobactérias marinhas da ordem <i>Oscillatoriales</i> produtoras de compostos bioativos num total de 800 compostos (Gerwich <i>et al.</i> , 2008).....	7
Fig. 4 – Espécies de <i>Lyngbya</i> produtoras de compostos bioativos num total de 800 compostos (Gerwich <i>et al.</i> , 2008).....	8
Fig. 5 – Esquema de montagem do sistema para obtenção do extrato bruto.....	13
Fig. 6 – Esquema de montagem do sistema de fracionamento com colunas de sílica.....	14
Fig. 7 - Densidade ótica final de <i>Nanochloropsis</i> sp. exposta ao extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06139, LEGE 07186 e LEGE 07175 por um período de 72 horas.....	27
Fig. 8 – Comprimento das larvas pluteus de <i>Paracentrotus lividus</i> após exposição de ovos fertilizados ao extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 06152, LEGE 06102, LEGE 06139, LEGE 06098, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134, ao controlo negativo e controlo positivo.....	31
Fig. 9 - Variação de densidade ótica da bactéria <i>Pseudomonas</i> sp. NB3L exposta ao extrato bruto e frações A, B e C da estirpe LEGE 06139.....	32
Fig. 10 - Viabilidade de células HEPG2 em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06152, LEGE 06102, LEGE 06139 e LEGE 06098 às 24, 48 e 72 horas.....	34
Fig. 11 - Viabilidade de células RKO em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06152, LEGE 06102, LEGE 06139 e LEGE 06098 às 24, 48 e 72 horas.....	35
Fig. 12 - Viabilidade de células SKBR3 em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06152, LEGE 06102, LEGE 06139 e LEGE 06098 às 24, 48 e 72 horas.....	36
Fig. 13 - Viabilidade de células T47D em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06152, LEGE 06102, LEGE 06139 e LEGE 06098 às 24, 48 e 72 horas.....	37
Fig. 14 - Viabilidade de fibroblastos em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108 e LEGE 06152 às 24, 48 e 72 horas.....	38
Fig. 15 - Viabilidade de fibroblastos em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06102, LEGE 06139 e LEGE 06098 às 24, 48 e 72 horas.....	39

Fig. 16 - Viabilidade de fibroblastos em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134 às 24, 48 e 72 horas.....40

Fig. 17 - Produtos de amplificação do gene 16S rRNA com o par de primers 27F/809R. Poços da esquerda para a direita: marcador de 100pb, LEGE 07175, LEGE 06134, LEGE 07183, LEGE 06156, LEGE 07186, LEGE 06138, LEGE 06139, LEGE 06098, controlo negativo.....41

Fig. 18 - Produtos de amplificação do gene 16S rRNA com o par de primers 740F/1494R. Poços da esquerda para a direita: marcador de 100 pb, LEGE 07175, LEGE 06134, LEGE 07183, LEGE 06156, LEGE 07186, LEGE 06138, LEGE 06139, LEGE 06098, controlo negativo, controlo positivo.....42

Índice de tabelas

Tabela I: Principais características e géneros das cinco ordens/subsecções do Filo Cianobactéria (Martins 2005 adaptado de Catenholz e Boone, 2001).....	1
Tabela II: Toxinas mais estudadas produzidas por cianobactérias e principais géneros produtores (Codd <i>et al.</i> , 2005).....	3
Tabela III: Toxinas estudadas produzidas por cianobactérias e principais órgãos alvo (Codd <i>et al.</i> , 2005).....	4
Tabela IV: Exemplos de alguns compostos isolados a partir de cianobactérias marinhas, sua origem e bioatividade.....	6
Tabela V: Estirpes de cianobactérias marinhas incluídas no estudo.....	12
Tabela VI: Quantidade de solventes adicionados às colunas de modo a obter as frações A, B e C.....	15
Tabela VII: Primers utilizados na identificação molecular das estirpes de cianobactérias.....	21
Tabela VIII: Condições das reacções de PCR para cada par de primers utilizados na identificação das estirpes e dos genes envolvidos na produção de toxinas.....	22
Tabela IX: Primers usados na identificação de genes envolvidos na produção das toxinas microcistinas, cilindrospermopsina e saxitoxina.....	24
Tabela X: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06108. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.....	28
Tabela XI: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06102. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.....	28
Tabela XII: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06152. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.....	28
Tabela XIII: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 07175. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.....	29
Tabela XIV: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06134. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.....	29
Tabela XV: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 07186. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.....	29
Tabela XVI: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06098. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.....	29
Tabela XVII: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06139. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.....	30
Tabela XVIII: Comparação de resultados da identificação morfológica com a identificação genotípica pelos pares de primers 740F/1494R.....	42
Tabela XIX: Tabela resumo dos resultados obtidos	44

Índice de Abreviaturas

BLASTn - Basic Local Alignment and Search Tool for nucleotide

Bp – Base pairs (pares de bases)

CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

HEPG2 – Células de carcinoma de pulmão

LEGE – Laboratório de Ecotoxicologia, Genómica e Evolução

LPS - Lipopolissacarídeos

MCYST – Microcistina

MCYST-LR – Microcistina-LR

MCYST-LA – Microcistina-LA

MCYST-AR – Microcistina-AR

MCYST-YR – Microcistina-YR

MCYST-RR – Microcistina-RR

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NCBI - Nacional Centre for Biotechnology Information

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RKO – Células de carcinoma de cólon

RNA – Ácido Ribonucleico

SKBR3 – Células de carcinoma de mama

T47D – Células de carcinoma de mama

U - Unidades

Anexos

Anexo I – Meio Z8.....55

Anexo II – Água do Mar artificial.....56

Anexo III – Resultados do bioensaio com *Nanochloropsis* sp.

Fig. 1 - Densidade ótica final de *Nanochloropsis* sp. exposta ao extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 06152, LEGE 06102.....57

Fig. 2 - Densidade ótica final de *Nanochloropsis* sp. exposta ao extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06098 e LEGE 06134.....58

Anexo IV – Resultados do bioensaio com linhagens celulares tumorais

Fig. 1 - Viabilidade de células HEPG2 em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134 às 24, 48 e 72 horas.....59

Fig. 2 - Viabilidade de células RKO em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134 às 24, 48 e 72 horas.....60

Fig. 3 - Viabilidade de células SKBR3 em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134 às 24, 48 e 72 horas.....61

Fig.4 - Viabilidade de células T47D em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134 às 24, 48 e 72 horas.....62

Anexo V – Resultados do bioensaio com *Pseudomonas* sp.

Fig. 1 - Variação de densidade ótica da bactéria *Pseudomonas* sp. NB3L exposta ao extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 06152 e LEGE 0610263

Fig. 2 - Variação de densidade ótica da bactéria *Pseudomonas* sp. NB3L exposta ao extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06098, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134.....64

1. Introdução

As cianobactérias são procariontes com capacidade fotossintética. Este grupo de organismos foi inicialmente designado de algas azuis-verdes de acordo com o código Internacional de Nomenclatura Botânica. Posteriormente, e de acordo com uma abordagem bacteriológica, o termo cianobactéria foi introduzido. De acordo com a classificação Botânica, as cianobactérias estão divididas em cinco ordens (Castenholz e Waterbury, 1989) e numa abordagem bacteriológica estão classificadas em cinco subseções dentro do domínio Eubacteria (Castenholz e Boone, 2001). As duas classificações são no entanto consideradas válidas verificando-se uma correspondência entre ambas (Tabela I).

Tabela I: Principais características e géneros das cinco ordens/subseções do Filo Cianobactéria (Martins, 2005 adaptado de Castenholz e Boone, 2001).

Ordens/subseções	Principais características	Géneros
I / Chroococcales	Unicelulares ou agregados não filamentosos. Reprodução por fissão binária em um, dois ou três planos. Raramente formam acinetos.	<i>Chroococcus, Cyanobacterium, Cyanobium, Cyanothece, Dactylococcopsis, Gloeobacter, Gloeotheca, Microcystis, Prochlorococcus, Synechococcus, Synechocystis</i>
II / Pleurocapsales	Unicelulares ou agregados não filamentosos de células unidas por paredes exteriores ou uma matriz de gel. Reprodução por fissão múltipla. As células-filhas são menores do que as células-mãe. Raramente formam acinetos.	<i>Cyanocystis, Dermocarpella, Myxosarcina, Stanieria, Xenococcus</i>
III / Oscillatoriales	Filamentosas. Reprodução por fissão binária num plano. Tricomas não ramificados e unisseriados. Tricomas sem heterocistos ou acinetos.	<i>Arthrospira, Lyngbya, Leptolyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Planktothrix, Pseudanabaena, Trichodesmium</i>
IV / Nostocales	Filamentosas. Reprodução por fissão binária num plano. Tricomas unisseriados não ramificados. As células dos tricomas podem-se diferenciar em heterocistos ou acinetos.	<i>Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cylandropermopsis, Gloeotrichia, Nodularia, Nostoc, Rivularia,</i>
V / Stigonematales	Filamentosos. Reprodução por fissão binária periodicamente ou mais comum em mais de um plano. Tricomas multisseriados ou tricomas com vários tipos de ramos verdadeiros.	<i>Loriella, Geitleria, Nostochopsis, Westiella</i>

Apesar de as cianobactérias apresentarem uma vasta distribuição por vários habitats, são particularmente conhecidas por dominarem ambientes aquáticos, nomeadamente águas doces e salobras (Paerl, 1996). Mais recentemente, tem-se vindo também a assistir a um aumento no estudo destes organismos em meio marinho, devido não só a um aumento da ocorrência de florescências junto a regiões costeiras, mas também à produção de compostos bioativos com interesse farmacológico (Albert *et al.*, 2005; Pittman e Ptittman, 2005; Watkinson *et al.*, 2005; Gerwich *et al.*, 2008; Tan, 2010).

Em meios aquáticos as cianobactérias dominam muitas vezes dentro das comunidades fotossintéticas, tanto planctónicas como bentónicas, podendo, sob condições ambientais específicas, como elevada luminosidade, altas temperaturas e elevados níveis de nutrientes, proliferar e originar florescências (Paerl, 1996). Estes organismos possuem uma ampla gama de características que contribuem para a sua dominância e adaptação. Morfologicamente podem ser unicelulares, coloniais ou filamentosas (Tabela I). Para além das células vegetativas comuns encontradas em situações normais, alguns grupos de cianobactérias, face a situações adversas, podem formar tipos de células especializadas como os acinetos e os heterocistos. Os acinetos são células de maiores dimensões e parede espessa, e com capacidade de armazenar substâncias de reserva. Estas células formam-se quando as condições se tornam desfavoráveis, como diminuição da luminosidade, diminuição da temperatura, mudança de pH e baixa concentração de nutrientes. Os heterocistos são células especializadas na fixação de azoto atmosférico, o que lhes confere vantagens adaptativas em meios pobres neste elemento. As cianobactérias conseguem também armazenar fósforo, o que lhes permite dominar em condições de fósforo limitadas e a presença de vacúolos gasosos permite-lhes alterarem a sua posição na coluna de água, concentrando-se em zonas onde as condições são favoráveis. Algumas espécies de cianobactérias são também conhecidas por produzirem toxinas com efeitos nefastos no fitoplâncton (Suikkanen *et al.*, 2004), zooplâncton (Hawser *et al.*, 1992), animais domésticos (Edwards *et al.*, 1992), pássaros (Henriksen *et al.*, 1997) e humanos (Moore *et al.*, 1984).

O principal fator que tem estado na base do estudo das cianobactérias é a produção de compostos com efeitos tóxicos a nível das comunidades aquáticas e de animais terrestres, incluindo o homem. Deste modo, as toxinas produzidas pelas cianobactérias têm sido intensivamente estudadas devido à ameaça que constituem em termos de saúde pública e aos efeitos nocivos que podem ter no equilíbrio de um

ecossistema. As toxinas mais conhecidas e estudadas são atribuídas a espécies de cianobactérias que ocorrem com frequência em ecossistemas de água doce, como cianobactérias dos géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis* e *Oscillatoria* (Tabela II).

Tabela II: Toxinas mais estudadas produzidas por cianobactérias e principais géneros produtores (Codd *et al.*, 2005).

Toxina	Estrutura	Género
Microcistinas	Heptapeptídeo cíclico	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanocapsa</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i>
Nodularinas	Pentapeptídeo cíclico	<i>Nodularia</i>
Cilindrospermopsina	Alcalóide	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i>
Anatoxina – a	Alcalóide	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i>
Anatoxina – a (S)	Éster	<i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i>
Homoanatoxina – a	Alcalóide	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i>
Saxitoxina	Alcalóide	<i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Oscillatoria</i>
Neosaxitoxina	Alcalóide	<i>Aphanizomenon</i>
Aplisiatoxina	Alcalóide	<i>Lyngya</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Schizothrix</i>
Debromoaplisiatoxina	Alcalóide	<i>Lyngya</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Schizothrix</i>
Linbiatoxina- A	Alcalóide	<i>Lyngbya</i>
Lipopolissacarídeos		Todos os géneros

Os compostos tóxicos produzidos pelas cianobactérias são metabolitos secundários e estão classificados de acordo com os efeitos observados em animais, em órgãos, tecidos e células (Wiegand e Pflugmacher, 2005). Assim, as cianotoxinas estão classificadas como hepatotoxinas, neurotoxinas, toxinas causadoras de distúrbios gastro-intestinais e toxinas irritantes pelo contacto (Tabela III). Dentro das hepatotoxinas, as microcistinas, nodularina e cilindrospermopsina são as mais referenciadas. Estas toxinas provocam danos especialmente a nível do fígado (Carmichael, 1992; Rinehart *et al.*, 1994). No caso da cilindrospermopsina, danos a nível dos rins e intestinos têm também sido referenciados (Terao *et al.*, 1994). As neurotoxinas interferem com a transmissão do impulso nervoso entre axónios e células musculares, sendo as mais estudadas a anatoxina-a, a anatoxina-a(s) e saxitoxina (Mahmood e Carmichael, 1986; Carmichael, 1992). Os lipopolissacarídeos (LPS) ou endotoxinas são componentes da parede celular de bactérias Gram-negativas, como é

o caso das cianobactérias. À presença de LPS nas cianobactérias têm sido atribuídos casos de dermatites e reações alérgicas (Philippis e Vincenzini, 1998).

Tabela III: Toxinas mais estudadas produzidas por cianobactérias e principais órgãos alvo (Codd *et al.*, 2005).

Toxina	Órgãos afetados
Microcistina	Fígado
Nodularina	Fígado
Cilindrospermopsina	Fígado, rins
Anatoxina – a Anatoxina – a(S) Saxitoxina	Músculos (influência na transmissão do impulso nervoso)
Lipopolissacarídeo (LPS) Linbiatoxina- A Debromoaplisiatoxina	Pele

No geral, as cianobactérias são ainda apontadas como uma ameaça para o homem e para os ecossistemas devido à produção de toxinas. No entanto, são vários os compostos isolados que revelaram possuir propriedades com interesse a nível farmacológico (Gerwich *et al.*, 2008; Folmer *et al.*, 2010; Tan, 2010).

No que diz respeito à produção de compostos com interesse farmacológico os trabalhos existentes incidem com maior frequência sobre as cianobactérias marinhas. Estudos relacionados com a produção de compostos anticancerígenos, por exemplo, estão documentados para estirpes dos géneros filamentosos *Lyngbya*, *Leptolyngbya*, *Microcoleus*, *Schizothrix*, *Symploca* e *Trichodesmium* (Horgen *et al.*, 2000; Luesch *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2008; Gunasekera *et al.*, 2008; Lington *et al.*, 2008; Matthew *et al.*, 2008., Medina *et al.*, 2008). Relativamente ao potencial anticancerígeno, a capacidade de induzir apoptose tem sido dos mais explorados (Wrasidio *et al.*, 2007). Em relação a este potencial têm sido reportados estudos de compostos de cianobactérias que induzem apoptose em linhagens celulares de mamíferos, peixes e células humanas (Zainuddin *et al.*, 2002; Teneva *et al.*, 2003; Surakka *et al.*, 2005; Rechter *et al.*, 2006; Kanekiyo *et al.*, 2007). Além de compostos com propriedades anticancerígenas, compostos com propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais, antifúngicas e algicidas têm também sido descritos. Numa revisão que incidiu sobre 128 compostos isolados de cianobactérias marinhas (Tan, 2007), em mais de 35% dos compostos foi detetada atividade em linhagens celulares tumorais, cerca de 10% dos compostos revelaram atividade em células normais e, em menores percentagens, alguns compostos revelaram atividades contra fungos e

bactérias, assim como atividade anti-inflamatória (Fig.1). Como exemplo de compostos bioativos com origem em cianobactérias marinhas apresentam-se na tabela IV alguns dos compostos já identificados, assim como a sua classificação do ponto de vista químico, a sua origem em termos de organismo produtor e o tipo de bioatividade estudada.

O interesse no estudo de compostos produzidos por cianobactérias marinhas prende-se também com o facto de que compostos já caracterizados têm revelado uma enorme variedade de estruturas, pelo que a existência de determinados grupos funcionais faz deles uma inspiração para a criação de novos produtos.

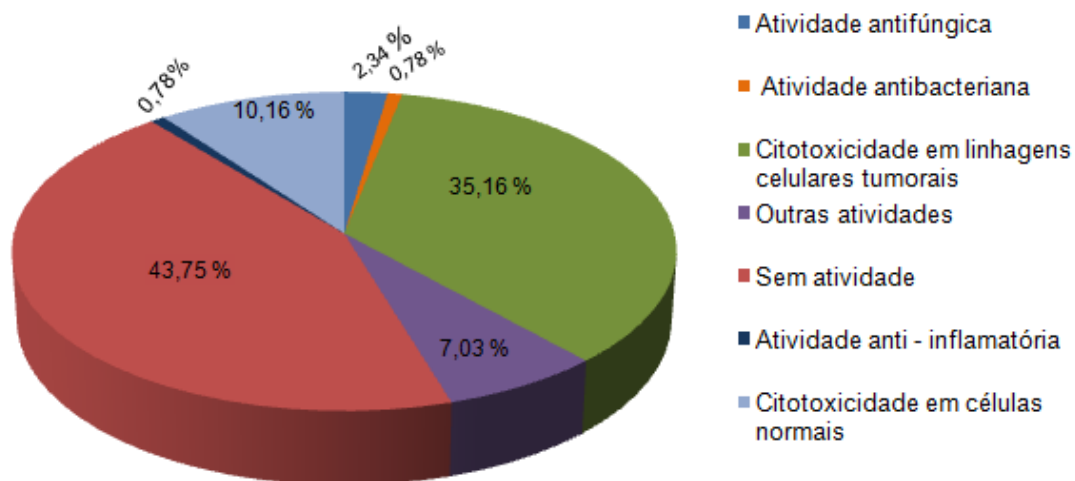


Fig. 1 - Atividade biológica de 128 compostos isolados de cianobactérias marinhas (Tan, 2007).

Tabela IV: Exemplos de alguns compostos isolados a partir de cianobactérias marinhas, sua origem e bioatividade.

Composto	Classe química	Origem	Bioatividade	Referências
Apratoxin A	Lipopeptídeo	<i>L. majuscula</i>	Citotoxicidade em linhagens celulares tumorais	Luesch <i>et al.</i> , 2002
Aeruginosin	Lipopeptídeo	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibidor enzimático, citotóxico	Moore, 1996
Agardhipeptin	Lipopeptídeo	<i>Oscillatoria agardhii</i>	Inibidor enzimático, hepatóxico	Sano <i>et al.</i> , 1996
Aulosirazole	Aromático	<i>Aulosira fertilissima</i>	Anticancerígeno	Stratmann <i>et al.</i> , 1994
Calothrixin	Alcalóide indole	<i>Calothrix</i> sp.	Anti - malárico	Issa, 1999
Cryptophycins	Lipopeptídeo	<i>Nostoc</i> sp.	Citotóxico	Moore <i>et al.</i> , 1989
Cyanovirin	Peptídeo e proteína	<i>Nostoc ellipsosporum</i>	Anti-HIV, antivírus	Dey <i>et al.</i> , 2000
Dendroamide	Lipopeptídeo	<i>Stigonema dendroideum</i>	Citotóxico, antibiótico	Ogino <i>et al.</i> , 1996
Westiellamide	Lipopeptídeo	<i>Westiellopsis prolificans</i>	Citotóxico	Prinsep <i>et al.</i> , 1992
Diarrhetic toxin	Lipopeptídeo	<i>Nodularia</i> sp.	Citotóxico	Quilliam, 1999
Didemnin	Lipopeptídeo	<i>Synechocystis trididemni</i>	Anticancerígeno, antiviral e imunossupressivo	Rinehart, 2000
Dolastin 10	Lipopeptídeo	<i>Symploca hydroides</i>	Citotoxicidade em linhagens celulares tumorais	Harrigan <i>et al.</i> , 1998
Fischerellin	Lipopeptídeo	<i>Fischerella muscicola</i>	Antifúngico, herbicida	Srivastava <i>et al.</i> , 1999
Largamides A	Lipopeptídeo	<i>Oscillatoria</i> sp.	Inibidor da quimiotripsina	Plaza e Bewley, 2006
Micromide	Lipopeptídeo	<i>Symploca</i> sp.	Citotóxico	Williams <i>et al.</i> , 2004
Microsporine	Terpenóide	<i>Nostoc commune</i>	Antibiótico	Bohm <i>et al.</i> , 1995
Obyanamide	Lipopeptídeo	<i>Lyngbya confervoides</i>	Citotóxico	Williams <i>et al.</i> , 2002
Palauamide	Lipopeptídeo	<i>Lyngbya</i> sp.	Citotóxico	Williams <i>et al.</i> , 2003
Sulfolipid	Ácido gordo	<i>Lyngbya lagerheimii</i>	Anti-HIV	Gustafson <i>et al.</i> , 1989
Symplostatin	Lipopeptídeo	<i>Symploca hydroides</i>	Citotóxico	Harrigan <i>et al.</i> , 1998
Tolyporphin	Porfirina	<i>Tolypothrix nodosa</i>	Antibiótico	Prinsep <i>et al.</i> , 1992
Ulongapeptin	Lipopeptídeo	<i>Lyngya</i> sp.	Citotóxico	Williams <i>et al.</i> , 2003

Ainda no que diz respeito às cianobactérias marinhas, a caracterização de compostos bioativos tem sido maioritariamente realizada em géneros filamentosos de cianobactérias de regiões tropicais e subtropicais, uma vez que aqui estes organismos se desenvolvem em grandes densidades. Numa revisão de Gerwich *et al.* (2008) dos cerca de 800 compostos descritos para cianobactérias marinhas, a ordem *Oscillatoriales* constitui a fonte de quase metade (Fig. 2) e dentro desta ordem, o género *Lyngbya* tem sido o mais referenciado (Fig.3), nomeadamente a espécie *Lyngbya majuscula* (Fig. 4). Esta maior incidência nas cianobactérias filamentosas e especificamente no género *Lyngbya* prende-se com o facto de este grupo formar extensos tapetes cianobacterianos, tornando-se fácil obter biomassa em meio natural, não havendo, na maior parte dos casos, necessidade de recorrer à sua cultura (Gerwich *et al.*, 2008).

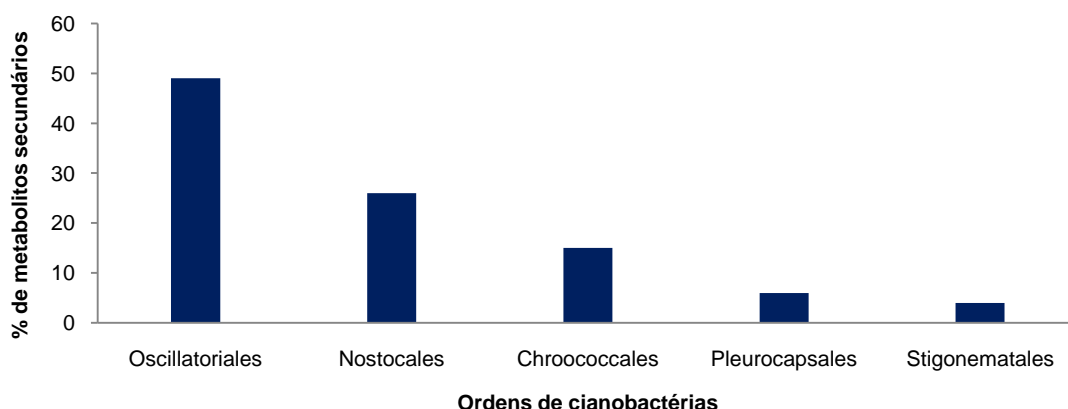


Fig. 2 – Percentagem de metabolitos produzidos por cianobactérias marinhas de diferentes ordens num total de 800 metabolitos (Gerwich *et al.*, 2008).

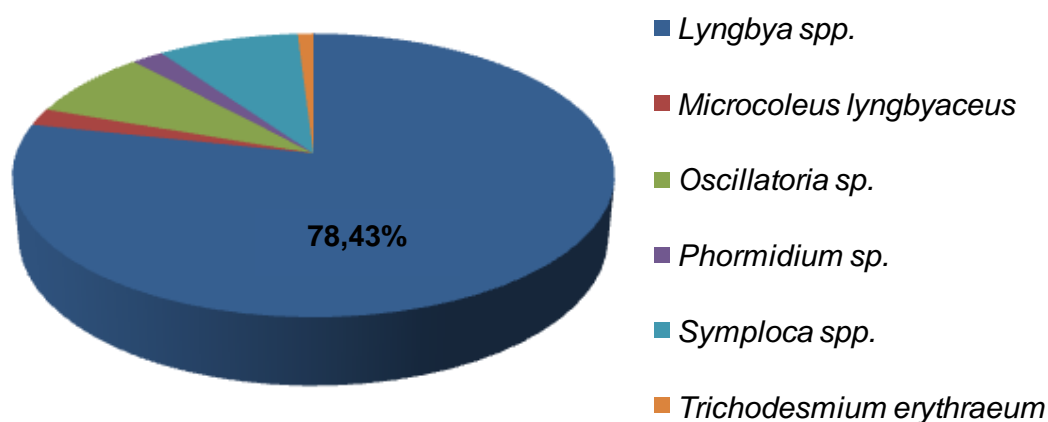


Fig. 3 – Cianobactérias marinhas da ordem *Oscillatoriales* produtoras de compostos bioativos, num total de 800 compostos (Gerwich *et al.*, 2008).

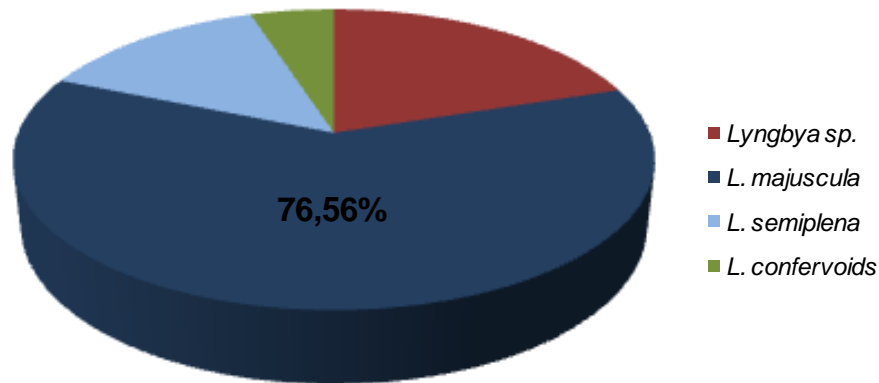


Fig. 4 – Espécies de *Lyngbya* produtoras de compostos bioativos, num total de 800 compostos (Gerwich *et al.*, 2008).

Os estudos com cianobactérias em Portugal iniciaram-se com cianobactérias de água doce uma vez que a ocorrência de florescências tóxicas se verifica com alguma frequência (Vasconcelos, 1996; Vasconcelos, 1999). Das toxinas apresentadas anteriormente as mais referenciadas em Portugal são as microcistinas. Dentro das várias variantes de microcistinas, a microcistina-LR (MCYST-LR) é a mais comum (Vasconcelos, 1995; Vasconcelos, 1999) no entanto, outras têm também sido descritas, como por exemplo, a MCYST-LA, MCYST-AR, MCYST-YR e a MCYST-RR (Vasconcelos, *et al.*, 1995). A ocorrência de MCYST-LR, tem sido reportada desde 1990 e um número significativo de reservatórios de água destinadas a consumo humano apresentaram altos níveis de toxinas (Vasconcelos, 1995; Vasconcelos, 1999). Vasconcelos *et al.*, 1996 mostrou que *Microcystis aeruginosa* é a espécie de cianobactérias mais comum em águas Portuguesas. *Microcystis wesenbergii*, *Anabaena flos-aquae*, *A. Scheremetievi* e *Aphanizomenon flos-aquae* são outras espécies importantes de cianobactérias presentes nas diferentes massas de água Portuguesas (Vasconcelos, 1994). O conhecimento da ocorrência das principais toxinas existentes nos diversos corpos de água, usados quer para fins recreativos ou mesmo para consumo é de todo importante. Em Portugal, é especialmente essencial, pois existe uma escassez de água e normalmente reservatórios eutrofizados são usados como fonte de água para consumo e recreio (Vasconcelos *et al.*, 1996).

Em regiões costeiras de Portugal não estão registados casos de ocorrência de florescências de cianobactérias. No entanto, com a problemática do aquecimento global e com o aumento da densidade demográfica junto à costa, as condições de aumento da temperatura e nutrientes propiciam um aumento da comunidade de

cianobactérias, como se tem verificado noutras partes do globo (Watkinson *et al.*, 2005; Ahern *et al.*, 2007). Partindo da experiência e da problemática que envolve as cianobactérias de água doce em Portugal, da importância das cianobactérias marinhas como produtoras de compostos bioativos e da extensa área costeira de Portugal, foram iniciados há cerca de uma década estudos que visam o isolamento de estirpes de regiões costeiras e a sua caracterização do ponto de vista ecotoxicológico e farmacológico, no sentido de avaliar possíveis impactos da sua ocorrência nos ecossistemas e na saúde pública. Desde então, têm sido isoladas e mantidas em laboratório várias estirpes que constituem a coleção do Laboratório de Ecotoxicologia Genómica e Evolução (LEGE) do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR - Porto). Em trabalhos já realizados com algumas das estirpes isoladas e cultivadas em laboratório estão descritos efeitos histopatológicos em murganhos injetados com extratos de cianobactérias dos géneros *Synechocystis*, *Synechococcus* e *Oscillatoria* (Martins *et al.*, 2005), efeitos tóxicos em invertebrados marinhos de extratos orgânicos e aquosos de cianobactérias dos géneros *Synechocystis*, *Synechococcus* (Martins *et al.*, 2007) e também efeitos antibacterianos em bactérias Gram-positivas e efeitos citotóxicos em linhagens celulares (Martins *et al.*, 2008). Nas estirpes testadas não foram identificadas as toxinas mais comuns de cianobactérias como as microcistinas e nodularinas, no entanto, em algumas estirpes também isoladas da costa portuguesa foram identificados genes envolvidos na produção destas toxinas, o que revela a sua potencial produção também por cianobactérias marinhas (Frazão *et al.*, 2010).

2. Objetivos do trabalho

Como já foi referido, os estudos com cianobactérias marinhas têm incidido particularmente em espécies que crescem em grandes densidades em regiões tropicais e subtropicais. No entanto, o estudo do potencial ecotoxicológico de géneros picoplanctónicos e de alguns géneros filamentosos tem sido largamente descuidado, uma vez que em condições naturais ocorrem em baixas densidades e como não há referências a episódios de intoxicações acabam por passar “despercebidos”. Dentro destes incluem-se as formas picoplanctónicas dos géneros *Cyanobium*, *Synechocystis* e *Synechococcus* e os géneros filamentosos *Leptolyngbya* e *Pseudanabaena*. Tendo em conta as propriedades toxicológicas e farmacológicas das cianobactérias, qualquer nova estirpe isolada pode ser considerada potencialmente tóxica ou interessante do ponto de vista farmacológico. Neste sentido, este trabalho teve como objetivos gerais avaliar o potencial risco ecotoxicológico de estirpes de cianobactérias marinhas isoladas da costa portuguesa, através da realização de bioensaios com organismos do meio e avaliar a potencial produção de compostos farmacologicamente ativos, estudando neste caso o seu potencial antibacteriano e a sua citotoxicidade em linhagens celulares humanas. O trabalho envolveu o estudo da bioatividade de extratos orgânicos de estirpes dos géneros *Cyanobium*, *Leptolyngbya* e *Synechococcus* e foi realizado a partir de biomassa obtida por cultura das estirpes em condições laboratoriais. Na medida em que algumas das estirpes incluídas no estudo ainda só estavam identificadas com base numa abordagem morfológica foi também realizada a sua identificação usando ferramentas moleculares. Estando também já descritos os genes envolvidos na produção de várias toxinas produzidas por cianobactérias foi também nosso objetivo utilizar uma abordagem molecular na pesquisa destes genes. Assim, partindo de estirpes de cianobactérias dos géneros *Cyanobium*, *Leptolyngbya* e *Synechococcus*, a partir das quais se preparou um extrato bruto e frações orgânicas, tiveram-se como objetivos específicos:

1. avaliar a toxicidade face a organismos representativos do meio e de diferentes níveis tróficos, através da realização de bioensaios:
 - a. bioensaios com a microalga marinha *Nanochloropsis* sp. - teste de inibição do crescimento

- b. bioensaios com o crustáceo *Artemia salina* - teste de mortalidade de náuplios
 - c. bioensaio com ovos fertilizados do ouriço do mar *Paracentrotus lividus* - teste de inibição do desenvolvimento embrionário;
- 2. avaliar o potencial antibacteriano - teste de inibição de crescimento de *Pseudomonas* sp.;
- 3. avaliar o potencial anticancerígeno em linhagens celulares tumorais humanas e a citotoxicidade em células normais humanas - determinação da viabilidade celular;
- 4. identificar por uma abordagem molecular as estirpes cuja identificação só estava baseada em parâmetros morfológicos;
- 5. identificar genes envolvidos na produção das cianotoxinas, microcistinas, cilindrospermopsina e saxitoxina recorrendo a primers já desenhados para este fim;
- 6. determinar química, imunológica e enzimaticamente toxinas do grupo das microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina, nas estirpes que revelassem a presença dos genes envolvidos na sua produção.

3. Material e métodos

3.1. Estirpes de cianobactérias

Neste trabalho foram incluídas 11 estirpes de cianobactérias marinhas dos géneros *Cyanobium*, *Leptolyngbya* e *Synechococcus* pertencentes à coleção de cianobactérias do LEGE (Tabela V). As estirpes foram isoladas a partir de amostras colhidas ao longo da costa Portuguesa e identificadas com base em características morfológicas e numa abordagem molecular. No início do trabalho algumas das estirpes estavam identificadas apenas do ponto de vista morfológico (Tabela V).

Tabela V: Estirpes de cianobactérias marinhas incluídas no estudo.

Estirpe	Género	Origem (Praia)	Identificação
LEGE 06108	<i>Leptolyngbya</i>	Praia da Luz	Morfologia e sequenciação do gene 16S rRNA
LEGE 06152	<i>Leptolyngbya</i>	Lavadores	Morfologia e sequenciação do gene 16S rRNA
LEGE 06102	<i>Leptolyngbya</i>	São Bartolomeu	Morfologia e sequenciação do gene 16S rRNA
LEGE 06138	<i>Cyanobium</i>	Aguda	Morfologia
LEGE 06139	<i>Synechococcus</i>	Aguda	Morfologia
LEGE 06156	<i>Synechococcus</i>	Burgau	Morfologia
LEGE 06098	<i>Cyanobium</i>	Martinhal	Morfologia
LEGE 07175	<i>Cyanobium</i>	Martinhal	Morfologia
LEGE 07186	<i>Cyanobium</i>	Martinhal	Morfologia
LEGE 06134	<i>Cyanobium</i>	Moledo	Morfologia
LEGE 07183	<i>Cyanobium</i>	Olhos d' Água	Morfologia

3.2. Cultura de cianobactérias

De modo a obter biomassa para a realização do estudo, as cianobactérias foram cultivadas em balões de 6 litros com 4 litros de meio Z8 (Anexo I) ao qual se adicionou 20g/L de NaCl. As culturas foram mantidas com arejamento constante, a 25°C e com um ciclo de luz/obscuridade de 14h/10h (Martins *et al.*, 2005). Após cerca de quatro semanas em cultura, a biomassa foi concentrada por filtração com filtros de 15 µm ou por centrifugação. As amostras concentradas foram lavadas com água destilada, congeladas a -20°C, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

Com as estirpes LEGE 06138, LEGE 06156 E LEGE 07183 a cultura em grande escala não foi bem sucedida, pelo que apenas se apresentam os resultados relativos ao seu estudo molecular.

3.3. Preparação dos extratos das estirpes de cianobactérias

A partir de biomassa liofilizada obtiveram-se um extrato bruto e três frações. O primeiro extrato, designado de extrato bruto, resultou da extração com uma solução de metanol e diclorometano. Três frações designados por, fração A, B e C foram obtidas por extração do extrato bruto com hexano, acetato de etilo e metanol, respetivamente. Este tipo de extração permite-nos isolar frações com compostos de diferentes polaridades.

Numa primeira extração, a 1 g de liofilizado de cada estirpe foram adicionados 50 mL de uma solução de metanol:diclorometano (1:2), agitando-se periodicamente com uma espátula, durante 10 minutos.

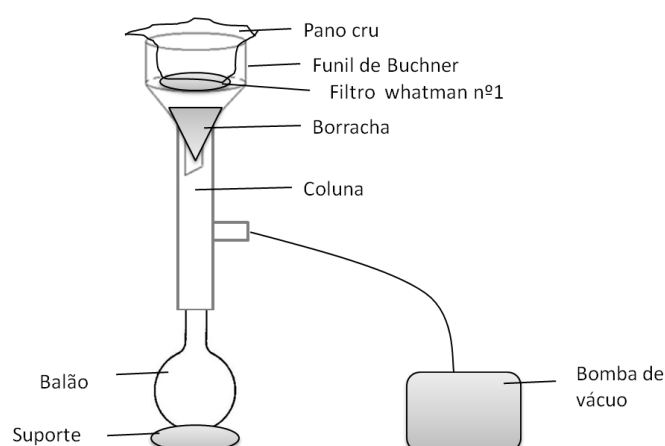


Fig. 5 – Esquema de montagem do sistema para obtenção do extrato bruto.

Para a extração foi montado um sistema como o representado na figura 5. Verteu-se no sistema a mistura. Após toda a componente líquida da mistura ter caído no balão, retirou-se a massa residual do pano crú e procedeu-se novamente à sua extração. Repetiu-se esta extração por mais 3 vezes, sendo as duas últimas feitas a aproximadamente 40°C. Nos casos em que o líquido resultante da última extração ainda não estava translúcido, efetuou-se uma sexta extração.

Toda a mistura resultante das extrações foi evaporada em evaporador rotativo. Após evaporação dos solventes ressuspendeu-se o sedimento em cerca de 4 mL de isooctano:etanol (1:1), recorrendo-se a ultra-sons para ajudar a dissolver. Transferiu-se esta mistura para um frasco de 22 mL previamente pesado e evaporou-se todo o solvente em azoto. O extrato resultante constitui o que se designa por extrato bruto. Calculou-se a massa total do extrato bruto obtido e dissolveu-se num volume de hexano de forma a obter uma concentração de 50 mg/mL. Para o fracionamento deste extrato inicial foram utilizadas colunas de sílica de 2 e 5 g, segundo um esquema como o apresentado na figura 6.

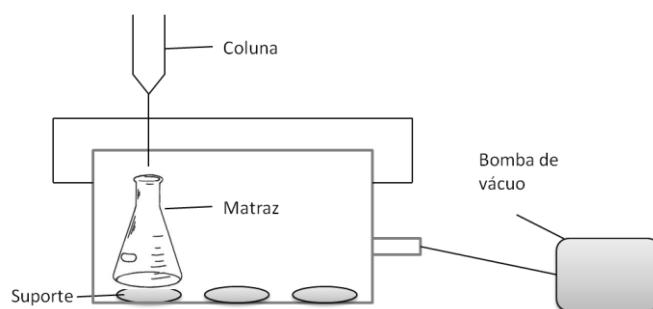


Fig. 6 – Esquema de montagem do sistema de fracionamento com colunas de sílica.

Procedeu-se a ativação da sílica com cerca de 4 mL de hexano. Colocou-se 1 mL de extrato bruto na coluna e adicionou-se hexano que se foi recolhendo num pequeno matraz até que uma coloração amarela atingiu cerca de $\frac{3}{4}$ da coluna. Procedeu-se de seguida a uma extração sequencial da coluna tal como indicado na tabela VI, obtendo-se o que designamos por fração A (fração de hexano), fração B (fração de acetato de etilo) e fração C (fração de metanol). Em todas as frações os solventes foram evaporados em evaporador rotativo e o sedimento ressuspendido em cerca de 9 mL de isooctano:etanol (1:1). Esta mistura foi transferida para frascos de 15

mL previamente pesados e evaporada com azoto. Cada sedimento seco foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

Para os testes de toxicidade dissolveram-se os extratos de cada um dos frascos preparados (bruto, fração A, fração B e fração C) em isooctano:etanol (1:1) numa concentração final de 10 mg/mL. Transferiu-se 100 µL do conteúdo de cada frasco para outro frasco também já pesado. Procedeu-se a evaporação novamente em azoto. O conteúdo de cada frasco foi dissolvido com DMSO a 100% a uma concentração de 10 mg/mL.

Tabela VI: Quantidade de solventes adicionados às colunas de modo a obter as frações A, B e C

Frações		Coluna de 2g				Coluna de 5g			
		Hexano	Acetato de Etilo	Metanol	Total	Hexano	Acetato de Etilo	Metanol	Total
Fração A	100% hexano	4000 µL	0 µL	0 µL	4 mL	10000 µL	0 µL	0 µL	10 mL
	20% acetato de etilo em hexano	3200 µL	800 µL	0 µL	4 mL	8000 µL	2000 µL	0 µL	10 mL
	40% acetato de etilo em hexano	2400 µL	1600 µL	0 µL	4 mL	6000 µL	4000 µL	0 µL	10 mL
Fração B	60% acetato de etilo em hexano	1600 µL	2400 µL	0 µL	4 mL	4000 µL	6000 µL	0 µL	10 mL
	80% acetato de etilo em hexano	800 µL	3200 µL	0 µL	4 mL	2000 µL	8000 µL	0 µL	10 mL
	100% acetato de etilo	0 µL	4000 µL	0 µL	4 mL	0 µL	10000 µL	0 µL	10 mL
	75% acetato de etilo em metanol	0 µL	3000 µL	1000 µL	4 mL	0 µL	7500 µL	2500 µL	10 mL
Fração C	75% metanol em acetato de etilo	0 µL	1000 µL	3000 µL	4 mL	0 µL	2500 µL	7500 µL	10 mL
	100% metanol	0 µL	0 µL	4000 µL	4 mL	0 µL	0 µL	10000 µL	10 mL
	100% metanol	0 µL	0 µL	4000 µL	4 mL	0 µL	0 µL	10000 µL	10 mL

3.4. Avaliação da toxicidade dos extratos face a organismos marinhos

Vários métodos têm sido usados para testar a toxicidade das cianobactérias que ocorrem em ecossistemas aquáticos. No que diz respeito aos efeitos sobre outros organismos existem bioensaios a partir dos quais se podem avaliar os efeitos de extratos brutos ou purificados, ou de toxinas, em parâmetros como o crescimento, a

sobrevivência ou o normal desenvolvimento. Os bioensaios mais usados incluem microalgas e plantas como representantes do primeiro nível trófico (Suikkanen *et al.*, 2004; Berry *et al.*, 2008; Granéli *et al.*, 2008), crustáceos como a *Artemia salina* como representantes de um segundo nível trófico (Marsalek e Bláha, 2003) e outros invertebrados marinhos como o ouriço do mar *Paracentrotus lividus*, a partir do qual se podem fazer ensaios de embriogénese (Fernandez e Beiras, 2001; Martins *et al.*, 2007). Para avaliar o possível risco para mamíferos incluindo o Homem, podem ser realizados bioensaios com ratinhos (Martins *et al.*, 2005) e com células (Selhem *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2008).

Neste trabalho, e no sentido de avaliar a possível toxicidade do extrato/frações das cianobactérias incluídas no estudo em organismos do meio marinho, utilizou-se como representante do primeiro nível trófico a microalga marinha *Nanhodactylopsis* sp.. Apesar de ainda não se encontrar bem esclarecido o papel das cianotoxinas nos ecossistemas, pensa-se que uma das suas funções será atuar como inibidoras de outras microlagas tal como verificado por Kearns e Hunter (2001) na inibição da motilidade de *Chlamydomonas reinhardtii* por uma estirpe de *Anabaena flos-aquae* produtora de anatoxina-a e microscitina-LR. Como organismo do segundo nível trófico foi escolhido o crustáceo *Artemia salina*. Este organismo do zooplâncton marinho tem sido considerado uma ferramenta importante no estudo da ecotoxicologia ambiental (Carballo *et al.*, 2002), tem uma distribuição ubíqua, é de fácil manuseamento em laboratório, é um elo importante nas cadeias tróficas de ecossistemas marinhos e tem sido utilizado no estudo da toxicidade de cianobactérias marinhas (Martins *et al.*, 2007). Por outro lado, a produção de cianotoxinas tem, em alguns trabalhos, sido apontada como uma forma de defesa contra a predação (Nagle e Paul, 1999). No sentido de avaliar o efeito tóxico em etapas mais sensíveis do ciclo de vida de organismos, estudou-se também o efeito do extrato bruto e frações sobre o desenvolvimento embrionário de *Paracentrotus lividus*. Esta espécie de ouriço do mar tem uma distribuição ubíqua, nomeadamente nas costas marítimas ibéricas, é relativamente fácil induzir em laboratório a fertilização e o desenvolvimento embrionário e também tem sido utilizado no estudo da toxicidade de cianobactérias marinhas (Martins *et al.*, 2007). A razão pela qual se optou por realizar ensaios com organismos em estádios de desenvolvimento mais precoces prende-se com o facto de se ter demonstrado que os estádios de embrião e larvares são mais sensíveis aos tóxicos dos que os estádios adultos (Martin *et al.*, 1981).

3.4.1. Avaliação da toxicidade face à microlaga *Nanochloropsis* sp.

A microalga marinha *Nanochloropsis* sp. foi cultivada nas mesmas condições que as estirpes de cianobactérias, como descrito no ponto 3.2.. Os testes de inibição do crescimento foram realizados em placas de 96 poços com 1×10^5 cel/mL de *Nanochloropsis* sp., incubados em 200 μ l de solução e em triplicado. O extrato bruto e as diferentes frações foram testados a uma concentração final de 10 μ g/mL e com diluições de 1:10 e 1:100. Como controlo positivo utilizou-se uma solução de dicromato de potássio (4 μ g/mL) e como controlo negativo utilizou-se meio Z8 com 1% de DMSO. As placas foram envolvidas em parafilme para evitar evaporação e incubadas durante 72 horas em constante agitação (agitador orbital). No final das 72 horas foi estimado o crescimento celular através da leitura da densidade ótica a 750 nm em leitor “GEN 5TM – Multi – detection Microplate Reader” (Biotek).

3.4.2. Avaliação da toxicidade face a náuplios de *Artemia salina*

Os náuplios de artémia foram obtidos a partir da eclosão de um grama de cistos de artémia num litro de água do mar filtrada (filtro de 0,2 μ m). Durante um período de eclosão de 24 horas, os cistos foram mantidos a 25°C com iluminação e arejamento contínuos. Após 24 horas separaram-se os náuplios para nova água do mar filtrada.

O teste de toxicidade foi realizado em placas de 96 poços, com 200 μ L de solução a testar e cerca de 10-15 organismos por poço. O extrato bruto e as diferentes frações foram testados a uma concentração final de 10 μ g/mL, com diluições de 1:10 e 1:100 e em triplicado. Para evitar evaporação, as placas foram vedadas com parafilme, incubadas a 25°C no escuro e com agitação constante (em agitador orbital). Como controlo positivo utilizou-se uma solução de dicromato de potássio (4 μ g/mL) e controlo negativo água do mar filtrada com 1% de DMSO. Depois de 24 horas e 48 horas contou-se o número de larvas mortas em cada poço. No final da contagem às 48 horas procedeu-se a uma fixação com lugol de modo a fazer a contagem do número total de larvas por poço. Finalmente procedeu-se ao cálculo da percentagem de mortalidade.

3.4.2. Avaliação da toxicidade em ovos fertilizados de *Paracentrotus lividus*

Os ouriços do mar foram recolhidos da praia de Valadares (N 41 05.166 W 8 39. 369).

Para recolha dos gâmetas procedeu-se à dissecação dos ouriços. Com uma pipeta de Pasteur recolheram-se ovos de uma fêmea em boas condições e adicionaram-se a cerca de 90 mL de água do mar artificial (Anexo II). Adicionou-se à suspensão de ovos alguns μL de esperma diretamente pipetados das gónadas e agitou-se lentamente de forma a permitir a fertilização. Determinou-se a percentagem de fertilização contando o total de ovos fertilizados em alíquotas de 10-20 μL . Neste caso obteve-se uma percentagem de fertilização de 99%.

O teste de toxicidade foi realizado em placas de 24 poços, num volume final de 3 mL das soluções a testar e com uma concentração de ovos fertilizados de 20 ovos/mL. O extrato bruto e as diferentes frações foram testados numa concentração final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e com diluições de 1:10 e 1:100 em triplicado. Como controlo positivo utilizou-se dicromato de potássio (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e como controlo negativo utilizou-se água do mar artificial com 0,1% de DMSO. O ensaio teve a duração de 48 horas tendo as placas sido mantidas a 20°C na obscuridade. Após incubação procedeu-se à fixação com formaldeído 37%. O sucesso da embriogénese foi determinado por determinação da percentagem de larvas pluteus formadas e pela medição do comprimento larvar.

3.5. Avaliação do potencial antibacteriano dos extratos face a *Pseudomonas* sp.

No sentido de estudar o interesse das cianobactérias enquanto produtoras de compostos com interesse farmacológico, foi avaliada a atividade antibacteriana do extrato bruto e diferentes frações face a uma estirpe de bactérias do género *Pseudomonas*. Estas bactérias são bacilos gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, com dimensões entre 0,5–1,0 μm de largura e 1,5–5,0 μm de comprimento e com atividade patogénica em plantas e alguns animais vertebrados.

A estirpe de *Pseudomonas* sp. NB3L foi cultivada em meio MSS, a 25°C e em agitação. A concentração inicial usada para o inóculo do teste foi obtida através do limiar inferior de deteção do espectrofotómetro. Depois da optimização, foram realizados os testes de crescimento em placas de 96 poços em que se adicionou 2 μL de cada extrato/fração a testar e 198 μL do inóculo de bactérias preparado anteriormente por poço. Mediu-se a densidade ótica a 750 nm o que constituiu a densidade ótica inicial. Foi também incluído um controlo negativo que consistiu somente em meio MSS e um controlo positivo que consistiu num cocktail de antibióticos (2 μL) – Penicilina (50 U/mL) + Estreptomicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Neomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Foram realizadas 3 réplicas para o extrato bruto, para cada fração e cada

controle. Envolveram-se as placas em parafilme e incubaram-se no escuro durante 24 horas em constante agitação. No final das 24 horas foi estimado o crescimento bacteriano através da leitura da densidade ótica a 750 nm. O valor final de densidade ótica foi calculado por subtração dos valores das densidades óticas iniciais. A leitura das densidades óticas foi realizada em leitor “GEN 5™ – Multi – detection Microplate Reader” (Biotek).

3.6. Avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e células normais humanas

Com o intuito de avaliar o potencial anticancerígeno das cianobactérias marinhas, foram realizados ensaios de inibição do crescimento celular de linhagens celulares tumorais humanas. Na medida em que a aplicabilidade de um composto no tratamento de formas cancerígenas depende também da sua ação em células normais, analisou-se a citotoxicidade dos extratos em células normais. Neste caso optou-se por estudar a citotoxicidade em fibroblastos, uma vez que estas células são as células principais, residentes e permanentes do tecido conjuntivo, existindo portanto em praticamente todos os órgãos.

3.6.1. Linhagens celulares e cultura das células

As linhagens celulares tumorais utilizadas foram: HEPG2 (células de carcinoma de pulmão), RKO (células de carcinoma de cólon) SKBR3 e T47D (células de carcinoma de mama). As células normais utilizadas foram fibroblastos obtidos a partir de pele de feto.

As células HEPG2, RKO, SKBR3 e T47D foram cultivadas em meio DMEM glutamax (Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM GlutaMAX™ - Gibco-Invitrogen), contendo 10% de soro bovino fetal (Gibco; Invitrogen), 2,5 µg/mL de fungizona (Gibco; Invitrogen) e 100IU/mL e 10 mg/mL de penicilina estreptomicina respetivamente (Gibco; Invitrogen). Os fibroblastos foram cultivados em α-MEM (Gibco; Invitrogen), suplementadas com 10% (v/v) de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina (100 IU/mL e 10 mg/mL, respetivamente), 2.5 µg/mL de fungizona e 50 µg/mL de ácido ascórbico. Todas as células foram cultivadas a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂.

3.6.2. Ensaio de toxicidade

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $3,3 \times 10^3$ células por poço para as linhagens de HEPG2, RKO, SKBR3 e T47D e a uma densidade de $6,6 \times 10^3$ células por poço para as células fibroblastos. Após 24 horas de aderência aos poços as células foram expostas ao extrato bruto e às diferentes frações das estirpes de cianobactérias numa concentração final de $10 \mu\text{g/mL}$ e com diluições de 1:10 e 1:100, em triplicado e por um período de 24, 48 e 72 horas. As células foram mantidas numa incubadora a 37°C com 5% CO_2 .

A viabilidade/proliferação celular foi avaliada pela redução do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Após cada período de incubação as células foram incubadas com $0,5 \text{ mg/mL}$ de MTT (Sigma) durante 4 horas. Ao fim destas 4 horas o meio foi aspirado e os cristais de formazan formados dissolvidos com $100 \mu\text{l}$ de DMSO (Panreac). A leitura da absorvância foi realizada com um comprimento de onda de 550 nm em leitor “GEN 5TM – Multi – detection Microplate Reader” (Biotek).

3.7. Identificação molecular das estirpes

3.7.1. Extração de DNA

Neste trabalho procedeu-se à identificação genotípica das estirpes LEGE 06138, LEGE 06139, LEGE 06156, LEGE 06098, LEGE 07175, LEGE 07186, LEGE 06134 e LEGE 07183.

A extração de DNA foi realizada a partir de um volume de 2 mL de cultura em fase exponencial. Cada amostra foi congelada e descongelada (2 vezes), pois verificou-se que este passo facilita a rutura da parede e membrana facilitando a extração de DNA. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 13200 rpm durante 10 minutos (centrífuga Eppendorf 5415R), sendo feitas três lavagens com água destilada. O DNA genómico foi extraído da “pellet” de células recorrendo ao kit de extração de DNA “Purelink Genomic DNA Mini Kit” (Invitrogen), segundo as instruções do protocolo. A presença de DNA genómico foi confirmada em gel de agarose a 1% (Molecular Biology Agarose, BioRad) seguindo os procedimentos standard da eletroforese em gel de agarose (Davis *et al.*, 1994) e usando como tampão Tris-Acetato EDTA (TAE 1%, BioRad – 40 mM Tris, 20 mM Ácido acético, 1 mM EDTA,

pH:8,3). A voltagem aplicada variou entre 100 volts durante 30 minutos a 110 volts durante 20 minutos. Ao gel de agarose foi adicionado 5 µL de brometo de etídio (BioRad) de uma solução stock de 10 mg/ml. Cada poço foi carregado com 4 µL de DNA e 2 µL de tampão de carregamento a 1x (Nucleic acid sample loading buffer 5x, BioRad – 50mM Tris-HCl, pH:8,0; 25% Glicerol, 5Mm EDTA; 0,2 Azul de Bromofenol e 0,2% Xylene Cyanol FF). O marcador utilizado foi de 1 Kb Plus (Invitrogen) (fragmentos de 100bp a 12kb). A imagem do gel foi obtida recorrendo ao transiluminador CSLMICRODOC System (Cleaver Scientific Ltd.), acoplado a uma câmara Cannon PowerShot G9.

3.7.2. Obtenção de produtos de PCR

Para a identificação das cianobactérias foram usados os pares de primers 27F/809R e 740F/1494R (Invitrogen) que codificam um fragmento de 782bp (pares de bases) do gene que codifica o 16S rRNA (Tabela VII). As condições seguidas para a obtenção de produtos de PCR encontram-se descritas na tabela VIII.

Tabela VII: Primers utilizados na identificação molecular das estirpes de cianobactérias.

Primer	Sequência (5'>>3')	Referência
740F	GGCYRWAWCTGACACTSAGGGA	Neilan <i>et al.</i> , 1997 Jungblut <i>et al.</i> , 2005
1494R	TACGGCTACCTTGTTACGAC	
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	
809R	GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA	

Para cada par de primers foram realizadas reações de PCR num volume final de 20 µL. Cada reação consistiu em 2 µL de tampão de reação 10X NH₄, 1µL de 50 mM de MgCl₂ e de cada primer, 2 µL de 2,5 mM de dNTPs mix, 0,1µL de *Taq* DNA polimerase 5 u/µL e 1 µL de DNA de cada uma das estirpes de cianobactérias. As reações decorreram nos termocicladores Biometra Professional Thermocycler e Biorad MyCycler Thermal Cycler. A análise dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5 e 2%, tendo sido usadas para visualização as mesmas condições usadas para a visualização do DNA genómico. O controlo

positivo foi efetuado com DNA da estirpe de *Microcystis aeruginosa* LEGE 00063. Como controlo negativo foi utilizada água destilada estéril.

Tabela VIII: Condições das reacções de PCR para cada par de primers utilizados na identificação das estirpes e dos genes envolvidos na produção de toxinas.

Par de Primer	Reação de PCR					Referências
	Desnatur. Inicial	Desnatur.	Emparelhamento	Extensão	Extensão final	
27F/809R 740F/1494R	92°C 2min	35 ciclos			72°C 5min	Neilan <i>et al.</i> , 1997 Junblut <i>et al.</i> , 2005
		92°C 20s	50°C 30s	72°C 1min		
CDF/CDR	95°C 10min	40 ciclos			72°C 5 min	Hisbergues <i>et al.</i> , 2003
		94°C 30s	59°C 30s	72°C 30s		
HEPF/HEPR	92°C 2min	35 ciclos			72°C 5min	Junblut e Neilan, 2006
		92°C 20s	52°C 30s	72°C 60s		
2959F/3278R	94°C 30s	35 ciclos			72°C 5min	Nonneman e Zimba, 2002
		94°C 30s	57°C 45s	72°C 1min		
PSCF/PSCR	94°C 5min	35 ciclos			72°C 7 min	Quahid <i>et al.</i> , 2005
		95°C 60s	52°C 30s	72°C 1min		
PKDF1/PKDR1 PKDF2/PKDR2	94°C 5min	35 ciclos			72°C 7 min	Quahid <i>et al.</i> , 2005
		95°C 60s	52°C 30s	72°C 1min		
PKEF/PKER	94°C 5min	35 ciclos			72°C 7 min	Quahid <i>et al.</i> , 2005
		95°C 60s	52°C 30s	72°C 1min		
PKGf/PKGR	94°C 5min	35 ciclos			72°C 7 min	Quahid <i>et al.</i> , 2005
		95°C 60s	52°C 30s	72°C 1min		
M13/M14 M4/K18	94°C 10min	30 ciclos			72°C 7 min	Schembri <i>et al.</i> ,2001 ; Fergusson e Saint, 2003
		94°C 10s	52°C 20s	72°C 60s		
682F/877R	94°C 3min	35 ciclos			72°C 7 min	Kellmann <i>et al.</i> , 2008
		94°C 10s	52°C 20s	72°C 60s		

3.8. Identificação de genes envolvidos na produção de toxinas

Foi realizada a pesquisa de genes envolvidos na produção de microcistinas, cilindrospermopsina e saxitoxina. Para a detecção do gene envolvido na produção de microcistinas foram usados os pares de primers: CD1F/CD1R; 2959F/3278R; PKEF/PKER; PKDF1/PKDR1; PKDF2/PKDR2; PKGF/PKGR; HEPF/HEPR. Na detecção do gene envolvido na produção de cilindrospermopsina foram usados os pares de primers M13/M14 e M4/K18. Por último, para a detecção do gene envolvido na produção da saxitoxina foram usados os pares de primers 682F/877R e SXTIF/SXTIR. Todos os pares de primers, genes alvo e referências encontram-se descritos na tabela IX e as condições de PCR encontram-se também descritas na tabela VIII. A confirmação da amplificação por PCR foi feita em gel de agarose, como descrito anteriormente para a presença do DNA genómico.

Como controlo positivo para detecção dos genes envolvidos na síntese de microcistinas e relativos aos primers CD1F/CD1R, HEPF/HEPR, 2959F/3278R, PSCF/PSCR, PKDF1/PKDR1, PKDF2/PKDR2, PKEF/PKER e PKGF/PKGR foi utilizado DNA da estirpe de *Microcystis aeruginosa* LEGE 00063. Como controlo positivo para a síntese de cilindrospermopsina e relativo aos pares de primers M13/M14 e M4/K18 foi utilizado DNA da estirpe de *Cylindrospermopsis raciborskii* LEGE 97047. Por fim, como controlo positivo para a síntese de saxitoxina e relativo aos primers 682R/877R e SXTIF/SXTR foi utilizado DNA da estirpe de *Aphanizomenon gracile* - LMECYA 40. Como controlo negativo foi utilizada água destilada estéril.

Tabela IX: Primers usados na identificação de genes envolvidos na produção das toxinas microcistinas, cilindropermopsina e saxitoxina.

Primer	Gene	Sequências (5'>>3')	Tamanho (bp)	Annealing temp. °C	Referência
Cd1F	<i>mcyA</i>	AAAATTAAGCCGATCAAA	297	59	Hisbergues <i>et al.</i> , 2003
Cd1R		AAAAGTGTTTATTAGCGGCTCAT			
2959F	<i>mcyB</i>	TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA	320	57	Nonneman e Zimba 2002
3278R		AGAGTGGAACAATATGATAAGCTAC			
PSCF	<i>mcyC</i>	GCAACATCCCAAGAGCAAAG	674	52	Quahid <i>et al.</i> , 2005
PSCR		CCGACAACATCACAAGGC			
PKDF1	<i>mcyD</i>	GACGCTCAAATGATGAAAC	647	52	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
PKDR1		GCAACCGATAAAAACTCCC			
PKDF2		AGTTATTCTCCTCAAGCC	859	52	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
PKDR2		CATTCTGAGGCTGTAATCGGGTTT			
HEPF	<i>mcyE</i>	TTTGGGGTAACTTTTTGGGCATAGTC	472	52	Jungblut e Neilan 2006
HEPR		AATTCTGAGGCTGTAATCGGGTTT			
PKEF1	<i>mcyE</i>	CGCAAACCCGATTTACAG	755	52	Quahid <i>et al.</i> , 2005
PKER1		CCCCTACCATCTTCATCTTC			
PKGF1	<i>mcyG</i>	ACTCTCAAGTTATCCTCCCTC	425	52	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
PKGR1		AATCGCTAAAACGCCACC			
M13	<i>Peptide synthetase</i>	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC	597	55	Schembri <i>et al.</i> , 2001
M14		GATGGAACATCGCTCACTGGTG			
K18	<i>Polyketide synthase</i>	CCTCGCACATAGCCATTTGC	422	55	Schembri <i>et al.</i> , 2001 e Fergusson e Saint 2003
M4		GAAGCTCTGGAATCCGGTAA			
SXTIF	<i>sxtI</i>	GCTTACTACCACGATAGTGCTGCCG	1669	52	Kellmann <i>et al.</i> , 2008
SXTIR		GGTTCGCCGCGACATTA			
682F	<i>sxtI</i>	GGATCTCAAAGAAGATGGCA	200	52	Ramos, V unpublished
877R		GCCAAACGCAGTACCACTT			

3.9. Preparação das amostras para sequenciação e alinhamento das sequências

Para sequenciação, todos os produtos de PCR foram purificados recorrendo ao kit para purificação de DNA “PCR Clean-up Gel extraction” (Macherey- Nagel) de acordo com as instruções do protocolo. Todos os produtos e primers foram sequenciados pela empresa STABVIDA (www.stabvida.com).

Uma vez que se amplificou a mesma região dos genes em dois sentidos, com vista a tornar a sequência obtida mais completa, utilizaram-se dois programas. Um dos programas – reverse complement – teve como objetivo desenvolver a sequência de modo inverso (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html). Um segundo programa - multalin - alinha as duas sequências, permitindo por tratamento manual completar bases em falta ou possíveis erros (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Este processo foi realizado para os dois fragmentos do gene *16S rRNA*, e posteriormente, recorrendo novamente ao programa multalin, os dois fragmentos foram alinhados, com vista a que o fragmento para determinação do género fosse maior para aumentar a certeza dos resultados. As sequências obtidas foram inseridas na base de dados BLASTn (Basic Local Alignment and Search Tool for nucleotide), integrado no NCBI (Nacional Centre for Biotechnology Information - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome), determinando-se o género da estirpe. A determinação do género da estirpe teve por base uma combinação do máximo “score” e da percentagem de similaridade com o organismo sequenciado.

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação da toxicidade face à microlaga *Nanochloropsis* sp.

Relativamente ao ensaio com *Nanochloropsis* sp., apresentam-se os resultados referentes as estirpes LEGE 06139, LEGE 07175 e LEGE 07186, todas do género *Cyanobium*, uma vez que para estas estirpes se verificou a ocorrência de inibição do crescimento da microalga com as frações A, B e C (Fig.7). Os resultados referentes às restantes estirpes de cianobactérias e para as quais não se verificaram inibições evidentes no crescimento da microalga, apresentam-se em anexo (Anexo III).

Com as estirpes LEGE 06139 e LEGE 07186 verificou-se uma diminuição do crescimento da microalga nas frações A, B e C, sendo esta inibição dependente da concentração e mais evidente na fração sem diluição ou seja para uma concentração de 10 µg/mL. No extrato bruto foi apenas registada uma pequena diminuição do crescimento da microalga no extrato não diluído. Estes resultados apontam para a produção de compostos inibidores da divisão celular e presentes nas frações A, B e C. No entanto, parecem também estar presentes compostos que favorecem a divisão das células e que em conjunto atenuam o efeito inibidor de outros compostos, o que poderá justificar a ocorrência de apenas uma ligeira diminuição do crescimento observada no extrato bruto.

Para a estirpe LEGE 07175 verificou-se também uma inibição do crescimento nas frações A e B mas na forma mais diluída e, tal como nas duas estirpes anteriores, também uma inibição com a fração C, inibição esta também dependente da concentração. Para esta estirpe e no extrato bruto verificou-se um ligeiro aumento da densidade celular o que parece mais uma vez refletir a presença de compostos estimuladores do crescimento.

A observação de efeitos estimulatórios e inibitórios por extratos de cianobactérias em microalgas tem sido descrita por vários autores (Gantar *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2011). Assim é sugerido que determinados compostos possam exercer um efeito de inibição do crescimento em determinadas concentrações mas em pequenas concentrações possam ter um efeito de estimulação do crescimento.

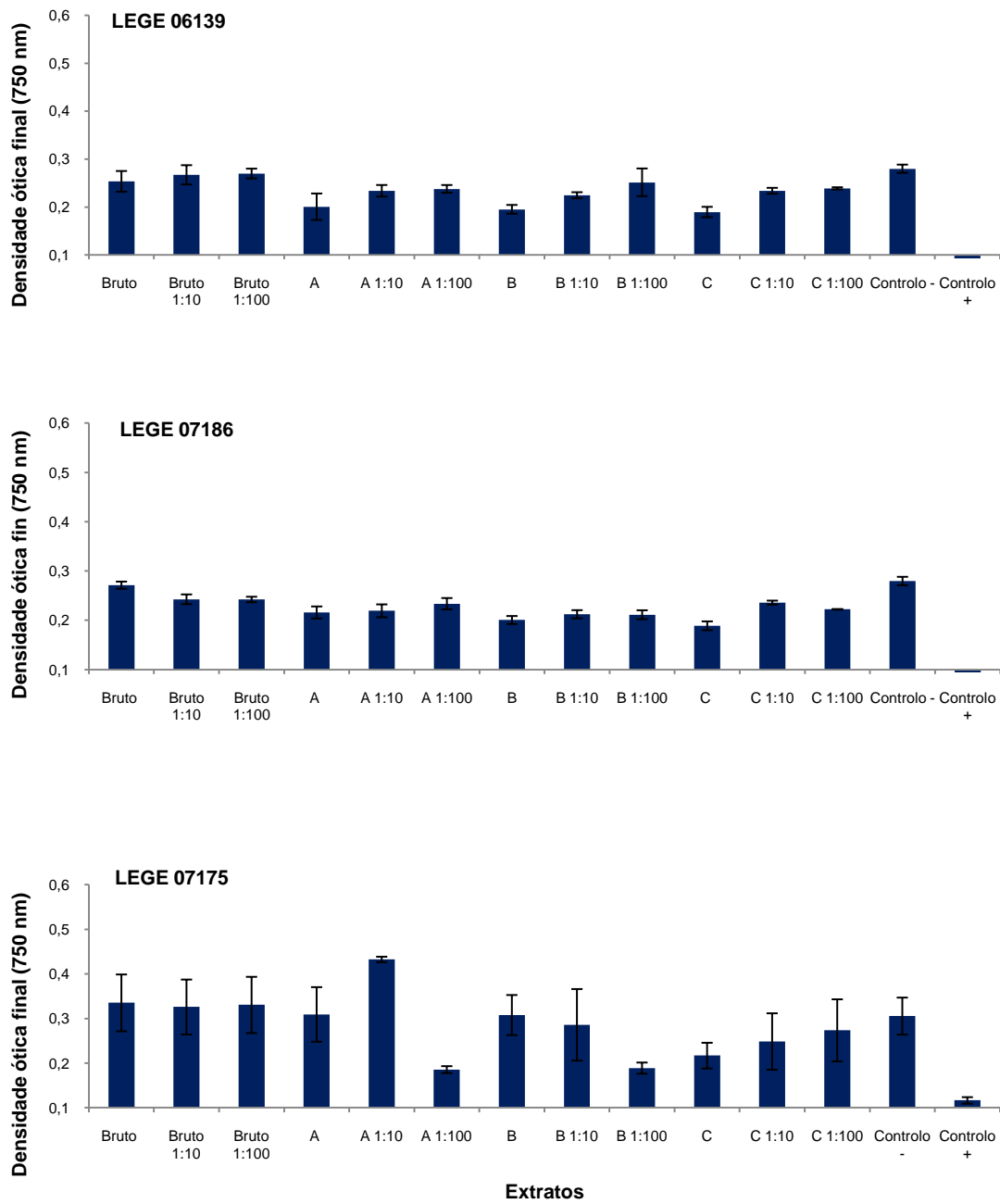


Fig. 7 - Densidade óptica final de *Nanochloropsis* sp. exposta ao extrato bruto e às frações A, B e C das estirpes LEGE 06139, LEGE 07186 e LEGE 07175 por um período de 72 horas.

4.2. Avaliação da toxicidade face a náuplios de *Artemia salina*

Os resultados de toxicidade obtidos com o crustáceo *Artemia salina* estão apresentados nas tabelas seguintes. Os resultados revelam uma toxicidade baixa ou nula se compararmos as taxas de mortalidade dos tratamentos com o controlo negativo. A percentagem de mortalidade registada observa-se no extrato bruto e frações A, B e C, e, apesar de não se verificar nenhuma incidência notória particular, a fração B parece ser onde, no geral das estirpes, se regista maior mortalidade. Os resultados obtidos demonstram que para as concentrações de extrato/fração testadas as estirpes de cianobactérias não apresentam relevância ecológica negativa face a *Artemia salina*.

Tabela X: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06108. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.

Concentração	Extratos							
	24 horas				48 horas			
	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C
50 mg/mL	0	0	7,69 \pm 13,32	0	5,56 \pm 9,62	2,22 \pm 3,85	13,29 \pm 15,81	1,85 \pm 3,21
25 mg/mL	0	0	5,59 \pm 4,90	0	21,48 \pm 11,18	0	10,72 \pm 11,62	0
12,5 mg/mL	0	0	0	0	8,10 \pm 7,33	0	3,33 \pm 5,77	0
Controlo -	3,03 \pm 5,25				5,81 \pm 5,04			
Controlo +	67,34 \pm 30,17				100 \pm 0			

Tabela XI: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06102. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.

Concentração	Extratos							
	24 horas				48 horas			
	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C
50 mg/mL	0	0	0	0	3,33 \pm 5,77	5,16 \pm 4,51	5,13 \pm 8,88	4,63 \pm 4,24
25 mg/mL	0	0	0	0	0	0	4,60 \pm 3,99	9,70 \pm 10,01
12,5 mg/mL	0	0	0	0	0	0	0	3,61 \pm 3,13
Controlo -	3,03 \pm 5,25				5,81 \pm 5,04			
Controlo +	67,34 \pm 30,17				100 \pm 0			

Tabela XII: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06152. Resultados expressos em percentagem de mortalidade (%) \pm desvio-padrão, n=3.

Concentração	Extratos							
	24 horas				48 horas			
	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C
50 mg/mL	0	0	0	0	3,33 \pm 5,77	5,16 \pm 4,51	5,13 \pm 8,88	4,63 \pm 4,24
25 mg/mL	0	0	0	0	0	0	4,60 \pm 3,99	9,70 \pm 10,01
12,5 mg/mL	0	0	0	0	0	0	0	3,61 \pm 3,13
Controlo -	3,03 \pm 5,25				5,81 \pm 5,04			
Controlo +	67,34 \pm 30,17				100 \pm 0			

Tabela XIII: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 07175. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.

Concentração	Extratos							
	24 horas				48 horas			
	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C
50 mg/mL	0	0	0	0	0	9,29 \pm 8,18	28,57 \pm 28,57	2,78 \pm 4,81
25 mg/mL	0	0	0	0	23,61 \pm 20,55	0	11,11 \pm 12,73	34,52 \pm 37,85
12,5 mg/mL	0	0	0	0	3,33 \pm 5,77	8,89 \pm 8,39	2,78 \pm 4,81	20,83 \pm 7,22
Controlo -	0				21,43 \pm 10,38			
Controlo +	67,34 \pm 30,17				100 \pm 0			

Tabela XIV: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06134. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.

Concentração	Extratos							
	24 horas				48 horas			
	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C
50 mg/mL	0	0	0	0	4,76 \pm 8,25	6,67 \pm 11,55	0	5,56 \pm 9,62
25 mg/mL	0	0	0	0	29,21 \pm 13,34	16,67 \pm 28,87	23,06 \pm 14,82	6,67 \pm 11,55
12,5 mg/mL	0	0	0	0	16,98 \pm 2,87	24,44 \pm 21,43	5,56 \pm 9,62	16,67 \pm 14,43
Controlo -	0				0			
Controlo +	67,34 \pm 30,17				100 \pm 0			

Tabela XV: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 07186. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.

Concentração	Extratos							
	24 horas				48 horas			
	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C
50 mg/mL	0	0	0	0	6,67 \pm 11,55	6,94 \pm 6,36	15,74 \pm 13,70	14,81 \pm 16,97
25mg/mL	0	0	0	0	18,89 \pm 20,09	6,67 \pm 11,55	16,38 \pm 1,98	16,15 \pm 19,96
12,5mg/mL	0	0	0	0	2,56 \pm 4,44	36,67 \pm 28,48	9,97 \pm 11,29	17,68 \pm 18,20
Controlo -	0				0			
Controlo +	67,34 \pm 30,17				100 \pm 0			

Tabela XVI: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06098. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.

Concentração	Extratos							
	24 horas				48 horas			
	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C
50 mg/mL	0	2,90 \pm 5,02	1,01 \pm 1,75	1,45 \pm 2,51	6,67 \pm 11,55	7,37 \pm 4,47	7,18 \pm 3,83	1,67 \pm 2,89
25 mg/mL	0	0	1,28 \pm 2,22	0	6,29 \pm 5,55	1,75 \pm 3,04	7,98 \pm 1,89	1,52 \pm 2,62
12,5 mg/mL	0	0	0	0	1,75 \pm 3,04	11,70 \pm 9,31	1,45 \pm 2,51	0,98 \pm 1,70
Controlo -	0				0			
Controlo +	67,34 \pm 30,17				100 \pm 0			

Tabela XVII: Resultados de toxicidade para os extratos bruto, fração A, fração B, fração C às 24 horas e 48 horas para a estirpe LEGE 06139. Resultados expressos em percentagem de mortalidade \pm desvio-padrão, n=3.

Concentração	Extratos							
	24 horas				48 horas			
	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C	Bruto	Fração A	Fração B	Fração C
50 mg/mL	0	0	3,03 \pm 5,25	0	0	3,70 \pm 6,42	17,17 \pm 16,69	0
25 mg/mL	0	0	0	0	0	0	18,70 \pm 7,03	10,32 \pm 9,01
12,5 mg/mL	0	0	0	0	0	0	12,42 \pm 13,80	3,70 \pm 6,42
Controlo -	0				0			
Controlo +	18,89 \pm 11,71				100,00 \pm 0			

4.3. Avaliação da toxicidade em ovos fertilizados de *Paracentrotus lividus*

No ensaio com ovos fertilizados de *Paracentrotus lividus* verificou-se que nem o extrato bruto nem as frações das estirpes testadas inibiram o desenvolvimento embrionário, tendo-se formado em todos os casos larvas pluteus. No entanto, para algumas das estirpes observou-se uma diminuição do tamanho das larvas, quando comparadas com as larvas do controlo negativo, assim como a formação de larvas com morfologia anormal. Os casos em que o tamanho das larvas formadas foi inferior ao controlo ocorreram na fração C, com exceção das estirpes LEGE 06098 e LEGE 07175 (Fig.8). Foi também registado um menor tamanho das larvas expostas à fração B, especialmente nas estirpes LEGE 06098 e LEGE 06139. De uma forma geral, no extrato bruto registou-se uma pequena diminuição do tamanho das larvas quando comparado com o controlo negativo, sendo esta diminuição inversamente proporcional à concentração do extrato.

As maiores diferenças em termos de tamanho das larvas observaram-se, de um modo geral, no extrato/fração mais concentrado. Nos extratos diluídos verificou-se em alguns casos um ligeiro aumento do tamanho das larvas em relação ao controlo, como se pode verificar com as estirpes LEGE 06108, LEGE 06139 e LEGE 07175. Estes dados revelam a possível produção de compostos que em elevadas concentrações desencadeiam um efeito tóxico mas em menores concentrações têm um efeito estimulador no crescimento das larvas. A ligeira diminuição do tamanho das larvas nos extratos brutos pode dever-se à mistura de vários compostos com efeitos antagónicos. Assim, a diminuição do tamanho das larvas nas frações C e B pode ser devida á presença de compostos com efeito inibidor e o aumento do tamanho das larvas verificado na fração A (LEGE 06102 e LEGE 06134) pode ser devido à presença de compostos com efeitos estimuladores do crescimento. O menor tamanho das larvas e as malformações observadas podem ser o resultado de possíveis alterações a nível citogenético das células.

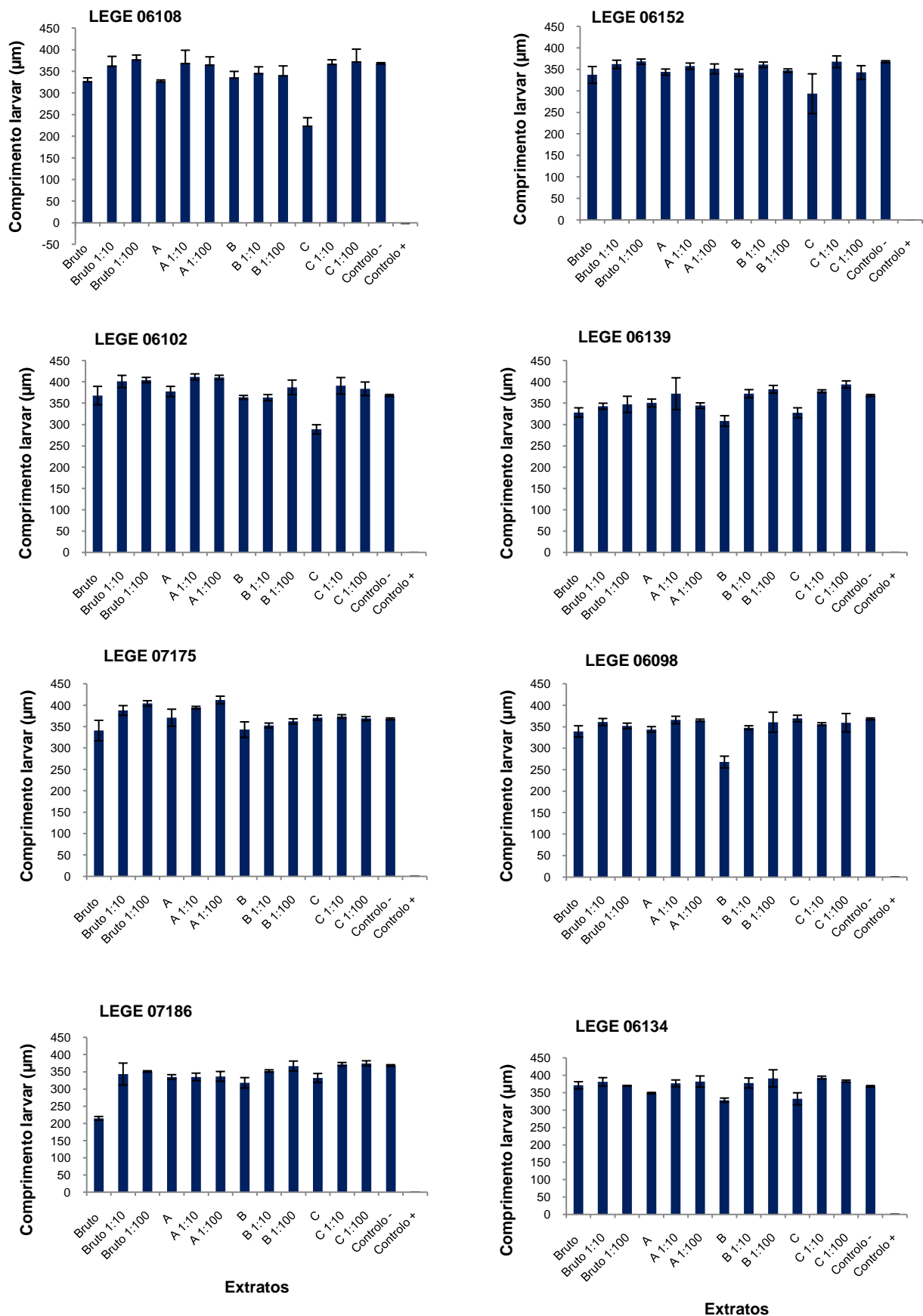


Fig. 8 – Comprimento das larvas pluteus de *Paracentrotus lividus* após exposição de ovos fertilizados ao extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 06152, LEGE 06102, LEGE 06139, LEGE 06098, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134, controlo negativo e controlo positivo.

4.4. Bioatividade face a *Pseudomonas* sp. NB3L

O ensaio em que se pretendeu avaliar o crescimento de uma cultura de *Pseudomonas* sp. exposta ao extrato bruto e às diferentes frações das estirpe de cianobactérias em estudo teve como objetivo avaliar o seu potencial antibacteriano. Com este ensaio apenas se obtiveram efeitos inibitórios com a fração A da estirpe LEGE 06139 (Fig. 9). Para as restantes estirpes de cianobactérias (Anexo V) na maior parte dos casos não se verificaram alterações no crescimento das bactérias quando comparadas com o controlo, ou ocorreu uma estimulação do crescimento.

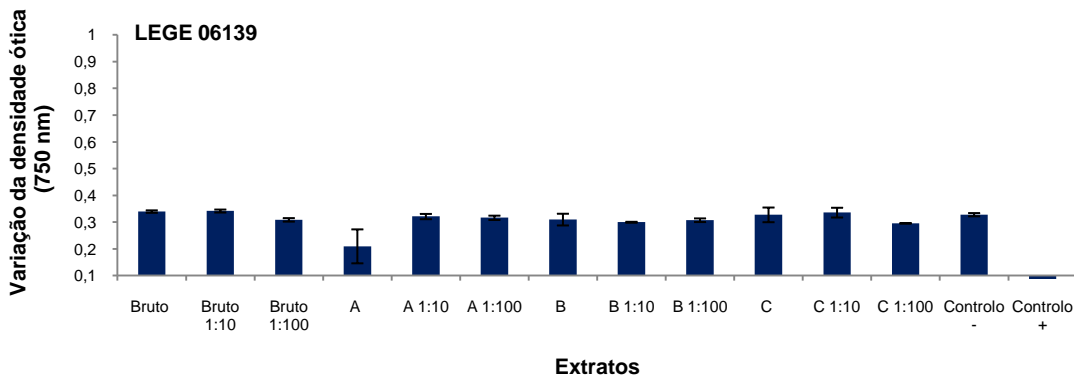


Fig. 9 - Variação de densidade ótica da bactéria *Pseudomonas* sp. NB3L exposta ao extrato bruto e frações A, B e C da estirpe LEGE 06139.

4.5. Citotoxicidade face a linhagens celulares tumorais e normais humanas

O estudo da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais dos extratos de cianobactérias incluídas no estudo prendeu-se com o facto de as cianobactérias marinhas estarem descritas como organismos promissores no que diz respeito a produção de compostos com propriedades anticancerígenas (Tan, 2007; Gerwick *et al.*, 2008; Tan 2010). Neste trabalho avaliou-se a inibição da proliferação celular de linhagens tumorais humanas utilizando o método da redução do MTT. Este é um método colorimétrico rápido, frequentemente usado para medir proliferação celular e citotoxicidade (Berridge e Tan, 1993). Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de *formazan* de cor violeta que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo este um mecanismo fundamental das células vivas, o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de viabilidade celular.

Na medida em que se tratam de linhagens celulares tumorais, interessa encontrar extratos onde se verifique uma inibição do crescimento das células. Neste caso consideramos

interessantes os extratos nos quais se verificou uma diminuição da viabilidade celular acima dos 50-60%. Nas figuras seguintes, e para cada linhagem celular, apresentam-se os resultados mais representativos relativos às estirpes de cianobactérias para as quais se obtiveram efeitos inibitórios. Os resultados relativos às estirpes de cianobactérias para as quais não se registaram resultados interessantes do ponto de vista de inibição do crescimento celular apresentam-se em anexo (Anexo IV).

De uma forma geral verificou-se que a fração onde se registou uma maior diminuição da viabilidade celular foi a fração B e, nos casos das estirpes LEGE 06102, LEGE 06152 e LEGE 06139 também a fração C.

A diminuição da viabilidade celular foi mais evidente nas células HEPG2, RKO SKBR3 e T47D expostas à fração B das estirpes LEGE 06102 e LEGE 06098, seguidas, com menor diminuição da viabilidade celular, pela estirpe LEGE 06152.

Para a maior parte das estirpes e extratos verificou-se que o crescimento celular variou de forma inversa à concentração de extrato, sendo maior nas concentrações mais baixas. Também para as concentrações mais baixas de extrato/fração verificou-se em vários casos uma estimulação do crescimento. Em relação ao tempo de exposição registaram-se resultados contraditórios uma vez que para algumas estirpes e extratos se verificou um aumento da viabilidade celular com o tempo de exposição e noutras estirpes se registou uma diminuição da viabilidade celular ao fim de 48 horas seguida de uma recuperação das células ao fim das 72 horas como verificado para a estirpe LEGE 06139 nas linhagens HEPG2, RKO e SKBR3.

Os resultados obtidos apontam para a produção de compostos com efeito tóxico e compostos que estimulam o crescimento das células, ou o mesmo tipo de composto pode exercer um efeito tóxico a concentrações mais elevadas e estimular o crescimento celular quando em baixas concentrações. A menor percentagem de inibição no extrato bruto quando comparado com as frações A, B e C será o resultado da mistura dos vários compostos produzidos.

Das várias estirpes de cianobactérias as estirpes LEGE 06152 (*Leptolyngbya* sp.), LEGE 06102 (*Leptolyngbya* sp.) e LEGE 06098 (*Cyanobium* sp.) foram as que revelaram efeitos mais evidentes em termos de diminuição da viabilidade celular.

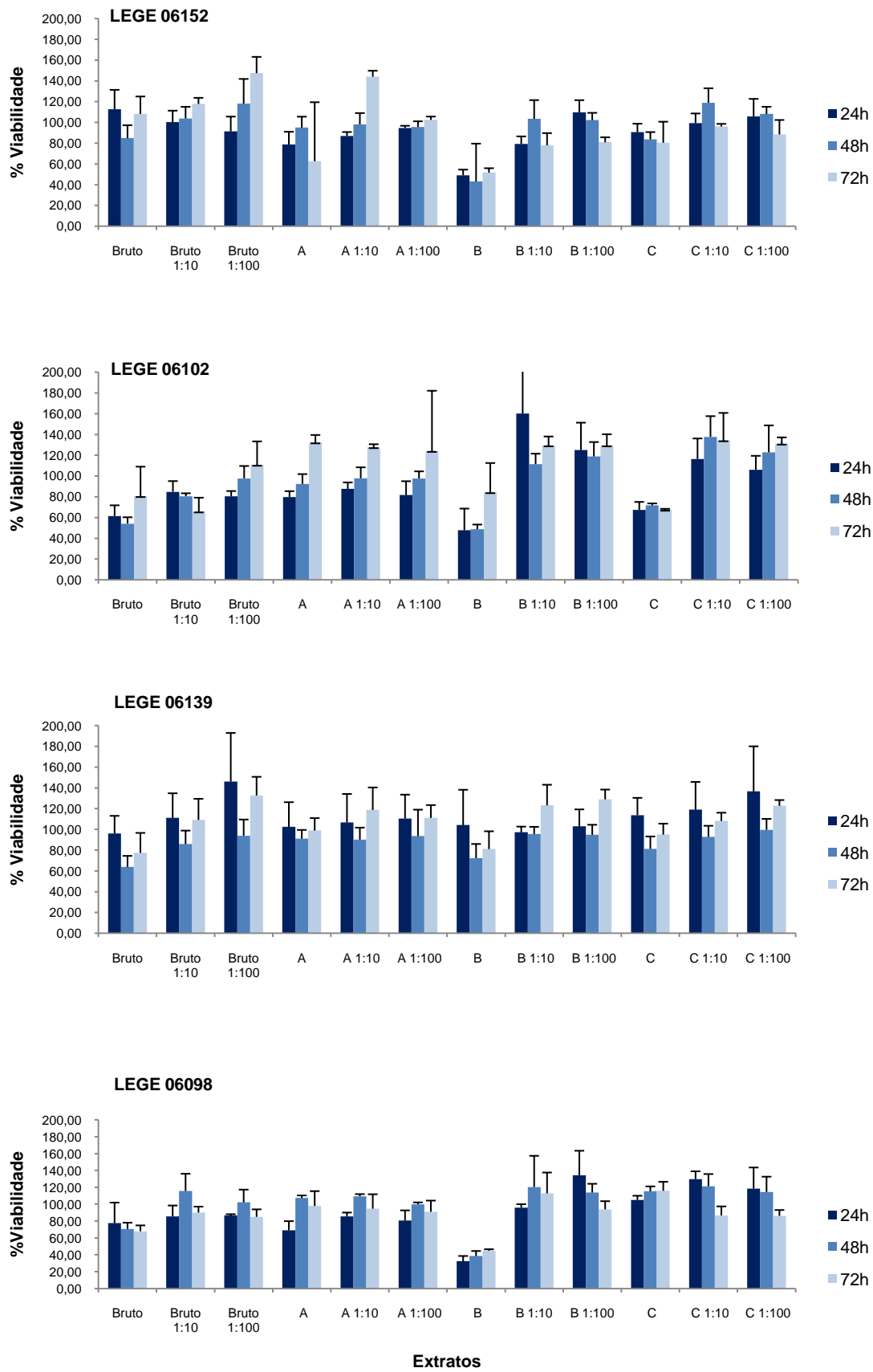


Fig. 10 - Viabilidade de células HEPG2 em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06152, LEGE 06102, LEGE 06139 e LEGE 06098 às 24, 48 e 72 horas.

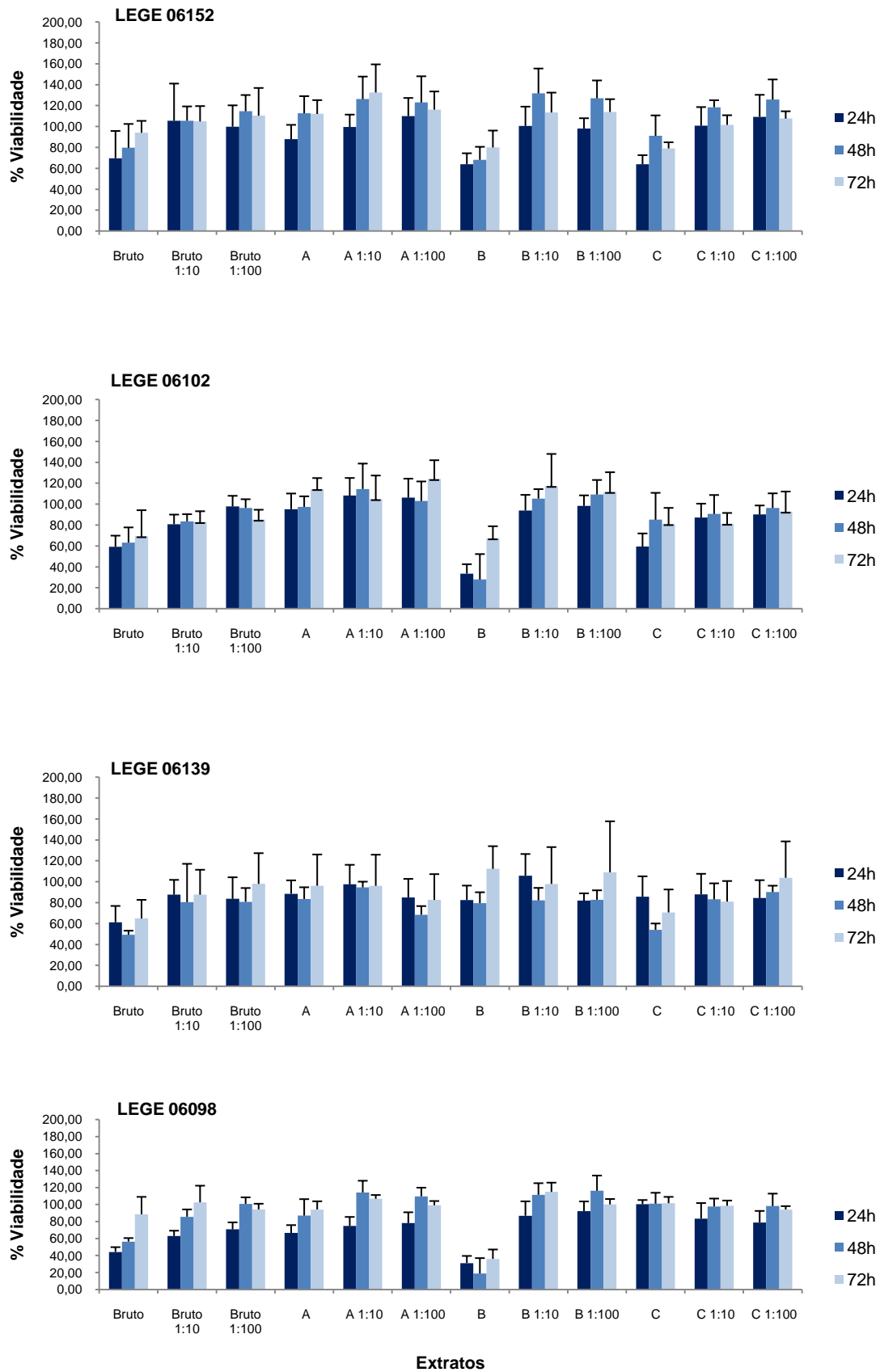


Fig 11 - Viabilidade de células RKO em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06152, LEGE 06102, LEGE06139 e LEGE 06098 às 24, 48 e 72 horas.

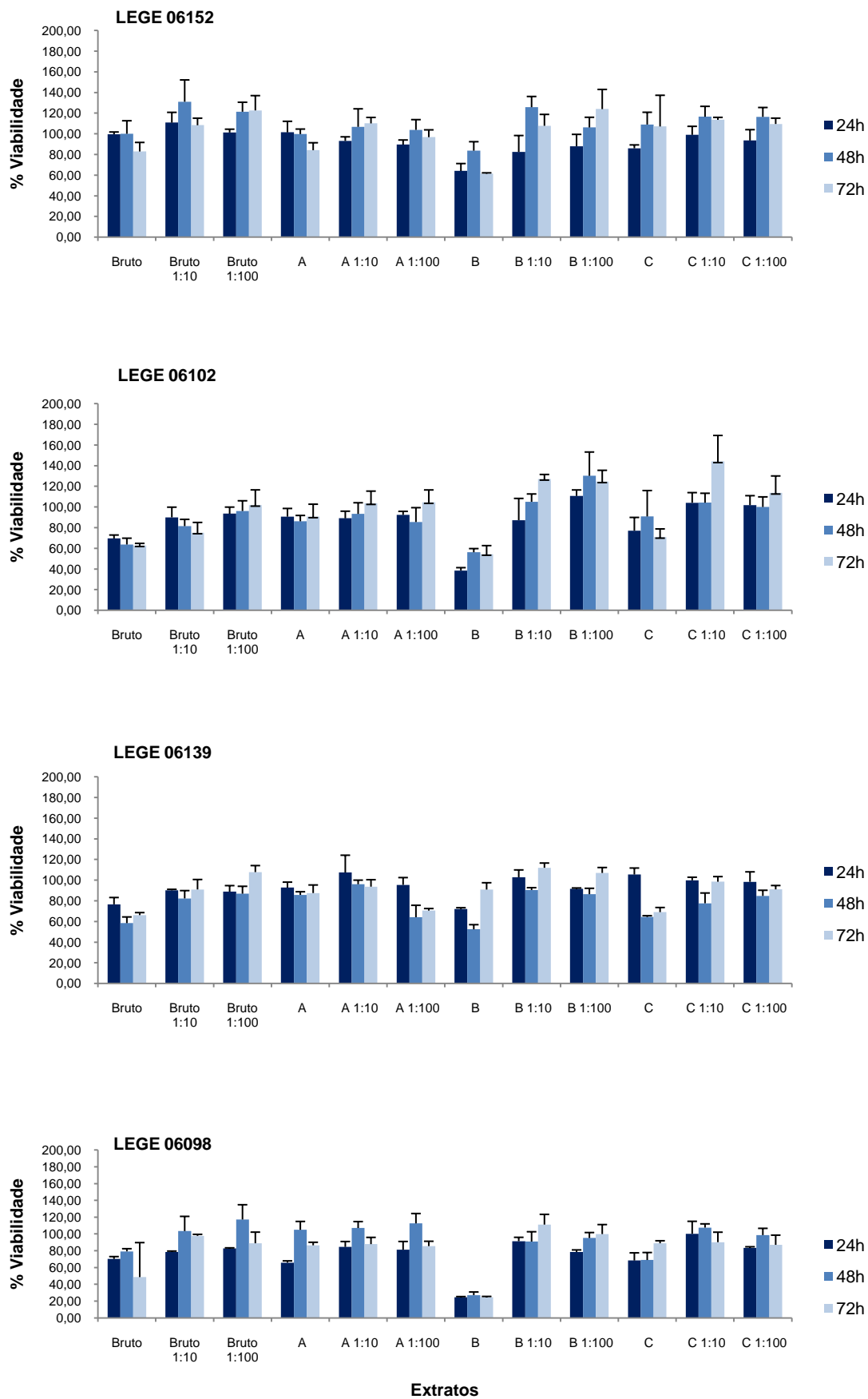


Fig. 12 - Viabilidade de células SKBR3 em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06152, LEGE 06102, LEGE 06139 e LEGE 06098 às 24, 48 e 72 horas.

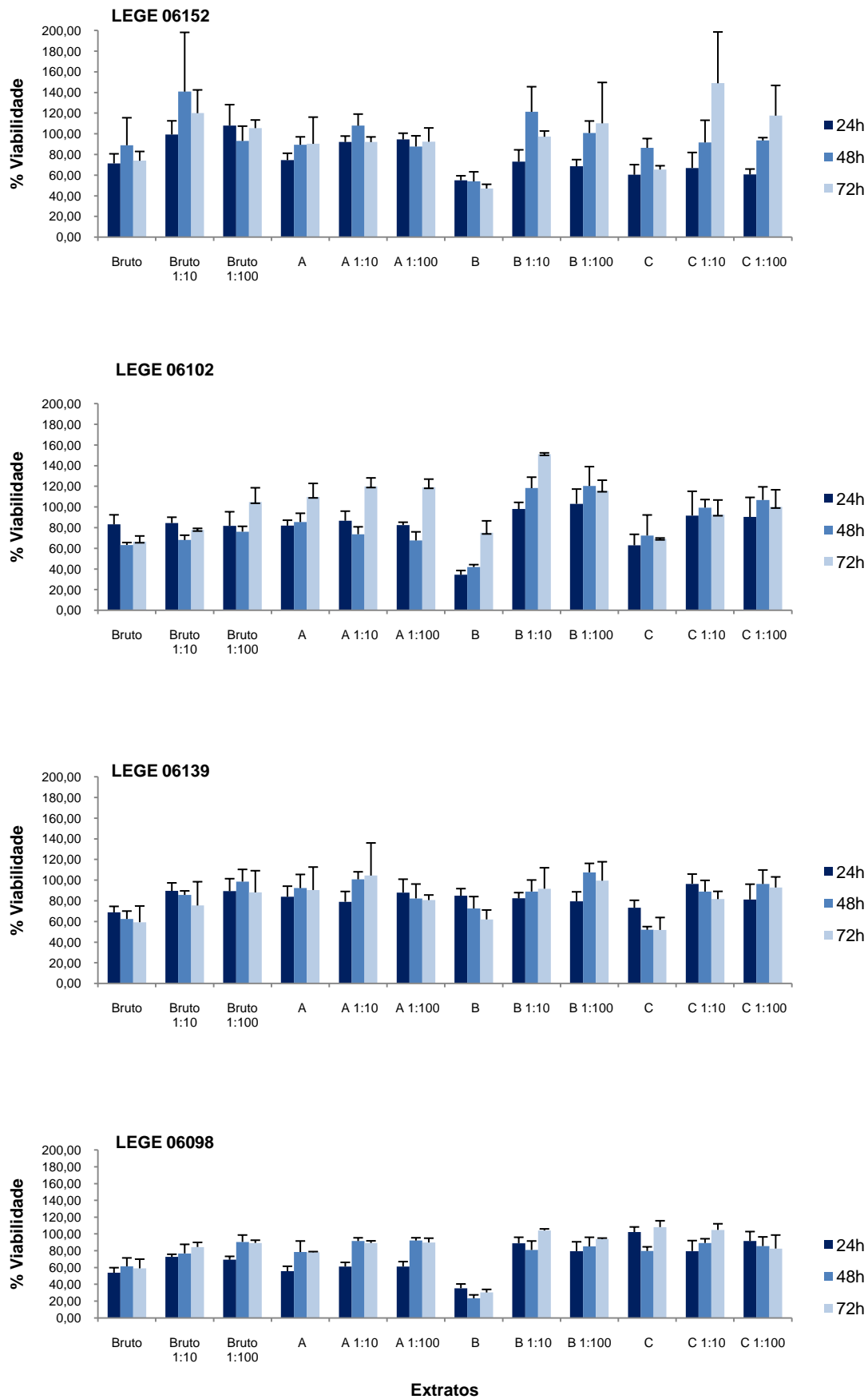


Fig. 13 - Viabilidade de células T47D em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06152, LEGE 06102, LEGE 06139 e LEGE 06098 às 24, 48 e 72 horas.

No que diz respeito ao ensaio de citotoxicidade em fibroblastos os resultados apresentam-se esquematizados nas figuras 14, 15 e 16. Analisando as figuras verifica-se que a viabilidade celular aumenta com a diminuição da concentração dos extratos. Com exceção da estirpe LEGE 06134, verifica-se também um aumento da viabilidade celular com o tempo de exposição, o que pode ser atribuído à presença de compostos que favorecem a proliferação das células. Verifica-se nestas células uma ligeira diminuição da viabilidade celular na fração B e na fração C, sendo no entanto esta inibição menos acentuada do que a verificada para as linhagens tumorais. Tal como verificado com as linhagens celulares tumorais também aqui os resultados apontam para a produção de compostos com efeitos inibitórios do crescimento celular e compostos que estimulam o crescimento celular ou também o mesmo composto pode exercer um efeito inibitório em concentrações mais elevadas e um efeito estimulatório quando em baixas concentrações. A diminuição de viabilidade celular observada no extrato bruto parece mais uma vez ser o resultado da mistura de vários compostos, que depois aparecem separadamente nas três frações.

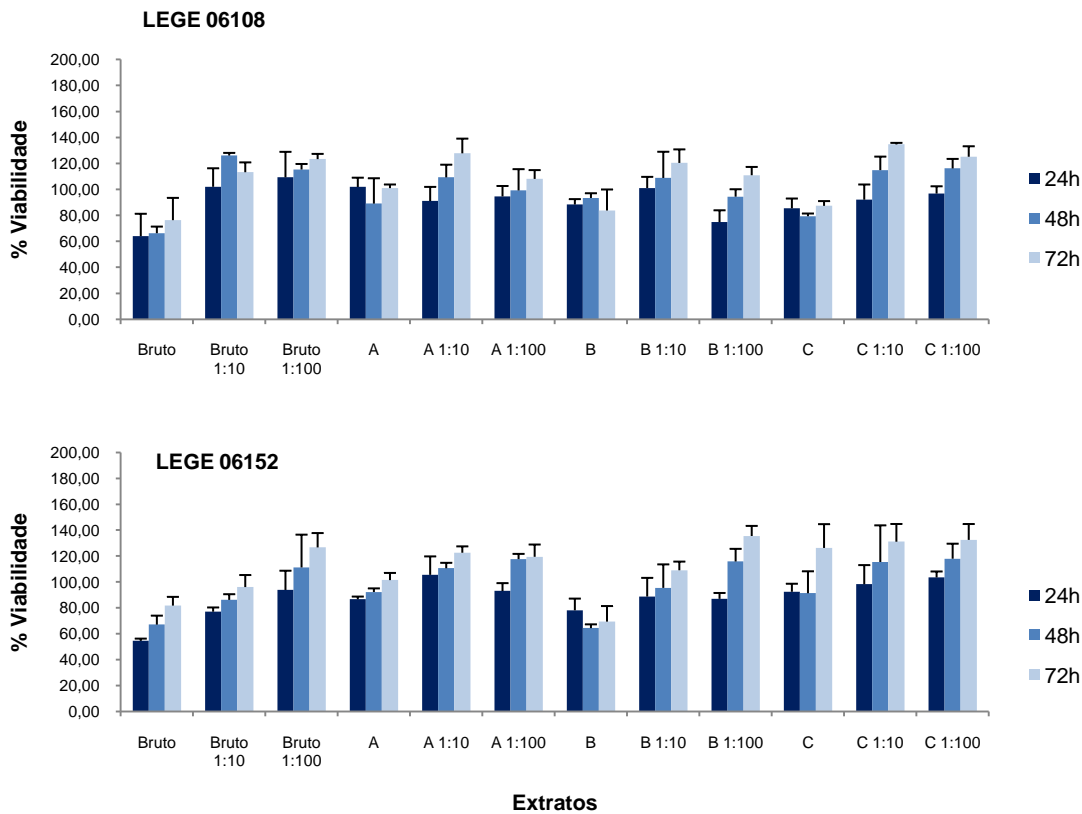


Fig. 14 - Viabilidade de fibroblastos em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108 e LEGE 06152 às 24, 48 e 72 horas.

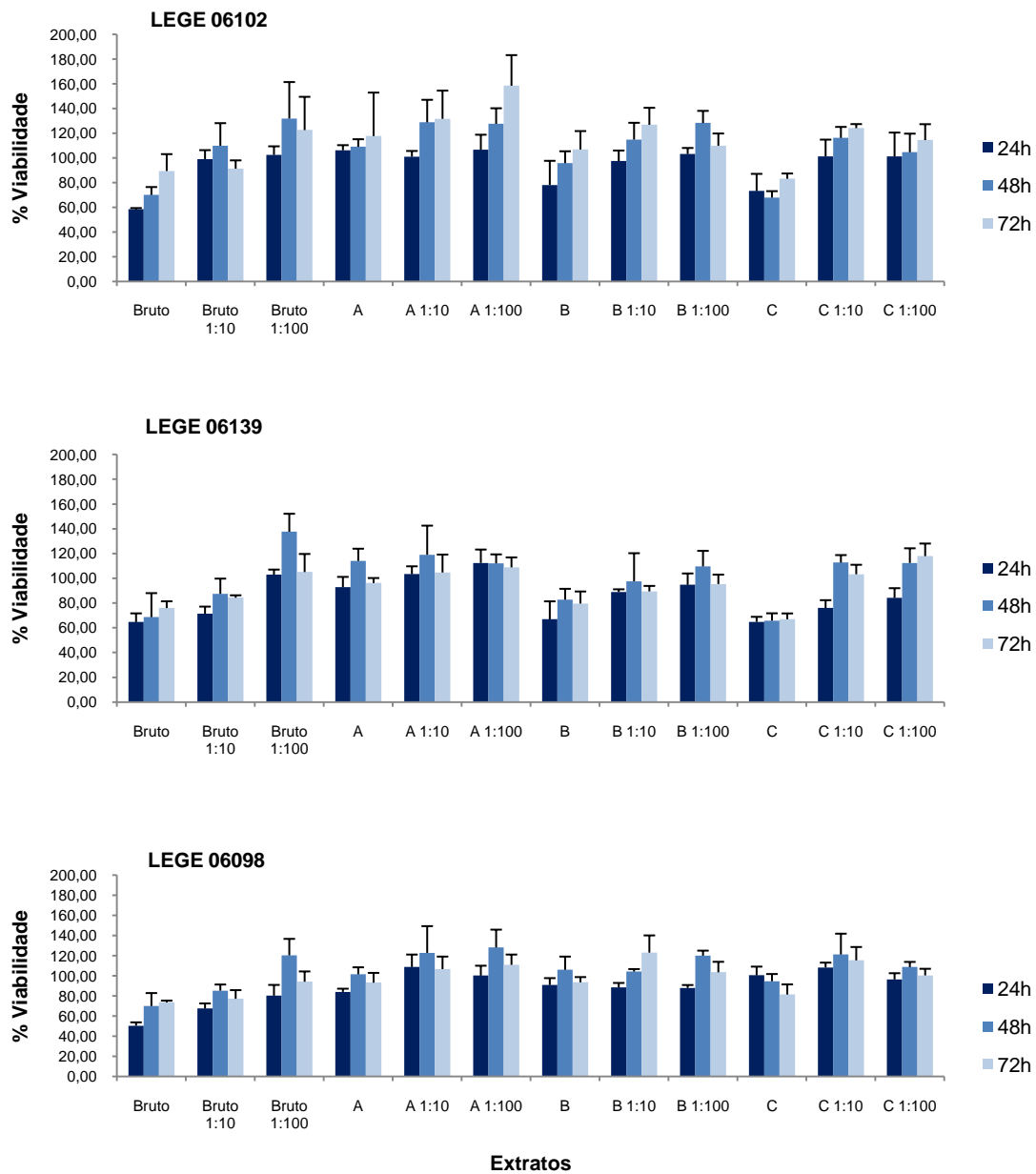


Fig. 15 - Viabilidade de fibroblastos em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06102, LEGE 06139 e LEGE 06098 às 24, 48 e 72 horas.

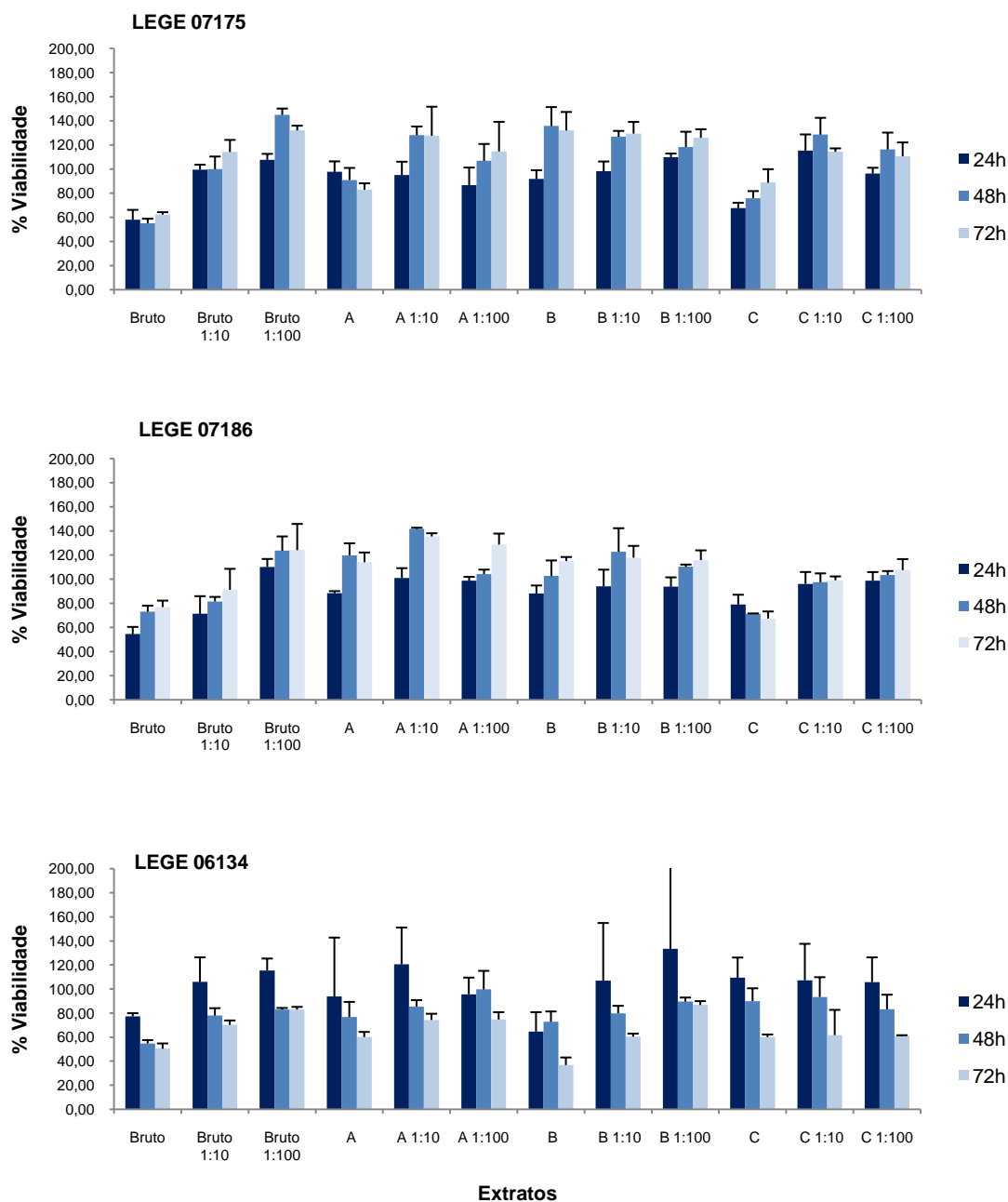


Fig. 16 - Viabilidade de fibroblastos em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134 às 24, 48 e 72 horas.

4.6. Identificação molecular das estirpes de cianobactérias e genes envolvidos na produção de cianotoxinas

Em termos moleculares e no que diz respeito às cianobactérias têm sido utilizadas metodologias que permitem não só a sua identificação como também a deteção de genes envolvidos na produção de algumas cianotoxinas. A identificação genotípica das cianobactérias tem vindo a reforçar a sua identificação com base em características morfológicas e a

identificação de genes relacionados com a produção de toxinas permite-nos referenciar as estirpes como potenciais produtoras das toxinas.

Na identificação com base em metodologias moleculares tem sido largamente usada a porção de DNA que codifica o RNA ribossomal (rRNA) presente na sub-unidade menor do ribossoma (16S) uma vez que esta fração apresenta uma distribuição ubíqua entre os grupos de procariotas (Otsuka *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2000). Esta porção designada no conjunto de gene 16S rRNA, apesar de conservada entre os procariotas, apresenta uma certa variabilidade capaz de conferir especificidade aos grupos a que pertence (Lyra *et al.*, 2001; Falcon *et al.*, 2002). Este gene além de distinguir espécies dentro de um género é também capaz de diferenciar estirpes dentro de uma espécie (Sangolkar *et al.*, 2006). As sequências do gene 16S rRNA são independentes das condições de crescimento ou de cultura e podem ser determinadas em culturas não axénicas.

Relativamente à identificação de genes envolvidos na produção de cianotoxinas esta metodologia permite-nos referenciar uma espécie como potencialmente tóxica, uma vez que, apesar de dentro de uma mesma espécie de cianobactérias poderem existir estirpes produtoras e não produtoras de toxinas, a produção de uma toxina depende da presença dos genes responsáveis pela sua produção. Sendo assim, caso estes genes estejam presentes, poderá ocorrer a produção de toxinas (Pearson e Neilan, 2008).

Os pares de primers 27F/809R e 740F/1494R amplificam o gene 16S rRNA em locais diferentes. Para o par 27F/809R não foi possível obter resultados satisfatórios não se tendo procedido à sua sequenciação (Fig. 17). Para o par de primers 740F/1494R foi conseguida uma boa amplificação (Fig. 18) tendo-se procedido a uma amplificação com 100 µL, de forma a obter a quantidade de DNA suficiente para sequenciar.

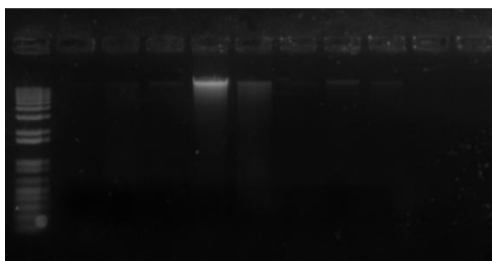


Fig. 17 - Produtos de amplificação do gene 16S rRNA com o par de primers 27F/809R. Poços da esquerda para a direita: marcador de 100pb, LEGE 07175, LEGE 06134, LEGE 07183, LEGE 06156, LEGE 07186, LEGE 06138, LEGE 06139, LEGE 06098, controlo negativo.

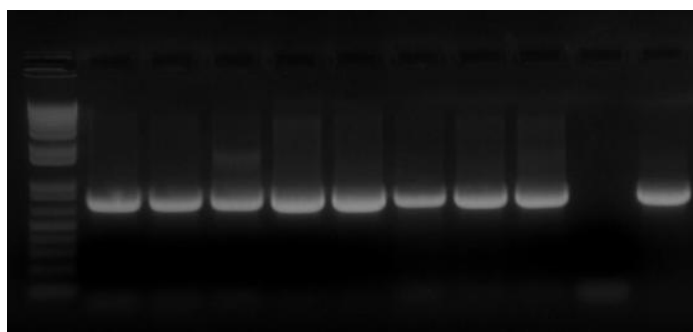


Fig. 18 – Produtos de amplificação do gene 16S rRNA com o par de primers 740F/1494R. Poços da esquerda para a direita: marcador de 100 pb, LEGE 07175, LEGE 06134, LEGE 07183, LEGE 06156, LEGE 07186, LEGE 06138, LEGE 06139, LEGE 06098, controlo negativo, controlo positivo.

Na tabela XVIII apresentam-se os resultados obtidos após introdução das sequências na base de dados BLAST, da qual se obteve a identificação das estirpes em estudo.

Tabela XVIII: Comparação de resultados da identificação morfológica com a identificação genotípica pelos pares de primers 740F/1494R.

Estirpes	Identificação Morfológica	Identificação Genotípica / Índice similaridade
LEGE 07175	<i>Cyanobium</i>	<i>Cyanobium</i> / 99%
LEGE 06134	<i>Cyanobium</i>	<i>Cyanobium</i> / 100%
LEGE 07183	<i>Cyanobium</i>	<i>Cyanobium</i> / 99%
LEGE 06156	<i>Synechococcus</i>	<i>Cyanobium</i> / 99%
LEGE 07186	<i>Cyanobium</i>	<i>Cyanobium</i> / 100%
LEGE 06138	<i>Cyanobium</i>	<i>Cyanobium</i> / 99%
LEGE 06139	<i>Synechococcus</i>	<i>Cyanobium</i> / 99%
LEGE 06098	<i>Cyanobium</i>	<i>Cyanobium</i> / 99%

Observando a tabela confirmamos que a identificação molecular da maior parte das estirpes de cianobactérias coincide com a identificação morfológica já realizada. Porém, para as estirpes LEGE 06156 e LEGE 06139, morfológicamente identificadas como *Synechococcus*, foi obtido o género *Cyanobium*. Entre estes dois géneros existe ainda alguma ambiguidade na sua identificação pelo que não poderemos afirmar que é a identificação genotípica que está correta. Da mesma forma convém referir que a base de dados BLASTn (Basic Local Alignment and Search Tool for nucleotide), integrado no NCBI (Nacional Centre for Biotechnology Information) é um instrumento de trabalho onde são colocadas várias sequências sem qualquer controlo. Além disso, a identificação genotípica assumida é o resultado do tratamento manual da sequência com maior número de bases identificadas e maior percentagem de similaridade com o organismo sequenciado pertencente à base de dados. Neste caso, para uma identificação mais correta das estirpes pode recorrer-se a outras metodologias, como é o caso da microscopia electrónica.

Quanto à identificação dos genes envolvidos na produção de toxinas foi realizada a pesquisa de genes envolvidos na produção de microcistinas, cilindrospermopsina e saxitoxina. Nenhum dos genes foi identificado nas estirpes estudadas. Assim, após estes resultados não se passou à detecção química, imunológica e enzimática das toxinas, o que constituía um dos objetivos do trabalho.

5. Discussão geral e conclusões

Na tabela XIX apresenta-se um resumo relativamente aos vários tipos de ensaios e estudos moleculares referentes às estirpes de cianobactérias em estudo. No ensaio com *Paracentrotus lívidus* os resultados referem-se à inibição do desenvolvimento embrionário e não ao tamanho das larvas. Não fazem parte desta tabelas as estirpes LEGE 06138, LEGE 06156 e LEGE 07183 uma vez que para estas estirpes não se conseguiu a sua cultura em grande escala e só foi realizado o estudo de identificação molecular e pesquisa de genes relacionados com a produção de toxinas.

Tabela XIX: Tabela resumo dos resultados obtidos.

		LEGE 06108	LEGE 06152	LEGE 06102	LEGE 06139	LEGE 06098	LEGE 07175	LEGE 07186	LEGE 06134
Ensaio de Toxicidade	<i>Nanohocloropsis</i> sp.	↑	s.e.	↑	↓	s.e.	↓	↓	s.e.
	<i>Artemia salina</i>	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.
	<i>Paracentrotus lívidus</i>	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.
	<i>Pseudomonas</i> sp.	s.e.	s.e.	s.e.	↓	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.
Ensaio de Citotoxicidade	HEPG2	s.e.	↓	↓	↓	↓	s.e.	s.e.	s.e.
	RKO	s.e.	↓	↓	↓	↓	s.e.	s.e.	s.e.
	SKBR3	s.e.	↓	↓	↓	↓	s.e.	s.e.	s.e.
	T47D	s.e.	↓	↓	↓	↓	s.e.	s.e.	s.e.
	Fibroblastos	s.e.	s.e.	s.e.	s.e.	↓	s.e.	s.e.	↑↓
Genes envolvidos na produção de microcistinas, nodularina e cilindrospermo- psina	MCYA: CDF/CDR	-	-	-	-	-	-	-	-
	MCYE: HEPF/HEPR	-	-	-	-	-	-	-	-
	MCYB: 2959F/3278R	-	-	-	-	-	-	-	-
	MCYC: PSCF/PSCR	-	-	-	-	-	-	-	-
	MCYD (1): PKDF/PKDR	-	-	-	-	-	-	-	-
	MCYD (2): PKDF/PKDR	-	-	-	-	-	-	-	-
	MCYE: PKEF/PKER	-	-	-	-	-	-	-	-
	MCYG: PKGF/PKGR	-	-	-	-	-	-	-	-
	CLD: M13/M14	-	-	-	-	-	-	-	-
	CLD: M4/K18	-	-	-	-	-	-	-	-
	SXT: 682F/877R	-	-	-	-	-	-	-	-
	SXTIF/SXTIR	-	-	-	-	-	-	-	-
	SXTIF/877R	-	-	-	-	-	-	-	-
	682F/SXTIR	-	-	-	-	-	-	-	-

↓ - Inibição ↑ - Estimulação - Resultado negativo para o gene s.e. – Sem efeito

Considerando o conjunto de resultados obtidos nos ensaios com a microalga *Nanhochloropsis* sp., o crustáceo *Artemia salina* e o ouriço do mar *Paracentrotus lividus*, as cianobactérias estudadas não parecem constituir uma ameaça em termos de equilíbrio das comunidades, uma vez que no geral se registaram valores baixos de toxicidade para os parâmetros estudados em cada ensaio. Vários estudos, no entanto, apontam para uma diminuição da toxicidade de estirpes mantidas em cultura (Prati *et al.*, 2001; Schatz *et al.*, 2005). Tendo em conta este facto, a toxicidade registada neste trabalho pode estar a ser subestimada.

Os resultados mais promissores deste trabalho prendem-se com os efeitos de diminuição da viabilidade celular de linhagens celulares tumorais humanas. Estes resultados dão ênfase à importância das cianobactérias marinhas enquanto produtoras de compostos com potencial anticancerígeno. O facto de os fibroblastos terem sido menos afetados que as células tumorais tanto pelo extrato bruto como pelas frações das cianobactérias é importante, uma vez que um composto usado no tratamento de tumores não deve ser tóxico para as células normais. Apesar do teste de viabilidade/proliferação celular ser largamente utilizado em estudos de viabilidade celular, outros ensaios serão necessários para reforçar os resultados obtidos.

No conjunto das estirpes estudadas, as estirpes LEGE 06152, LEGE 06102 e LEGE 06098 parecem ser as mais promissoras em termos de isolamento de compostos com aplicabilidade farmacológica, nomeadamente anticancerígena. As duas primeiras estirpes pertencem ao género *Leptolyngbya* e a última ao género *Cyanobium*. Estes resultados parecem reforçar a constatação de que as cianobactérias marinhas filamentosas são uma fonte interessante de compostos bioativos.

Dentro do extrato bruto e frações testadas, a fração B parece também ser a mais promissora em termos de isolamento de compostos com potencial bioativo, uma vez que foi nesta fração que mais efeitos tóxicos e citotóxicos foram registados. Esta fração corresponde à extração com acetato de etilo e inclui compostos com polaridade intermédia. Nestes compostos incluem-se péptideos e lipopeptídeos, sendo esta a natureza de uma grande parte dos compostos bioativos produzidos por cianobactérias marinhas já identificados.

Os efeitos de estimulação e inibição observados em alguns dos ensaios apontam para a produção de vários tipos de compostos. Esta produção de compostos com potencial tóxico e inibitório é reforçada pelos resultados obtidos no extrato bruto de várias estirpes, uma vez que em muitos dos casos se verificou uma toxicidade inferior à registada nas frações mas superior aos valores obtidos no controlo negativo.

Como conclusão geral deste trabalho podemos considerar que as estirpes estudadas albergam compostos com interesse em termos de bioatividade, nomeadamente compostos com potencial anticancerígeno.

6. Referências

- Ahern, K. S., Ahern, C. R., Udy, J. W., 2007. In situ field experiment shows *Lyngbya majuscula* (cyanobacterium) growth stimulated by added iron, phosphorus and nitrogen. *Harmful Algae* 7, 389-404.
- Albert, S., O'Neil, J. M., Udy, J. W., Ahern, K. S., O'Sullivan, C. M., Dennison, W. C., 2005. Blooms of the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* in coastal Queensland, Australia: disparate sites, common factors. *Marine Pollution Bulletin* 51(1-4), 428-437.
- Berridge V, Tan AS., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303, 474-82.
- Berry, J.P., Gantar, M., Perez, M.H., Berry, G., Noriega, F.G., 2008. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. *Marine Drugs* 6, 117-146.
- Bohm, G. A., Pfeleiderer, W., Boger, P., Scherer, S.J., 1995. Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Biological Chemistry* 270, 8536-8539.
- Carballo, J.L., Hernández-Inda, Z. L., Pérez, P., García-Grávalos, M. D., 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2(1), 17.
- Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacterial secondary metabolites: the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 445-459.
- Castenholz, R., & Waterbury, J., 1989. Group I. Cyanobacteria. In: Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., Holt, J.G. (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 1710-1727.
- Castenholz, R. W., Boone, D.R., 2001. The Archae and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. In: Garrity, G. M. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York.
- Codd, G. A., Morrison, L. F., Metcalf, J. S., 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3), 264-272.
- Davis, L., Kuehl, M., Battey, J., 1994. *Basic Methods in molecular biology*. Group PPBaP, editor, Norwalk, CT: Appleton & Lange.
- Dey, B., Lerner, D. L., Lusso, P., Boyd, M. R., Elder, J. H., Berger, E. A., 2000. Multiple antiviral activities of ayanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses. *Journal of Virology* 74, 4562-4569.

- Edwards, C., Beattie, K.A., Scrimgeour, C.M., Codd, G.A., 1992. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon* 30, 1165-1175.
- Falcon, L. I., Cipriano, F., Chistoserdov, A. Y., Carpenter, E. J., 2002. Diversity of diazotrophic unicellular cyanobacteria in the tropical North Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (11), 5760-4.
- Fergusson, K. M., Saint, C. P., 2003. Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Environmental Toxicology* 18(2), 120-125.
- Fernandez, N., Beiras, R., 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea urchin. *Ecotoxicology* 10 (5), 263–271.
- Folmer, F., Jaspars, M., Dicato, M., Diederich M., 2010. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. *Phytochemistry Reviews* 9, 557-579.
- Frazão, B., Martins, R. & Vasconcelos, V., 2010. Are known cyanotoxins involved in the toxicity of Picoplanktonic and filamentous North Atlantic Marine cyanobacteria? *Marine Drugs* 8, 1908-1919.
- Gantar, M., Berry, J.P., Thomas, S., Wang, M., Perez, R., Rein, K.S., 2008. Allelopathic activity among cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. *FEMS Microbial Ecology* 64, 55-64
- Gerwick, W. H., Coates R. C., Engene, N., Gerwick, L., Grindberg, R. V., Jones, A. C., Sorrels, C. M., 2008. Giant Marine Cyanobacteria produce exciting potential pharmaceuticals. *Microbe* 3(6), 277-284.
- Gunasekera, S.P., Ross, C., Paul, V.J., Matthew, S., Luesch, H., 2008. Dragonamides C and D, linear lipopeptides from the marine cyanobacterium brown *Lyngbya polychroa*. *Journal of Natural Products* 71(5), 887-890.
- Gustafson, K. R., Crdellina, J. H., Fuller, R. W., Weislow, O.S., Kiser, R. F., Snader, K. M., Ptterson, G.M. L., Boyd, M. R., 1989. Aids-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue green algae). *Journal of the National Cancer Institute* 81, 1254-1258.
- Gutiérrez, M., Suyama, T.L., Engene, N., Wingerd, J.S., Matainaho, T., Gerwick, W.H., 2008. Apratoxin D, a potent cytotoxic cyclodepsipeptide from Papua New Guinea Collection of the marine cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Lyngbya sordida*. *Journal of Natural Products* 71(6), 1099-1103.
- Granéli, E., Weberg, M., Salomon, P.S., 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. *Harmful Algae* 8, 94–102.
- Harrigan, G. G., Leusch, H., Yoshida, W. Y., Moore, R. E., Nagle, D. G., Paul, V. J., Mooberry, S.L., Corbett, T. H., Valeriote, F. A. 1998. Symplostatin 1: A dolastatin 10 analogue from the marine cyanobacterium *Symploca hydroides*. *Journal of Natural Products* 61, 1075-1077.

- Henriksen, P., Carmichael, W.W., An, J., Moestrup, O., 1997. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* 35, 901-913.
- Hawser, S.P., O' Neil, J. M., Roman, M.R., Codd, G.A., 1992. Toxicity of blooms of the cyanobacterium *Trichodesmium* to zooplankton. *Journal of Applied Phycology* 4, 79-86.
- Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K., Borner, T., 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology* 180, 402-410.
- Horgen, F.D., Yoshida, W.Y., Scheuer, P.J., 2000. Malevamides A-C, new depsipeptides from the marine cyanobacterium *Symploca laete-viridis*. *Journal of Natural Products* 63, 461-467.
- Issa, A. A., 1999. Antibiotic production by the cyanobacteria *Oscillatoria angustissima* and *Calothrix parietina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 8, 33-37.
- Jungblut, A. D., Hawes, I., Mountfort, D., Hitzfeld, B., Dietrich, D. R., Burns, B. P., Neilan, B. A., 2005. Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Environmental Microbiology* 7(4), 519-529.
- Jungblut, A. D., Neilan, B. A., 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 185(2), 107-114.
- Kanekiyo, T., Ban, T., Aritake, K., Huang, Z. L., Qu, W. M., Okazaki, I., Mohri, I., Murayama, S., Ozono, K., Taniike, M., Goto, K., Urado, Y., 2007. Lipocalin-type prostaglandin D synthase/trace is a major amyloid beta chaperone in human cerebrospinal fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6412-6417.
- Kearns, K.D. and Hunter, M.D., 2001. Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microbial Ecology* 42, 80-86
- Kellmann, R., Michali, T., K., Neilan, B., A., 2008. Identification of a saxitoxin biosynthesis gene with a history of frequent horizontal gene transfers. *Journal of Molecular Evolution* 67, 526-538.
- Kotai, J., 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norwegian Institute for Water Research B-11769(Blindern), Oslo, 5.
- Linnington, R.G., Edwards, D.J., Shuman, C.F., McPhail, K.L., Matainaho, T., Gerwick, W.H., 2008. Symplocamide A, a potent cytotoxin and chymotrypsin inhibitor from the marine cyanobacterium *Symploca* sp.. *Journal of Natural Products* 71(1), 22-27.
- Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sundaman, P., Paulin, L., Sivonen, K., 2001. Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenin*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(Pt 2), 513-26.

Lopes, V., Vasconcelos, V., 2011. Bioactivity of benthic and picoplanktonic estuarine cyanobacteria on growth of photoautotrophs: inhibition versus stimulation. *Marine Drugs* 9, 790-802.

Luesch, H., Yoshida, W.Y., Moore, R.E., Paul, V.J., 2002. New apratoxins of marine cyanobacterial origin from Guam and Palau. *Bioorganic Medical Chemistry* 10(6), 1973-1978.

Mahmood, N.A. & Carmichael, W.W., 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon* 24(2), 175-186.

Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P., Glickstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Marine Pollution Bulletin* 12, 304-308.

Martins, M.R.F., 2005. Ecotoxicology of Marine Cyanobacteria from de Portuguese Coast. Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 106 pp.

Martins, R., Pereira, P., Welker, M., Fastner, J., Vasconcelos, V.M., 2005. Toxicity of culturable marine cyanobacteria strains isolated from the Portuguese coast. *Toxicon* 46 (4), 454-464.

Martins, R., Fernandez, N., Beiras, R., Vasconcelos, V., 2007. Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine *Synechocystis* and *Synechococcus* cyanobacterial strains to marine invertebrates. *Toxicon* 50 (6), 791-799.

Martins, R. F., Ramos, M. F., Herfindal, L., Sousa, J. A., Skaerven, K., Vasconcelos, V. M., 2008. Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria - *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Marine Drugs* 6(1), 1-11.

Matthew, S., Schupp, P.J., Luesch, H., 2008. Apratoxin E, a potent cytotoxic peptolide from a Guamanian collection of the marine cyanobacterium *Lyngbya bouillonii*. *Journal of Natural Products* 71(6), 1113-1116.

Marsalek B. & Bláha, L., 2004. Comparison of 17 biotests for detection of cyanobacterial toxicity. *Environmental Toxicology* 19, 310-317.

Medina R.A., Gorger, D.E., Hills, P., Mooberry, S.L., Huang, N., Romero, L.I., Ortega-Barria, E., Gerwich, W.H., McPhail., K., 2008. Coibamide A, a potent antiproliferative cyclic depsipeptide from the Panamanian marine cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. *Journal of American Chemistry Society* 130, 6324-6325

Moore, R.E., 1984. Public health and toxins from marine blue-green algae. In; Ragelis, E.P.(Ed), *Seafood toxins*. American Chemical Society, Washington, DC, 460 pp.

Moore, R. E, Bornemann, V., Niemczura, W. P., Gregson, J.M., Chen, J. L., Norton, T.R., Patterson, G. M.L., Helms, G.L., Puwainaphycin, C.J.1989. Puwainaphycin C, a cardioactive cyclic peptide from the blue-green alga *Anabaena* BQ-16-1. Use of two-dimensional carbon-13-carbon-13 and carbon-13-nitrogen-15 correlation spectroscopy in sequencing the amino acid units. *American Chemistry Society* 111, 6128-6132.

- Moore, R. E., 1996. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: A review. *Journal of Industrial Microbiology* 16, 134-143.
- Nagle, D. G. & V. J. Paul, 1999. Production of secondary metabolites by filamentous tropical marine cyanobacteria: Ecological functions of the compounds. *Journal of Phycology* 35, 1412–1421.
- Neilan, B. A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L. L., Hawkins, P. R., Cox, P. T., Goodman, A. E., 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47(3), 693-697.
- Nonneman D, Zimba PV. 2002. A PCR-based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. *Journal of Phycology* 38(1), 230-233.
- Ouahid, Y., Silva, G.P., Campo , F. F., 2005. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. *Environmental Toxicology* 20, 235-242.
- Ogino, J., Moore, R. E., Patterson, G. M. L., Smith, C. D., 1996. Dendroamides, new cyclic hexapeptides from a blue-green alga. Multidrug-resistance reversing activity of dendroamide A. *Journal of Natural Products* 59, 581-586.
- Otsuka S, Suda S, Li R, Watanabe M, Oyaizu H, Matsumoto S, Watanabe MM. 1998. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiology Letters* 164(1), 119-124.
- Paerl, H.W., 1996. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia* 35, 25-35.
- Pearson, L. A., Neilan, B. A., 2008. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Current Opinion in Biotechnology* 19(3), 281-288.
- Pittman, S.J., Pittman, K.M., 2005. Short-term consequences of a benthic cyanobacterial bloom (*Lyngbya majuscula* Gomont) for fish and penaeid prawns in Moreton Bay (Queensland, Australia). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 63, 619–632.
- Plaza, A., Bewley, C.A., 2006. Largamides A–H, unusual cyclic peptides from the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Journal of Organic Chemistry* 71, 6898–6907.
- Philippis, R., Vincenzini, M., 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 151-175.
- Prati, M., Molteni, M., Pomati, F., Rossetti, C., Bernardini, G., 2001. Biological effect of the *Planktothrix* sp. FP1 cyanobacterial extract. *Toxicon* 40(3), 267-272.
- Prinsep, M. R., Moore, R. E., Levine, I. A., Patterson, G. M.L., 1992. Westiellamide, a bistratamide-related cyclic peptide from the blue-green algae *Westiellopsis prolifica*. *Journal of Natural Products* 55, 140-142.

- Quilliam, M. A., 1999. Phycotoxins. *Journal of Aoac International* 82, 773-781.
- Rechter, S., König, T., Auerochs, S., Thulke, S., Walter, H., Dörnenburg, H., Walter, C., Marschall, M., 2006. Antiviral activity of Arthrospira-derived spirulan-like substances. *Antiviral Research* 72 (3), 197-206.
- Rinehart, K.L., Namikoshi, M., Choi, B.W., 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (Cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology* 8, 159-176.
- Rinehart, K.L., 2000. Antitumor compounds from tunicates. *Medicinal Research Reviews* 20, 1-27.
- Sano, T., Kaya, K., 1996. Oscillapeptin G, a tyrosinase inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*. *Journal of Natural Products* 59, 90-92.
- Sangolkar LN, Maske SS, Chakrabarti T. 2006. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Research* 40(19), 3485- 3496.
- Schatz, D., Heren, Y., Hadas, O., Carmeli, S., Sukenik, A., & Kaplan, A., 2005. Ecological implications of the emergence of non-toxic subcultures from toxic *Microcystis* strains. *Environmental Microbiology* 7, 798-805.
- Schembri, M. A., Neilan, B. A., Saint, C. P., 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology* 16(5), 413-421.
- Selheim, F., Herfindal, L., Martins, R., Vasconcelos, V., Doskeland, S. O., 2005. Neuro-apoptogenic and blood platelet targeting toxins in benthic marine cyanobacteria from the Portuguese coast. *Aquatic Toxicology* 74(4), 294-306.
- Srivastava, V.C., Manderson, G.J., and Bhamidimarri, R., 1998. Inhibitory metabolite production by the cyanobacterium *Fischerella muscicola*. *Microbiological Research* 153, 309-317
- Stratmann, K., Belli, J., Jensen, C. M., Moore, R. E., Patterson, G. M. L., 1994. Aulosirazole, a novel solid tumor selective cytotoxin from the blue-green alga *Aulosira fertilissima*. *Journal of Organic Chemistry* 59, 6279-6281.
- Suikkanen, S., Fistarol, G.O. & Granéli, E., 2004. Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermanii* on algal monocultures. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology* 308, 85-101
- Surakka, A., Sihvonen, L.M., Lehtmäki, J.M., Walhsten., Vuorela, P. & Sivonen, K., 2005. Benthic cyanobacteria from the Baltic Sea contain cytotoxic *Anabaena*, *Nodularia* and *Nostoc* strains and an apoptosis-inducing *Phormidium* strain. *Environmental Toxicology* 20, 285-292.
- Tan, L. T., 2007. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry* 68(7), 954-979.
- Tan L.T., 2010. Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery. *Journal of Applied Phycology* 22, 659-676.

Teneva I, Asparuhova D, Dzhambazov B, Mladenov R, Schirmer K., 2003. The freshwater cyanobacterium *Lyngbya aerugineo-coerulea* produces compounds toxic to mice and to mammalian and fish cells. *Environmental Toxicology* 18 (1), 9-20.

Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M., Harada, K., Ito, E., Watanabe, M., 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green algae *Umezakia natans*. *Toxicon* 32, 833-843.

Vasconcelos, V.M., 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese freshwaters. *Archives of Hydrobiologia* 130, 439-451.

Vasconcelos, V.M., Sivonen, K., Evans, W.R., Carmichael, W.W., Namikoshi, M., 1995. Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from Portuguese strains of *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend Elekin. *Archives fur Hydrobiologie* 134(3), 295-305.

Vasconcelos, VS, O., Evans, W., Carmichael, W., Namikoshi, M., 1996. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese Freshwaters. *Water Research* 30, 2377-2384.

Vasconcelos, V.M., 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32, 249-254.

Watkinson, A. J., O'Neil, J.M., Dennison, W.C., 2005. Ecophysiology of the marine cyanobacterium, *Lyngbya majuscula* (Oscillatoriaceae) in Moreton Bay, Australia. *Harmful Algae* 4, 697-715.

Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3), 201-218.

Williams, P.G., Yoshida, W.Y., Moore, R.E., Paul, V.J., 2004. Micromide and guamamide: cytotoxic alkaloids from a species of the marine cyanobacterium *Symploca*. *Journal of Natural Products* 67, 49-53.

Williams, P. G., Yoshida, W. Y., Quon M. K., Moore, R. E., Paul, V. J., 2003. The structure of palauamide, a potent cytotoxin from a species of the marine cyanobacterium *Lyngbya*. *Journal of Natural Products* 66, 1545-1549.

Williams, P. G., Yoshida, W. Y., Quon M. K., Moore, R. E., Paul, V. J., 2003. Ulongapeptin, a cytotoxic cyclic depsipeptide from a Palauan marine cyanobacterium *Lyngbya* sp.. *Journal of Natural Products* 66, 651-654.

Williams, P. G., Yoshida, W. Y., Moore, R. E., Paul, V. J., 2002. Isolation and structure determination of obyanamide, a novel cytotoxic cyclic depsipeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya confervoides*. *Journal of Natural Products* 65, 29-31.

Wilson KM, Schembri MA, Baker PD, Saint CP. 2000. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1), 332-338.

Wrasidlo, W., Mielgo, A., Torres, V.A., Barbero, S., Stoletov, K., Suyama, T.L., Klemke, R.L., Gerwich, W.H., Carson, D.A., Stupack, D.G., 2007. The marine lipopeptide A triggers apoptosis via caspase 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(7), 2313-2318.

Zainuddin EN, Mundt S, Wegner U, Mentel R., 2002. Cyanobacteria a potential source of antiviral substances against influenza virus. *Medical Microbiology Immunology* 191,3-4.

7. Anexos

Anexo I

MEIO Z8 (Kotai, 1972)

Solução A (10 mL/L)		Solução B (10 mL/L)	
Reagente	g/L	Reagente	g/L
NaNO ₃	46.7	K ₂ HPO ₄	3.1
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5.9	Na ₂ CO ₃	2.1
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.5		
Solução Fe-EDTA (10 mL/L)			
Reagente		mL/L	
FeCl ₃ *		10	
EDTA-Na**		9.5	
* Solução FeCl ₃		**Solução EDTA-Na	
Reagente	100 mL	Reagente	100 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	2.8 g	EDTA	3.9 g
HCl (0.1 N)	100 mL	NaOH (0.1 N)	100 mL
Solução Micronutrientes (1mL/L)			
Reagente		mL/L	
1 a 12		10	
13 e 14		100	
Reagente	g/L	Reagente	g/L
1- Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O ^{a)}	0.33	8- CuSO ₄ .5H ₂ O	1.25
2- (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .2H ₂ O	0.88	9- NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O	1.98
3- KBr	1.2	10- Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.41
4- KI	0.83	11- V ₂ O ₅	0.089
5- ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.87	12- Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ .24H ₂ O ^{b)}	4.74
6- Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1.55	13- H ₃ BO ₃	3.1
7- Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1.46	14- MnSO ₄ .4H ₂ O ^{c)}	2.23

Anexo II

Água do Mar artificial (2L):

<i>Reagente</i>	<i>Quantidade (g)</i>
NaCl	49,2
KCl	1,34
CaCl ₂	2,72
MgCl ₂ .6H ₂ O	9,32
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,58
NaHCO ₃	0,782

Anexo III

Resultados do bioensaios com *Nanochloropsis* sp.

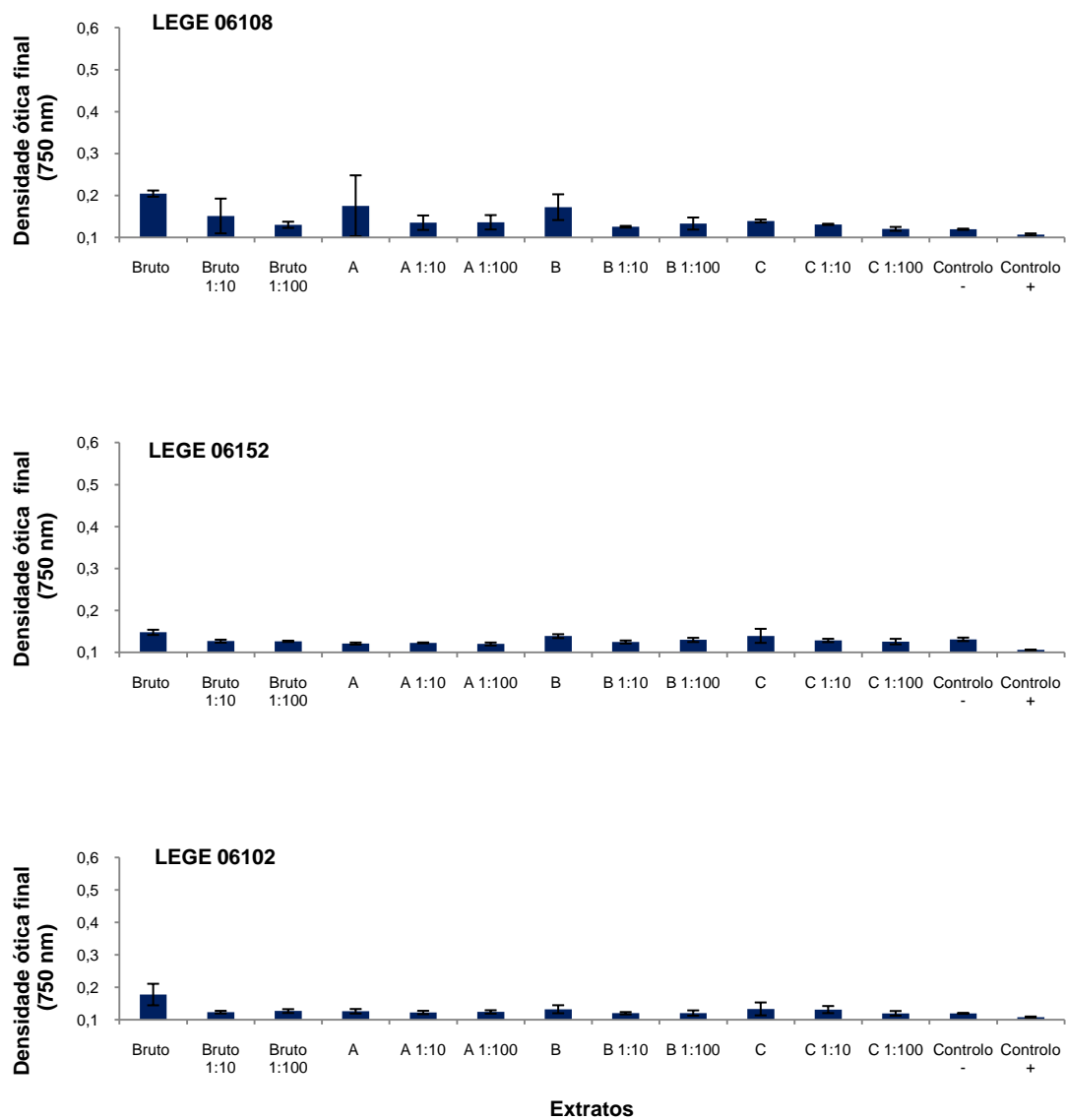


Fig. 1 - Densidade ótica final de *Nanochloropsis* sp. exposta ao extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 06152, LEGE 06102.

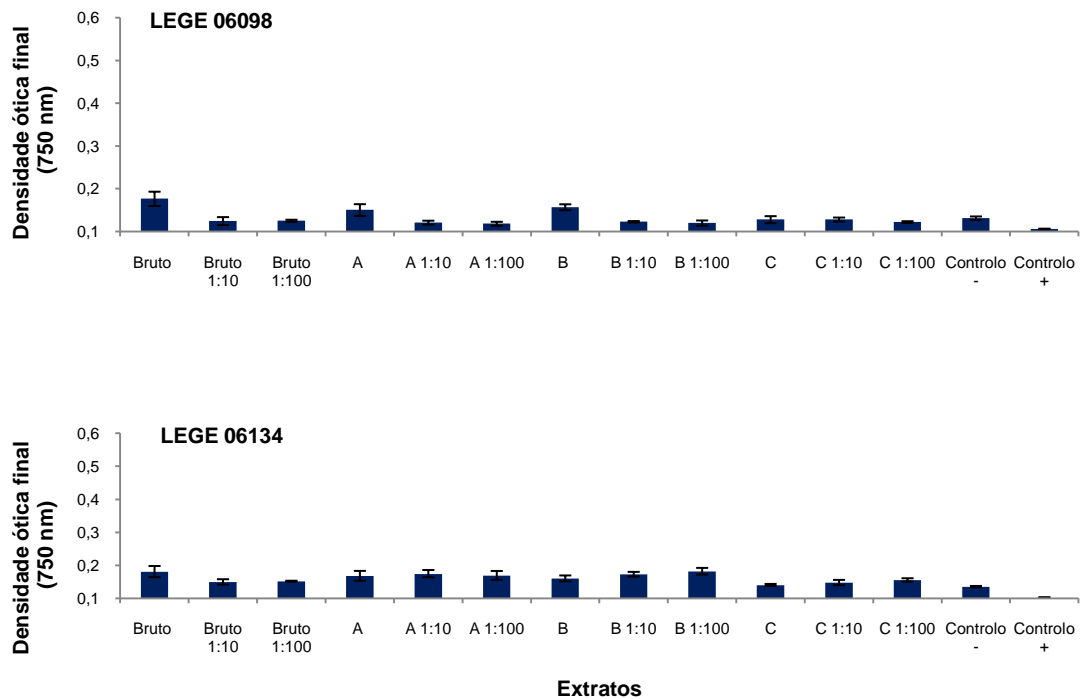


Fig. 2 - Densidade ótica final de *Nanochloropsis* sp. exposta ao extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06098 e LEGE 06134.

Anexo IV

Resultados do bioensaio com linhagens celulares tumorais

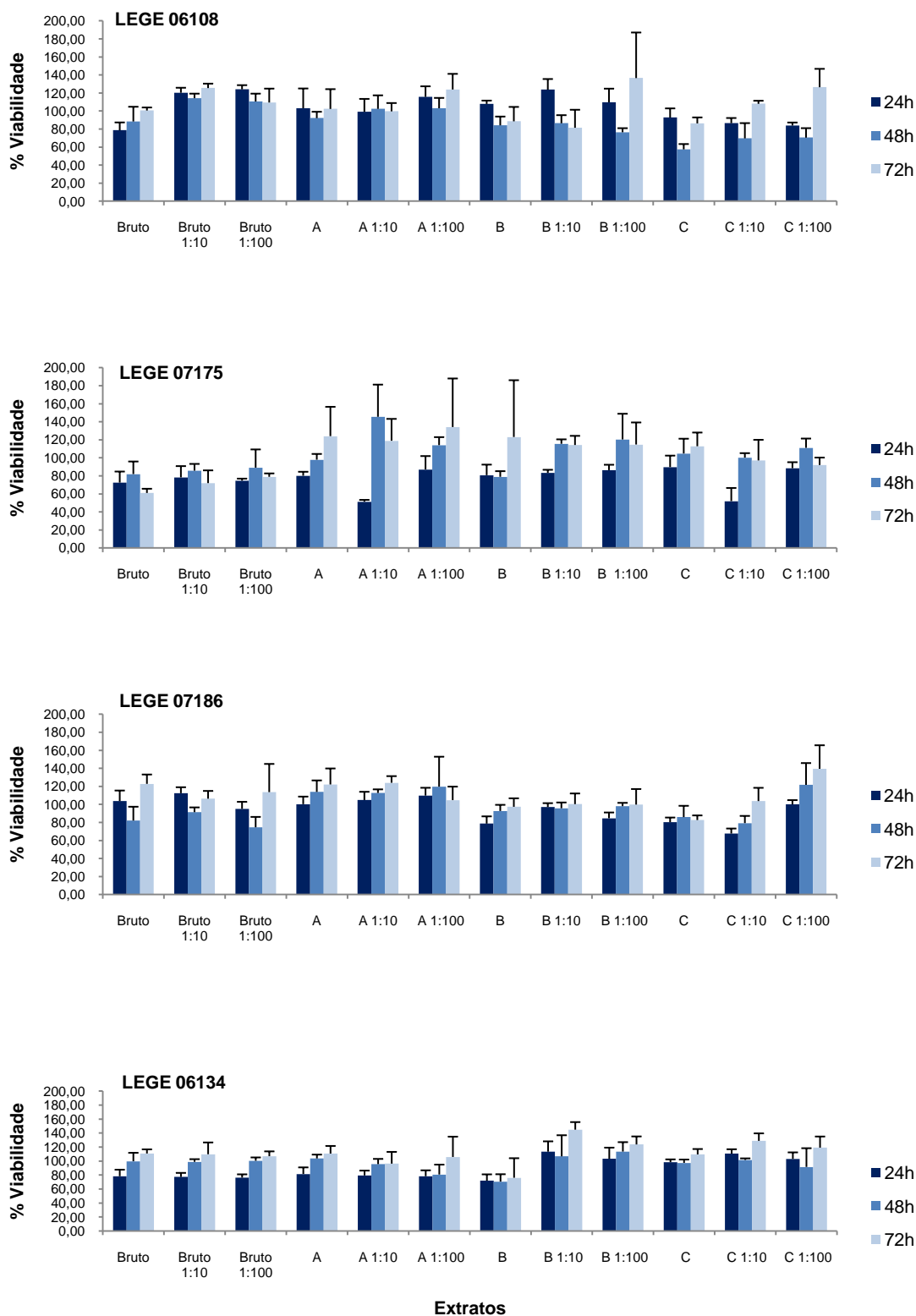


Fig. 1 - Viabilidade de células HEPG2 em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134 às 24, 48 e 72 horas.

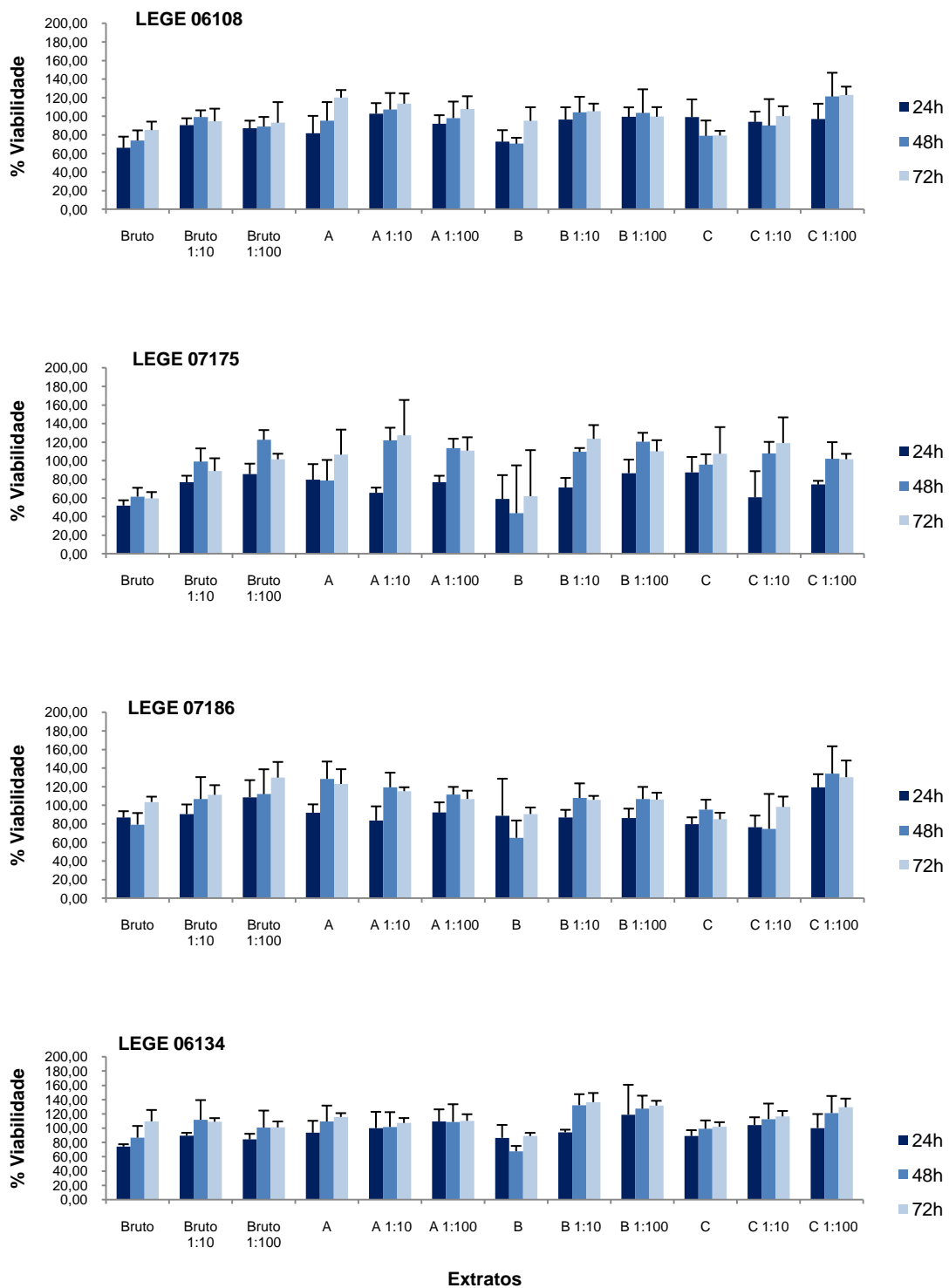


Fig. 2 - Viabilidade de células RKO em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134 às 24, 48 e 72 horas.

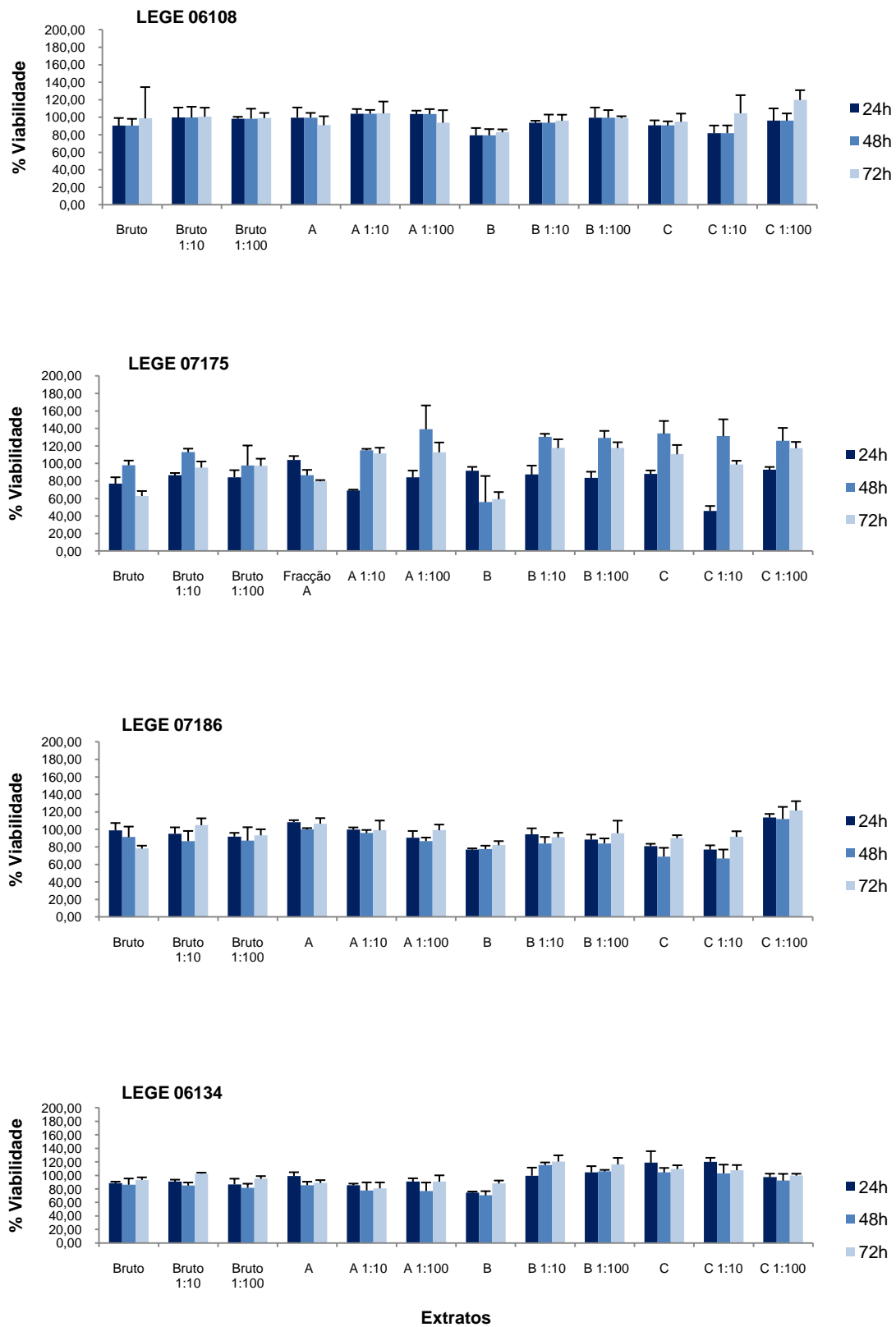


Fig. 3 - Viabilidade de células SKBR3 em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134 às 24, 48 e 72 horas.

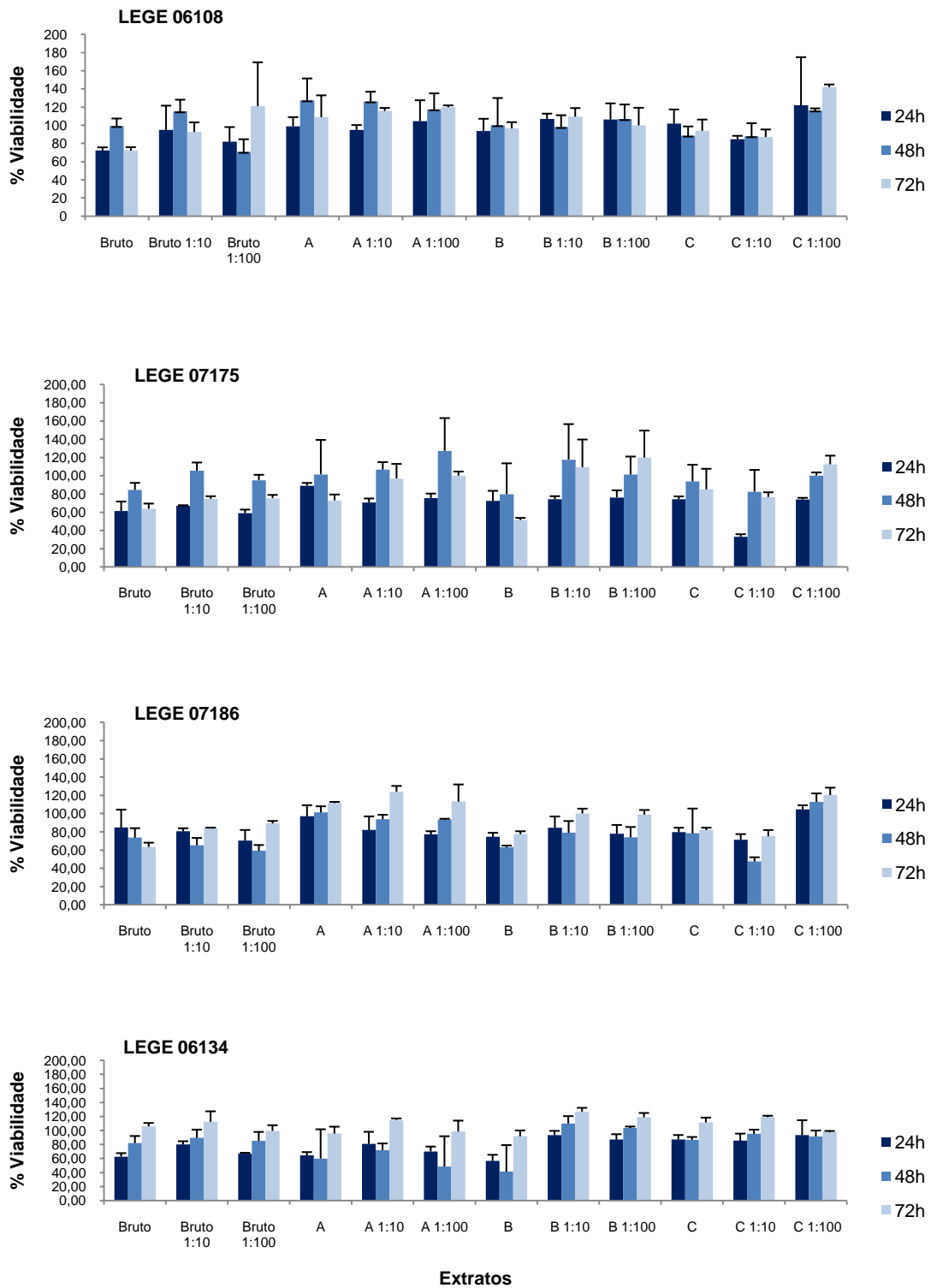


Fig.4 - Viabilidade de células T47D em presença do extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134 às 24, 48 e 72 horas.

Anexo V

Resultados do bioensaio com *Pseudomonas* sp.

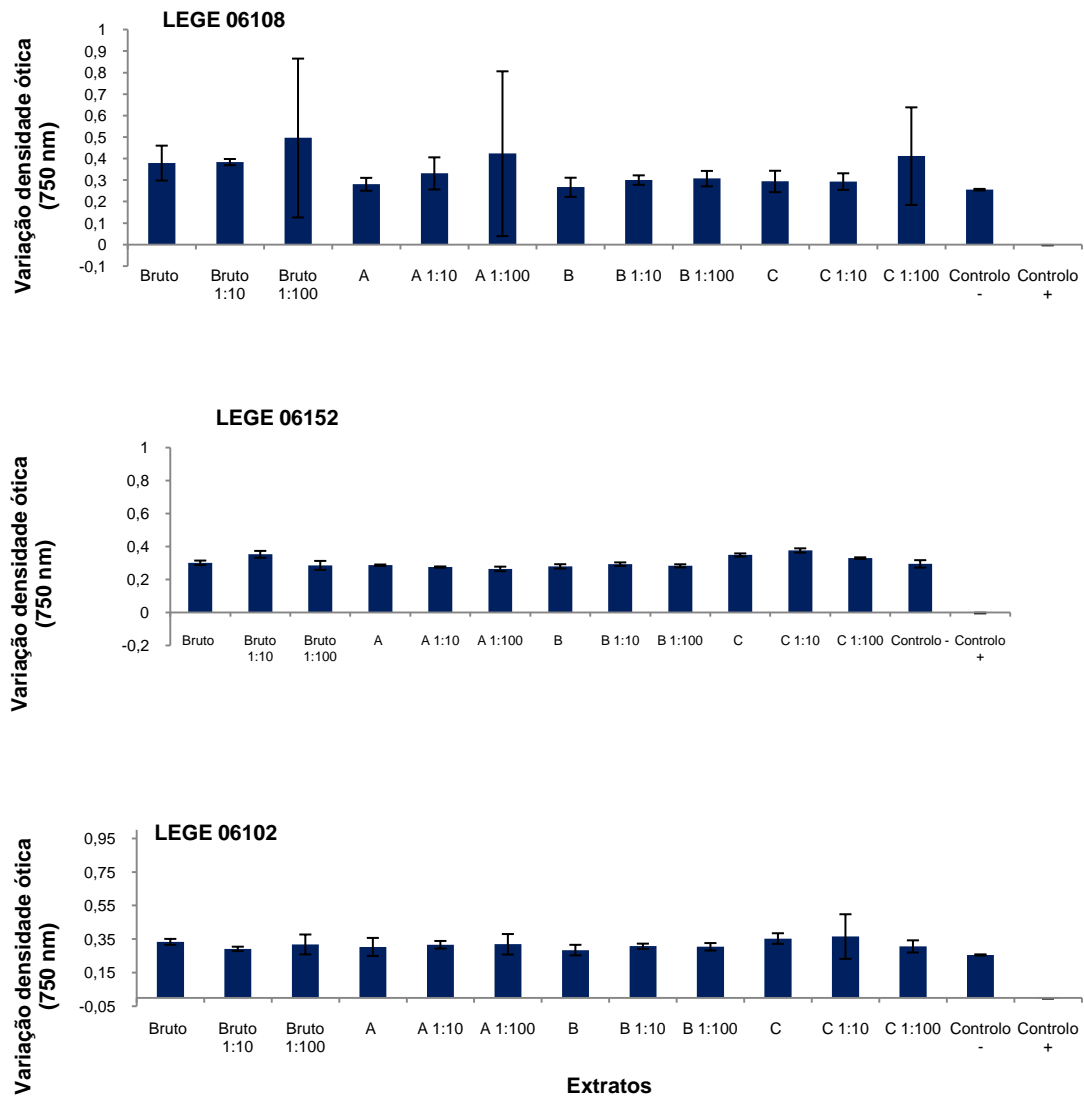


Fig. 1 - Variação de densidade ótica da bactéria *Pseudomonas* sp. NB3L exposta ao extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06108, LEGE 06152 e LEGE 06102.

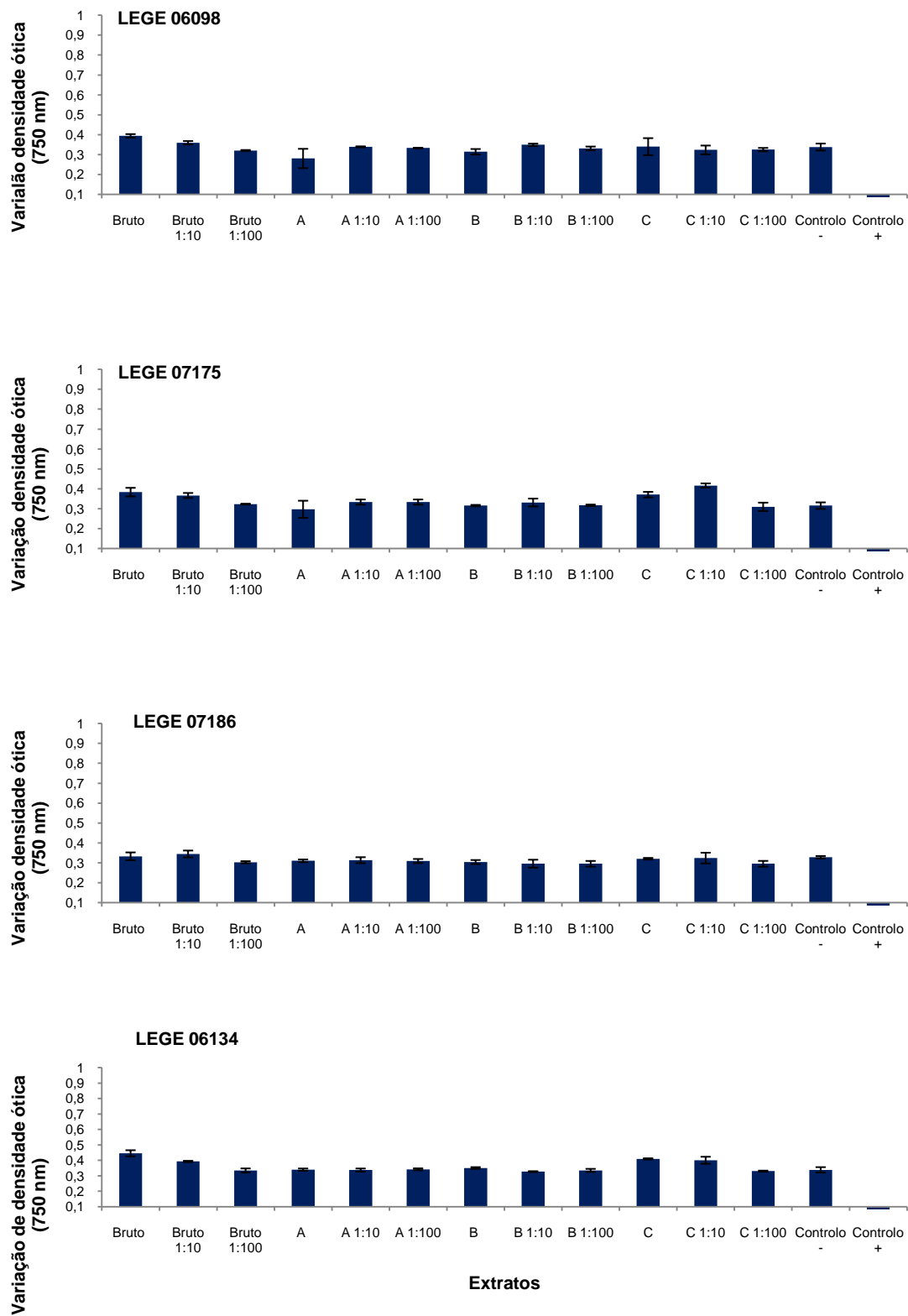


Fig. 2 - Variação de densidade ótica da bactéria *Pseudomonas* sp. NB3L exposta ao extrato bruto e frações A, B e C das estirpes LEGE 06098, LEGE 07175, LEGE 07186 e LEGE 06134.

