

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA
E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Rhuana Valdetário Médice

Caracterização e bioprospecção da biomassa de cianobactérias e microalgas
presentes em reservatórios de água visando seu potencial biotecnológico

São Paulo, 2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA
E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Rhuana Valdetário Médice

Caracterização e bioprospecção da biomassa de cianobactérias e microalgas
presentes em reservatórios de água visando seu potencial biotecnológico

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Farmácia na área de Fisopatologia e Toxicologia.

Orientador: Ernani Pinto

Coorientador: Camila Manoel Crnkovic

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

M489c Médice, Rhuana Valdetário
Caracterização e bioprospecção da biomassa de cianobactérias e microalgas presentes em reservatórios de água visando seu potencial biotecnológico / Rhuana Valdetário Médice. - SãoPaulo, 2023.
162 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Pinto, Ernani
Coorientadora: Crnkovic, Camila Manoel

1. Cianobactérias. 2. Produtos Naturais. 3. Metabolômica. 4. Monitoramento ambiental. 5. Bioprospecção. I. T. II. Pinto, Ernani, orientador.
III. Crnkovic, Camila Manoel, coorientadora.

Rhuana Valdetário Médice

Caracterização e bioprospecção da biomassa de cianobactérias e microalgas presentes em reservatórios de água visando seu potencial biotecnológico: Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Farmácia (Fisopatologia e Toxicologia).

Comissão Julgadora

Prof. Dr. orientador/presidente

1o. Examinador

2o. Examinador

3o. Examinador

4o. Examinador

São Paulo, ____ de setembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer as pessoas sem as quais nada disso seria possível: minha mãe e meu irmão. Mãe, muito obrigada por todo apoio e carinho, não só neste período, mas durante toda a vida. Você é e sempre será meu exemplo! Gui, sem você todas as aventuras teriam gosto de medo, e não teriam nem um terço da graça que tiveram. Amo vocês!

Também quero estender esse agradecimento a minha linda família: Edinho, Rose, Camila, Alexia e Pedro. Saber que vocês estavam sempre a caminho, seja lá para onde for, fez essa jornada muito mais leve.

Quero agradecer também ao Paulo, por ser um incrível companheiro de muitas aventuras e por ter deixado a cidade cinza mais colorida.

Aos meus grandes amigos, Andressa, Carol e Marcelo, muito obrigada! Pela companhia, pelas risadas, ombros e cervejas.

Não posso deixar de agradecer também a quem participou de toda essa jornada acadêmica comigo. Ao professor Ernani, muito obrigada por ter aberto as portas do doutorado para mim e por todos os ensinamentos durante essa jornada. À professora Camila, que tão gentilmente aceitou me coorientar, me acolheu em seu laboratório e me ensinou tantas coisas, no pessoal e no profissional. Muito obrigada por toda a dedicação e carinho que vi durante esses anos, não só comigo, mas com toda a equipe de trabalho. Você é um exemplo da profissional que quero me tornar.

Ao pessoal do LTPNA, Fernanda, Larissa, Mariana, Rafa, Vanessa e, em especial, a Éryka (amiga linda e companheira oficial de revisões e mochilões) e ao Felipe. O apoio de vocês foi essencial. O meu muito obrigada também a todo o pessoal do meu querido LabAzul, Chico, Helô, Luiza, Leo Figueiredo, Leo Santos, Maria, Renata, Sara, Vitória, Yuri, e claro (!!!) Márcio, João e Jaewon. Muito obrigada por terem me acolhido nessa família linda que é o LabAzul, vocês não só encheram minha jornada de conhecimento mas também de alegria.

Quero agradecer também ao professor Paul Long, por ter me recebido em seu laboratório. À professora Carlota Yagui e seu grupo de pesquisa, Felipe, Javi e Rafael por todo o apoio e companheirismo durante o intercâmbio. Ao professor André Baby pela parceria, ensinamentos e gentileza. À Elaine e à Edna por estarem sempre na torcida e dispostas a ajudar.

E por último, mas não menos importante, a Deus, por tudo que tive e tenho a chance de aprender e por me dar tantos motivos para agradecer.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Processos PROEX 88882.327695/2019-01 e Print-CAPES PDSE 88887.694644/2022-00.

*me levanto
sobre o sacrifício
de um milhão de mulheres que vieram antes
e penso
o que é que eu faço
para tornar essa montanha mais alta
para que as mulheres que vierem depois de mim
possam ver além*

- legado

Rupy Kaur

RESUMO

MÉDICE, R. V. Caracterização e bioprospecção da biomassa de cianobactérias e microalgas presentes em reservatórios de água visando seu potencial biotecnológico. 2023. 162f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Florações de cianobactérias têm ocorrido com mais frequência e severidade em reservatórios de água do mundo todo. Essas florações prejudicam os ecossistemas, comprometem a qualidade e uso da água para atividades humanas, e preocupam quanto à possível produção de cianotoxinas. Contudo, para além das cianotoxinas, os metabólitos secundários de cianobactérias englobam uma variedade de compostos, muitos deles ainda pouco estudados, com estruturas e atividades biológicas diversas. A investigação do perfil químico da biomassa de cianobactérias permite a identificação de compostos tóxicos e a priorização de moléculas com potencial biotecnológico e pode aprimorar as estratégias de gestão de florações cianobacterianas em reservatórios, garantindo a qualidade da água e a saúde dos ecossistemas, ao mesmo tempo em que abre possibilidade para a exploração do potencial biotecnológico dos metabólitos secundários de cianobactérias. No presente trabalho, utilizamos a metabolômica baseada em espectrometria de massas e ferramentas bioinformáticas, combinadas a ensaios de bioatividade para investigar os perfis químicos de duas biomassas, uma delas coletada em um reservatório no estado do Rio de Janeiro (RJ) e outra coletada em um reservatório no estado de Minas Gerais (MG). As análises metabolômicas não direcionadas do extrato orgânico produzido a partir da biomassa coletada no reservatório do RJ mostraram a presença de quatro classes de cianopeptídeos: microcistinas (MC), microgininas (MG), aeruginosinas (AER) e cianopeptolinas (CP). Esse extrato e algumas de suas frações apresentaram toxicidade aguda ($LC_{50} = 278 \mu\text{g/mL}$) nos ensaios com o microcrustáceo *Artemia salina*. Utilizando as plataformas NP Analyst e Data Fusion-based Discovery (DAFdiscovery), investigamos a correlação entre os cianopeptídeos detectados e a toxicidade observada no bioensaio. Os resultados indicam que outros compostos, além das MC, podem estar relacionados com a toxicidade observada. Compostos da classe das CP apresentaram alta correlação com a bioatividade observada. Quanto à biomassa coletada no reservatório no estado de MG, o extrato orgânico e suas frações não mostraram a presença de compostos classificados atualmente como cianotoxinas e, tanto o extrato quanto suas frações, não demonstraram toxicidade nos ensaios com *A. salina*. A fim de investigarmos mais a fundo o potencial biotecnológico dessa biomassa, foi realizada também uma extração aquosa acidificada, específica para obtenção de compostos da classe dos aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs). Os MAAs são compostos com propriedades fotoprotetoras e antioxidantes bem descritos na literatura e já utilizados como ingrediente bioativo natural em algumas formulações cosméticas. A análise metabolômica direcionada do extrato aquoso mostrou a presença de seis MAAs: porphyra-334, shinorina, ácido palitênico, palitinol, asterina e usujireno. O extrato contendo MAAs mostrou um pico de absorção na região UVA (320–400 nm), não causou toxicidade aguda nos ensaios com *A. salina* e não mostrou citotoxicidade contra uma linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT), nas concentrações testadas (0,01-1000 $\mu\text{g/mL}$). Esse mesmo extrato foi testado em ensaios de viabilidade celular de células HaCaT expostas à radiação ultravioleta (UVR) e foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na viabilidade das células HaCaT tratadas com diferentes concentrações do extrato (5-500 $\mu\text{g/mL}$) previamente à exposição à radiação UV. Ainda, em ensaios para medição do fator de proteção solar (FPS), quando adicionado (10% p/p) à uma formulação fotoprotetora base, o extrato aumentou em mais de

50% o valor de FPS medido. Contudo, a adição do extrato não garantiu um valor de FPUVA preconizado pela legislação. Os resultados apresentados mostram que ferramentas metabolômicas e bioinformáticas podem oferecer uma abordagem rápida e eficiente para a avaliação de risco e manejo ambiental de biomassas de cianobactérias, contribuindo com tomadas de decisão e medidas de proteção mais céleres diante de eventos de florações e possibilitando a exploração de produtos com valor agregado, transformando o que, até hoje, é um resíduo e um problema ambiental em fonte de compostos bioativos.

Palavras-chaves: cianobactérias, metabólitos secundários, metabolômica, LC-MS/MS, bioinformática, produtos naturais, monitoramento ambiental

ABSTRACT

MÉDICE, R. V. Characterization and bioprospecting of cyanobacterial and microalgal biomass in water reservoirs aiming at their biotechnological potential. 162f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Cyanobacterial blooms have become more frequent and severe in water reservoirs worldwide. These blooms threaten ecosystems, compromise water quality for human activities, and raise concerns about the potential production of cyanotoxins. Also, in addition to cyanotoxins, the secondary metabolites of cyanobacteria encompass various compounds, many of which are still poorly understood, exhibiting diverse structures and biological activities. Investigating the chemical profile of cyanobacterial biomass allows for identifying toxic compounds and prioritizing molecules with biotechnological potential. This approach can enhance management strategies for cyanobacterial blooms in reservoirs, ensuring water quality and ecosystem health while exploring the biotechnological potential of cyanobacterial secondary metabolites. In this study, we employed mass spectrometry-based metabolomics and bioinformatics tools, along with bioactivity assays, to investigate the chemical profiles of biomass collected from reservoirs in the states of Rio de Janeiro (RJ) and Minas Gerais (MG). The untargeted metabolomics analysis of the organic extract from the RJ reservoir biomass revealed the presence of four classes of cyanopeptides: microcystins (MC), microginins (MG), aeruginosins (AER), and cyanopeptolins (CP). This extract and some of its fractions exhibited acute toxicity ($LC_{50} = 278 \mu\text{g/mL}$) in tests with the microcrustacean *Artemia salina*. We used the NP Analyst and Data Fusion-based Discovery (DAFdiscovery) platforms to investigate the correlation between the detected cyanopeptides and the observed toxicity. The results indicate that other compounds, besides MC, may be related to the observed toxicity. Compounds from the CP class showed a high correlation with the observed bioactivity. Regarding the biomass collected in the MG state reservoir, the organic extract and its fractions did not show the presence of compounds currently classified as cyanotoxins, and none of them demonstrated toxicity in tests with *A. salina*. To further explore the biotechnological potential of this biomass, we produced an acidified aqueous extract, specific to obtain compounds from the class of mycosporin-like amino acids (MAAs). MAAs are well-known for their photoprotective and antioxidant properties and have been used in cosmetic formulations. Targeted metabolomic analysis of the aqueous extract revealed the presence of six MAAs: porphyra-334, shinorine, palythenic acid, palythanol, asterine, and usujirene. This extract, containing MAAs, showed an absorption peak in the UVA region (320–400 nm), exhibited no acute toxicity in *A. salina* assays, and showed no cytotoxicity against a human keratinocyte cell line (HaCaT) at the concentrations tested (0.01-1000 $\mu\text{g/mL}$). Furthermore, this extract was tested in cell viability assays of HaCaT cells exposed to ultraviolet radiation (UVR), resulting in a significant increase ($p < 0.05$) in cell viability when treated with different concentrations of the extract (5-500 $\mu\text{g/mL}$) before UV radiation exposure. In tests to measure the sun protection factor (SPF), when added (10% w/w) to a base photoprotective formulation, the extract increased the measured SPF value by more than 50%. However, the formulation with the extract did not meet the recommended FPUVA value recommended in the international legislation. The results presented show that metabolomics and bioinformatics tools can offer a quick and efficient approach to risk assessment and environmental management of cyanobacterial biomass, contributing to faster decision-making and protection measures in the face of blooming events and enabling the exploration of products with added value, transforming what, until today, is a waste and an environmental problem into a source of

bioactive compounds.

Keywords: cyanobacteria, secondary metabolites, metabolomics, LC-MS/MS natural products, environmental management

Lista de Figuras

Figura 1.1: Microscopia eletrônica de algumas espécies de cianobactérias com destaque para um heterócito no gênero <i>Nodularia</i>	24
Figura 1.2: Florações em reservatórios de água no sul e sudeste brasileiros. Da esquerda para a direita: lago do Museu Mariano Procópio em Juiz de Fora, MG; Praia dos Namorados, Americana, SP; detalhe da Represa do Funil, RJ e reservatório em Porto Alegre, RS.....	26
Figura 1.3: Ilustração esquemática dos componentes de um espectrômetro de massas.....	29
Figura 1.4: Modelo de ionização por <i>electrospray</i> : (A) modelo do resíduo carregado, e (B) modelo de dessorção de íons.....	32
Figura 1.5: Representação esquemática de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ).....	33
Figura 1.6: Representação esquemática de um analisador de massas do tipo quadrupolo acoplado a um analisador do tipo tempo de voo (QToF).....	35
Figura 1.7: Fluxograma de trabalho para análises metabolômicas não direcionada e direcionada.....	38
Figura 2.1: Estrutura molecular geral das microcistinas. R ₁ e R ₂ representam os aminoácidos variáveis.....	51
Figura 2.2: Estrutura molecular geral das nodularinas. A letra R representa os aminoácidos variáveis.....	52
Figura 2.3: Estrutura molecular da anatoxina-a e da homoanatoxina-a.....	54
Figura 2.4: Estrutura molecular da guanitoxina.....	55
Figura 2.5: Estrutura molecular geral das saxitoxinas. R ₁₋₄ representam os aminoácidos variáveis.....	56
Figura 2.6: Estrutura molecular geral das cilindrospermopsinas. R ₁₋₃ são as posições dos radicais variantes.....	58
Figura 2.7: Fluxograma do pré-processamento (extração e <i>clean-up</i>) das amostras.....	64
Figura 2.8: Esquema de fracionamento do extrato da biomassa de cianobactérias.....	65

Figura 2.9: Rede molecular, gerada pelo GNPS, a partir dos dados de massa (MS/MS) das análises do extrato orgânico obtido a partir da biomassa investigada e padrões de compostos semeados. Em destaque, as classes de cianopeptídeos anotadas: microcistinas, microgininas, cianopeptolinas e aeruginosinas.....	70
Figura 2.10: Cromatograma (a) e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> MC-LR m/z 995.5570 $[M+H]^+$. Os dados de massa exata, padrão isotópico e perfil de fragmentação gerados pelo LC-MS/MS ajudam na anotação da molécula	72
Figura 2.11: Cromatograma e espectro de fragmentação das <i>features</i> MC-LR m/z 995,5570 $[M+H]^+$, MC-LY m/z 1029,54211 $[M+H]^+$, MC-YR m/z 1045,5355 $[M+H]^+$, MC-WR m/z 1068,5515 $[M+H]^+$, MC-YR-D-Asp3 m/z 1031,5313 $[M+H]^+$, MC-LY m/z 1002,5193 $[M+H]^+$	74
Figura 2.12: Cluster das <i>features</i> anotadas como pertencentes à classe das microcistinas (MC). Os nodos exibem os valores de m/z para cada <i>feature</i> , as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ).....	75
Figura 2.13: Estrutura molecular de algumas das microcistinas (MC) encontradas no extrato orgânico produzido a partir da biomassa coletada no reservatório do Funil, no estado do Rio de Janeiro (RJ).....	76
Figura 2.14 Cromatograma e espectro de fragmentação das <i>features</i> cianostatina B m/z 754,44264 $[M+H]^+$, MG KR787 m/z 788,4015 $[M+H]^+$, MG KR604 m/z 605,3918 $[M+H]^+$ e m/z 768,4588 $[M+H]^+$	77
Figura 2.15: Cluster das <i>features</i> identificadas como pertencentes à classe das microgininas (MG). Os nodos exibem os valores de m/z para cada <i>feature</i> , as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ)...	78
Figura 2.16: Estrutura molecular de algumas das microgininas (MG) encontradas no extrato orgânico produzido a partir da biomassa coletada no reservatório do Funil, no estado do Rio de Janeiro (RJ).....	79
Figura 2.17: Cromatograma e espectro de fragmentação das <i>features</i> m/z 1001,5777 $[M+H]^+$, CP 986 m/z 987,5552 $[M+H]^+$, CP 972 m/z 973,5417 $[M+H]^+$, m/z 1072,6102 $[M+H]^+$ e m/z 1044,5761 $[M+H]^+$	80
Figura 2.18: Cluster das <i>features</i> anotadas como pertencentes à classe das cianopeptolinas (CP). Os nodos exibem os valores de m/z para cada <i>feature</i> , as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ)...	82
Figura 2.19: Estrutura molecular da cianopeptolinas (CP) 1020 e de algumas das (CP) encontradas no extrato orgânico produzido a partir da biomassa coletada no reservatório do Funil, no estado do Rio de Janeiro (RJ).....	82

Figura 2.20: Cromatograma e espectro de fragmentação das <i>features</i> AER 298A m/z 605,3650 $[M+H]^+$, m/z 655,3448 $[M+H]^+$ e m/z 671,3391 $[M+H]^+$	84
Figura 2.21: Cluster das <i>features</i> anotadas como pertencentes à classe das aeruginosinas (AER). Os nodos exibem os valores de m/z para cada <i>feature</i> , as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ)...	85
Figura 2.22: Estrutura molecular da aeruginosina NAL2 anotada no cluster das aeruginosinas.....	86
Figura 2.23: Gráfico da curva dose-resposta para o extrato de cianobactérias em relação aos ensaios de toxicidade aguda contra o microcrustáceo <i>A. salina</i>	87
Figura 2.24: Mortalidade (%) de náuplios de <i>A. salina</i> , com desvio padrão, após exposição a 100 $\mu\text{g/mL}$ de cada fração.....	88
Figura 3.1: Esquema das possíveis aplicações de microalgas, cianobactérias e seus metabólitos.....	100
Figura 3.2: Esquema do espectro magnético da radiação ultravioleta.....	103
Figura 3.3: Exemplo de estrutura de aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) com anéis do tipo ciclohexenimina (a) e ciclohexenona (b).....	106
Figura 3.4: Rede molecular, gerada pelo GNPS, a partir dos dados de massa (MS/MS) das análises do extrato orgânico obtido a partir da biomassa investigada e padrões de compostos semeados. O cluster referente aos compostos da classe das cianopeptolinas está em destaque.....	117
Figura 3.5: Rede molecular, gerada pelo GNPS, a partir dos dados de massa (MS/MS) das análises do extrato aquoso obtido a partir da biomassa investigada e padrões de compostos semeados. Em destaque cluster de compostos da classe das aeruginosinas e nodo de um composto do tipo aminoácido do tipo micosporina (MAA).....	118
Figura 3.6: Cromatograma e espectros dos íons quantificador e qualificador do aminoácido do tipo micosporina porphyra-334 encontrado no extrato aquoso da biomassa de cianobactérias obtido em um equipamento do tipo LC-QqQ-MS no modo MRM.....	119
Figura 3.7: Espectro de absorção do extrato da biomassa de cianobactérias diluído em solução de tampão fosfato (PBS) na concentração final de 1000 $\mu\text{g/mL}$	120
Figura 3.8: Viabilidade celular das células de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) após 24h de exposição a diferentes concentrações do extrato aquoso da biomassa de cianobactérias estudada. As colunas representam a média \pm desvio padrão (DP) (n=6). O controle negativo (Ctrl-) foi feito com células não tratadas em meio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) e o controle positivo (Ctrl+) com células expostas a dimetilsulfóxido (DMSO) (90%)	121

Figura 3.9: Viabilidade celular das células de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) após exposição à luz UV em diferentes concentrações de tratamento **(a)** e diferentes momentos do tratamento **(b)**. Em **(a)** os queratinócitos HaCaT foram tratados com diferentes concentrações de extrato de cianobactérias e expostos à luz UV por 10 min. Em **(b)** células HaCaT tratadas com 100 µg/mL do extrato da cianobactéria imediatamente antes e logo após a irradiação. As colunas representam a média ± desvio padrão (DP) (n=4 para **a**, n=5 para **b**). Ctrl+ são as células tratadas com maior concentração de extrato e não irradiadas, Ctrl- são as células irradiadas sem tratamento, *p< 0,05, **p>0,05

122

Figura 3.10: Gráfico dos valores de fator de proteção solar (FPS) medidos antes e após a adição do extrato aquoso da biomassa de cianobactérias investigada

123

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Porcentagem de mortalidade dos náuplios, com desvio padrão (DP) para diferentes concentrações do extrato orgânico de cianobactérias	86
Tabela 2.2: Pontuação de atividade (<i>activity score</i>), pontuação de agrupamento (<i>cluster score</i>) e correlação de bioatividade (Bioactivity correlation) atribuídas aos diferentes cianopeptídeos presentes nas frações do extrato de cianobactérias pelas plataformas NP Analyst e DAF Discovery	90
Tabela 3.1: Composição da formulação fotoprotetora base (controle) e com adição do extrato de cianobactérias	115
Tabela 3.2: Aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) encontrados no extrato aquoso da biomassa ambiental de cianobactérias estudada, com os íons precursor, qualificador e quantificador (<i>m/z</i>) usados para monitorar as transições específicas de cada MAA e o tempo de retenção de cada composto	119
Tabela 3.3: Mortalidade (%) dos náuplios de <i>A. salina</i> quando expostos a diferentes concentrações de extrato aquoso obtido a partir da biomassa de cianobactérias estudada.....	121

Lista de Abreviaturas e siglas

ACN: acetonitrila

AER: aeruginosinas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CP: cianopeptolinas

DP: desvio padrão

ESI: fonte de ionização do tipo eletrospray

MG: microgininas

MC: microcistinas

FPS: fator de proteção solar

HaCaT: linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados

HILIC: cromatografia líquida de interação hidrofílica

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

MAAs: aminoácidos do tipo micosporinas

MeOH: metanol

MRM: monitoramento múltiplo de reações

MTS: (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) - 2H-tetrazólio)

MS: espectrometria de massas

MS/MS: dados de MS *in tandem*

MS2: dados de MS *in tandem*

m/z: razão massa-carga

OMS: organização mundial de saúde

QqQ: analisador de massas do tipo triplo quadrupolo

QToF: analisador de massas do tipo quadrupolo acoplado a um analisador de massas do tipo tempo de voo

RP: fase reversa

SPE: extração em fase sólida

UPLC: cromatografia líquida de alta pressão

UVR :radiação ultravioleta

Sumário

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
Capítulo 1. Introdução ao estudo dos metabólitos de cianobactérias e microalgas – referencial teórico	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. CIANOBACTÉRIAS	22
3. FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS E SEUS IMPACTOS.....	25
4. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A INVESTIGAÇÃO DE COMPOSTOS EM MATRIZES AMBIENTAIS.....	26
4.1. <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>	27
4.2. <i>Espectrometria de Massas</i>	29
4.2.1 <i>Fonte de ionização por eletrospray (ESI)</i>	30
4.2.2. <i>Analizador do tipo triplo quadrupolo (QqQ)</i>	33
4.2.3. <i>Analizador de massas por tempo de voo (ToF)</i>	34
5. METABOLÔMICA BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	36
6. ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	41
6.1 <i>Teste de toxicidade aguda com Artemia salina</i>	43
6.2 <i>Ensaio de viabilidade celular a partir da redução do MTS</i>	43
Capítulo 2. Cianobactérias - “the dark side”	45
1. CIANOTOXINAS	46
1.1 <i>Hepatotoxinas</i>	49
1.2 <i>Neurotoxinas</i>	53
1.3 <i>Citotoxinas</i>	57
2. MONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DO RISCO ASSOCIADO À PRESENÇA DE CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS EM RESERVATÓRIOS	59
3. MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.1 <i>Coleta da biomassa</i>	62
3.2. <i>Identificação do fitoplâncton</i>	62
3.3 <i>Extração e clean-up da amostra</i>	63
3.4 <i>Fracionamento</i>	64
3.5 <i>Análise do extrato bruto e suas frações por UHPLC-QToF-MS/MS</i>	65
3.6 <i>Metabolômica baseada em LC-MS/MS</i>	66
3.7. <i>Ensaio de toxicidade aguda contra Artemia salina</i>	67
3.8 <i>Integração entre os dados de LC-MS/MS e os resultados do ensaio biológico</i>	68
3.9 <i>Análises estatísticas</i>	69
4. RESULTADOS	69

4.1	<i>Caracterização da biomassa</i>	69
4.2	<i>Desreplicação e anotação</i>	69
4.3	<i>Análise da toxicidade aguda contra o microcrustáceo Artemia salina</i>	86
4.4	<i>Correlação entre as features encontradas no extrato e nas frações da biomassa investigada e as atividades biológicas observadas</i>	88
5.	DISCUSSÃO.....	91
6.	CONCLUSÃO.....	96
	Capítulo 3. Cianobactérias - “the bright side”	98
1.	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR CIANOBACTÉRIAS E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.....	99
2.	CIANOBACTÉRIAS COMO FONTE ALTERNATIVA DE COMPOSTOS FOTOPROTETORES	102
3.	AMINOÁCIDOS DO TIPO MICOSPORINAS (MAAs).....	105
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	108
4.1	<i>Coleta da biomassa</i>	108
4.2.	<i>Identificação do fitoplâncton</i>	109
4.3	<i>Reagentes, meios de cultivo e linhagens celulares</i>	109
4.4.	<i>Produção do extrato orgânico</i>	110
4.5.	<i>Produção do extrato aquoso - extração dos MAAs</i>	110
4.6.	<i>Análise do extrato por UHPLC-QToF-MS/MS e metabolômica não direcionada</i>	111
4.7.	<i>Análise do extrato por HPLC-QqQ-MS/MS - metabolômica direcionada</i>	111
4.8.	<i>Espectro de absorção ultravioleta do extrato aquoso de cianobactérias</i>	112
4.9.	<i>Ensaio de toxicidade aguda dos extratos orgânico e aquoso de cianobactérias contra o microcrustáceo Artemia salina</i>	112
4.11.	<i>Fonte de irradiação ultravioleta</i>	113
4.12.	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	113
4.13.	<i>Proteção contra morte celular induzida por exposição à radiação UV</i>	113
4.14.	<i>Medida do fator de proteção solar (FPS) in Vitro</i>	114
4.15.	<i>Determinação do fator de proteção UVA (FPUVA)</i>	116
4.16	<i>Análises estatísticas</i>	116
5.	RESULTADOS	116
5.1	<i>Identificação do fitoplâncton</i>	116
5.2	<i>Desreplicação e anotação dos extratos orgânico e aquoso da biomassa de cianobactérias estudada</i>	117
5.3	<i>Identificação dos MAAs presentes no extrato aquoso</i>	118
5.4.	<i>Espectro de absorção ultravioleta do extrato aquoso</i>	120
5.5	<i>Análise de toxicidade aguda dos extratos orgânico e aquoso de cianobactérias contra o microcrustáceo Artemia salina</i>	120

5.6. <i>Ensaio de viabilidade celular com células HaCaT</i>	121
5.7. <i>Inibição da morte celular induzida por exposição à radiação UV</i>	122
5.8. <i>Avaliação do fator de proteção solar (FPS) e fator de proteção UVA (FPUVA) in vitro</i> ..	123
6. DISCUSSÃO	123
7. CONCLUSÃO	129
Capítulo 4 - Considerações gerais e produção acadêmica	131
1. CIANOBACTÉRIAS: FLORAÇÕES, MONITORAMENTO AMBIENTAL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E PERSPECTIVAS FUTURAS	132
2. REALIZAÇÕES ACADÊMICAS DURANTE O DOUTORADO	135
REFERÊNCIAS.....	138
APÊNDICE	161

**Capítulo 1. Introdução ao estudo dos metabólitos de
cianobactérias e microalgas – referencial teórico**

1. INTRODUÇÃO

No contexto da pesquisa de produtos naturais, as cianobactérias são um grupo de destaque. Esses organismos procariontes e fotossintetizantes, de longa história evolutiva, estão presentes nos mais diversos ecossistemas do planeta (Rizwan *et al.*, 2018), incluindo ambientes de condições extremas como fontes termais e geleiras. Contudo, são mais comumente encontrados em ecossistemas aquáticos onde desempenham um papel importante nos ciclos de nitrogênio, carbono e oxigênio (Vincent, 2009).

Como produtores primários, as cianobactérias dependem da luz solar para obter energia e, em condições favoráveis, como alta incidência solar, grande disponibilidade de nutrientes e temperaturas elevadas, podem multiplicar-se rapidamente, resultando em episódios de floração de cianobactérias (CDC, [s.d]). Nas últimas décadas, a eutrofização acelerada dos corpos d'água, causada principalmente pela ação humana e pelas mudanças climáticas, tem contribuído para o aumento na frequência e no volume das florações de cianobactérias em reservatórios de água do mundo todo (Macário *et al.*, 2021). Essas florações impactam a paisagem e o potencial recreativo dos corpos d'água e comprometem a qualidade da água como um todo, devido à redução nos níveis de oxigênio dissolvido (Huisman *et al.*, 2018).

No entanto, a maior preocupação quanto à ocorrência de florações cianobacterianas está relacionada ao fato de muitos desses organismos produzirem toxinas que são prejudiciais à saúde humana e animal (Du *et al.*, 2019). Na década de 1980, diversos casos de morte e intoxicação de animais que viviam próximos a reservatórios de água afetados por florações chamaram atenção para o problema e vários estudos sobre intoxicação causada por cianotoxinas foram publicados (Chorus *et al.*, 2000). Ao longo dos anos, avanços na elucidação das estruturas químicas de várias dessas cianotoxinas e o desenvolvimento de métodos de detecção química adequados para análises de rotina aceleraram a pesquisa e

aumentaram o volume de conhecimento sobre essas toxinas. Assim, em 1998, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um guia com normas específicas para toxinas de cianobactérias em águas de abastecimento público. Esse guia estabelecia o limite de 1,0 µg/L para a microcistinas (equivalente a microcistina-LR), uma cianotoxina hepatotóxica bastante comum, como concentração máxima aceitável (Sanchez *et al.*, 2012).

No Brasil, o padrão de potabilidade de águas estabelecido pela do Ministério da Saúde, PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021, estabelece concentração máxima de 1,0 µg/L para microcistinas (equivalente de MC-LR) e cilindrospermopsinas e de 3,0 µg/L para saxitoxinas (equivalente de STX/L). Ela também proíbe o uso de algicidas como forma de controle de florações e ainda recomenda o monitoramento mensal de cianobactérias em água bruta com concentração inferior a 10.000 células/mL e semanal, se superior. Para cianotoxinas, o monitoramento deve ser semanal se a concentração de cianobactérias no manancial exceder 20.000 células/mL (Brasil, 2021).

Mas as cianobactérias não chamam a atenção da comunidade científica apenas por seu impacto na ecologia dos sistemas aquáticos e capacidade de produção de toxinas. As cianobactérias são organismos que, para além das toxinas, produzem uma quantidade excepcional de metabólitos secundários estruturalmente diversos e altamente bioativos (Jones *et al.*, 2020). Entre as classes químicas de metabólitos secundários produzidos por cianobactérias podemos citar fenóis, terpenos, derivados de ácidos graxos, polissacarídeos, peptídeos, alcaloides, policetídeos, e outros (Singh *et al.*, 2017; Crnkovic, 2018). Essas moléculas têm aplicação nas indústrias de cosméticos, pigmentos e biofertilizantes; no desenvolvimento de novos compostos ativos para a indústria farmacêutica; na suplementação da nutrição humana e animal; e na extração e exploração de moléculas de alto valor (Huang, Chen, Sandmann, 2006; Blanco *et al.*, 2007; Suganya *et al.*, 2016; Moreno-Garcia *et al.*, 2017).

Em função de tamanho potencial, os produtos naturais de cianobactérias vêm sendo constantemente explorados e revisados (Jones *et al.*, 2020, 2021). Contudo, as cianobactérias ainda são uma fonte relativamente pouco explorada de compostos bioativos, principalmente no que diz respeito à descoberta de novos candidatos a fármacos (Tidgewell; Clark; Gerwick, 2010).

No contexto de descoberta de novos compostos bioativos, diferentes abordagens podem ser utilizadas. Durante muitos anos, a abordagem clássica, que compreende a triagem biológica dos extratos brutos, seguida de procedimentos de fracionamento bioguiado até o isolamento e identificação do(s) composto(s) bioativo(s) (Newman, Cragg, 2016), dominou o campo da pesquisa e levou à descoberta exitosa de diversos compostos (Wall, Wani, 1996; Campbell, 2012; Kingston, Cassera, 2022). Mas as altas taxas de “redescoberta” de moléculas revelou a necessidade de novas abordagens (Orjala *et al.*, 2011).

A evolução de técnicas analíticas e o desenvolvimento das ciências ‘ômicas’ trouxeram um novo fôlego à pesquisa de produtos naturais ao permitir a identificação de compostos bioativos em estágios iniciais e evitar etapas de fracionamento trabalhosas que podem alcançar resultados replicados (Borges *et al.*, 2022). Técnicas analíticas cada vez mais sensíveis, métodos de triagem e desreplicação (identificação de moléculas já caracterizadas anteriormente), estratégias de pré-fracionamento, metabolômica, genômica, manipulação das vias biossintéticas, entre outras ferramentas, ajudam na pesquisa de novos compostos.

A metabolômica é considerada hoje a técnica mais funcional e abrangente para o monitoramento e identificação do estado bioquímico de um organismo em resposta a mudanças genéticas e ambientais (Takaki, 2017). O desenvolvimento de ferramentas computacionais que permitem o cruzamento de informações biológicas com dados analíticos

e bancos de dados está na vanguarda da investigação, desreplicação, priorização, e identificação de produtos naturais.

É nesse contexto que o presente projeto foi desenvolvido. Utilizando dados de metabolômica baseada em espectrometria de massas, em paralelo com resultados de bioensaios e ferramentas de bioinformática, investigamos o perfil químico de duas biomassas de cianobactérias coletadas em reservatórios eutrofizados nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais.

Nos próximos tópicos deste capítulo, falaremos um pouco mais sobre cianobactérias, florações e sobre o estado-da-arte das técnicas e metodologias empregadas neste estudo. No capítulo 2, discutiremos um pouco sobre as toxinas produzidas por cianobactérias, os impactos ambientais que elas podem gerar e a importância do monitoramento ambiental. Na sequência, serão apresentados os métodos e resultados de análises da investigação da biomassa coletada no reservatório do Funil, na cidade do Rio de Janeiro, capital do estado. No capítulo 3 trataremos sobre o potencial biotecnológico dos metabólitos secundários produzidos por cianobactérias e serão apresentados os métodos e resultados da caracterização de uma biomassa coletada em um lago artificial do Museu Mariano Procópio, no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. No Capítulo 4 são apresentadas as considerações finais e produções geradas durante todo o projeto de doutorado.

2. CIANOBACTÉRIAS

Cianobactérias (Reino Eubacteria, Filo Cyanobacteria) são microrganismos procariontes e fotossintetizantes, componentes naturais do fitoplâncton. Seus primeiros registros fósseis datam de 3,5 bilhões de anos e, durante essa longa história evolutiva, foram capazes de colonizar a quase totalidade dos ecossistemas do planeta, inclusive ambientes extremos como fontes termais, desertos e geleiras (Whitton, Potts, 2007). Contudo, esses

organismos são mais comumente encontrados em ambientes marinhos, estuarinos e de água doce (Molica, Azevedo, 2009).

Sua principal forma de obtenção de energia é pela fotossíntese, característica correlata às microalgas (eucariotas), mas sua organização celular é similar à das bactérias Gram-negativas (Alves, 2005). Porém, diferente das bactérias Gram-negativas, as cianobactérias apresentam a camada de peptídeoglicano mais espessa, o que proporciona maior rigidez à parede e protege contra a ruptura celular por osmose (Melcher, 2007).

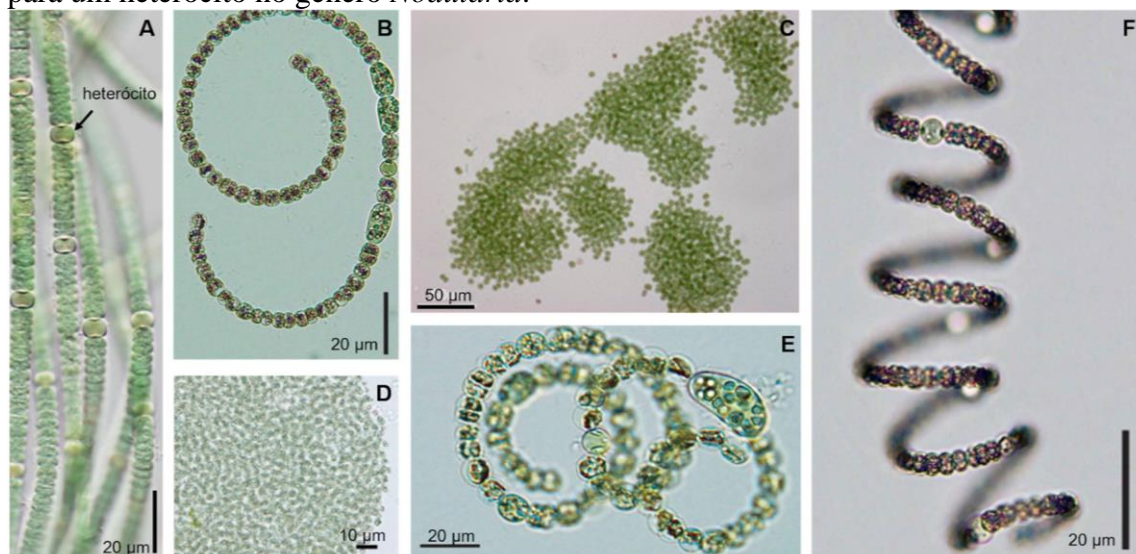
As cianobactérias são consideradas os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberar oxigênio elementar na atmosfera primitiva e, até hoje, desempenham um papel importante na oxigenação da atmosfera terrestre devido à sua capacidade fotossintética (Fischer, 2008). Além disso, essas bactérias desempenham um papel crucial nos ciclos biogeoquímicos (Rastogi *et al.*, 2014).

Esses organismos fotoautotróficos armazenam seus pigmentos fotossintetizantes nas membranas dos tilacóides, na região periférica das células, semelhante ao que é observado nos cloroplastos das células vegetais superiores (Raven, Evert, Eichhorn, 2007). Todas as cianobactérias possuem clorofila-a e carotenoides. Algumas ainda apresentam pigmentos acessórios como: ficobiliproteínas e aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) (Geraldés *et al.*, 2020).

As cianobactérias possuem mecanismos de proteção contra a incidência de radiação solar nociva (UVB e UVA), ao mesmo tempo em que estão adaptadas a baixas intensidades luminosas (Whitton, Potts, 2007). Cianobactérias são organismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, que é catalisado pelo complexo enzimático das nitrogenases. A ausência de oxigênio é requisito para a atividade da nitrogenase, por isso a fixação do nitrogênio é realizada em condições anóxicas, seja através da separação temporal entre respiração e fixação de nitrogênio (ciclos claro e escuro), seja através de células

especializadas chamadas heterócitos (Bauersachs *et al.*, 2009). Como os heterócitos não realizam a fotossíntese, eles não possuem pigmento (**Figura 1.1A** – destaque).

Figura 1.1: Microscopia eletrônica de algumas espécies de cianobactérias com destaque para um heterócito no gênero *Nodularia*.



A: *Nodularia harveyana*¹, B: *Dolichospermum circinale*¹, C: *Microcystis aeruginosa*², D: *Microcystis panniformis*³, E: *Dolichospermum perturbatum*¹, F: *Dolichospermum spiroides*¹. Fonte: ¹McGregor (2018); ²Norway's portal to natural toxin research - disponível em: <http://toxinology.nilu.no/Researchareas/>; ³INaturalist, disponível em: <https://www.inaturalist.org/taxa/>.

As cianobactérias apresentam grande diversidade genotípica e fenotípica, abrangendo formas unicelulares, coloniais, filamentosas ou pseudoparenquimatosas. Pesquisas apontam que esse grupo é representado por cerca de 250 gêneros (Nabout *et al.*, 2013), e mais de 5100 espécies já foram identificadas e categorizadas de acordo com características morfológicas a análises moleculares (Allaf, Peerhossaini, 2022).

Quanto à classificação, diversas formas já foram propostas e revisadas ao longo dos anos. Em 1979, Rippka Deruelles e Waterbury sugeriram uma classificação bacteriológica na qual levavam em conta a organização celular, plano de fissão, presença ou ausência de bainha e ramificações. Nessa classificação, posteriormente adotada pelo manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey's, as cianobactérias eram divididas em 5 (I-V) subseções (Crnkovic, 2018).

Mais recentemente, em 2014, apoiados por análises de microscopia eletrônica e caracterizações moleculares e genéticas, Komárek e colaboradores propuseram uma classificação botânica que organiza as cianobactérias em oito ordens e quatro subclasses, diferenciadas principalmente por análises filogenéticas (Komárek *et al.*, 2014).

3. FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS E SEUS IMPACTOS

Florações de cianobactérias, também conhecidas pelo termo em inglês *bloom*, são definidas como o fenômeno de crescimento excessivo e descontrolado de cianobactérias em corpos d'água (Bortoli, Pinto, 2015). Diversos fatores, como altas temperaturas, disponibilidade de nutrientes, luz solar intensa e baixo movimento da água, contribuem para o crescimento e formação dessas florações em reservatórios (EPA, 2023).

No entanto, devido às mudanças climáticas e à eutrofização dos corpos d'água causada pela atividade humana, tem havido um aumento na frequência, severidade e duração das florações de cianobactérias em todo o mundo (Macário *et al.*, 2021). A análise de imagens de satélite obtidas ao longo de três décadas demonstrou um aumento global nas florações em lagos de água doce e oceanos (Hallegraeff *et al.*, 2021; Ho, Michalak, Pahlevan, 2019). O painel intergovernamental de avaliação de mudanças climáticas de 2019 apontou que a ocorrência de proliferação de algas nocivas, sua toxicidade e risco para os ecossistemas e à saúde humana devem continuar aumentando junto com o aquecimento global e as descargas do CO₂ durante todo o século XXI (Pörtner *et al.*, 2019).

Durante as florações, que podem durar dias, semanas ou até mesmo meses, geralmente ocorre a formação de uma “nata” ou “tapete” espesso e colorido na superfície dos reservatórios, o que aumenta a turbidez e diminui a incidência de luz nas camadas mais profundas da coluna d'água. O quadro causa uma rigorosa diminuição das concentrações de oxigênio dissolvido na água, levando à morte de organismos aquáticos e causando alterações no odor e na cor dos mananciais (Huisman *et al.*, 2018). A **Figura 1.2** ilustra

alguns episódios de floração que ocorreram nos últimos anos em reservatórios do sul e sudeste brasileiro.

Figura 1.2: Florações em reservatórios de água no sul e sudeste brasileiros. Da esquerda para a direita: lago do Museu Mariano Procópio em Juiz de Fora, MG; Praia dos Namorados, Americana, SP; detalhe da Represa do Funil, RJ e reservatório em Porto Alegre, RS.



Fonte: Acervo pessoal.

As alterações na qualidade da água associadas às florações de cianobactérias têm impacto na paisagem e no potencial de lazer, além de afetarem as atividades econômicas relacionadas ao reservatório. As florações também trazem preocupações quanto à produção de toxinas, prejudiciais à saúde humana e animal, por algumas espécies de cianobactérias (Wood, 2016).

4. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA A INVESTIGAÇÃO DE COMPOSTOS EM MATRIZES AMBIENTAIS

A análise de compostos-alvo em matrizes complexas, como as amostras ambientais, muitas vezes requer a detecção e/ou quantificação de concentrações muito baixas desses compostos (Whitehead, 2023). Os métodos utilizados devem ser capazes de separar, identificar e quantificar compostos químicos com alta sensibilidade e especificidade (Fatta-

Kassinou, Meric, Nikolaou, 2011). Assim, é necessário o uso de técnicas analíticas, sensíveis, seletivas, robustas e eficientes.

A partir da segunda metade do século XX, as capacidades de detecção das técnicas analíticas avançaram rapidamente (Bulska, Rusczyńska, 2017). Algumas das metodologias disponíveis atualmente são capazes de detectar traços (ppm) de compostos, como por exemplo espectrometria de massas e espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (AAS - do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*).

O uso de técnicas hífenadas também se difundiu amplamente nas análises de amostras complexas. O termo "hífenadas" se refere ao acoplamento de duas ou mais técnicas analíticas. O objetivo desse arranjo é realizar análises de forma mais rápida e eficiente. As técnicas a serem acopladas devem gerar informações complementares. Um exemplo típico e muito utilizado de técnicas hífenadas é o acoplamento de métodos de separação, como a cromatografia, com métodos de identificação, como a espectrometria de massas (Rodrigues *et al.*, 2006).

Neste trabalho, utilizamos a cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massas para análise dos compostos de interesse. Portanto, essas técnicas serão discutidas em maior detalhe a seguir.

4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação que se baseia no equilíbrio dos compostos de interesse entre duas fases imiscíveis: a fase estacionária (FE) e a fase móvel (FM) (Matumoto, Alcântara, 2014). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é um tipo versátil de cromatografia por eluição. Nela, a fase móvel é um solvente líquido e a fase estacionária é composta por partículas finamente divididas. Esta técnica utiliza colunas de aço

inoxidável com diâmetro interno entre 2 e 5 mm empacotadas com partículas porosas esféricas de tamanhos entre 3 e 10 μm , que formam a fase estacionária. A fase móvel elui continuamente pela coluna, sob pressão elevada e com um fluxo controlado (Skoog et al., 2006). A separação dos analitos presentes na mistura acontece devido às diferentes interações entre os analitos e as FM e FE. O tempo de retenção de um composto é a medida do tempo transcorrido entre a injeção da amostra na coluna e o aparecimento do ápice do pico deste composto no detector.

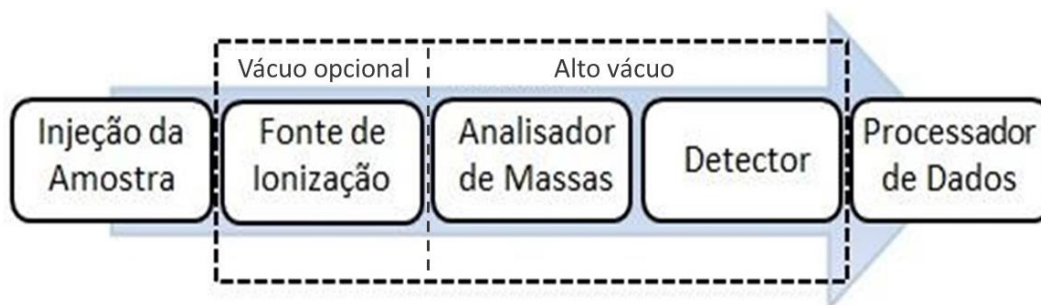
Uma evolução da técnica de HPLC é a UPLC (do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*). Esta técnica normalmente utiliza partículas de coluna com tamanho inferior a 2 μm e pode operar em pressões mais altas do que 15.000 psi (McShane et al., 2014). Essa tecnologia permite taxas de fluxo mais rápidas, mantendo a eficiência de separação e aumentando o rendimento da análise da amostra. Os sistemas de HPLC e UPLC são geralmente acoplados a uma técnica de detecção, e esta, a um computador que registra os dados sob a forma de um gráfico (cromatograma) (Skoog et al., 2006).

A cromatografia líquida é uma ótima técnica de separação e, acoplada a um sistema detector, permite a análises qualitativas (confirmação da identidade química) e quantitativas (concentração de determinado composto na amostra) de amostras diversas. Entre as várias opções de detectores existentes, uma das que melhor fornece informações estruturais é a espectrometria de massas (Lanças, 2009). O acoplamento dessas técnicas combina a alta eficiência de separação da cromatografia com a seletividade e as informações estruturais fornecidas pela espectrometria de massas. Essas vantagens fazem com que esse arranjo seja extensivamente utilizado em pesquisas recentes com aplicação ambiental (Chiaradia, Collins, Jardim, 2008).

4.2. Espectrometria de Massas

De forma básica, um espectrômetro de massas tem cinco componentes principais (Figura 1.3). O primeiro deles é a unidade de introdução da amostra, que faz a interseção atmosfera-vácuo. As pressões dentro de um espectrômetro são muito baixas, chegando a micrometros de mercúrio em algumas regiões. A unidade de introdução da amostra leva até o segundo componente, a fonte de ionização. Neste compartimento as moléculas da amostra são transformadas em íons em fase gasosa. Estes íons são acelerados por um campo magnético e, em seguida, um analisador de massas (terceiro componente) os separa em razão de suas relações massa/carga (m/z). Na sequência, o quarto componente, um detector, quantifica os íons gerados. Um sistema de processamento de dados, quinto componente, registra e processa os sinais (Pavia, 2015). O espectro de massas é um gráfico do número de íons produzidos *versus* a razão m/z (SKOOG, 2006).

Figura 1.3: Ilustração esquemática dos componentes de um espectrômetro de massas.



Fonte: PAVIA (2015) – adaptado.

A espectrometria de massas (MS - do inglês *Mass Spectrometry*), através da determinação precisa da razão m/z dos analitos, é capaz de fornecer informação sobre: (i) a composição elementar de amostras; (ii) a estrutura molecular; e, quando acoplada a um sistema de separação, (iii) a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas (Ardrey, 2003).

Os componentes de um espectrômetro de massas podem ser de diferentes tipos e a escolha de cada um vai depender das amostras e do tipo das análises que se deseja realizar. As fontes de ionização mais usadas em sistemas hifenados LC-MS, são: ionização por eletronebulização (ESI - *electrospray ionization*), ionização química à pressão atmosférica (APCI - *atmospheric pressure chemical ionization*) e a fotoionização à pressão atmosférica (APPI - *atmospheric pressure photoionization*) (Ardrey, 2003; Chiaradia, Collins, Jardim, 2008). Cada uma possui um mecanismo específico de ionização que influencia de maneira distinta a produção dos íons (Remane *et al.*, 2010).

Quanto aos analisadores, os mais utilizados são: quadrupolos (Q), tempo de voo (*time of flight* - ToF), armadilha de íons (*ion trap*- IT), setor elétrico (E), setor magnético (B) e ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (*Fourier-transformation cyclotron resonance* – FT ICR) (Hoffmann, Stroobant, 2007). Um arranjo comumente utilizado para aumentar a capacidade de resolução dos analisadores de massa é a espectrometria de massas sequencial (também conhecida como *in tandem*, MS/MS ou MS²). Neste caso, dois ou mais analisadores de massa são acoplados, para uma etapa de reação adicional. Normalmente um deles funciona como célula de colisão e o(s) outro(s) como analisador(es) de massa (Bustillos, 2020). A seguir, falaremos com mais detalhes sobre a fonte de ionização e os analisadores de massa utilizados neste trabalho.

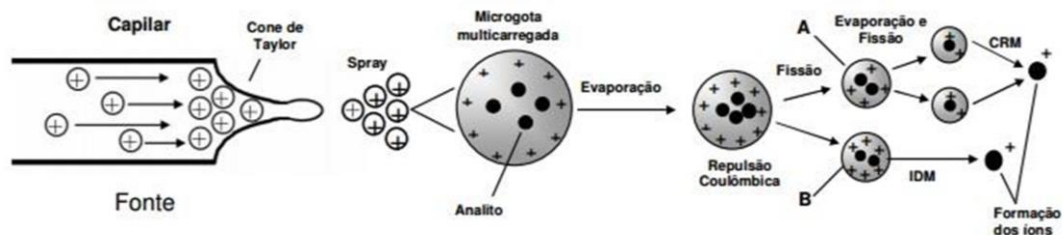
4.2.1 Fonte de ionização por eletrospray (ESI)

A ESI (do inglês - *Electrospray Ionization*) é uma técnica de ionização em pressão atmosférica e é uma técnica de ionização suave, que permite a formação de íons a partir de macromoléculas, superando sua tendência a fragmentarem-se quando ionizadas (Souza, 2008).

O processo de ionização por ESI se inicia com o bombeamento dos analitos, dissolvidos em um solvente volátil, através de um fino capilar de aço inoxidável. Na ponta deste capilar é aplicada uma alta tensão, gerando um forte campo elétrico. Como consequência desse campo a amostra que sai pelo capilar forma um aerossol composto por gotículas de solvente e analito altamente carregadas. As gotículas carregadas se chocam com um contrafluxo de um gás de secagem (geralmente N₂), em temperaturas elevadas (150-200°C), que auxilia na evaporação do solvente e na formação do aerossol (Pavia, 2015). A evaporação do solvente leva à diminuição do tamanho destas gotículas, aumentando a repulsão eletrostática entre as cargas de sua superfície. Dessa forma, a tensão superficial do líquido se torna cada vez maior até que ocorre o fenômeno de “explosão Coulômbica”, que resulta na formação de gotas menores, com posterior liberação dos íons (Ardrey, 2003; Chiaradia, Collins, Jardim, 2008; Souza, 2008; Lanças, 2009).

Os detalhes de como os íons são efetivamente transferidos para a fase gasosa ainda causam discussão. Dois mecanismos são propostos: (i) o modelo de carga residual e (ii) o modelo de dessorção de íons. O modelo de carga residual propõe que as gotículas continuam a sofrer evaporação e fissão num processo contínuo até a total dessolvatação das moléculas. Assim, as cargas que estavam contidas no solvente são transferidas para o analito, levando à formação de um íon isolado. Já o modelo de dessorção de íons postula que, à medida que ocorre a evaporação, as gotículas de solvente alcançam um determinado raio em que a densidade elétrica na sua superfície se torna suficientemente grande para expulsar os íons dos analitos para fora da gotícula. A transferência de carga entre o solvente e o analito ocorreria durante essa expulsão (Yamashita, Fenn, 1984; Hoffmann, Stroobant, 2007; Souza, 2008). A Figura 1.4, ilustra os mecanismos propostos.

Figura 1.4: Esquema de ionização por *electrospray*: em (A) vemos o modelo do resíduo carregado, e (B) ilustra o modelo de dessorção de íons.



Fonte: SOUZA (2008)

A maior parte dos íons gerados na ESI são moléculas protonadas ($[M+nH]^{n+}$) ou desprotonadas ($[M-nH]^{n-}$), há também a probabilidade de formação de moléculas cationizadas (p. ex: $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$) ou anionizadas (p. ex: $[M+Cl]^-$) (Souza, 2008). Também pode ocorrer a formação de íons multi-carregados ($z > 1$) em compostos com alto peso molecular. Nestes casos, como o espectrômetro reconhece a relação massa/carga (m/z), o resultado é a massa do analito dividida pelo número de cargas presentes na molécula. É possível estimar a presença de múltiplas cargas através da relação isotópica da amostra, ou seja, pela presença natural de isótopos de ^{13}C ou 2H .

A ionização pode ocorrer tanto no modo positivo quanto no modo negativo. Substâncias com grupamentos básicos, como aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas no modo positivo, devido a relativa facilidade com que são protonadas. Já as substâncias que contém funções ácidas, como ácidos carboxílicos e fenóis, são facilmente desprotonadas, e podem ser analisadas no modo negativo (Crotti *et al.*, 2006).

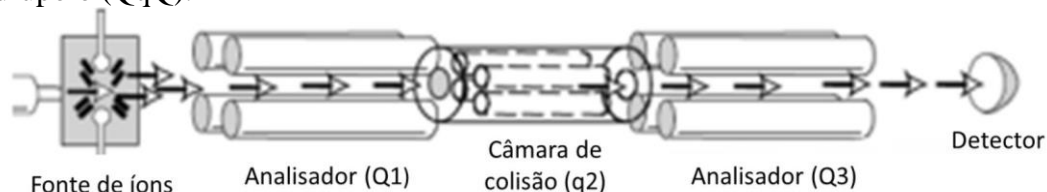
A ESI apresenta vantagens e desvantagens. Entres as vantagens estão: (i) a ionização em fase líquida, o que permite a análise de compostos iônicos e termicamente instáveis e (ii) capacidade de produzir íons de múltiplas cargas, o que permite o estudo de moléculas com alta massa molar (Pavia, 2015). Entre as desvantagens estão: (i) a suscetibilidade a efeitos de interferentes na matriz; (ii) a ionização branda que pode produzir espécies moleculares intactas, o que dificulta a sua informação estrutural (Ardrey, 2003).

4.2.2. Analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ)

Um analisador de massas do tipo quadrupolo é composto por quatro barras sólidas paralelas na direção do feixe de íons. Ele utiliza uma combinação de voltagem de corrente contínua (CC) e radiofrequência (RF) aplicada às barras para criar um campo eletrostático oscilante na região entre elas. Esse campo oscilante é projetado de forma a permitir a passagem apenas dos íons com uma relação massa/carga (m/z) desejada. Esses íons seguem uma trajetória estável em formato espiral até alcançarem o detector, onde serão registrados como um sinal elétrico. Os íons com uma relação massa/carga (m/z) diferente da desejada são instáveis sob esse campo oscilante e colidem com as barras antes de alcançarem o detector, não sendo registrados no resultado final (Pavia, 2015).

Um analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ), é formado por três conjuntos de quadrupolos (conjuntos de quatro eletrodos em forma de barras), organizados em série (Figura 1.5). Nesse arranjo, o primeiro e o terceiro quadrupolos atuam como filtros de massa e o segundo causa a fragmentação do analito por meio da interação com um gás de colisão (Skoog *et al.*, 2006).

Figura 1.5: Representação esquemática de um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ).



Fonte: Nascimento (2019) - adaptado.

Analisadores do tipo triplo quadrupolo, que apresentam alta sensibilidade, seletividade e linearidade, podem aprimorar a detecção do método quando usados para gerar um íon característico de uma molécula (p. ex: no monitoramento de perda neutra e no monitoramento de reações múltiplas). Contudo, têm uma baixa resolução quando

comparado a outros analisadores, o que pode dificultar a distinção entre íons de massa semelhante. (Hoffmann, Stroobant, 2007).

Neste trabalho, as análises metabolômicas direcionadas (*targeted*) foram realizadas com dados de um sistema HPLC acoplado a um espectrômetro de massa do tipo Triplo Quadrupolo (QqQ), com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) - sistema HPLC-ESI-QqQ-MS/MS. Esse sistema, apesar da baixa resolução de massas, foi escolhido por possibilitar uma boa separação entre os analitos de interesse e a realização de análises no método monitoramento de reações múltiplas (MRM - do inglês *multiple-reaction monitoring*). Este método possibilita o acompanhamento de fragmentações específicas para múltiplos íons produto provenientes de um ou mais íons precursores (Vessecchi *et al.*, 2011). Isso aumenta a seletividade do método, pois é muito baixa a probabilidade de duas moléculas gerarem íons precursores e íons produtos idênticos por meio de MS/MS (Geraldês, 2019).

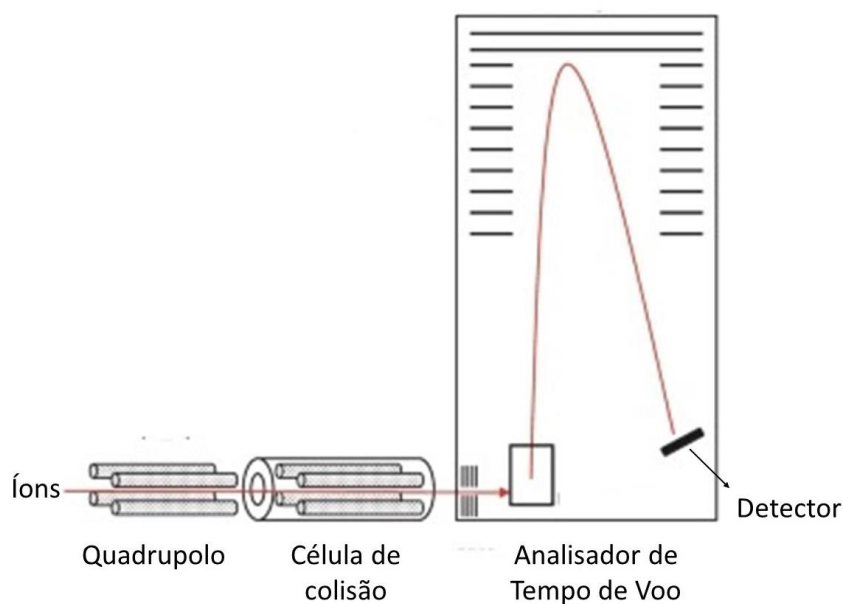
4.2.3. Analisador de massas por tempo de voo (ToF)

Um analisador de massas por tempo de voo (ToF – do inglês *Time of Flight*) é baseado no princípio de que as velocidades de dois íons, criados simultaneamente e com a mesma energia cinética, variarão conforme a massa dos íons. O íon mais leve será mais rápido e chegará primeiro ao detector, enquanto o íon mais pesado demorará mais para alcançar o mesmo detector. Esse tipo de analisador precisa de equipamentos eletrônicos de alta velocidade para medir precisamente os tempos de voo de cada íon (Pavia, 2015).

O arranjo QToF, é um arranjo sequencial (*in tandem*) de analisadores de massas, que combina um quadrupolo com um analisador de massas por tempo de voo. A instrumentação QToF-MS/MS pode ser entendida de forma análoga a um espectrômetro de massa triplo-quadrupolo, onde o terceiro quadrupolo é substituído por um tubo de tempo

de voo (Figura 1.6). O primeiro quadrupolo (Q1) pode operar como um filtro de massa para a seleção de íons específicos com base em sua relação m/z , ou apenas no modo de radiofrequência (RF), onde todos os íons são transmitidos através do quadrupolo. O segundo quadrupolo (Q2) atua como uma célula de colisão, onde os íons são bombardeados por moléculas de gás neutro, resultando na fragmentação dos mesmos. O Q2 também pode atuar no modo RF sem subseqüente fragmentação de íons. Após deixar o quadrupolo, os íons são acelerados na região do analisador de íons por tempo de voo. (Allen, McWhinney, 2019).

Figura 1.6: Representação esquemática de um analisador de massas do tipo quadrupolo acoplado a um analisador do tipo tempo de voo (QToF).



Fonte: Levine; Kerrigan (2020) - adaptado.

Neste trabalho, o equipamento utilizado para as análises não direcionadas (*untargeted*) dos extratos de cianobactérias foi um UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS. Estes analisadores possuem alta resolução, o que permite o cálculo de fórmulas moleculares de compostos através de dados de massa acurada e distribuição de padrão isotópico, além de informações estruturais que podem ser extraídas a partir dos padrões de fragmentação, levando à anotação de compostos. Isso é particularmente útil para análise de amostras ambientais complexas (Bustillos, 2020).

5. METABOLÔMICA BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A abordagem clássica para a descoberta de produtos naturais bioativos envolve a coleta de amostras, extração, bioensaio(s) ou teste(s) químico(s), seguidos pelo isolamento e elucidação da estrutura do composto de interesse (Wolf, Siems, 2007; Demarque *et al.*, 2020). Embora historicamente bem-sucedidas, as ferramentas clássicas, quando usadas isoladamente, são demoradas e muitas vezes infrutíferas no que diz respeito à descoberta de novas moléculas, uma vez que, frequentemente, levam ao isolamento de compostos já conhecidos (Demarque *et al.*, 2020). Para superar esse gargalo, a associação de técnicas analíticas com ferramentas computacionais e tratamentos estatísticos, conhecida como ferramentas ‘ômicas’, vem se apresentando como poderosa aliada no fluxo de trabalho moderno de descoberta de novos produtos naturais.

A metabolômica é definida como o estudo (identificação e/ou quantificação) do conjunto de metabólitos (pequenas moléculas produtos do metabolismo) de um determinado sistema biológico (Demarque *et al.*, 2020). Ela surgiu no final do século XX, em resposta à dificuldade de se investigar o metabolismo completo de organismos vivos usando apenas técnicas de isolamento e determinação estrutural (Crnkovic, 2018).

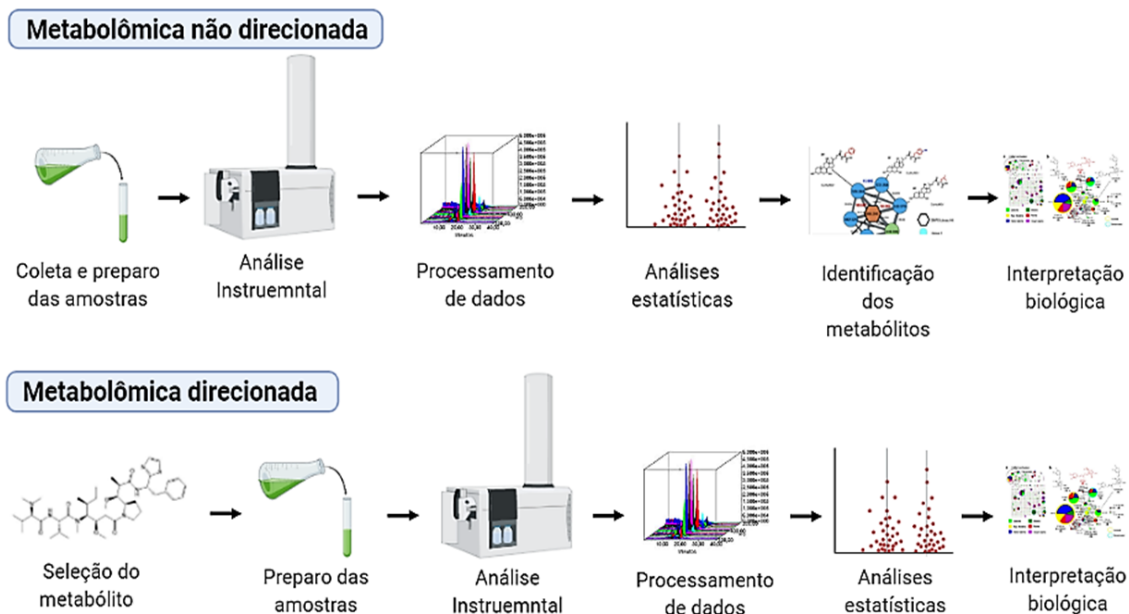
Diferentes técnicas analíticas podem ser usadas para análises metabolômicas. Cada uma delas têm vantagens e desvantagens associadas. Entre as técnicas mais utilizadas em análises metabolômicas estão as técnicas hifenadas que acoplam métodos de separação de alta resolução com detecção seletiva por espectrometria de massas (MS), como cromatografia gasosa (GC-MS), cromatografia líquida (LC-MS) e eletroforese capilar (CE-MS) (Bouslimani *et al.*, 2014).

A espectrometria de massas possui qualidades que ampliam sua aplicação na metabolômica, como por exemplo: alta sensibilidade, necessidade de pequenos volumes de amostra para análise, alto poder de resolução e possibilidade de acoplamento com uma

técnica cromatográfica. Além disso, técnicas de ionização a baixas pressões permitem a análise de amostras biológicas de alto peso molecular, e o uso de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) gera dados que podem ser prontamente comparados com bancos de dados e bibliotecas espectrais, facilitando a desreplcação e a identificação dos compostos (Crnkovic, 2018; Demarque *et al.*, 2020).

A abordagem metabolômica a ser utilizada depende da pergunta de pesquisa que se quer responder. A procura por um composto desconhecido geralmente passa pela aquisição de dados de forma não direcionada. Assim, faz-se uso da metabolômica global ou não direcionada (*untargeted metabolomics*), que pode ser definida como uma análise qualitativa do maior número possível de metabólitos, pertencentes a diferentes classes químicas, contidas no sistema biológico em estudo (Canuto *et al.*, 2018). Porém, se há um metabólito específico que se deseja investigar, a metabolômica direcionada ou alvo (*targeted metabolomics*), definida como a análise quantitativa de um ou mais metabólitos pré-selecionados (Canuto *et al.*, 2018), é o caminho de escolha. Não é incomum que uma análise metabolômica não direcionada seja seguida pela análise metabolômica direcionada. Os fluxogramas de trabalho comumente empregados para cada uma das abordagens são ilustrados na Figura 1.7.

Figura 1.7: Fluxograma de trabalho para análises metabolômicas não direcionada e direcionada.



Fonte: CANUTO et al., 2018 (adaptado)

A identificação abrangente de pequenas moléculas é o foco principal da metabolômica aplicada à pesquisa de produtos naturais e ao monitoramento ambiental. No entanto, esta tarefa pode ser altamente desafiadora uma vez que o volume de dados de MS gerados para uma amostra não é trivial de se interpretar e a mera massa de um composto não é suficiente para determinação da fórmula molecular correta (Ludwig *et al.*, 2020).

Para contornar esse problema, diversas estratégias têm sido implementadas. Entre elas, a criação de bancos de dados de espectros de MS/MS que servem para pesquisa e comparação de dados; e o desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas e softwares que ajudam no processamento e interpretação dos dados de massas (MS), auxiliando no processo de desrepliação de um composto. Mais recentemente, com o objetivo de encontrar compostos bioativos em estágios iniciais da pesquisa, vêm surgindo abordagens que integram dados químicos com resultados de bioensaios (Olivon *et al.*, 2017; Egan *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2022). A seguir, discutiremos sobre as ferramentas utilizadas neste trabalho.

O GNPS (do inglês *Global Natural Products Social Molecular Network*) por exemplo, é uma plataforma online e colaborativa de compartilhamento de dados de espectrometria de massas (MS/MS) Essa plataforma, através de diferentes funcionalidades, permite aos pesquisadores compartilhar, processar e analisar dados brutos de espectrometria de massas *in tandem* (MS/MS) (Wang *et al.*, 2016).

A principal funcionalidade do GNPS é a construção de redes moleculares em que os espectros de massas de diferentes amostras são comparados e agrupados de acordo com sua similaridade. A similaridade, neste caso, é um valor calculado de cosseno entre espectros presentes na(s) amostra(s) ou entre a(s) amostra(s) e o(s) espectro(s) de referência dos bancos de dados. Assim, são gerados agrupamentos espectrais que têm como base um valor pré-estabelecido de cosseno (Aron *et al.*, 2020). Esse valor varia de 0 a 1, em que 1 indica 100% de similaridade entre os espectros e 0 indica espectros totalmente diferentes (Pilon *et al.*, 2021). Espectros com 100% de similaridade são agrupados em um espectro consenso. Esse espectro é representado por um nodo ou *feature* na rede molecular e, se há similaridade entre os *features* eles serão conectados por uma aresta, formando uma família (ou *cluster*). O agrupamento em *clusters* ajuda na identificação de estruturas desconhecidas e facilita a descoberta de novos metabólitos. Além disso, o GNPS permite a anotação de metabólitos já conhecidos com base em bancos de dados existentes, como o PubChem[®] e o MassBank[®].

O SIRIUS[®] (<https://bio.informatik.uni-jena.de/sirius/>) é um software para a identificação de metabólitos a partir de dados de espectrometria de massas *in tandem* de alta resolução. Esse software engloba diferentes ferramentas, incluindo os serviços *web-based* CSIFingerID e CANOPUS (Dührkop *et al.*, 2019). Utilizando os dados de LC-MS/MS e analisando dados de padrão isotópico, a plataforma gera proposições de fórmulas moleculares e realiza pesquisas (CSIFingerID) em bancos de dados de espectros de

fragmentação para identificação preliminar de moléculas que pode chegar a até 70% de precisão (Dührkop *et al.*, 2019; Ludwig *et al.*, 2020). A partir dos dados estruturais, a ferramenta CANOPUS sugere a(s) possível(is) classe(s) química dessas estruturas (Ludwig *et al.*, 2020).

Como mencionado anteriormente, a integração do conjunto de dados metabolômicos com resultados de bioensaios de uma amostra ajudam a priorizar a investigação de um composto em meio a uma amostra complexa acelerando a descoberta de novas moléculas (Lee *et al.*, 2022). Neste trabalho, as plataformas empregadas para integrar dados metabolômicos baseados em MS e resultados de ensaios de bioatividade foram o NP Analyst e o DAFdiscovery.

O NP Analyst (<https://www.npanalyst.org/>) é uma plataforma aberta e *online* de integração de dados para avaliar as atividades biológicas de misturas complexas (Lee *et al.*, 2022). Essa ferramenta engloba três funções ou etapas principais: (i) uma etapa, opcional, para processar os dados de espectrometria de massa e criar uma lista de *features* de MS, (ii) determinação de pontuação desses *features* com base em perfis de bioatividade e (iii) geração de arquivos de saída para visualização.

Os resultados do NP Analyst são exibidos como pontuações de atividade (*Activity Score*) e pontuações de cluster (*Cluster Score*) para cada *feature*. O *Activity Score* é uma medida da "força da bioatividade" para uma determinada *feature*. Por exemplo, se uma *feature* estiver presente em três amostras (p. ex frações) diferentes, a pontuação da atividade é calculada a partir da média dos quadrados dos valores atribuídos para cada uma dessas amostras no bioensaio. Já o *Cluster Score* é uma medida da consistência da bioatividade entre todas as amostras que contêm uma determinada *feature*. É determinado pela média dos valores de bioatividade de todas as amostras que contêm essa determinada

feature (Lee *et al.*, 2022). Ambos os valores variam de -1 a +1 sendo que quanto mais alto o valor, maior a relação entre a *feature* presente na amostra e a bioatividade observada.

O DAFdiscovery (*Data Fusionbased Discovery*) é um aplicativo, *notebook-based*, desenvolvido para combinar dados de MS, RMN e bioatividade, ou qualquer combinação de dois deles, permitindo a fusão de dados e a detecção de compostos potencialmente associados à bioatividade por meio de cálculos de correlação (STOCSY/SHY). O DAFdiscovery permite aos usuários fundir dados de diferentes fontes (RMN, MS e/ou bioatividade) para aplicar uma função STOCSY/SHY para produzir gráficos espectrais de RMN e/ou um resultado de correlação para as *features* de MS detectados. Seu fluxo de trabalho é dividido em 5 opções: Opção 1 - fusão de dados de RMN, MS e Bioensaio; Opção 2 - fusão de dados de RMN e MS; Opção 3 - fusão de dados de RMN e Bioensaio; Opção 4 - fusão de dados de MS e Bioensaio; e Opção 5 apenas dados de RMN (Borges *et al.*, 2022).

Para a fusão de dados de MS com resultados de bioatividade (Opção 4), a plataforma DAFdiscovery leva em consideração a intensidade de picos detectados em cada fração de uma mesma amostra. Uma maior intensidade em frações bioativas aumenta a correlação de bioatividade. Em um pequeno número de amostras, se um composto tiver alta concentração em uma determinada fração bioativa e baixa concentração em uma fração inativa, ele ainda terá uma alta correlação de bioatividade (Borges *et al.*, 2022). Os resultados de correlação entre dados de bioatividade e dados de MS são apresentados em um gráfico do tipo *scatter plot* com valores de correlação que variam entre -1 e +1. Novamente, quanto maior o valor, maior a correlação entre uma *feature* e a bioatividade observada.

6. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Na pesquisa de produtos naturais, a triagem de extratos e frações utilizando bioensaios é uma estratégia eficiente para a investigação de substâncias bioativas.

Geralmente, o bioensaio pode servir a três propósitos principais: (i) detectar (e possivelmente quantificar) a presença de compostos bioativos em extratos complexos; (ii) guiar os procedimentos de fracionamento químico para o isolamento de substâncias bioativas e (iii) dar uma caracterização biológica preliminar de um composto específico (Claeson, Bohlin, 1997).

A seleção dos bioensaios a serem realizados depende do objetivo de cada pesquisa. Geralmente, a descoberta de fármacos a partir de produtos naturais tem como estratégia uma combinação de diferentes bioensaios. Comumente, o fluxo de trabalho com bioensaios inclui uma triagem inicial de grandes números de amostras com ensaios que fornecem respostas rápidas, a custos relativamente baixos. A partir daí, ensaios secundários são utilizados para investigar de maneira mais aprofundada as amostras que se mostraram ativas na triagem inicial (Claeson, Bohlin, 1997).

As atividades biológicas associadas a produtos naturais cianobacterianos são várias e incluem atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antiviral, citotóxica e antitumoral (Kehr, Picchi, Dittmann, 2011). Assim, diferentes bioensaios são úteis para avaliar o potencial das cianobactérias em produzir compostos bioativos, ajudando a priorizar aqueles que merecem ser isolados e identificados (Regueiras *et al.*, 2018). Os ensaios biológicos propostos neste trabalho foram os testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia salina* e o ensaio de viabilidade celular a partir da redução do MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) de células de linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT).

6.1 Teste de toxicidade aguda com *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo sem carapaça (ordem Anostraca) que vive em lagos de água salgada ao redor do mundo, e tem caráter eurialino. Esses organismos são um elo trófico entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores (Pimentel *et al.*, 2011).

A *A. salina* é usada como alimento vivo para peixes e seus ovos são facilmente encontrados em lojas de aquarismo. Os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos e, se desidratados e bem acondicionados, podem ser conservados por longos períodos (Milani, Ziolli, 2007). Quando são reidratados em condições ambientais adequadas, esses ovos eclodem em aproximadamente 24 horas.

O fácil acesso e baixo custo desses organismos somados a simplicidade do teste - que é rápido, requer pequena quantidade de amostra (2-20 mg), não requer métodos assépticos e nem equipamentos especiais - favorece sua utilização rotineira em laboratórios para testes preliminares de toxicidade (Espinoza, 2015).

6.2 Ensaio de viabilidade celular a partir da redução do MTS

Os ensaios de viabilidade celular medem a saúde e a função das células em resposta a estímulos externos, agentes químicos ou tratamentos terapêuticos. Na triagem de compostos, esses ensaios ajudam a determinar se a(s) molécula(s) testada(s) afetam a proliferação celular ou demonstram efeitos citotóxicos diretos que podem resultar na morte celular (Riss *et al.*, 2004).

Os ensaios de viabilidade celular podem se basear em diferentes funções celulares como atividade enzimática, permeabilidade da membrana celular, produção de adenosina trifosfato (ATP), entre outros (Kamiloglu *et al.*, 2020). Neste trabalho, a citotoxicidade de extratos e frações de cianobactérias foi analisada a partir dos ensaios de redução do MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-

sulfofenil)-2H-tetrazólio).

O ensaio MTS baseia-se na redução desse composto pela enzima desidrogenase mitocondrial formando cristais de formazan (Riss et al., 2004). O ensaio MTS é um teste colorimétrico, que permite a quantificação indireta de células metabolicamente viáveis baseado na conversão enzimática do sal de MTS (uma solução incolor) em formazan (coloração azul ou roxo) (de Mesquita *et al.*, 2009).

Basicamente, as células metabolicamente ativas irão converter o MTS, enquanto as células mortas não serão capazes de realizar essa conversão. A coloração azul ou roxa é, portanto, um quantificador da viabilidade das células (Mosmann, 1983).

Capítulo 2. Cianobactérias - “the dark side”

1. CIANOTOXINAS

As cianotoxinas são moléculas que não estão envolvidas nos processos de crescimento, desenvolvimento ou reprodução das cianobactérias e por isso, são classificadas como metabólitos secundários (Carmichael, 1992). Os metabólitos secundários são compostos comumente relacionados à adaptação e à interação do organismo ao ecossistema em que vive (Yunes, 2019).

Os metabólitos secundários de cianobactérias incluem uma variedade de compostos com uma ampla diversidade de estruturas (Janssen, 2019) que se reflete em uma vasta gama de atividades. Muitos desses compostos apresentam toxicidade animal e vegetal (Dittmann, Wiegand, 2006).

Os primeiros relatos documentados de intoxicação por cianotoxinas datam do século XIX (Francis, 1878; Yunes, 2019) e, ao longo dos anos, muitos outros casos de intoxicação humana e animal associados à exposição às cianotoxinas foram reportados (Chorus *et al.*, 2000; Hilborn *et al.*, 2014; Buratti *et al.*, 2017). Por esse motivo, esses compostos foram e são extensivamente estudados, especialmente as classes das microcistinas, saxitoxinas e cilindropermopsinas. Nas últimas três décadas, outras classes de peptídeos cianobacterianos bioativos foram descobertos, como as aeruginosinas (Murakami *et al.*, 1994), microgininas (Okino *et al.*, 1993), cianopeptolinas (Martin *et al.*, 1993), microviridinas (Ishitsuka *et al.*, 1990) e anabaenopeptinas (Harada *et al.*, 1995), e entre eles há compostos com potencial para causarem efeitos adversos à saúde humana e animal (Mazur-Marzec *et al.*, 2018).

Quanto à sua estrutura química, as cianotoxinas podem ser divididas em três grupos: (i) peptídeos cíclicos, (ii) alcalóides e (iii) lipopolissacarídeos. Já quanto ao seu mecanismo de ação farmacológico são classificadas em: (i) hepatotóxicas, representadas por microcistinas e nodularinas; (ii) neurotóxicas, que são anatoxina-a, saxitoxinas e guanitoxina e (iii) citotóxica, representadas pela cilindropermopsina. Existem ainda outras toxinas com

ações distintas, porém seus efeitos não estão totalmente elucidados (BORTOLI; PINTO, 2015).

Embora os eventos de intoxicação de animais por cianotoxinas seja responsáveis pela maioria dos casos relatados, a exposição humana a essas toxinas também tem diversos casos documentados (Metcalf *et al.*, 2021). A exposição às cianotoxinas em humanos pode ocorrer por diferentes vias, incluindo: (i) dérmica, (ii) respiratória (inalação de partículas em aerossol durante banhos ou práticas esportivas), (iii) intravenosa (tratamento de diálise) e (iv) oral. No entanto, a exposição e os sintomas dérmicos causados por cianobactérias de água doce são tipicamente leves e autolimitados, necessitando de alguma educação e orientação pública, mas não necessariamente regulamentação. Quanto à exposição por inalação, ainda são necessários mais estudos que confirmem a relevância desta via de exposição (Metcalf *et al.*, 2021). Alguns autores argumentam que, como a aspiração geralmente também envolve a deglutição, a absorção estaria acontecendo por via oral (Ibelings *et al.*, 2014).

Consequentemente, as diretrizes tendem a concentrar-se na exposição oral, ou seja, ingestão de toxinas através da ingestão da água potável, ou consumo de animais aquáticos que ingeriram cianobactérias e/ou cianotoxinas e as acumularam (Magalhaes, Soares, Azevedo, 2001; Ibelings, Chorus, 2007; Zamyadi *et al.*, 2012). A ingestão de água contaminada por cianotoxinas geralmente se dá de forma acidental durante a recreação e práticas esportivas. Há de ressaltar também, que as operações unitárias comumente empregadas nas estações de tratamento de água (decantação, floculação/flotação, filtração e cloração) não são capazes de remover essas moléculas.

Os sintomas da intoxicação por cianotoxinas vão depender da via de contaminação, da dose ingerida, do estado geral de saúde do indivíduo exposto e do tipo de toxina a que foi exposto (Bortoli, Pinto, 2015). Os diversos exemplos de intoxicação humana

relacionados a esses compostos incluem: surtos de gastroenterite (Lippy, Erb, 1976; Teixeira *et al.*, 1993), hepatomegalia por (suposta) exposição a cilindrospermopsina (Griffiths, Saker, 2003) e sintomas semelhantes a pneumonia em cadetes do exército após exposição pulmonar/oral a uma floração de *Microcystis* durante exercícios aquáticos (Turner *et al.*, 1990).

O caso mais emblemático de intoxicação humana por cianotoxinas ficou conhecido como “Síndrome de Caruaru” quando, em 1996, no estado de Pernambuco, Brasil, 110 pacientes de uma clínica de hemodiálise apresentaram sintomas de intoxicação por hepatotoxinas como, náusea, vômito, distúrbios de visão, dores de cabeça, confusão mental, fraqueza muscular e sangramento nasal e do trato gastrointestinal (Bortoli, Pinto, 2015). Desses pacientes, 100 desenvolveram insuficiência hepática aguda e 76 vieram a óbito.

A apuração do caso analisou as resinas do sistema de tratamento de água da clínica e no soro e tecido hepático dos pacientes expostos. Durante as análises foram identificados dois grupos de cianotoxinas: microcistinas, em todas as amostras e cilindrospermopsina, nas resinas. A comparação dos sintomas e patologia das vítimas com estudos em animais, utilizando essas duas cianotoxinas, levaram à conclusão de que o principal fator contribuinte para a morte dos pacientes em diálise foi exposição intravenosa às diferentes variantes de microcistinas, especificamente microcistina-YR e microcistina-LR (Azevedo *et al.*, 2002).

Outro caso envolvendo uma clínica de hemodiálise aconteceu em novembro de 2001, no Rio de Janeiro. Florações de cianobactérias dominadas por *Microcystis* e *Dolichospermum* (anteriormente denominada *Anabaena*) foram detectadas no reservatório do Funil e no Rio Guandu, que fornecem água potável para a cidade. A concentração de microcistina-LR medida foi de 0,4 µg/L. Um alerta foi encaminhado para o ambulatório de hemodiálise do hospital da Universidade Federal do Rio de Janeiro que detectou nas resinas

e na coluna de carvão ativado do ambulatório uma concentração de 0,32 µg/L de microcistina-LR. Acredita-se que um total de 44 pacientes em hemodiálise atendidos neste centro foram expostos à cianotoxina. A análise inicial de ELISA confirmou a presença de concentrações séricas de microcistina-LR $\geq 0,16$ µg/L em 90% das amostras de soro coletadas desses pacientes. Entre os 12 pacientes selecionados para monitoramento contínuo no período de 2 meses que se seguiram à exposição, as concentrações séricas de microcistina variaram de 0,16 a 0,96 µg/L (Soares *et al.*, 2006). Embora nenhuma outra consequência tenha sido descrita pelos autores, os resultados indicaram que esses pacientes em diálise renal foram expostos à microcistina, assim como toda a cidade, durante o período de floração de cianobactérias nos reservatórios.

Assim como na exposição humana, os efeitos deletérios da exposição de animais à cianotoxinas vão depender de diversos fatores. Há relatos de intoxicação e morte de animais silvestres (girafas, lontras, flamingos e peixes) e domésticos (cães) em todo o mundo (Wood, 2016), e diversos trabalhos comprovam a bioacumulação em uma variedade de organismos aquáticos como zooplâncton (Karjalainen *et al.*, 2008), moluscos (Casali *et al.*, no date), crustáceos, peixes (Magalhaes, Soares, Azevedo, 2001; Panosso *et al.*, 2007; Deblois *et al.*, 2008; Drobac *et al.*, 2016) e vertebrados aquáticos (tartarugas, patos e aves) (Magalhaes; Soares; Azevedo, 2001; Xie *et al.*, 2006; Deblois *et al.*, 2008). O consumo de organismos aquáticos que acumulam cianotoxinas em órgãos e tecidos representa um risco adicional à saúde humana.

A seguir, serão discutidas as cianotoxinas e sua classificação.

1.1 Hepatotoxinas

As cianotoxinas classificadas como hepatotoxinas incluem os peptídeos cíclicos microcistina e nodularina, que são as cianotoxinas mais comumente encontradas em florações (Chorus, Bartram, 1999; Bortoli, Pinto, 2015).

Microcistinas

As microcistinas (MC) são a classe de cianotoxinas mais bem estudada no mundo (Preece *et al.*, 2017) com mais de 300 variantes descritas na literatura (Chaffin *et al.*, 2023; Jones *et al.*, 2021). Foram identificadas pela primeira vez por Bishop e colaboradores, em 1959, a partir de uma cepa de *Microcystis aeruginosa*, daí a origem do nome (Bishop, Anet, Gorham, 1959).

As MC são classificadas quimicamente como heptapeptídeos cíclicos e sua estrutura geral e mais comumente encontrada na natureza é a ciclo (D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷). Essa estrutura compreende cinco aminoácidos praticamente invariáveis, D-alanina (1), D-MeAsp (ácido D-metilaspártico) (3), Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6dienóico (5), ácido D-glutâmico (6) e Mdha (N-metildehidroalanina) (7), além de dois L-aminoácidos variáveis, representados por R₁ e R₂ (2 e 4). Nos aminoácidos das posições (3) e (7) podem ser encontrados diferentes radicais (Jones *et al.*, 2021). A unidade Adda é uma porção típica de moléculas de microcistinas e considerada crítica para a toxicidade das mesmas (Greer *et al.*, 2017).

As massas moleculares das MC variam entre 800 e 2117 Da (Jones *et al.*, 2021). A principal diferença entre as variantes da microcistina é a toxicidade. Variações nas posições dos aminoácidos, desmetilações e isomeria atribuem diferente toxicidade a essas moléculas (Bortoli, Pinto, 2015). A Figura **2.1** mostra a estrutura geral das MC.

Figura 2.1: Estrutura molecular geral das microcistinas. R₁ e R₂ representam os aminoácidos variáveis.

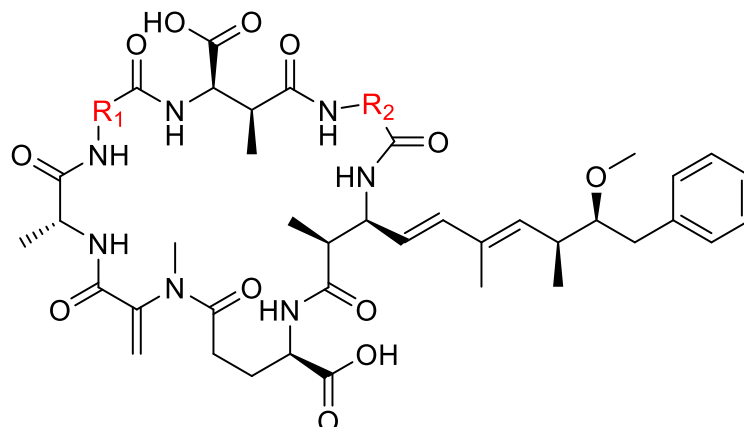


Figura feita no software ChemDraw®

A maioria das espécies de cianobactérias produtoras de MC são planctônicas (Buratti *et al.*, 2017). Os gêneros de cianobactérias produtoras de MC incluem *Microcystis*, *Dolichospermum* ou *Sphaerospermopsis* (anteriormente *Anabaena*), *Planktothrix* (anteriormente *Oscillatoria*), *Nostoc*, *Rhaphidiopsis* (anteriormente *Cylindrospermopsis*), *Anabaenopsis*, *Aphanocapsa* e *Hapalosiphon* (Beasley, 2020).

Nodularinas

As nodularinas (NOD) são cianotoxinas com estrutura muito semelhante às microcistinas. Elas são pentapeptídeos cíclicos e sua estrutura química é idêntica nos aminoácidos 1–4, ciclo-(D-MeAsp¹-L-arginina²-Adda³-D-glutamato⁴-Mdhb⁵). Mdhb é a porção ácido 2-metilamino-2-butírico (Rinehart *et al.*, 1988). Atualmente, são conhecidas mais de 16 variantes estruturais de NOD e suas massas moleculares variam de 700 - 1130 Da (Jones *et al.*, 2021). A Figura 2.2 mostra a estrutura geral desses compostos em que R representa os aminoácidos variáveis.

Figura 2.2: Estrutura molecular geral das nodularinas. A letra R representa os aminoácidos variáveis.

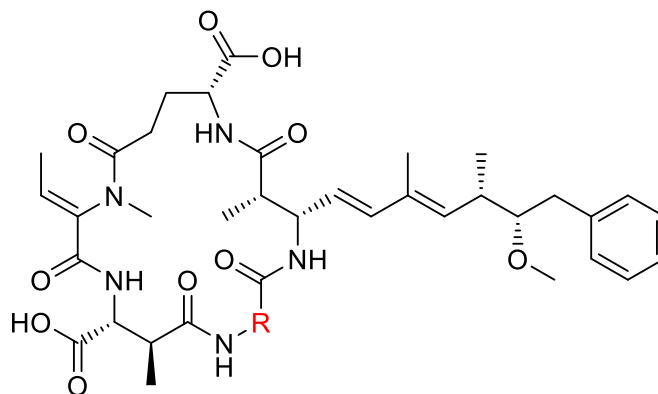


Figura feita no software ChemDraw®

O nome nodularina tem origem na cianobactéria *Nodularia spumigena* (Rinehart *et al.*, 1988). A produção dessas moléculas em espécies planctônicas é limitada a cepas dos gêneros *Nodularia* e *Aliinostoc* (Chorus, Bartram, 1999).

Todas as MC e NOD são hidrofílicas devido principalmente à presença de ácidos carboxílicos livres nas estruturas (Msagati, Siame, Shushu, 2006; Catherine *et al.*, 2017). Esses compostos exibem alta estabilidade química, mantendo-se estáveis no meio ambiente por dias e até mesmo semanas, mesmo quando expostos à radiação solar e temperaturas elevadas (Harada *et al.*, 1996).

O principal mecanismo de ação das MC e NOD é pela inibição das proteínas fosfatases (PP) 1 e 2A (PP1 e PP2A) (Chorus, Bartram, 1999; Van Apeldoorn *et al.*, 2007), as quais são essenciais na manutenção da homeostase celular. A inibição dessas enzimas é resultado da interação da porção Adda das toxinas com a parte apolar do triptofano das PP (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Como resultado da inibição das fosfatases, há o aumento da fosforilação das proteínas celulares, o que leva a mudanças na morfologia celular, principalmente dos hepatócitos. Os danos às células hepáticas incluem desorganização de citoesqueleto, peroxidação lipídica, perda da integridade da membrana, fragmentação de DNA, apoptose, dilaceração celular, necrose e sangramento intra-hepático (Chorus, Bartram,

1999; Dittmann, Wiegand, 2006). A hiperfosforilação também é apontada como responsável pela formação de tumores devido a formação de nódulos nos hepatócitos, associados às mudanças morfológicas e inativação dos produtos dos genes supressores de tumor (retinoblastoma e P53) (Dittmann, Wiegand, 2006; Campos, Vasconcelos, 2010).

1.2 Neurotoxinas

As neurotoxinas cianobacterianas são compostos que têm os efeitos neurológicos como o principal modo de ação conhecido (Metcalf *et al.*, 2021). Dentre as principais cianotoxinas classificadas como neurotóxicas estão a anatoxina-a e seus análogos, a guanitoxina e a saxitoxina e seus análogos.

Anatoxina-a

Esta classe de toxinas alcalóides de baixo peso molecular possui 12 variantes estruturais conhecidas, com massas moleculares variando de 165 - 209 Da (Jones *et al.*, 2021).

A anatoxina-a foi primeiramente isolada e caracterizada a partir de uma linhagem de *Dolichospermum flosaquae* (anteriormente *Anabaena flosaquae*), daí a origem de seu nome (Devlin *et al.*, 1977). A coexistência de diferentes variantes da anatoxina-a nas mesmas cepas já foi relatada (Hodoki *et al.*, 2013). Sua estrutura molecular é 2-acetil-9-azabicyclo [4.2.1] 2-noneno (Chorus, Bartram, 1999; Bortoli, Pinto, 2015). E seu homólogo, homoanatoxina-a, tem estrutura 2-(propano-1-oxo-1-il) 9-aza-bicyclo [4.2.1] 2-noneno (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). A estrutura molecular da anatoxina-a e do análogo, homoanatoxina-a, são ilustradas na Figura 2.3.

Figura 2.3: Estrutura molecular da anatoxina-a e da homoanatoxina-a.

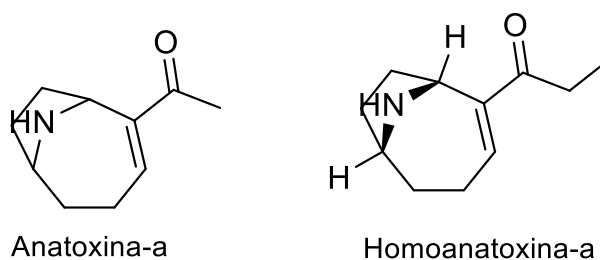


Figura feita no software ChemDraw®

A anatoxina-a já foi detectada em corpos de água doce da América do Norte, Europa, Austrália, Oceania e Ásia, e é produzida por vários gêneros de cianobactérias, como *Dolichospermum* (anteriormente *Anabaena*), *Cuspidothrix* (anteriormente *Aphanizomenon*), *Phormidium*, *Cylindrospermum* e *Rhaphidiopsis* (anteriormente *Cylindrospermopsis*) (Hodoki *et al.*, 2013; Wood, 2016).

Esses compostos são de ação rápida, e funcionam como mimetizadores da acetilcolina se ligando aos receptores nicotínicos deste neurotransmissor e causando estimulação persistente, já que a toxina não é degradada pela acetilcolinesterase (Carmichael, Biggs, Peterson, 1979). Esta ligação aos receptores nicotínicos induz a abertura dos canais receptores de íons positivos resultando na despolarização da membrana. A exposição prolongada à anatoxina-a causa a dessensibilização dos receptores nicotínicos, o que por sua vez resulta no bloqueio da transmissão elétrica neuromuscular (Aráoz, Molgó, Tandreau de Marsac, 2010). Como a transmissão de estímulos é essencial para a atividade da musculatura esquelética, a exposição a essa classe de toxinas pode causar paralisia muscular, levando à morte por asfixia. Quando ingerida, a toxina é rapidamente absorvida e o quadro de toxicidade aguda se caracteriza por rápida paralisia dos músculos esqueléticos e respiratórios, resultando em tremores, alterações no andar, convulsões e morte por falência respiratória (Rogers *et al.*, 2005).

Guanitoxina

A guanitoxina é um alcalóide com grupos guanidina e fosfato, originalmente denominado anatoxina-a(S) (Mahmood, Carmichael, 1987). Foi caracterizada pela primeira vez a partir da cepa *Dolichospermum flosaquae* (anteriormente *Anabaena flosaquae*). Recebeu o nome anatoxina-a(S) porque causava sintomas semelhantes à anatoxina-a, com adição de hipersalivação (S para *salivation*). Foi recentemente renomeada como guanitoxina, uma vez que não possui estrutura ou mecanismo de ação semelhantes aos da anatoxina-a (Fiore *et al.*, 2020).

A guanitoxina tem uma massa molecular de 252 Da (Dörr *et al.* 2010). Este organofosfato natural consiste em uma porção cíclica N-hidroxiguanina metil fosfato éster (Matsunaga *et al.*, 1989) (Figura 2.4). Nenhuma variante estrutural da guanitoxina é conhecida até hoje. Essa toxina já foi detectada em corpos de água doce no Canadá, Dinamarca, Portugal, EUA, Escócia e Brasil e é produzida por gêneros de cianobactérias planctônicas de água doce, como *Dolichospermum* e *Sphaerospermopsis* (Carmichael, Gorham, 1978; Molica *et al.*, 2005).

Figura 2.4: Estrutura molecular da guanitoxina.

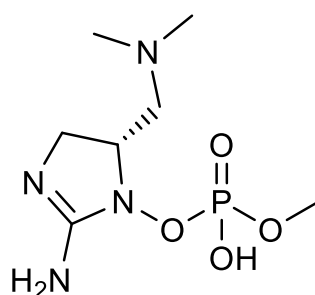


Figura feita no software ChemDraw®

Essa toxina é um inibidor colinesterásico irreversível, a inativação da enzima colinesterase pela guanitoxina pode resultar em paralisia e asfixia (Fiore *et al.*, 2020; Metcalf *et al.*, 2021).

A estabilidade dessa molécula em ambientes naturais ainda carece de mais estudos. A guanitoxina se decompõe rapidamente em condições alcalinas; no entanto, é relativamente estável em condições neutras ou ácidas (pH 1,5 - 5) (Matsunaga *et al.*, 1989; Fernandes, Dörr, Pinto, 2021).

Saxitoxinas

As saxitoxinas (SAX) são alcalóides naturais também conhecidos pela sigla PSP de *Paralytic Shellfish Poisons* (Thottumkara, Parsons, Du Bois, 2014). A primeira SAX foi caracterizada em 1957 a partir do molusco manteiga (*Saxidomus giganteus*), daí a origem do nome (Schantz *et al.*, 1957). A primeira evidência de SAX em cepas de cianobactérias foi relatada em 1959 em uma floração de *Aphanizomenon flosaquae* (Gentile, Maloney, 1969). Atualmente, sabe-se que essas neurotoxinas são produzidas por cianobactérias de água doce e dinoflagelados marinhos (Kellmann, Michali, Neilan, 2008; Stüken *et al.*, 2011).

As SAX consistem em alcalóides perihidropurina tricíclicos que podem ser substituídos em várias posições (Jones *et al.*, 2021) (Figura 2.5). Até o momento são conhecidas 57 variantes estruturais desta neurotoxina com massas moleculares que variam de 224 a 491 Da (Bortoli, Pinto, 2015)

Figura 2.5: Estrutura molecular geral das saxitoxinas. R₁₋₄ representam os aminoácidos variáveis.

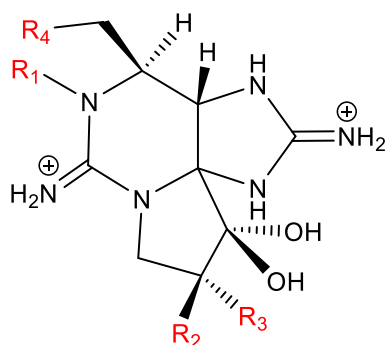


Figura feita no software ChemDraw®

As SAX são comumente divididas em: não sulfatadas (saxitoxinas, saxitoxinas dc e neosaxitoxinas); monossulfatadas (goniautoxinas); dissulfatadas (toxinas C) e variantes sem carbamoil (toxinas dc) (Pearson *et al.*, 2016). As SAX já foram detectados em todos os continentes e são produzidas por cianobactérias planctônicas de água doce como *Dolichospermum* (anteriormente *Anabaena*), *Raphidiopsis* (anteriormente *Cylindrospermopsis*), *Aphanizomenon*, *Planktothricoides* (anteriormente *Planktothrix*) e *Oxynema* (Carmichael, Gorham, 1978; Chorus, Bartram, 1999; Molica *et al.*, 2005; Chorus, Welker, 2021).

As saxitoxinas são bloqueadores seletivos dos canais de sódio, potássio e cálcio dependentes de voltagem (Pearson *et al.*, 2010). Em concentrações suficientemente altas, podem levar à paralisia e morte (Wiese *et al.*, 2010).

Essas cianotoxinas são as que, tradicionalmente, são consideradas neurotóxicas. Contudo, novos estudos têm demonstrado que outras cianotoxinas, como microcistinas, cilindrospermopsinas e lipopolissacarídeos também podem ter efeitos neurológicos ou pelo menos serem capazes de penetrar no sistema nervoso central (Metcalf *et al.*, 2021).

1.3 Citotoxinas

Cilindrospermopsinas

Cilindrospermopsinas são alcalóides compostos por uma guanina tricíclica combinada com um anel hidroximetiluracil (Figura 2.6). Até o momento, cinco variantes estruturais são conhecidas, com massas moleculares variando entre 319 e 415 Da (Jones *et al.*, 2021).

Figura 2.6: Estrutura molecular geral das cilindrospermopsinas. R₁₋₃ são as posições dos radicais variantes.

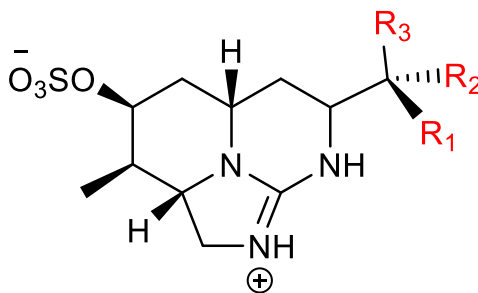


Figura feita no software ChemDraw®

A primeira cilindrospermopsina foi caracterizada a partir da cepa *Raphidiopsis raciborskii* (anteriormente conhecida como *Cylindrospermopsis raciborskii*) (Ohtani, Moore, Runnegar, 1992). Essa toxina é produzida por diversos gêneros de cianobactérias como *Raphidiopsis*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* e *Lyngbya* (Pearson *et al.*, 2010), e foram majoritariamente encontradas na Europa e Oceania (Stirling, Quilliam, 2001; Spooft *et al.*, 2006; Sacilotto Detoni *et al.*, 2016).

A citotoxicidade das cilindrospermopsinas é causada pela inibição da síntese proteica e pela toxicidade de um metabólito formado após sua biotransformação no sistema do citocromo P450 (Falconer, 2004). A exposição de mamíferos à cilindrospermopsina pode causar, além de citotoxicidade, hepatotoxicidade e genotoxicidade (Jacinavicius *et al.*, 2016).

Cianotoxinas de diversas classes são frequentemente encontradas em florações de cianobactérias ao redor do mundo. No entanto, além dessas cianotoxinas já bem descritas, a biomassa de cianobactérias pode conter outros cianopeptídeos ainda pouco estudados ou até mesmo não identificados, que podem ter efeitos nocivos à saúde humana e animal. Melhorar a compreensão da produção e toxicidade desses outros cianopeptídeos é essencial para planejar ações de controle ambiental e orientar a avaliação do risco de exposição às cianotoxinas (Fastner, Erhard, Von Döhren, 2001; Welker *et al.*, 2006).

2. MONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DO RISCO ASSOCIADO À PRESENÇA DE CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS EM RESERVATÓRIOS

Os dados de monitoramento e controle da qualidade da água para consumo humano sugerem que as cianotoxinas estão entre os contaminantes mais comumente encontrados em reservatórios de água, muitas vezes ocorrendo em concentrações potencialmente perigosas (Ibelings *et al.*, 2014).

Em 1998, a OMS publicou um guia provisório para o monitoramento de cianotoxinas em água potável, estabelecendo uma concentração máxima de segurança de 1 µg/L para microcistina-LR. Após esta publicação, diversos países adotaram esse parâmetro em suas abordagens de monitoramento de cianotoxinas em reservatórios.

No entanto, simplificar o monitoramento das cianotoxinas a apenas algumas classes e/ou à concentração total equivalente pode subestimar os riscos associados a outros cianopeptídeos dissolvidos na água (Janssen, 2019). Além disso, florações de cianobactérias e seus conteúdos de cianotoxinas são fenômenos altamente variáveis e dependentes das condições ambientais (Ibelings *et al.*, 2014). A produção e a concentração de toxinas dependem da variação na dominância entre as cepas tóxicas e não tóxicas de cianobactérias presentes na biomassa (Molica, Azevedo, 2009). A formação do chamado "tapete" de cianobactérias também desempenha um papel importante na concentração de determinadas cianotoxinas. Algumas cianobactérias são capazes de produzir vesículas de gás que as permitem flutuar para a superfície dos reservatórios. Como resultado, as cianobactérias se acumulam na superfície da água, formando uma camada densa, semelhante a um "tapete" (Starr *et al.*, 1981; Metcalf *et al.*, 2021). Esse acúmulo de biomassa em uma região específica resulta em uma maior concentração de cianotoxinas nessa área. Além disso, o vento pode levar esse "tapete" de cianobactérias para as margens dos reservatórios, aumentando significativamente o risco de humanos ou animais entrarem em contato com altas

concentrações de cianobactérias e as toxinas que elas contêm ou liberam quando as células se rompem (Ibelings *et al.*, 2003).

Portanto, é essencial compreender as condições específicas de cada localidade e seu impacto na ocorrência das florações, a fim de avaliar e gerenciar adequadamente o conteúdo e as concentrações prováveis de cianotoxinas.

Observar a quantidade de cianobactérias pode ajudar a estabelecer níveis de alerta e avaliar o risco, mesmo antes de analisar as toxinas (Van Der Merwe *et al.*, 2012; Neilan *et al.*, 2013). De fato, diversos países adotaram o monitoramento do número total de células de cianobactérias como alternativa ao monitoramento de toxinas individuais (Ibelings *et al.*, 2014). Esses países implementaram sistemas de alerta com dois ou três níveis de gravidade e as ações apropriadas para cada nível. Parâmetros comuns utilizados como indicadores de biomassa cianobacteriana incluem o número de células fitoplanctônicas e as concentrações de pigmentos, como a clorofila-*a*. Quando qualquer nível de alerta de biomassa cianobacteriana é violado, são acionadas respostas predefinidas ou planos de intervenção para reduzir a exposição humana direta às crescentes cargas de cianotoxinas (Ibelings *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2020).

Em 2015, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) lançou um documento de apoio intitulado "Recomendações para sistemas públicos de água para o gerenciamento de cianotoxinas na água potável", em tradução livre (EPA, 2015). Esse documento serve como um guia para estados e serviços públicos interessados em gerenciar os riscos associados à presença de cianotoxinas na água potável, e reconhece que a ação mais apropriada pode variar caso a caso.

Na maioria dos casos, as diretrizes estabelecem limites para as concentrações de cianobactérias e cianotoxinas que não devem ser excedidos e estipulam ações imediatas a

serem tomadas caso essas concentrações sejam ultrapassadas, a fim de prevenir ou minimizar a exposição à cianobactérias nocivas e suas toxinas (Ibelings *et al.*, 2014).

Contudo, as regulamentações e diretrizes existentes ainda enfrentam grandes desafios devido à variedade de toxinas que podem ser produzidas por uma floração e à falta de dados toxicológicos suficientes para estabelecer limites de concentração para a maioria delas.

Concentrar-se apenas nas cianotoxinas já conhecidas para avaliação de risco e manejo de episódios de floração pode subestimar os impactos negativos no ecossistema. Nas últimas décadas, centenas de cianopeptídeos, como cianopeptolinas, anabaenopeptinas, aeruciclamidas, aeruginosinas e microgininas, foram identificados em biomassas de eventos de florações de cianobactérias (Welker, Von Döhren, 2006; Beversdorf *et al.*, 2017). No entanto, ainda faltam estudos sobre a ocorrência, distribuição e toxicidade de muitos desses metabólitos bioativos, especialmente em sistemas tropicais de água doce (Jones *et al.*, 2020).

No passado, as cianotoxinas eram frequentemente analisadas usando bioensaios com culturas de células, modelos animais ou sistemas baseados em anticorpos (Deblois, Giani, Bird, 2011). Mais recentemente, após o desenvolvimento de técnicas analíticas e bioinformáticas, a metabolômica tornou-se uma ferramenta importante para o estudo de metabólitos de cianobactérias (Jacinavicius *et al.*, 2021).

O crescente número de episódios de florações de cianobactérias em reservatórios, que também cresce em severidade e duração, exige rápida tomada de decisão por parte dos órgãos de saúde (Macário *et al.*, 2021). Compreender os efeitos dos diversos metabólitos secundários das cianobactérias e atribuir a sua atividade biológica em cenários de exposição ambiental torna-se cada dia mais necessário.

Neste contexto, uma das propostas deste trabalho foi utilizar ferramentas metabolômicas e quimiométricas para avaliar o perfil químico de um extrato complexo de cianobactérias obtido a partir de uma biomassa coletada em um reservatório eutrofizado no

Sudeste Brasileiro. Nosso objetivo foi identificar as principais classes de cianopeptídeos neste extrato e correlacionar sua presença com a toxicidade observada em ensaios com o microcrustáceo *A. salina*. Tudo isso sem a necessidade de isolar os compostos presentes na amostra, utilizando uma abordagem mais rápida e com menor consumo de reagentes para a avaliação de risco de uma biomassa ambiental. A seguir, são apresentados a metodologia, os resultados e a discussão dos achados de pesquisa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta da biomassa

A amostra foi coletada durante a estação seca (agosto de 2019) no Reservatório do Funil, um sistema eutrófico localizado no sudeste brasileiro (22°30'S e 44°45'W), na cidade do Rio de Janeiro, a uma altitude de 440 m, em uma área de clima tropical úmido (Cwa no sistema Köppen). Naquele momento, uma camada espessa se acumulou na superfície e perto da margem do reservatório. A biomassa foi concentrada com auxílio de uma rede de fitoplâncton (malha de 50 µm). Cinco litros de amostra foram coletados, armazenados em uma garrafa de plástico e mantidos refrigerados durante o transporte. As amostras foram mantidas a -20°C até o processamento. O pH e a temperatura da amostra foram medidos no momento da coleta.

3.2 Identificação do fitoplâncton

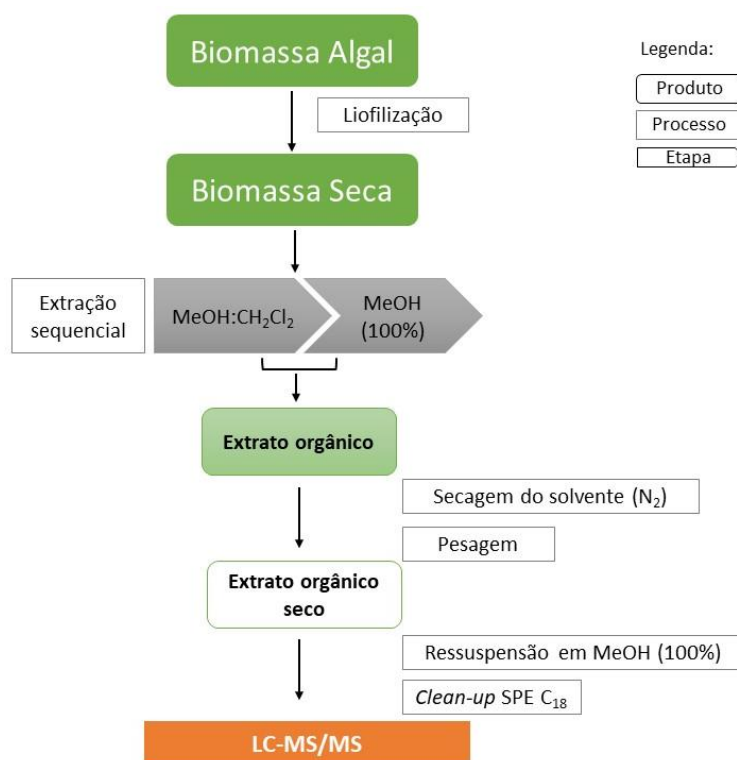
Para análise qualitativa (diversidade de espécies) da comunidade fitoplanctônica da biomassa, amostras foram coletadas a 0,5 metro de profundidade e armazenadas em frascos de vidro. Parte das amostras foi acondicionada fresca e parte fixada com solução de Lugol. As amostras foram analisadas em parceria com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcelo Manzi Marinho, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). Para tal, amostras

frescas foram observadas em um microscópio óptico (400x e 1000x). Os grandes grupos taxonômicos de cianobactérias foram determinados seguindo os critérios estabelecidos por Van den Hoek e colaboradores (1995) e Komárek & Anagnostidis (1989, 1999, 2003, 2005).

3.3 Extração e clean-up da amostra

A biomassa foi liofilizada e extraída de acordo com o método de extração sequencial relatado pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI - do inglês *National Cancer Institute*) para extração e triagem em larga escala de produtos naturais de plantas, microrganismos e organismos marinhos (McCloud, 2010). Resumidamente, uma mistura de diclorometano:metanol (DCM:MeOH) (1:1) foi adicionada à biomassa liofilizada (265 mg), a mistura foi sonicada em banho de ultrassom por 2 minutos e mantida em contato durante a noite. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e armazenado em um frasco de vidro. A biomassa restante foi extraída mais uma vez com MeOH (100%) durante oito horas. O novo sobrenadante foi coletado e adicionado ao anterior para formar o extrato orgânico bruto. Esse extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio. A Figura 2.7 mostra um fluxograma do processo de extração utilizado.

Figura 2.7: Fluxograma do pré-processamento (extração e *clean-up*) das amostras.



Fonte: A autora. Figura feita com PowerPoint®.

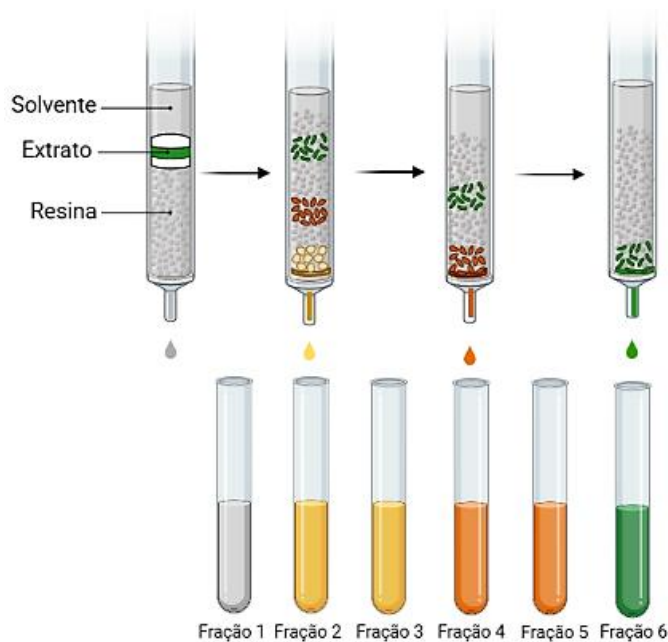
Antes de serem analisados por LC-MS/MS, os extratos orgânicos foram ressuspendidos em MeOH (100%) e passaram por um processo de *clean-up* empregando extração de fase sólida (SPE - do inglês *solid phase extraction*) com cartuchos C₁₈, 3 mL/500 mg (Chromabond®). Os cartuchos foram previamente lavados com acetato de etila (EtOAc) e equilibrados com MeOH (100%). Em seguida, os extratos foram adicionados e eluídos com MeOH (100%) duas vezes. O extrato resultante foi então seco sob fluxo de N₂ e ressuspenso com 1 mL de MeOH:H₂O (70:30) previamente às análises em LC-MS/MS.

3.4 Fracionamento

Uma alíquota dos extratos brutos foi fracionada usando uma coluna de cromatografia contendo resina Diaion® HP-20SS como fase sólida. Um gradiente (10 mL) de álcool isopropílico:H₂O (0:100, 20:80, 40:60, 70:30, 90:10 e 100:0) foi aplicado para obter as

frações F1, F2, F3, F4, F5 e F6, respectivamente. A Figura 2.8 ilustra o esquema de fracionamento das amostras.

Figura 2.8: Esquema de fracionamento do extrato da biomassa de cianobactérias.



Fonte: A autora. Figura feita com Biorrender®.

3.5 Análise do extrato bruto e suas frações por UHPLC-QToF-MS/MS

As análises de UHPLC-QToF-MS/MS foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta performance (Shimadzu® Prominence Liquid Chromatography) acoplado a um espectrômetro de massas *in tandem* de alta resolução (Micro ToF-QII; Bruker Daltonics®, MA, EUA) com ionização por electrospray (ESI) - (UHPLC-ESI-QToF-MS/MS). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna Luna Kinetex C18 (50 x 2,1 mm, diâmetro de partícula de 2,6 µm). As fases móveis foram compostas por ácido fórmico 0,2% v/v em água ultrapura (fase A) e ácido fórmico 0,2% v/v em acetonitrila (fase B). O gradiente empregado foi o seguinte: A:B 95:5 (0 min), A:B 0:100 (em 12 min), A:B 0:100 (1 min), A:B 95:5 (em 0,1 min), A:B 95:5 (até chegar aos 15 min). Uma vazão de 0,6 mL/min foi aplicada. As condições de ESI foram: potencial de capilar em 3,5 kV, gás de secagem (N₂) a 200°C com uma vazão de 9,0 mL/min e pressão

de nebulização de 40,0 psi. O espectrômetro de massa (QToF) operou no modo de varredura automática MS/MS, e os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo com duas faixas de massa, m/z 50-1500 e m/z 800-2000 (MS1), e no modo negativo com uma única faixa de massa, m/z 150-2000 (MS1).

3.6 Metabolômica baseada em LC-MS/MS

Os dados de LC-MS/MS foram convertidos para arquivos no formato .mzXML com o software DataAnalysis[®] (Bruker) e pré-filtrados no MSConvert[®]. Os dados foram inseridos na plataforma GNPS[®] (<https://gnps.ucsd.edu/>) para gerar a rede molecular usando a ferramenta *Classical Molecular Networking*. Os parâmetros de rede molecular do GNPS foram os seguintes: tolerância de massa de íon precursor, 0,02 Da; tolerância de massa de íon fragmento, 0,02 Da; cos., 0,65; número máximo de nodos vizinhos, 10; número mínimo de íons fragmento, 4; tamanho mínimo do cluster: 2; filtrar G6 como brancos antes da formação da rede, sim.

Dados de MS2 de padrões de compostos conhecidos também foram inseridos na análise e “semeados” na rede molecular, são eles: aeruginosina NAL2 m/z 587,3571 [M+H]⁺; guanitoxina m/z 253,1051 [M+H]⁺; cianopectolina 1020 m/z 1021,5368 [M+H]⁺; cianostatina B m/z 754,4426 [M+H]⁺; MC-RR m/z 519,7960 [M+2H]⁺; MC-RR-D-Asp3 m/z 512,7889 [M+2H]⁺; micosporina-lisina m/z 317,1368 [M+H]⁺; microginina KR787 m/z 788,4016 [M+H]⁺; namalídeo B m/z 576,3391 [M+H]⁺; namalídeo C m/z 562,3235 [M+H]⁺; nodularina-R m/z 825,4490 [M+H]⁺; DAdda3-nodularina-R m/z 811,4328 [M+H]⁺; porphyra 334 m/z 347,1431 [M+H]⁺; shinorina m/z 333,128 [M+H]⁺ e spumigina 638 m/z 639,3109 [M+H]⁺.

O software Cytoscape[®] foi usado para visualizar as redes moleculares. A anotação dos *features* na rede molecular foi feita por uma série procedimentos: (i) pesquisa automática

dos espectros nas bibliotecas do GNPS (limites fixos para pontuação de cosseno $> 0,7$ e pelo menos quatro íons fragmento correspondentes); (ii) comparação dos dados espectrais das amostras com os dados espectrais dos padrões de compostos semeados na rede e (iii) propagação de anotação pelo cluster. Ainda, as plataformas SIRIUS[®] e ChemCalc[®] foram utilizadas para propor possíveis fórmulas moleculares através da análise dos dados de MS, do padrão isotópico dos compostos e do cálculo do erro de massas (Δ) entre a massa molecular observada e a massa molecular teórica. A busca por compostos conhecidos foi realizada usando as bases de dados PubChem[®], ChempSpider[®], Metlin[®], NPAtlas[®], Dictionary of Natural Products[®], GNPS[®] e CyanoMetDB (JONES et al., 2020).

3.7. Ensaio de toxicidade aguda contra *Artemia salina*

Cistos de *Artemia salina* foram eclodidos por 24 horas em água do mar artificial, sob aeração e iluminação constantes, a uma temperatura média de 25°C. Os náuplios móveis foram transferidos, juntamente com a água do mar, para placas de 96 poços. Os ensaios biológicos foram realizados em triplicata, usando dicromato de potássio como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) 1% como controle negativo.

Um branco foi preparado, com solução de água do mar artificial, para garantir que a manipulação dos náuplios, independente da adição de substâncias químicas, não provocou a morte dos organismos. Amostras dos extratos foram preparadas em DMSO por diluição seriada (100 mg/mL, 50 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.1 mg/mL e 0.01 mg/mL).

Em cada poço da placa de 96 poços, foram adicionados 99 μL de água do mar artificial contendo 10~20 náuplios de *A. salina* e 1 μL da amostra ou solução controle. As concentrações finais das amostras (extratos) foram de 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 0.1 $\mu\text{g/mL}$. As frações foram testadas em concentração única de 100 $\mu\text{g/mL}$.

A concentração final do controle negativo foi de 1% e a do controle positivo, 200 µg/mL. As placas foram incubadas a 25°C na ausência de luz durante 20~23h.

A contagem dos náuplios mortos foi feita com a ajuda de um contador de colônias e a mortalidade foi calculada pela razão de náuplios mortos pelo total de náuplios no respectivo poço, segundo a Equação 1. Os valores de concentração letal média (LC₅₀) foram calculados por regressão não linear, função dose-resposta, usando o software Origin 2019®.

$$\text{Mortalidade (\%)} = (\text{Náuplios vivos} / \text{Total náuplios}) \times 100\% \quad \text{(Equação 1)}$$

3.8 Integração entre os dados de LC-MS/MS e os resultados do ensaio biológico

A fim de investigar a correlação entre as *features* presentes nas amostras e a bioatividade observada, foram utilizadas duas ferramentas quimiométricas. A primeira foi o NP Analyst, uma plataforma aberta e *on-line* de integração de dados para prever atividades biológicas de compostos a partir de misturas complexas (Lee *et al.*, 2022). A segunda foi o DAFdiscovery, um aplicativo *notebook-based* que permite aos usuários combinar dados de MS, RMN e bioatividade, ou qualquer combinação de dois deles, possibilitando a fusão de dados e a descoberta de compostos de interesse por meio de cálculos de correlação (Borges *et al.*, 2022).

Os dados de MS das frações gerados pela ferramenta *Classical Molecular Networking* do GNPS (mesmos parâmetros mencionados anteriormente) foram enviados para a plataforma NP Analyst como arquivo de rede no formato .graphml. Os resultados do NP Analyst foram exibidos como pontuação de atividade (*activity score*) e pontuação de agrupamento (*cluster score*).

Para a plataforma DAFdiscovery, os dados de MS foram filtrados usando o software MZMine. A seguir, esses dados e os resultados de bioatividade foram enviados para a

plataforma como arquivos no formato .csv, opção de fluxo de trabalho 4 (fusão de dados de MS e bioensaio). Os resultados são exibidos em valores de correlação de bioatividade.

3.9 Análises estatísticas

Todos os dados foram expressos como a média \pm DP (desvio padrão) onde $n \geq 3$ replicatas experimentais. As análises estatísticas foram realizadas usando Graphpad Prism[®] 6.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA) ou software Origin Pro[®] (Origin Lab, Northampton, MA, EUA). Foram realizados o teste-t de Student, ANOVA, regressão linear e não linear. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da biomassa

A análise microscópica revelou que as cianobactérias constituíam o componente dominante (99,7%) do fitoplâncton na biomassa coletada no Reservatório do Funil. Do total de cianobactérias 71,75% eram *Dolichospermum circinalis* (Rabenhorst) Wacklin, Hoffmann & Komárek, 23,43% eram *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, 3,27% eram *Dolichospermum spiroidis* (Klebhan) Wacklin, L.Hoffmann & Komárek, e 1,21% eram *Microcystis panniformis* Komárek et al.

Durante a coleta da amostra, o pH medido foi de 7,38 e a temperatura da água era de 21°C.

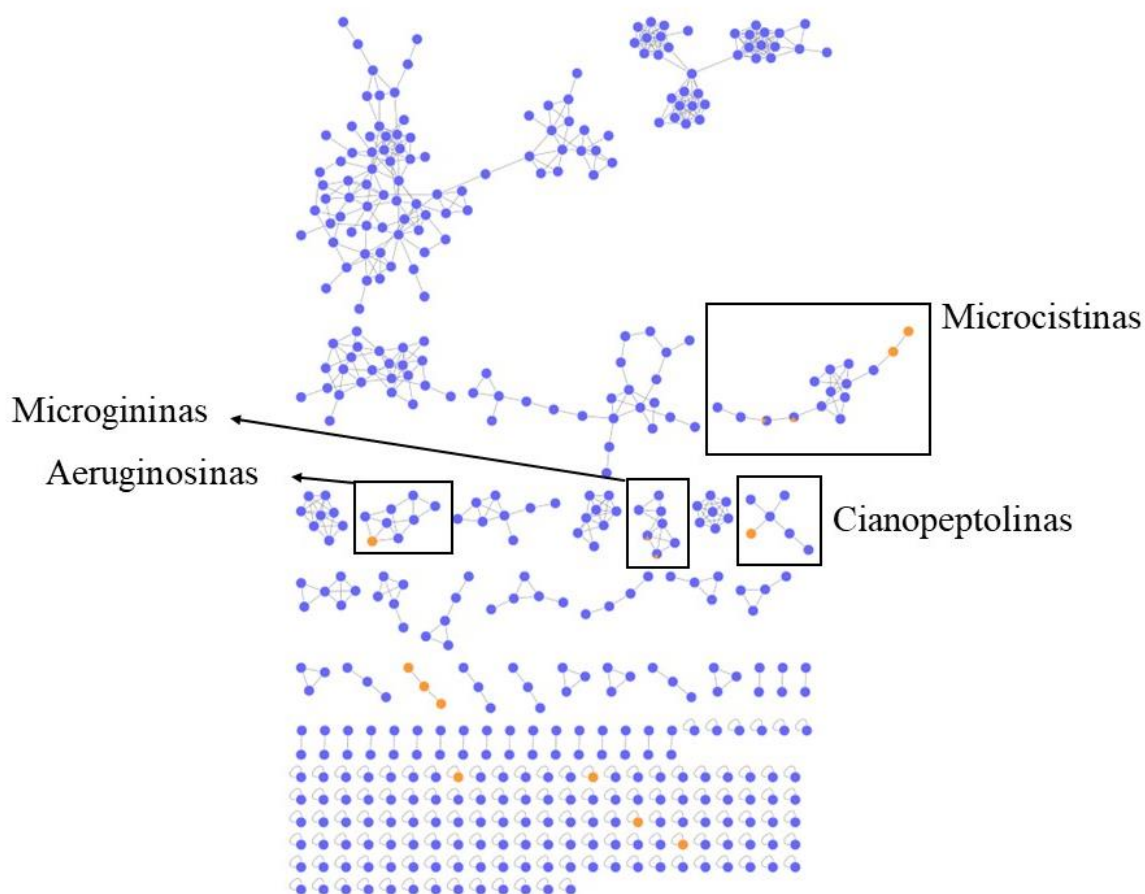
4.2 Desrepliação e anotação

Os dados de MS/MS dos extratos e das amostras de compostos padrão semeados foram analisados usando a ferramenta *Classic Molecular Network* do GNPS, que gerou uma rede molecular contendo um total de 464 nodos.

Os dados de MS também foram analisados pelas ferramentas DEREPLICATOR+ e *Network Annotation Propagation* (NAP) do GNPS para auxiliar na desrepliação das

features. Além disso, durante o processo de desrepliação foram verificados manualmente as massas exatas das *features*, o padrão isotópico e o perfil de fragmentação dos compostos analisados. Esse processo revelou a presença de cianopeptídeos de quatro classes diferentes: microcistinas (MC), microgininas (MG), aeruginosinas (AER) e cianopeptolinas (CP). A Figura 2.9 destaca os clusters de cada uma das classes mencionadas na rede molecular gerada pelo GNPS.

Figura 2.9: Rede molecular, gerada pelo GNPS, a partir dos dados de massa (MS/MS) das análises do extrato orgânico obtido a partir da biomassa investigada e padrões de compostos semeados. Cada nodo representa um espectro de consenso e, se há similaridade entre esses espectros eles são conectados por arestas, formando um *cluster*. Em destaque, as classes de cianopeptídeos anotadas: microcistinas, microgininas, cianopeptolinas e aeruginosinas.



Fonte: Arquivo gerado no software CytoScape®.

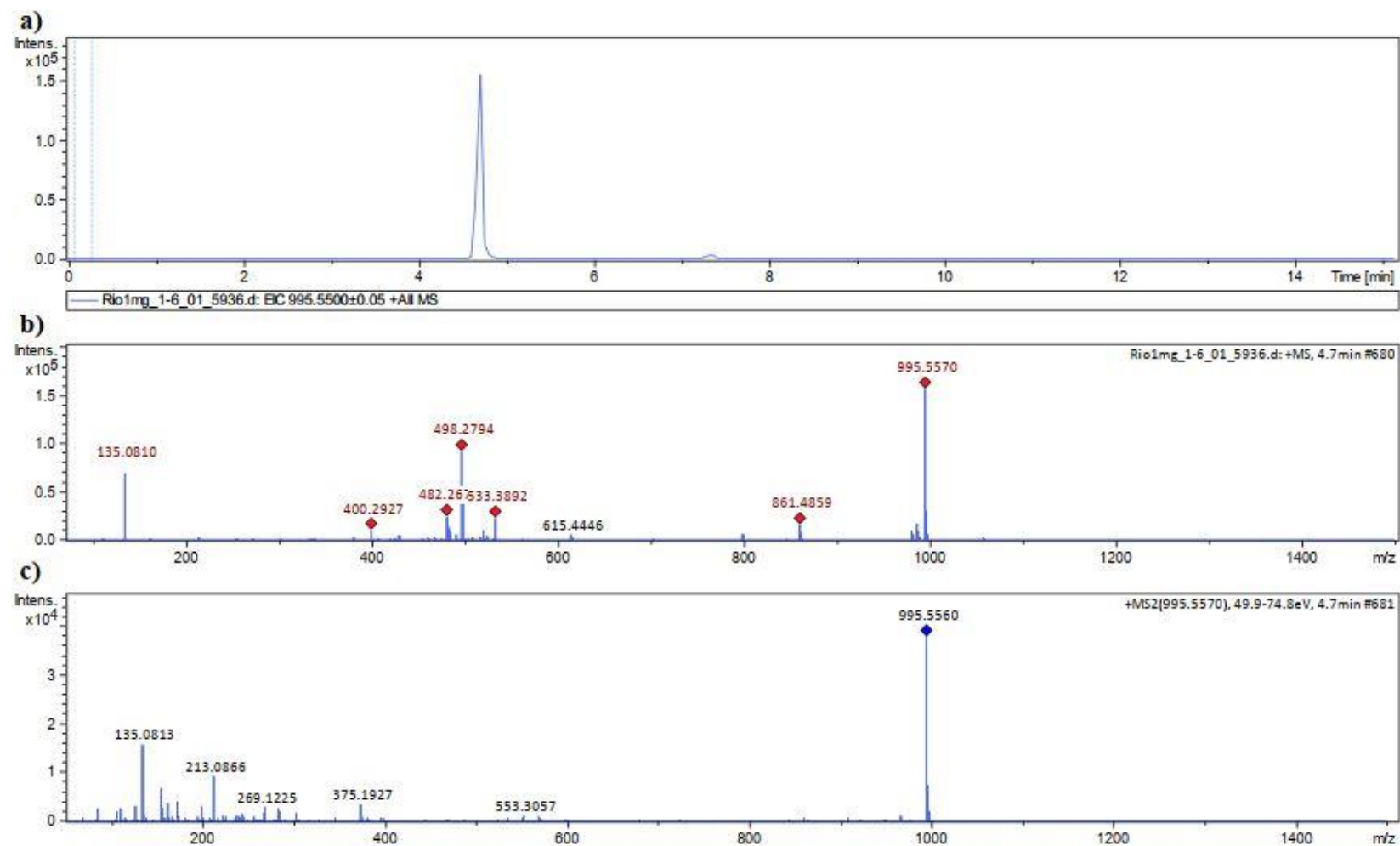
Legenda: nodos azuis: *features* presentes nos extratos, nodos laranjas: *features* geradas pelos espectros de padrões semeados junto com as amostras.

A desrepliação das MC começou pela similaridade entre os espectros da amostra e os espectros dos padrões semeados MC-RR e MC-RR-D-Asp3. Como já mencionado, as

MC são heptapeptídeos cíclicos com um uma porção Adda característica. Nos espectros de fragmentação de MC, essa porção aparece como um sinal de m/z 135 Da, sendo um fragmento característico das MC. Esse sinal característico pode ser observado nos espectros de MS2 de MC apresentados nas Figuras **2.10** e **2.11**.

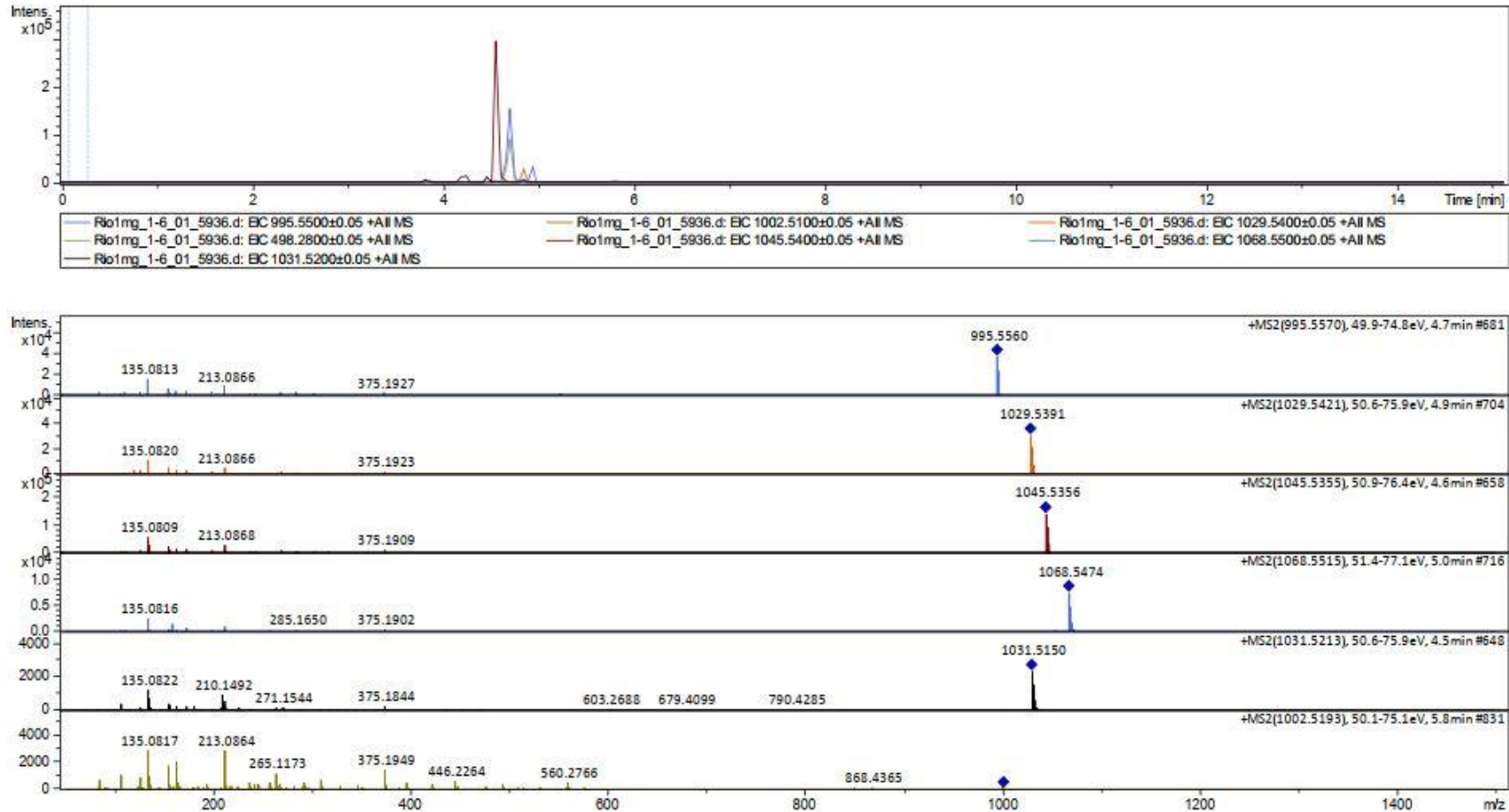
Com base na similaridade entre os espectros das amostras e os espectros de sua biblioteca, o GNPS permitiu a anotação das *features* MC-LY m/z 1002.5248 [M+H]⁺ e MC-LR m/z 995.5570 [M+H]⁺. A análise do perfil isotópico, do valor de massa acurado e do perfil de fragmentação gerados pelas análises de LC-MS/MS para essas duas *features* ajudaram a corroborar essas anotações feitas pelo GNPS. A Figura **2.10** ilustra esses dados para a *feature* MC-LR.

Figura 2.10: Cromatograma (a) e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* MC-LR m/z 995,5570 $[M+H]^+$. Os dados de massa exata, padrão isotópico e perfil de fragmentação gerados pelo LC-MS/MS ajudam na anotação da molécula.



A anotação dos demais nodos da rede passou pelas mesmas etapas de análise do perfil isotópico, do valor de m/z e do perfil de fragmentação. As MC geralmente são detectadas como íons moleculares protonados $[M+H]^+$, sendo os adutos de sódio e potássio detectados em intensidades muito mais baixas (Welker *et al.*, 2006). Além do sinal em m/z 135, outros fragmentos típicos são m/z 213 e m/z 375 Da, correspondentes aos fragmentos GluMeDha + H e Adda'-Glu-MeDha + H, respectivamente (Welker *et al.*, 2002). Como pode ser visto na Figura 2.11, todas as MC anotadas apresentam pelo menos dois desses fragmentos.

Figura 2.11: Cromatograma e espectro de fragmentação das *features* MC-LR m/z 995,5570 $[M+H]^+$, MC-LY m/z 1029,5421 $[M+H]^+$, MC-YR m/z 1045,5355 $[M+H]^+$, MC-WR m/z 1068,5515 $[M+H]^+$, MC-YR-D-Asp3 m/z 1031,5213 $[M+H]^+$, MC-LY m/z 1002,5193 $[M+H]^+$.



Após essas etapas, foi possível anotar as seguintes variantes de MC: MC-LR (m/z 995,5570 $[M+H]^+$ e m/z 498,2807 $[M+2H]^+$), MC-LY (m/z 1002,5193 $[M+H]^+$), MC-YR (m/z 1045,5355 $[M+H]^+$), [D-Asp] MC-YR (m/z 1031,5213 $[M+H]^+$), MC-WR (m/z 1068,5515 $[M+H]^+$), [D-Asp3] D-Asp3MC-Hphr (m/z 1029,5421), MC-RR (m/z 519,7880 $[M+2H]^+$) e [D-Asp3] MC-RR (m/z 512,7806 $[M+2H]^+$). A Figura 2.12 mostra o cluster da classe das MC. E a Figura 2.13 ilustra a fórmula estrutural de algumas MC anotadas.

Figura 2.12: Cluster das *features* anotadas como pertencentes à classe das microcistinas (MC). Os nodos exibem os valores de m/z para cada *feature*, as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ).

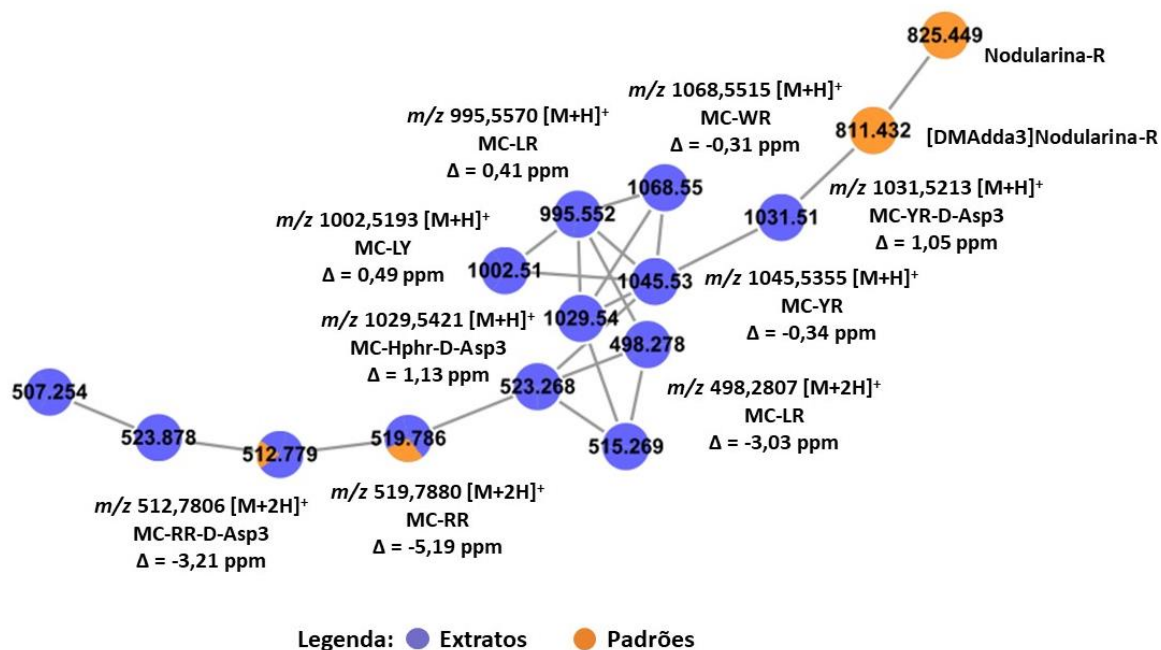
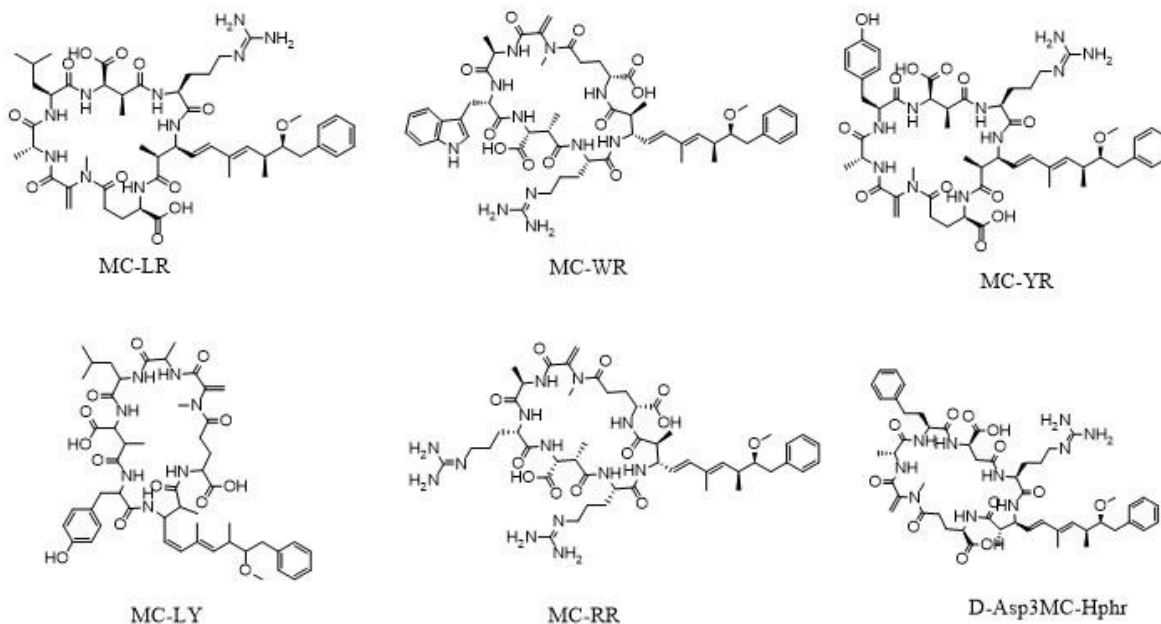


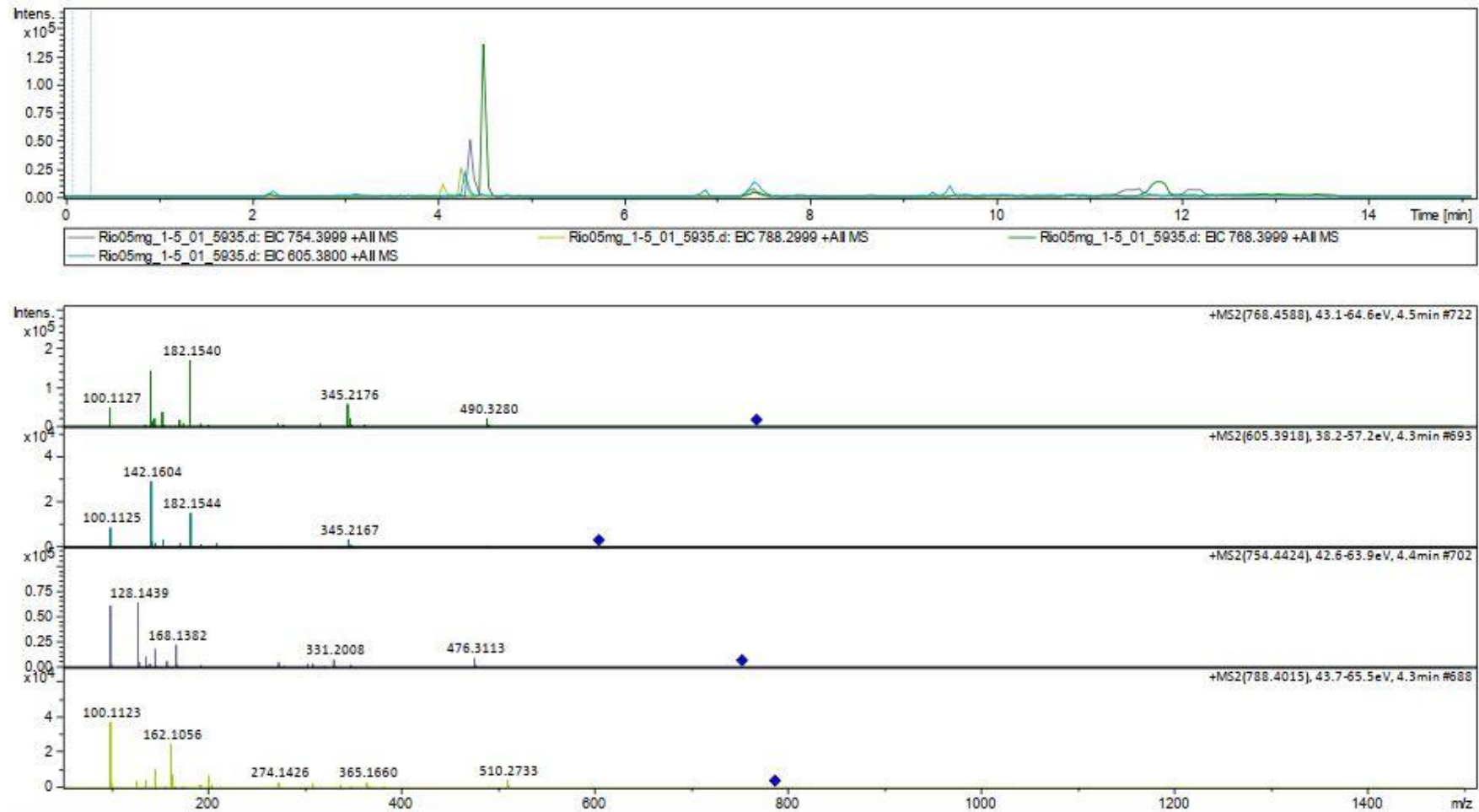
Figura 2.13: Estrutura molecular de algumas das microcistinas (MC) encontradas no extrato orgânico produzido a partir da biomassa coletada no reservatório do Funil, no estado do Rio de Janeiro (RJ).



A desrepliação das MG também começou pela similaridade entre os espectros da amostra e os espectros dos padrões semeados cianostatina B (m/z 754,4424 $[M+H]^+$) e microginina MG KR787 (m/z 788,4015 $[M+H]^+$). A anotação da *feature* MG KR604 (m/z 605,3918 $[M+H]^+$) foi feita após análise do perfil isotópico, do valor de massa acurado e do perfil de fragmentação.

As MG são peptídeos lineares com um ácido N-terminal 3-amino-2-hydroxidecanóico (Ahda) característico (Ishida, Matsuda, Murakami, 1998). Os espectros de fragmentos das MG geralmente apresentam dois fragmentos característicos: m/z 128 Da e m/z 142 Da. O m/z 128 corresponde à quebra da cadeia lateral de Ahda e o m/z 142 ao fragmento da cadeia lateral Ahda N-metilada (Welker *et al.*, 2006). A Figura 2.14 mostra os espectros de fragmentação para as *features* anotadas como pertencentes à classe das MG.

Figura 2.14: Cromatograma e espectro de fragmentação das *features* cianostatina B m/z 754,4424 $[M+H]^+$, MG KR787 m/z 788,4015 $[M+H]^+$, MG KR604 m/z 605,3879 $[M+H]^+$ e m/z 768,4588 $[M+H]^+$



A proposição da fórmula molecular $C_{41}H_{61}N_5O_9$ (erro de 5,40 ppm) para a *feature* de m/z 768,4588 $[M+H]^+$ foi baseada na diferença de massa de 14.0163 Da entre essa *feature* e a cianostatina B. Esse valor sugere que a fórmula molecular (FM) do composto investigado tenha um grupo $-CH_2$ a mais do que a cianostatina B. Apoiando essa anotação, a ferramenta SIRIUS[®] sugeriu a mesma fórmula molecular para esse composto, com base nos dados MS1 e MS2. Uma busca nas bases de dados de produtos naturais mostra que essa FM pode ser referente a variante MG KR 787. A Figura 2.15 mostra o cluster da classe das MG com as *features* anotadas. A estrutura molecular das MG anotadas pode ser vista na Figura 2.16.

Figura 2.15: Cluster das *features* identificadas como pertencentes à classe das microgininas (MG). Os nodos exibem os valores de m/z para cada *feature*, as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ).

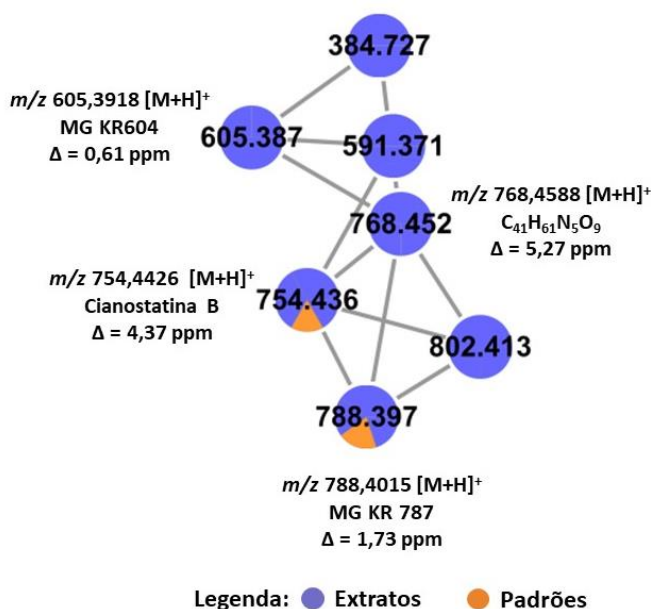
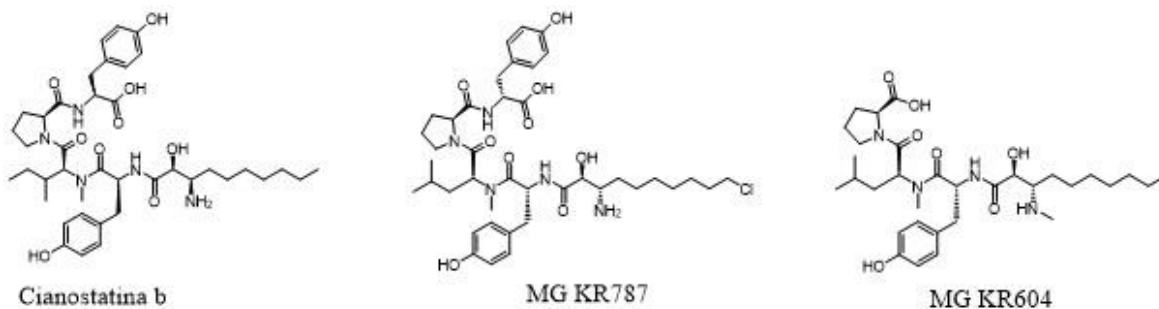
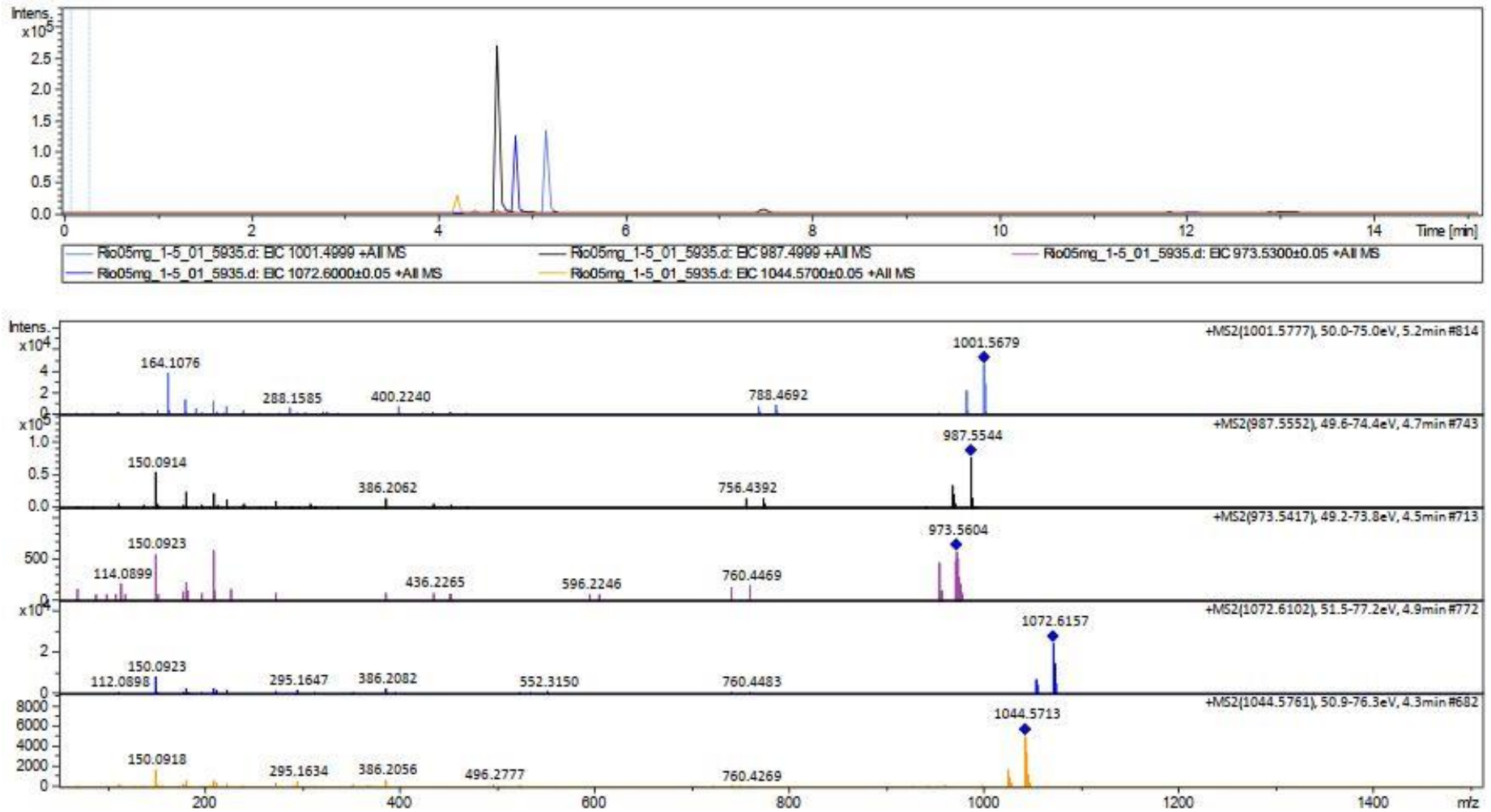


Figura 2.16: Estrutura molecular de algumas das microgininas (MG) encontradas no extrato orgânico produzido a partir da biomassa coletada no reservatório do Funil, no estado do Rio de Janeiro (RJ).



As cianopeptolinas (CP) são depsipeptídeos cíclicos com grande variação nos aminoácidos e suas posições na parte cíclica (Welker, Von Döhren, 2006). Além disso, sua cadeia lateral pode apresentar comprimento e composição variáveis. Por isso, elas não são identificadas apenas por um fragmento característico único, mas sim por uma série de fragmentos que estão associados a unidades conservadas de aminoácidos comuns às variantes de cianopeptolinas. Entre esses fragmentos estão: m/z 150 (MeTyr), m/z 386 (Ahp-Leu-MeTyr-H₂O) e m/z 209 (Ahp-Leu-H₂O) (Welker *et al.*, 2006). A Figura 2.17 mostra o cromatograma e os espectros de fragmentação dos compostos anotados como pertencentes a esta classe.

Figura 2.17: Cromatograma e espectro de fragmentação das *features* m/z 1001,5777 $[M+H]^+$, CP 986 m/z 987,5552 $[M+H]^+$, CP 972 m/z 973,5417 $[M+H]^+$, m/z 1072,6102 $[M+H]^+$ e m/z 1044,5761 $[M+H]^+$.



No agrupamento CP (Figura **2.18**), os compostos CP 986 e CP 972 foram anotados de acordo com sua similaridade espectral MS/MS com compostos já descritos, valor de massa acurada e perfil isotópico.

Com base na diferença de massa de 14,0225 Da entre CP 986 e a *feature* de m/z 1001,5777 $[M+H]^+$, propusemos a fórmula molecular $C_{48}H_{76}N_{10}O_{13}$ (Δ erro -1,70 ppm). Com base na diferença de massa de 85,0476 Da entre CP 986 e a *feature* de m/z 1072,6102 $[M+H]^+$, propusemos a fórmula molecular $C_{51}H_{81}N_{11}O_{14}$ (Δ erro -1,21 ppm). Além disso, considerando a diferença de massa de 28.0324 Da entre os compostos m/z 1072,6102 $[M+H]^+$ e m/z 1044,5761 $[M+H]^+$, sugerimos a fórmula $C_{49}H_{77}N_{11}O_{14}$ (Δ erro -2,65 ppm).

A ferramenta SIRIUS[®] sugeriu as mesmas fórmulas moleculares para esses compostos com base nos dados MS1 e MS2. A ferramenta também classificou o primeiro como um depsipeptídeo, o segundo como um peptídeo e o último como um depsipeptídeo cíclico. Uma pesquisa na literatura não mostrou estudos que abordassem cianopeptolinas com essas FM, indicando que eles podem ser novos análogos dessa classe. A Figura **2.19** mostra o cromatograma e os espectros de fragmentação dos compostos anotados como pertencentes a esta classe.

Figura 2.18: Cluster das *features* anotadas como pertencentes à classe das cianopeptolinas (CP). Os nodos exibem os valores de m/z para cada *feature*, as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ).

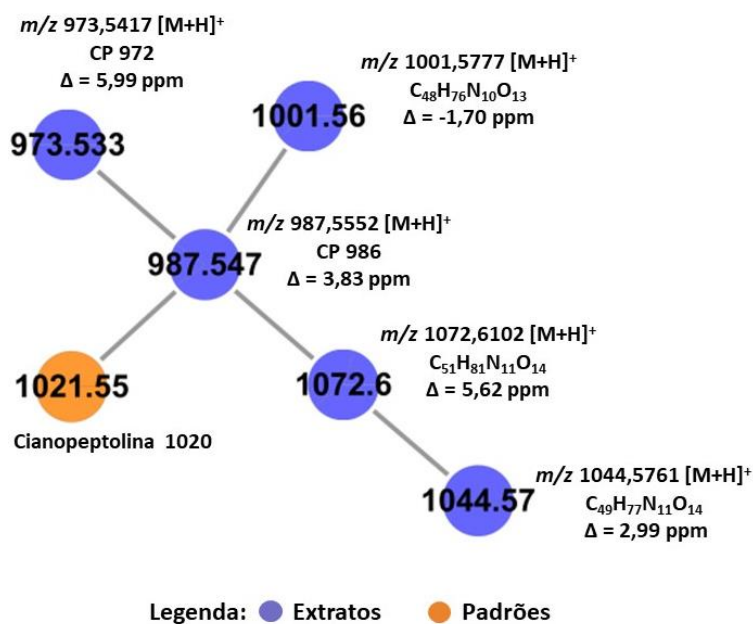
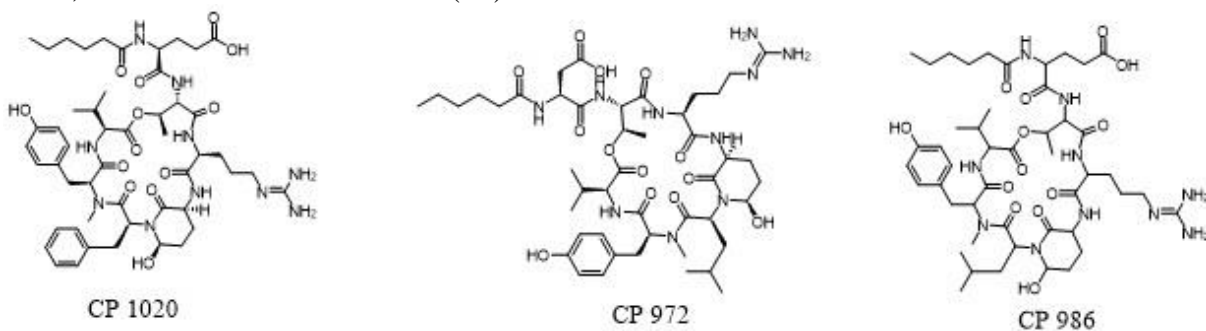


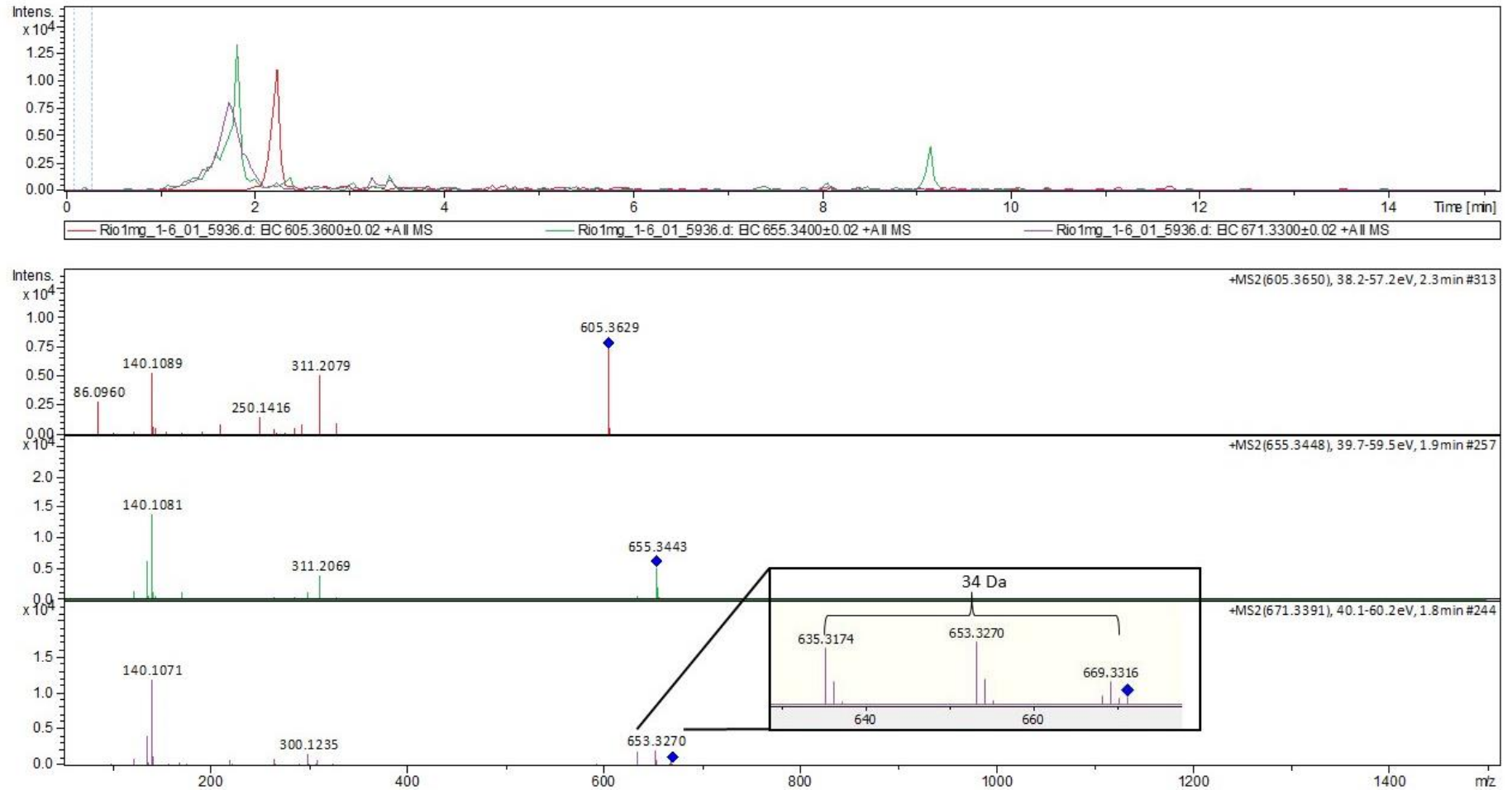
Figura 2.19: Estrutura molecular da cianopeptolinas (CP) 1020 e de algumas das (CP) encontradas no extrato orgânico produzido a partir da biomassa coletada no reservatório do Funil, no estado do Rio de Janeiro (RJ).



As aeruginosinas (AER) são tetrapeptídeos lineares que contêm uma porção única 2-carboxi-6-hidroxi-octahidroindol (Choi) e um derivado Arg C-terminal. É comum que nos espectros de fragmentação esse íon apareça como um sinal de massa intenso na m/z 140 Da, correspondente ao íon Choi-imonium (Welker *et al.*, 2006). Welker e colaboradores afirmam também que é comum séries de até 3 sinais com incremento de 34 Da, esses sinais são indicativos das variantes não, mono e dicloradas do peptídeo.

Nos dados de MS/MS das *features* classificadas como AER encontramos um sinal em m/z 140, indicativo do íon Choi e, em uma das *features*, com uma diferença de massa de 34 Da entre os sinais, como pode ser observado na Figura **2.20**.

Figura 2.20: Cromatograma e espectro de fragmentação das *features* AER 298A m/z 605,3650 $[M+H]^+$, m/z 655,3448 $[M+H]^+$ e m/z 671,3391 $[M+H]^+$.



No *cluster* da classe das AER (Figura 2.21), a AER 298A (m/z 605,3650 $[M+H]^+$) foi anotada com base na similaridade espectral, valor de massa acurada e padrão isotópico. Pela diferença de massa (83,9835 Da) entre AER NAL2 (padrão semeado - $C_{30}H_{46}N_6O_6$) e a *feature* de m/z 671,3391 $[M+H]^+$, propusemos a fórmula molecular $C_{33}H_{46}N_6O_9$ (Δ erro - 1,86 ppm). Com base na diferença de massa de 15,9968 Da entre este último composto e o composto com m/z 655,3448 $[M+H]^+$, propomos a fórmula molecular $C_{33}H_{46}N_6O_8$ (Δ erro - 4,79 ppm). A ferramenta SIRIUS[®] sugeriu as mesmas fórmulas moleculares para essas *features*. A estrutura molecular AER NAL2 pode ser vista na Figura 2.22.

Figura 2.21: Cluster das *features* anotadas como pertencentes à classe das aeruginosinas (AER). Os nodos exibem os valores de m/z para cada *feature*, as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ).

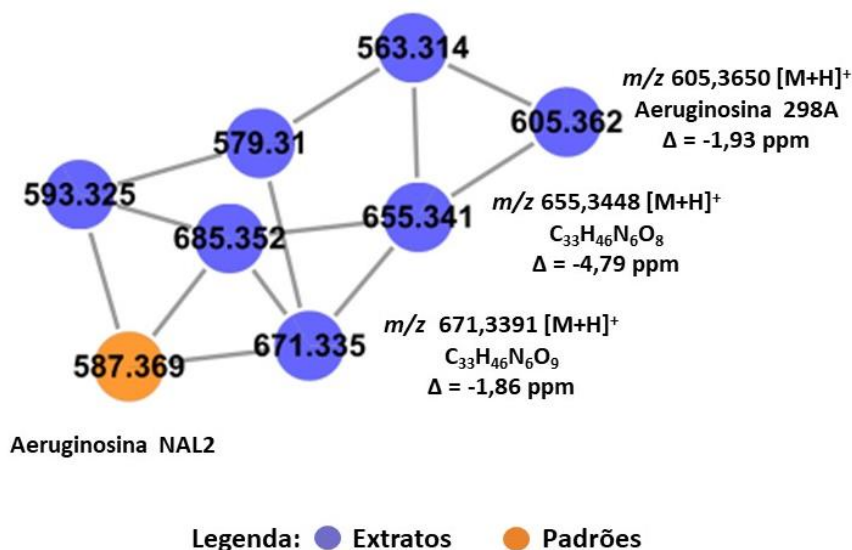
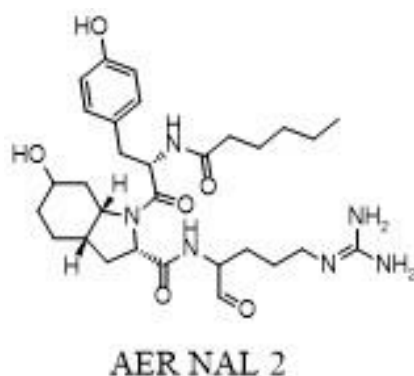


Figura 2.22: Estrutura molecular da aeruginosina NAL2 anotada no cluster das aeruginosinas.



4.3 Análise da toxicidade aguda contra o microcrustáceo *Artemia salina*

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda com *A. salina* para o extrato orgânico são mostrados na Tabela 2.1. Nela são apresentadas as porcentagens de mortalidade para diferentes concentrações do extrato, após um período de 24 horas de exposição dos náuplios. Nesses ensaios, o controle positivo apresentou 100% de letalidade, já o controle negativo (DMSO 1%) e o branco (água do mar artificial) não demonstraram toxicidade.

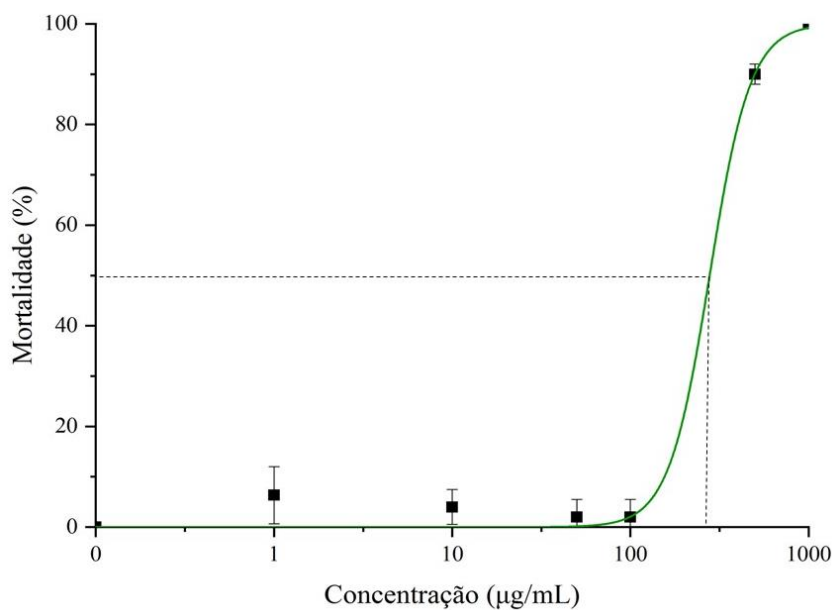
Tabela 2.1: Porcentagem de mortalidade dos náuplios, com desvio padrão (DP) para diferentes concentrações do extrato de cianobactérias.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Mortalidade (%) \pm DP*
0,1	0,0 \pm 0
1	6,0 \pm 5,7
10	4,0 \pm 3,4
50	2,0 \pm 3,2
100	2,0 \pm 3,6
500	90,0 \pm 3,0
1000	100,0 \pm 0

O extrato nas concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram 90% e 100% de mortalidade de náuplios, respectivamente. Com base nesses resultados, uma curva dose-

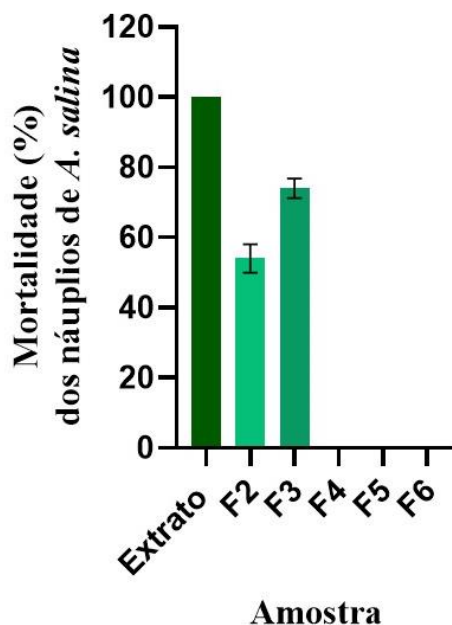
resposta foi construída (Figura 2.22), e o valor de $LC_{50} = 278 \mu\text{g/mL}$ ($\pm 33.7 \mu\text{g/mL}$) foi calculado.

Figura 2.23: Gráfico da curva dose-resposta para o extrato de cianobactérias em relação aos ensaios de toxicidade aguda contra o microcrustáceo *A. salina*.



Em relação às frações, F2-RJ e F3-RJ foram as que mostraram toxicidade significativa, causando 54% e 74% de mortalidade de náuplios, respectivamente. As frações F4-RJ, F5-RJ e F6-RJ não causaram mortalidade dos náuplios (0%) (Figura 2.23).

Figura 2.24: Mortalidade (%) de náuplios de *A. salina*, com desvio padrão, após exposição a 1000 µg/mL de extrato e 100 µg/mL de cada fração.



4.4 Correlação entre as features encontradas no extrato e nas frações da biomassa investigada e as atividades biológicas observadas

De acordo com os resultados do NP Analyst, as pontuações de atividade (*activity score*) para as *features* identificadas como pertencentes a uma das classes de cianopeptídeos, encontradas em cada fração, variaram de 0,04 a 0,54. As pontuações de agrupamento (*cluster score*) atribuídas ficaram entre 0,1 e 1.

As pontuações de atividade variaram em uma ampla faixa entre as diferentes classes de cianopeptídeos. No entanto, dentro da mesma classe, essas pontuações de atividade foram consistentes entre os compostos (Tabela 2.2).

As pontuações de atividade para MC variaram de 0,35 a 0,4. A pontuação mais alta (0,4) foi atribuída à MC-WR m/z 1068,55 $[M+H]^+$ e a mais baixa (0,35) à variante $[D-Asp]^3MC-Hphr$, ambas presentes nas frações ativas F2-RJ e F3-RJ. Os compostos das classes MG e AER receberam as pontuações de atividade mais baixas (0,1-0,18). A pontuação de atividade mais alta (0,54) foi atribuída às variantes da classe das CP.

A plataforma DAFdiscovery atribuiu correlações de bioatividade entre 0,31 e 0,99 para as *features* identificadas em uma das classes de cianopeptídeos presentes em cada fração. Assim como aconteceu nas análises do NP Analyst, os compostos da classe das AER receberam as pontuações de correlação de bioatividade mais baixas, e os compostos da classe das CP receberam as mais altas.

Compostos da classe das MC também receberam pontuações de correlação de bioatividade semelhantes entre si (0,54-0,58), exceto para a variante MC-YR (0,44) e a variante MC-RR (0,99). Diferentemente dos resultados do NP Analyst, a cianostatina B e a MG KR787 receberam um alto valor de correlação de bioatividade, 0,81 e 0,75, respectivamente. Os gráficos de dispersão com os resultados para ambas as plataformas são mostrados nas Figura **A1** e **A2** do Apêndice.

Tabela 2.2: Pontuação de atividade (*activity score*), pontuação de agrupamento (*cluster score*) e correlação de bioatividade (*Bioactivity correlation*) atribuídas aos diferentes cianopeptídeos presentes nas frações do extrato de cianobactérias pelas plataformas NP Analyst e DAF Discovery.

<i>m/z</i>	Compostos anotados/classe	NP Analyst		DAFdiscovery	
		Pontuação de atividade	Pontuação de agrupamento	Correlação de bioatividade	Fração em que a <i>feature</i> está presente
519.7880	MC-RR/microcistinas	0,08	0,17	0,99	F2, F3, F4, F5, F6
605.3918	Aeruginosina 298A/aeruginosinas	0,18	0,40	0,31	F2, F3, F6
754.4424	Cianostatin B/microgininas	0,10	0,21	0,81	F2, F3, F4, F5
973.5417	CP 972/cianopectolinas	0,54	1	0,71	F2, F3
987.5552	CP 986/cianopectolinas	0,54	1	0,76	F2, F3
788.4015	MG KR787/microgininas	0,18	0,40	0,75	F2, F3, F4
995.5570	MC-LR/microcistinas	0,39	1	0,58	F2, F3
1002.5193	MC-YL/microcistinas	0,39	1	0,44	F2, F3
1029.5437	[D-Asp3] MC-HphR/microcistinas	0,35	1	0,57	F2, F3
1044.5761	C ₄₉ H ₇₇ N ₁₁ O ₁₄ */cianopectolinas	0,54	1	0,81	F3
1045.5456	MC-YR/microcistinas	0,39	1	0,54	F2, F3
1068.5474	MC-WR/ microcistinas	0,40	1	0,55	F2, F3
1072.6102	C ₅₁ H ₈₁ N ₁₁ O ₁₄ */cianopectolinas	0,54	1	0,75	F3

*Fórmula molecular putativa

5. DISCUSSÃO

Na biomassa de cianobactérias foram encontrados compostos pertencentes a quatro classes distintas de cianopeptídeos: microcistinas, microgininas, cianopeptolinas e aeruginosinas. Todas essas classes de compostos incluem metabólitos bioativos que podem afetar a atividade de enzimas celulares, interferir em vias de sinalização celular e causar apoptose de tecidos (Huang, Zimba, 2019). No entanto, dentre as classes encontradas, apenas as microcistinas são mencionadas nas legislações de manejo de água doce em todo o mundo (Chorus, Welker, 2021). Embora a coocorrência de toxinas de cianobactérias e outros metabólitos secundários seja ecologicamente relevante (Fernandes *et al.*, 2019), poucos estudos exploraram as atividades biológicas de extratos brutos, especialmente em regiões tropicais.

Toxicidade da biomassa e perfil de cianopeptídeos

Nos sistemas aquáticos, a comunidade de cianobactérias produz uma série complexa de metabólitos. Todos esses compostos podem ser liberados simultaneamente, principalmente após a lise das células de cianobactérias (Rohrlack, Hyenstrand, 2007), afetando organismos aquáticos (Osswald *et al.*, 2007; Ferrão-Filho, Kozlowsky-Suzuki, 2011; Toporowska, Pawlik-Skowrońska, Kalinowska, 2014; Pearson *et al.*, 2016).

Para avaliar a ecotoxicidade da biomassa, realizamos um teste de toxicidade aguda com *A. salina*. Os resultados mostraram 100% de mortalidade de náuplios de *A. salina* após 24 horas de exposição a 500 µg/mL de extrato bruto. A LC₅₀ de 278 µg/mL calculada neste estudo para uma biomassa composta predominantemente por *Dolichospermum* spp. é maior do que os valores de LC₅₀ relatados anteriormente para extratos de florações de *Microcystis* coletados em reservatórios tropicais no Marrocos (1 a 46 µg/mL) (Sabour *et al.*, 2002). Embora tanto *Dolichospermum* spp. quanto *Microcystis* spp. sejam conhecidos como

produtores de MC, a variação na toxicidade pode ser atribuída à diferença na composição de espécies da biomassa, à flutuação de clones tóxicos e às condições ambientais específicas das quais a biomassa se originou. É bem estabelecido que esses fatores influenciam o perfil e a concentração de metabólitos na amostra (Chorus, Welker, 2021). Por exemplo, uma comparação entre extratos de *Microcystis* spp. e *Planktothrix agardhii*, que tinham concentrações totais de microcistinas semelhantes, revelou diferenças significativas no perfil das variantes de microcistinas e outros oligopeptídeos, levando a efeitos tóxicos variados nos organismos testados (Pawlik-Skowrońska, Toporowska, Mazur-Marzec, 2019).

Embora existam vários estudos investigando a toxicidade de cianopeptídeos (Carmichael, 1992; Aráoz, Molgó, Tandeu de Marsac, 2010; Ferrão-Filho, Kozlowsky-Suzuki, 2011; Merel *et al.*, 2013; Buratti *et al.*, 2017), a biomassa usada geralmente vem de culturas de cepas isoladas, e os testes de toxicidade são principalmente realizados com extratos de uma única cepa. O problema com essas metodologias é que elas ignoram a complexidade químico-ecológica da interação entre diferentes espécies na biomassa. Além disso, as concentrações testadas dificilmente serão encontradas em condições naturais. Essa grande variação nos resultados reforça a necessidade de estudos de toxicidade com extratos brutos de amostras de biomassas ambientais.

Correlação de Bioatividade

A análise de correlação de bioatividade relacionou compostos das diferentes classes de cianopeptídeos (MC, MG, CP e AER) com a toxicidade observada nos testes com *A. salina*. O grupo de cianopeptídeos com a maior diversidade de variantes (sete) identificadas em nosso extrato foram as MCs. Essa classe de cianotoxinas é amplamente estudada e, para todas as variantes de MC registradas neste estudo, exceto a MC-YL, há uma LC₅₀ descrita na literatura. Os valores variam entre 50 µg/kg (-LR) e 600 µg/kg (-RR) de peso corporal por injeção intraperitoneal em ensaios com camundongos (Botes *et al.*, 1985; Kusumi *et al.*,

1987; Namikoshi *et al.*, 1992; Del Campo, Ouahid, 2010). Para todos os análogos de MC encontrados em nosso extrato, exceto a MC-RR, os resultados da plataforma NP Analyst apresentaram os segundos maiores valores de pontuação de atividade (0,35 - 0,40). A plataforma DAFdiscovery atribuiu valores de correlações de bioatividade às variantes de MC entre 0,44 (-YL) a 0,99 (-RR). Embora a MC-RR tenha apresentado a menor pontuação de atividade nas análises do NP Analyst (0,08), a correlação de bioatividade nas análises do DAFdiscovery apresentou o maior valor (0,99).

Provavelmente, essa variação decorre dos diferentes algoritmos utilizados por cada plataforma. O NP Analyst considera a presença da molécula na(s) fração(ões) ativa(s) e sua ausência nas inativas (pontuação de agrupamento). Se uma molécula estiver presente apenas na fração ativa, ela terá uma pontuação mais alta. Mas, se também aparecer em frações inativas, mesmo em concentrações muito mais baixas, receberá uma pontuação mais baixa. Já a plataforma DAFdiscovery leva em consideração a intensidade do pico em cada fração. Altas concentrações desses compostos em frações bioativas elevam a correlação de bioatividade. Em um número reduzido de amostras, se um composto tem alta concentração em uma determinada fração bioativa e baixa concentração em uma fração não ativa, ainda terá uma alta correlação de bioatividade.

Quanto à classe das MG, neste trabalho foram anotados os compostos cianostatina B, MG KR787 e MG KR604 (m/z 605,3879 $[M+H]^+$). Além disso, foi possível propor a fórmula molecular $C_{41}H_{61}N_5O_9$ para a *feature* de m/z 768.4589 $[M+H]^+$, que pode ser do congênere MG KR 787.

Diversos análogos de MG são descritos como inibidores de zinco metaloproteases e são conhecidos por serem inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), aminopeptidase M (APM) e leucina aminopeptidase (LAP) (Kodani *et al.*, 1999; Ishida *et al.*, 2000; Lifshits *et al.*, 2011; Lodin-Friedman, Carmeli, 2018). O mecanismo de inibição

enzimática é atribuído principalmente à porção de Ahda, embora NeMe-Tyr-Tyr no C-terminal favoreça a ligação ao sítio ativo das enzimas (Ishida *et al.*, 2000). Dados sobre a atividade tóxica de MG em modelos animais são escassos. Ujvárosi e colaboradores (2020) determinaram a citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* de quatro congêneres de MG (MG FR3, MG GH787, MGL 402 e cianostatina B) em um extrato cianobacteriano contendo esses metabólitos. Nesse estudo, o extrato afetou significativamente a viabilidade das células no ensaio MTT com a linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Além disso, o extrato e todos os congêneres testados induziram quebras de fita de DNA. Fernandes e colaboradores (2019) testaram um extrato bruto de *Microcystis* sp. contendo MG e demonstraram sua toxicidade aguda em larvas de um peixe de água doce tropical, *Astyanax altiparanae*, conhecido como lambari-do-rabo-amarelo, relatando várias anormalidades, incluindo edema abdominal e pericárdico.

Em nosso estudo, a ferramenta DAFdiscovery apresentou uma alta correlação de bioatividade (0,75 - 0,81) para compostos da classe das MG. No entanto, o NP Analyst atribuiu uma baixa pontuação de atividade (0,1 - 0,18) para esses mesmos compostos. Como discutido, essa diferença se dá provavelmente devido a presença de MG, ainda que em pequenas concentrações, em frações que não demonstraram bioatividade no ensaio com *A. salina*. Por exemplo, a MG KR787 aparece em maior concentração na fração ativa F3-RJ, o que lhe confere uma alta correlação de atividade no DAFdiscovery. No entanto, ele também está presente, embora em menor concentração, na fração não ativa F4-RJ, o que faz com que ele receba uma baixa pontuação de atividade pelo NP Analyst.

As CP são uma grande família de depsipeptídeos cíclicos que podem ser produzidos por diferentes gêneros de cianobactérias, incluindo *Microcystis*, *Planktothrix*, *Dolichospermum* e *Nostoc* (Welker, Von Döhren, 2006). Algumas CP mostraram atividade inibitória contra serino proteases, como tripsina, quimotripsina, trombina e elastase

(Weckesser, Martin, Jakobi, 1996; Linington *et al.*, 2008; Gesner-Apter, Carmeli, 2009). Gademann *et al.* (2010) mostraram que a CP 1020, isolada de uma cepa de *Microcystis*, foi tóxica ($LC_{50} = 8,8 \mu\text{M}$) para o crustáceo de água doce *Thamnocephalus platyurus* em concentrações semelhantes a algumas MC bem conhecidas. Ainda, Faltermann e colaboradores (2014) apontaram que a exposição de embriões de peixe-zebra a diferentes concentrações de CP 1020 resultou em alterações transcricionais de genes relacionados a diversas vias biológicas.

Em nosso estudo, ambas as plataformas atribuíram aos compostos da classe das CP as maiores correlações de bioatividade (0,54 pelo NP Analyst e 0,71 - 0,81 pelo DAFdiscovery), incluindo os análogos potencialmente novos ($C_{49}H_{77}N_{11}O_{14}$ e $C_{51}H_{81}N_{11}O_{14}$). Esses resultados fornecem evidências que apoiam a hipótese de que as CP devem ser consideradas entre as cianotoxinas que devem ser monitoradas em reservatórios de água.

Quanto às AER, essas são uma família de cianopeptídeos que tem algumas variantes descritas como inibidores potentes de serino proteases (Ersmark, Del Valle, Hanessian, 2008). Os mecanismos inibitórios foram elucidados por cristalografia de raios X de complexos aeruginosina-protease (Hicks *et al.*, 2006). Em nossas análises, a presença de AER 298A foi correlacionada com a bioatividade por ambas as plataformas, com pontuações de 0,18 e 0,31 pelo NP Analyst e pelo DAFdiscovery, respectivamente. Scherer, Bezold e Gademann (2016) afirmaram que algumas variantes de AER correspondem à bem conhecida MC-LR em termos de toxicidade contra crustáceos. Seus estudos relataram uma $LC_{50} = 34,5 \mu\text{M}$ para a AER 828A, um análogo sintético, contra o organismo *T. platyurus*. Resultados semelhantes foram encontrados por Kohler e equipe (2014), que relataram um valor de LC_{50} de $22,4 \mu\text{M}$ para essa variante de AER contra *T. platyurus*.

Utilizando ferramentas quimiométricas para correlacionar a toxicidade de compostos em misturas complexas

Os resultados de correlação de bioatividade demonstraram que diferentes cianopeptídeos na amostra contribuem para a toxicidade observada. Era esperado que as MC, uma classe de cianotoxinas amplamente conhecidas e estudadas, demonstrassem toxicidade. Contudo, as análises realizadas neste trabalho, mostraram que compostos das classes das microgininas, aeruginosinas e, especialmente, cianopeptolinas também podem apresentar correlação com a toxicidade observada.

Ambas as ferramentas (DAFdiscovery e NP Analyst) utilizadas neste estudo mostraram-se eficazes na investigação da correlação de bioatividade de diferentes cianopeptídeos em um extrato complexo produzido a partir de uma amostra ambiental, embora cada uma tenha suas particularidades.

O DAFdiscovery oferece uma melhor aproximação quando se tem um maior número de amostras e em situações em que a separação alcançada entre cada extrato ou fração é ineficiente, pois considera a intensidade do pico do composto ionizado em cada amostra. Por sua vez, o NP Analyst funciona melhor para um pequeno número de amostras e quando a separação dos compostos ocorre de maneira eficiente, pois a ferramenta tende a suavizar os valores de correlação se um composto aparecer em frações não ativas. Embora isso possa subestimar a toxicidade da molécula, o NP Analyst também fornece outro índice, o valor de pontuação de agrupamento (*cluster score*), que auxilia na interpretação dos resultados.

6. CONCLUSÃO

Na biomassa ambiental investigada as cianobactérias eram o componente dominante do fitoplâncton (99,7%). Dentre os gêneros identificados estão *Dolichospermum* e *Microcystis*, reconhecidos produtores de cianotoxinas. De fato, as análises metabolômicas mostraram a presença de cianotoxinas da classe das MC na biomassa investigada, que por si

só já representa um risco ao uso da água desse ecossistema. Contudo, os achados aqui apresentados destacam que a toxicidade observada pode não ser atribuída exclusivamente as MC, enfatizando a importância de uma avaliação de risco (eco)toxicológico mais abrangente, que leve em conta as diferentes classes de cianopeptídeos que são produzidos por uma biomassa durante um evento de floração.

O uso de ferramentas metabolômicas e bioinformáticas é promissor e pode ser uma alternativa eficiente para o monitoramento ambiental. Essas ferramentas podem auxiliar tanto na identificação do perfil químico de um extrato quanto nas análises de correlação entre toxicidade/bioatividade em extratos complexos e frações. Tudo isso, sem a necessidade de isolar um composto ou usar padrões para testes biológicos, com uma abordagem que consome menos tempo e reagentes. As ferramentas DAFdiscovery e NP Analyst contribuíram substancialmente para o processo de avaliação da toxicidade, e a escolha entre elas dependerá dos dados do usuário. Neste trabalho, os resultados de ambas as ferramentas mostraram-se complementares na avaliação da toxicidade de um extrato complexo e desconhecido de cianobactérias.

Capítulo 3. Cianobactérias - “the bright side”

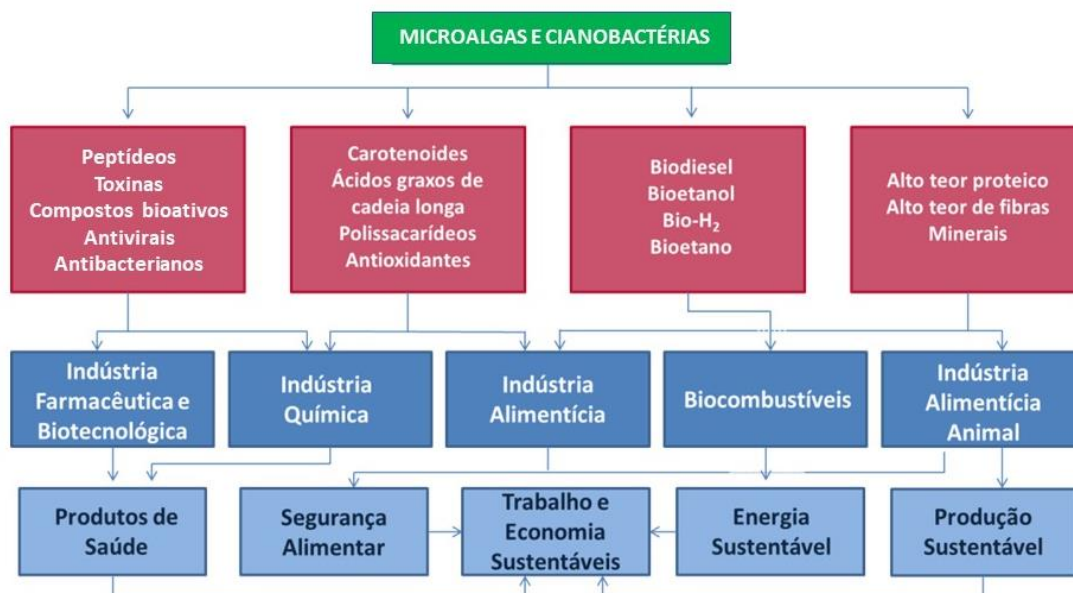
1. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR CIANOBACTÉRIAS E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

As cianobactérias chamam atenção por sua abundância, diversidade de gêneros e espécies, e capacidade de se adaptar e sobreviver nos mais diferentes ecossistemas. Toda essa diversidade lhes confere também a capacidade de biossintetizar os mais diversos metabólitos com diferentes atividades biológicas (Kumla et al., 2022; Demay et al., 2019; Le Manach et al., 2019).

Para além das cianotoxinas, as cianobactérias produzem uma ampla variedade de cianopeptídeos estruturalmente diversos. De acordo com Jones e colaboradores (2020), mais de 2000 peptídeos ou metabólitos peptídicos de cianobactérias já foram descritos. Essa diversidade de compostos também abre caminho para uma ampla gama de aplicações. Algumas espécies de microalgas e cianobactérias são exploradas comercialmente há décadas na nutrição humana e na alimentação animal (Singh *et al.*, 2017). Outras espécies são utilizadas como herbicidas, fertilizantes agrícolas (Reis, Gouveia, 2013), para biorremediação e tratamento de efluentes (Rizwan *et al.*, 2018) e até mesmo em biorrefinarias, para a produção de biocombustíveis e coprodutos de alto valor agregado (Suganya *et al.*, 2016; Rizwan *et al.*, 2018).

Com o advento de técnicas analíticas avançadas e a descoberta de seu potencial biotecnológico, os metabólitos secundários de cianobactérias vêm sendo utilizados também pelas indústrias química, farmacêutica e de cosméticos. A Figura 3.1 ilustra algumas das aplicações que podem ser dadas às microalgas, cianobactérias e seus produtos de extração.

Figura 3.1: Esquema das possíveis aplicações dadas às microalgas, cianobactérias e seus metabólitos.



Fonte: REIS e GOUVEIA (2013) (adaptado).

A pesquisa de metabólitos secundários de cianobactérias pela indústria farmacêutica teve início em meados da década de 1970, com o trabalho de Richard e Moore (Tidgewell, Clark, Gerwick, 2010). Desde então, as cianobactérias são consideradas fontes promissoras de novos compostos bioativos e quimicamente inéditos (ORJALA, 2011).

Um exemplo clássico é a Dolastatina 10, molécula com alta atividade citotóxica, detectada inicialmente em extratos da lebre do mar (*Dolabella auricularia*) por Pettit e colaboradores, em 1972. Mais tarde, em 2001, Luesch e colaboradores relataram o isolamento de dolastatina 10 da cianobactéria *Symploca* sp. da qual a *D. auricularia* se alimenta, revelando sua verdadeira fonte. A elucidação da estrutura da dolastatina 10, em 1987, revelou uma molécula antineoplásica potente (PETTIT et al., 1987). Assim, na década de 1990, esse composto entrou em ensaios clínicos de fase I contra células tumorais no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI – do inglês *National Cancer Institute*).

Em 2003, Doronina e equipe relataram a conjugação bem-sucedida de um análogo da dolastatina 10 (monometil auristatina E) com um anticorpo monoclonal anti-CD30, que produz uma droga potente e seletiva conhecida como Brentuximabe vedotina (Senter, Sievers, 2012). Esta droga foi aprovada em 2011 pelo órgão regulatório norte americano (FDA - do inglês *Food and Drug Administration*) e hoje é usada como fármaco no tratamento de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico.

Ao longo dos anos, a diversidade de metabólitos secundários de cianobactérias vem se mostrando promissora. Em um trabalho de revisão, Rizwan e colaboradores (2018) apontam que as cianobactérias são importantes fontes de compostos bioativos para o desenvolvimento de drogas quimioterápicas, com atividades neurológicas, antimicrobianas e até mesmo toxinas altamente potentes com aplicabilidade na indústria farmacêutica. Demay e colaboradores (2019) corroboram essa afirmação e adicionam à lista o potencial citotóxico, antifúngico, antiviral e anti-inflamatório dos metabólitos secundários produzidos por cianobactérias.

Diversos trabalhos ilustram essas bioatividades específicas como por exemplo, propriedades antibacterianas (Volk, Furkert, 2006; Niveshika *et al.*, 2016), anticancerígenas (Luesch *et al.*, 2001; Mukund, Sivasubramanian, 2014), antifúngicas (Shaieb, Issa, Meragaa, 2014), antiplasmódicas (Linnington *et al.*, 2007; Simmons *et al.*, 2008), antivirais (Von Elert *et al.*, 2005; Abdo *et al.*, 2012)(Abdo *et al.*, 2012; Von Elert *et al.*, 2005), fotoprotetoras (de la Coba *et al.*, 2019; Lawrence, Long, Young, 2019; Gerald, Jacinavicius, *et al.*, 2020), antioxidantes e anti-inflamatórias (Kageyama, Waditee-Sirisattha, 2019)

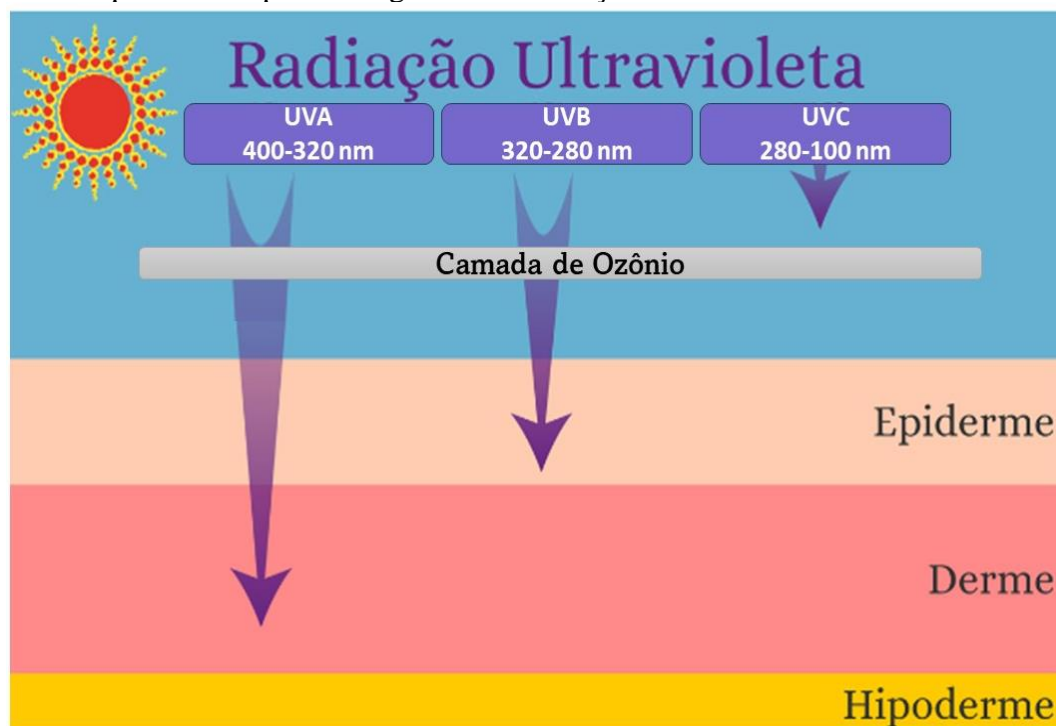
Essas descobertas reforçam o interesse contínuo na pesquisa e exploração das cianobactérias como uma valiosa fonte de novos produtos farmacêuticos e terapêuticos.

2. CIANOBACTÉRIAS COMO FONTE ALTERNATIVA DE COMPOSTOS FOTOPROTETORES

A luz solar é composta por espectro contínuo de radiação eletromagnética que é dividido de acordo com o intervalo de comprimento de onda (λ) em: radiação ultravioleta (UV) (100 - 400 nm), visível (400 - 780 nm) e infravermelho (> 780 nm) (Balogh *et al.*, 2011). Apesar de corresponder a apenas 5% de toda a radiação terrestre, a radiação UV interage fortemente com moléculas orgânicas e é importante para muitos processos biológicos (como por exemplo a produção de vitamina D). No entanto, também pode ser extremamente prejudicial para os organismos vivos, desde animais e plantas até microrganismos (Martins, *et al.*, 2022).

A radiação UV é tradicionalmente dividida em: UVC (100 - 290 nm), UVB (290 - 320 nm) e UVA (320 - 400 nm) (González, Fernández-Lorente, Gilaberte-Calzada, 2008). Os raios UVC, apesar de muito energéticos e potencialmente perigosos, são completamente filtrados pelas partículas do ozônio atmosférico e assim, não atingem a superfície terrestre (Martins, *et al.*, 2022) (Figura 3.2). A maioria dos efeitos deletérios da radiação ultravioleta em organismos vivos são atribuídos à faixa UVB. Esses raios atingem a camada superior da pele, a epiderme, e são os responsáveis pelas queimaduras solares. Os raios UVB geram processos inflamatórios, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estão fortemente relacionados com danos diretos ao DNA e carcinogênese (Balogh *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019; Martins, *et al.*, 2022). Já os raios UVA atingem a camada dérmica da pele prejudicando assim, as fibras de colágenos e de elasticidade (Lopes, da Cruz, Batista, 2012), sendo responsáveis pelo envelhecimento precoce e manchas. A radiação UVA também está relacionada ao câncer de pele (Balogh *et al.*, 2011).

Figura 3.2: Esquema do espectro magnético da radiação ultravioleta.



Fonte: Mooney (2021) - adaptado.

Disponível em: <https://w20.b2m.cz/post/a-radiacao-ultravioleta-e-dividida-de-acordo.html>.

O aumento da expectativa de vida, aliado à busca por produtos que mitiguem os efeitos adversos da exposição solar, tem impulsionado o desenvolvimento de cosméticos destinados à proteção da pele contra a radiação UV (Lodén, 2014). A abordagem mais popular para reduzir a exposição aos raios UVA e UVB é a aplicação tópica de protetores solares contendo princípios ativos que absorvem ou refletem os raios UV através do uso de agentes orgânicos ou inorgânicos (Mancuso *et al.*, 2017).

Os filtros orgânicos absorvem os raios UVA e UVB, dissipando sua energia em forma de calor, enquanto os filtros inorgânicos consistem em partículas opacas que refletem e dispersam a radiação ultravioleta e visível. Muitas formulações cosméticas destinadas à fotoproteção combinam os dois tipos de filtros para obter formulações finais foto estáveis e que proporcionem ampla proteção contra radiação (Morone, Janaína *et al.*, 2022).

Apesar de indispensáveis, os protetores solares disponíveis no mercado podem, muitas vezes, apresentar efeitos adversos tanto para os seres humanos quanto para os ecossistemas. Os filtros inorgânicos, que contêm óxidos metálicos, podem produzir radicais

altamente oxidantes (Serpone, Dondi, Albini, 2007). Quando presentes em sua forma nanoparticulada, esses filtros que atravessam a membrana celular e induzem toxicidade aos fibroblastos humanos, podendo gerar processos inflamatórios, e redução da elasticidade da pele (Pan *et al.*, 2009). Os filtros orgânicos são apontados como causa de dermatite de contato em crianças (Stiefel, Schwack, 2013) e de desregulação endócrina em animais no meio ambiente (Ozáez, Martínez-Guitarte, Morcillo, 2013; J. Wang *et al.*, 2016). Estudos também mostram que resíduos sintéticos de filtros UV, detectados em estações de tratamento de águas residuais e sedimentos de rios, podem induzir toxicidade em organismos aquáticos (Zhang *et al.*, 2015; J. Wang *et al.*, 2016).

Como consequência, a pesquisa cosmética tem direcionado seus esforços na investigação de ingredientes de fontes naturais (Mourelle, Gómez, Legido, 2017; Drasar, Khripach, 2019) com menos efeitos colaterais, ecologicamente corretos e com métodos de produção sustentáveis (Ariede *et al.*, 2017; Cavinato *et al.*, 2017). Plantas, macroalgas, microalgas e cianobactérias têm sido amplamente exploradas no campo cosmético devida às suas propriedades fotoprotetoras (Morone *et al.*, 2019). Esses organismos, constantemente expostos à radiação UV, desenvolveram ao longo do tempo diversas defesas bioquímicas para se protegerem dos danos causados por essa radiação (Rastogi *et al.*, 2020). Por exemplo, plantas superiores sintetizam flavonóides; muitos mamíferos, aves, répteis e peixes sintetizam a melanina; cianobactérias, fungos e algas sintetizam aminoácidos do tipo micosporinas, citoneminas e outros compostos fotoprotetores (Cockell, Knowland, 1999)

Como organismos fotoautotróficos, as cianobactérias dependem fortemente da radiação solar para realizar fotossíntese (Rastogi *et al.*, 2014). No entanto, a dependência das cianobactérias da luz para a realização de fotossíntese também implica exposição à radiação ultravioleta (UV) potencialmente prejudicial. Evidências sugerem que as cianobactérias habitam o planeta há mais de 3 bilhões de anos, o que implica que as primeiras

cianobactérias habitavam ambientes com extrema exposição à radiação UV (Sánchez-Baracaldo, Cardona, 2020). Não é surpreendente, portanto, que esses organismos tenham desenvolvido adaptações para lidar com os danos causados pelos raios UV (Martins, *et al.*, 2022). De fato, é possível que as cianobactérias estejam entre os primeiros organismos terrestres a produzir compostos fotoprotetores (Michaelian, Simeonov, 2015). Entre esses compostos estão os carotenoides, as cioneminas e os aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs). Todos amplamente reconhecidos e estudados por suas propriedades fotoprotetoras. Como parte do escopo deste trabalho, discutiremos mais a fundo os aminoácidos do tipo micosporinas.

3. AMINOÁCIDOS DO TIPO MICOSPORINAS (MAAs)

Dentre os metabólitos especializados das cianobactérias com propriedades de fotoproteção, destacam-se os aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs). Estes compostos são produzidos por organismos, como cianobactérias, fungos e macroalgas, como uma estratégia adaptativa para mitigar os efeitos adversos da exposição crônica à radiação UV (Wada, Sakamoto, Matsugo, 2015). Os MAAs foram relatados pela primeira vez na década de 1960 (Shibata, 1969) e desde então, muitas informações sobre suas estruturas, distribuição, propriedades e funções foram publicadas (Bhatia *et al.*, 2011; Carreto, Carignan, 2011; Wada, Sakamoto, Matsugo, 2015; Geraldés, Jacinavicius, *et al.*, 2020).

Esses compostos são um grupo de metabólitos secundários de baixo peso molecular (< 400 g/mol), incolores e altamente solúveis em água. Eles podem ser formados de um anel aminociclohexenona (oxo-micosporina) ou aminociclohexenimina (imino-micosporina), com substituintes de nitrogênio (Geraldés, Pinto, 2021). Os derivados de aminociclohexenona contêm uma ciclohexenona conjugada com um aminoácido, exemplos são a micosporina-glicina e a micosporina-aurina. Já os derivados da aminociclohexenimina possuem uma ciclohexenimina conjugada com uma glicina ou uma metilamina ligada ao

terceiro átomo de carbono e um aminoácido, aminoálcool ou cromóforo enaminona ligados ao primeiro átomo de carbono (Gerald, de Medeiros, *et al.*, 2020). Exemplos de estruturas do tipo aminociclohexenona e do tipo aminociclohexenimina podem ser visualizados na Figura 3.3.

Figura 3.3: Exemplo de estrutura de aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) com anéis do tipo ciclohexenimina (a) e ciclohexenona (b).

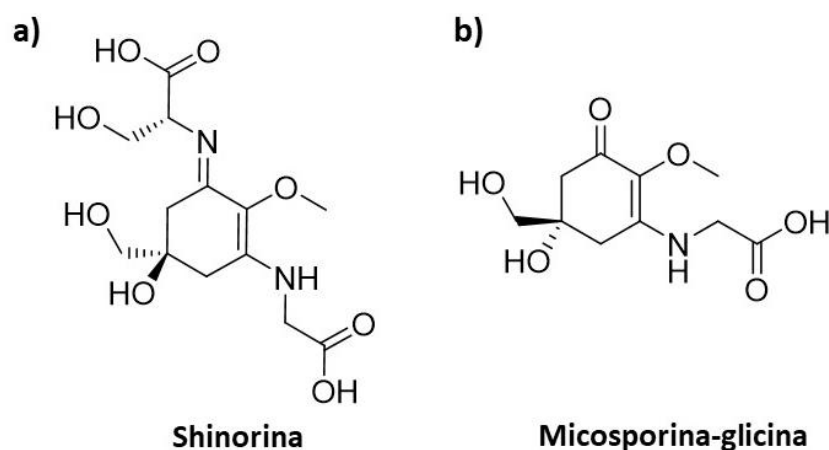


Figura feita no software ChemDraw®

A diversidade estrutural dos MAAs deve-se à ligação de diferentes aminoácidos ao núcleo, que pode ainda sofrer descarboxilação ou desmetilação, resultando em alteração na capacidade de absorção da luz UV (Wada, Sakamoto, Matsugo, 2015; Gerald, Pinto, 2021). A maioria dos MAAs absorvem radiação principalmente na região do UVA de 320 - 400 nm), contudo, alguns têm absorção máxima na região do UVB de 280 - 320 nm. Os máximos de absorção de MAAs situam-se entre 268 e 362 nm, a depender da sua estrutura molecular (Lawrence, Long, Young, 2019).

Até agora, mais de 74 MAAs são conhecidos (Gerald, Pinto, 2021). Sua capacidade fotoprotetora contra a radiação UVA e UVB (Lawrence, Long, Young, 2019), suas funções antioxidantes (Bhatia *et al.*, 2011), alta solubilidade em água e estabilidade em uma ampla faixa de temperaturas e pH (de la Coba *et al.*, 2019), tornam esses compostos promissores

para uso formulações para proteção solar e produtos antienvhecimento (Kageyama, Waditee-Sirisattha, 2019).

A incidência de todos os tipos de câncer de pele tem aumentado em todo o mundo (The American Cancer Society Medical and Editorial Content Team, 2022), e com isso, as pessoas têm usado cada vez mais produtos de proteção solar para mitigar os efeitos nocivos dos raios UV. As formulações típicas de filtro solar contêm compostos químicos e físicos, ou seja, compostos orgânicos ou inorgânicos para cobrir todo o espectro ultravioleta solar (UVR - do inglês *ultraviolet radiation*) (Lawrence, Long, Young, 2019).

A maioria dos filtros UVR convencionais, apesar de terem inúmeros benefícios para a saúde, são moléculas estáveis e não biodegradáveis que, uma vez na água, podem afetar o fitoplâncton e o crescimento de algas (Tovar-Sánchez *et al.*, 2013). Esses compostos também foram associados a infecções virais que levam ao branqueamento de corais e necrose (Danovaro *et al.*, 2008; Downs *et al.*, 2014), e propriedades antiandrogênicas, causando alterações nas características sexuais secundárias em peixes machos (Weisbrod *et al.*, 2007). A exposição prolongada a certas formulações de filtros solares também tem sido apontada como a causa de vários distúrbios em humanos, incluindo hipersensibilidade de contato (Russo *et al.*, 2018), inflamação (Becker *et al.*, 2014), acúmulo sistêmico e distúrbios neurológicos (Ruszkiewicz *et al.*, 2017; Chatzigianni *et al.*, 2022). Assim, fica clara a necessidade de encontrar moléculas de proteção solar mais naturais e ecologicamente corretas.

Vários estudos apontam os MAAs como substitutos promissores para os protetores solares químicos disponíveis comercialmente devido ao seu potencial de proteger as células da pele contra danos induzidos por UV, ação antienvhecimento, cicatrização de feridas e efeitos anti-inflamatórios e regenerativos (Singh *et al.*, 2017, 2021; de la Coba *et al.*, 2019; Geraldés, Pinto, 2021).

Algumas empresas no mercado já comercializam extratos de MAAs para a produção de produtos cosméticos fotoprotetores. Por exemplo, a suíça Mibelle AG Biochemistry comercializa Helioguard 365[®] e Noriguard[®], extratos ricos em MAAs (principalmente porphyra-334, shinorina e palitina) extraídos da alga vermelha *Porphyra umbilicalis*. A empresa francesa Gelyma comercializa o produto Helionori[®], extrato semelhante ao anterior, obtido da mesma espécie de alga vermelha.

No presente estudo, usamos metabolômica baseada em espectrometria de massa para investigar o perfil de MAAs produzidos por uma biomassa de cianobactérias que ocorre, de forma perene há pelo menos seis anos, em um lago artificial. O extrato aquoso dessa biomassa, rico em MAAs, foi testado quanto à sua citotoxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina* e a linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT). Em seguida, também testamos o potencial de proteção UV deste extrato em células HaCaT expostas à luz UVR e o fator de proteção solar (FPS) que a adição desse extrato conferia a uma formulação fotoprotetora base.

Tudo isso com o objetivo de propor um destino sustentável e agregar valor a uma matéria-prima que, até o momento, representa um problema para os ecossistemas e para a saúde pública. A pesquisa também ajuda a explorar MAAs de diferentes ecossistemas, aumentando a diversidade de fontes dessas moléculas para aplicação industrial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta da biomassa

A amostra foi coletada em novembro de 2019 no lago artificial do Museu Mariano Procópio (21°44'S, 43°21'W, altitude 648 m), na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. A coleta foi feita em sete diferentes pontos do lago a uma profundidade entre 10 e 50 cm. Devido à alta densidade da biomassa, não foi necessário o uso de rede de fitoplâncton para concentração. O pH e a temperatura da amostra foram medidos no momento da coleta. As

amostras foram armazenadas em recipientes plásticos e mantidas sob refrigeração durante o transporte até o laboratório. No laboratório as amostras foram filtradas para retirada das sujidades maiores. A seguir, a biomassa foi seca por liofilização e a biomassa seca foi mantida a -20°C até a realização da extração.

4.2. Identificação do fitoplâncton

A identificação foi feita em parceria com o grupo de pesquisa do professor Dr. Marcelo Manzi Marinho (UERJ). As amostras frescas foram observadas em um microscópio óptico (400x e 1000x), e os grandes grupos taxonômicos de cianobactérias foram determinados seguindo os critérios de Van den Hoek e colaboradores (1995) e Komárek & Anagnostidis (1989, 1999, 2003, 2005).

4.3 Reagentes, meios de cultivo e linhagens celulares

Os reagentes acetonitrila, metanol, diclorometano (J. T. Baker[®], Mexico), ácido fórmico e formiato de amônio (Fluka[®], Alemanha) utilizados nos experimentos apresentavam grau de pureza HPLC. A água ultrapura foi obtida de um sistema do tipo MilliQ[®]. Os padrões de MAAs (palitina, shinorina, e porphyrina-334) foram isolados por nosso grupo de pesquisa e gentilmente cedidos pela Dra. Vanessa Sofia Mendes Geraldes.

O meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Invitrogen[®]), foi suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS - do inglês *fetal bovine serum*) (Sigma[®], Paraguai), e 1% (v/v) de solução de penicilina (10000 U/mL) + estreptomicina (10 mg/mL) (BioReagent[®], Sigma-Aldrich, EUA). O corante para o ensaio de proliferação celular (MTS) CellTiter 96[®] era da marca Promega[®], EUA. A solução de tampão fosfato-salino (PBS - do inglês *phosphate buffered saline*) foi preparada a partir da dissolução de tabletes Sigma-Aldrich[®], EUA, em água deionizada e autoclavada antes do uso. A linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) foi gentilmente cedida pelo grupo de

pesquisa do professor Dr. Simon Pitchford do Instituto de Ciências Farmacêuticas do *King's College London*, Reino Unido.

4.4. Produção do extrato orgânico

O extrato orgânico da biomassa coletada no lago do Museu Mariano Procópio foi produzido e processado da mesma forma como descrito no item 3.3 do Capítulo 2. Novamente, antes de serem analisados por LC-MS/MS, os extratos orgânicos foram ressuspendidos em MeOH (100%) e passaram pelo processo de *clean-up* empregando SPE.

4.5. Produção do extrato aquoso - extração dos MAAs

Como compostos polares, os MAAs tendem a ser melhor extraídos por solventes igualmente polares. Neste trabalho, a extração dos MAAs a partir da biomassa de cianobactérias foi feita com água acidificada, seguindo um protocolo desenvolvido e publicado por nosso grupo de pesquisa (Geraldês, Jacinavicius, *et al.*, 2020). Brevemente, 1g da biomassa liofilizada foi extraído com 100 mL de uma solução de H₂O + 0,1% (v/v) de ácido fórmico + 2 mM de formiato de amônio. A mistura foi sonicada em um aparelho de ultrassom por sonda (OMNI Sonic[®] Ruptor), a 30% de potência, durante 2 minutos para garantir a lise celular, e mantida em repouso durante 1h, à temperatura ambiente. O precipitado celular foi separado por centrifugação (10.000 RPM por 15 min) e o sobrenadante filtrado em filtro de seringa de PVDF com tamanho de malha de 0,22 µm. Este extrato foi utilizado nas análises de absorção do espectro UVR, nas análises metabolômica direcionada e não direcionada, nos ensaios biológicos de toxicidade aguda e viabilidade celular e nos ensaios *in silico* para medida do FPS.

4.6. Análise do extrato por UHPLC-QToF-MS/MS e metabolômica não direcionada

As análises por UHPLC-MS/MS e as análises metabolômicas não direcionadas do extrato orgânico foram realizadas como descrito nos itens 3.5 e 3.6 do Capítulo 2.

4.7. Análise do extrato por HPLC-QqQ-MS/MS - metabolômica direcionada

A detecção dos MAAs presentes no extrato aquoso de cianobactérias foi feita a partir de um método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *in tandem* (LC-MS/MS), desenvolvido e validado por nosso grupo de pesquisa (Geraldes, Jacinavicius, *et al.*, 2020). As amostras foram injetadas em um sistema de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo (QqQ) (6460 LC-MS Triple Quad Agilent Technologies®) com fonte de ionização por electrospray (ESI).

A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Synergi® 4 µ Hydro-RP 80 A° (150 × 2,0 mm) (Phenomenex®, EUA). As fases móveis foram: A = H₂O + 0,1% (v/v) de ácido fórmico + 2 mM de formiato de amônio e B = acetonitrila: H₂O (8: 2, v/v) + 0,1% (v/v) de ácido fórmico.

As amostras foram injetadas (10 µL) e eluídas a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min. O gradiente de separação foi, A: B 100: 0 (0 - 2 min), A: B 95: 5 (em 4 minutos), A: B 95: 5 (1,5 min), A: B 100: 0 (0,5 min), A: B 100: 0 (4 min). Tempo total da corrida 12 min.

As análises de MS foram realizadas monitorando duas transições (fragmento quantificador e fragmento qualificador) usando o modo MRM (monitoramento múltiplo de reações). As condições da fonte de ionização foram: modo positivo, temperatura do gás de secagem (nitrogênio) 350 °C, fluxo do gás de secagem 10 mL/min, pressão do nebulizador 45 psi, tensão capilar 3500 V. Os dados foram processados usando os softwares *Mass Hunter*® *Qualitative Analysis* e *Mass Hunter*® *Quantitative Analysis* (Agilent Technologies, EUA).

4.8. Espectro de absorção ultravioleta do extrato aquoso de cianobactérias

O espectro de absorção do extrato de cianobactérias foi medido entre 280 e 400 nm, usando um espectrofotômetro Jenway-7305-UV/Visible®. Para isso, o extrato de cianobactérias foi dissolvido em solução de PBS até a concentração final de 1000 µg/mL e as medidas foram realizadas em intervalos de 5 nm usando uma solução de PBS como branco.

4.9. Ensaios de toxicidade aguda dos extratos orgânico e aquoso de cianobactérias contra o microcrustáceo *Artemia salina*

Os ensaios de toxicidade com *Artemia salina* seguiram o mesmo protocolo descrito no item 3.7 do Capítulo 2. Resumidamente, em cada poço de uma placa de 96 poços foi adicionado 99 µL de solução artificial de água do mar contendo entre 10-20 náuplios de *A. salina* e 1 µL de amostra de extrato ou solução controle. As amostras foram testadas em triplicata nas concentrações: 0,1, 1, 10, 100, 500 e 1000 µg/mL. Dicromato de potássio foi utilizado como controle positivo (200 µg/mL) e dimetil sulfóxido (DMSO) (1%) como controle negativo. As placas foram incubadas a 25°C no escuro por 20-23h. A mortalidade foi calculada como a razão de náuplios mortos para o número total de náuplios no respectivo poço.

4.10. Cultura celular

O cultivo de células HaCaT, bem como os ensaios de viabilidade celular e de exposição à luz UV foram realizados durante o estágio de doutorado sanduíche, no *Institute of Pharmaceutical Sciences* do *King's College London*, sob a supervisão do Prof. Dr. Paul F. Long. As células HaCaT foram cultivadas em frascos de cultura de células T75 em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de FBS e 1% (v/v) de solução de penicilina-estreptomicina. As células foram incubadas em uma atmosfera umidificada, com 5% de CO₂

a 37 °C até atingir 70-80% de confluência. Após atingirem a confluência, foram transferidos para placas de 96 poços para os ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular.

4.11. Fonte de irradiação ultravioleta

A fonte de radiação UV foram as lâmpadas Dual Philips Ultravioleta-B TL 20W/12 RS, com saída UVR de UVB: 4 J/m²/s e UVA: 1,75 J/m²/s.

4.12. Ensaios de viabilidade celular

Depois de atingir 70-80% de confluência nos frascos T75, as células foram transferidas para placas de 96 poços a uma densidade de 6x10⁴ células/poço. As células foram mantidas na placa durante a noite, para aclimação, com 100 µL de meio DMEM suplementado com 1% de FBS e 1% de solução antibiótica. Após esse período, cada poço foi lavado com 100 µL de PBS e coberto com o extrato aquoso de cianobactérias dissolvido em PBS.

A viabilidade celular dos queratinócitos foi testada contra diferentes concentrações de extrato aquoso (0,01; 0,1; 1; 10; 100 e 1000 µg/mL). Como controle negativo, usamos células cultivadas em meio DMEM suplementado com 1% de FBS e 1% de solução antibiótica não expostas ao tratamento com extrato. Como controle positivo, foram utilizadas células expostas o DMSO (95%). Os experimentos foram realizados em sextuplicata.

4.13. Proteção contra morte celular induzida por exposição à radiação UV

Foram testadas diferentes concentrações de extrato e diferentes tratamentos para proteção UV. O extrato foi testado nas concentrações de 5, 50 e 500 µg/mL. Os diferentes tratamentos foram (i) extratos adicionados imediatamente antes da irradiação e (ii) extratos adicionados imediatamente após a irradiação. O controle negativo foi feito com células tratadas com a maior concentração de extrato testada e expostas à radiação; o controle positivo foi feito com células não tratadas e não irradiadas. Ainda, um branco foi feito

utilizando células não irradiadas expostas à maior concentração de extrato. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata.

As placas, com as tampas removidas, foram irradiadas por 10 min. Após a irradiação, o extrato de cianobactérias foi substituído pelo meio de cultura, quando adicionado previamente à irradiação; ou foi adicionado às células logo após a irradiação, a depender do delineamento experimental. A seguir, as placas foram incubadas por 24 horas.

A viabilidade celular foi medida 24 h após a irradiação usando o ensaio MTS. A solução de MTS foi adicionada às células (20 µL/poço) e as placas incubadas a 37°C, 5% CO₂, por 3 h. A densidade óptica foi medida a 490 nm usando um leitor de microplacas Spark Multimode® (Tecan, EUA). A quantidade de produto formazan, medida através da absorbância a 490 nm, é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura.

4.14. Medida do fator de proteção solar (FPS) in Vitro

A avaliação da eficácia fotoprotetora *in vitro* da formulação contendo o extrato aquoso da biomassa de cianobactérias estudada foi realizada em um espectrofotômetro de reflectância difusa com esfera de integração (Labsphere® UV Transmittance Analyser-2000S). Esses testes foram realizados no Laboratório de Cosmetologia do Departamento de Farmácia da FCF-USP, em parceria com o Prof. Dr. André Rolim Baby. Para os testes, o extrato de cianobactérias foi adicionado à formulação fotoprotetora base na concentração final de 10% p/p. A mesma formulação base foi utilizada como controle. A Tabela **3.1** descreve a composição da formulação fotoprotetora base e com adição do extrato de cianobactérias.

Tabela 3.1: Composição da formulação fotoprotetora base (controle) e com adição do extrato de cianobactérias.

Ingredientes	Concentração (% p/p)	
	Formulação controle	Formulação controle + extrato de cianobactérias
Aristoflex [®] AVC	2	2
Crodafol [®] CES	6	6
Metoxinamato de octila	10	10
Avobenzona	5	5
Phenova [®]	0.6	0.6
Extrato cianobacteriano	-	10
Água	q.s.*	q.s

*q.s. = quantidade suficiente

As formulações foram pesadas (0,0325 g) e aplicadas manualmente, formando uma camada fina e uniforme (1,3 mg/cm²), em placas de polimetilmetacrilato (PMMA, HD Helioplate[®] HelioScreen) com características para imitar a aspereza da pele humana (COLIPA - The European Cosmetic Association, 2011). Após 20 minutos de secagem, as absorvâncias foram medidas entre 290 e 450 nm em uma taxa de progressão de 1,0 nm, pelo software UV-2000[®]. Os valores foram medidos em 5 pontos de cada placa e os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados obtidos foram convertidos em valores de fator de proteção solar (FPS), e os comprimentos de onda crítico (λ_c) medidos. Uma placa de PMMA contendo glicerina foi usada como branco.

O método utilizado estima o FPS *in vitro*, a partir da Equação 2, descrita abaixo, onde: $E(\lambda)$ = espectro de ação eritematosa; $I(\lambda)$ = irradiância espectral da fonte UV; $A_o(\lambda)$ = média de absorvância monocromática por placa anteriormente à irradiação e $d\lambda$ = intervalo de comprimento de onda (1 nm) (COLIPA - The European Cosmetic Association, 2011).

$$in\ vitro\ SPF = \frac{\int_{\lambda=290\ nm}^{\lambda=400\ nm} E(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot d\lambda}{\int_{\lambda=290\ nm}^{\lambda=400\ nm} E(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot 10^{-A_o(\lambda)} \cdot d\lambda} \quad \text{Equação 2}$$

4.15. Determinação do fator de proteção UVA (FPUVA)

As formulações foram irradiadas em simulador solar, Atlas Suntest CPS+, previamente à segunda leitura no espectrofotômetro. A irradiância foi mantida a 580,08 W/m² (300-800 nm), correspondendo no UV a 55 W/m² (Dose= 198 kJ/m²). Para cada amostra, cinco registros de absorvância foram aferidos. O cálculo de FPUVA foi realizado de acordo com a equação 3, onde: I(λ) e dλ são definidos na equação 2; P(λ)= espectro de ação PPD; A(λ)= média de absorvância monocromática por placa posteriormente à irradiação; C= coeficiente de ajuste.

$$\text{UVAPF} = \frac{\int_{\lambda=320 \text{ nm}}^{\lambda=400 \text{ nm}} P(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot d\lambda}{\int_{\lambda=320 \text{ nm}}^{\lambda=400 \text{ nm}} P(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot 10^{-A(\lambda) \cdot C} \cdot d\lambda} \quad \text{Equação 3}$$

4.16 Análises estatísticas

Todos os dados foram expressos como a média ± DP (desvio padrão) onde n ≥ 3 replicatas experimentais. As análises estatísticas foram realizadas usando Graphpad Prism[®] 6.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA) ou software Origin Pro[®] (Origin Lab, Northampton, MA, EUA). Foram realizados o teste-t de Student, ANOVA, regressão linear e não linear. Um valor de P < 0,05 foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação do fitoplâncton

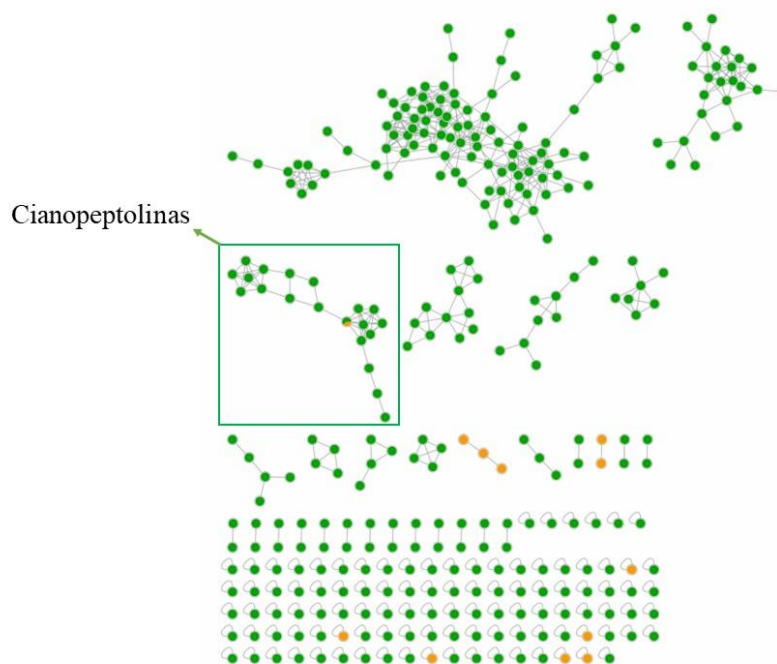
A microscopia eletrônica mostrou que as cianobactérias eram o componente principal do fitoplâncton (96,8 – 99,8%) na biomassa ambiental analisada. Quatro espécies de cianobactérias foram identificadas: (i) *Microcystis aeruginosa* (a mais abundante); (ii) *Microcystis panniformis*; (iii) *Pseudanabaena mucicola* (na mucilagem das colônias de *Microcystis aeruginosa*) e (iv) *Merismopedia tenuissima* (uma única colônia). A temperatura e pH da água no momento da coleta eram 23°C e 6,31 respectivamente.

5.2 Desreplicação e anotação dos extratos orgânico e aquoso da biomassa de cianobactérias estudada

Os dados de MS/MS dos extratos orgânico e aquoso da biomassa de cianobactérias investigada e das amostras de compostos padrão semeados foram analisados usando a ferramenta *Classic Molecular Network* do GNPS, como os mesmos parâmetros descritos no item 3.6 do Capítulo 2, para geração das redes moleculares.

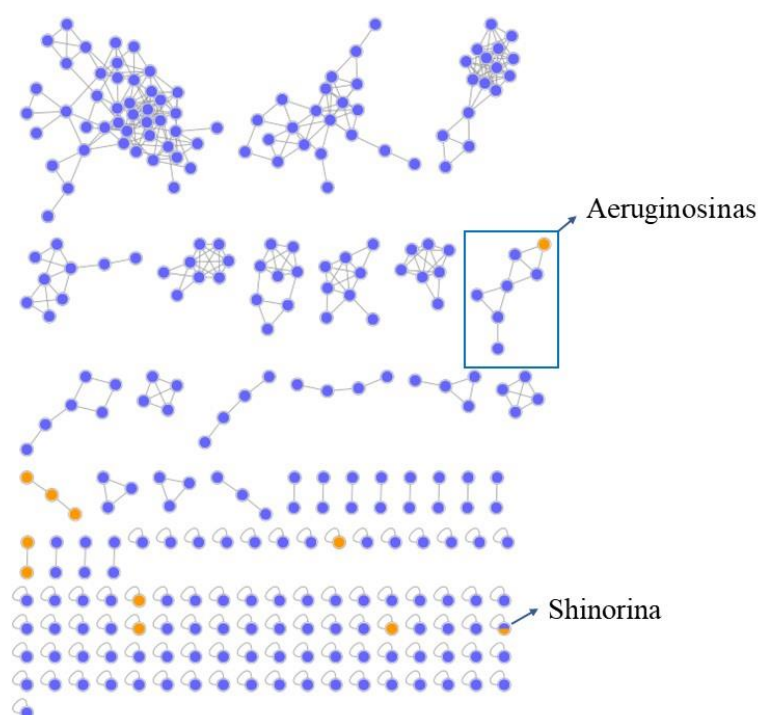
A rede molecular do extrato orgânico apresentou um total de 331 nodos. A procura por metabólitos secundários de cianobactérias atualmente classificados como cianotoxinas não mostrou a presença dessas toxinas no extrato orgânico investigado. A comparação com os dados de MS2 dos padrões revelou um *cluster* de compostos da classe das cianopeptolinas (CP). A rede molecular pode ser vista na Figura 3.4.

Figura 3.4: Rede molecular, gerada pelo GNPS, a partir dos dados de massa (MS/MS) das análises do extrato orgânico obtido a partir da biomassa investigada e padrões de compostos semeados. O *cluster* referente aos compostos da classe das cianopeptolinas está em destaque.



A rede molecular do extrato aquoso da biomassa apresentou um total de 278 nodos. A comparação com os dados de MS2 dos padrões revelou um *cluster* de compostos da classe das aeruginosinas (AER) e um composto da classe dos aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs). Nesta amostra também não foram encontrados metabólitos secundários de cianobactérias classificados como cianotoxinas. Figura 3.5.

Figura 3.5: Rede molecular, gerada pelo GNPS, a partir dos dados de massa (MS/MS) das análises do extrato aquoso obtido a partir da biomassa investigada e padrões de compostos semeados. Em destaque *cluster* de compostos da classe das aeruginosinas e nodo de um composto do tipo aminoácido do tipo micosporina (MAA).



Fonte: Arquivo gerado no software CytoScape®.

Legenda: nodos azuis: *features* presentes nos extratos, nodos laranjas: *features* geradas pelos espectros de padrões semeados junto com as amostras.

5.3 Identificação dos MAAs presentes no extrato aquoso

A análise direcionada do extrato aquoso de cianobactérias através do modo MRM do equipamento LC-MS revelou a presença de seis diferentes MAAs: porphyra-334 m/z 347 $[M+H]^+$, shinorina m/z 333 $[M+H]^+$, ácido palitênico m/z 329 $[M+H]^+$, palitinol m/z 303 $[M+H]^+$, asterina-330 m/z 289 $[M+H]^+$ e usujireno m/z 285,000 $[M+H]^+$. A Figura 3.6 mostra um exemplo do cromatograma com os espectros dos íons quantificador e qualificador para

o MAA porphyrina-334. Os íons precursor e quantificador de cada composto, juntamente com o tempo de retenção estão organizados na Tabela 3.2. A estrutura molecular dos MAAs encontrados está ilustrada na Figura A3 do Apêndice.

Figura 3.6: Cromatograma e espectros dos íons qualificador (a) e quantificador (b) do aminoácido do tipo micoporina porphyrina-334 encontrado no extrato aquoso da biomassa de cianobactérias obtido em um equipamento do tipo LC-QqQ-MS no modo MRM.

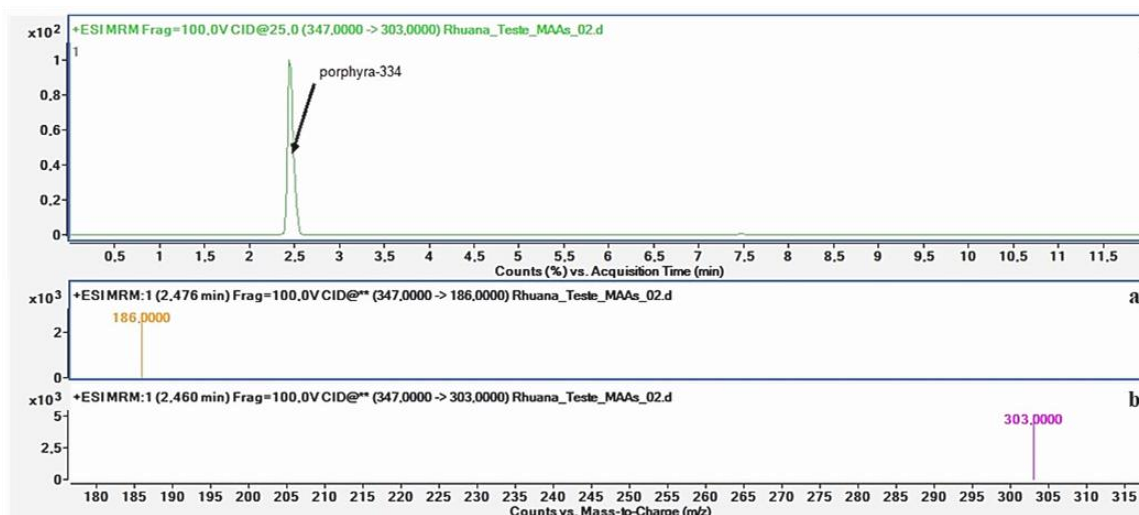


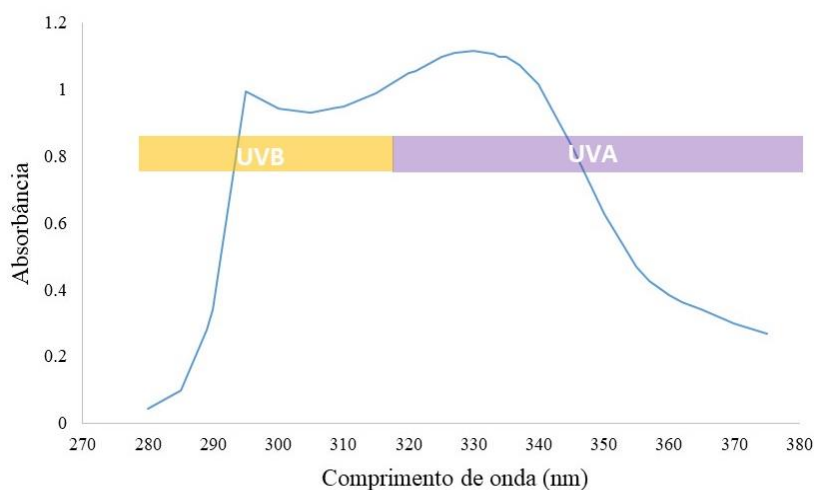
Tabela 3.2: Aminoácidos do tipo micoporinas (MAAs) encontrados no extrato aquoso da biomassa ambiental de cianobactérias estudada, com os íons precursor, qualificador e quantificador (m/z) usados para monitorar as transições específicas de cada MAA e o tempo de retenção de cada composto.

Íon precursor (m/z)	Composto putativo	Fragmento qualificador (m/z)	Fragmento quantificador (m/z)	Tempo de retenção (min)
347	porphyrina-334	186	303	2,5
333	shinorina	186	230	1,5
329	ácido palitênico	197	283	2,5
303	palitíno	189	288	2,5
289	asterina-330	186	230/274	1,8
285	Usujireno (cis isômero)	197	226/241	2,5

5.4. Espectro de absorção ultravioleta do extrato aquoso

O espectro de absorção UV do extrato aquoso (Figura 3.7) mostra uma maior absorbância na região UVA, com um pico na região UVA (320-400 nm) e outro na região UVB (295 nm).

Figura 3.7: Espectro de absorção do extrato da biomassa de cianobactérias diluído em solução de tampão fosfato (PBS) na concentração final de 1000 µg/mL.



5.5 Análise de toxicidade aguda dos extratos orgânico e aquoso de cianobactérias contra o microcrustáceo *Artemia salina*

Os resultados dos testes de toxicidade aguda com *A. salina* são apresentados na Tabela 3.3. A maior taxa de mortalidade apresentada ficou em torno de 12%, com os náuplios expostos à concentração de 1 µg/mL do extrato orgânico. O extrato aquoso, mesmo em sua maior concentração (1000 µg/mL) não causou mortalidade dos náuplios. Como nenhum dos extratos foi capaz de causar a mortalidade de mais de 50% dos náuplios durante o experimento, podemos inferir que a concentração letal média (LC₅₀) é maior do que 1000 µg/mL. O controle positivo apresentou 100% de letalidade, enquanto o controle negativo (1% DMSO) e o branco (água do mar artificial) não apresentaram toxicidade.

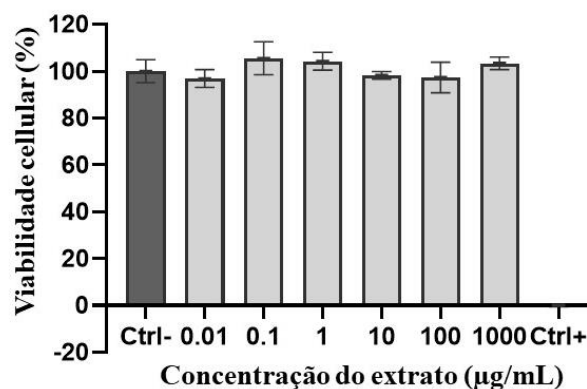
Tabela 3.3: Mortalidade (%) dos náuplios de *A. salina* quando expostos a diferentes concentrações de extrato aquoso obtido a partir da biomassa de cianobactérias estudada.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Mortalidade (%) \pm DP*	
	Extrato orgânico	Extrato aquoso
0,1	5,6 \pm 9,6	0,0 \pm 0
1	12,3 \pm 11,0	0,0 \pm 0
10	2,1 \pm 3,6	0,0 \pm 0
50	5,6 \pm 5,1	0,0 \pm 0
100	0,0 \pm 0	0,0 \pm 0
500	5,1 \pm 3,6	0,0 \pm 0
1000	2,8 \pm 4,8	0,0 \pm 0

5.6. Ensaios de viabilidade celular com células HaCaT

Os ensaios de viabilidade celular mostraram que o extrato aquoso da biomassa de cianobactérias não foi citotóxico para células HaCaT nas concentrações testadas (0,01–1000 $\mu\text{g/mL}$). A Figura 3.8 mostra a viabilidade celular após um período de exposição de 24h.

Figura 3.8: Viabilidade celular das células de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) após 24h de exposição a diferentes concentrações do extrato aquoso da biomassa de cianobactérias estudada. As colunas representam a média \pm desvio padrão (DP) (n=6). O controle negativo (Ctrl-) foi feito com células não tratadas em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e o controle positivo (Ctrl+) com células expostas a dimetilsulfóxido (DMSO) (90%).

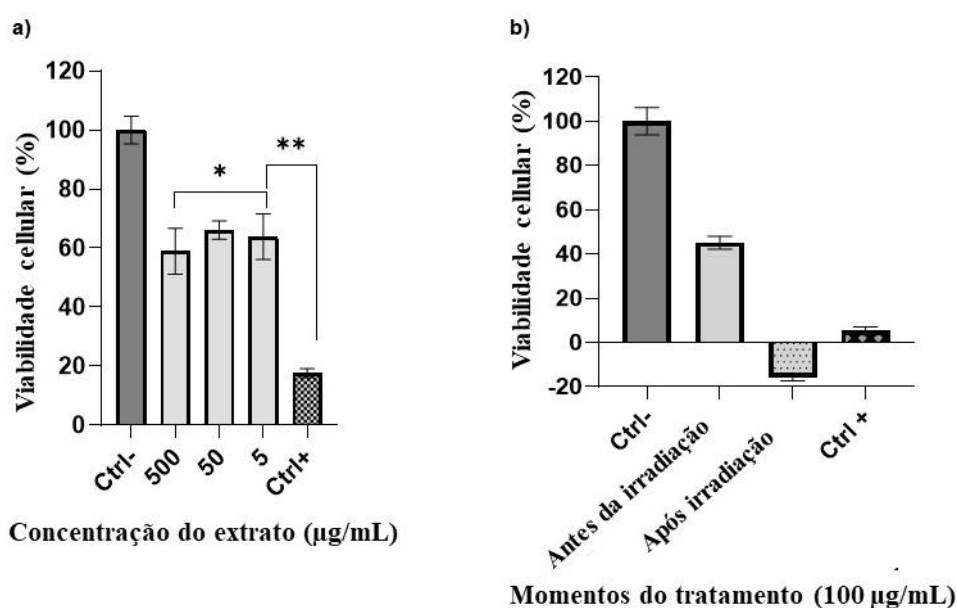


5.7. Inibição da morte celular induzida por exposição à radiação UV

Os ensaios de viabilidade celular mostraram que o extrato de cianobactéria inibiu a morte celular induzida por UV em todas as concentrações testadas (5-500 $\mu\text{g/mL}$). Conforme mostrado na Figura 3.9a, a viabilidade celular aumentou significativamente nas células tratadas com o extrato em comparação com o controle não tratado ($p < 0,05$). Entretanto, não houve significância estatística ($p > 0,05$) na viabilidade entre as diferentes concentrações.

Quando examinados os diferentes tempos de aplicação do extrato de cianobactérias a adição de 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato antes da irradiação manteve a melhora na viabilidade celular em comparação com o controle não tratado. No entanto, adicionar a mesma concentração de extrato de cianobactérias após a exposição à luz UV não aumentou a viabilidade dos queratinócitos. A Figura 3.9b ilustra esses resultados.

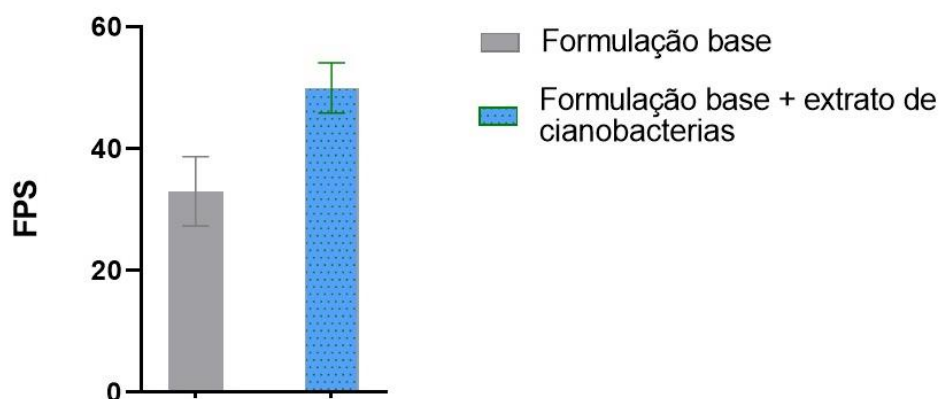
Figura 3.9: Viabilidade celular das células de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) após exposição à luz UV em diferentes concentrações de tratamento (a) e diferentes momentos do tratamento (b). Em (a) os queratinócitos HaCaT foram tratados com diferentes concentrações de extrato de cianobactérias e expostos à luz UV por 10 min. Em (b) células HaCaT tratadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato da cianobactéria imediatamente antes e logo após a irradiação. As colunas representam a média \pm desvio padrão (DP) ($n=4$ para a, $n=5$ para b). Ctrl- são as células tratadas com maior concentração de extrato e não irradiadas, Ctrl+ são as células irradiadas sem tratamento. * $p > 0,05$, ** $p < 0,05$.



5.8. Avaliação do fator de proteção solar (FPS) e fator de proteção UVA (FPUVA) *in vitro*

A formulação fotoprotetora base (controle) apresentou FPS *in vitro* igual a $33,66 \pm 5,7$, coeficiente de variação (CoV) = 17,7%. Quando o extrato de cianobactérias foi adicionado à essa mesma formulação (10,0% - p/p), o FPS foi aumentado para $50,95 \pm 4,1$, CoV = 8,1%. Os valores médios de FPS medidos para cada formulação podem ser vistos na Figura 3.10. O comprimento de onda crítico médio foi de 384 nm. Durante os testes de proteção UVA, o sistema controle teve seu FPS reduzido de 33,66 para $6,15 \pm 0,33$; com valor médio de FPUVA igual a 3, UVA/UVB= 0,48. Já o sistema com adição do extrato de cianobactérias teve seu FPS reduzido de 50,95 para $21,23 \pm 6,45$, com valor médio de FPUVA igual a 6, UVA/UVB= 0,28.

Figura 3.10: Gráfico dos valores de fator de proteção solar (FPS) medidos antes e após a adição do extrato aquoso da biomassa de cianobactérias investigada.



6. DISCUSSÃO

A identificação do fitoplâncton da biomassa de cianobactérias investigada mostrou a predominância das espécies *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis panniformis*. O gênero *Microcystis* é amplamente reconhecido por sua capacidade de produzir cianotoxinas, especialmente microcistinas. No entanto, a análise metabolômica não direcionada não revelou a presença dessas ou de outras moléculas classificadas como cianotoxinas nos

extratos estudados. Alguns autores afirmam que variações temporais na toxicidade de florações cianobacterianas são comuns e estão associadas às condições ambientais, à composição de espécies dessa biomassa e à flutuação de clones (Molica, Azevedo, 2009). As análises metabolômicas não direcionadas mostraram a presença de cianopeptídeos da classe das CP no extrato orgânico e da classe das AER no extrato aquoso da biomassa investigada.

A identificação dos MAAs no extrato aquoso da biomassa de cianobactérias foi realizada através da metabolômica direcionada, utilizando o método de MRM de LC-MS/MS. Essas análises revelaram a presença de seis diferentes MAAs (porphyra-334, shinorina, ácido palitênico, palitinol, asterina-330 e usujireno) nas amostras. O perfil de MAAs em uma amostra varia de acordo com muitos fatores, como grupos taxonômicos e condições ambientais, como luz, temperatura, salinidade e nutrientes (Geraldês, Pinto, 2021). Estudos apontam a shinorina como o principal MAA produzido por cianobactérias mas também é comum a produção de diferentes MAAs por uma mesma cepa (Geraldês, Jacinavicius, *et al.*, 2020). A mistura de diferentes MAAs, com máximos de absorção em diferentes comprimentos de onda, permitem um filtro protetor mais eficaz (Lawrence *et al.*, 2018) uma vez que é possível abranger uma região maior do espectro UV.

Em um estudo abrangente que investigou a produção de MAAs por 69 cepas de cianobactérias isoladas e cultivadas em laboratório, Geraldês e colaboradores (2020) encontraram ao todo 9 MAAs diferentes. No entanto, ao contrário do que os nossos resultados revelaram, nenhuma das cepas de *Microcystis* sp analisada se mostrou produtora de MAAs. Hu e colaboradores (2018), ao investigarem o metabolismo de uma cepa de *Microcystis aeruginosa* coletada diretamente de uma floração ambiental apontaram a produção de shinorina por essa espécie e mostraram que este MAA estava localizado exclusivamente na matriz extracelular.

No presente estudo, todos os MAAs detectados pertencem ao grupo das iminomicosporinas. Este grupo é o mais comumente produzido por cianobactérias (Sinha, Häder, 2008), contém um anel aminociclohexenimina e tem absorção máxima entre 320 e 360 nm (Carreto, Carignan, 2011). O extrato aquoso de cianobactérias testado demonstrou absorvência significativa em uma ampla faixa de luz UVB e UVA (295-345 nm) com picos em 295 nm e entre 320-340 nm.

Estudos mostram que o conteúdo de MAAs em uma biomassa varia de acordo com o(s) grupo(s) taxonômico(s) presente(s) nela e que a coexistência de diferentes MAAs, com máximos de absorção em diferentes comprimentos de onda, abrangeriam uma maior faixa de proteção UV (Chrapusta *et al.*, 2017). Assim, espera-se que a utilização de uma mistura de diferentes MAAs em uma formulação de filtro solar colabore para uma cobertura mais ampla de proteção contra a radiação UV. A radiação UV é um dos fatores de maior influência para o acúmulo de MAAs por cianobactérias (Rosic, 2019). A variabilidade e a intensidade espectrais podem resultar em mudanças no perfil de MAAs dos organismos, e essas variabilidade e alta intensidade ocorrem naturalmente no ambiente, especialmente em ecossistemas tropicais. Além disso, a combinação de diferentes MAAs também pode melhorar a estabilidade da formulação (Wada, Sakamoto, Matsugo, 2015). Esses fatores, fazem da biomassa ambiental de cianobactérias uma promissora fonte de MAAs para a indústria cosmética. É fundamental ressaltar no entanto, que a eficácia da mistura de MAAs em uma formulação de filtro solar dependerá da concentração e proporção dos diferentes MAAs utilizados, bem como dos demais ingredientes da formulação (Bhatia *et al.*, 2011; Gacesa *et al.*, 2018; Lawrence, Long, Young, 2019).

Nos ensaios de toxicidade aguda contra *A. salina* o extrato aquoso de cianobactérias não demonstrou toxicidade nas concentrações testadas (0,01–1000 µg/mL). Os valores

obtidos classificam esse extrato como não tóxico segundo os critérios de Nguta e colaboradores (2011).

Temos de ressaltar, contudo, que as análises metabolômicas não direcionadas mostraram a presença de compostos das classes das cianopeptolinas (CP) e aeruginosinas (AER) nos extratos da biomassa investigada. Como discutido no capítulo 2, alguns compostos dessas classes possuem atividade inibitória contra serino proteases e já demonstraram toxicidade em testes com organismos aquáticos (Scherer, Bezold; Gademann, 2016; Faltermann *et al.*, 2014). Estudos afirmam que os diferentes congêneres de cianopeptídeos de cada uma dessas classes podem exibir graus de atividade inibitória diversos contra as serino proteases (Ersmark, Del Valle and Hanessian, 2008; Mazur-Marzec *et al.*, 2018). Seja porque as variantes encontradas nos extratos não exibem alto grau de inibição contra as enzimas citadas, ou porque não estavam em concentração suficiente para gerarem efeitos biológicos, os extratos testados não demonstraram toxicidade, nas concentrações testadas, nos ensaios realizados neste estudo.

De acordo com Lee, Chen, Chou (1999), os ensaios de toxicidade com *A. salina* são considerados um método confiável para detectar a toxicidade de alguns cianopeptídeos. Além disso, os organismos desse gênero atuam como um elo trófico entre comunidades planctônicas e cadeias superiores (Pimentel *et al.*, 2011). Embora preliminar, esse resultado é promissor porque há uma preocupação crescente com os danos aos delicados ecossistemas marinhos que alguns dos produtos químicos usados em formulações de proteção solar podem causar (Danovaro *et al.*, 2008; Tovar-Sánchez *et al.*, 2013; Chatzigianni *et al.*, 2022). Extratos de produtos naturais podem ser uma alternativa biocompatível aos compostos atualmente utilizados (Lawrence; Long; Young, 2019).

Nos ensaios de viabilidade celular, o extrato aquoso de cianobactérias não mostrou citotoxicidade para queratinócitos nas concentrações testadas (0,01–1000 µg/mL). Uma boa

correlação foi demonstrada entre HaCaT e queratinócitos primários em modelos *in vivo* (Afaq *et al.*, 2007; Lawrence *et al.*, 2018). Estudos demonstram que linhagens celulares imortalizadas de origem epitelial, como HaCaT, podem fornecer resultados informativos sobre a segurança dos produtos em relação à saúde humana (Rusanov, Luzgina, Lisitsa, 2017). Neste trabalho, a viabilidade celular das células HaCaT após exposição ao extrato de cianobactérias não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao controle sem células tratadas, indicando que o extrato não causou toxicidade nas concentrações testadas.

O extrato de cianobactéria também inibiu a morte celular induzida por exposição à luz UV. O tratamento com o extrato aumentou a viabilidade celular (~40%) na faixa de concentrações testadas (5-500 $\mu\text{g/mL}$), não apresentando diferença significativa entre os grupos tratados com diferentes concentrações do extrato ($p < 0,05$). Investigando o efeito de MAAs isolados na sobrevivência de células WI-38 irradiadas com UV, Oyamada e colaboradores (2008) encontraram um aumento na viabilidade celular dependente da concentração de MAAs. O aminoácido shinorina apresentou um aumento de viabilidade de aproximadamente 40% na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ e chegou a quase 60% na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$. A exposição ao composto porphyra-334 proporcionou um aumento na viabilidade (~60%) na concentração de 34 $\mu\text{g/mL}$. O melhor resultado foi apresentado pelo composto micosporina-glicina que aumentou a viabilidade celular em aproximadamente 60% na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Lawrence e colaboradores (2018) também demonstraram uma inibição da morte celular induzida por um sistema de simulação da luz solar em células HaCaT tratadas com uma solução de palitina. A porcentagem de inibição foi em torno de 50%, mas não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações (0,3-10% v/v) testadas.

O potencial antioxidante de alguns MAAs é documentado na literatura. Essas moléculas podem proteger a célula contra a radiação UV não apenas absorvendo fótons de

alta energia e dissipando energia como calor, mas também eliminando espécies reativas de oxigênio (Chrapusta *et al.*, 2017; Ngoennet *et al.*, 2018; Kageyama, Waditee-Sirisattha, 2019; Lawrence, Long, Young, 2019). Neste trabalho, testamos diferentes momentos de exposição ao extrato rico em MAAs. A adição de extrato logo após a irradiação não mostrou efeito positivo na viabilidade celular, que foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que o grupo não tratado. No trabalho de Lawrence e colaboradores (2018) a adição de uma solução de palitina (10% v/v) adicionada imediatamente após a irradiação inibiu significativamente a produção de espécies oxidantes. Os autores afirmam que isso ocorre devido ao seu potencial antioxidante. De La Coba e colaboradores (2019) demonstraram que, apesar do potencial antioxidante descrito, alguns MAAs não possuem essa propriedade ou podem ter atividade antioxidante sutil, principalmente em pH próximo ou abaixo da neutralidade. Em nosso trabalho, o extrato de cianobactérias não aumentou a viabilidade celular no tratamento realizado após a irradiação. Uma explicação possível é de que a irradiação tenha sido muito intensa e tenha causado danos irreversíveis às células.

Durante a medida do fator de fotoproteção, a adição do extrato aquoso de cianobactéria a 10,0% p/p nas células aumentou o valor do FPS da formulação fotoprotetora base (Avobenzona e Octil Metoxicinamato) de 33 para 51 (aproximadamente 54%). Além disso, mesmo após a exposição à irradiação, a formulação contendo o extrato cianobacteriano manteve os melhores resultados para esse parâmetro (queda de 58% no valor do FPS da formulação com extrato de cianobactérias contra uma queda de 81% no controle). Os coeficientes de variação (CoV) para todas as medições foram inferiores a 20%, conforme recomendado pela legislação (COLIPA - The European Cosmetic Association, 2011; ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012).

O FPS por si só é um indicador apenas para a proteção UV solar capaz de causar eritema, restrito principalmente à radiação UVB (290–320 nm) e UVA de comprimento de

onda parcialmente curto (320 – 340 nm). Assim, esse valor por si só não fornece informações sobre proteção contra UVA de comprimento de onda longo (340–400 nm) (Hojerová, Medovčíková, Mikula, 2011), que pode causar fotoenvelhecimento, perda de elasticidade e outros problemas (Velasco *et al.*, 2008). A medição do comprimento de onda crítico ($c\lambda$) é um parâmetro que descreve se o produto fotoprotetor atingiu um amplo espectro de ação. É definido como o comprimento de onda no qual a área sob a curva fornece 90% da absorção total da amostra entre 290–400 nm. Em nosso estudo, a formulação fotoprotetora contendo o extrato da cianobactéria apresentou $c\lambda = 384$ antes do processo de irradiação UVA e $c\lambda = 372$ nm após a irradiação.

De acordo com o órgão *Food and Drug Administration* (FDA), um protetor solar ideal deve ter um valor mínimo de FPS de 15 e deve ter um $c\lambda$ igual ou superior a 370 nm para ser considerado de amplo espectro (Food and Drug Administration, 2012). A Comissão de recomendação da União Europeia e a ANVISA recomendam o mesmo valor mínimo para o comprimento de onda e acrescentam que, a proteção contra a radiação UVA e UVB devem estar relacionados. Assim, um aumento do fator de proteção solar UVB deve incluir um aumento na proteção UVA e que o valor do FPUVA deve ser pelo menos um terço ($1/3$) do FPUVB (EU, 2006; ANVISA, 2022). A formulação contendo extrato de cianobactéria testada neste estudo apresenta $c\lambda$ maior que 370 nm e FPS maior que 15, mesmo após a exposição à irradiação, contudo o valor de FPUVA medido (6) não chega a um terço do FPUVB (50).

7. CONCLUSÃO

Metabólitos secundários produzidos por cianobactérias ainda são uma fonte pouco explorada de compostos bioativos. A biomassa de cianobactérias pode ser considerada uma fonte de diferentes compostos de alto valor agregado para múltiplas propostas. Na presente

investigação, demonstramos o potencial biotecnológico de uma biomassa de cianobactérias coletada em um reservatório de água, a partir da exploração de MAAs. Esses MAAs, compostos naturais bem descritos na literatura principalmente por suas propriedades de proteção solar, têm apresentado o potencial para serem utilizados pela indústria cosmética. O extrato aquoso da biomassa estudada mostrou a presença de 6 diferentes MAAs e melhorou a viabilidade celular da linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) quando expostos à luz ultravioleta, mesmo em baixas concentrações ($\mu\text{g/mL}$). A adição do extrato a um sistema fotoprotetor base também aumentou o fator de proteção desse sistema em mais de 50%. Além disso, o extrato não apresentou (eco)toxicidade nos ensaios realizados com células HaCaT e o microcrustáceo *A. salina* nas concentrações testadas.

É importante ressaltar que os resultados apresentados tratam de ensaios com um extrato bruto de biomassa ambiental, com presença de diversos compostos além dos MAAs, alguns deles com potencial toxicológico ainda não bem descritos pela literatura. A aplicação e possível utilização de um extrato proveniente de uma biomassa de cianobactérias pela indústria ainda necessitaria de uma série de etapas e estudos adicionais, entre elas, o isolamento dos compostos de interesse. No entanto, os resultados aqui apresentados são promissores e reforçam a viabilidade do uso e aproveitamento de biomassas ambientais, que podem transformar o que antes era apenas um problema ambiental em um produto com valor agregado. Esse potencial cria uma situação favorável para a sustentabilidade e o meio ambiente, mostrando-se como uma perspectiva promissora para o futuro.

Capítulo 4 - Considerações gerais e produção acadêmica

1. CIANOBACTÉRIAS: FLORAÇÕES, MONITORAMENTO AMBIENTAL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E PERSPECTIVAS FUTURAS

As cianobactérias podem atingir densidades altas, formando densas florações em poucos dias ou semanas. Embora os eventos de floração ocorram também em condições naturais (Trout-Haney, Wood, Cottingham, 2016), o aquecimento global e as altas cargas de nutrientes que chegam aos reservatórios devido à ação antrópica são apontadas como as principais causas do aumento mundial na proliferação, frequência, severidade e duração de eventos de floração de cianobactérias em todo o mundo (Ferranti *et al.*, 2013; Grabowska *et al.*, 2014; Mazur-Marzec *et al.*, 2018; Janssen, 2019; Macário *et al.*, 2021).

As florações de cianobactérias têm efeitos deletérios no ecossistema e nas atividades humanas, incluindo maior consumo de oxigênio devido à decomposição da biomassa, restrição de atividades recreativas, uso limitado da água para a agricultura e a possível produção de toxinas que traz a necessidade de medidas técnicas adicionais para fornecer água potável segura (Molica, Azevedo, 2009; Hilborn *et al.*, 2014; Beasley, 2020). O aumento na frequência e duração das florações chamam a atenção para a necessidade urgente de melhores estratégias para lidar com essas florações (Macário *et al.*, 2021), tanto do ponto de vista do monitoramento ambiental, quanto do ponto de vista sanitário e de manejo e controle.

Apesar de a produção de toxinas por cianobactérias ocorrer em reservatórios de águas doces em todo o mundo, nosso conhecimento sobre os riscos potenciais dos metabólitos secundários produzidos por esses organismos ainda é limitado (Janssen, 2019). Até o momento, apenas alguns metabólitos bioativos são classificados como tóxicos, e se restringem às estruturas discutidas no Capítulo 2 deste trabalho. No entanto, as cianobactérias produzem uma incrível diversidade de centenas de cianopeptídeos, e fica impossível não levantar a questão: os demais cianopeptídeos não representam, de fato, risco à saúde humana e aos ecossistemas ou faltam estudos que investiguem esse papel?

Estudos recentes mostram que outros cianopeptídeos, incluindo cianopeptolinas e anabaenopeptinas, podem ocorrer com a mesma frequência e em concentrações semelhantes às microcistinas durante eventos de floração (Beverdorf *et al.*, 2017). Muitos desses cianopeptídeos são inibidores enzimáticos. Por exemplo, alguns compostos das classes das cianopeptolinas e aeruginosinas são inibidores de serino-proteases e podem ter efeitos na coagulação sanguínea (Kodani *et al.*, 1999; Schreuder *et al.*, 2016). Algumas microgininas, inibem a enzima conversora de angiotensina (ECA) envolvida na regulação da pressão arterial (Okino *et al.*, 1993; Kodani *et al.*, 1999).

Ainda, para além das toxinas, como mencionado anteriormente, os metabólitos secundários produzidos por cianobactérias apresentam uma ampla diversidade de estruturas (Moore, 1996; Burja *et al.*, 2001; Staunton, Weissman, 2001; Silva-Stenico *et al.*, 2015) e têm potencial biotecnológico para serem explorados comercialmente na agricultura, aquicultura, biorremediação, biocombustíveis, nutracêuticos e produtos farmacêuticos (Ananya, Ahmad, 2014; Suganya *et al.*, 2016; Rizwan *et al.*, 2018).

Esse potencial levanta mais uma questão: considerando a necessidade premente de governos e órgãos ambientais em melhorar as estratégias de gestão de florações de cianobactérias em reservatórios para garantir a qualidade da água, a exploração comercial dessas florações pode ser uma estratégia sustentável de apoio ao manejo de corpos d'água afetados?

Baseando-se especialmente na evolução das técnicas para sequenciamento genômico, diversos autores afirmam que o potencial biossintético das cianobactérias ainda é pouco explorado (Wilkinson, Micklefield, 2007; Challis, 2008; Singh *et al.*, 2017; Morone *et al.*, 2019). Isso porque, em condições padronizadas de cultura em laboratório, pode ocorrer que apenas uma fração do potencial biossintético seja expresso e, portanto, apenas algumas estruturas químicas sejam produzidas (Scherlach, Hertweck, 2009; Wasil *et al.*, 2013).

Outros trabalhos supõem que a produção de metabólitos secundários resulta da interação de um organismo com seu ambiente e que quanto mais desafiador esse ambiente, maior a diversidade de produtos naturais sintetizados por esses organismos (Scherlach; Hertweck, 2009). Assim, é provável que a biosfera não cultivada tenha um potencial biossintético muito maior, especialmente onde nichos ecológicos favorecem a produção de compostos com atividades terapêuticas (Kwan, 2018).

Por conta disso, diferentes abordagens no cultivo e na procura de metabólitos secundários de microrganismos têm sido propostas (Scherlach, Hertweck, 2009). E despontam trabalhos na literatura que avaliam a possibilidade do aproveitamento comercial da biomassa ambiental de cianobactérias (Macário *et al.*, 2021; Massa *et al.*, 2022).

Os principais desafios na investigação do perfil químico de uma biomassa complexa, tanto no âmbito da avaliação de risco quanto no âmbito do aproveitamento biotecnológico, são a grande diversidade estrutural dos cianopeptídeos produzidos por cianobactérias, a falta de padrões de referência e os altos requisitos analíticos para identificação e quantificação de compostos em matrizes ambientais (Janssen, 2019).

Nesse cenário, as ferramentas metabolômicas e bioinformáticas se apresentam como abordagens altamente eficazes para a identificação de compostos tóxicos em estudos de avaliação de risco ambiental, proporcionando uma análise mais ágil e reduzindo o consumo de reagentes. Ainda, em estudos de desreplicação e caracterização, essas ferramentas permitem a priorização de compostos com potencial para serem explorados comercialmente. O uso dessas metodologias, como mostrado por esse trabalho, pode ajudar a responder às perguntas levantadas e obter respostas mais precisas e abrangentes para o entendimento e uso de biomassas de cianobactérias ambientais, transformando o que até agora é apenas um problema ecológico em fonte de moléculas bioativas através de um manejo seguro e sustentável.

2. REALIZAÇÕES ACADÊMICAS DURANTE O DOUTORADO

Artigos em periódicos

MEDICE, R. V.; ARRUDA, R.S.; JAEWON, Y.; BORGES, R. M.; LURLING, M.; MARINHO, M. M.; CRNKOVIC, C. M.; PINTO, E. *Primary Screening of Cyanobacteria biomass from a Tropical Reservoir: Biological Activity and Metabolomics Analyses. Environmental science and pollution research - submetido*

Innovative strategies for cyanobacteria bloom management: exploiting the biotechnological potential of biomass from a tropical reservoir. Em preparação

Unveiling Hidden Risks: Exploring Cyanobacteria and Secondary Metabolites in Tilapia Floating Cage Fish Farms. Co-autoria - em preparação.

Unmasking the Hidden Threat: Ecotoxicological Impact of Secondary Metabolites from a Microcystin-Free Microcystis aeruginosa Strain on Key Aquatic Invertebrates. Co-autoria - em preparação.

Capítulo de livro

MÉDICE, R.V.*; WEISS, M.N.*; JACINAVICIUS, F.R.; PINTO, E.; CRNKOVIC, C.M. Metabolomics applied to cyanobacterial toxins and natural products. In: **Microbial Natural Products Chemistry: An omics approach**; Fill, T.P., Ed; Springer Nature. ISBN: 3031417410, 9783031417412.

Resumos publicados em anais de congressos

MACHADO, M.J.; MÉDICE, R.V.; DEXTRO, R.B.; WEISS, M. B.; CRKOVIC, C.M.; FIORE, M.F. Metabolic potential of cyanobacterial strains isolated from Pantanal soda lakes. In: **3º Congresso Latinoamericano de Ecologia Microbiana - ISME-LAT 2023 – Conference program, 2023.**

MEDICE, R. V.; CRNKOVIC, C. M.; Pinto, E. Characterization and bioprospecting of cyanobacterial biomass in Brazilian water reservoir aiming at their biotechnological potential. In: **7th Early Career Researcher Symposium on Cyanobacteria, 2022, Leipzig. Cyano2022 - Conference Program, 2022. p. 25-25.**

BUENO, M. G. S.; WEISS, M. B.; MEDICE, R. V.; Pinto, E.; CRNKOVIC, C. M. Assessment of Acute Toxicity of Cyanobacterial Extracts Using the Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. In: **24th Week of Pharmaceutical Science and Technology School of Pharmaceutical Sciences University of São Paulo, 2021, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP, 2021. v. 57. p. 16-16.**

MEDICE, R. V.; CRNKOVIC, C. M.; Pinto, E. Characterization of Cyanobacterial Biomass in Bloom Episodes for Its Biotechnological Potential. In: **SETAC Latin America 14th Biennial Meeting, 2021**, Virtual. Abstract Book - SETAC Latin America 14th Biennial Meeting, 2021.

Apresentações de trabalho

MEDICE, R. V.; ARRUDA, R.S.; JAEWON, Y.; BORGES, R. M.; LURLING, M.; MARINHO, M. M.; CRNKOVIC, C. M.; PINTO, E. Primary Screening of Cyanobacteria Biomass From a Brazilian Reservoir: Biological Activity and Metabolomics Analyses of Crude Extracts. In: **SETAC Latin America 15th Biennial Meeting, September 2023** - Montevideo, Uruguay.- Trabalho aceito para apresentação oral

MEDICE, R. V.; CRNKOVIC, C. M.; Pinto, E. Characterization and bioprospecting of cyanobacterial biomass in Brazilian water reservoir aiming at their biotechnological potential. 2022. In: **7th Early Career Researcher Symposium on Cyanobacteria, 2022, Leipzig, Cyano2022** - Apresentação oral.

MEDICE, R. V. Metabolômica como ferramenta para desreplicação de cianotoxinas em amostras ambientais. 2022. In: **Escola de Inverno de Fisiopatologia e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo** - Apresentação oral

MEDICE, R. V.; CRNKOVIC, C. M.; Pinto, E. Characterization of Cyanobacterial Biomass in Bloom Episodes for Its Biotechnological Potential. 2021. In: **SETAC Latin America 14th Biennial Meeting, 2021** - Apresentação oral

Doutorado Sanduíche

(2022-2023) Institute of Pharmaceutical Sciences do King's College London, Londres, Reino Unido. Supervisor: Prof. Dr. Paul F. Long.

Seminários

A Metabolômica como ferramenta para desreplicação de cianotoxinas em amostras ambientais. Evento: **IV Escola de Inverno em Fisiopatologia e Toxicologia (FISIOTOX)** do Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) da FCF/USP, **2022**. Virtual. no dia 20 de julho de 2022,

Antibióticos e seus subprodutos. Evento: **Uso Racional de Medicamentos, 2023** (virtual). Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

Participação em bancas e comissões avaliadoras

- Trabalho de conclusão de curso de graduação

TORRAO, A. S.; SERRA, C. H. R.; MEDICE, R. V.. Participação em banca de Davi Mello Castanheira. Psicoterapia auxiliada por MDMA como tratamento do transtorno de estresse

pós-traumático. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

- Participação em bancas de comissões julgadoras

21ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia, 2023. Universidade de São Paulo.

11ª BRAGANTEC - Feira de Ciência e Tecnologia, 2021. Instituto Federal São Paulo, Campus de Bragança Paulista

Participação em comissões

Representante discente junta à Comissão de Relações Internacionais - CRInt da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP por dois mandatos (2021).

Cursos

(2023) Fundamentos teóricos e práticos de cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil. (Carga horária: 9h).

(2023) Abordagem para descoberta de alvos moleculares. Instituto Butantan, Brasil. (Carga horária: 20h).

(2022) *Introduction to Metabolomics*. Portal Metabolômica Brasil (PORTALMETABOBR) Brasil. (Carga horária: 16h).

(2020) Fundamentos e Aplicações da Metabolômica. Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil. (Carga horária: 36h).

(2019) Espectrometria de massas aplicada à análise de metabólitos naturais. Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil. (Carga horária: 8h).

(2019) *An introduction to ecotoxicology: challenges and opportunities*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil. (Carga horária: 3h).

REFERÊNCIAS

- Abdo, S.M. *et al.* (2012) ‘Antiviral activity of freshwater algae’, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(2), pp. 21–25.
- Afaq, F. *et al.* (2007) ‘Delphinidin, an Anthocyanidin in Pigmented Fruits and Vegetables, Protects Human HaCaT Keratinocytes and Mouse Skin Against UVB-Mediated Oxidative Stress and Apoptosis’, *Journal of Investigative Dermatology*, 127(1), pp. 222–232. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700510>.
- Allaf, M.M. and Peerhossaini, H. (2022) ‘Cyanobacteria: Model Microorganisms and Beyond’, *Microorganisms*, 10(4), p. 696. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040696>.
- Allen, D. and McWhinney, B. (2019) ‘Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications’, *Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), pp. 135–146. Disponível em: <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00023>.
- Alves, M.S.A. (2005) *Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais*. Tese. Universidade de São Paulo. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-14042016-101810/publico/Dissert_Alves_MichelaSA.pdf.
- Ananya, A.K. and Ahmad, I.Z. (2014) ‘Cyanobacteria “the blue green algae” and its novel applications: A brief review’, *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 7(1). Disponível em: <https://www.issr-journals.org/xplore/ijias/0007/001/IJIAS-14-174-05.pdf>.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2012) *RESOLUÇÃO - RDC Nº 30, DE 1º DE JUNHO DE 2012 - Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências*. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0030_01_06_2012.html.
- ANVISA, A.N. de V.S. (2022) Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 629, de 10 de março de 2022. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6407780/RDC_629_2022_.pdf/8afdb838-af85-4690-a9f7-842ba38119ee.
- Aráoz, R., Molgó, J. and Tandeau De Marsac, N. (2010) ‘Neurotoxic cyanobacterial toxins’, *Toxicon*, 56(5), pp. 813–828. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.036>.
- Ardrey, R.E. (2003) *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*. Huddersfield, England: John Wiley & Sons Ltd. Disponível em: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.021808>.
- Ariede, M.B. *et al.* (2017) ‘Cosmetic attributes of algae - A review’, *Algal Research*, 25, pp. 483–487. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.019>.
- Aron, A.T. *et al.* (2020) ‘Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS’, *Nature Protocols*, 15(6), pp. 1954–1991. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5>.

Azevedo, S.M. *et al.* (2002) 'Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil', *Toxicology*, 182, pp. 441–446. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00491-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00491-2).

Balogh, T.S. *et al.* (2011) 'Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção', *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(4), pp. 732–742. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000400016>.

Bauersachs, T. *et al.* (2009) 'Distribution of heterocyst glycolipids in cyanobacteria', *Phytochemistry*, 70(17–18), pp. 2034–2039. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.08.014>.

Beasley, V.R. (2020) 'Harmful Algal Blooms (Phycotoxins)', in *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier, p. B9780124095489112000. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11275-8>.

Becker, K. *et al.* (2014) 'TiO₂ nanoparticles and bulk material stimulate human peripheral blood mononuclear cells', *Food and Chemical Toxicology*, 65, pp. 63–69. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.018>.

Beversdorf, L. *et al.* (2017) 'Variable Cyanobacterial Toxin and Metabolite Profiles across Six Eutrophic Lakes of Differing Physiochemical Characteristics', *Toxins*, 9(2), p. 62. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins9020062>.

Bhatia, S. *et al.* (2011) 'Mycosporine and mycosporine-like amino acids: A paramount tool against ultra violet irradiation', *Pharmacognosy Reviews*, 5(10), pp. 138–146. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.91107>.

Bishop, C.T., Anet, E.F. and Gorham, P.R. (1959) 'Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1', *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(3), pp. 453–471.

Blanco, A.M. *et al.* (2007) 'Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(6), pp. 1259–1266. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0598-9>.

Borges, R.M. *et al.* (2022) 'Data Fusion-based Discovery (DAFdiscovery) pipeline to aid compound annotation and bioactive compound discovery across diverse spectral data', *Phytochemical Analysis*, p. pca.3178. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pca.3178>.

Bortoli, S.;Pinto, E. (2015) 'Cianotoxinas: Características Gerais, Histórico, Legislação E Métodos De Análises', *Ecologia de reservatórios e interfaces*, pp. 163–164.

Botes, D.P. *et al.* (1985) 'Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*', *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, p. 2747. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/p19850002747>.

Bouslimani, A. *et al.* (2014) 'Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies', *Natural Product Reports*, 31(6), p. 718. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c4np00044g>.

- Brasil. PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021 (2021). Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2021/prt0888_07_05_2021.html.
- Bulska, E., Ruszczynska, A. (2017) 'Analytical Techniques for Trace Element Determination', *Physical Sciences Reviews*, 2(5). Disponível em: <https://doi.org/10.1515/psr-2017-8002>.
- Buratti, F.M. *et al.* (2017) 'Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation', *Archives of Toxicology*, 91(3), pp. 1049–1130. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>.
- Burja, A.M. *et al.* (2001) 'Marine cyanobacteria - A prolific source of natural products', *Tetrahedron*, 57(46), pp. 9347–9377. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00931-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00931-0).
- Bustillos, O.V. (2020) 'A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem HPLC-MS/MS', *Analytica*. Disponível em: <https://www.yumpu.com/pt/document/view/63409253/revista-analytica-ed-106>.
- C. Campbell, W. (2012) 'History of Avermectin and Ivermectin, with Notes on the History of Other Macrocyclic Lactone Antiparasitic Agents', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(6), pp. 853–865. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138920112800399095>.
- Campos, A. and Vasconcelos, V. (2010) 'Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), pp. 268–287. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms11010268>.
- Canuto, G.A.B. *et al.* (2018) 'Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas', *Química Nova*, 41(1), pp. 75–91. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>.
- Carmichael, W.W. (1992) 'Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins', *Journal of Applied Bacteriology*, 72(6), pp. 445–459. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x>.
- Carmichael, W.W., Biggs, D.F. and Peterson, M.A. (1979) 'Pharmacology of Anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1', *Toxicon*, 17(3), pp. 229–236. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(79\)90212-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(79)90212-5).
- Carmichael, W.W. and Gorham, P.R. (1978) 'Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of western Canada: With 3 figures and 2 tables in the text', *SIL Communications, 1953-1996*, 21(1), pp. 285–295. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/05384680.1978.11903972>.
- Carreto, J.I. and Carignan, M.O. (2011) 'Mycosporine-like amino acids: Relevant secondary metabolites. chemical and ecological aspects', *Marine Drugs*, 9(3), pp. 387–446. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md9030387>.
- Casali, M.P. *et al.* (no date) *Avaliação da bioacumulação de microcistinas em moluscos coletados em ambiente natural. Ilha Solteira - SP: Universidade Estadual Paulista*, pp. 1–

15.

Catherine, A. *et al.* (2017) ‘Microcystins and Nodularins’, in J. Meriluoto, L. Spoof, and G.A. Codd (eds) *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 107–126. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch11>.

Cavinato, M. *et al.* (2017) ‘Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging’, *Biogerontology*, 18(4), pp. 499–516. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9715-7>.

CDC, C. for D.C. and P. (no date) ‘Cyanobacteria Blooms FAQs’, *Harmful Algal Bloom (HAB)-Associated Illness*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/habs/general.html> (Acessado em: 12 July 2023).

Chaffin, J.D. *et al.* (2023) ‘Microcystin congeners in Lake Erie follow the seasonal pattern of nitrogen availability’, *Harmful Algae*, 127, p. 102466. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2023.102466>.

Challis, G.L. (2008) ‘Genome mining for novel natural product discovery’, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(9), pp. 2618–2628. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm700948z>.

Chatzigianni, M. *et al.* (2022) ‘Environmental impacts due to the use of sunscreen products: a mini-review’, *Ecotoxicology*, 31(9), pp. 1331–1345. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02592-w>.

Chiaradia, M.C., Collins, C.H. and Jardim, I.C.S.F. (2008) ‘O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos’, *Química Nova*, 31(3), pp. 623–636. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300030>.

Chorus, I. *et al.* (2000) ‘HEALTH RISKS CAUSED BY FRESHWATER CYANOBACTERIA IN RECREATIONAL WATERS’, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 3(4), pp. 323–347. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/109374000436364>.

Chorus, I. and Bartram, J. (1999) *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: F & FN Spon. Disponível em: <http://www.earthprint.com>.

Chorus, I. and Welker, M. (eds) (2021) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Second edition. Boca Raton: CRC Press, an imprint of Informa.

Chrapusta, E. *et al.* (2017) ‘Mycosporine-Like Amino Acids: Potential Health and Beauty Ingredients’, *Marine Drugs*, 15(10), p. 326. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md15100326>.

Claeson, P. and Bohlin, L. (1997) ‘Some aspects of bioassay methods in natural-product research aimed at drug lead discovery’, *Trends in Biotechnology*, 15(7), pp. 245–248. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01051-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01051-2).

de la Coba, F. *et al.* (2019) ‘UVA and UVB Photoprotective capabilities of topical formulations containing mycosporine-like amino acids (maas) through different biological effective protection factors (BEPFs)’, *Marine Drugs*, 17(1). Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md17010055>.

Cockell, C.S. and Knowland, J. (1999) ‘Ultraviolet radiation screening compounds’, *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 74(3), pp. 311–345. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0006323199005356>.

COLIPA - The European Cosmetic Association (2011) *In vitro method for the determination of the uva protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products*. Disponível em: FDA-1978-N-0018-0698_attachment_70.pdf.

Crnkovic, C.M. (2018) *Metabolomics for the Discovery of Natural Products from Cyanobacteria BY*. University of Illinois at Chicago.

Crotti, A.E.M. *et al.* (2006) ‘Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”’: Processus químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular’, *Quimica Nova*, 29(2), pp. 287–292. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200020>.

Danovaro, R. *et al.* (2008) ‘Sunscreens Cause Coral Bleaching by Promoting Viral Infections’, *Environmental Health Perspectives*, 116(4), pp. 441–447. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.10966>.

Deblois, C.P. *et al.* (2008) ‘Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs’, *Toxicon*, 51(3), pp. 435–448. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.10.017>.

Deblois, C.P., Giani, A. and Bird, D.F. (2011) ‘Experimental model of microcystin accumulation in the liver of *Oreochromis niloticus* exposed subchronically to a toxic bloom of *Microcystis* sp.’, *Aquatic Toxicology*, 103(1–2), pp. 63–70. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.02.006>.

Del Campo, F.F. and Ouahid, Y. (2010) ‘Identification of microcystins from three collection strains of *Microcystis aeruginosa*’, *Environmental Pollution*, 158(9), pp. 2906–2914. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.018>.

Demarque, D.P. *et al.* (2015) ‘Optimization and Technological Development Strategies of an Antimicrobial Extract from *Achyrocline alata* Assisted by Statistical Design’, *PLoS ONE*, pp. 1–15. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118574>.

Demarque, D.P. *et al.* (2020) ‘Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products’, *Scientific Reports Nature research*, 10(1051), pp. 1–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58046-y>.

Demay, J. *et al.* (2019) ‘Natural Products from Cyanobacteria : Focus on Beneficial Activities’, *Marine Drugs*, 17(320), pp. 1–49. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md17060320>.

Devlin, J.P. *et al.* (1977) ‘Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC’, *Canadian Journal of Chemistry*, 55(8), pp. 1367–1371. Disponível em:

<https://doi.org/10.1139/v77-189>.

Dittmann, E. and Wiegand, C. (2006) 'Cyanobacterial toxins - occurrence, biosynthesis and impact on human affairs', *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(1), pp. 7–17. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500162>.

Doronina, S.O. *et al.* (2003) 'Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy Corrigendum : A model of molecular interactions on short oligonucleotide microarrays', *Nat. Biotech.*, 21(8), p. 2003.

Downs, C.A. *et al.* (2014) 'Toxicological effects of the sunscreen UV filter, benzophenone-2, on planulae and in vitro cells of the coral, *Stylophora pistillata*', *Ecotoxicology*, 23(2), pp. 175–191. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1161-y>.

Drasar, P.B. and Khripach, V.A. (2019) 'Growing Importance of Natural Products Research', *Molecules*, 25(1), p. 6. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25010006>.

Drobac, D. *et al.* (2016) 'Cyanobacteria and cyanotoxins in fishponds and their effects on fish tissue', *Harmful Algae*, 55, pp. 66–76. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.02.007>.

Du, X. *et al.* (2019) 'The diversity of cyanobacterial toxins on structural characterization, distribution and identification: A systematic review', *Toxins*, 11(9), pp. 1–34. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins11090530>.

Dührkop, K. *et al.* (2019) 'SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information', *Nature Methods*, 16(4), pp. 299–302. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>.

Egan, J.M. *et al.* (2021) 'Development of an NMR-Based Platform for the Direct Structural Annotation of Complex Natural Products Mixtures', *Journal of Natural Products*, 84(4), pp. 1044–1055. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01076>.

EPA, U.S.E.P.A. (2015) 'Recommendations for Public Water Systems to Manage Cyanotoxins in Drinking Water'. Office of Water. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-06/documents/cyanotoxin-management-drinking-water.pdf>.

EPA, U.S.E.P.A. (2023) 'Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (CyanoHABs) in Water Bodies', *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (CyanoHABs) in ... United States Environmental Protection Agency*. Disponível em: <https://www.epa.gov/cyanoHABs>.

Ersmark, K., Del Valle, J.R. and Hanessian, S. (2008) 'Chemistry and Biology of the Aeruginosin Family of Serine Protease Inhibitors', *Angewandte Chemie International Edition*, 47(7), pp. 1202–1223. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.200605219>.

Espinoza-, F.R. (2015) 'Uso Da Artemia Salina Como Bioindicador Na Avaliação Ecotoxicologica Do Fármaco Cloridrato De Ciprofloxacina Em Solução Sintética Tratada Por Processo De Eletrocoagulação', pp. 1–5.

EU (2006) - COMMISSION RECOMMENDATION of 22 September 2006 on the efficacy of sunscreen products and the claims made relating thereto', *Official Journal of the European Union* P.11.

Falconer, I.R. (2004) *Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies*. 0 edn. CRC Press. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9780203022870>.

Faltermann, S. *et al.* (2014) 'Molecular effects of the cyanobacterial toxin cyanopeptolin (CP1020) occurring in algal blooms : Global transcriptome analysis in zebrafish embryos', *Aquatic Toxicology*, 149, pp. 33–39. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.018>.

Fastner, J., Erhard, M. and Von Döhren, H. (2001) 'Determination of Oligopeptide Diversity within a Natural Population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by Typing Single Colonies by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry', *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), pp. 5069–5076. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5069-5076.2001>.

Fatta-Kassinos, D., Meric, S. and Nikolaou, A. (2011) 'Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current state of knowledge and future research', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(1), pp. 251–275. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4300-9>.

Fernandes, K. *et al.* (2019) 'Toxicity of Cyanopeptides from Two *Microcystis* Strains on Karval Development of *Astyanax altiparanae*', *Toxins*, 11(220), pp. 1–18. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins11040220>.

Fernandes, K., Dörr, F.A. and Pinto, E. (2021) 'Stability Analyses by HPLC-MS of Guanitoxin Isolated from *Sphaerospermopsis torques-reginae*', *Journal of the Brazilian Chemical Society* [Preprint]. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210053>.

Ferranti, P. *et al.* (2013) 'Profiling microcystin contamination in a water reservoir by MALDI-TOF and liquid chromatography coupled to Q/TOF tandem mass spectrometry', *Food Research International*, 54(1), pp. 1321–1330. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.028>.

Ferrão-Filho, A.D.S. and Kozłowsky-Suzuki, B. (2011) 'Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals', *Marine Drugs*, 9(12), pp. 2729–2772. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md9122729>.

Fiore, M.F. *et al.* (2020) 'Guanitoxin, re-naming a cyanobacterial organophosphate toxin', *Harmful Algae*, 92, p. 101737. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101737>.

Fischer, W.W. (2008) 'Biogeochemistry: Life before the rise of oxygen', *Nature*, 455(7216), pp. 1051–1052. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/4551051a>.

Food and Drug Administration - U.S. Department of Health and Human Services (2012) *Labeling and Effectiveness Testing: Sunscreen Drug Products for Over-The-Counter Human Use — Small Entity Compliance Guide*. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/labeling-and->

effectiveness-testing-sunscreen-drug-products-over-counter-human-use-small-entity.

Francis, G. (1878) 'Poisonous Australian Lake', *Nature*, 18(444), pp. 11–12. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/018011d0>.

Gacesa, R. *et al.* (2018) 'The mycosporine-like amino acids porphyra-334 and shinorine are antioxidants and direct antagonists of Keap1-Nrf2 binding', *Biochimie*, 154, pp. 35–44. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.020>.

Gademann, K. *et al.* (2010) 'Multiple Toxin Production in the Cyanobacterium *Microcystis*: Isolation of the Toxic Protease Inhibitor Cyanopeptolin 1020', *Journal of Natural Products*, 73(5), pp. 980–984. Available at: <https://doi.org/10.1021/np900818c>.

Gentile, J.H. and Maloney, T.E. (1969) 'Toxicity and environmental requirements of a strain of *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs', *Canadian Journal of Microbiology*, 15(2), pp. 165–173. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/m69-028>.

Geraldes, V., de Medeiros, L.S., *et al.* (2020) 'Genetic and biochemical evidence for redundant pathways leading to mycosporine-like amino acid biosynthesis in the cyanobacterium *sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024', *Algae*, 35(2), pp. 177–187. Disponível em: <https://doi.org/10.4490/algae.2020.35.5.19>.

Geraldes, V., Jacinavicius, F.R., *et al.* (2020) 'Identification and distribution of mycosporine-like amino acids in Brazilian cyanobacteria using ultrahigh-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34(S3). Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rcm.8634>.

Geraldes, V. and Pinto, E. (2021) 'Mycosporine-like amino acids (Maas): Biology, chemistry and identification features', *Pharmaceuticals*, 14(1), pp. 1–17. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph14010063>.

Geraldes, V.S.M. (2019) *Universidade De São Universidade De São, Teses USP*. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/47/47134/tde-16092016-150334/en.php>.

Gesner-Apter, S. and Carmeli, S. (2009) 'Protease Inhibitors from a Water Bloom of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*', *Journal of Natural Products*, 72(8), pp. 1429–1436. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np900340t>.

González, S., Fernández-Lorente, M. and Gilaberte-Calzada, Y. (2008) 'The latest on skin photoprotection', *Clinics in Dermatology*, 26(6), pp. 614–626. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.09.010>.

Grabowska, M. *et al.* (2014) 'Non-ribosomal peptides produced by *Planktothrix agardhii* from Siemianówka Dam Reservoir SDR (northeast Poland)', *Archives of Microbiology*, 196(10), pp. 697–707. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1008-9>.

Greer, B. *et al.* (2017) 'Detection of freshwater cyanotoxins and measurement of masked microcystins in tilapia from Southeast Asian aquaculture farms', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(16), pp. 4057–4069. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0352-4>.

Griffiths, D.J. and Saker, M.L. (2003) ‘The Palm Island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin’, *Environmental Toxicology*, 18(2), pp. 78–93. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.10103>.

Hallegraeff, G.M. *et al.* (2021) ‘Perceived global increase in algal blooms is attributable to intensified monitoring and emerging bloom impacts’, *Communications Earth & Environment*, 2(1), p. 117. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s43247-021-00178-8>.

Harada, K. *et al.* (1995) ‘Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17’, *Tetrahedron Letters*, 36(9), pp. 1511–1514. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)00073-L](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)00073-L).

Harada, K. *et al.* (1996) ‘Stability of microcystins from cyanobacteria—III. Effect of pH and temperature’, *Phycologia*, 35(sup6), pp. 83–88. Disponível em: <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-6S-83.1>.

Hicks, L.M. *et al.* (2006) ‘Structural Characterization of *in Vitro* and *in Vivo* Intermediates on the Loading Module of Microcystin Synthetase’, *ACS Chemical Biology*, 1(2), pp. 93–102. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cb500007v>.

Hilborn, E.D. *et al.* (2014) ‘Algal bloom-associated disease outbreaks among users of freshwater lakes—United States, 2009–2010’, *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 63(1), pp. 11–15.

Ho, J.C., Michalak, A.M. and Pahlevan, N. (2019) ‘Widespread global increase in intense lake phytoplankton blooms since the 1980s’, *Nature*, 574(7780), pp. 667–670. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1648-7>.

Hodoki, Y. *et al.* (2013) ‘Anatoxin-a-producing *Raphidiopsis mediterranea* Skuja var. *grandis* Hill is one ecotype of non-heterocytous *Cuspidothrix issatschenkoi* (Usačev) Rajaniemi *et al.* in Japanese lakes’, *Harmful Algae*, 21–22, pp. 44–53. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.11.007>.

Hoffmann, E. de and Stroobant, V. (2007) *Mass Spectrometry - Principles and Applications.*, *Mass spectrometry reviews*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mas.20296>.

Hojerová, J., Medovčíková, A. and Mikula, M. (2011) ‘Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight’, *International Journal of Pharmaceutics*, 408(1–2), pp. 27–38. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.040>.

Hu, C. *et al.* (2018) ‘Mycosporine-like amino acids (MAAs)—producing Microcystis in Lake Erie: Development of a qPCR assay and insight into its ecology’, *Harmful Algae*, 77(January), pp. 1–10. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.05.010>.

Huang, I.-S. and Zimba, P.V. (2019) ‘Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology’, *Harmful Algae*, 83, pp. 42–94. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.11.008>.

- Huang, J.C., Chen, F. and Sandmann, G. (2006) 'Stress-related differential expression of multiple β -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*', *Journal of Biotechnology*, 122(2), pp. 176–185. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.09.002>.
- Huisman, J. *et al.* (2018) 'Cyanobacterial blooms', *Nature Reviews Microbiology*, 16(August). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>.
- Ibelings, B.W. *et al.* (2003) 'Fuzzy modeling of cyanobacterial surface waterblooms: validation with noaa-avhrr satellite images', *Ecological Applications*, 13(5), pp. 1456–1472. Disponível em: <https://doi.org/10.1890/01-5345>.
- Ibelings, B.W. *et al.* (2014) 'Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe', *Harmful Algae*, 40, pp. 63–74. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.10.002>.
- Ibelings, B.W. and Chorus, I. (2007) 'Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review', *Environmental Pollution*, 150(1), pp. 177–192. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.04.012>.
- Ishida, K. *et al.* (2000) 'Microginins, Zinc Metalloproteases Inhibitors from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*', *Tetrahedron*, 56(44), pp. 8643–8656. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00770-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00770-5).
- Ishida, K., Matsuda, H. and Murakami, M. (1998) 'Four new microginins, linear peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*', *Tetrahedron*, 54(44), pp. 13475–13484. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00826-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00826-6).
- Ishitsuka, M.O. *et al.* (1990) 'Microviridin. A novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*', *Journal of the American Chemical Society*, 112(22), pp. 8180–8182. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00178a060>.
- Jacinavicius, F.R. *et al.* (2016) 'Phenotypic plasticity and negative allelopathy in *Microcystis* strains', *Annals of Microbiology*, 66(3), pp. 1265–1276. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1215-5>.
- Jacinavicius, F.R. *et al.* (2021) 'Effect of ultraviolet radiation on the metabolomic profiles of potentially toxic cyanobacteria', *FEMS Microbiology Ecology*, 97(1), p. fiae243. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae243>.
- Janssen, E.M.L. (2019) 'Cyanobacterial peptides beyond microcystins – A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment', *Water Research*, 151, pp. 488–499. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.048>.
- Jones, M. *et al.* (2020) 'Comprehensive database of secondary metabolites from cyanobacteria', (C), pp. 1–16. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.038703>.
- Jones, M.R. *et al.* (2021) 'CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria', *Water Research*, 196, p. 117017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117017>.
- Kageyama, H. and Waditee-Sirisattha, R. (2019) 'Antioxidative, anti-inflammatory, and

anti-aging properties of mycosporine-like amino acids: Molecular and cellular mechanisms in the protection of skin-aging', *Marine Drugs*, 17(4). Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md17040222>.

Kamiloglu, S. *et al.* (2020) 'Guidelines for cell viability assays', *Food Frontiers*, 1(3), pp. 332–349. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fft2.44>.

Karjalainen, M. *et al.* (2008) 'Nodularin concentrations in Baltic Sea zooplankton and fish during a cyanobacterial bloom', *Marine Biology*, 155(5), pp. 483–491. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00227-008-1046-4>.

Kehr, J.C., Picchi, D.G. and Dittmann, E. (2011) 'Natural product biosyntheses in cyanobacteria: A treasure trove of unique enzymes', *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 7(Figure 1), pp. 1622–1635. Disponível em: <https://doi.org/10.3762/bjoc.7.191>.

Kellmann, R., Michali, T.K. and Neilan, B.A. (2008) 'Identification of a Saxitoxin Biosynthesis Gene with a History of Frequent Horizontal Gene Transfers', *Journal of Molecular Evolution*, 67(5), pp. 526–538. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9169-2>.

Kingston, D.G.I. and Cassera, M.B. (2022) 'Antimalarial Natural Products', in A.D. Kinghorn *et al.* (eds) *Antimalarial Natural Products*. Cham: Springer International Publishing (Progress in the Chemistry of Organic Natural Products), pp. 1–106. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-89873-1_1.

Kodani, S. *et al.* (1999) 'Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of lake Teganuma (Japan)', *FEMS Microbiology Letters*, 178(2), pp. 343–348. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08697.x>.

Kohler, E. *et al.* (2014) 'The toxicity and enzyme activity of a chlorine and sulfate containing aeruginosin isolated from a non-microcystin-producing Planktothrix strain', *Harmful Algae*, 39, pp. 154–160. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.07.003>.

Komárek, J. *et al.* (2014) 'Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach', *Preslia*, 86(4), pp. 295–335.

Kumla, D. *et al.* (2022) 'Specialized metabolites from cyanobacteria and their biological activities', in *The Pharmacological Potential of Cyanobacteria*. Elsevier, pp. 21–54. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821491-6.00002-8>.

Kusumi, T. *et al.* (1987) 'Cyanoviridin RR, a toxin from the cyanobacterium (blue-green alga)', *Tetrahedron Letters*, 28(40), pp. 4695–4698. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96600-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96600-0).

Kwan, J.C. (2018) 'The Who, Why, and How of Small-Molecule Production in Invertebrate Microbiomes: Basic Insights Fueling Drug Discovery', *mSystems*, 3(2). Disponível em: <https://doi.org/10.1128/msystems.00186-17>.

Lanças, F.M. (2009) 'A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"?', *Scientia Chromatographica*, 1(2), pp. 35–61. Disponível em: <https://doi.org/10.4322/sc.2013.005>.

- Lawrence, K.P. *et al.* (2018) 'Molecular photoprotection of human keratinocytes *in vitro* by the naturally occurring mycosporine-like amino acid palythine', *British Journal of Dermatology*, 178(6), pp. 1353–1363. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bjd.16125>.
- Lawrence, K.P., Long, P.F. and Young, A.R. (2019) 'Mycosporine-Like Amino Acids for Skin Photoprotection', *Current Medicinal Chemistry*, 25(40), pp. 5512–5527. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867324666170529124237>.
- Le Manach, S. *et al.* (2019) 'Global metabolomic characterizations of microcystis spp. Highlights clonal diversity in natural bloom-forming populations and expands metabolite structural diversity', *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), pp. 1–16. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00791>.
- Lee, S. *et al.* (2022) 'NP Analyst: An Open Online Platform for Compound Activity Mapping', *ACS Central Science*, 8(2), pp. 223–234. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c01108>.
- Lee, T.-H., Chen, Y.-M. and Chou, H.-N. (1999) 'Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay.', *Acta Zoologica Taiwanica*, 10(1), pp. 1–8.
- Levine, B.S. and Kerrigan, S. (eds) (2020) *Principles of forensic toxicology*. Fifth edition. Cham, Switzerland: Springer.
- Lifshits, M. *et al.* (2011) 'Protease inhibitors from three fishpond water blooms of *Microcystis* spp.', *Tetrahedron*, 67(22), pp. 4017–4024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.04.042>.
- Lim, M.H. *et al.* (2020) 'Risk Management of Cyanotoxins in Singapore', *Journal of Water Resource and Protection*, 12(06), pp. 512–525. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/jwarp.2020.126031>.
- Linington, R.G. *et al.* (2007) 'Venturamides A and B: Antimalarial constituents of the Panamanian marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp.', *Journal of Natural Products*, 70(3), pp. 397–401. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np0605790>.
- Linington, R.G. *et al.* (2008) 'Symplocamide A, a Potent Cytotoxin and Chymotrypsin Inhibitor from the Marine Cyanobacterium *Symploca* sp.', *Journal of Natural Products*, 71(1), pp. 22–27. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np070280x>.
- Lippy, E.C. and Erb, J. (1976) 'Gastrointestinal Illness at Sewickley, Pa.', *Journal - American Water Works Association*, 68(11), pp. 606–610. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1976.tb02504.x>.
- Lodén, M. (2014) 'Interactions between the stratum corneum and topically applied products: regulatory, instrumental and formulation issues with focus on moisturizers', *British Journal of Dermatology*, 171, pp. 38–44. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bjd.13240>.
- Lodin-Friedman, A. and Carmeli, S. (2018) 'Microginins from a *Microcystis* sp. Bloom Material Collected from the Kishon Reservoir, Israel', *Marine Drugs*, 16(3), p. 78. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md16030078>.

Lopes, F., M., da Cruz, R., O. and Batista, K., A. (2012) 'Radiação Ultravioleta e Ativos Utilizados nas Formulações de Protetores Solares', *Ensaio e Ciência Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 16. Disponível em: <https://doi.org/1415-6938>.

Ludwig, M. *et al.* (2020) 'De Novo Molecular Formula Annotation and Structure Elucidation Using SIRIUS 4', in S. Li (ed.) *Computational Methods and Data Analysis for Metabolomics*. New York, NY: Springer US (Methods in Molecular Biology), pp. 185–207. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_11.

Luesch, H. *et al.* (2001) 'Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1', *Journal of Natural Products*, 64(7), pp. 907–910. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np010049y>.

Macário, I.P.E. *et al.* (2021) 'The “bright Side” of Cyanobacteria: Revising the Nuisance Potential and Prospecting Innovative Biotechnology-Based Solutions to Integrate Water Management Programs', *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 9(21), pp. 7182–7197. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c00458>.

Magalhaes, V. de F., Soares, R.M. and Azevedo, S.M.F.O. (2001) 'Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk', *Toxicon*, 39, pp. 1077–1085. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00251-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00251-8).

Mahmood, N.A. and Carmichael, W.W. (1987) 'Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17', *Toxicon*, 25(11), pp. 1221–1227. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90140-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90140-1).

Mancuso, J.B. *et al.* (2017) 'Sunscreens: An Update', *American Journal of Clinical Dermatology*, 18(5), pp. 643–650. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0290-0>.

Martin, C. *et al.* (1993) 'Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. pcc 7806.', *The Journal of Antibiotics*, 46(10), pp. 1550–1556. Disponível em: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.1550>.

Martins, T.P. *et al.* (2022) 'UV-protective secondary metabolites from cyanobacteria', in *The Pharmacological Potential of Cyanobacteria*. India: Elsevier Inc.

Massa, A. *et al.* (2022) 'Assessment of Cyanobacterial Biomass as Sustainable Agricultural Fertilizer: Soil Experiment with Plants in Pot', in *The 7th Iberian Congress on Cyanotoxins/3rd Iberoamerican Congress on Cyanotoxins. The 7th Iberian Congress on Cyanotoxins/3rd Iberoamerican Congress on Cyanotoxins*, MDPI, p. 22. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/blsf2022014022>.

Matsunaga, S. *et al.* (1989) 'Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*', *Journal of the American Chemical Society*, 111(20), pp. 8021–8023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00202a057>.

Matumoto, P.Y.; Alcântara, F.C. de (2014) 'Metodologia Analítica De Citrato De Sildenafil', *Revista Acadêmica Oswaldo Cruz*, 2.

Mazur-Marzec, H. *et al.* (2018) ‘Cyanopeptolins with trypsin and chymotrypsin inhibitory activity from the cyanobacterium *Nostoc edaphicum* CCNP1411’, *Marine Drugs*, 16(7), pp. 1–19. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md16070220>.

McCloud, T.G. (2010) ‘High throughput extraction of plant, marine and fungal specimens for preservation of biologically active molecules’, *Molecules*, 15(7), pp. 4526–4563. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules15074526>.

McShane, A.J. *et al.* (2014) ‘An Overview of Quantitative Proteomic Approaches’, in *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, pp. 111–135. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62651-6.00005-2>.

Melcher, S.S. (2007) *Estudos morfológicos e moleculares de cianobactérias potencialmente tóxicas dos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Raphidiopsis* (Nostocales) Estudos morfológicos e moleculares de cianobactérias potencialmente tóxicas dos gêneros *Cylindrospermo**. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

Merel, S. *et al.* (2013) ‘State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins’, *Environment International*, 59, pp. 303–327. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>.

de Mesquita, M.L. *et al.* (2009) ‘Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines’, *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3), pp. 439–445. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.018>.

Metcalf, J.S. *et al.* (2021) ‘Cyanotoxins and the Nervous System’, *Toxins*, 13(9), p. 660. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins13090660>.

Michaelian, K. and Simeonov, A. (2015) ‘Fundamental molecules of life are pigments which arose and co-evolved as a response to the thermodynamic imperative of dissipating the prevailing solar spectrum’, *Biogeosciences*, 12(16), pp. 4913–4937. Disponível em: <https://doi.org/10.5194/bg-12-4913-2015>.

Milani, M.G. and Ziolli, R.L. (2007) ‘Avaliação do potencial tóxico de novos compostos e de compostos de interesse ambiental através do ensaio de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina*’, pp. 1–9.

Molica, R. and Azevedo, S. (2009) ‘Ecofisiologia de Cianobactérias Produtoras de Cianotoxinas’, *Oecologia Brasiliensis*, 13.

Molica, R.J.R. *et al.* (2005) ‘Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply’, *Harmful Algae*, 4(4), pp. 743–753. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.11.001>.

Moore, R.E. (1996) ‘Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review’, *Journal of Industrial Microbiology*, (16), pp. 134–143.

Moreno-Garcia, L. *et al.* (2017) ‘Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability’, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76(January), pp. 493–506. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.024>.

- Morone, J. *et al.* (2019) 'Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals — A new bioactive approach', *Algal Research*, 41(April), p. 101541. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101541>.
- Morone, Janaína *et al.* (2022) 'Cyanobacteria in cosmetics: a natural alternative for anti-aging ingredients', in *The Pharmacological Potential of Cyanobacteria*. India: Elsevier Inc.
- Mosmann, T. (1983) 'Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays', *Journal of Immunological Methods*, (65), pp. 55–63. Disponível em: <https://doi.org/JIM 02849>.
- Mourelle, M., Gómez, C. and Legido, J. (2017) 'The Potential Use of Marine Microalgae and Cyanobacteria in Cosmetics and Thalassotherapy', *Cosmetics*, 4(4), p. 46. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040046>.
- Msagati, T., Siame, B. and Shushu, D. (2006) 'Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins', *Aquatic Toxicology*, 78(4), pp. 382–397. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.011>.
- Mukund, S. and Sivasubramanian, V. (2014) 'Anticancer Activity of Oscillatoria Terebriformis Cyanobacteria in Human Lung Cancer Cell Line A549', *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 5(2), pp. 34–45.
- Murakami, M. *et al.* (1994) 'Aeruginosin 298-A, A Thrombin Alga Microcystis and Trypsin aeruginosa Inhibitor from the Blue-green', *Tetrahedron Letters*, 35(19), pp. 3129–3132.
- Nabout, J.C. *et al.* (2013) 'How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number', *Biodiversity and Conservation*, 22(12), pp. 2907–2918. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10531-013-0561-x>.
- Namikoshi, M. *et al.* (1992) 'Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria Microcystis aeruginosa, Microcystis viridis, and Microcystis wesenbergii: nine new microcystins', *The Journal of Organic Chemistry*, 57(3), pp. 866–872. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jo00029a016>.
- Nascimento, R.M. (2019) *Avaliação Temporal de Biomarcadores de Petróleo Empregados no Estudo de Derrames Simulados em Ambientes Terrestres*. Tese. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Disponível em: https://repository.ufrpe.br/bitstream/123456789/1646/1/tcc_rayanemariadonascimento.pdf.
- Neilan, B.A. *et al.* (2013) 'Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria: Regulation of cyanobacterial toxin biosynthesis', *Environmental Microbiology*, 15(5), pp. 1239–1253. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x>.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2016) 'Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014', *Journal of Natural Products*, 79(3), pp. 629–661. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- Ngoennet, S. *et al.* (2018) 'A Method for the Isolation and Characterization of

Mycosporine-Like Amino Acids from Cyanobacteria', *Methods and Protocols*, 1(4), p. 46. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/mps1040046>.

Niveshika *et al.* (2016) 'Structural elucidation and molecular docking of a novel antibiotic compound from cyanobacterium *Nostoc* sp. MGL001', *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), pp. 1–15. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01899>.

Ohtani, I., Moore, R.E. and Runnegar, M.T.C. (1992) 'Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*', *Journal of the American Chemical Society*, 114(20), pp. 7941–7942. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00046a067>.

Okino, T. *et al.* (1993) 'Microginin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*', *Tetrahedron Letters*, 34(3), pp. 501–504. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(93\)85112-A](https://doi.org/10.1016/0040-4039(93)85112-A).

Olivon, F. *et al.* (2017) 'Bioactive Natural Products Prioritization Using Massive Multi-informational Molecular Networks', *ACS Chemical Biology*, 12(10), pp. 2644–2651. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00413>.

Osswald, J. *et al.* (2007) 'Acute effects of an anatoxin-a producing cyanobacterium on juvenile fish—*Cyprinus carpio* L.', *Toxicol*, 49(5), pp. 693–698. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2006.11.010>.

Oyamada, C. *et al.* (2008) 'Mycosporine-Like Amino Acids Extracted from Scallop (*Patinopekten yessoensis*) Ovaries: UV Protection and Growth Stimulation Activities on Human Cells', *Marine Biotechnology*, 10(2), pp. 141–150. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9043-z>.

Ozáez, I., Martínez-Guitarte, J.L. and Morcillo, G. (2013) 'Effects of in vivo exposure to UV filters (4-MBC, OMC, BP-3, 4-HB, OC, OD-PABA) on endocrine signaling genes in the insect *Chironomus riparius*', *Science of The Total Environment*, 456–457, pp. 120–126. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.081>.

Pan, Z. *et al.* (2009) 'Adverse Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts and How to Protect Cells', *Small*, 5(4), pp. 511–520. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/sml.200800798>.

Panosso, R. *et al.* (2007) 'Cianobactérias e Cianotoxinas em Reservatórios do Estado do Rio Grande do Norte e o Potencial Controle das Florações pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)', *Oecologia Brasiliensis*, 11(03), pp. 433–449. Disponível em: <https://doi.org/10.4257/oeco.2007.1103.12>.

Pavia, D.L. (2015) *Introdução à espectroscopia*. 5a. edição. São Paulo: Cengage Learning.

Pawlik-Skowrońska, B., Toporowska, M. and Mazur-Marzec, H. (2019) 'Effects of secondary metabolites produced by different cyanobacterial populations on the freshwater zooplankters *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia pulex*', *Environmental Science and Pollution Research*, 26(12), pp. 11793–11804. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04543-1>.

Pearson, L. *et al.* (2010) 'On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the

- Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin', *Marine Drugs*, 8(5), pp. 1650–1680. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md8051650>.
- Pearson, L.A. *et al.* (2016) 'The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria', *Harmful Algae*, 54, pp. 98–111. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.002>.
- Pettit, G.R. *et al.* (1987) 'The Isolation and Structure of a Remarkable Marine Animal Antineoplastic Constituent: Dolastatin 10', *Journal of the American Chemical Society*, 109(22), pp. 6883–6885. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja00256a070>.
- Pilon, A.C. *et al.* (2021) 'Redes Moleculares: uma análise sobre anotações e descobertas de novos ativos', *Química Nova*, 44(9), pp. 1168–1179. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170777>.
- Pimentel, M.P. *et al.* (2011) 'O Uso de Artemia sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental', *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 6(1), pp. 15–22. Disponível em: <https://doi.org/10.5132/jbse.2011.01.003>.
- Pörtner, H.-O. *et al.* (2019) *Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate*. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/srocc/> (Accessed: 13 July 2023).
- Preece, E.P. *et al.* (2017) 'A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk', *Harmful Algae*, 61, pp. 31–45. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.006>.
- Rastogi, R.P. *et al.* (2014) 'Ultraviolet radiation and cyanobacteria', *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 141, pp. 154–169. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.020>.
- Rastogi, R.P. *et al.* (2020) 'Resilience and self-regulation processes of microalgae under UV radiation stress', *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 43, p. 100322. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.100322>.
- Raven, P.H., Evert, R.F. and Eichhorn, S.E. (2007) *Biologia vegetal*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Regueiras, A. *et al.* (2018) 'Differential toxicity of cyanobacteria isolated from marine sponges towards echinoderms and crustaceans', *Toxins*, 10(7), pp. 1–12. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins10070297>.
- Reis, A. and Gouveia, L. (2013) 'Biorefinarias de microalgas', *Boletim de Biotecnologia*, (Figura 1), p. 201.
- Remane, D. *et al.* (2010) 'Systematic investigation of ion suppression and enhancement effects of fourteen stable-isotope-labeled internal standards by their native analogues using atmospheric-pressure chemical ionization and electrospray ionization and the relevance for multi-anal', *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, (24), pp. 3567–3577. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rcm>.

- Rinehart, K.L. *et al.* (1988) 'Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda', *Journal of the American Chemical Society*, 110(25), pp. 8557–8558. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00233a049>.
- Rippka, R., Deruelles, J. and Waterbury, J.B. (1979) 'Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria', *Journal of General Microbiology*, 111(1), pp. 1–61. Available at: <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.
- Riss, T.L. *et al.* (2004) 'Cell Viability Assays', in S. Markossian *et al.* (eds) *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> (Accessed: 13 July 2023).
- Rizwan, M. *et al.* (2018) 'Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92(May), pp. 394–404. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>.
- Rodrigues, M.V.N. *et al.* (2006) 'O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais', *Multi Ciência*, (October 2006), p. 14.
- Rogers, E.H. *et al.* (2005) 'Potential developmental toxicity of anatoxin-a, a cyanobacterial toxin', *Journal of Applied Toxicology*, 25(6), pp. 527–534. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jat.1091>.
- Rohrlack, T. and Hyenstrand, P. (2007) 'Fate of intracellular microcystins in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanophyceae)', *Phycologia*, 46(3), pp. 277–283. Disponível em: <https://doi.org/10.2216/06-14.1>.
- Rosic, N. (2019) 'Mycosporine-Like Amino Acids: Making the Foundation for Organic Personalised Sunscreens', *Marine Drugs*, 17(11), p. 638. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md17110638>.
- Rusanov, A.L., Luzgina, N.G. and Lisitsa, A.V. (2017) 'Sodium Dodecyl Sulfate Cytotoxicity towards HaCaT Keratinocytes: Comparative Analysis of Methods for Evaluation of Cell Viability', *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 163(2), pp. 284–288. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3785-z>.
- Russo, J.P. *et al.* (2018) 'Photoallergic Contact Dermatitis to Sunscreens Containing Oxybenzone in La Plata, Argentina', *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 109(6), pp. 521–528. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2018.05.010>.
- Ruszkiewicz, J.A. *et al.* (2017) 'Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review', *Toxicology Reports*, 4, pp. 245–259. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.05.006>.
- Sabour, B. *et al.* (2002) 'Toxicology of a *Microcystis ichthyoblabe* waterbloom from Lake Oued Mellah (Morocco)', *Environmental Toxicology*, 17(1), pp. 24–31. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.10028>.
- Sacilotto Detoni, A.M. *et al.* (2016) 'Toxic *Trichodesmium* bloom occurrence in the southwestern South Atlantic Ocean', *Toxicon*, 110, pp. 51–55. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.12.003>.

- Sanches, S.M. *et al.* (2012) 'Presença da toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle', *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 2(33), pp. 181–187.
- Sánchez-Baracaldo, P. and Cardona, T. (2020) 'On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria', *New Phytologist*, 225(4), pp. 1440–1446. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nph.16249>.
- Schantz, E.J. *et al.* (1957) 'Paralytic Shellfish Poison. VI. A Procedure for the Isolation and Purification of the Poison from Toxic Clam and Mussel Tissues', *Journal of the American Chemical Society*, 79(19), pp. 5230–5235. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja01576a044>.
- Scherer, M., Bezold, D. and Gademann, K. (2016) 'Investigating the Toxicity of the Aeruginosin Chlorosulfopeptides by Chemical Synthesis', *Angewandte Chemie International Edition*, 55(32), pp. 9427–9431. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.201602755>.
- Scherlach, K. and Hertweck, C. (2009) 'Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms', *Organic and Biomolecular Chemistry*, 7(9), pp. 1753–1760. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b821578b>.
- Schreuder, H. *et al.* (2016) 'Isolation, Co-Crystallization and Structure-Based Characterization of Anabaenopeptins as Highly Potent Inhibitors of Activated Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFIa)', *Scientific Reports*, 6(1), p. 32958. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep32958>.
- Senter, P.D. and Sievers, E.L. (2012) 'The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma', *Nature Biotechnology*, 30(7), pp. 631–637. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.2289>.
- Serpone, N., Dondi, D. and Albin, A. (2007) 'Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products', *Inorganica Chimica Acta*, 360(3), pp. 794–802. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2005.12.057>.
- Shaieb, F.A., Issa, A.A.-S. and Meragaa, A. (2014) 'Antimicrobial activity of crude extracts of cyanobacteria *Nostoc commune* and *Spirulina platensis*', *Archives of Biomedical Sciences*, 2(2), pp. 34–41.
- Shibata, K. (1969) 'Pigments and a UV-absorbing substance in corals and a blue-green alga living in the Great Barrier Reef', *Plant and Cell Physiology* [Preprint]. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a074411>.
- Silva-Stenico, M.E. *et al.* (2015) 'Bioactive Cyanopeptides Produced by', *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 26(10), pp. 2088–2096.
- Simmons, T.L. *et al.* (2008) 'Viridamides A and B, lipodepsipeptides with antiprotozoal activity from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigro-viridis*', *Journal of Natural Products*, 71(9), pp. 1544–1550. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np800110e>.
- Singh, A. *et al.* (2021) 'Exploring Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) as Safe and

Natural Protective Agents against UV-Induced Skin Damage’, *Antioxidants*, 10(5), p. 683. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox10050683>.

Singh, R. *et al.* (2017) ‘Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: Current status and future prospects’, *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), pp. 1–37. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00515>.

Sinha, R.P. and Häder, D.-P. (2008) ‘UV-protectants in cyanobacteria’, *Plant Science*, 174(3), pp. 278–289. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.12.004>.

Skoog, D.A. *et al.* (2006) *Fundamentos de química analítica*. São Paulo: Cengage Learning.

Soares, R.M. *et al.* (2006) ‘Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil’, *Environmental Toxicology*, 21(2), pp. 95–103. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.20160>.

Souza, L.M. (2008) *Aplicações da Espectrometria de Massas e da Cromatografia Líquida na Caracterização Estrutural de Biomoléculas de Baixa Massa Molecular*. Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Spoof, L. *et al.* (2006) ‘First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland)’, *Environmental Toxicology*, 21(6), pp. 552–560. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.20216>.

Starr, M.P. *et al.* (eds) (1981) *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9>.

Staunton, J. and Weissman, K.J. (2001) ‘Polyketide biosynthesis : a millennium review’, *Natural Product Reports*, (18), pp. 380–416. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/a909079g>.

Stiefel, C. and Schwack, W. (2013) ‘Rapid screening method to study the reactivity of UV filter substances towards skin proteins by high-performance thin-layer chromatography’, *International Journal of Cosmetic Science*, 35(6), pp. 588–599. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ics.12082>.

Stirling, D.J. and Quilliam, M.A. (2001) ‘First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in New Zealand’, *Toxicon*, 39(8), pp. 1219–1222. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00266-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00266-X).

Stüken, A. *et al.* (2011) ‘Discovery of Nuclear-Encoded Genes for the Neurotoxin Saxitoxin in Dinoflagellates’, *PLoS ONE*. Edited by B. Zhang, 6(5), p. e20096. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020096>.

Suganya, T. *et al.* (2016) ‘Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach’, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, pp. 909–941. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.026>.

Teixeira, M. da G. *et al.* (1993) ‘Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam,

Bahia, Brazil’, *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 27(3), pp. 244–253.

The American Cancer Society medical and editorial content team (2022) ‘About Melanoma Skin Cancer’. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>.

Thottumkara, A.P., Parsons, W.H. and Du Bois, J. (2014) ‘Saxitoxin’, *Angewandte Chemie International Edition*, 53(23), pp. 5760–5784. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.201308235>.

Tidgewell, K., Clark, B.R. and Gerwick, W.H. (2010) ‘The natural products chemistry of cyanobacteria’, *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, 2, pp. 141–188. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00041-1>.

Toporowska, M., Pawlik-Skowrońska, B. and Kalinowska, R. (2014) ‘Accumulation and effects of cyanobacterial microcystins and anatoxin-a on benthic larvae of *Chironomus* spp. (Diptera: Chironomidae)’, *European Journal of Entomology*, 111(1), pp. 83–90. Disponível em: <https://doi.org/10.14411/eje.2014.010>.

Tovar-Sánchez, A. *et al.* (2013) ‘Sunscreen Products as Emerging Pollutants to Coastal Waters’, *PLoS ONE*. Edited by W.-C. Chin, 8(6), p. e65451. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065451>.

Trout-Haney, J., Wood, Z. and Cottingham, K. (2016) ‘Presence of the Cyanotoxin Microcystin in Arctic Lakes of Southwestern Greenland’, *Toxins*, 8(9), p. 256. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins8090256>.

Turner, P.C. *et al.* (1990) ‘Pneumonia associated with contact with cyanobacteria.’, *BMJ*, 300(6737), pp. 1440–1441. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.300.6737.1440>.

Ujvárosi, A.Z. *et al.* (2020) ‘The cyanobacterial oligopeptides microginins induce DNA damage in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line’, *Chemosphere*, 240, p. 124880. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124880>.

Van Apeldoorn, M.E. *et al.* (2007) ‘Toxins of cyanobacteria’, *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(1), pp. 7–60. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600185>.

Van Der Merwe, D. *et al.* (2012) ‘Investigation of a *Microcystis aeruginosa* cyanobacterial freshwater harmful algal bloom associated with acute microcystin toxicosis in a dog’, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(4), pp. 679–687. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1040638712445768>.

Velasco, M.V.R. *et al.* (2008) ‘Broad spectrum bioactive sunscreens’, *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1–2), pp. 50–57. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.06.031>.

Vessecchi, R. *et al.* (2011) ‘Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa’, *Química Nova*, 34(10), pp. 1875–1887. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011001000025>.

Vincent, W.F. (2009) ‘Cyanobacteria’, in *Encyclopedia of Inland Waters*. Elsevier, pp. 226–232. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00127-7>.

Volk, R.B. and Furkert, F.H. (2006) 'Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth', *Microbiological Research*, 161(2), pp. 180–186. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.08.005>.

Von Elert, E. *et al.* (2005) 'Cyanopeptolin 954, a chlorine-containing chymotrypsin inhibitor of *Microcystis aeruginosa* NIVA Cya 43', *Journal of Natural Products*, 68(9), pp. 1324–1327. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np050079r>.

Wada, N., Sakamoto, T. and Matsugo, S. (2015) 'Mycosporine-Like Amino Acids and Their Derivatives as Natural Antioxidants', *Antioxidants*, 4(3), pp. 603–646. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox4030603>.

Wall, M.E. and Wani, M.C. (1996) 'Camptothecin and taxol: from discovery to clinic', *Journal of Ethnopharmacology*, 51(1–3), pp. 239–254. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01367-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01367-9).

Wang, J. *et al.* (2016) 'Recent Advances on Endocrine Disrupting Effects of UV Filters', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(8), p. 782. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph13080782>.

Wang, M. *et al.* (2016) 'Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking', *Nature Biotechnology*, 34(8), pp. 828–837. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.

Wang, P.-W. *et al.* (2019) 'Comparison of the Biological Impact of UVA and UVB upon the Skin with Functional Proteomics and Immunohistochemistry', *Antioxidants*, 8(12), p. 569. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox8120569>.

Wasil, Z. *et al.* (2013) 'One pathway, many compounds: Heterologous expression of a fungal biosynthetic pathway reveals its intrinsic potential for diversity', *Chemical Science*, 4(10), pp. 3845–3856. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3sc51785c>.

Weckesser, J., Martin, C. and Jakobi, C. (1996) 'Cyanopeptolins, depsipeptides from cyanobacteria', *Systematic and Applied Microbiology*, 19(2), pp. 133–138. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80038-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80038-5).

Weisbrod, C.J. *et al.* (2007) 'Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225(3), pp. 255–266. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.08.004>.

Welker, M. *et al.* (2002) 'Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research', *Environmental Toxicology*, 17(4), pp. 367–374. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.10073>.

Welker, M. *et al.* (2006) 'Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity', *Peptides*, 27(9), pp. 2090–2103. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.014>.

Welker, M. and Von Döhren, H. (2006) 'Cyanobacterial peptides — Nature's own combinatorial biosynthesis', *FEMS Microbiology Reviews*, 30(4), pp. 530–563. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x>.

Whitehead, H.D. (2023) *Development of analytical methods for highly selective and sensitive analysis of compounds relevant to human health and the environment*. University of Notre Dame.

Whitton, B.A. and Potts, M. (2007) 'Introduction to the Cyanobacteria', in *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Nedhelands: Springer, pp. 1–11.

Wiese, M. *et al.* (2010) 'Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs', *Marine Drugs*, 8(7), pp. 2185–2211. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md8072185>.

Wilkinson, B. and Micklefield, J. (2007) 'Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways', *Nature Chemical Biology*, 3(7), pp. 379–386. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.7>.

Wolf, D. and Siems, K. (2007) 'Burning the Hay to Find the Needle – Data Mining Strategies in Natural Product Dereplication', *Natural Products in Drug Discovery*, 61(6), pp. 339–345. Disponível em: <https://doi.org/10.2533/chimia.2007.339>.

Wood, R. (2016) 'Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature', *Environment International*, 91, pp. 276–282. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.026>.

Yamashita, M. and Fenn, J.B. (1984) 'Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme', *Journal of Physical Chemistry*, 88(20), pp. 4451–4459. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/j150664a002>.

Yunes, J.S. (2019) 'Cyanobacterial Toxins', in *Cyanobacteria*. Elsevier, pp. 443–458. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00022-2>.

Zamyadi, A. *et al.* (2012) 'Fate of toxic cyanobacterial cells and disinfection by-products formation after chlorination', *Water Research*, 46(5), pp. 1524–1535. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.06.029>.

Zhang, N.-S. *et al.* (2015) 'Ecological risks of home and personal care products in the riverine environment of a rural region in South China without domestic wastewater treatment facilities', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, pp. 417–425. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.004>.

APÊNDICE

Figura A1: Gráfico de dispersão (*scatter plot*) dos resultados gerados pela plataforma NP Analyst da análise de correlação de bioatividade entre os compostos presentes nas diferentes frações do extrato orgânico da biomassa de cianobactérias e a bioatividade observada nos ensaios de toxicidade aguda.

