



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



LILIAN DOS SANTOS MASCARENHAS

***CAPILLIPHYCUS SALINUS* (CYANOBACTERIA): ANÁLISE POR CLAE-DAD E
AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO FRENTE A ACETILCOLINESTERASE**

Feira de Santana, BA.
2023

LILIAN DOS SANTOS MASCARENHAS

***CAPILLIPHYCUS SALINUS* (CYANOBACTERIA): ANÁLISE POR CLAREZA E
AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO FRENTE A ACETILCOLINESTERASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexsandro Branco (UEFS)
Coorientadora: Profa. Dra. Taiara Aguiar Caires (UESB)

Feira de Santana, BA.
2023

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

M36c Mascarenhas, Lilian dos Santos
Capilliphycus salinus (CYANOBACTERIA): análise por
CLAE-DAD e avaliação da inibição frente a acetilcolinesterase /
Lilian dos Santos Mascarenhas. – 2023.
84f. : il.

Orientador: Alexsandro Branco
Coorientadora: Taíara Aguiar Caires
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de
Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.

1. *Capilliphycus salinus*. 2. Acetilcolinesterase. 3. Compostos
nitrogenados. 4. Cianobactérias. 5. CLAE-DAD. I. Branco,
Alexsandro, orient. II. Caires, Taíara Aguiar, coorient. III.
Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

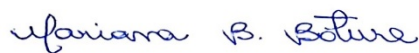
CDU: 579.8

LÍLIAN DOS SANTOS MASCARENHAS

**CAPILLIPHYCUS SALINUS (CYANOBACTERIA): ANÁLISE POR CLAREZADA
E AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO FRENTE A ACETILCOLINESTERASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de mestre.

Feira de Santana, Bahia, 21 de setembro de 2023



Dra. Mariana Borges Botura
(Universidade Estadual de Feira de Santana)



Dra. Alice Ferreira da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)



Dr. Alexandre Branco
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Orientador e Presidente da Banca

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos agradecendo ao Deus que creio e confio, sustentando cada um dos meus dias e que me protege da bondade dos maus e da maldade dos bons.

Na sequência, agradeço a minha família (em especial à minha filha, Lara, e minha mãe, Dona Dete) que incentivam, torcem e se alegram junto comigo.

À minha coorientadora Taiara Caires, acolhedora e incentivadora que, além de possibilitar os trabalhos ajudando com a coleta e identificação da cianobactéria, tentou facilitar o desenvolvimento das atividades de diversas formas e em diversos momentos.

Um agradecimento especial a Annabel Azevedo, que trilhou comigo por caminhos muitas vezes espinhosos, aprendendo junto e ensinando em diversos outros momentos. Obrigada pela amizade, apoio e companheirismo, Bel.

Ao coordenador Alexsandro Branco pelo uso do espaço e aparatos do Labfitoquímica. E, à equipe de pesquisadores e colegas: Mara Márcia, Matheus Nolasco e Isabella Reis por todo apoio nas análises e nas boas discussões; e, a Jéssica Francisco pelos bons momentos de descontração e pela caronas valiosas. Gratidão por tudo!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEFS (PPGBiotec) pela oportunidade de fazer parte do seu corpo de discente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida possibilitando o desenvolvimento dos estudos.

RESUMO

As cianobactérias filamentosas são interessantes fontes de compostos bioativos de aplicação biotecnológica. A espécie *Capilliphycus salinus* (Microcoleaceae) foi alvo de estudo para obtenção e caracterização dos compostos do metabolismo especial (ME), e para avaliação da atividade biológica frente a acetilcolinesterase (AChE). A biomassa foi coletada na praia de Pedra do Sal, Salvador, Bahia, triada, liofilizada, pesada e submetida a extração dos MEs com o solvente etanol 96%. O extrato hidroalcoólico foi particionado com os solventes hexano, acetato de etila e água destilada e o extrato aquoso foi centrifugado e submetido a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel flash resultando em dez frações. As frações foram monitoradas em cromatografia de camada delgada (CCD), submetidas ao ensaio de inibição frente a AChE com o método de Elmann. Análises por cromatografia à líquido de alta eficiência acoplada a arranjo de diodo (CLAE-DAD), com as fases estacionárias coluna C18 e coluna quiral com vancomicina, em modo *polar iônico*, e à espectrometria de massas (EM/EM) foram realizadas. As CCDs reagiram com o ninhidrina apresentando manchas que indicaram a presença de compostos nitrogenados; o ensaio de inibição da AChE foi positivo para todas as frações; a melhor condição cromatográfica foi com uso da coluna quiral, com temperatura de 33° C e taxa de fluxo de 0,1 mL.min⁻¹. Os cromatogramas apresentaram picos em diferentes tempos de retenção e boa intensidade com melhores registros do UV-Vis em 280 nm para a fração 04, com absorbâncias ($\lambda_{\max}$) em regiões compatíveis com compostos fenólicos e aminoácidos semelhantes a micosporinas (MAAs), e em 360 nm para a fração 09, com regiões do $\lambda_{\max}$ compatíveis com compostos da MAA. As análises do EM/EM apresentou pico com íon m/z 560 no modo positivo compatível com um MAA híbrido. Os resultados demonstram o potencial biotecnológico de *C. salinus* como produtora de ME.

PALAVRAS-CHAVES: *Capilliphycus salinus*, acetilcolinesterase, compostos nitrogenados, cianobactérias, CLAE-DAD.

ABSTRACT

Filamentous cyanobacteria are interesting sources of bioactive compounds with biotechnological application. The species *Capilliphycus salinus* (Oscillatoriales:Microcoleaceae) was studied to obtain and characterize compounds of special metabolism (SM), and to evaluate the biological activity against acetylcholinesterase (AChE). The biomass was collected on the beach of Pedra do Sal, Salvador, Bahia, sorted, freeze-dried, weighed, and submitted to extraction of the MEs with 96% ethanol solvent. The hydroalcoholic extract was partitioned with the solvents hexane, ethyl acetate and distilled water and the aqueous extract was centrifuged and subjected to fractionation on a silica gel flash chromatographic column resulting in ten fractions. The fractions were monitored in thin-layer chromatography (TLC), submitted to the inhibition test against AChE with the Elmann method. Analyses by high-performance liquid chromatography coupled to diode-array (HPLC-DAD), with stationary phases C18 column and chiral column with vancomycin, in ion polar mode, and mass spectrometry (MS/MS) were performed. The CCDs reacted with ninhydrin presenting maces that indicated the presence of nitrogen compounds; the AChE inhibition assay was positive for all fractions; the best chromatographic condition was with the use of the chiral column, with a temperature of 33° C and a flow rate of 0.1 mL.min⁻¹. The chromatograms showed peaks at different retention times and good intensity with best UV-Vis records at 280 nm for fraction 04, with absorbances ($\lambda_{\max}$) in regions compatible with phenolic compounds and mycosporine-like amino acids (MAAs), and at 360 nm for fraction 09, with $\lambda_{\max}$ regions compatible with MAA compounds. The MS/MS analyses showed peak with ion m/z 560 in the positive mode compatible with a hybrid MAA. The results demonstrate the biotechnological potential of *C. salinus* as a producer of SM.

KEYWORD: *Capilliphycus salinus*, acetylcholinesterase, nitrogen componds, cyanobacteria, HPLC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Versatilidade de uso e aplicação de cianobactérias.....	17
Figura 2: Estruturas químicas de algumas das principais cianotoxinas produzidas por cianobactérias.....	19
Figura 3: Estrutura básica de: (A) gadusol, 4-dexigadusol e oxo-micosporinas (ciclohexenoma); (B) núcleo de imino-micosporinas (cicloheximinina) apresentando ressonância no anel de seis membros e possíveis regiões de substituições –R. Fonte: Adaptado de Carreto e Carigman (2011)	23
Figura 4: Localização da citonemina na bainha extracelular em filamentos de cianobactéria.....	28
Figura 5: <i>Capilliphyucus salinus</i> : (A) Talo fasciculado. (B-D) Fotomicrografias com aspecto geral dos filamentos.....	35
Figura 6: <i>Capilliphyucus salinus</i> : (A-C) população epilítica na piscina de marés; (D) Biomassa coletada e armazenadas em sacos plástico\ - Nov. ALCB 114379. Fonte: Caires, Taiara Aguiar.....	40
Figura 7: Localização da praia de Pedra do Sal, município de Salvador, litoral norte do estado da Bahia – BR, região de coleta da cianobactéria <i>Capilliphyucus salinus</i>	40
Figura 8: Partição líquido-líquido: (A-B) particionamento em hexano e em acetato de etila, respectivamente; (C) extrato aquoso (CSEa), extrato de acetato de etila (CSAc) e extrato de hexano (CSHx) obtidos.....	42
Figura 9: Coluna cromatográfica em sílica flash: (A-B) detalhes para o início da separação; (C-D) frações obtidas e dispostas para concentração.....	43
Figura 10: Resumo das etapas do desenvolvimento metodológico.....	44
Figura 11: Cromatografia em camada delgada do extrato aquoso (CSEa) e das frações (01-10). Rfs (fatores de retenção) foram registrados em 0,34, 0,46, e 0,54 corados em tons de rosa e púrpura. Entre colchetes são mostrados os Rfs das frações 04 e 09.....	48

Figura 12: Gráfico apresentando o percentual de inibição do extrato aquoso de <i>Capilliphycus salinus</i> e das suas dez frações destacando a maior inibição apresentada pelas frações 09 e 10.....	49
Figura 13: Cromatograma da fração 04 obtido por CLAE-DAD, em fase reversa, usando como fases móveis MeOH modificado (0,1% de CH ₃ COOH) em A e ACN em B. A concentração das amostras foi de 10 mg.mL ⁻¹ , a taxa de fluxo em 1 mL.min ⁻¹ , o volume de injeção de 20 µL e a temperatura em 27º C. A melhor absorbância foi registrada no λ _{max} 280 nm.....	50
Figura 14: Cromatograma da fração 04 extraídos das análises em coluna quiral apresentando os picos A, B, C e D (majoritários) e os picos a e b (minoritários). A eluição ocorreu em modo polar-iônico e usou a fase móvel metanol modificado com 0,2% de ácido acético e 0,05% de hidróxido de amônia em A, com temperatura de 33º C e taxa de fluxo de 0,1 mL.min ⁻¹ . A melhor absorbância foi no λ _{max} 280 nm.....	51
Figura 15: Espectros com λ _{max} em 214/265 nm em A, 220/260 nm em B, 215/227/282 nm em C e 212/260 nm em D.....	51
Figura 16: Espectros de UV-Vis dos picos a e b extraídos do cromatograma da fração 04, apresentando λ _{max} em 334 nm e 333 nm, respectivamente.....	52
Figura 17: Cromatograma da fração 09 apresentando quatro regiões de retenção com picos c, d, e e f bem definidos, retidos em 24,03 min, 27,48 min, 31,00 min e 34,51 min, respectivamente.....	52
Figura 18: Espectros da fração 09 apresentando bandas de absorção com λ _{max} 346 nm em c e f, 347 nm, 363 nm em d e 346 nm em e.....	53
Figura 19: Cromatograma de íons totais da fração 09 obtido no modo de ionização positivo exibindo o íon molecular m/z 560,2 [M+H] ⁺	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação das cianotoxinas, suas classes químicas, organismos produtores, mecanismo de ação, toxicidade e sintomatologia à exposição aguda.....	20
Tabela 2: Uma visão geral dos tipos mais comuns de micosporinas distribuídas nos diferentes grupos (Filos/Gêneros) de seres vivos.....	25
Tabela 3: Exemplos de citoneminas mais comuns e suas características químicas.....	28
Tabela 4: Uma visão geral de metabólitos especiais nitrogenados com atividade biológica produzidos por gêneros e espécies pertencentes a ordem Oscillatoriales.....	31
Tabela 5: Condições de eluição usando as fases móveis MeOH modificado (0,1% de CH ₃ COOH) em A e ACN em B aplicado a fração 04.....	46
Tabela 6: Eluição em modo polar iônico (isocrático) usando como fase móvel MeOH modificado (99,75%, 0,2% CH ₃ COOH e 0,05% NH ₄ OH) aplicado às frações 04 e 09.	46
Tabela 7: Dados dos espectros de UV-vis obtidos por CLAE-DAD com coluna quiral das frações 04 e 09 apresentando os compostos caracterizados e possível composto/classe química e grupo de organismos que ocorrem segundo comparação com dados da literatura.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

'A'	Canal A da fase móvel
'B'	Canal B da fase móvel
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ACTI	Acetiltiocolina
ALCB	Herbário Alexandre Leal Costa
Amb.	Ambiente
BA	Bahia
BR	Brasil
BSA	Albumina sérica bovina
BuOH	Butanol
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC-flash	Cromatográfica em Coluna Aberta – Flash
CH ₃ COOH	Ácido acético
CL	Cromatografia Líquida
LC	Liquid Chromatography (Cromatografia a Líquido)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
cm	Centímetros
CSAc	Extrato de acetato de etila
CSEa	Extrato aquoso
CSEa	Frações do extrato aquoso particionado
CSHx	Extrato hexânico
DA	Doença de Alzheimer
DAD	Detector de arranjo de diodo
DN	Doença neurodegenerativa
ESI-EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
EtOH	Etanol
FLD	Detector de Fluorescência

GPS	Global Positioning System (Sistema de Posicionamento Global)
H ₂ O	Água
HC	Hipótese Colinérgica
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IACHe	Inibidor de acetilcolinesterase
IACHe	Inibição da acetilcolinesterase
MAA	Aminoácido semelhante a micosporina
ME	Metabólito especial
MeOH	Metanol
Min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
N ₂	Nitrogênio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônia
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
PLL	Partição líquido-líquido
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Sal.	Salinidade
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SNC	Sistema nervoso central
UV	Ultravioleta
UVR	Raios ultravioleta
UV-Vis	Radiação Eletromagnética na Região Ultravioleta e Visível
Vis	Luz visível
ϵ	<i>Coefficientes de absortividade molar</i>
Λ_{max}	Absorbância máxima
μL	Microlítro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
2.1 CIANOBACTÉRIAS E A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	16
2.2 COMPOSTOS DO METABOLISMO ESPECIAL COM BIOATIVIDADE EM CIANOBACTÉRIAS	18
2.3 CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE COMPOSTOS BIOATIVOS: A ORDEM OSCILLATORIALES	28
2.3.1 A espécie <i>Capilliphycus salinus</i>	32
2.4 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO PARA ACETILCOLINESTERASE COMO TRATAMENTO DE DOENÇAS NEURODEGENARIVAS (DOENÇA DE ALZHEIMER): O PROTAGONISMO DAS CIANOBACTÉRIAS	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS	38
3.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE	39
3.3 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO	41
3.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE	44
3.5 ANÁLISE QUÍMICA POR CLAE-DAD e ESI-MS/MS	45
3.5.1 CLAE-DAD utilizando fase reversa C18	45
3.5.2 CLAE-DAD usando fase estacionária quiral	46
3.5.3 Análises por espectrometria de massas (ESI-EM/EM)	47
4 RESULTADOS	48
4.1 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE	48
4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E DOS DADOS ESPECTRAIS	49
4.2.1 Análise por CLAE-DAD com fase reversa C18	49
4.2.2 Análises por CLAE-DAD com Fase Estacionária Quiral	50
4.3 ANÁLISES POR ESI- EM/EM	54
5 DISCUSSÃO	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7 REFERÊNCIAS	66
APÊNDICES	74

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas marinhos possuem uma diversidade de organismos estimada em cerca de 300 mil espécies descritas que está acompanhada por uma ampla diversidade química, de moléculas únicas (VIDAL *et al.* 2021). No contexto da biota marinha, os microrganismos fotossintetizantes são destaque na produção de compostos bioativos, matérias-primas importantes para a obtenção de fármacos utilizados nas mais diversas aplicações, com as bactérias heterotróficas e as cianobactérias como protagonistas na produção de compostos do metabolismo especial (ME) (RASTOGI e SINHA 2009; AHMADI *et al.* 2015; RASTOGI *et al.* 2016a). Alguns já são utilizados na formulação de fármacos já aprovados ou em fase de testes clínicos (VEGA *et al.* 2020; 2021; GERALDES e PINTO 2021).

As cianobactérias são um grupo diversificado de bactérias gram-negativas, fotossintetizantes e cosmopolitas reconhecidamente produtoras de substâncias bioativas com ações anti-HIV, anticancerígena, antifúngica, antiprotzoária e antibacteriana, apresentando ainda atividades citotóxica, antiviral, antiobesidade, canabinomimética, inibidora enzimática e protetora contra radiação ultravioleta (UV) além do potencial uso como suplementos alimentares para humanos e animais, ou ainda como base para produtos cosméticos por serem ricas em vitaminas, minerais, lipídios, carboidratos e proteínas (DUFOSSÉ *et al.* 2005; DA SILVA *et al.* 2017; MORONE *et al.* 2019; GERALDES e PINTO 2021; JACINAVICIUS *et al.* 2021). Muitos destes compostos estão entre as substâncias mais perigosas (cianotoxinas) encontradas nas águas superficiais oferecendo riscos à saúde de humanos e dos demais seres vivos expostos, por outro lado podem oferecer benefícios por apresentar atividades biológicas com potencial aplicação na formulação de fármacos diversas (VAN APELDOORN 2007; ARÁOZ *et al.* 2010; CAIRES *et al.* 2018b).

A ação inibitória a determinadas enzimas, apresentadas por ME de origem cianobacteriana, é uma das mais interessantes atividades apresentadas por estes seres. Compostos que exibem inibição da AChE são importantes candidatos a fármacos para o tratamento da doença neurodegenerativas (DN), a exemplo da Doença de Alzheimer (DA), uma vez que, a AChE provoca a diminuição da atividade dos neurônios colinérgicos provocando os sintomas da DA e, a inibição desta enzima aumenta a quantidade do neurotransmissor acetilcolina (ACh) favorecendo a passagem das informações nas regiões sinápticas (FALCO *et al.* 2016; CASTAÑEDA *et al.* 2021).

Estudos confirmaram a ação inibitória da AChE por compostos do ME em extratos de cianobactérias filamentosas pertencentes aos gêneros *Anabaena*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Mycrocistis*, *Nostoc* entre outros, mostrando inibição de forma transitória ou reversível. Contudo, linhagens de cianobactérias filamentosas ainda são pouco estudadas embora despertem grandes interesses pela diversidade dos MEs que produzem e pelo amplo potencial de aplicação dos mesmos (RASTOGI e SINHA 2009). Neste contexto, a ordem Oscillatoriales é caracterizada por reunir organismos filamentosos e ocorrem predominantemente em ambientes de praias com formações rochosas em todo o litoral brasileiro (CAIRES *et al.* 2018a) com os gêneros *Oscillatoria*, *Phormidium* e *Moorea* entre os mais citados como produtoras de ME bioativos.

Recentemente dois novos gêneros marinhos pertencentes a Oscillatoriales foram desmembrados do complexo *Lyngbya* e descritos como *Neolyngbya* e *Capilliphycus* Caires *et al.* (2018a) com duas novas espécies descritas para o último gênero: *C. tropicalis* e *C. salinus* Caires *et al.* (2018a) endêmicas para o litoral baiano. *C. salinus* desperta interesse para a investigação quanto à produção de metabólitos especiais e atividade biológica de inibição da acetilcolinesterase (AChE), lacuna de conhecimento já que não existem quaisquer outros estudos além do registro para a nova espécie.

As linhagens de cianobactérias filamentosas de águas tropicais marinhas são pouco estudadas embora despertem grandes interesses por serem ricos e diversos arsenais de metabólitos especiais e com amplo potencial para as mais diversas aplicabilidades. Desta forma, o presente estudo tendo como objetivo analisar a composição química dos metabólitos especiais do extrato aquoso da cianobactéria *Capilliphycus salinus*, coletada em ambiente natural, com análises por cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE), e avaliar a atividade de inibição destes compostos frente à enzima AChE.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 CIANOBACTÉRIAS E A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

As cianobactérias (Cyanophyceae) constituem um grupo bem definido de bactérias gram-negativas fotossintetizantes constituído por organismos filamentosos, unicelulares, coloniais ou multicelulares e estão distribuídos nos mais variados ecossistemas, com registros fósseis datados de 3,5 bilhões de anos (VIDAL *et al.* 2021; JACINAVICIUS *et al.* 2023). A ampla biodiversidade e capacidade fisiológica adaptativa que estes organismos apresentam é reflexo da diversidade de ambientes que colonizam, ocupando habitats terrestres, aquáticos (águas doce e salgada) e ambientes extremos (regiões polares e alpinas) (RASTOGI *et al.* 2016a; KOMÁREK 2016; NOWRUZI *et al.* 2021). O hábito cosmopolita favoreceu a ampliação da capacidade de biossíntese de grandes quantidades e diversidade de metabólitos especiais (ME), produtos naturais com funções especializadas para competir com sucesso pela sobrevivência no planeta, favorecendo também para a alta capacidade de fixar nitrogênio (N₂) atmosférico (RASTOGI e SINHA 2009; AHMADI *et al.* 2015; RASTOGI *et al.* 2016a).

Os MEs pertencem a um amplo número de classes químicas, incluindo alcaloides e substâncias derivadas de peptídeos e a descoberta de novos compostos, em especial de organismos marinhos, é um desafio crescente no campo da bioprospecção. Nesse contexto, as cianobactérias são promissoras fontes de novos compostos bioativos naturais podendo ultrapassar outros organismos marinhos e liderar a lista de maiores produtores até 2024 (CARROLL *et al.* 2019; 2021). Investigações apontam um aumento de 71% na descoberta de novos compostos cianobacterianos, com 48 compostos descritos apenas em 2017, sendo que 29 deles apresentam ao menos um grupo amida distribuídos em 11 peptídeos cíclicos e 5 peptídeos lineares em cianobactérias filamentosas (CARROLL *et al.* 2019).

Tais compostos podem ser considerados perigosos em todo o mundo, estando entre as substâncias mais tóxicas encontradas nas águas superficiais, podendo oferecer riscos ecotoxicológicos e à saúde humana em função da exposição a algumas cianobactérias produtora de determinados metabólitos (RASTOGI e SINHA 2009; SILVA-STENICO *et al.* 2013; JACINAVICIUS *et al.* 2023). Contudo, ainda são poucos os esclarecimentos a respeito da constituição química destes compostos, embora os estudos venham sendo ampliados e muitos potenciais biotecnológicos já são comprovados.

As atividades biológicas conhecidas das cianobactérias são de ampla versatilidade de uso e aplicação, apresentando estabilidade e maior atividade do que muitos compostos de origem terrestres (MIAN 2003; SINGH *et al.* 2011; SOARES 2014; MI *et al.* 2017; CARROLL *et al.* 2021). As formas de uso vão desde a formulação de produtos farmacêuticos e aplicação na indústria alimentícia à produção de remediadores ambientais e biocombustíveis, uma alternativa segura em substituição aos produtos de origem sintética (DUFOSSÉ *et al.* 2005; DA SILVA *et al.* 2017). A diversidade química destes produtos naturais são reconhecidos como matéria prima em potencial para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos (Figura 1), embora grande parte dos MEs permaneça inexplorada (RASTOGI e SINHA 2009; SVIRČEV *et al.* 2019; MORONE *et al.* 2019; GERALDES e PINTO 2021; JACINAVICIUS *et al.* 2021).

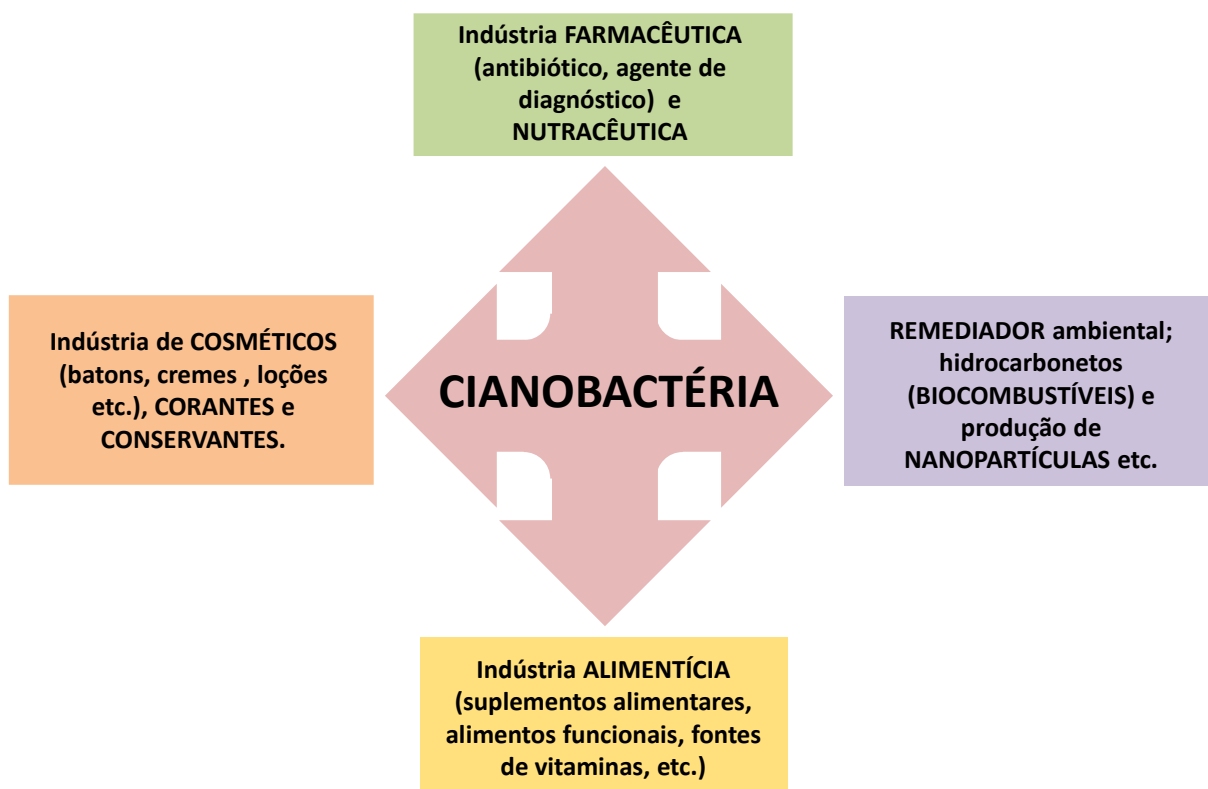


Figura 1: Versatilidade de uso e aplicação de cianobactérias.

Fonte: Adaptado de DUFOSSÉ *et al.* (2005).

A maioria dos ME promissores de origem cianobacteriana tende a ser produzido por organismos marinhos filamentosos, os quais detêm cerca de metade dos 800 compostos relatados na literatura até o ano 2016, incluindo lipopeptídeos, alcaloides, sacarídeos, compostos indólicos e aromáticos, sendo estes extraídos de espécimes pertencentes à ordem Oscillatoriales (GERWICK *et al.* 2008; MI *et al.* 2017). Os gêneros *Planktothrix*, *Oscillatoria*,

Lyngbya, *Moorea* e *Okeania* se destacam como bons produtores de MEs, com 58% dos produtos naturais relatados para o gênero *Oscillatoria* e 35% para o gênero *Lyngbya*, pertencentes às famílias Oscillatoriaceae e Microcoleaceae, respectivamente, com os compostos aplicados às mais variadas atividades produtivas (GERWICK *et al.* 2008; MI *et al.* 2017; CARROLL *et al.* 2021; NOWRUZI *et al.* 2020; 2020a; GUIRY e GUIRY 2023).

As cianobactérias produtoras de toxinas são as mais estudadas nos organismos que compõem o grupo. Espécies comuns a sistemas de água doce, com florações potencialmente nocivas e produtoras de toxinas, ainda são priorizadas por apresentarem atividades hepatotóxicas e neurotóxicas a humanos e outros animais (PLAAS e PAERL 2020; JACINAVICIUS *et al.* 2021; 2023). Neste universo de compostos tóxicos, aqueles com potencial aplicação biotecnológica são alvos de estudos pelo forte interesse para as indústrias farmacêutica e cosmética, a exemplo dos estudos aplicados às citotoxinas, para o tratamento de doenças neurodegenerativas, e os aminoácidos semelhantes à micosporinas (micosporinas ou MAAs, derivado do inglês *mycosporine-like amino acid*) e citoneminas, por apresentarem potencial proteção à pele humana contra os efeitos causados pela radiação ultravioleta (UV) (KAGEYAMA e WADITEE-SIRISATTHA 2019; GERALDES e PINTO 2021).

2.2 COMPOSTOS DO METABOLISMO ESPECIAL COM BIOATIVIDADE EM CIANOBACTÉRIAS

As cianotoxinas podem causar efeitos agudos e crônicos em seres humanos e outros animais, razões pelas quais suas florações podem levar a impactos econômicos com restrição do abastecimento de água para os diversos usos, tais como restrição para uso doméstico e redução das atividades turísticas associadas a balneabilidade, por exemplo (VAN APELDOORN 2007; ARÁOZ *et al.* 2010; CAIRES *et al.* 2018b). Produzidas na parede celular ou interior das células cianobacterianas, as cianotoxinas possuem estruturas químicas e toxicidades distintas e a liberação na água podem provocar desde irritações cutâneas até a morte dos indivíduos após contato ou ingestão de água e/ou alimentos contaminados (GANTAR *et al.* 2008; BOTANA *et al.* 2019).

As vias biossintéticas das cianotoxinas envolvem comumente a síntese de grandes complexos modulares de peptídeo sintetase não ribossômica (NRPS) e policetídeo sintase (PKS) (FIORE 2011; CAIRES *et al.* 2018b) e estão reunidas em três classes de acordo com suas estruturas químicas: peptídeos cíclicos (microcistina e nodularina), alcaloides (anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxina, cilindrospermopsina, aplisiatoxinas, lyngbyatoxina-a) e

lipopolissacarídeos (Figura 2) (KAEBERNICK e NEILAN 2001; BORTOLI 2015; BOTANA *et al.* 2019).

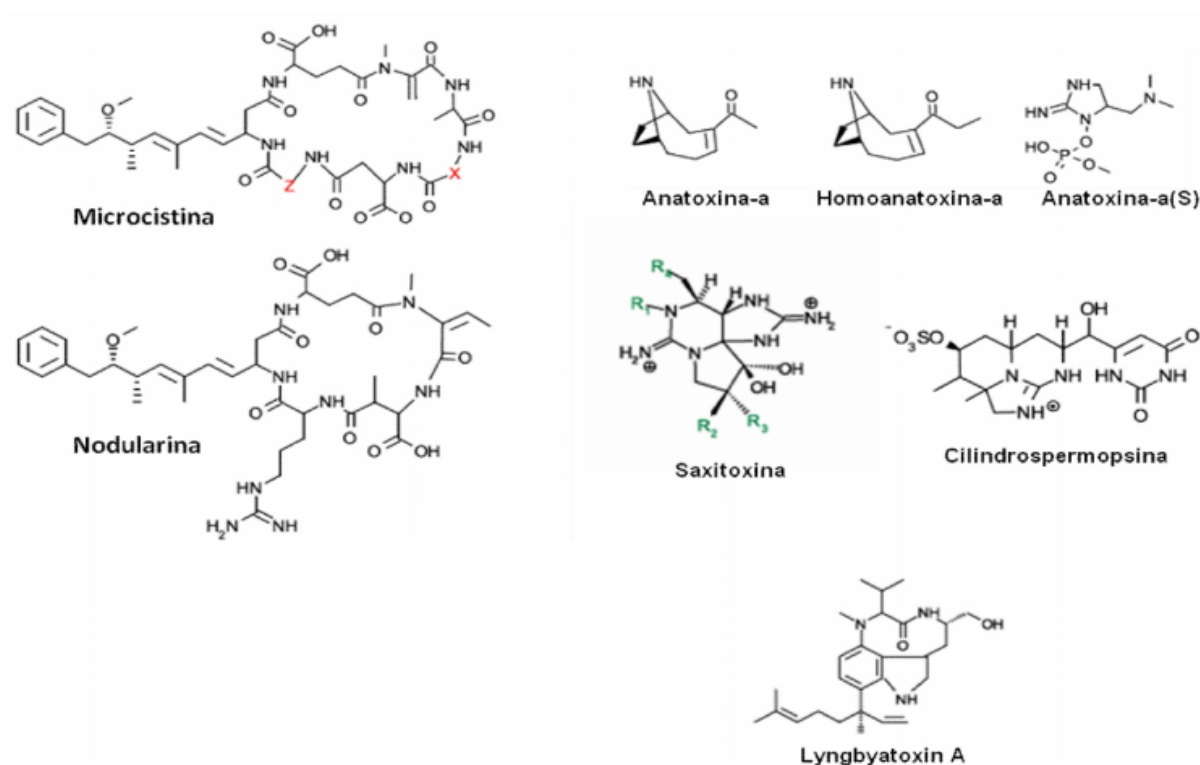


Figura 2: Estruturas químicas de algumas das principais cianotoxinas produzidas por cianobactérias.

Fonte: Adaptado de Bortoli e Pinto (2015).

A maioria das cianotoxinas é classificada como hepatotoxinas ou neurotoxinas, existindo ainda as dermatotoxinas (lyngbyatoxina e aplysiatoxinas) e são produzidas principalmente por cianobactérias marinhas bentônicas. Apenas saxitoxina e anatoxinas são consideradas neurotoxinas a humanos e agem diretamente no sistema nervoso desencadeando desequilíbrio, fasciculação, respiração ofegante e convulsões como sinais de intoxicação. As neurotoxinas são comumente produzidas por cepas dos gêneros *Anabaena*, *Lyngbya* e *Oscillatoria*, e em menor frequência por cepas dos gêneros *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis*, *Phormidium* ou *Planktotrix* (Tabela 1) (KAEBERNICK e NEILAN 2001; VAN APELDOORN *et al.* 2007; GANTAR *et al.* 2008; RASTOGI E SINHA 2009; BORTOLI e PINTO 2015; BLUNT *et al.* 2016; MI *et al.* 2017; BOTANA *et al.* 2019; CARROLL *et al.* 2021; NOWRUZI *et al.* 2020; 2020a; GUIRY e GUIRY 2023).

Tabela 1: Relação das cianotoxinas, suas classes químicas, organismos produtores, mecanismo de ação, toxicidade e sintomatologia à exposição aguda.

Toxina	Classe química	Principais Gêneros	Mecanismo de ação	Atividade	Sintomatologia a exposição aguda
Neurotoxinas					
Saxitoxina (PSPs)	Alcaloide neurotóxico	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Planktothrix</i> e também algumas espécies de dinoflagelados	Bloqueio dos canais de sódio	-	Paralisia progressiva dos músculos, diminuição dos movimentos, exagerada respiração abdominal, cianose, convulsão, parada respiratória e morte.
Anatoxina-A (Antx-A)	Alcaloide neurotóxico	<i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> e <i>Raphidiopsis</i>	Agonista nicotínico, musculares e neuronais	Larvicidas	Paralisia progressiva, forte respiração abdominal, cianose, convulsão, morte por asfixia.
Anatoxina-A (S)	Alcaloide neurotóxico	<i>Anabaena</i>	Inibição irreversível da acetilcolinesterase	-	Paralisia progressiva, fraqueza muscular, diminuição da frequência respiratória e convulsões. Salivação intensa. Morte ocorre por falência respiratória.
Homoanatoxina-A	Alcaloide neurotóxico	<i>Planktothrix</i>	Agonista nicotínico, musculares e neuronais		Paralisia progressiva, forte respiração abdominal, cianose, convulsão, morte por asfixia.
Kalkitoxina	Lipopeptídeo	<i>Lyngbya</i>	-	Icthiotóxica	Bloquear canais de sódio da célula nervosa de peixes
Hepatotoxinas					
Microcistina	Heptapeptídeo cíclico	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Aphanocapsa</i> , <i>Anabaenopsis sp.</i>	Inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A	Algicida/ Larvicida/ Herbicida	Prostração, pilo ereção, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarreia, choque hipovolêmico e hemorragia intra-hepática.
Nodularina	Pentapeptídeo cíclico	<i>Nodularia</i> .	Inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A	-	Prostração, pilo ereção, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarreia, choque hipovolêmico e hemorragia intra-hepática.

Toxina	Classe química	Principais Gêneros	Mecanismo de ação	Atividade	Sintomatologia a exposição aguda
Hepatotoxinas					
Cilindrospermopsina	Policetídeo alcaloidal tóxico	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Anabaena</i> .	Inibição da síntese protéica	Larvicida	Desestruturação e necrose do fígado, danos em células renais, cardíacas, pulmonares e também da mucosa gástrica.
Dermatotoxinas					
Lyngbyatoxina -A	-	<i>Lyngbya</i>	Efeitos gastrointestinais	-	Aumento da secreção gástrica, promove a inflamação, edema pulmonar, irritação gastrointestinal e promoção de tumor dérmico.
Aplysiatoxina	Viclactona fenólica	<i>Stylocheilus</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Oscillatoria</i>	Potentes promotores de tumor e ativa a proteína quinase C	-	Irritação gastrointestinal
Outras Toxinas					
Homoanatoxina-A	-	<i>Planktothrix</i>	-	-	Semelhante a Antx-A
Lipopolissacarídeos	-	Cianobactéria em geral	-	-	Potencial irritante; afeta qualquer tecido exposto
Antillatoxina	-	<i>Lyngbya</i>	-	-	Ictiotoxina potente, estimula os canais de sódio dependentes de tensão
Debromoaplysiatoxina	-	<i>Schizothrix</i> e <i>Oscillatoria</i>	Potentes promotores de tumor e ativa a proteína quinase C	-	Irritação gastrointestinal

Fontes: Kaebernick e Neilan (2001), Van Apeldoorn *et al.* (2007), Izaguirre *et al.* (2007), Rastogi e Sinha (2009), Bortoli e Pinto (2015), Blunt *et al.* (2016), Botana *et al.* (2019), Nowruzi *et al.* (2020; 2020a).

A anatoxina-a (Antx-A) é um agonista dos receptores nicotínicos, com modos de ação tanto musculares quanto neuronais, ao passo que a anatoxina-a(S) possui potente efeito letal, se tratando do único organofosforado produzido por cianobactérias até então conhecido (VAN APELDOORN *et al.* 2007; AYALA *et al.* 2019), com ação semelhante ao agente nervoso Sarin e dez vezes mais letal que o Antx- A e apresentando atividade irreversível de inibição da AChE. As anatoxina-a(S) apresentam sintomatologias comuns as Antx- A após exposição aguda, causando o bloqueio despolarizante neuromuscular com paralisia progressiva, forte respiração abdominal, cianose, salivação intensa, convulsão e a morte ocorre por falência

respiratória (Tabela 1) (RASTOGI e SINHA 2009; 2016a; BORTOLI e PINTO 2015; BLUNT *et al.* 2016; BOTANA *et al.* 2019; NOWRUZI *et al.* 2021).

Já as hepatotoxinas atingem diretamente o fígado e constituem o tipo mais comum de intoxicação apresentando sinais de prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal e diarreia produzida principalmente por compostos associados aos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria* e *Nostoc* (Tabela 1). Ao passo que as dermatotoxinas, produzidas especialmente pelos gêneros *Lyngbya*, *Nodularia*, *Anabaena* e *Oscillatoria*, são irritantes de contato provocando dermatites e irritações nos olhos, febre, tontura, fadiga e gastroenterite (KAEBERNICK e NEILAN 2001; BRIAND *et al.* 2003). A hepatotoxicose e a neurotoxicose são as toxicidades mais comumente causadas pela ingestão de cianotoxinas (Tabela 1) (KAEBERNICK e NEILAN 2001; BORTOLI e PINTO 2015).

Apesar dos efeitos tóxicos muitas cianotoxinas, devido à sua natureza aleloquímica, mostram-se fortes candidatos para a produção de fármacos eficientes para uso no controle da doença de Alzheimer, por exemplo, devido a sua ação inibitória frente a enzima AChE, responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh), com consequente interrupção dos impulsos nervosos no sistema nervoso central e periférico (ARAÚJO *et al.* 2016; SINGH *et al.* 2017). A função das cianotoxinas no ambiente natural ainda é bastante discutida entre os estudiosos.

Algumas linhas de pesquisa sobre a função destes compostos na natureza defendem que eles agem como mecanismo de defesa natural, outros estudos tentam evidenciar que as toxinas são moléculas de sinalização exercendo comunicação entre as cianobactérias ou sugerem auxiliar para uma melhor captação da luz solar dos organismos que os produzem, (BORTOLI e PINTO 2015). A realização da fotossíntese oxigênica requer das cianobactérias a exposição à UVR, a qual é potencialmente prejudicial para as células, necessitando assim de estratégias de sobrevivência para atenuar os efeitos nocivos desta radiação (NOWRUZI *et al.* 2020a; BASU e MACKEY 2018; DEXTRO *et al.* 2023).

Em se tratando dos compostos fotoprotetores, estes são importantes adaptações dos organismos marinhos às exposições às quais estão submetidos exibindo propriedades fotoprotetoras sob estresse por radiação que previnem danos causados por exposição a radiação ultravioleta (UV) (SINGH *et al.* 2017). Diferentes estímulos ambientais podem interferir na biossíntese desses compostos, a exemplo da variação da intensidade da luz, os diferentes comprimentos de onda da radiação UV, assim como a disponibilidade de nutrientes (RASTOGI *et al.*, 2010; SINGH *et al.* 2017). Dentre as substâncias fotoprotetoras, a síntese de

duas delas são importantes estratégias absorventes/de triagem: as micosporinas ou aminoácidos semelhantes a micosporina (do inglês *mycosporine-like amino acid*) (MAAs) e as citoneminas (CARRETO e CARINGAN 2011; LAWRENCE *et al.* 2018a; 2018b; BASU e MACKEY 2018; DEXTRO *et al.* 2023).

A família de ME representadas pelos MAAs é constituída por metabólitos comumente presentes em uma ampla variedade de organismos com relações taxonômicas distantes que vão desde organismos procariontes (cianobactérias) a organismos eucariontes (tais como fungos, algas eucarióticas e alguns animais marinhos) (SINHA *et al.* 2007; SIMENOV e MICHAELIAN 2017). Comuns em cianobactérias, a maioria dos relatos existentes na literatura para as espécies produtoras de MAAs são para cepas da ordem Nostocales (principalmente para o gênero *Nostoc*), seguida por gêneros de Chroococcales (*Microcystis*) e de Oscillatoriales (*Oscillatoria*) com algumas citações para a ordem Gomontiellales, para o gênero *Chamaesiphon* (RASTOGI *et al.* 2016a; BAIRWA *et al.* 2021; DEXTRO *et al.* 2023).

Derivados dos aminoácidos fenólicos, os MAAs formam uma família de metabólitos baixo peso molecular (<400 Da), incolores e solúveis em água, com cromóforo de absorção da radiação UV composto por um núcleo ciclohexenoma ou um núcleo ciclohexinimina (Figura 3 A e B) conjugado ao nitrogênio ou componente imino-álcool dos aminoácidos (RASTOGI e INCHAROENSAKDI 2014; 2016a; DEXTRO *et al.* 2023).

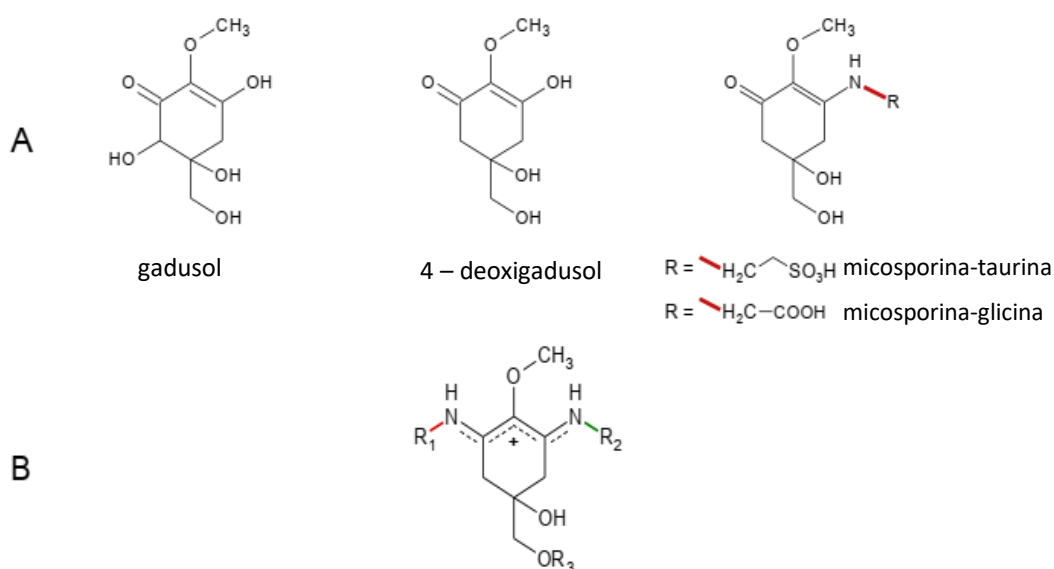


Figura 3: Estrutura básica de: (A) gadusol, 4-dexigadusol e oxo-micosporinas (ciclohexenoma); (B) núcleo de imino-micosporinas (ciclohexinimina) apresentando ressonância no anel de seis membros e possíveis regiões de substituições -R. **Fonte:** Adaptado de Carreto e Carigman (2011).

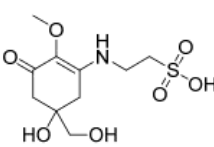
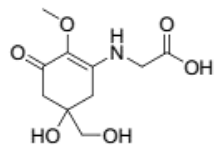
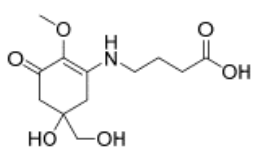
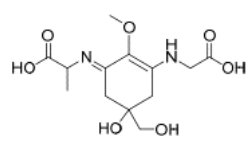
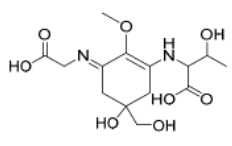
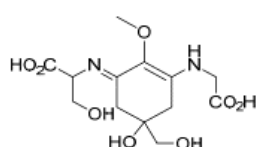
Os MAAs apresentam absorvância máxima (λ_{max}) nas regiões UVB (280-315 nm) e UVA (315-400 nm) de radiação solar possuindo papel fundamental contra os raios UV-A e UV-B. Nas células, tais compostos atuam principalmente como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ROS), previnem a oxidação lipídica e extinguem as radiações UV-B (280–315 nm) e UVA (315–360 nm) dissipando a radiação solar absorvida em forma de energia térmica sem gerar produtos foto oxidativos (RASTOGI e MADAMWAR 2016; RASTOGI *et al.* 2014; 2016a; LAWRENCE *et al.* 2018a; PARAILLOUX *et al.* 2020; DEXTRO *et al.* 2023). A radiação UV-A é um componente da radiação solar que penetra na derme causando ressecamento e rugas, podendo provocar anormalidades dos pigmentos e podendo produzir também um excesso de ROS que podem causar a destruição do DNA de forma indireta; os raios UV-B por sua vez, são altamente citotóxico e mutagênico à camada mais externa da pele, levando a mutações e o crescimento celular anormal, além de potencialmente suprimir as reações imunológicas afetando as vias de transdução de sinal intracelular e a expressão gênica (DERIKVAND *et al.* 2017; NOWRUZI *et al.* 2020a).

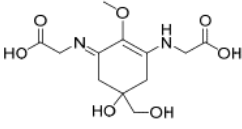
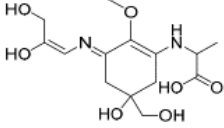
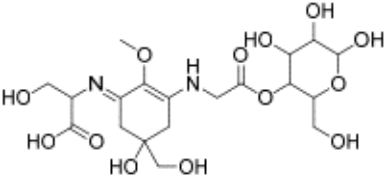
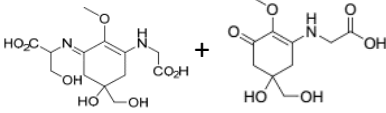
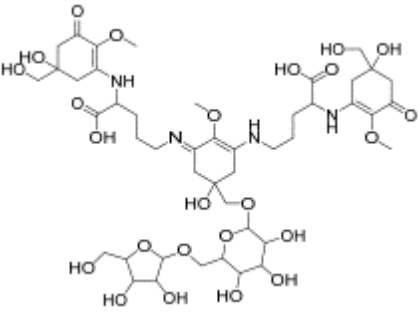
A provável origem biossimbiótica dos MAAs seria a partir de uma cianobactéria, ou um ancestral cianobacteriano, com transmissão para organismos eucariontes por eventos de endossimbiose e/ou de transferência lateral de genes (procariotos para eucariotos) durante o processo evolutivo (SINGH *et al.* 2010; RASTOGI *et al.* 2016a; SIMENOV e MICHAELIAN 2017). Há evidências de duas vias anabólicas das microsporinas: a via da pentose fosfato e a via do chiquimato, ambas possuindo como molécula precursora o 4-desoxigadusol (Figura 3) (HARTMANN *et al.* 2015; WADA *et al.* 2015; D'AGOSTINO *et al.* 2016; TORRES *et al.* 2018; LAWRENCE *et al.* 2018a; DEXTRO *et al.* 2023).

Os pesquisadores não fazem uma distinção química clara entre a microsporina e os MAAs, ainda assim, as diferenças estruturais são observadas adicionando o aminoácido glicina ao 4-desoxigadusol que origina a microsporina-glicina, espécie molecular com um anel de amino-ciclohexenona (oxo-microsporinas), denominadas microsporinas “originais” (Figura 3 A), enquanto as adições de aminoácidos à microsporina-glicina dão origem a imino-MAAs primários, a exemplo da shinorina e porfira-334 que possuem os aminoácidos serina e treonina, respectivamente (Figura 3, B). Modificações adicionais nas cadeias laterais destes aminoácidos originam as imino-MAAs secundárias, tais como microsporina-glicina-alanina e shinorina (Tabela 2) (SIMEONOV e MICHAELIAN, 2017; TORRES *et al.* 2018; LAWRENCE *et al.*

2018a; KAGEYAMA e WADITEE-SIRISATTHA 2019; GERALDES e PINTO 2021; DEXTRO *et al.* 2023).

Tabela 2: Uma visão geral dos tipos mais comuns de micosporinas distribuídas nos diferentes grupos (Filos/Gêneros) de seres vivos.

Compostos fotoprotetor Pubchem CID	$\lambda_{\max}$ (nm) E ($M^{-1}.cm^{-1}$)	Fórmula molecular Massa molecular	Estrutura molecular	Principais Filos/Gêneros
Micosporinas				
Oxo-micosporina				
Micosporina -taurina -	309 28,100	$C_{10}H_{17}NO_7S$ 295,07		Cnidaria, Cyanobacteria .
Micosporina -glicina 4444486	310 28,100	$C_{10}H_{15}NO_6$ 245.09		Arthropoda, Chlorophyta, Chordata, Cnidaria, Cyanobacteria , Dinoflagellata, Echinodermata, Lichen, Miozoa, Mollusca, Ochrophyta, Phaeophyta, Porifera, Rhodophyt
Micosporina -GABA -	310 28,900	$C_{12}H_{20}NO_6$ 273.12		Cyanobacteria , Dinoflagellata
Imino-micosporina				
Micosporina -glicina-alanina 102110164	333 -	$C_{13}H_{20}N_2O_7$ 316.13		Cyanobacteria , Rhodophyta
Porphyra-334 91864535	334 42,300	$C_{14}H_{22}N_2O_8$ 346.14		Arthropoda, Bacillariophyta, Chlorophyta, Chordata, Cnidaria, Cyanobacteria , Dinoflagellata, Miozoa, Mollusca, Ochrophyta, Phaeophyta, Porifera, Rhodophyta
Shinorina 101926676	334 44,668	$C_{13}H_{20}N_2O_8$ 332.12		Athropoda, Bacillariophyta, Chlorophyta, Chordata, Cyanobacteria , Dinoflagellata, Lichen, Miozoa, Mollusca, Ochrophyta, Phaeophyta, Porifera, Rhodophyta

Compostos fotoprotetor Pubchem CID	$\lambda_{\max}$ (nm) ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Fórmula molecular Massa molecular	Estrutura molecular	Principais Filos/Gêneros
Imino-micosporina				
Micosporina -2-glicina 23427657	334 -	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₇ 302.11		Bacillariophyta, Cnidaria, Cyanobacteria , Echinodermata, Mollusca, Rhodophyta
Euhalothece -362 102182144	362 -	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₇ 330.14		Cyanobacteria
Micosporinas híbridas				
Hexose-shinorina -	333 -	C ₁₉ H ₃₀ N ₂ O ₁₃ 494.1		Cyanobacteria
M-320 -	320 -	- 559		Dinoflagelado
1050-Da MAA -	312/ 340 58,800	C ₄₅ H ₇₀ N ₄ O ₂₄ 1050.44		Cyanobacteria

Fonte: La Barre e Kornprobst (2014), Geraldes e Pinto (2021), Dextro *et al.* (2023) e <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>.

As características do tipo coeficientes de absortividade molar (ϵ), absorções máximas do UV entre 310 e 362 nm, a fotoestabilidade nas águas doce e salgada, associadas às variáveis ambientais como pH, temperatura, existência de vários solventes dissolvidos na água e a radiação UV (UVR) apontam o potencial dos MAAs como compostos fortemente fotoprotetores (LA BARRE e KORNPORBST 2014; SINGH *et al.* 2017; KAGEYAMA e WADITEE-SIRISATTHA 2019; VEGA *et al.* 2020; 2021; GERALDES e PINTO 2021). Atualmente existem mais de 70 compostos da MAA já identificados nos mais diferentes grupos de seres vivos (Tabela 2) apresentando atividade biológicas com funções filtros fotoprotetores

da radiação UV e agente antioxidante, sendo considerados promissores constituintes de produtos cosméticos com alta proteção UV com formulações comerciais já existentes em composições farmacológicas (TORRES *et al.* 2018; VEGA *et al.* 2020; 2021; GERALDES e PINTO 2021).

As formulações comerciais, a exemplo dos protetores solares Helioguard 365®, desenvolvido por Mibelle AG Biochemistry, e Helionori®, comercializado pela Gelyma, fazem uso dos MAAs em suas composições farmacológicas adicionando às suas formulações a combinação dos MAAs porphyra-334 e shinorine e dos MAAs porphyra-334, shinorine e asterina, respectivamente, extraídas de *Porphyra umbilicalis* (CARRETO e CARIGNAN 2011; TORRES *et al.* 2018; VEGA *et al.* 2020; 2021; GERALDES e PINTO 2021). Os MAAs apresentam ainda ações antienvhecimento, atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória, inibição da glicação de proteínas e inibição da atividade da colagenase (KAGEYAMA e WADITEE-SIRISATTHA 2019; GERALDES e PINTO 2021).

No ambiente natural os MAAs desempenham papel nos sistemas biológicos na regulação osmótica, como reguladores da esporulação, na germinação em fungos e na reprodução de invertebrados marinhos, e também como pigmentos acessórios da fotossíntese; podendo desempenhar ainda papel sobre a dessecação ou estresse térmico em certos organismos e atuar como um reservatório de N₂ intracelular ou mesmo proteger os consumidores primários e secundários através da cadeia alimentar (CARRETO e CARIGNAN 2011; WADA *et al.* 2015; SINGH *et al.* 2017; TORRES *et al.* 2018; VEGA *et al.* 2020; GERALDES e PINTO 2021). Desempenhando função semelhante aos MAAs, as citoneminas são excelentes fotoprotetores naturais contra a radiação UV e, ao contrário daqueles, são compostos sintetizadas exclusivamente por cianobactérias (PATHAK *et al.* 2016; 2019; SINGH *et al.* 2017; VEGA *et al.* 2020).

As citoneminas, por sua vez, são pigmentos de proteção, lipofílico de cor amarelo-acastanhado, formado por um dímero indol e subunidades fenólicas que se acumulam nas bainhas extracelulares de algumas cianobactérias (Figura 4) conferindo às células fotoproteção contra a radiação UV, em especial na região UV-A-violeta-azul com absorção máxima em 384 nm, e ação antioxidantes que previnem danos celulares resultantes da produção de ROS de forma induzida (GIOVANNETTI *et al.* 2013; RASTOGI e INCHAROENSAKDI 2014; PATHAK *et al.* 2016; 2019; VEGA *et al.* 2020).

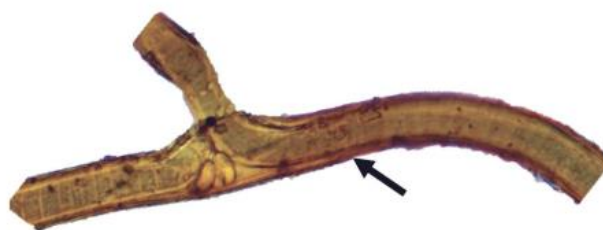
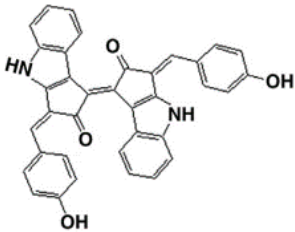
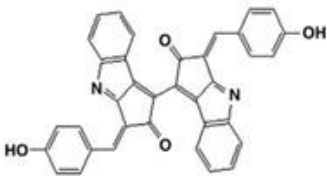
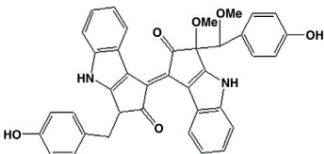


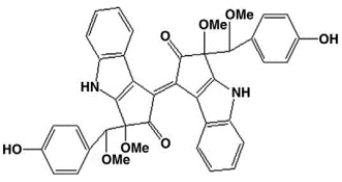
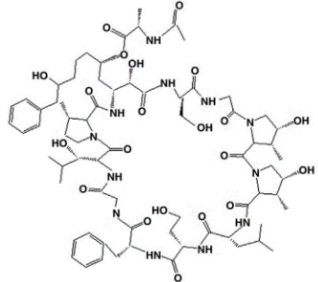
Figura 4: Localização da citonemina na bainha extracelular em filamentos de cianobactéria.

Fonte: Adaptado de Pathak *et al.* (2019).

Apesar de estarem associadas à bainha celular, as citoneminas não fazem parte efetivamente dela e podem ser facilmente removidas, o que indica não estarem ligadas covalentemente, apresentando-se em duas formas mais comuns: uma forma oxidada, com coloração marrom-amarelada, insolúvel em água e menos solúvel em solventes orgânicos, como piridina e tetra-hidrofurano; e, a forma reduzida que possui coloração caracterizada por um vermelho brilhante e solúvel em solventes orgânicos (Tabela 3) (RASTOGI e INCHAROENSAKDI 2014; PATHAK *et al.* 2019; VEGA *et al.* 2020).

Tabela 3: Exemplos de citoneminas mais comuns e suas características químicas.

Citoneminas Pubchem CID	$\lambda_{\max}$ (nm)	Fórmula molecular Massa molecular	Estrutura molecular	Principais Gêneros
Citonemina oxidada 135473381	252, 278, 300 e 386 -	$C_{36}H_{20}N_2O_4$ 544.6		
Citonemina Reduzida 101366214	246, 276, 314, 378, 474 e 572 -	$C_{36}H_{22}N_2O_4$ 546.6		<i>Lyngbya</i> (<i>Lyngbya</i> sp.), <i>Scytonema</i> (<i>Scytonema</i> sp. R77DM*)
Dimethoxy- citonemina 10461341	316 e 422 18143 e 23015	$C_{38}H_{28}N_2O_6$ 608.6		

Citoneminas Pubchem CID	λ_{max} (nm)	Fórmula molecular Massa molecular	Estrutura molecular	Principais Gêneros
Tetramethoxy- citonemina 10327140	562 5944	$\text{C}_{40}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_8$ 670.7		<i>Lyngbya</i> (<i>Lyngbya</i> sp.), <i>Scytonema</i> (<i>Scytonema</i> sp. R77DM*)
Scytonemin-A 78325125	- -	$\text{C}_{71}\text{H}_{106}\text{N}_{12}\text{O}_{21}$ 1463.7		

Fontes: Rastogi *et al.* (2014), Pathak *et al.* (2017), Simeonov e Michaelian (2017), Pathak *et al.* (2019) e <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>.

O mecanismo antigo de proteção UVR, o composto é produzido em resposta aos elevados níveis de radiação UV-A com perfil de absorção do UV/Vis que absorve fortemente a radiação UV-A enquanto transmite os comprimentos de onda da luz que são absorvidos pelo aparato fotossintético das cianobactérias sem sofrer fotodegradação (GARCIA-PICHEL e CASTENHOLZ 1991; GIOVANNETTI *et al.* 2013; PATHAK *et al.* 2016; 2017). Além disso, a citonemina promove o retardamento da fotodegradação da clorofila a pela radiação UVA nas cianobactérias que as produz, observando-se ainda a existência de uma relação direta entre a produção de citonemina em cianobactérias e a exposição ao fluxo de UV, mantendo-se altamente estável em resposta a diferentes estressores, como a forte radiação UV, a temperatura etc., realizando a atividade de triagem dos raios UV e evitando que até 90% da radiação UV entre nas células sem qualquer investimento metabólico adicional, mesmo após prolongados períodos em inatividade fisiológica (SINGH *et al.* 2017; PATHAK *et al.* 2017; 2019; FUENTES-TRISTAN 2019; VEGA *et al.* 2020; NOWRUZI *et al.* 2020; GAO *et al.* 2021).

A citonemina é um composto eficaz e não tóxico, com valiosa função fotoprotetora, apresentando ação antioxidante e fator de eliminador de radical em sua forma reduzida. Frequentemente citadas em diversos estudos, as citoneminas são promissores compostos para exploração biotecnológica por apresentar alta foto-estabilidade, sugerindo a utilização pelas indústrias farmacêutica com inclusão do composto como fotoprotetor orgânico em loções de produtos cosméticos para proteção UVR, bem como por apresentar propriedades anti-inflamatória e antiproliferativa (PATHAK *et al.* 2019; FUENTES-TRISTAN 2019; VEGA *et al.*

2020; GAO *et al.* 2021). Além disso, possui potencial farmacológico como agente anti-inflamatório, antiproliferativo e antioxidante, e atividade quinase relacionada ao ciclo celular, interrompendo o processo inflamatório e a proliferação de células Jurkat, linhagem de células T ($IC_{50} = 7,8 \mu M$) da leucemia em humanos (SINGH *et al.* 2010b; DERIKVAND *et al.* 2017; PATHAK *et al.* 2019; NOWRUZI *et al.* 2020). A ordem Oscillatoriales é reconhecida como produtora de ME de forma geral, com destaque para os gêneros *Oscillatoria*, *Phormidium* e *Moorea*.

2.3 CIANOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE COMPOSTOS BIOATIVOS: A ORDEM OSCILLATORIALES

As espécies de cianobactérias tóxicas são as mais comumente estudadas devido à sua prevalência em mananciais hídricos de água doce, atenção especial por serem potencialmente nocivas e apresentar grave risco à saúde de humanos e de outros animais pela produção de cianotoxinas nestes mananciais (RASTOGI e SINHA 2009a; SINGH *et al.* 2017; PLAAS e PAERL 2020; JACINAVICIUS *et al.* 2021; 2023). Em função disso, estudos estão sendo voltados para as espécies marinhas e apontam as cianobactérias filamentosas como protagonistas para a produção de compostos do tipo lipopeptídeos, amidas, aminoácidos, macrolídeos e ácidos graxos, vitaminas e minerais (SINGH *et al.* 2011; RAJA *et al.* 2016), assim como para compostos do metabolismo especial importantes para o desenvolvimento biotecnológico e industrial (SINGH *et al.* 2017a; MI *et al.* 2017; BOTANA *et al.* 2019; CARROLL *et al.* 2021; PLAAS e PAERL 2020; JACINAVICIUS *et al.* 2021; 2023).

A ordem Oscillatoriales é caracterizada por reunir organismos filamentosos que ocorrem em diversos ambientes, como em praias com formações rochosas por exemplo, tendo amplo registro para todo o litoral brasileiro (RASTOGI *et al.* 2009; CAIRES *et al.* 2018a). Potencialmente produtores de ME, tais como microcistina e anatoxina-a, os gêneros *Oscillatoria*, *Phormidium* e *Moorea* são os mais comumente citados como produtores de cianotoxinas pertencentes a esta família (MI *et al.* 2017; BOTANA *et al.* 2019). Tais cianotoxinas demonstraram inibição da proteína fosfatase PP1 e PP2A em estudos realizados com os gêneros *Oscillatoria* e *Phormidium*, ligando-se irreversivelmente aos receptores nicotínicos da acetilcolina (MI *et al.* 2017; BOTANA *et al.* 2019; CARROLL *et al.* 2021; NOWRUZI *et al.* 2020a; 2020b; 2021). A

Tabela 4 apresenta uma visão geral de metabólitos especiais nitrogenados com atividade biológica produzidos por gêneros e espécies pertencentes à ordem Oscillatoriales.

Tabela 4: Uma visão geral de metabólitos especiais nitrogenados com atividade biológica produzidos por gêneros e espécies pertencentes a ordem Oscillatoriales.

Gênero/ Espécie	Classe química	Tipo de composto	Bioatividade/ Aplicação	Referência
<i>Oscillatoria</i>				
<i>O. nigroviridis</i>	Aromático	Oscillatoxina	Citotóxico/ Anticâncer	Nowruzi <i>et al.</i> (2020)
<i>O. nigro</i>	-	Viridamide A	Toxicidade para <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , <i>Plasmodium falciparum</i>	Kini <i>et al.</i> (2020)
<i>O. acutíssima</i>	Lipopeptídeo	Acutificina e 20,21- didehidroacutifici na	Composto para produtos cosméticos/ agente antineoplástico e citotóxico	Nowruzi <i>et al.</i> (2020 e Burja <i>et al.</i> 2001)
<i>O. agardhii</i>	Lipopeptídeo	Agardhiptina, anabaenopeptina, microcistina, oscillatoriamida e oscillapeptina	Inibidor enzimático, hepatotoxina	Burja <i>et al.</i> 2001
<i>Oscillatoria</i> sp	-	Biopterina glicosada	Cromóforo absorvente de UV-A	Nowruzi <i>et al.</i> (2020a)
	Alcaloide (fenólico bislactona)	Dermatotoxinas e Aplysiatoxinas	Agentes inflamatórios, ativadores da proteína quinase C; promove dilatação do vaso linfático e congestionamento de capilares; diarreia e deposição de fibrina na artéria pulmonar dilatada seguida de sangramento.	Nowruzi <i>et al.</i> (2020a) e Singh <i>et al.</i> (2017)
	Micosporina	Porphyra-334, Shinorina Micosporina- glicina, Palitinol e Euhalothece-362	Moléculas multifuncionais: agentes antioxidantes, fotoprotetores naturais/ micosporina-glicina suprime a ativação de genes responsáveis pelo estresse oxidativo e enzimas antioxidantes, neutralizando os radicais de oxigênio e hidroxila	Botana <i>et al.</i> (2019) e Nowruzi <i>et al.</i> (2020a)
	Heptapeptídeo cíclico	Microcistinas (hepatotoxina)	Inibição da proteína fosfatase (PP1 e PP2A).	Botana <i>et al.</i> (2019) e Nowruzi <i>et al.</i> (2020a)
	Pentapeptídeo cíclico	Anatoxina-a (neurotoxina)	Inibição da proteína fosfatase (PP1 e PP2A).	Singh <i>et al.</i> (2017)
	-	Toxinas em geral	Desenvolvimento de biocidas que servem como antibióticos, agentes anticâncer e anti- inflamatórios.	Nowruzi <i>et al.</i> (2020a), Nowruzi <i>et al.</i> (2020) e Singh <i>et al.</i> (2017)

Gênero/Espécie	Classe Química	Tipo de composto	Bioatividade/Aplicação	Referência
<i>Oscillatoria</i>				
<i>Oscillatoria</i> sp	Alcaloide	Lyngbyatoxina	Causa eritema (dermatite), bolhas e necrose em mamíferos; promotores de tumores potentes/ agente anticancerígeno	Singh <i>et al.</i> (2017)
		Venturamide A e B	Atividade antimalarial e antiprotozoal (<i>T. cruzi</i>)	Kini <i>et al.</i> (2020)
<i>Phormidium</i>				
<i>Phormidium</i> sp	Relacionados a swinholide (policetídeos diméricos)	Swinholides A – I 294, 295–302 (macrolídeo citotóxico)	Antifúngica e antitumoral (pulmão humano) / toxicidade potente contra a linha celular H-460	Carroll <i>et al.</i> (2021) e Tao <i>et al.</i> (2018)
<i>P. amoenum</i>	Alcaloide	Neurotoxinas Anatoxina-a	Liga-se irreversivelmente aos receptores nicotínicos da acetilcolina.	Singh <i>et al.</i> (2017) e Castañeda <i>et al.</i> (2021)
<i>P. foveolarum</i>	Compostos Fenólicos	-	Potencialmente considerado para usos farmacêutico e nutricionais (aditivo no preparo de alimentos funcionais). Previne danos vasculares e cardiovasculares, e progressão de doenças. Fornece defesa eliminando os radicais livres. Atua como um composto de triagem UV-B.	Singh <i>et al.</i> (2017)
	Carotenoides, β -caroteno, Luteína, zeaxantina, Criptoxantina, α -caroteno, Licopeno	-	Protege PSII, complexos de colheita leve e Centro de reação. Agente antioxidante/ Uso na indústria de alimentos e para prevenção do câncer.	Singh <i>et al.</i> (2017)
<i>P. tenue</i>	Ácido graxo (sulfo)	Sulfolipídeo	Atividade anti HIV-1	Nowruzi <i>et al.</i> (2020)
	Sulfolipídeos	Monogalactopiranosil glicerol Digalactopirano - sil glicerol	Atividade anti-HIV e anticâncer	Nowruzi <i>et al.</i> (2020) e Burja <i>et al.</i> (2001)
<i>P. ectocarpi</i>	Derivados de fenóis	Hierridina, 2,4-dimetoxe-6-heptadecylfenol	Antiplasmodial e antibiótico	Burja <i>et al.</i> (2001)

Gênero/Espécie	Classe Química	Tipo de composto	Bioatividade/Aplicação	Referência
<i>Moorea</i>				
<i>M. bouillonii</i>	Peptídeo linear	Apratiramida 262	Cicatrização de feridas/ Estimula VEGF-A	Carroll <i>et al.</i> (2021)
	Pentapeptídeo cíclico	Kakeromamide A 266	Induz a diferenciação de células-tronco neurais em astrócitos.	Carroll <i>et al.</i> (2021)
<i>M. producens</i>	-	Malynge	Atividade anti HIV-1	Carroll <i>et al.</i> (2021)
Oscillatoriales em geral				
	Ester	30-methyloscillatoxina D, 31-noroscillatoxina, oscillatoxina	Atividade citotóxica	Burja <i>et al.</i> 2001
	Aromáticos indoís	Scytonemin	Fotoproteção UVR	Burja <i>et al.</i> 2001
	Peptídeos	Brintonamidas A 257-261	Compostos 257 e 260 exibiram calicreína 7 moderada a baixa, quimase, caspase e inibição da quimiotripsina /Atuam no processo de descamação epitelial (supressores tumorais) - biomarcadores	Carroll <i>et al.</i> (2021)
	Lipopolissacarídeos	Endotoxinas lipopolissacarídica	Agente inflamatório, irritantes gastrointestinais.	Singh <i>et al.</i> (2017)

Os compostos do ME que apresentam função fotoprotetora também chamam atenção dos estudiosos devido às suas capacidades de dissipar o UVR com dois dos grupos de moléculas fotoprotetoras mais importantes produzidas por cianobactérias como estratégias absorventes/de triagem para a proteção UVR, os MAAs e as citoneminas (presente apenas em cianobactérias), apresentando ainda outras multifuncionalidades (LAWRENCE *et al.* 2018a; 2018b; VEGA *et al.* 2020; GERALDES e PINTO 2021). Os MAAs são produzidos, em especial, por organismos de ambientes com altos níveis de UVR e a composição varia de acordo com o grupo taxonômico que a produz apresentando coexistência frequente entre os vários de MAAs que apresentam diferentes $\lambda_{\max}$, permitindo uma fotoproteção mais eficiente (CHRAPUSTA *et al.* 2017; GERALDES e PINTO 2021).

Os MAAs não são produzidos por plantas superiores (proteção UV fornecida pelos flavonoides) tão pouco por vertebrados superiores (função protetora executada pela melanina) existindo a constatação de que os animais podem adquirir os MAAs através da

cadeia alimentar ou por processos de endossimbiose com consequente acumulação (NEWMAN *et al.* 2000; GERALDES e PINTO 2021). Dentre as espécies de Oscillatoriales, *Oscillatoria* sp é produtora dos mais diferentes metabólitos especiais, a exemplo dos MAAs micosporina-glicina, palitinol, shinorina e euhalothece-362, possuindo ação UV fotoprotetoras e atividade antioxidantes (BOTANA *et al.* 2019; NOWRUZI 2020a). A micosporina-glicina por exemplo (

Tabela 4), apresenta efeitos positivos na regeneração celular observados em fibroblastos da pele humana, mostrando ser potenciais agentes cosméticos como supressor da ativação de genes responsáveis pelo estresse oxidativo e enzimas antioxidantes (NOWRUZI *et al.* 2020a).

A busca por novos fármacos é um trabalho incessante e os produtos naturais têm sido cada vez mais estudados como promessas para a contribuição no tratamento/cura de doenças dos mais variados tipos, a exemplo das doenças neurodegenerativas que não possuem cura.

2.3.1 A espécie *Capilliphycus salinus*

Linhagens de cianobactérias filamentosas de águas marinhas tropicais são pouco estudadas, embora despertem grandes interesses por serem ricos e diversos arsenais de compostos do metabolismo secundário com amplo potencial para as mais diversas aplicabilidades. Neste contexto, e considerando a inexistência de estudos relacionados à caracterização química de *C. salinus* (Microcoleaceae) até o presente, o investimento em análises para a descoberta de novos compostos químicos em *C. salinus* e a sua potencial aplicação biotecnológica, faz da espécie um importância objeto de estudo.

De modo geral, a família Microcoleaceae (Oscillatoriales) é caracterizada por reunir organismos filamentosos que ocorrem em diversos ambientes, como em praias com formações rochosas, tendo amplo registro para todo o litoral brasileiro (CAIRES *et al.*, 2018a). O gênero marinho *Capilliphycus* (CAIRES *et al.*, 2018a) foi recentemente descrito, sendo desmembrado do complexo *Lyngbya*, e abarcando duas novas espécies, *C. tropicalis* e *C. salinus* (Caires et al. 2018a). *C. salinus*, endêmica da Bahia, possui o talo fasciculado (Figura 5, A) contendo filamentos que medem entre 14 e 16,4 µm de diâmetro, envoltos por bainha polissacarídica hialina, delgada ou ligeiramente espessa e firme; com células discoides, com 1,7 a 2,5 µm de comprimento e 5,8 a 7 vezes mais largas do que longas (CAIRES *et al.*, 2018a).

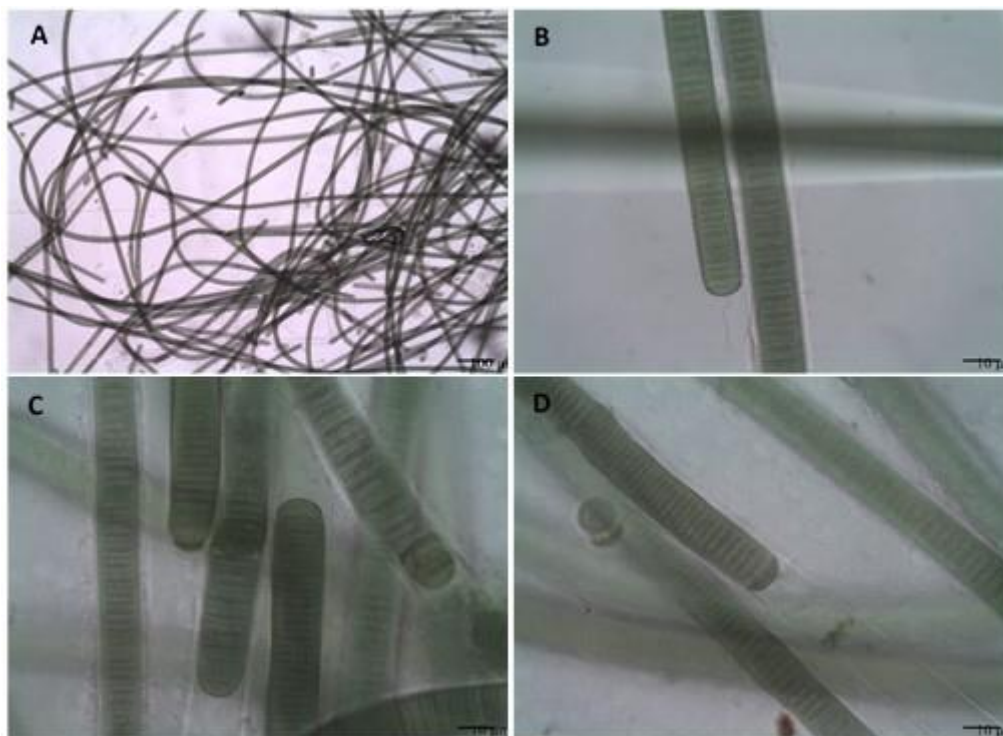


Figura 5: *Capilliphycus salinus*: (A) Talo fasciculado. (B-D) Fotomicrografias com aspecto geral dos filamentos.
Fonte: CAIRES, Taiara Aguiar.

A espécie apresenta ainda, conteúdo celular de coloração verde-escuro e granuloso, especialmente com grânulos de cianoficina, uma reserva de nitrogênio para a espécie (CAIRES *et al.*, 2018a).

2.4 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO PARA ACETILCOLINESTERASE COMO TRATAMENTO DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS (DOENÇA DE ALZHEIMER): O PROTAGONISMO DAS CIANOBACTÉRIAS

As doenças neurodegenerativas (DNs) são condições altamente debilitantes que envolvem supostamente mecanismos inter-relacionados e desencadeiam a progressiva degeneração e morte dos neurônios (GORMAN 2008; PARK 2014; CASTAÑEDA *et al.* 2021). Neste aspecto, a Doença de Alzheimer (DA) é uma DN que se desenvolve de forma gradual e progressiva, e é considerada a mais comum e a principal causa de demência em idosos, afetando cerca de 47,5 milhões de pessoas em todo o mundo (FRANCIS *et al.* 1999; CASTAÑEDA *et al.* 2021). O comprometimento da capacidade cognitiva e da memória das pessoas acometidas pela DA interfere direta e negativamente em suas atividades diárias, incapacidade física e causando dependência, acompanhando ainda distúrbios comportamentais, como agressão, depressão

e perambulação, levando a morte do paciente em alguns anos (FRANCIS *et al.* 1999; CASTAÑEDA *et al.* 2021).

Os fatores que causam a DA ainda são desconhecidos, entretanto sabe-se que o desenvolvimento da doença envolve complexos mecanismos que incluem fatores genéticos, ambientais e o estilo de vida do paciente, levando a destruição gradual e progressiva dos neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC) (CASTAÑEDA *et al.* 2021). Algumas hipóteses tentam explicar o desenvolvimento da DA: Hipótese da Cascata Amiloide, Hipótese Glutaminérgica, Hipótese da Tau, Hipótese da Inflamação e do Estresse Oxidativo e a Hipótese Colinérgica (HC) (CASTAÑEDA *et al.* 2021). A HC é bastante aceita pela comunidade médica e a inibição da AChE para o controle dos sintomas da DA tem sido a primeira e mais relevante estratégia de tratamento atual (CASTAÑEDA *et al.* 2021).

A HC se baseia na deficiência do sistema colinérgico sinalizado pela acetilcolina (ACh) com a degeneração dos neurônios colinérgicos levando à deficiência dos níveis de acetilcolina e à perda da sinalização e afetando, conseqüentemente, os processos cognitivos que envolvem memória, atenção, aprendizado e regulação da função do ciclo do sono (CASTAÑEDA *et al.* 2021). As estratégias de terapia da DA incluem o aumento dos níveis de acetilcolina através da inibição da acetilcolinesterase (AChE), o uso de análogos de acetilcolina e moduladores alostéricos dos receptores de acetilcolina (McGLEENON *et al.* 1999; CASTAÑEDA *et al.* 2021).

A acetilcolinesterase (AChE) pertence à classe das colinesterases, enzimas responsáveis por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas, transformando-a em ácido acético e colina, e permitindo que os neurônios retornem ao estado de repouso após serem ativados, ações importantes para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas humanas (FALCO *et al.* 2016; ARAÚJO *et al.* 2016). Por sua vez, a ACh tem sua biossíntese no neurônio pré-sináptico como resultado da reação entre a colina e acetilcoenzima A (Acetil-CoA) e, após sua liberação na região sináptica ela é captada por seus receptores (muscarínicos e nicotínicos), finalizando sua ação com a hidrólise pela ação da AChE e produzindo o composto colina, que volta para o neurônio pré-sináptico reiniciando o ciclo (McGLEENON *et al.* 1999; ARAÚJO *et al.* 2016; CASTAÑEDA *et al.* 2021). Quando bloqueada, a AChE perde a capacidade de hidrolisar a ACh permitindo que o neurotransmissor permaneça ativo por mais tempo na fenda sináptica, melhorando a transmissão colinérgica (ARAÚJO *et al.* 2016).

Inibidores da AChE com ação no SNC, como os fármacos colinérgicos donepezila, galantamina e rivastigmina, considerados de primeira linha, são amplamente usados para o tratamento de demências associadas às doenças de Alzheimer e Parkinson, em pacientes com sintomas dos tipos leves a moderadas, sendo donepezila indicado para o tratamento de sintomas severos (FALCO *et al.* 2016; CASTAÑEDA *et al.* 2021). A ação inibitória exibidas por metabólitos de cianobactérias sobre certas enzimas está entre as mais interessantes atividades apresentadas por este grupo de seres. Neste sentido, as cianobactérias de água doce assumem protagonismo como fontes de inibidores de proteases e despertam o interesse pela busca por compostos do ME oriundos de cianobactérias marinhas e que modulem esta classe específica de enzima, uma vez que, o ambiente marinho possui uma capacidade infinita de produção de ME e seu potencial ainda é pouco explorado (CARVALHO *et al.* 2013; Ayala *et al.* 2019; CARROL *et al.* 2020).

Alguns estudos mostram a ação de inibição da AChE por compostos do ME de cianobactérias filamentosas. Os compostos isolados de *Anabaena flos-aquae* e *A. lemmermannii* apresentaram potente inibição da AChE por uma anatoxina, anatoxina-A(S), com ação semelhante ao potente organofosforado, o agente nervoso Sarin, e com letalidade dez vezes maior que o anatoxina-A; mostrando ainda a inibição da acetil e da butirilcolinesterase realizada pelo metabólito nostocarbolina, extraído de uma cianobactéria do gênero *Nostoc*. (RASTOGI e SINHA 2009). Os ensaios *in vitro* e *in vivo* também mostraram significativo potencial inibitório frente a AChE, de forma transitória ou reversível, a partir da análise de extratos dos gêneros *Phormidium*, *Lyngbya* e *Leptolyngbya* (CARVALHO *et al.* 2013; AYALA *et al.* 2019).

A diversidade de metabólitos especiais produzidos por cianobactérias é de amplo espectro de possibilidades para a produção de novos fármacos a serem explorados e com potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novos medicamentos, com novas possibilidades de tratamento e controle de doenças neurodegenerativas, com especial destaque para as demências, tais como a DA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

O georreferenciamento da região de coleta usou GPS de campo (Garmin eTrex Legend® HCx) e os dados ambientais de salinidade e temperatura foram registrados com refratômetro (Biobrix modelo 211, São Paulo, Brasil) e termômetro (HTC-2 – Underbody), respectivamente. Para a remoção da cianobactéria das rochas foram utilizadas espátulas de metal e posteriormente armazenadas em sacos plásticos e dispostas em caixas térmicas. Para a identificação morfológica da cianobactéria foi realizada no Lab. de Bioprospecção e Biotecnologia (LaBBiotec) do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia e usou microscópio óptico (Olympus®) acoplado a uma câmera digital (Canon EOS).

Outras etapas do desenvolvimento metodológico foram realizadas no Laboratório (Lab) de Fitoquímica e no Lab. de Toxicologia, vinculados ao Departamento de Saúde da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, e coordenados pelos Professores Dr. Alessandro Branco e Dra. Mariana Botura, respectivamente; e na Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, com equipe do Professor Dr. Ivo José Curcino Vieira.

Para a triagem do material foi utilizada bandeja plástica e pinça cirúrgica, e o excesso de água foi retirado com papéis toalhas. A liofilização do material usou Liofilizador Liotop - L101 e a pesagem das amostras em balança de precisão (ELET. FA2104N). A extração usou etanol 96% (MODERNA) e o material foi disposto em Erlenmeyer (6L). O extrato foi filtrado usando filtro de papel disposto em funil de Buckner acoplado a kitassato e interligados a uma bomba de vácuo Primatec. O extrato bruto foi armazenado em bquer e mantido em capela (Evolution/Permutation) e posteriormente em estufa (TECNAL TE-394/1) para secagem.

A partição líquido-líquido usou os solventes hexano e acetato de etila, ambos da MODERNA, e água (H₂O) destilada em funil separador (1000 mL - Lab) apoiado em aro metálico e acoplado ao suporte universal. O fracionamento em coluna de sílica gel (CC-flash) utilizou coluna cromatográfica de fase normal com 3,0 cm de diâmetro por 75 cm de altura preenchida com fase estacionária em sílica gel 60 (<0,063 nm) disposta sobre um tampão de algodão (1,5 cm de diâmetro) fechando a abertura inferior da coluna de vidro. A eluição ocorreu com os solventes etanol e metanol (MODERNA) e água ultrapura do sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Burlington, Estados Unidos). O monitoramento das frações usou cromatografia em camada delgada (TLC) sílica gel 60 F254 (Merck®).

Os reveladores e reagente utilizados nas análises em CCDs foram: irradiação UV (em 254 nm e 365 nm) em câmara escura de UV da CIENLAB e solução de ácido sulfúrico e etanol (H_2SO_4 e EtOH, 2:8 v/v) seguida de aquecimento em placa aquecedora a 100° C; câmara saturada com iodo ressublimado; e reagente ninhidrina (0,2g de ninhidrina solubilizada em 100 mL de EtOH, concentração de 1 mM em solução estoque) seguida de aquecimento em placa aquecedora a 100 °C. A pulverização do reagente sobre a placa de CCD foi com pulverizador de vidro (200 mL, Sigma-Aldrich).

As análises por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência em modo reverso (CLAE) contou com um modelo Agilent (Infinity II 1260) acoplado ao Detector de Arranjo de Diodo (DAD) e uma bomba quaternária de solventes (LPG 3400SD), com as fases estacionárias uma coluna C18 (4.6×50 mm, 5 μm , Agilent Infinity 300SB-C18) e uma coluna Quiral, composta por vancomicina (4.6×150 mm, 2.7 μm InfinityLab Poroshell 120 Chiral-V), em modo orgânico polar e polar-iônico. Experimentos de espectrometria de massa usou um espectrômetro de massa (ESI ME/ME) linear de armadilha de íons Thermo Scientific LTQ e os dados de foram processados usando o software Data Analysis 4.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

Os eluentes foram os solventes metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) em grau HPLC da LiChrosolv (Darmstadt, Alemanha), H_2O ultrapura produzidas por sistema Milli-Q, ácido acético (CH_3COOH) e hidróxido de amônia (NH_4OH). As fases móveis foram filtradas em filtro do sistema Millipore (Agilent Technologies, 13 mm X 0,2 μm) apropriados para injeções em sistemas HPLC, com amostras ressuspendidas em metanol grau HPLC e filtradas em filtro de seringa do sistema Millipore. A desgaseificação dos solventes e solubilização das amostras ocorreram em Banho de Ultrassom da SolidSteel com capacidade de 3,8L.

3.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

Os métodos de extração e análises usaram biomassa da cianobactéria *C. salinus* obtidas em ambiente marinho. Os espécimes de *C. salinus* formam extensos tapetes de cor marrom em população epilítica nas piscinas de marés, armazenadas em sacos plásticos imersas em água do mar (Figura 6) e mantidas em resfriamento com gelo para manutenção da temperatura e preservação das características biológicas (CAIRES *et al.* 2018a), e armazenadas em freezer até o momento da extração dos compostos.



Figura 6: *Capilliphycus salinus*: (A-C) população epilítica na piscina de marés; (D) Biomassa coletada e armazenadas em sacos plástico\’s - Nov. ALCB 114379. **Fonte:** Caires, Taiara Aguiar.

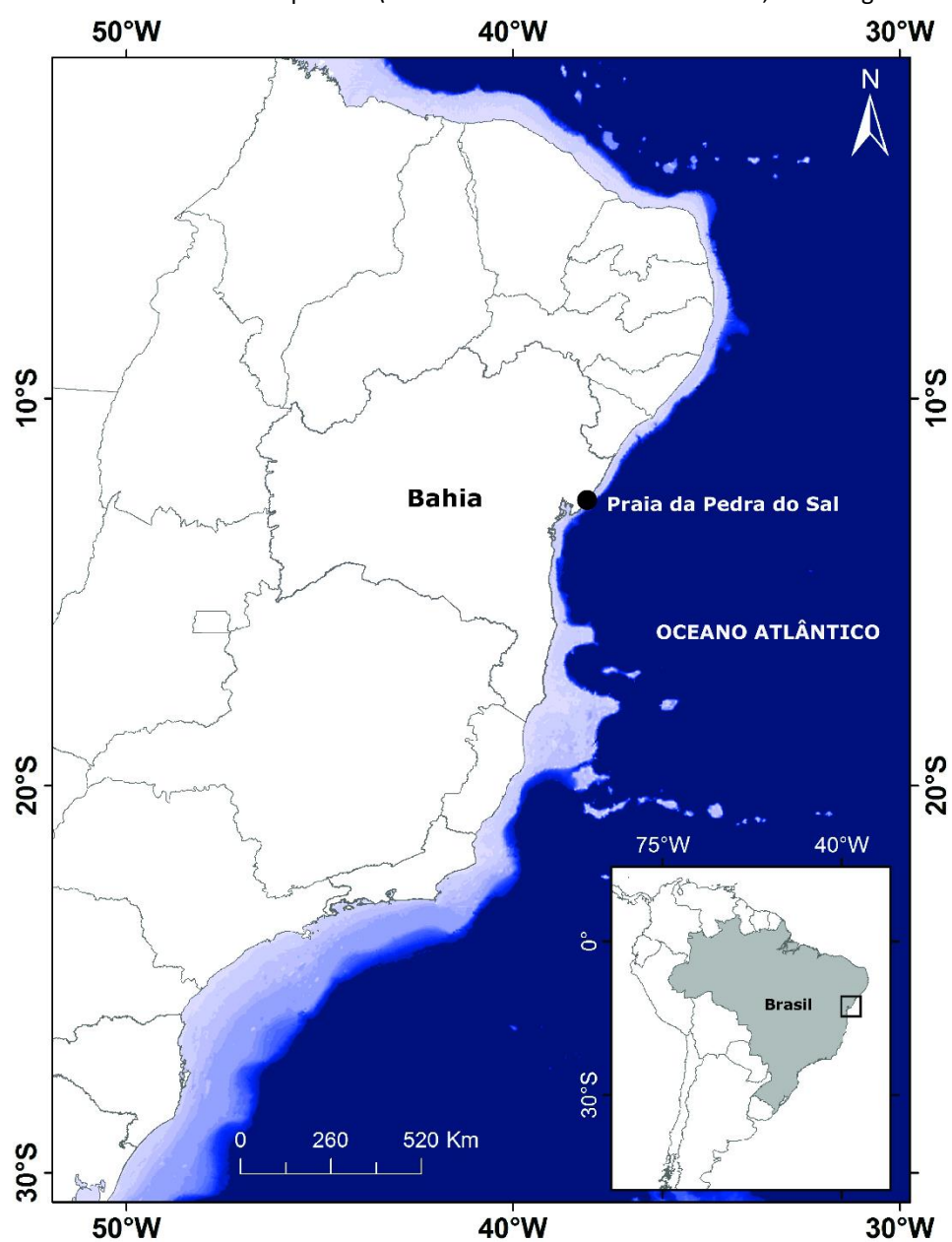


Figura 7: Localização da praia de Pedra do Sal, município de Salvador, litoral norte do estado da Bahia – BR, região de coleta da cianobactéria *Capilliphycus salinus*.

Fonte: Caires, Taiara Aguiar.

A coleta da cianobactéria ocorreu no período de maré baixa de sizígia na região mesolitorânea da praia de Pedra do Sal, município de Salvador, estado da Bahia, Brasil, localizada sob as coordenadas -12°57'06"S e -38°20'42"W (Figura 7). Os parâmetros ambientais de temperatura e salinidade foram registrados em 38,7° C e 34,2 respectivamente. A identificação morfológica da espécie foi realizada pela Professora Dra. Taiara Aguiar Caires usando como suporte microscópio óptico e câmera digital e seguiu a classificação taxonômica sugerida por Caires *et al.* (2018a). Uma porção das amostras coletadas foi depositada no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) da Universidade Federal da Bahia, sob o registro ALCB132755, e cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o registro A259DC3.

O material coletado passou por triagem para remoção de partículas de solo e sedimentos, tais como restos de carapaças de gastrópodes, bivalves e outros pequenos invertebrados, bem como de macroalgas associados aos filamentos. O excesso de água foi retirado com uso de papel toalha e o material foi disposto em sacos plásticos e armazenados em freezer comum a uma temperatura aproximada de -4° C (CARRETO *et al.* 2001; 2005; CARRETO E CARIGMAN 2011) até o preparo do extrato hidroalcoólico. O material foi liofilizado obtendo-se 1153,0 g de biomassa seca que foi submetida a extração hidroalcoólica dos compostos químicos.

3.3 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO

A biomassa foi liofilizada por 60 horas, pesada (1153,0 g), submetida a maceração e posteriormente à extração a frio. A extração foi feita utilizando solvente orgânico etanol 96% (EtOH), em volume aproximado de 2500 mL suficiente para cobrir toda a biomassa. O frasco foi mantido fechado e armazenado ao abrigo da luz por seis dias, passando por agitações diárias. Ao final do período de extração o material foi filtrado uma única vez e o volume, apresentando rendimento de 8,2 %, foi disposto em capela para concentração e posteriormente armazenados em freezer até a execução da partição líquido-líquido.

O extrato bruto foi submetido a partição líquido-líquido (Figura 8) com os solventes orgânicos em polaridade crescente (hexano e acetato de etila) e H₂O destilada, líquidos imiscíveis. O extrato bruto foi disposto em funil de separação e submetido a três extrações sequenciais para cada um dos solventes, usando de 100 mL de solvente orgânico em cada momento de extração (Figura 8 A e B).

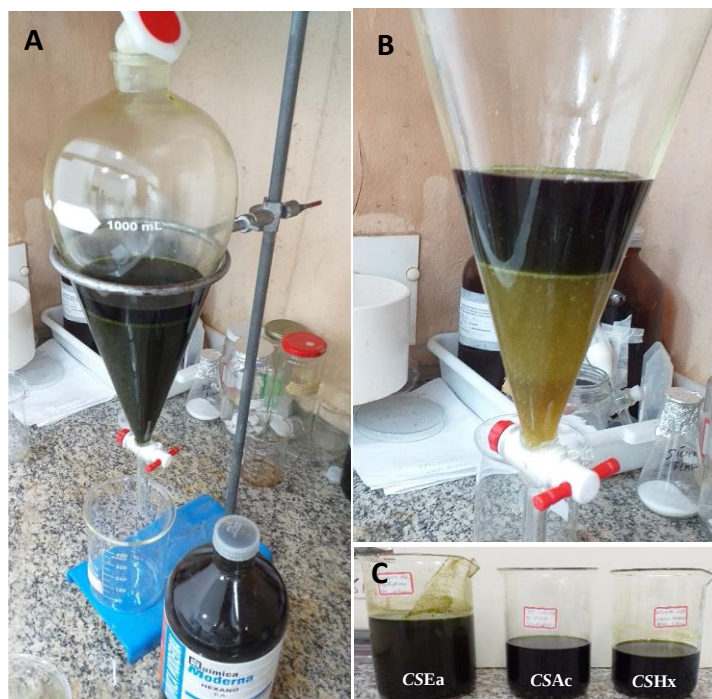


Figura 8: Partição líquido-líquido: (A-B) particionamento em hexano e em acetato de etila, respectivamente; (C) extrato aquoso (CSEa), extrato de acetato de etila (CSAc) e extrato de hexano (CSHx) obtidos.

Após a extração em acetato de etila utilizou-se 50 mL de H₂O destilada no segundo momento com mais 100 mL do solvente num terceiro momento. Os extratos foram mantidos em capela para concentração e o extrato aquoso foi disposto em estufa com temperatura de 45° C para redução máxima do volume do solvente. Os extratos aquoso (CSEa), de acetato de etila (CSAc) e hexânico (CSHx) (Figura 8, C), obtidos no particionamento, foram monitorados por cromatografia de camada delgada (CCD), e os perfis químicos foram observados. Os extratos foram armazenados em freezer até o momento do fracionamento por coluna cromatográfica de CC-flash.

O CSEa, com rendimento de 8,27%, foi submetido à centrifugação para separação de *debris* celular e posterior fracionamento por CC-flash. O fracionamento do CSEa contou com uma coluna cromatográfica de fase normal preenchida com sílica gel empacotada com sistema de eluição isocrática e disposta em um tampão de algodão com aproximadamente 1 cm de diâmetro. A amostra foi introduzida na coluna em forma líquida, escorrendo cuidadosamente na parede da coluna (Figura 9 A e B).



Figura 9: Coluna cromatográfica em sílica flash: (A-B) detalhes para o início da separação; (C-D) frações obtidas e dispostas para concentração.

No desenvolvimento da CC-flash, o fluxo contínuo foi promovido com uma bomba de vácuo mantendo a pressão positiva na abertura superior da coluna e forçando a passagem da fase móvel através da fase estacionária. Dez frações (Figura 9, C e D) foram obtidas e monitoradas por CCD usando eluições em diferentes polaridades, usando os solventes MeOH, EtOH e H₂O destilada, e reveladas por irradiação UV, solução de ácido sulfúrico e aquecimento em placa aquecedora a 100° C, e câmara saturada com iodo ressublimado. As frações foram dispostas em capela para concentração total dos compostos químicos e armazenadas em freezer para conservação e posterior aplicação dos diferentes ensaios.

As frações foram submetidas as análises por CCDs para detecção de compostos nitrogenados usando como revelador o reagente ninhidrina. As CCDs foram preparadas nas dimensões de 6,5 cm X 6,0 cm depositado o CSEa e as dez frações. A fase móvel foi composta por butanol (BuOH), CH₃COOH e H₂O ultrapura (6:2:2 v,v,v). A revelação da CCD foi com o reagente ninhidrina preparado em concentração de 1 mM solubilizado em EtOH (PA) para a solução estoque e ressolubilizada na concentração de 0,1% em EtOH (PA). O reagente foi vaporizado sobre a CCD e revelada com aquecimento em placa aquecedora a aproximadamente 100° C. As etapas do desenvolvimento metodológico que envolveram

extração e análise química dos compostos do ME de *C. salinus* estão apresentadas de forma resumida na Figura 10.

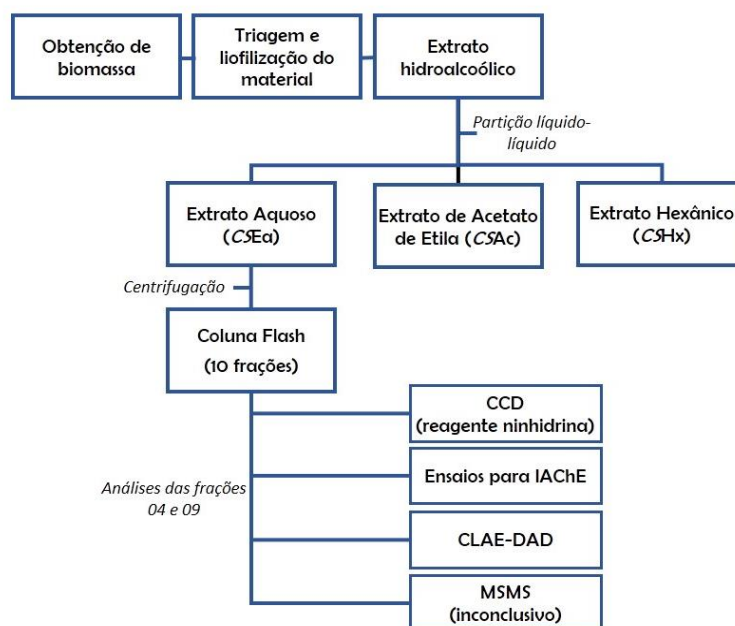


Figura 10: Resumo das etapas do desenvolvimento metodológico.

As frações foram mantidas em freezer para conservação e em seguida foram submetidas à análise para inibição da AChE.

3.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

O efeito do extrato aquoso e das dez frações de CSEa frente à atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi avaliado de acordo com o método de Ellman (1961) modificado por Tan *et al.* (2013). O método de Ellman baseia-se na conversão da acetiltiocolina em tiocolina, que é catalisada pelas colinesterases. O produto da reação (tiocolina) interage com o DTNB, ácido 5,5'-ditiobis (2nitrobenzoico), formando um ânion amarelo cuja absorbância é medida em espectrofotômetro em 405 nm.

A enzima AChE tipo VI-S, obtida de *Electrophorus electricus*, iodeto de acetiltiocolina (ACTI), 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB ou reagente de Ellman), eserina [(-)-fisostigmina] e o tampão fosfato 0,1M (pH 7,5) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Nos poços de microplacas (96 poços) foram adicionados 140 µL de solução tampão fosfato contendo albumina sérica bovina (0,1%), 20 µL das amostras teste (concentração final de 1 mg/mL) e 20 µL da enzima (0,15 U/mL). Após preparação, a placa foi incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Após esse período, foram adicionados 10 µL de DTNB (10 mM) e 10 µL de solução de iodeto de acetiltiocolina (0,125 mM).

O controle positivo utilizado foi eserina (50 μ M) e as amostras foram solubilizadas em um tampão aquoso. Todas as amostras foram testadas em triplicatas. A absorbância foi medida a 405 nm em leitor de microplaca Skatn nos tempos de 0 minutos, 10 minutos e 30 minutos logo após a adição do ACTI. A porcentagem de inibição das colinesterases foi calculada através da comparação das leituras de reação das amostras em relação ao controle negativo.

O cálculo da porcentagem da atividade enzimática foi feito conforme a fórmula descrita abaixo:

$$9 \% I = [1 - (\Delta \text{ da Amostra} / \Delta \text{ Controle})] \times 100$$

Onde:

% I é a porcentagem de inibição de atividade enzimática,

Δ da Amostra corresponde a diferença da absorbância da amostra no tempo 0 e no tempo 30 minutos

e,

Δ Controle é a diferença da absorbância do controle utilizado no tempo 0 e no tempo 30 minutos.

Os dados de inibição colinesterásica (% I) foram submetidos ao Teste de Tukey e os resultados plotados em gráfico, considerando valor de $P < 0,05$. Os dados forneceram subsídios para o direcionamento das análises cromatográficas as frações pertinentes, o que possibilita a otimização do tempo e economia de recursos.

3.5 ANÁLISE QUÍMICA POR CLAE-DAD E ESI-MS/MS

3.5.1 CLAE-DAD utilizando fase reversa C18

Nas análises por CLAE-DAD foi utilizada a fração 04 como amostra padrão para separação dos compostos e contou com fase estacionária C18, em modo reverso, as fases móveis foram filtradas em filtros apropriados para sistema HPLC (ver seção 3.1). As frações foram ressuspensas em MeOH (10 mg.mL⁻¹), homogeneizadas em banho de ultrassom por 10 min e filtradas com filtro de seringa (ver seção 3.1). O modo de eluição utilizou as fases móveis formadas por MeOH modificado (0,1% de CH₃COOH) em A e ACN em B. A corrida foi iniciada com 95% de A descendo para 90% A em 10 min e atingindo 80% A em 15 min (baseado em CARRETO *et al.* 2001; 2005; CARRETO e CARIGMAN 2011 com adaptações) (Tabela 5).

Tabela 5: Condições de eluição usando as fases móveis MeOH modificado (0,1% de CH_3COOH) em A e ACN em B aplicado a fração 04.

Tempo (min)	Fases Móveis		Vol. Injeção (μL)
	A (%)	B (%)	
0	95	5	20
10	90	10	20
15	80	20	20

O volume de injeção foi de 20 μL e o tempo de análise foi estabelecido em 15 min. O tempo de retenção, a absorbância do UV-Vis e a intensidade dos picos apresentados nos cromatogramas foram observados. Outras condições de eluição com diferentes solventes, podem ser verificados no APÊNDICE 2.

3.5.2 CLAE-DAD usando fase estacionária quiral

As análises também foram realizadas utilizando a fração 04 como padrão de separação dos compostos. As análises por CLAE-DAD com fase estacionária quiral, composta por vancomicina (FEQ-v), ocorreram em modo *polar iônico* e as fases móveis foram filtradas em filtros apropriados para sistema CLAE (ver seção 3.1) e desgaseificadas em ultrassom por 15 min. As frações foram ressuspensas em MeOH ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), homogeneizadas em banho de ultrassom por 10 min e filtradas com filtro de seringa do sistema Millipore (ver seção 3.1).

A eluição usou como fase móvel a composição de MeOH + CH_3COOH (0,2%) + NH_4OH (0,05%) em A, variando a temperatura em 21° C, 23° C, 24° C, 27° C, 30° C e 33° C, e o fluxo, em 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de modo que as temperaturas pré-estabelecidas foram aplicadas aos diferentes fluxos, totalizando 25 injeções (Tabela 6).

Tabela 6: Eluição em modo polar iônico (isocrático) usando como fase móvel MeOH modificado (99,75%, 0,2% CH_3COOH e 0,05% NH_4OH) aplicado às frações 04 e 09.

Total de Corridas	Tempo (min)	Eluição isocrática	Vol. Injeção (μL)
25	15*	MeOH modificado em A	20

* corridas com fluxo de 0,1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ocorreram em 50 min.

O volume de injeção e o tempo de corrida foram mantidos em 20 μL e 15 min para todas as corridas, com exceção para as corridas com fluxo de 0,1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ que foram executadas no tempo total de 50 min. Os mesmos parâmetros usados na execução do método e composição da fase móvel foram repetidos para a fração 09. Outras condições de eluição em FEQ-v com diferentes solventes podem ser verificadas no APÊNDICE 3.

3.5.3 Análises por espectrometria de massas (ESI-EM/EM)

Experimentos de espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI- EM/EM) foram realizados em parceria com a Universidade Estadual Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. As frações 04 e 09 da cianobactéria foram analisadas por infusão direta em ESI- EM/EM a uma vazão de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, usando pressão de gás de 100 psi. A voltagem do spray foi ajustada para 4 kV e a temperatura capilar para 219° C. Os espectros de varredura completa das frações foram obtidos nos modos positivo e negativo usando uma faixa de massa de 100–800 m/z . Uma energia de 20 a 30% foi aplicada para realizar a fragmentação por espectrometria de massa em vários estágios (MS^n) dos picos selecionados.

4 RESULTADOS

O extrato hidroalcoólico passou por partição líquido-líquido e resultou em três novos extratos. Os dois extratos iniciais (CSHx e CSAC) não foram utilizados nas análises devido aos baixos rendimentos apresentados, sendo utilizado para tanto o extrato aquoso (CSEa). O CSEa foi centrifugado e fracionado por CC-flash resultando em dez frações que foram analisadas por CCD, pulverizadas com solução saturada em ninhidrina (reagente específico para revelação de aminas, aminoácidos etc.) e reveladas com aquecimento em temperatura aproximada de 85° C (Figura 11).

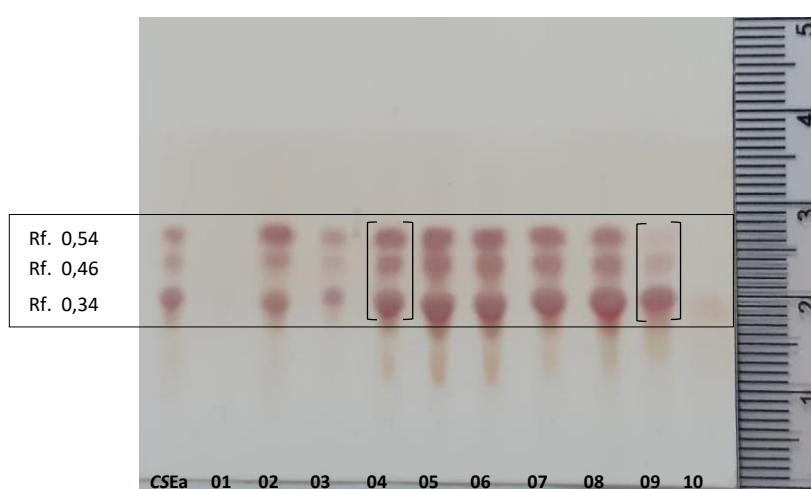


Figura 11: Cromatografia em camada delgada do extrato aquoso (CSEa) e das frações (01-10). Rfs (fatores de retenção) foram registrados em 0,34, 0,46, e 0,54 corados em tons de rosa e púrpura. Entre colchetes são mostrados os Rfs das frações 04 e 09.

A reação entre os analitos e a ninhidrina revelou as bandas cromatográficas em rosa escuro e vermelho púrpura (composto conhecido como Púrpura de Rühmann), indicativo da presença de compostos nitrogenados. As frações foram submetidas a ensaio '*in vitro*' para avaliação do potencial de inibição da AChE.

4.1 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

Os resultados da atividade de inibição frente a AChE foram positivos em todas as frações. O gráfico da Figura 12 mostra a diferença do percentual de inibição da AChE entre as dez frações com destaque para a fração 09 com aproximadamente 80% inibição seguido da fração 10, com aproximadamente 61% de atividade inibitória.

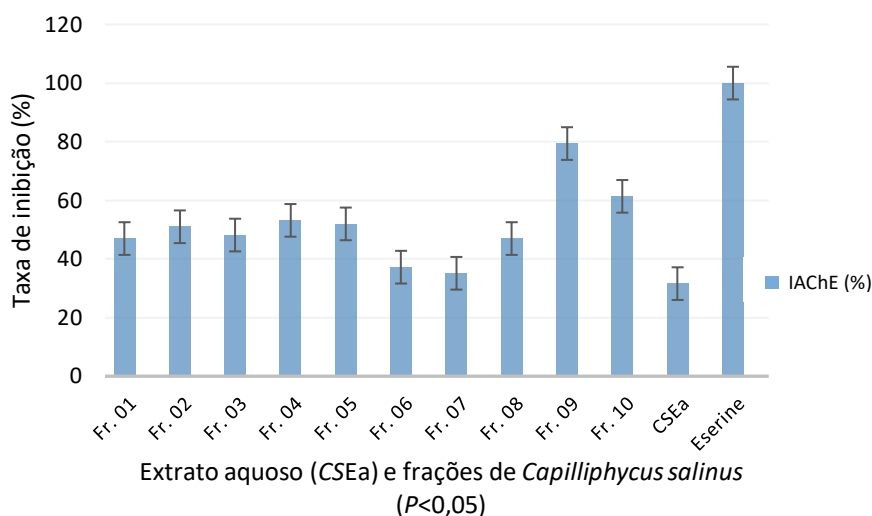


Figura 12: Gráfico apresentando o percentual de inibição do extrato aquoso de *Capilliphycus salinus* e das suas dez frações destacando a maior inibição apresentada pelas frações 09 e 10.

A fração 09 não apresentou diferença significativa em relação ao controle positivo. Os resultados apresentados pelos ensaios de inibição para AChE e na revelação da CCD com ninhidrina direcionaram a seleção das frações 09 para a continuidade dos estudos submetendo-as às análises por CLAE-DAD.

4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E DOS DADOS ESPECTRAIS

4.2.1 Análise por CLAE-DAD com fase reversa C18

O melhor resultado de separação dos compostos polares, por CLAE-DAD em C18, das frações obtidas pelo fracionamento em coluna flash foi o da fração 04, usando as fases móveis MeOH modificado (0,1% de CH_3COOH) em A e ACN em B. As condições cromatográficas de eluição, taxa de fluxo, volume de injeção e temperatura (Tabela 5) gerou cromatograma com maior número de picos e boa intensidade de absorção em diferentes tempos de retenções, embora não apresentando separação da linha de base (Figura 13).

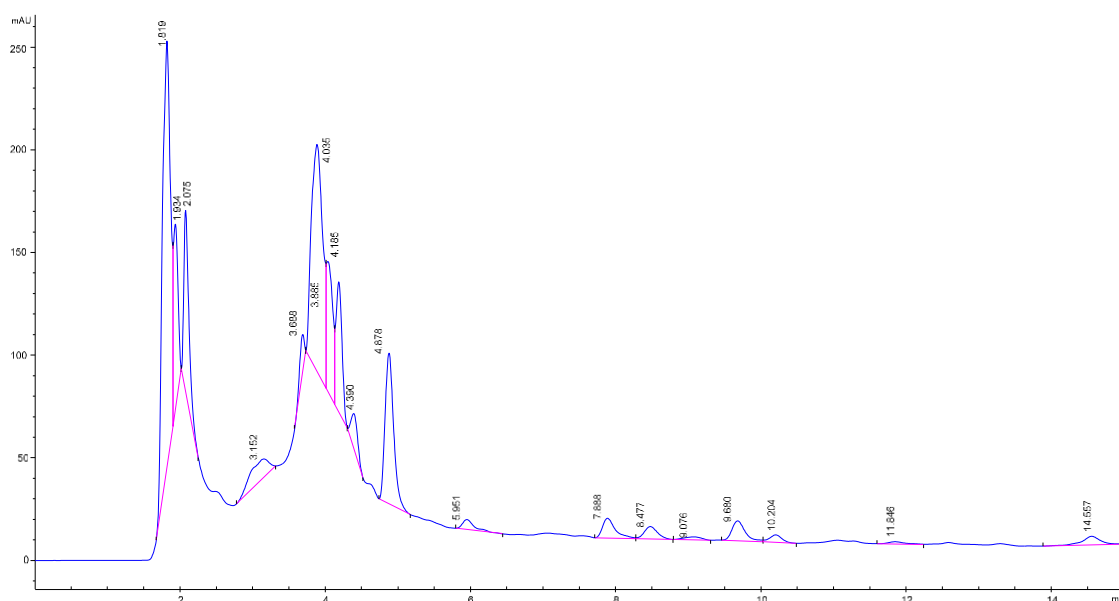


Figura 13: Cromatograma da fração 04 obtido por CLAE-DAD, em fase reversa, usando como fases móveis MeOH modificado (0,1% de CH_3COOH) em A e ACN em B. A concentração das amostras foi de 10 mg.mL^{-1} , a taxa de fluxo em 1 mL.min^{-1} , o volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e a temperatura em 27°C . A melhor absorbância foi registrada no λ_{max} 280 nm.

Outras condições cromatográficas em C18 são apresentadas APÊNDICE 2. Os espectros do UV-vis foram inconclusivos e os resultados mostraram a necessidade de análises por CLAE-DAD com aplicação de técnicas que forneçam uma melhor separação dos compostos nitrogenados das frações do CSEa. A fase estacionária quiral foi utilizada como alternativa para a separação dos compostos nitrogenados.

4.2.2 Análises por CLAE-DAD com Fase Estacionária Quiral

A separação dos compostos das fração 04 e 09, com uso da FEQ-v, ocorreu em modo *polar iônico*, em eluição isocrática. As condições cromatográficas de eluição, taxa de fluxo, volume de injeção e temperatura (Tabela 6) aplicadas à fração 04 gerou cromatograma com picos em diferentes tempos de retenções, boa intensidade de absorção e separação da linha de base (Figura 14).

A melhor absorbância foi registrada no UV-Vis de 280 nm. As retenções com maior intensidade de absorção e maior definição dos picos foram observadas nos tempos de 22,12 min, 24,66 min, 26,26 min e 30,16 min, com os compostos A, B, C e D majoritários, respectivamente (Figura 14). Os espectros de UV-Vis dos respectivos compostos podem ser observados na Figura 15.

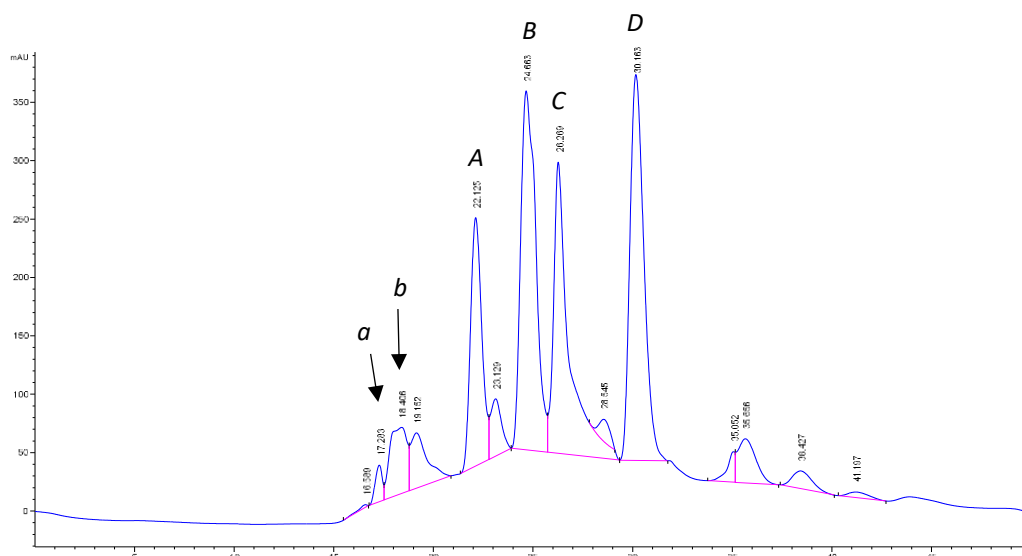


Figura 14: Cromatograma da fração 04 extraídos das análises em coluna quiral apresentando os picos A, B, C e D (majoritários) e os picos a e b (minoritários). A eluição ocorreu em modo polar-iônico e usou a fase móvel metanol modificado com 0,2% de ácido acético e 0,05% de hidróxido de amônia em A, com temperatura de 33° C e taxa de fluxo de 0,1 mL.min⁻¹. A melhor absorbância foi no λ_{max} 280 nm.

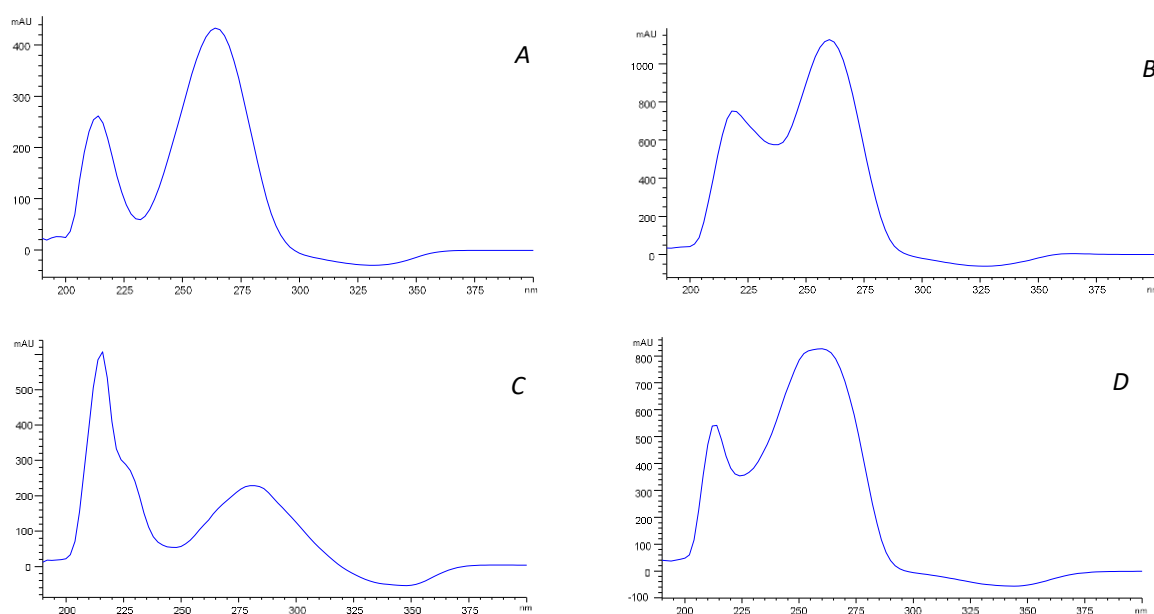


Figura 15: Espectros com λ_{max} em 214/265 nm em A, 220/260 nm em B, 215/227/282 nm em C e 212/260 nm em D.

Os compostos minoritários, picos a e b, foram retidos nos tempos 17.28 min e 18.39 min, respectivamente (Figura 14), apesar de ainda apresentar forte coeluição e sem definição da linha de base, apresentaram espectros de UV-Vis com bandas bem definidas e boa intensidade absorção do UV-vis (Figura 16).

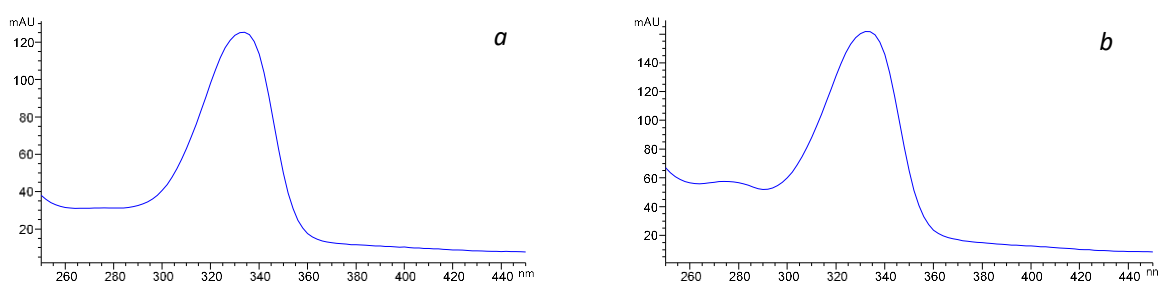


Figura 16: Espectros de UV-Vis dos picos *a* e *b* extraídos do cromatograma da fração 04, apresentando λ_{max} em 334 nm e 333 nm, respectivamente.

O cromatograma da fração 09 apresentou separação dos compostos com baixa intensidade (mAU). As retenções ocorreram nos tempos de 24,03 min, 27,48 min, 31,00 min e 34,51 min, com os picos *c*, *d*, *e* e *f* respectivamente (Figura 17).

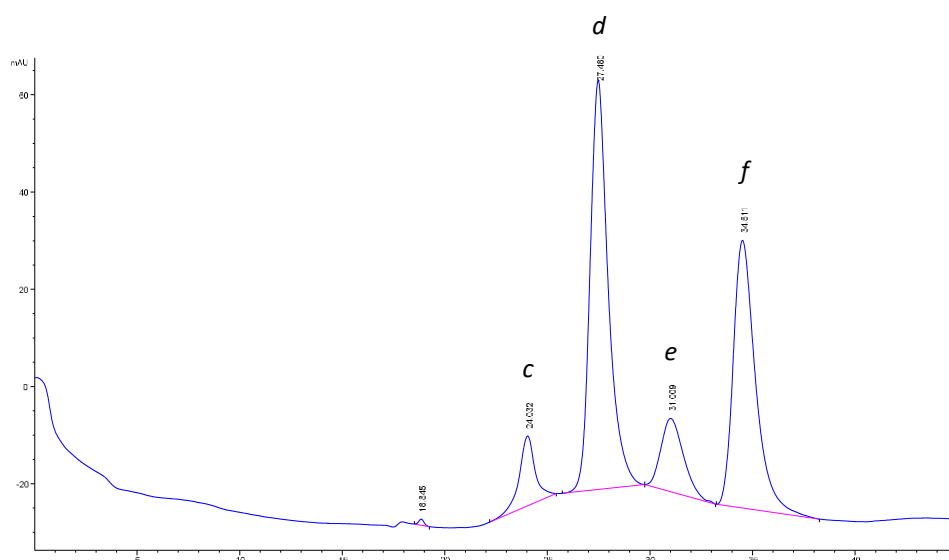
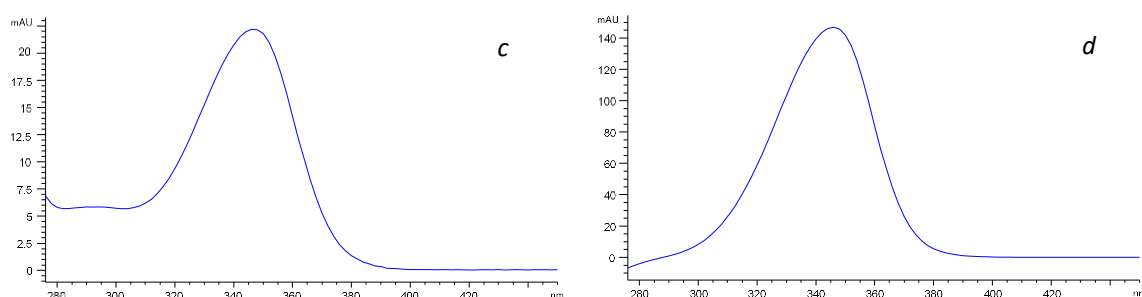


Figura 17: Cromatograma da fração 09 apresentando quatro regiões de retenção com picos *c*, *d*, *e* e *f* bem definidos, retidos em 24,03 min, 27,48 min, 31,00 min e 34,51 min, respectivamente.

A melhor definição de picos foi registrada em UV-Vis de 360 nm. Os espectros de UV-Vis dos respectivos compostos apresentaram bandas bem definidas e boa absorvância, e podem ser observados nos espectros de UV-vis dos picos *c*, *d*, *e* e *f* correspondentes (Figura 18).



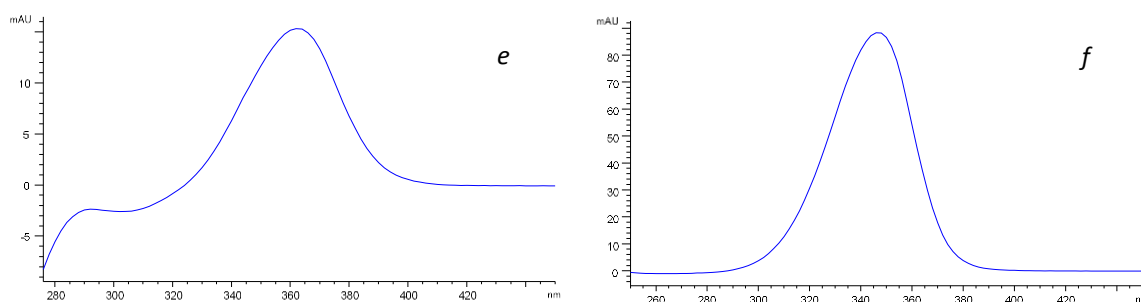


Figura 18: Espectros da fração 09 apresentando bandas de absorção com λ_{max} 346 nm em c e f, 347 nm, 363 nm em d e 346 nm em e.

Os resultados comparativos entre os espectros extraídos do cromatograma da fração 04 (Figura 14), identificados como os compostos **A**, **B**, **C** e **D**, e os espectros do cromatograma da fração 09, identificados como compostos **a** e **b** (Figura 16), foram comparados com dados da literatura e estão apresentados na Tabela 7 abaixo.

Tabela 7: Dados dos espectros de UV-vis obtidos por CLAE-DAD com coluna quiral das frações 04 e 09 apresentando os compostos caracterizados e possível composto/classe química e grupo de organismos que ocorrem segundo comparação com dados da literatura.

	TR (min)	Bandas λmáx (nm)			Composto sugerido	Grupo de organismo	Referência
Fração 04							
Compostos majoritários							
A	22,4	214	265	-	Compostos fenólicos não definidos	Cyanobacteria (com espectro amplo de ocorrência entre os seres vivos)	Rastogi e Sinha (2009)
B	25,0	220	260	-			
C	26,4	215	227	282			
D	30,8	212	260	-			
Compostos minoritários							
a	17,28	334	-	-	Micosporina-2- glicina	Bacillariophyta, Cnidaria, Cyanobacteria, Echinodermata, Mollusca, Rhodophyta	Geraldes e Pinto (2021)
					Shinorina	Arthropoda, Bacillariophyta, Chlorophyta, Chordata, Cyanobacteria, Dinoflagellata, Lichen, Miozoa, Mollusca, Ochrophyta, Porifera, Rhodophyta	Carreto e Carignan (2011), Lalegerie et al. (2020), Geraldes e Pinto (2021)
					Porfira-334	Arthropoda, Bacillariophyta, Chlorophyta, Chordata, Cnidaria, Cyanobacteria, Dinoflagellata, Miozoa, Mollusca, Ochrophyta, Phaeophyta, Porifera, Rhodophyta	Carreto e Carignan (2011), Lalegerie et al. (2020), Geraldes e Pinto (2021)

	TR (min)	Bandas λmáx (nm)			Composto sugerido	Grupo de organismo	Referência
Fração 04							
b	18,65	333	-	-	Micosporina-glicina - alanina	Cyanobacteria, Rhodophyta	Carreto e Carignan (2011), Lalegerie <i>et al.</i> (2020), Gerald e Pinto (2021)
					Hexose- shinorina		
Fração 09							
c	24,06	346	-	-	MAA não definida	Oscillatoriales	Carreto e Carignan (2011).
d	27,49	347	-	-	Inconclusivo	-	-
e	31,04	362	-	-	Euhalothece-362	Cyanobateria	Carreto e Carignan (2011), Gerald e Pinto (2021)
f	34,58	346	-	-	MAA não definida	Oscillatoriales	Carreto e Carignan (2011)

TR = Tempo de Retenção; Myc = Micosporina; Gyc = Glicina

Os resultados das análises por CLAE-DAD com uso da coluna quiral será discutido na seção seguinte. As frações foram submetidas a análises por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI- EM/EM).

4.3 ANÁLISES POR ESI- EM/EM

As frações 04 e 09 foram analisadas por EM/EM por injeção direta nos modos de ionização positivo e negativo. O cromatograma de íons totais da fração 09 exibiu um íon molecular $[M+H]^+$ m/z 560,2 no modo de ionização positivo (Figura 19).

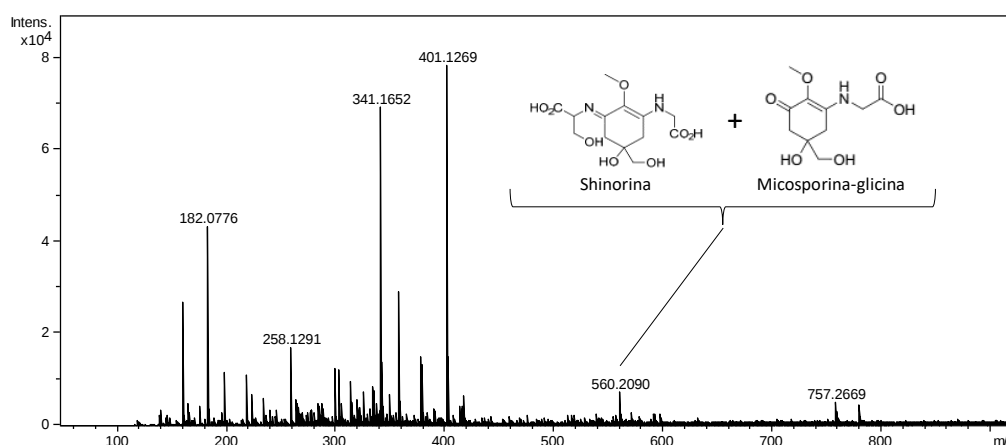


Figura 19: Cromatograma de íons totais da fração 09 obtido no modo de ionização positivo exibindo o íon molecular m/z 560,2 $[M+H]^+$.

O cromatograma de íons totais no modo de ionização negativo $[M-H]^-$ da fração 09 não apresentou o íon correspondente.

5 DISCUSSÃO

A separação de espécies químicas é uma atividade farmacológica antiga desenvolvida pelo homem a fim de obter substâncias que auxiliem nos processos de tratamento/cura de enfermidades (HARBORNE 1984). Diferentes técnicas de separação de compostos químicos são amplamente utilizadas em todo o mundo e, neste sentido, as técnicas de cromatografia apresentam amplo sucesso para a identificação e isolamento de compostos químicos com atividade biológica (HARBORNE 1984). Desta forma, as técnicas de cromatografias foram aplicadas para o desenvolvimento deste estudo, o primeiro de caracterização química dos compostos nitrogenados presentes no extrato aquoso de *Capilliphyicus salinus* (CSEa) e fez uma avaliação da atividade inibitória frente a acetilcolinesterase (AChE), existindo apenas o trabalho propondo a descrição desta nova espécie por Caires *et al.* (2018a).

A extração dos compostos a partir da biomassa de *C. salinus* coletada em ambiente natural ocorreu a frio e usou como solvente EtOH 96%, considerado um bom solvente para extrações iniciais (HARBORNE 1984), em uma única extração, adotando um tempo mais longo de contato entre o solvente extrator e a biomassa. O extrato hidroalcoólico foi submetido à partição líquido-líquido (PLL) e o extrato aquoso (CSEa) foi selecionado para o fracionamento em coluna cromatográfica de sílica flash (CC-flash).

A CC-flash é considerada por STILL *et al.* (1978) um método geral rápido e barato para a separações preparativas de misturas que requerem resoluções moderadas, otimização o tempo de execução e o uso dos recursos materiais empregados na técnica. O fracionamento em CC-flash se baseou nas indicações metodológicas de Fair e Kormos (2008), com adaptações, que sugerem uma série de formulações preparativas desenvolvidas em cromatografia de camada delgada (CCD) para desenvolvimento de uma CC-flash em sistema preparativo. A técnica proporciona eluições rápidas, econômicas e eficientes otimizando o tempo e o uso dos recursos materiais.

O desenvolvimento das CCDs para o sistema preparativo considerou ainda as indicações de Carreto e Carigman (2011) e Carreto *et al.* (2005), com modificações, aplicados a composições cianobacterianas polares. O sistema de solventes que forneceu melhor separação entre os analitos apresentou alta polaridade (50%, 45% e 5% EtOH/ MeOH/ H₂O ultrapura, respectivamente), e foi o mesmo utilizado para a execução da CC-flash. A amostra

foi inserida na coluna na forma líquida por considerar as dificuldades para secagem total do CSEa e a minimização dos riscos de oxidação e perda de material.

Em todas as etapas do desenvolvimento dos métodos de PLL e CC-flash o extrato e as frações foram monitoradas por CCD para a observação do comportamento químico dos compostos fornecendo informações quanto à polaridade e o grau de semelhança química. O CSEa chamou atenção quanto ao perfil químico por apresentar compostos com alta polaridade quando revelados por irradiação UV e em ácido sulfúrico aquecido, considerados reveladores universais. O CSEa foi ainda submetido a reação em iodo ressublimado revelou a presença de moléculas insaturadas com duplas e/ou triplas ligações ou ainda com anéis aromáticos. Contudo, as revelações das CCDs com o reagente ninhidrina (1,2,3-Indantrione monohydrate) foi determinante para a compreensão da composição química das frações.

Hartmann *et al.* (2016) utilizou o reagente ninhidrina para identificação de um novo MAA, não detectada em sistema de CLAE-DAD convencional, presente em extrato bruto de *Prasiola calophylla* (Trebouxioophyceae, Chlorophyta) e usou a técnica em sistema de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC, do inglês *high-performance thin layer chromatography*). Os resultados de Hartmann *et al.* (2016), com adaptações, serviram de base para este estudo e as dez frações submetidas a reação na presença da ninhidrina apontaram para a presença de compostos nitrogenados.

O aquecimento dos compostos em contato com a solução saturada em ninhidrina forçaram a reação com moléculas de ninhidrina colorando em tons de rosa e vermelho mais intenso (púrpura) as bandas cromatográficas, forte indicativo da presença de compostos do ME com nitrogênio em suas constituições químicas. Os resultados positivos para compostos nitrogenados direcionou análises para o ensaio de inibição frente a AChE.

Os resultados do ensaio '*in vitro*' de inibição da AChE confirmaram a existência de compostos do ME bioativos no CSEa e em todas as frações, com a mais baixa ação inibitória apresentada pelo CSEa, com apenas de 32% de inibição. As frações 02, 04 e 05 tiveram inibição média de 52%, enquanto a fração 09 apresentou melhor taxas, com aproximadamente 80% de inibição, seguida da fração 10 que apresentou 61% de inibição (Figura 12). Diferentes estudos mostraram a ação de inibição da AChE por compostos do ME de cianobactérias filamentosas. Em uma revisão realizada de 2009, Rastogi e Sinha (2009) resume os vários metabólitos secundários sintetizados por cianobactérias, seu significado biotecnológico e

industrial e citam alguns compostos inibidores de proteases, tais como cianopectolinas, micropeptina, oscilapeptina e anatoxinas, e sua seletividade para determinadas enzimas.

Rastogi e Sinha (2009) chamam atenção para as anatoxinas por serem um grupo de compostos altamente tóxicos para organismos aquáticos e terrestres, especialmente os mamíferos, e por seu potencial de inibição enzimática. O destaque é dado para a anatoxina-A (S), isolada de *Anabaena flos-aquae* e *A. lemmermannii*, por ser um potente inibidor da AChE relatada no estudo realizado por Matsunaga e seus colaboradores (1989) e a ação do composto semelhante com a atividade apresentada pelo agente nervoso 'Sarin' e com potencial de letalidade dez vezes maior que a Antx-A. Rastogi e Sinha chamam atenção ainda para a ação do metabólito nostocarbolina, extraído de uma cianobactéria do gênero *Nostoc*, por apresentar ação de inibição tanto da acetil quanto da butirilcolinesterase.

Nos ensaios '*in vitro*' e '*in vivo*' realizados por CARVALHO e seus colaboradores (2013), utilizando extratos metanólicos de cepas de cianobactérias coletadas em diferentes ambientes tropicais do Brasil, que incluem duas cepas do gênero *Phormidium* (*P. cf. amoenum* CCIBt 3412 e *Phormidium* sp. CCIBt 3265), eles confirmaram a presença de compostos com potencial inibição da AChE. No ensaio '*in vitro*', de bioautografia para inibição da AChE, Carvalho e seus colaboradores (2013) observaram os Rfs com manchas correspondentes a compostos com ação de inibição para AChE; enquanto nos ensaios '*in vivo*', os extratos metanólicos foram aplicados a camundongos Swiss machos (com peso entre 19 e 21 g e 50 dias de vida), e as cepas de *Phormidium* apresentaram atividade inibitória para AChE de forma transitória ou reversível. CARVALHO e seus colaboradores (2013) relacionou os dados dos ensaios '*in vivo*' com respostas associadas a ação nos receptores muscarínicos (como dispnéia, cólicas abdominais e diarreia) e ação nos receptores nicotínicos (tais como câibras musculares, fraqueza motora, paralisia, taquicardia e errecção dos pelos), e sintomas associados ao SNC (sistema nervoso central) do tipo tremores, ataxia e dificuldades de caminhar.

Ayala e seus pares (2019) também realizaram ensaios '*in vivo*' aplicados aos artrópodes *Aedes aegypti* e *Artemia salina*. Nesses ensaios foram observadas significativas inibições da AChE após utilização dos extratos metanólicos dos gêneros das cianobactérias filamentosas *Lyngbya*, *Phormidium* e *Leptolyngbya*. As taxas de mortalidade foram apresentadas em 100% e 97% pelas cepas de *Lyngbya* e *Phormidium*, respectivamente, quando aplicadas a *A. aegypti*, enquanto as taxas de mortalidade dos extratos em *A. salina* foram em 56% e 63%,

respectivamente. As taxas de mortalidade apresentadas pelo extrato de *Leptolyngbya* foram mais baixas, com 40% e 6%, respectivamente.

Os resultados observados nas CCDs permite perceber o pouco sucesso da separação dos compostos com a aplicação da CC-flash, contudo, o ensaio de inibição foi possível observar uma diferença significativa da atividade inibitória apresentada pelo CSEa e pelas frações 09 e 10, provavelmente possuindo uma pequena diferença da concentração química desses compostos em relação às demais. Os resultados permitiram direcionar as análises por sistema de cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE-DAD) voltando os esforços para as frações 04 e 09 por terem apresentado atividade biológica intermediária de 53% (fração 04) e relevante atividade, com 80% de inibição da fração 09.

As frações foram submetidas a análise por CLAE-DAD, em fase estacionária C18, apropriada para separação de compostos polares (HARBORNE 1984). Contudo, os cromatogramas não mostraram diferenças químicas entre elas, com os compostos mostrando-se altamente polares e com forte coeluição, com picos pouco definidos, alargados e retidos no início da corrida, saindo entre 1 e 3 min. Os espectros de UV-Vis foram inconclusivos. O grau de similaridade química entre as frações mostrou a necessidade de aplicação de métodos que favoreçam a separação desses compostos e a fração 04 foi utilizada como padrão de separação em função da similaridade química apresentada e do maior rendimento obtido favorecendo a otimização no desenvolvimento das atividades com economia de tempo e dos recursos materiais empregados.

As análises em coluna C18 usando os eluentes MeOH e ACN favoreceu à melhor separação. O cromatograma obtido (Figura 13) apresentou picos em diferentes tempos de retenção e considerável absorção, ainda assim com picos mal definidos e com baixa resolução da linha de base. Os espectros de absorção do UV-Vis mostraram baixa resolução e foram considerados inconclusivos. O perfil cromatográfico da fração 04 apresentado na C18 mostrou clara necessidade da escolha de um método cromatográfico mais elucidativo, que promovam a separação dos compostos nitrogenados de forma mais eficiente, com uso de técnicas mais sensíveis e que também promovam a economia de materiais e a redução do tempo para a obtenção dos dados (STILL *et al.* 1978).

As dificuldades para separação de compostos altamente polares de cianobactérias são conhecidas e relatadas na literatura. O estudo de Carreto e Carigman (2011) fizeram uma revisão de métodos usados para separação, isolamento e identificação desses compostos e

relata a dificuldade de separação a partir de extratos de cianobactérias, com o uso de colunas convencionais indicadas para compostos polares, como do tipo C18 e C8. No estudo, Carreto e Carrigman (2011) relatam a separação de compostos polares (microsporinas e MAAs) de cianobactérias e fungos terrestres por Volkman e Gorbushina (2006) e Dunlap e Chalker (1986). Esses utilizaram a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em colunas poliméricas C18 e diferentes sistemas de eluição, separando compostos de caráter mais básicos.

Parailloux e colaboradores (2020) também conseguiram separar MAAs de extrato de algas e identificaram, além de MAAs relatadas na literatura, cinco novos MAAs usando o acoplamento da cromatografia líquida de interação hidrofílica zwitteriônica (HILIC, do inglês *Hydrophilic – Interaction Chromatography*) com espectrometria de massa de eletrospray multiestágio MS2/MS3, mostrando que a combinação das técnicas é apropriada para separação de compostos altamente hidrofílicos. A separação de moléculas com alta polaridade não é um trabalho simples e, em se tratando de moléculas até então desconhecidas da literatura, o resultado das análises não permitiu estabelecer conclusões sobre os aspectos químicos que envolvem as interações entre os analitos, as fases móveis e as fases estacionárias de forma mais apropriada dificultando na escolha de uma fase estacionária adequada para aplicação na separação de compostos químicos de forma precisa (CARDOSO *et al.* 2018; 2019).

As tentativas de separação dos compostos de *C. salinus* em C18 não foram satisfatórias para o estudo, entretanto, os resultados das análises das reações entre as frações e o reagente ninhidrina, associado aos resultados dos ensaios de inibição da AChE, indicam a presença de compostos nitrogenados com bioatividade e foram determinantes para a aplicação de outra alternativa de separação, mudando a fase estacionária, e tendo como alternativa de uso uma fase estacionária quiral com vancomicina (FEQ-v). Tais colunas são bastante utilizadas em pesquisas e na indústria farmacêutica por serem eficientes na separação de diferentes tipos de substâncias, incluindo aquelas que possuem nitrogênio em sua composição.

A FEQ-v foi descrita por Desai e Armstrong, e Magalhães e Bonato (ARMSTRONG *et al.* 1994; ARMSTRONG e ZHOU *et al.* 1994; CARDOSO *et al.* 2018; 2019) e possui alta capacidade para a separação de numerosas substâncias, em especial enantioméricas, com simplicidade de uso e precisão dos resultados. Essas colunas são indicadas para a separação de aminoácidos, aminas e compostos polares, dentre outros (ARMSTRONG *et al.* 1994;

ARMSTRONG e ZHOU 1994; LOURENÇO *et al.* 2010; CARDOSO *et al.* 2018; 2019). Cardoso e seus pares (2018; 2019) consideram as colunas quirais flexíveis podendo ser utilizadas em sistemas de LC e MS compatíveis, e com alta sensibilidade para detecção dos analitos, aumentando em até 10 vezes o tamanho dos picos e reduzindo o tempo de corrida em até 3,5 vezes, promovendo ainda a economia no uso de solventes.

Os compostos de *C. sallinus* foram então submetidos às análises por CLAE-DAD em coluna quiral por considerar a presença de moléculas nitrogenadas e as características químicas potenciais do antibiótico macrocíclico vancomicina que compõe a coluna em ampliar as possibilidades de interações que envolvem seletor e analitos (CARDOSO *et al.* 2018). As corridas com melhor resultado de separação ocorrem no modo *polar iônico*, em eluição isocrática, com a fase móvel formada por MeOH modificado com 0,2% de CH₃COOH e 0,05% de NH₄OH. Os cromatogramas apresentaram picos bem definidos em diferentes tempos de retenção, com boa intensidade e boa separação da linha de base (Figura 17).

Dentre os parâmetros utilizados nas corridas, a temperatura de 33° C e fluxo de 0,1 mL.min⁻¹ mostraram os melhores resultados para separação dos MEs presentes nas frações 04 e 09 de *C. sallinus*. Os cromatogramas apresentaram picos em diferentes tempos de retenção e boa intensidade de absorção. As corridas em baixo fluxo tiveram o tempo ajustado para 50 min, uma vez que, o tempo de 15 min foi ineficiente para o desenvolvimento de uma análise cromatográfica satisfatória, retardando o início da retenção dos analitos que ocorria apenas no final da corrida.

Os picos majoritários apresentados no cromatograma da fração 04 (Figura 14), identificados como os compostos **A**, **B**, **C** e **D**, apresentaram espectros de UV-Vis com λ_{max} entre 212 nm e 282 nm (Figura 15, picos majoritários) apresentando duas ou três bandas de absorção. O composto **A** apresentou duas absorbâncias, com λ_{max} 214 nm e λ_{max} 265 nm; **B** apresentou o λ_{max} 220 nm e λ_{max} 260 nm; o composto **C** apresentou absorbâncias nos λ_{max} 215 nm, λ_{max} 227 nm e λ_{max} 282 nm; e **D**, com λ_{max} 212 nm e λ_{max} 260 nm (Tabela 7) faixas de absorbâncias características de moléculas que possuem cromóforos formados por anéis de seis membros com ligações duplas, sugerindo pertencer a classe química dos compostos fenólicos.

Os espectros dos picos minoritários, identificados como compostos **a** e **b** (Figura 16), apresentaram uma única e bem formada banda de absorção do UV-vis com λ_{max} 334 nm e λ_{max} em 333 nm, respectivamente. A comparação dos dados espectrais aos achados na literatura

sugerem a presença dos compostos pertencentes à família da MAA que caracteristicamente absorvem no UV-vis entre as faixas 310 nm e 368 nm. Dessa forma, o composto **a** apresenta compatibilidade espectral com os MAAs micosporina-2-glicina ou porphyrina-334 ou shinorina, com λ_{max} 334 nm, enquanto o composto **b** é compatível com os MAAs micosporina-glicina-alanina ou hexose-shinorina, que apresentam λ_{max} 333 nm (Figura 16 e Tabela 2) (CARRETO e CARIGNAN 2011; LALEGERIE *et al.* 2020; GERALDES e PINTO 2021).

O cromatograma da fração 09 (Figura 17) apresentou quatro regiões de retenção com picos expressivos e proeminentes (compostos **c**, **d**, **e** e **f**), boa intensidade de absorção (mAU) e razoável separação entre eles. Os espectros de absorção do UV-vis apresentaram uma única e bem formada banda cromatográfica com absorbâncias nos λ_{max} 346 nm (em dois diferentes tempos de retenção), λ_{max} 347 nm e λ_{max} 362 nm (Figura 18) e, em comparação dos espectros de UV-vis com dados da literatura, apontam para a presença de compostos da família dos MAAs (Tabela 7).

Desta forma, comparando com dados espectrais da literatura, os compostos **c** e **f** (λ_{max} 346 nm) são relatados por Carreto e Carignan (2011) como ‘MAA ainda não identificado’ (ou não definida) (Tabela 2) e não estão presentes na relação de MAAs no levantamento bibliográfico de Geraldles e Pinto (2021) com mais 70 tipos destes compostos. O composto **e** (λ_{max} 362 nm) trata-se possivelmente do MAA euhalotheca-362, apresentado por Carreto e Carignan (2011) e Geraldles e Pinto (2021) com λ_{max} 362 nm (Tabela 2); ao passo que o composto **d** (λ_{max} 347 nm), apesar de possuir características espectrais compatíveis com compostos da MAA, não foram encontrados relatos na literatura, até o presente momento, para compostos com características espectrais compatíveis.

Os resultados obtidos mostraram o potencial de separação dos compostos das frações 04 e 09 (Figura 14 e Figura 17) com uso da FEQ-v, a variedade de ME do CSEa de *C. salinus* e o potencial desses compostos para inibição da AChE. Embora não tenham sido encontrados estudos com uso de colunas quirais com vancomicina para a separação de compostos nitrogenados polares oriundos de cianobactérias até o momento, o uso da FEQ-v se mostrou uma interessante ferramenta cromatográfica para a separação dos compostos polares nitrogenados de *C. salinus* com eficiência e simplicidade de uso, bem como o potencial para separação e caracterização dos compostos nitrogenados.

Nos estudos de Lourenço (2010) e ILISZ (2013), e seus pares, eles concluíram que as FEQ possuem excelente enantioseletividade para uma alta variedade de compostos quirais,

bem como, uma ampla versatilidade de diferentes modos de eluição possíveis para uma única coluna, podendo adequar o uso para o modo normal, polar iônico (com uso das fases modificadas com ácido ou base, ou ácido e base), polar orgânico (com uso de solvente orgânico) ou reverso (com uso de tampão em fase aquosa) sendo os dois últimos considerados mais eficientes para separação de compostos polares nitrogenados favorecendo aos diferentes mecanismos de interação que envolvem seletor e analitos.

A determinação dos mecanismos de interação entre os analitos presentes nas frações 04 e 09 de *C. salinus* não é conclusiva por se tratar de compostos químicos até então desconhecidos da literatura. Ainda assim, é possível presumir os mecanismos de interação que envolvem tais separações considerando o potencial de formação de ligações de hidrogênio pelo MeOH e que, o modo *polar iônico* tenha promovido uma maior interação entre seletor e analito promovendo, conseqüentemente, a separação dos analitos mesmo não se tratando de compostos enantioméricos.

As frações 04 e 09 foram submetidas a análises de espectrometria de massas (ME/ME) por injeção direta nos modos de ionização positivo e negativo. O cromatograma de íons totais da fração 09 (Figura 19) exibiu o íon m/z 560,2 no modo de ionização positivo, compatível com íon da MAA 'M-320'. Carreto *et al.* (2001; 2005) detectaram uma série de MAAs híbridos presentes em extratos de dinoflagelados do gênero *Alexandrium*, dentre elas a M-320 (559.5 Da) que apresentava espectro de UV-vis com formato assimétrica e $\lambda_{\max}$ 320 nm. Os autores sugeriram que tal molécula seja o resultado da condensação entre as MAAs shinorina (332.3 Da) e micosporina-glicina (245.2 Da) (Tabela 2) apresentando uma massa molecular 18 unidades menor que a massa calculada de shinorina e micosporina-glicina, produtos da hidrólise ácida controlada de M-320.

A M-320 ($[M+H]^+$ m/z 560) foi caracterizada com base na análise comparativa entre o cromatograma de íons moleculares de alta resolução, em modo positivo, comparando-o aos dados apresentados por Carreto *et al.* (2001; 2005) e Wada *et al.* (2015). Os espectros do UV-vis obtidos com as análises por CLAE-DAD em coluna quiral não apresentaram absorbâncias em $\lambda_{\max}$ 320 nm. As micosporinas (ou MAAs) se apresentam comumente com tempos de retenção e absorbância do UV muito próximas umas das outras, embora em picos distintos (CARRETO e CARIGNAN 2011; LALEGERIE *et al.* 2020; GERALDES e PINTO 2021). Um levantamento feito por Geraldes e Pinto (2021) conseguiu catalogar 74 tipos de MAAs

relacionando-os com dados de $\lambda_{\max}$, m/z e padrão de fragmentação além dos dados de ϵ e fórmula química, não apresentando entretanto moléculas com $\lambda_{\max}$ 346 nm e $\lambda_{\max}$ 347 nm.

Os MAAs (Tabela 2), além de serem moléculas fotoprotetoras, estão envolvidas ainda em diversos processos biológicos na natureza, tais como atividade antioxidante, regulação osmótica e proteção contra estresse térmico e dessecação podendo também atuar como pigmentos fotossintéticos acessórios e como estoques de N_2 intracelular (OREN e GUNDE-CIMERMAN 2007; D'AGOSTINNO *et al.* 2016). Ao passo que as citonemina (Tabela 3) possuem potencial farmacológico com ação anti-inflamatório, antiproliferativo, antioxidante, aglutinante, e ainda propriedades emoliente e anti-irritante, além da função básica de fotoproteção, excelente candidato para a compor cremes anti-idade (NOWRUZI *et al.* 2020a).

Vale salientar que compostos nitrogenados, tais como cianotoxinas e compostos protetores da radiação UV-A e UV-B (micosporinas e citoneminas), são comuns em cianobactérias filamentosas (RASTOGI e SINGH 2009; CAIRES *et al.* 2018b; NOWRUZI *et al.* 2020a; GERALDES e PINTO 2021; DEXTRO *et al.* 2023) e os resultados dos espectros apontam a produção destes compostos por *C. salinus*. Contudo, ainda que os espectros obtidos com o desenvolvimento da FEQ-v e o cromatograma de íons totais do EM/EM sejam compatíveis com os dados da literatura, possibilitando a caracterização dos compostos como pertencentes à classe dos compostos fenólicos (na fração 04) e da família das MAAs (nas frações 04 e 09) (DOURADO 2008; RASTOGI e SINHA 2009; CARRETO *et al.* 2001; 2005; CARRETO e CARIGMAN 2011; WADA *et al.* 2015; KAGEYAMA e WADITEE-SIRISATTHA 2019; SAKAMOTO *et al.* 2019; GERALDES e PINTO 2021; DEXTRO *et al.* 2023) os resultados não foram conclusivos para a suas identificações exatas.

Estudos com o potencial uso de compostos do ME de origem cianobacteriana para a produção de medicamentos são uma realidade e alguns desses compostos empregados na produção de drogas antivirais, antiprotozoais, anticâncer por exemplo (CARVALHO *et al.* 2013; KAGEYAMA e WADITEE-SIRISATTHA 2019). As ações inibitórias exibidas por metabólitos de cianobactérias sobre certas enzimas está entre as mais interessantes atividades apresentadas por este grupo de seres vivos e, casando com a identificação de proteases como fatores importantes para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas humanas, as cianobactérias filamentosas de água doce assumem protagonismo como fontes de inibidores de compostos que modulam esta classe de enzima despertando o interesse também pela busca por compostos do ME em cianobactérias filamentosas marinhas, uma vez que o

ambiente marinho possui uma capacidade infinita de produção de ME embora seu potencial ainda seja pouco explorado (CARVALHO *et al.* 2013; AYALA *et al.* 2019; CARROL *et al.* 2020).

Os resultados dos estudos confirmam a presença de compostos nitrogenados com interessante grau de inibição da AChE e acende a possibilidade de ampliação dos estudos para a confirmação das classes químicas a que pertencem, assim como para a sua aplicação biotecnológica. Ressalta-se, por tanto, a necessidade de estudos complementares de separação, isolamento, quantificação e elucidação estrutural dos compostos de *C. salinus* para a confirmação dos resultados obtidos nas análises da coluna quiral, com ampliação das investigações com CLAE-DAD com coluna quiral acoplada a espectrômetro de massas (LC-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As linhagens de cianobactérias filamentosas de águas tropicais marinhas são pouco estudadas, embora despertem grandes interesses para a ampliação dos estudos e descoberta de novos compostos com potenciais biotecnológicos, uma vez que se trata de organismos considerados verdadeiros arsenais ricos e diversos em moléculas químicas do metabolismo secundário com amplo potencial para as mais diversas aplicabilidades (SINGH, 2022).

C. salinus apresentou compostos do metabolismo especial nitrogenados nas reações com ninhidrina e nos ensaios *in vitro* para inibição da AChE, mostrando possuir potencial biotecnológico para a produção de compostos com bioatividade frente a AChE. A coluna quiral mostrou-se uma boa estratégia para separação eficiente dos MEs de cianobactéria, demonstrando facilidade de uso, rapidez das análises e economia dos solventes utilizados na separação dos compostos altamente polares do CSEa de *C. salinus*.

As análises por CLAE-DAD com uso de uma fase estacionária quiral, formada pelo antibiótico vancomicina, é uma interessante e eficiente alternativa à separação de compostos altamente polares de cianobactérias, possuindo vantagens em relação à coluna C18 devido a versatilidade, facilidade de uso e otimização do tempo e dos recursos materiais empregados nas análises.

Estudos confirmando a fase estacionária quiral para separação de compostos oriundos de cianobactérias não foram encontrados até o presente momento. Desta forma, faz-se necessária a ampliação e o aprofundamento dos estudos sobre a potencialidade e a viabilidade da fase estacionária quiral para a separação e isolamento de composto altamente polares de cianobactérias, assim como a aplicação de novos testes, *in vitro* e *in vivo* para a confirmação efetiva da atividade de inibitória da AChE pelos compostos do CSEa de *C. salinus*. Além do mais, é necessário o investimento em estudos relacionados a bioprospecções de produtos naturais de origem cianobacterianos para a potencial aplicação em formulações de fármacos e cosméticos em alternativa aos existentes atualmente.

7 REFERÊNCIAS

- Agilent Technologies, Inc. 2018. Inovações da Agilent. Trusted Answers. Agilent. Public. Nº 5994-0070PTBR. EUA, 31 de julho de 2018. Disponível em:< <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/brochure-poroshell-chiral-agilent-5994-0070pt-br-20181022.pdf>> Acesso em: 05 de junho de 2022.
- Agilent Technologies, Inc. 2020. Colunas InfinityLab Poroshell 120 Quiral. Trusted Answers. Agilent. Public. Nº 5994-2797PTBR EUA, 8 de dezembro de 2020. Disponível em:< <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/brochure-poroshell-chiral-agilent-5994-2797pt-br-20201022.pdf>> Acesso em: 05 de junho de 2022.
- AHMADI, A. *et al.* Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: a review. *BioMed research international*, v. 2015. 2015.
- ARÁOZ, R.; MOLGÓ, J. and DE MARSAC, N. T. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*, v. 56, n. 5, p. 813-828, 2010.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A. and GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.
- ARMSTRONG, D. W. and ZHOU, Y. Use of a macrocyclic antibiotic as the chiral selector for enantiomeric separations by TLC. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 17(8), p 1695-1707, 1994.
- ARMSTRONG, D. W. *et al.* A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC enantioseparations. *Chirality* v. 7, p 474-497. 1995.
- AYALA, F. I. *et al.* Environmental and cultured cyanobacteria as sources of *Aedes aegypti* larvicides. *Universitas Scientiarum*, v. 24, n. 3, p. 465-496, 2019.
- BAIRWA, H. K. *et al.* Evaluation of UV-B protection efficiency of mycosporine like amino acid extracted from the cyanobacteria *Anabaenopsis* sp. SLCyA isolated from a hypersaline lake. *Bioresource Technology Reports*, v. 15, p. 100749, 2021.
- BASU, S. and MACKEY, K. R. M. Phytoplankton as key mediators of the biological carbon pump: Their responses to a changing climate. *Sustainability*, v. 10, n. 3, p. 869, 2018.
- BLUNT, J. W. *et al.* Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 33, n. 3, p. 382-431, 2016.
- BORTOLI, S. and PINTO, E. Cianotoxinas: características gerais, histórico, legislação e métodos de análises. Capítulo 21. In: Pompêo *et al.* (Orgs.). *Ecologia de reservatórios e interfaces*. São Paulo, 2015. P 321-339.
- BOTANA, L. M. *et al.* Toxins | neurotoxins. In: *Encyclopedia of Analytical Science*. 2019. p. 141-147.
- BRIAND, Jean-François *et al.* Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary research*, v. 34, n. 4, p. 361-377, 2003.

BUDDEN, T. and BOWDEN, N. A. The role of altered nucleotide excision repair and UVB-induced DNA damage in melanomagenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 1, p. 1132-1151, 2013.

BURJA, A. M. *et al.* Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, v. 57, n. 46, p. 9347-9377, 2001.

CAIRES, T. A. *et al.* Polyphasic delimitation of a filamentous marine genus, *Capillus* gen. nov. (Cyanobacteria, Oscillatoriaceae) with the description of two Brazilian species. *Algae*, v. 33, n. 4, p. 291-304, 2018a.

CAIRES, T. A. *et al.* Biotechnological potential of *Neolyngbya* (Cyanobacteria), a new marine benthic filamentous genus from Brazil. *Algal research*, v. 36, p. 1-9, 2018b.

CAIRES, T. A. *et al.* Biodiversity of benthic filamentous cyanobacteria in tropical marine environments of Bahia State, Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, v. 42, p. 149-170, 2019.

CARDOSO, P. A. and CÉSAR, I. C. Chiral method development strategies for HPLC using macrocyclic glycopeptide-based stationary phases. *Chromatographia*, v. 81, p. 841-850, 2018.

CARDOSO, P. A. *et al.* Chirobiotic V versus Chiralpak ID for the Enantioselective chromatographic separation of Chloroquine: stability and validation study. *Journal of chromatographic science*, v. 57, n. 5, p. 443-450, 2019.

CARRETO, J. I.; CARIGNAN, M. O. and MONTTOYA, N. G. A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Marine Biology*, v. 146, p. 237-252, 2005.

CARRETO, J. I. and CARIGNAN, M. O. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Marine drugs*, v. 9, n. 3, p. 387-446, 2011.

CARRETO, J. I.; CARIGNAN, M. O. and MONTTOYA, N. G. Comparative studies on mycosporine-like amino acids, paralytic shellfish toxins and pigment profiles of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *A. catenella* and *A. minutum*. *Marine Ecology Progress Series*, v. 223, p. 49-60, 2001.

CARROLL, A. R. *et al.* Marine natural products. *Natural product reports*, v. 36, n. 1, p. 122-173, 2019.

CARROLL, A. R. *et al.* Marine natural products. *Natural product reports*, v. 38, n. 2, p. 362-413, 2021.

CARVALHO, L. R. *et al.* Biologically active compounds from cyanobacteria extracts: *in vivo* and *in vitro* aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 23, n. 3, p. 471-480, 2013.

CASTANEDA, A. *et al.* Bridging cyanobacteria to neurodegenerative diseases: A new potential source of bioactive compounds against Alzheimer's disease. *Marine Drugs*, v. 19, n. 6, p. 343, 2021.

CHRAPUSTA, E. *et al.* Mycosporine-like amino acids: Potential health and beauty ingredients. *Marine drugs*, v. 15, n. 10, p. 326, 2017.

DA SILVA, M. F. *et al.* Recovery of phenolic compounds of food concern from *Arthrospira platensis* by green extraction techniques. *Algal research*, v. 25, p. 391-401, 2017.

D'AGOSTINO, P. M. *et al.* Comparative profiling and discovery of novel glycosylated mycosporine-like amino acids in two strains of the cyanobacterium *Scytonema cf. crispum*. *Applied and environmental microbiology*, v. 82, n. 19, p. 5951-5959, 2016.

DERIKVAND, P.; LLEWELLYN, C. A. and PURTON, S. Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers: A comparison with current synthetic compounds. *European Journal of Phycology*, v. 52, n. 1, p. 43-56, 2017.

DEXTRO, R. B. *et al.* Exploring the Relationship between Biosynthetic Gene Clusters and Constitutive Production of Mycosporine-like Amino Acids in Brazilian Cyanobacteria. *Molecules*, v. 28, n. 3, p. 1420, 2023.

DOURADO, R. S. and LADEIRA, Â. M. Identificação de flavonóides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). *Brazilian Journal of Botany*, v. 31, p. 611-620, 2008.

DUFOSSÉ, L. *et al.* Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. *Trends in Food Science & Technology*, v. 16, n. 9, p. 389-406, 2005.

DUNLAP, W. C. and CHALKER, B. E. Identification and quantitation of near-UV absorbing compounds (S-320) in a hermatypic scleractinian. *Coral Reefs*, v. 5, p. 155-159, 1986.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

SILVA-STENICO, M. E. *et al.* Natural products from cyanobacteria with antimicrobial and antitumor activity. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 14, n. 9, p. 820-828, 2013.

FAIR, J. D. and KORMOS, C. M. Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, n. 1-2, p. 49-54, 2008.

FALCO, A. *et al.* Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Química Nova*, v. 39, p. 63-80, 2016.

FAVRE-BONVIN, J. *et al.* Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry*, v. 26, n. 9, p. 2509-2514, 1987.

FIORE, M. F.; ALVARENGA, D. O. and SILVA-STENICO, M. E. Genética de cianotoxinas. *Microbiologia in Foco*, v. 4, p. 24-35, 2011.

FRANCIS *et al.* 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 66, p.137–147, 1999.

FUENTES-TRISTAN, S. *et al.* Bioinspired biomolecules: Mycosporine-like amino acids and scytonemin from *Lyngbya* sp. with UV-protection potentialities. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 201, p. 111684, 2019.

GAO, X. *et al.* Biotechnological production of the sunscreen pigment scytonemin in cyanobacteria: Progress and strategy. *Marine Drugs*, v. 19, n. 3, p. 129, 2021.

GARCIA-PICHEL, F. and CASTENHOLZ, R. W. Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment 1. *Journal of Phycology*, v. 27, n. 3, p. 395-409, 1991.

GERALDES, V. and PINTO, E. Mycosporine-like amino acids (MAAs): biology, chemistry and identification features. *Pharmaceuticals*, v. 14, n. 1, p. 63, 2021.

GERWICK, W. H. *et al.* Giant marine cyanobacteria produce exciting potential pharmaceuticals. *Microbe-American Society for Microbiology*, v. 3, n. 6, p. 277, 2008.

GIOVANNETTI, R. *et al.* HPLC-DAD-ESI/MS identification of light harvesting and light screening pigments in the lake sediments at edmonson point. *The Scientific World Journal*, v. 2013, 2013.

GORMAN, A. M. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 12, n. 6a, p. 2263-2280, 2008.

Guiry, MD & Guiry, GM 2023. AlgaeBase . Publicação eletrônica mundial. National University of Ireland, Galway. Disponível em:< <https://www.algaebase.org>. Acesso em: 28 de abril de 2023.

HARBORNE, A. J. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer science & business media, 1998.

HARTMANN, A. *et al.* Prasiolin, a new UV-sunscreen compound in the terrestrial green macroalga *Prasiola calophylla* (Carmichael ex Greville) Kützinger (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Planta*, v. 243, p. 161-169, 2016.

ILISZ, I. *et al.* Enantioseparations by high-performance liquid chromatography using macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases: an overview. *Chiral Separations: Methods and Protocols*, p. 137-163, 2013.

JACINAVICIUS, F. R. *et al.* Different ecophysiological and structural strategies of toxic and non-toxic *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) strains assessed under culture conditions. *Algal Research*, v. 41, p. 101548, 2019.

JACINAVICIUS, F. R. *et al.* Toxicological effects of cyanobacterial metabolites on zebrafish larval development. *Harmful Algae*, v. 125, p. 102430, 2023.

KAEBERNICK, M. and NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS microbiology ecology*, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2001.

KAGEYAMA, H. and WADITEE-SIRISATTHA, R. Antioxidative, anti-inflammatory, and anti-aging properties of mycosporine-like amino acids: Molecular and cellular mechanisms in the protection of skin-aging. *Marine Drugs*, v. 17, n. 4, p. 222, 2019.

KINI, S. *et al.* Algae and cyanobacteria as a source of novel bioactive compounds for biomedical applications. In: *Advances in cyanobacterial biology*. Academic Press, 2020. p. 173-194.

KOMÁREK, J. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*, v. 51, n. 3, p. 346-353, 2016.

LA BARRE, S. and KORNPROBST, Jean-Michel (Ed.). **Outstanding marine molecules: chemistry, biology, analysis**. John Wiley & Sons, 2014.

LALEGERIE, F.; STIGER-POUVREAU, V. and CONNAN, S. Temporal variation in pigment and mycosporine-like amino acid composition of the red macroalga *Palmaria palmata* from Brittany (France): Hypothesis on the MAA biosynthesis pathway under high irradiance. *Journal of Applied Phycology*, v. 32, p. 2641-2656, 2020.

LAWRENCE, K. P. *et al.* Molecular photoprotection of human keratinocytes in vitro by the naturally occurring mycosporine-like amino acid palythine. *British Journal of Dermatology*, v. 178, n. 6, p. 1353-1363, 2018b.

LAWRENCE, K. P.; LONG, P. F. and YOUNG, A. R. Mycosporine-like amino acids for skin photoprotection. *Current Medicinal Chemistry*, v. 25, n. 40, p. 5512-5527, 2018a.

LOURENÇO, T. C. *et al.* 2010; Fases estacionárias quírais para cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2155-2164, 2010.

MCGLEENON, B. M.; DYNAN, K. B. and PASSMORE, A. P. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *British journal of clinical pharmacology*, v. 48, n. 4, p. 471, 1999.

MI, Yue *et al.* New peptides isolated from marine cyanobacteria, an overview over the past decade. *Marine drugs*, v. 15, n. 5, p. 132, 2017.

MIAN, P. *et al.* Biological screening of terrestrial and freshwater cyanobacteria for antimicrobial activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical biology*, v. 41, n. 4, p. 243-247, 2003.

MORONE, J. *et al.* Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals—A new bioactive approach. *Algal Research*, v. 41, p. 101541, 2019.

NEWMAN, S. J. *et al.* Antarctic krill (*Euphausia superba*) acquire a UV-absorbing mycosporine-like amino acid from dietary algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 255, n. 1, p. 93-110, 2000.

NOWRUZI, B. *et al.* Plant-cyanobacteria interactions: Beneficial and harmful effects of cyanobacterial bioactive compounds on soil-plant systems and subsequent risk to animal and human health. *Phytochemistry*, v. 192, p. 112959, 2021.

NOWRUZI, B.; SARVARI, G. and BLANCO, S. Applications of cyanobacteria in biomedicine. In: Handbook of Algal Science, Technology and Medicine. Academic Press, 2020b. p. 441-453.

NOWRUZI, B.; SARVARI, G. and BLANCO, S. The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. *Algal Research*, v. 49, p. 101959, 2020a.

OREN, A. and GUNDE-CIMERMAN, N. Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS microbiology letters*, v. 269, n. 1, p. 1-10, 2007.

PARAILLOUX, M. *et al.* Untargeted analysis for mycosporines and mycosporine-like amino acids by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—electrospray orbitrap MS2/MS3. *Antioxidants*, v. 9, n. 12, p. 1185, 2020.

Park, K. Genetic Changes. *NIH. Bone*. V. 23, 1–7, 2014

PATHAK, J. *et al.* Cyanobacterial extracellular polysaccharide sheath pigment, scytonemin: A novel multipurpose pharmacophore. In: *Marine Glycobiology*. CRC Press, p. 343-358, 2016.

PATHAK, J. *et al.* Cyanobacterial secondary metabolite scytonemin: a potential photoprotective and pharmaceutical compound. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, v. 90, p. 467-481, 2020.

PLAAS, H. E. and PAERL, H. W. Toxic cyanobacteria: a growing threat to water and air quality. *Environmental science & technology*, v. 55, n. 1, p. 44-64, 2020.

PUBCHEM. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine, 2013. Disponível em: <pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>. Acesso em: 08 maio de 2023.

RAJA, R. *et al.* Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. *Critical reviews in microbiology*, v. 42, n. 3, p. 394-405, 2016.

RASTOGI, R. P. *et al.* Characterization and antioxidant functions of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc* sp. R76DM. *Algal Research*, v. 16, p. 110-118, 2016.

RASTOGI, R. P. *et al.* Photoprotective compounds from marine organisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 37, n. 6, p. 537-558, 2010.

RASTOGI, R. P. and INCHAROENSAKDI, A. Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU2555. *FEMS microbiology ecology*, v. 87, n. 1, p. 244-256, 2014.

RASTOGI, R. P. and SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology advances*, v. 27, n. 4, p. 521-539, 2009.

RASTOGI, R. P. and MADAMWAR, D. Cyanobacteria synthesize their own UV-sunscreens for photoprotection. *Bioenergetics: Open Access*, v. 5, n. 02, p. 138, 2016.

PATHAK, J. *et al.* Nanobiotechnology of cyanobacterial UV-protective compounds: Innovations and prospects. In: **Food Preservation**. Academic Press, 2017. p. 603-644.

SIMEONOV, A. and MICHAELIAN, K. Properties of cyanobacterial UV-absorbing pigments suggest their evolution was driven by optimizing photon dissipation rather than photoprotection. arXiv preprint arXiv:1702.03588, 2017.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: do produto natural ao medicamento [recurso eletrônico] / Simões Oliveira e Organizadores, – Porto Alegre: Artmed. E PUB. 848, 2017.

SVIRČEV, Z. *et al.* Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. **Archives of toxicology**, v. 93, p. 2429-2481, 2019.

SINGH, R. *et al.* Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: current status and future prospects, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 515. 2017.

SINGH, R. K. *et al.* Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *The Journal of antibiotics*, v. 64, n. 6, p. 401-412, 2011.

SINGH, S. P. *et al.* Genome mining of mycosporine-like amino acid (MAA) synthesizing and non-synthesizing cyanobacteria: A bioinformatics study. *Genomics*, v. 95, n. 2, p. 120-128, 2010a.

SINGH, S. P. *et al.* Photoprotective and biotechnological potentials of cyanobacterial sheath pigment, scytonemin. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 5, 2010b.

SINHA, R. P.; SINGH, S. P. and HÄDER, Donat-P. Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 89, n. 1, p. 29-35, 2007.

SOARES, A. R. *et al.* Cariebowlinol, an antimicrobial tetrahydroquinolinol from an assemblage of marine cyanobacteria containing a novel taxon. *Journal of natural products*, v. 78, n. 3, p. 534-538, 2015.

STILL, W. C.; KAHN, M. and MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 43, n. 14, p. 2923-2925, 1978.

GANTAR, M. and SVIRČEV, Z. Microalgas e cianobactérias: alimento para reflexão 1. **Journal of phycology**, v. 44, n. 2, pág. 260-268, 2008.

TAN, L. T. Pharmaceutical agents from filamentous marine cyanobacteria. *Drug discovery today*, v. 18, n. 17-18, p. 863-871, 2013.

TAO, Y. *et al.* Samholides, swinholide-related metabolites from a marine cyanobacterium cf. *Phormidium* sp. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 83, n. 6, p. 3034-3046, 2018. TORRES *et al.* 2018;

VAN APELDOORN, M. E. *et al.* Toxins of cyanobacteria. *Molecular nutrition & food research*, v. 51, n. 1, p. 7-60, 2007.

VEGA, J. *et al.* Cyanobacteria and red macroalgae as potential sources of antioxidants and UV radiation-absorbing compounds for cosmeceutical applications. *Marine drugs*, v. 18, n. 12, p. 659, 2020.

VEGA, J. *et al.* Cyanobacteria and red macroalgae as potential sources of antioxidants and UV radiation-absorbing compounds for cosmeceutical applications. *Marine drugs*, v. 18, n. 12, p. 659, 2020.

VEGA, J. *et al.* Mycosporine-like amino acids from red macroalgae: UV-photoprotectors with potential cosmeceutical applications. *Applied Sciences*, v. 11, n. 11, p. 5112, 2021.

VEGA, J. *et al.* Mycosporine-like amino acids from red macroalgae: UV-photoprotectors with potential cosmeceutical applications. *Applied Sciences*, v. 11, n. 11, p. 5112, 2021.

SAKAMOTO, T. *et al.* Four chemotypes of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* characterized by differences in the mycosporine-like amino acids. *Phycological Research*, v. 67, n. 1, p. 3-11, 2019.

WADA, N. *et al.* Mycosporine-like amino acids and their derivatives as natural antioxidants. *Antioxidants*, v. 4, n. 3, p. 603-646, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Os volumes obtidos com a aplicação da CC-flash variaram de 0,002 g (com a fração 06) a 0,473 g (com a fração 04) e estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela de rendimento das frações do extrato aquoso..

Frações de <i>C. salinus</i>	Massa (g)	Rendimento (%)
CSEa*	171,0 mL	14,83
01	0,017	0,068
02	0,105	0,418
03	0,424	1,697
04	0,473	1,890
05	0,380	1,521
06	0,002	0,007
07	0,171	0,682
08	0,107	0,427
09	0,053	0,212
10	0,255	1,019

*CSEa utilizado em estado líquido para evitar degradação dos compostos devido às dificuldades para secagem do material.

APÊNDICE 2

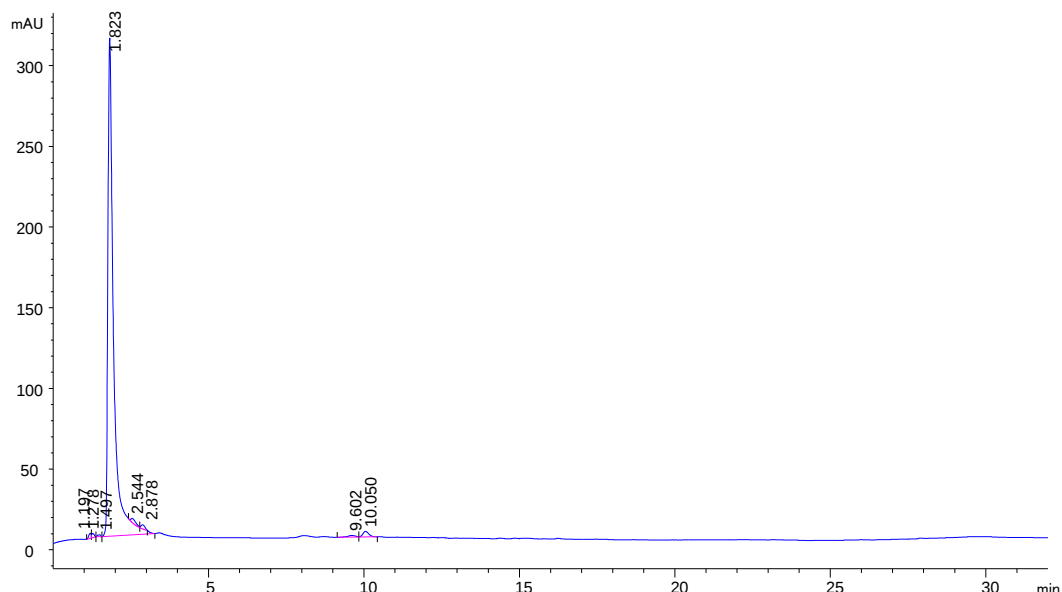


Figura: Cromatograma da fração 04 extraído da análise por CLAE-DAD em fase reversa com coluna C18 usado como padrão para nas tentativas de separações dos analitos. A presença de um único e expressivo pico retido no início da corrida (entre 1,6 min e 3 min) confirma o comportamento altamente polar dos compostos.

As eluições usaram como fases móveis H₂O ultrapura com 0,1% de ácido acético (CH₃COOH) em A e 100% de MeOH em B, com gradiente de eluição iniciado em 90% de A e 10% de B, reduzindo gradativamente a concentração de A até atingir 100% de B que foi mantida por mais 3 min, aumentando a concentração de A para 70% e mantendo até o fim dos 32 min de corrida (CARRETO *et al.* 2005; CARRETO e CARIGNAN 2011, com adaptações). O gradiente de eluição está disposto na tabela abaixo:

Tabela de eluição do método de monitoramento das frações do CSEa por CLAE-DAD usando como eluentes as fases móveis H₂O ultrapura com 0,1% de ácido acético em A e 100% de MeOH em B.

Tempo (min)	Fases Móveis		Vol. Injeção (μL)
	A (%)	B (%)	
0	90	10	20
5	70	30	20
15	50	50	20
20	30	70	20
25	0	100	20
28	0	100	20
30	70	30	20
32	70	30	20

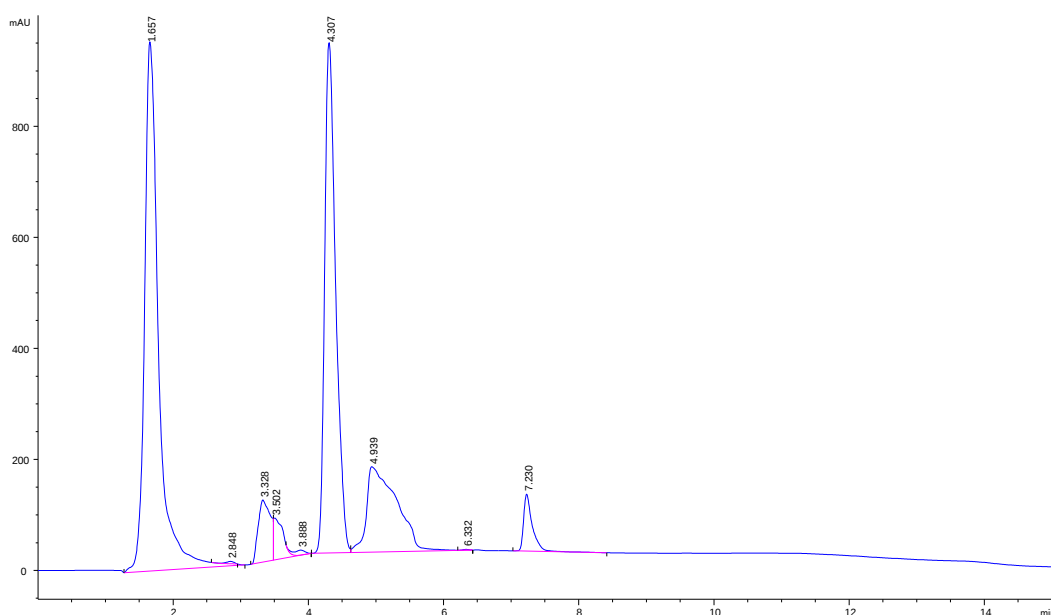


Figura: Cromatograma da fração 04 extraído da análise por CLAE-DAD em fase reversa com coluna C18, como tentativa separação dos analitos. A eluição usando água e acetonitrila permitiu maior grau de separação observadas pelos diferentes tempos de retenção, com dois picos mais expressivos em 1,8 min e 4,2 min, respectivamente.

As eluições usaram como fases móveis $\text{H}_2\text{O}_{\text{ultrapura}}$ em **A** e 100% acetonitrila (ACN) em **B**. O gradiente de eluição iniciou com 100% de B mantidos pelos primeiros 5 min e 80% de B em 10 min com tempo total de corrida de 15 min. As corridas tiveram os tempos reduzidos 15 min totais devido ao alto grau de polaridade apresentado pelos compostos retidos em tempo inferior a 5 min e o gradiente de eluição está disposto na tabela abaixo:

Tabela mostrando as condições de eluição usando as fases móveis $\text{H}_2\text{O}_{\text{ultrapura}}$ (A) e acetonitrila (B) aplicado a fração 04 do CSEa na análise por CLAE-DAD analítica.

Tempo (min)	Fases Móveis		Vol. Injeção (μL)
	A (%)	B (%)	
0	0	100	20
5	0	100	20
10	20	80	20
15	20	80	20

APÊNDICE 3

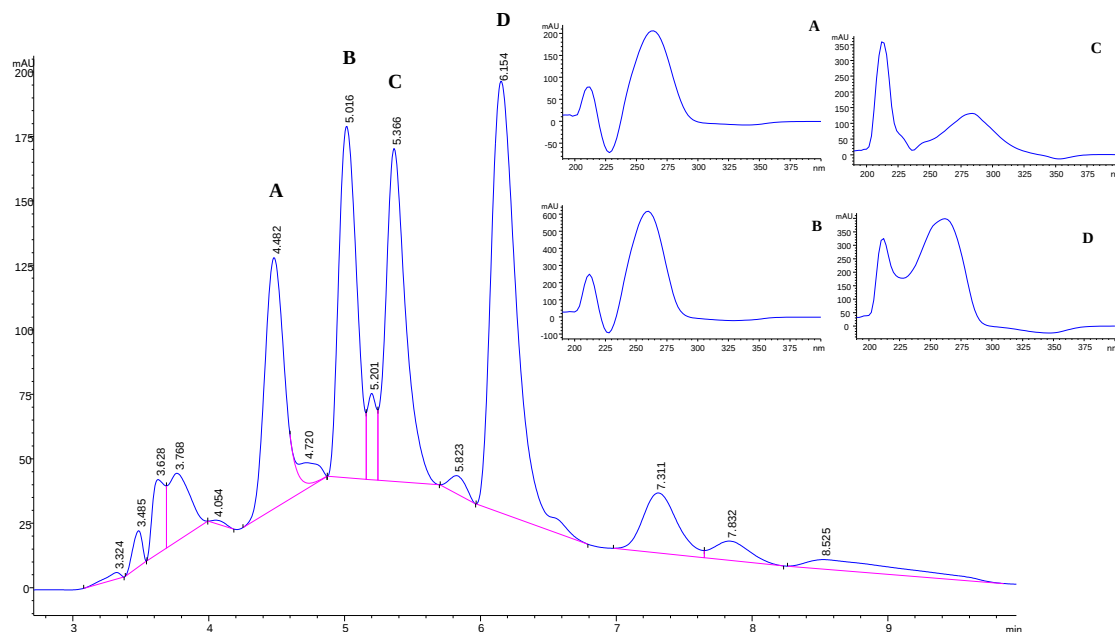


Figura: Cromatograma e espectros de UV-Vis da fração 04: cromatograma extraído das análises por CLAE-DAD em fase estacionária quiral apresentando boa separação com quatro picos expressivos identificados como compostos A, B, C e D; os espectros de UV-vis apresentam λ_{max} entre 210 nm e 280 nm.

A eluição seguiu a indicação do guia de instruções da Agilent Technologies Inc. (2020), em modo *orgânico polar* (isocrático) e usou o solvente MeOH (100%) como fase móvel. O gradiente de eluição está disposto na tabela abaixo:

Tabela mostrando o padrão de eluição em modo orgânico polar usando como fase móvel MeOH, com taxa de fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e temperatura de 27 C.

Corrida	Tempo (min)	Fase Móvel	Vol. Injeção (μL)
1	10	MeOH	20

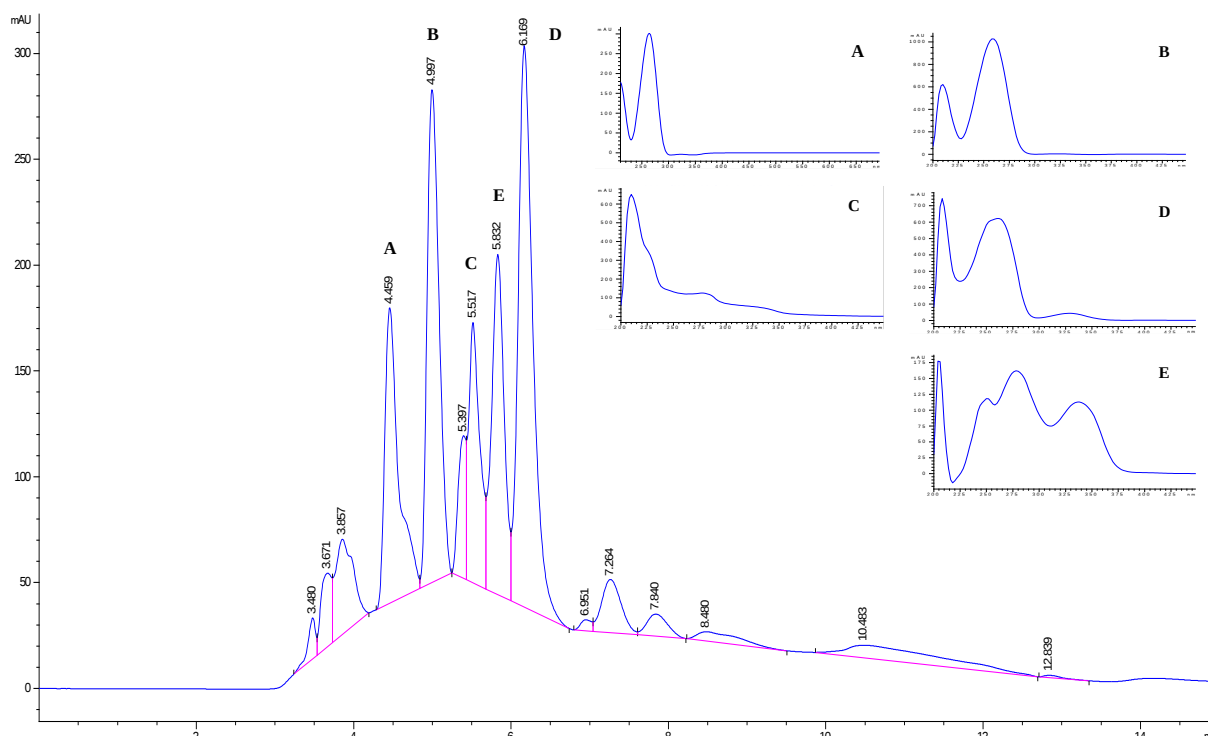


Figura: Cromatograma e espectros de UV-Vis da fração 04: cromatograma extraído das análises por CLAE-DAD em fase estacionária quiral apresentando razoável separação com cinco picos expressivos identificados como compostos A, B, C, D e E, contudo sem boa separação da linha de base. Os espectros de UV-vis apresentaram λ_{max} entre 210 nm e 270 nm, com o composto E apresentando três bandas cromatográficas, com a absorção máxima em 330 nm.

As eluições foram feitas em modo *iônico polar* e usou as fases móveis MeOH modificado (0,2% de CH_3COOH) em **A** e MeOH modificado (0,05% NH_4OH) em **B** executadas em gradiente de eluição crescente, variando de 0% a 100% de **A** na corrida 1, e decrescente iniciado em 100% até atingir 0% **A** na corrida 2. As corridas tiveram o tempo máximo de 15 min e foram executadas com taxa de fluxo de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e a temperatura fixada em 27°C . O gradiente de eluição está disposto na tabela abaixo:

Tabela mostrando as condições de eluição das corridas 1 e 2 usando como fases móveis MeOH modificado (0,2% de CH_3COOH) em A e MeOH modificado (0,05% NH_4OH) em B aplicado as frações 01, 02, 03 e 04 do CSEa na análise por CLAE-DAD analítica com fase estacionária quiral.

Corridas	Tempo (min)	Fases Móveis		Vol. Injeção (μL)
		A (%)	B (%)	
1	0	0	100	20
	15	100	0	20
2	0	100	0	20
	15	0	100	20

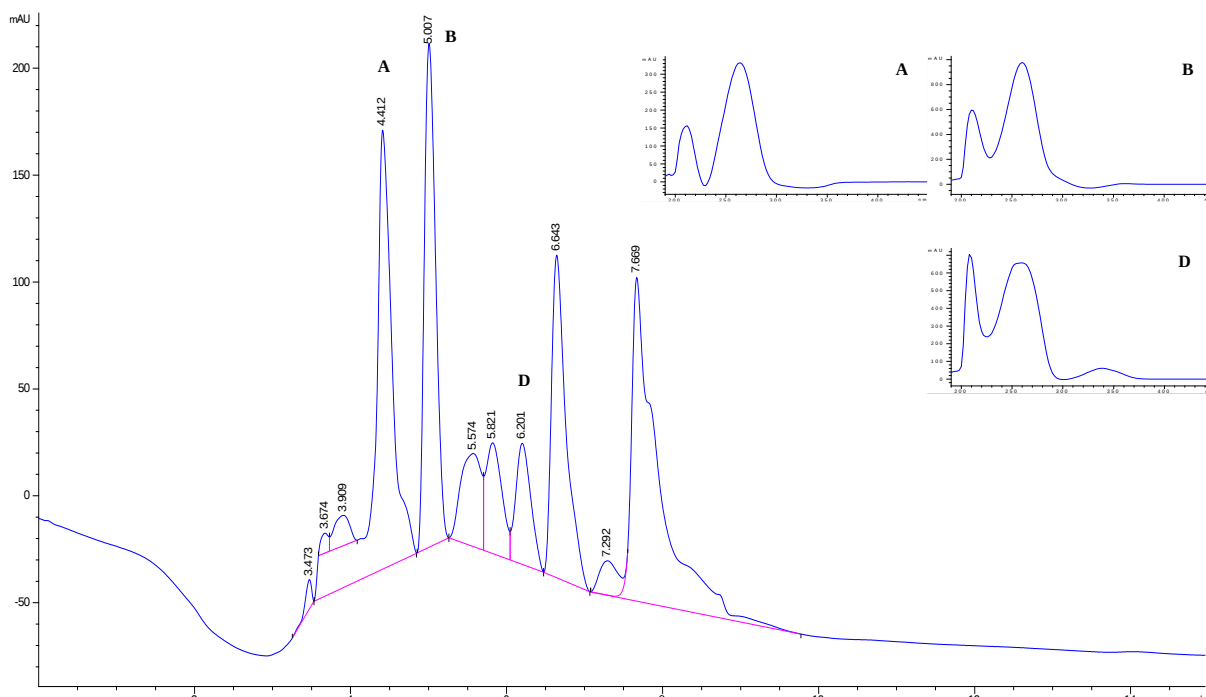


Figura: Cromatograma e espectros de UV-Vis da fração 04: cromatograma extraído das análises por CLAE-DAD em fase estacionária quiral apresentando razoável separação com três picos com melhor definição e separação da linha de base, identificados como compostos A, B e D. Os compostos forte coeluição sem boa separação da linha de base. Os espectros de UV-vis apresentaram λ_{max} entre 210 nm e 270 nm.

As eluições foram feitas em modo iônico polar e as corridas executadas utilizando como eluentes as fases móveis MeOH modificado (0,2% de CH_3COOH) em **A** e MeOH modificado (0,05% de NH_4OH) em **B** que variaram o gradiente de eluição proporcionalmente entre **A** e **B** em modo isocrático. As taxas de fluxo, os volumes de injeção e os tempos das corridas foram mantidos em $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $20 \mu\text{L}$ e 15 min, respectivamente, com temperatura de 27°C . O gradiente de eluição está disposto na tabela abaixo:

Condições de eluição das corridas 1 a 5 usando como fases móveis MeOH modificado (0,2% de CH_3COOH) em A e MeOH modificado (0,05% NH_4OH) em B com variação das proporções entre os eluentes.

Corridas	Tempo (min)	Fases Móveis		Vol. Injeção (μL)
		A (%)	B (%)	
1	15	90	10	20
2	15	70	30	20
3	15	50	50	20
4	15	30	70	20
5	15	10	90	20