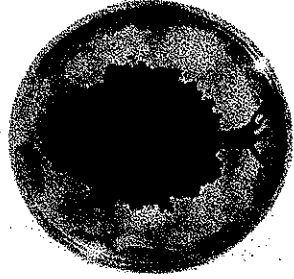


**SIMONE MACIEL DA COSTA**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE EXTRATOS  
HIDROFÍLICOS (METANÓLICOS E AQUOSOS) DE  
ALGUMAS CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS DA ORDEM  
OSCILLATORIALES QUANTO À ATIVIDADE  
BIOLÓGICA**



**CCS/PBV/UFRJ  
RIO DE JANEIRO  
1998**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE EXTRATOS  
HIDROFÍLICOS (METANÓLICOS E AQUOSOS) DE ALGUMAS  
CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS DA ORDEM OSCILLATORIALES  
QUANTO À ATIVIDADE BIOLÓGICA**

**SIMONE MACIEL DA COSTA**

Tese apresentada ao Programa de pós-  
graduação em Biotecnologia Vegetal do  
Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas - área de  
concentração Biotecnologia Vegetal

**ORIENTADORA: Dr.<sup>a</sup> Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo**

**RIO DE JANEIRO  
1998**

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE EXTRATOS  
HIDROFÍLICOS (METANÓLICOS E AQUOSOS) DE ALGUMAS  
CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS DA ORDEM  
OSCILLATORIALES QUANTO À ATIVIDADE BIOLÓGICA

SIMONE MACIEL DA COSTA

Tese submetida ao corpo docente do Programa de pós-graduação em  
Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio  
de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada por:

Prof. \_\_\_\_\_ - Orientador

Dr<sup>a</sup> Sandra Maria F. O. Azevedo

Prof. \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup> Rosalie Reed Rodrigues Coelho

Prof. \_\_\_\_\_

Dr. Ricardo M. Kuster

Prof. \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup> Denise Saraiva Dagnino

RIO DE JANEIRO  
1998

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Costa, Simone Maciel da

Potencial biotecnológico de extratos hidrofílicos (metanólicos e aquosos) de algumas cepas de cianobactérias da ordem Oscillatoriales quanto à atividade biológica / Simone Maciel da Costa. Rio de Janeiro: UFRJ/CCS/PBV, 1998

93p. il.

Tese de mestrado em Ciências Biológicas - área de concentração em Biotecnologia Vegetal - Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, PBV.

1. Potencial Biotecnológico. 2. Metabólito secundário.
3. Cianobactérias. 4. Testes Biológicos. 5. Atividade Biológica. 6. Tese (Mestrado - UFRJ/PBV). I. Título

Aos meus pais Severino e Ivaneide por todo carinho e apoio dedicados nesta longa caminhada.

Ao meu amor Hamilton pelo incentivo e companheirismo compartilhado em todos os momentos desta tese.

## AGRADECIMENTOS

- À Prof. Sandra Azevedo pela orientação, amizade e pelo grande incentivo durante a realização deste trabalho;
- À Coordenação do programa de Biotecnologia Vegetal por toda dedicação ao longo desses anos, sendo representada atualmente pela Prof. Yocie Yoneshigue Valentin que certamente trará enorme contribuição para o curso;
- À Prof. Maria Aparecida Esquibel, chefe do Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBCCF<sup>2</sup>, pela excelente revisão deste trabalho;
- Ao Prof. Alfredo Oliveira Filho, chefe do Laboratório de Biologia do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, pelo uso dos equipamentos e instalações de seu laboratório e à sua equipe: Aline, Bete, Celso, Elza, Cosme, Joaquim e Marli pela ajuda sempre dispensada;
- Ao Prof. Antonio Jorge Ribeiro da Silva, chefe da Central Analítica do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, pela utilização de alguns dos equipamentos;
- Ao Prof. Paulo Roberto Ribeiro Costa, chefe do Laboratório de Síntese Assimétrica do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, pela utilização de alguns dos equipamentos;
- Ao Prof. Allen Norton Hagler, chefe do Laboratório de Coleção de Culturas de Leveduras do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, por ter gentilmente cedido a levedura *Candida albicans*;
- À Prof. Marcia Wigg, chefe do Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas do Departamento de virologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, pela realização dos testes antivirais e citotóxicos;

- À Prof. Rosalie Reed Rodrigues Coelho, chefe do Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, por ceder gentilmente todas as bactérias utilizadas nos antibiogramas e pela contribuição e incentivo dado para que esse trabalho se realizasse, e a sua equipe: Doralice, Luzia, Marta, Rosana;
- Ao Prof. Alvaro Leitão, chefe do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Instituto de Biofísica, por ceder o espaço físico e equipamentos para que se realizassem os antibiogramas (estufa, fluxo laminar) e a seus técnicos: André e Janine pela atenção dispensada;
- Ao Prof. Renato Cordeiro, chefe do Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmacologia da Fiocruz, pela realização dos testes de agregação plaquetária, e a sua equipe: Valber, Socorro e Sabrina;
- Aos amigos do Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas: Aloysio, Ana Claudia, Cláudio, Denise, Elizângela, Juliene, Karine, Marcelo, Patrícia, Raquel, Renato, Sílvia, Suzane e Valéria, pelo incentivo, apoio e paciência durante a realização deste trabalho;
- À minha amiga Ana Claudia pela amizade, incentivo, pelas contribuições valiosas dadas ao longo deste trabalho e pelo apoio nos momentos difíceis;
- À Juliene por toda amizade e ajuda para que este trabalho se realizasse;
- À Patrícia pela identificação taxonômica das cepas;
- À minha irmã Ioneide por todo o incentivo e amizade;
- À CAPES pelo apoio financeiro;
- À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Os metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias são uma fonte excepcional de substâncias biologicamente ativas, incluindo: atividade alelopática, algicida, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antineoplásica, citotóxica, inibidores enzimáticos e inflamatória.

Neste trabalho avaliamos o potencial biotecnológico de extratos polares de algumas cepas de cianobactérias, da ordem Oscillatoriales, isoladas de corpos d'água brasileiros, através de testes biológicos, como: antibiograma; agregação plaquetária e atividade antiviral e citotóxica.

Nos antibiogramas realizados os melhores resultados foram com os extratos MeOH 80% (N) das cepas NPCD-2 (*Limnothrix* sp); NPDF-2 (*Leptolyngbya* sp) e NPBT-1 (*Tychonema* sp) contra a levedura *Candida albicans*. Estes extratos apresentaram perda de atividade com a subcultura dessas cepas em cultivo por longos períodos, provavelmente, devido à diminuição na produção do metabólito bioativo.

Os testes de agregação plaquetária realizados demonstraram que os extratos (N) e (I) das cepas NPFX-1 – *Leptolyngbya* sp (MeOH 20%), NPFE-1 – *Tychonema* sp (MeOH 20%) e NPCD-2 – *Limnothrix* sp (H<sub>2</sub>O) foram capazes de induzir uma agregação plaquetária espontânea, na ausência dos agonistas ADP e PAF, o que sugere a potencial atividade inflamatória destes extratos.

Nos testes antivirais nenhum dos extratos testados apresentaram atividade contra o HSV-1 (vírus *Herpes simplex* tipo 1).

Os testes de citotoxicidade demonstraram que os extratos aquosos das cepas NPRG-1, NPDF-2 e NPFE-3, todas pertencentes ao gênero *Leptolyngbya* sp (*Pseudoanabaenaceae*), podem fornecer valiosas informações para o desenvolvimento de novas drogas anti-câncer.

Os resultados dos testes biológicos confirmaram o potencial dos extratos das cepas de cianobactérias da ordem Oscillatoriales como uma fonte promissora de novos metabólitos bioativos.



## ABSTRACT

Biological activity of secondary metabolites produced by cyanobacteria have been studied due to their importance in biotechnology and/or pharmacology.

These metabolites have a wide spectrum of activity: while: allelopathic, algicidal, antibacterial, antifungal, antineoplastic, cytotoxic, antiviral, enzyme inhibitors and inflammatory.

Biotechnological potential of polar extracts of some strains of cyanobacteria (Oscillatoriales) of Brazilian water bodies were evaluated through the following biological tests: diffusion tests, platelet aggregation, antiviral and citotoxic activity.

In diffusion tests, the better results were with MeOH 80% (N) extracts of the strains NPCD-2 (*Limnothrix* sp), NPDF-2 (*Leptolyngbya* sp) and NPBT-1 (*Tychonema* sp) strains against *Candida albicans*. However the extract lost activity when the strains were subcultured for long periods, probably due to a decreased production of the bioactive metabolite.

In the platelet aggregation tests, the extracts (N) and (I) of NPFX-1 - *Leptolyngbya* sp (MeOH 20%), NPFE-1 - *Tychonema* sp (MeOH 20%) and NPCD-2 - *Limnothrix* sp (H<sub>2</sub>O) strains, were able to induce a natural platelet aggregation in the absence of the agonists ADP and PAF. This result suggests indirectly a potential inflammatory activity of these extracts.

Nevertheless antiviral tests showed no activity against HSV-1 (*Herpes simplex* virus - type 1). Cytotoxic tests showed that the aqueous extracts of NPRG-1, NPDF-2 and NPBE-3 strains, both *Leptolyngbya* sp (Pseudoanabaenaceae) genera, can provide important information to developed new anti cancer drugs.

These results confirm the potential of extracts of cyanobacteria from the order Oscillatoriales as a promising source of new bioactive metabolites and could provide subsidy to future investigations chemicals and biotechnologicals.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADDA - 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienólico
- ADP – “Adenosine diphosphate” - Difosfato de adenosina
- AIDS – “Acquired immune deficiency syndrome” - Síndrome da imunodeficiência humana
- ANOVA - Análise de variância
- Antx-a - Anatoxina-a
- Antx-a(s) - Anatoxina-a(s)
- CMNT - Concentração máxima não tóxica
- CPE – “Cytopathic effect” - Efeito citopatogênico
- EPM - Erro padrão da média
- Hep-2 - Células do tipo epitelíóide de tumor de laringe humana
- HIV-1 – “Human immune deficiency virus - Vírus da imunodeficiência humana
- HSV-1 e HSV-2 – “Herpes simplex virus” - Vírus *Herpes simplex* - tipo 1 e tipo 2
- (I) - Processo de extração invertido
- IIV - Índice de inibição viral
- KB e LoVo - Carcinoma humano
- MCYST – “Microcystin” - Microcistina
- Mdha - N-metil-dehidroalanina
- MeOH - Metanol
- (N) - Processo de extração normal
- NeoSTX - Neosaxitoxina
- P-388 - Leucemia linfocítica
- PA - Percentual de agregação
- PAF – “Platelet active factor” - Fator de ativação de plaquetas
- PI - Percentual de inibição
- PPP – “Platelet poor plasma” - Plasma pobre em plaquetas
- PRP – “Platelet rich plasma” - Plasma rico em plaquetas
- PSP - “Paralytic Shellfish Poisoning” - Veneno paralisante de molusco
- RSV – “Respiratory insufficient virus” - Vírus da insuficiência respiratória
- STX - Saxitoxina
- TCID<sub>50</sub> - Dose de vírus capaz de infectar 50% das culturas de células inoculadas

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Quadro I - Ordem Chroococcales.....	3
Quadro II - Ordem Oscillatoriales.....	4
Quadro III - Ordem Nostocales.....	5
Quadro IV - Ordem Stigonematales.....	6
Tabela I - Produção de biomassa pelas cepas de cianobactérias utilizadas nos testes biológicos.....	45
Tabela II - Diâmetro da zona de inibição (mm) de crescimento dos microorganismos testados com diferentes extratos.....	47
Tabela III- Diâmetro da zona de inibição (mm) de crescimento dos microorganismos no segundo teste com os extratos das cepas NPCD-2, NPPE-1, NPDF-2 e NPBT-1.....	47
Tabela IV - Diâmetro da Zona de Inibição (mm) de alguns antibióticos contra algumas cepas controle.....	47
Tabela V - Efeito dos extratos de cepas de cianobactérias sob a agregação plaquetária.....	52
Tabela VI - Agregação plaquetária do extrato MeOH 20% da cepa NPFX-1.....	55
Tabela VII - Agregação plaquetária do extrato MeOH 20% da cepa NPFE-1.....	62
Tabela VIII - Agregação plaquetária do extrato H <sub>2</sub> O da cepa NPCD-2.....	67
Tabela IX - Testes antivirais realizados com extratos aquosos de cianobactérias.....	70
Figura 1 - Estrutura química da neurotoxina Anatoxina-a e fórmula geral da hepatotoxina Microcistina.....	9
Figura 2 - Estruturas químicas de alguns metabólitos secundários produzidos por algumas cepas de cianobactérias.....	10
Figura 3 - Agregação plaquetária em plasma de rato pelo extrato da cepa NPFX-1 (I) MeOH 20% induzida ou não por ADP.....	56
Figura 4 - Agregação plaquetária em plasma de rato pelo extrato da cepa NPFX-1 (I) MeOH 20% sob várias concentrações, induzida ou não por ADP.....	56
Figura 5 - Agregação plaquetária em plasma de rato pelo extrato da cepa NPFX-1 (N) MeOH 20% induzida por ADP.....	57

	Pág.
<b>Figura 6</b> - Agregação plaquetária em plasma de rato pelo extrato da cepa NPFX-1 (N) MeOH 20% sob várias concentrações, induzida ou não por ADP.....	57
<b>Figura 7</b> - Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPFX-1 (I) MeOH 20% induzida por ADP.....	58
<b>Figura 8</b> - Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPFX-1 (N) MeOH 20% induzida por ADP.....	58
<b>Figura 9</b> - Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPFX-1 (I) MeOH 20% induzida por PAF.....	59
<b>Figura 10</b> - Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPFX-1 (N) MeOH 20% induzida por PAF.....	59
<b>Figura 11</b> - Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPFX-1 (N) MeOH 20% induzida ou não pelo PAF.....	60
<b>Figura 12</b> - Agregação plaquetária em plasma de rato pelo extrato da cepa NPFE-1 (I) MeOH 20% induzida por ADP.....	60
<b>Figura 13</b> - Agregação plaquetária em plasma de rato pelo extrato da cepa NPFX-1 (N) MeOH 20% induzida por ADP.....	63
<b>Figura 14</b> - Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPFE-1 (I) MeOH 20% induzida por PAF.....	64
<b>Figura 15</b> - Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPFE-1 (N) MeOH 20% induzida por PAF.....	64
<b>Figura 16</b> - Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPFE-1 (I) MeOH 20% sob várias concentrações sem PAF.....	65
<b>Figura 17</b> - Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPCD-2 (I) H <sub>2</sub> O induzida ou não por ADP.....	68
<b>Figura 18</b> - Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPCD-2 (I) H <sub>2</sub> O induzida ou não por PAF.....	68

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo I - Meio para bactérias Luria-Bertani - LB.....	89
Anexo II - Meio para <i>Candida albicans</i> – GYP modificado.....	90
Anexo III - Meio Z-8 para cianobactérias.....	91
Anexo IV – Resultado dos testes.....	93

## SUMÁRIO

	Pág.
FICHA CATALOGRÁFICA.....	iv
DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Cianobactérias.....	1
1.2 - Metabólitos secundários.....	7
1.2.1 - Biotoxinas.....	11
1.2.2 - Citotoxinas.....	13
1.3 - Atividade algicida e alelopática.....	13
1.4 - Atividade antibacteriana.....	16
1.5 - Atividade fungicida.....	17
1.6 - Atividade citotóxica e antineoplásica.....	18
1.6.1 – Atividade citotóxica e antineoplásica nas famílias Scytonemataceae e Microchaetaceae.....	19
1.6.2 – Atividade citotóxica e antineoplásica nas famílias Oscillatoriaceae, Nostocaceae e Schizotrichaceae.....	21
1.7 - Atividade antiviral.....	22
1.8 - Inibidores enzimáticos.....	23
1.9 - Atividade inflamatória.....	25
1.10 - Agentes bioativos.....	25
1.11 - Otimização das condições de cultivo.....	26
1.12 - Testes biológicos.....	28

	<b>Pág.</b>
2 - OBJETIVOS.....	30
3 - METODOLOGIA.....	31
3.1 - Isolamento e purificação das cepas.....	31
3.2 - Cepas utilizadas.....	32
3.3 - Condições de cultivo.....	33
3.4 - Determinação da produção celular.....	33
3.5 - Preparação dos extratos.....	33
3.5.1 - Extração.....	34
3.5.2 Fracionamento dos extratos.....	34
3.6 - Testes biológicos.....	35
3.6.1 - Antibiograma.....	35
3.6.1.1 - Impregnação dos discos.....	35
3.6.1.2 - Realização dos testes.....	36
3.6.2 - Atividade Inflamatória.....	36
3.6.2.1 - Coleta de sangue para obtenção de plasma.....	37
3.6.2.2 - Contagem das plaquetas.....	37
3.6.2.3 - Agregação plaquetária.....	38
3.6.2.4 - Efeito dos extratos sob a agregação plaquetária.....	38
3.6.2.5 - Análise estatística.....	39
3.6.3 - Atividade antiviral.....	39
3.6.3.1 - Teste de citotoxicidade.....	40
3.6.3.1.1 - Sistema hospedeiro.....	40
3.6.3.1.2 - Preparo das culturas de células.....	40
3.6.3.1.3 - Toxicidade dos extratos.....	41
3.6.3.2 - Avaliação da ação antiviral.....	41
3.6.3.2.1 - Amostra de vírus.....	41
3.6.3.2.2 - Preparo do estoque de vírus e titulação.....	41
3.6.3.2.3 - Redução do título viral frente aos extratos brutos.....	42

	<b>Pág.</b>
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 - Obtenção de biomassa.....	44
4.2 - Antibiograma.....	46
4.3 - Atividade inflamatória.....	50
4.3.1 - Teste de agregação plaquetária.....	53
4.3.1.1 - Cepa NPFX-1 MeOH 20%.....	53
4.3.1.2 - Cepa NPFE-1 MeOH 20%.....	61
4.3.1.3 - Cepa NPCD-2 H <sub>2</sub> O.....	66
4.4 - Atividade antiviral e citotóxica.....	69
4.5 - Considerações finais.....	71
5 - CONCLUSÕES.....	73
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
7 - ANEXOS.....	88



## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias ou cianofíceas são microorganismos procariontes fotossintéticos primitivos que tiveram o seu aparecimento na terra há mais de 3 bilhões de anos atrás, com certos gêneros mostrando poucas mudanças morfológicas desde aquele tempo (Schopf, 1994-citado em Hagemann & Jüttner, 1996). Além disso, este grupo de microorganismos preservou propriedades enzimáticas para sintetizar elementos estruturais perdidos durante o desenvolvimento dos vegetais superiores (Hagemann & Jüttner, 1996).

As cianobactérias são amplamente distribuídas em natureza e incluem grande variedade de tipos fisiológicos e morfológicos, podendo ser unicelulares, coloniais ou filamentosas. Algumas espécies coloniais ou filamentosas são envolvidas por uma bainha de mucilagem que elas mesmas produzem. O tamanho varia muito, medindo desde alguns micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) até alguns milímetros (mm) (Bold & Wynne, 1985; Yoo *et al.*, 1995).

Estes organismos possuem pigmentos chamados ficobilinas, que servem como pigmentos acessórios para a clorofila-*a*, única forma de clorofila encontrada nas cianobactérias. Uma classe de ficobilinas, a ficocianina é um pigmento azul que age como pigmento auxiliar durante a fotossíntese, captando a energia luminosa na banda vermelha do espectro visível e transportando-a para a clorofila-*a*. Ao contrário da ficocianina, a clorofila-*a* capta luz na banda azul do espectro visível. A ficocianina, pigmento acessório, confere portanto à cianobactéria uma vantagem ecológica no ambiente aquático, pois ela consegue captar luz em diferentes profundidades na coluna d'água (Brock & Madigan, 1988-citado em Yoo *et al.*, 1995).

Além disso, algumas espécies de cianobactérias possuem vacúolos gasosos que permitem flutuação na superfície d'água, onde a luz está disponível para a fotossíntese. O crescente processo de eutrofização dos ambientes aquáticos em todo o mundo, principalmente nos últimos anos, tem favorecido à formação de um fenômeno conhecido como floração ou "bloom", que é o crescimento intenso das cianobactérias na superfície da coluna d'água. Além da eutrofização, outros fatores que influenciam na

formação dos "blooms" são a alta intensidade luminosa, temperatura da água entre 15 e 30°C, ventos calmos e pH de 6 a 9. Os "blooms" em geral são formados pela predominância de uma determinada espécie, podendo ser tóxica ou não, e podem atingir até 75 cm de espessura na coluna d'água (Carmichael, 1992 e 1994; Azevedo et al., 1994).

As cianobactérias podem apresentar-se sob formas diferenciadas. Assim, algumas espécies produzem heterocistos que são estruturas especializadas para a fixação do nitrogênio atmosférico. Os heterocistos são geralmente maiores do que as células vegetativas, e são comumente encontrados em cianobactérias filamentosas dos gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum* e *Nostoc*.

Outras possuem estruturas de reprodução conhecidas como acinetos, que são células modificadas com reservas nutritivas e espessamento da parede celular, se desenvolvem à partir de uma célula vegetativa e podem resistir a condições adversas no ambiente, permitindo as cianobactérias sobreviverem por muitos anos no sedimento.

Algumas espécies filamentosas possuem estruturas especializadas em reprodução, conhecidas como hormogônios, que são filamentos curtos de células indiferenciadas, formadas pela fragmentação de filamentos completos, dando origem a novos indivíduos (Nichols & Adams, 1982).

Embora as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas deste grupo de microorganismos sejam muito semelhantes às das bactérias, os botânicos consideram as cianobactérias como algas pela presença de clorofila-a e dos fotossistemas I e II encontrado apenas nas algas e vegetais superiores. Além disso, a identificação taxonômica ainda segue a classificação botânica. Segundo classificação de Anagnostidis & Komárek (1985, 1988 e 1990) e Komárek & Anagnostidis (1986 e 1989) as cianobactérias estão divididas em 4 ordens:

1) **Chroococcales** - São organismos unicelulares ou coloniais, a reprodução é por divisão celular simples, fissão binária e podem formar excistos e nanocistos. As espécies pertencentes a esta ordem não possuem tricomas, heterocistos ou acinetos (Quadro I).

2) **Oscillatoriales** - São organismos com organização filamentososa, os filamentos (tricomas) podem estar envolvidos ou não por uma bainha mucilagínosa, a divisão celular é perpendicular ao eixo do tricoma e se dá à partir da fragmentação do tricoma

em seções curtas, com estruturas conhecidas como hormocistos ou hormogônios. Não possuem acinetos ou heterocistos (Quadro II).

**3) Nostocales** - São organismos com organização filamentosa uniseriada, os filamentos não são envolvidos por uma bainha mucilaginosa e a divisão celular é perpendicular ao eixo do tricoma. Os heterocistos e acinetos estão presentes (Quadro III).

**4) Stigonematales** - São organismos com organização filamentosa uni ou multiseriada, apresentam obrigatoriamente heterocistos e os filamentos são envolvidos por uma bainha mucilaginosa. A divisão celular pode ocorrer em vários planos (Quadro IV).

A seguir as quatro ordens representante das cianobactérias e alguns exemplos dos principais gêneros de cada família ou subfamília (Quadro I, II, III e IV).

**Quadro I - ORDEM CHROOCOCCALES:**

FAMÍLIA	SUBFAMÍLIA	GÊNERO
1 - Microcystaceae	Aphanotheceoidae	- <i>Aphanothece</i> , <i>Anacystis</i> e <i>Gloeothece</i>
	Synechococcoideae	- <i>Synechococcus</i> , <i>Rhabdoderma</i> e <i>Catella</i>
	Merismopedioideae	- <i>Merismopedia</i> (syn. <i>Agmellum</i> ), <i>Aphanocapsa</i> , <i>Coelosphaerium</i> , <i>Micrococcus</i> e <i>Synechocystis</i>
2 - Chroococcaceae	Microcystoideae	- <i>Microcystis</i> , <i>Eucapsis</i> e <i>Gloeoecapsa</i>
		- <i>Chroococcus</i> , <i>Gloeoecapsopsis</i> e <i>Pseudocapsa</i>
3 - Entophysalidaceae	Entophysalidoideae	- <i>Chlorogloea</i> , <i>Lithocapsa</i> e <i>Paracapsa</i>
	Siphononematoideae	- <i>Siphonema</i>
4 - Chamaesiphonaceae		- <i>Chamaesiphon</i> , <i>Cyanophanon</i> e <i>Clastidium</i>

Quadro II - ORDEM OSCILLATORIALES:

FAMILIA	SUBFAMILIA	GÊNERO
1 - Borziaceae		- <i>Borzia</i> e <i>Komvophoron</i>
2- Pseudoanabaenaceae	Pseudoanabaenoideae	- <i>Pseudoanabaena</i> e <i>Romeria</i>
	Limnotrichoideae	- <i>Limnothrix</i> , <i>Arthronema</i> e <i>Jaaginema</i>
	Leptolyngbyoideae	- <i>Leptolyngbya</i> e <i>Planktolyngbya</i>
3 - Schizotrichaceae		- <i>Schizothrix</i>
4 - Phormidiaceae	Phormidioideae	- <i>Phormidium</i> , <i>Tychonema</i> , <i>Planktothrix</i> e <i>Trichodesmium</i>
	Microcoleoideae	- <i>Microcoleus</i> , <i>Lyngbyopsis</i> e <i>Hydrocoleum</i>
	Spirulinoideae	- <i>Spirulina</i> e <i>Arthrospira</i>
5 - Oscillatoriaceae	Hormoscolloideae	- <i>Hormoscilla</i> e <i>Katagnymene</i>
	Starrioideae	- <i>Starria</i> e <i>Gomontiella</i>
	Oscillatorioidaeae	- <i>Oscillatoria</i> , <i>Lyngbya</i> e <i>Blennothrix</i>
	Plectonematoideae	- <i>Plectonema</i>
	Ammatoideoideae	- <i>Ammatoidea</i> e <i>Pseudoscytonema</i>
6 - Homoeotrichaceae	Homoeotrichoideae	- <i>Homoeothrix</i> e <i>Heteroleibleinia</i>

Quadro III - ORDEM NOSTOCALES:

FAMÍLIA	SUBFAMÍLIA	GÊNERO
1 - Scytonemataceae		- <i>Scytonema</i> , <i>Scytonematopsis</i> e <i>Kyrtuthrix</i>
	Tolypotrichoideae	- <i>Tolypotrix</i> , <i>Coleodesmium</i> , <i>Coelodesmiumopsis</i> e <i>Hassallia</i>
3 - Rivulariaceae	Microchaetoideae	- <i>Microchaeta</i> , <i>Fortiea</i> e <i>Camptylonemopsis</i>
		- <i>Rivularia</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Gloeotrichia</i> e <i>Dichothrix</i>
4 - Nostocaceae	Anabaenoideae	- <i>Anabaena</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Aphanizomenon</i> e <i>Cylindrospermopsis</i>
	Nostocoidaeae	- <i>Nostoc</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Hormothamnion</i> e <i>Aulosira</i>

Quadro IV - ORDEM STIGONEMATALES:

FAMÍLIA	SUBFAMÍLIA	GÊNERO
1 - Chlorogloeopsaceae		- <i>Chlorogloeopsis</i>
2 - Capsosiraceae		- <i>Capsosira</i> , <i>Desmosiphon</i> , <i>Stauratomatonema</i> e <i>Hyphomorpha</i>
3 - Stigonemataceae		- <i>Stigonema</i> , <i>Pulvinularia</i> e <i>Homoeoptycha</i>
4 - Fischerellaceae		- <i>Fischerella</i> , <i>Doliocatella</i> , <i>Leptopogon</i> e <i>Westiellopsis</i>
5 - Borzinemataceae		- <i>Borzinema</i> , <i>Handeliella</i> , <i>Spelaeopogon</i> e <i>Schmidleinema</i>
6 - Loriellaceae		- <i>Loriella</i> , <i>Colteronema</i> , <i>Geitleria</i> e <i>Matteia</i>
7 - Nostochopsaceae		- <i>Nostochopsis</i> e <i>Mastigocoleus</i>
8 - Mastigocladaceae	Mastigocladoideae	- <i>Mastigocladus</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Westiella</i> e <i>Adrianema</i>
	Brachytrichioideae	- <i>Brachytrichia</i> , <i>Lyngariella</i> e <i>Herpyzonema</i>

## 1.2 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As cianobactérias têm sido estudadas principalmente por sua morfologia como organismos procariontes, seu mecanismo fotossintético e de fixação de nitrogênio, além de certos aspectos estruturais e genéticos (Packer & Glazer, 1988-citado em Carmichael, 1992). No entanto, somente nos últimos anos os seus metabólitos secundários vêm sendo estudados devido à sua importância biotecnológica e/ou farmacológica (Patterson *et al.*, 1991).

O termo metabólito secundário, refere-se àqueles compostos que não são usados pelo organismo para seu metabolismo primário (divisão celular, respiração, fotossíntese), e incluem compostos que agem como hormônios, antibióticos, aleloquímicos e toxinas (Carmichael, 1992). Muitos apresentam propriedades farmacológicas importantes (ex: antibióticos). No entanto, pouco se sabe sobre a sua função nos organismos produtores (Gleason & Wood, 1987). Alguns pesquisadores consideram os metabólitos como produtos residuais. No entanto, muitos destes compostos são muito complexos e metabolicamente dispendiosos, para serem considerados produtos residuais (Muller, 1969; Seigler & Price, 1976-citados em Gleason & Wood, 1987).

Alguns metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias são substâncias alelopáticas, que são compostos produzidos por um organismo para inibir o crescimento e o desenvolvimento de espécies competidoras (Gleason & Wood, 1987). Por este motivo os metabólitos secundários das cianobactérias parecem ter uma função ecológica importante (Patterson & Bolis, 1997).

Os microorganismos têm provado, historicamente, ser uma fonte excepcional de metabólitos secundários biologicamente ativos. Estes metabólitos têm sido importantes para conduzir a novos compostos farmacêuticos e agroquímicos, bem como a novos herbicidas e pesticidas (Patterson *et al.*, 1991).

A maioria dos trabalhos de isolamento, testes e fisiologia dos microorganismos produtores de antibióticos, são relacionados a organismos quimio-heterotróficos (Smith, 1982-citado em Bloor & England, 1989).

Os maiores produtores de metabólitos bioativos são os actinomicetos, sendo o grupo de organismos mais estudado nas últimas décadas. No entanto, por terem sido

extensivamente estudados, a produção de novos compostos vêm se tornando cada vez mais difícil (Bradner, 1980; Ômura, 1992-citados em Patterson *et al.*, 1993 e 1994).

Grandes esforços vêm sendo gastos em programas de descoberta de novas drogas. Entretanto, os riscos de redescoberta de compostos previamente conhecidos têm aumentado. Uma das maiores estratégias, que agora vêm sendo explorada para reduzir a taxa de re-isolamento de novos compostos, é o exame de grupos de microorganismos que tenham sido pouco investigados no passado (Patterson *et al.*, 1991).

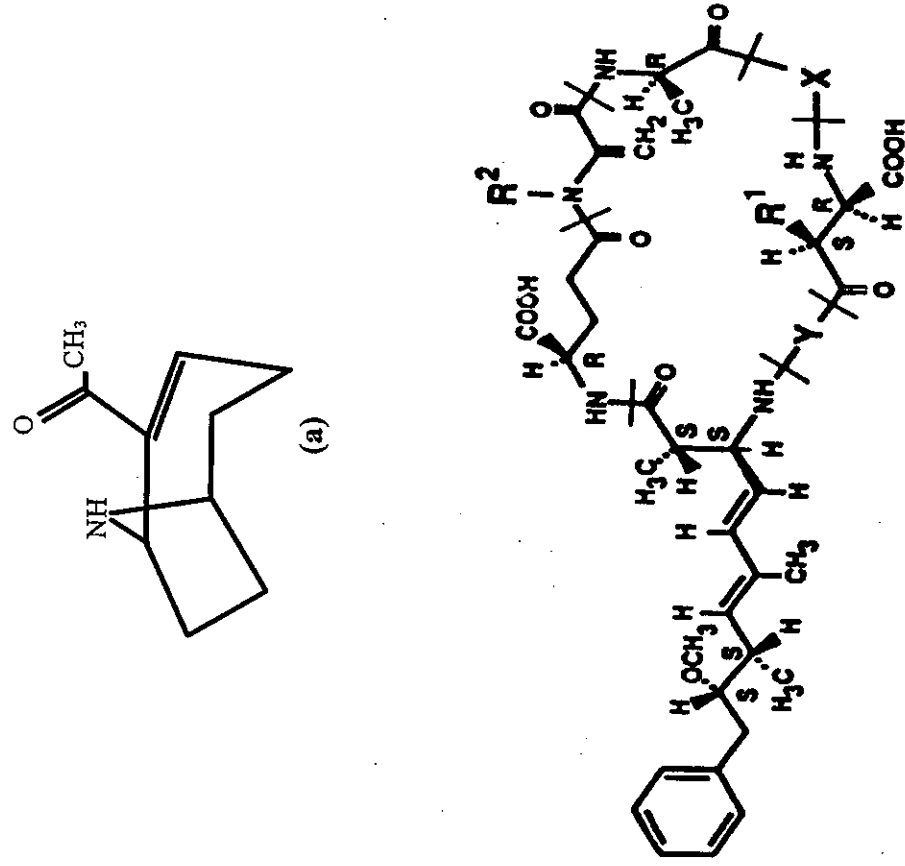
A descoberta de novas fontes de produtos naturais bioativos é de grande importância para assegurar o suplemento de novas drogas necessárias para tratar doenças infecciosas, que vêm se tornando resistentes e para combater novas doenças (Patterson *et al.*, 1994).

Dentro deste contexto, vários pesquisadores têm mostrado o potencial das cianobactérias como fonte de novos compostos biologicamente ativos, alguns dos quais têm uso potencial como agentes terapêuticos e agroquímicos (Rinehart *et al.*, 1981; Bloor & England, 1989; Cano *et al.*, 1990; Glombitza & Koch, 1989-citado em Patterson & Carmeli, 1992; Patterson *et al.*, 1994; Namikoshi & Rinehart, 1996; e Moore, 1996).

A descoberta de novos compostos nas cianobactérias é comparável às mais tradicionais fontes farmacêuticas. Além disso, a taxa de compostos já conhecidos é significativamente baixa quando comparada aos actinomicetos, onde 95% dos compostos ativos confirmados nos testes são conhecidos (Bradner, 1980-citado em Patterson *et al.*, 1991). Por outro lado, podem ser cultivadas com relativa facilidade em laboratório, sob condições diversas de nutrientes, para fornecer uma fonte consistente de metabólitos secundários biologicamente ativos (Patterson *et al.*, 1993).

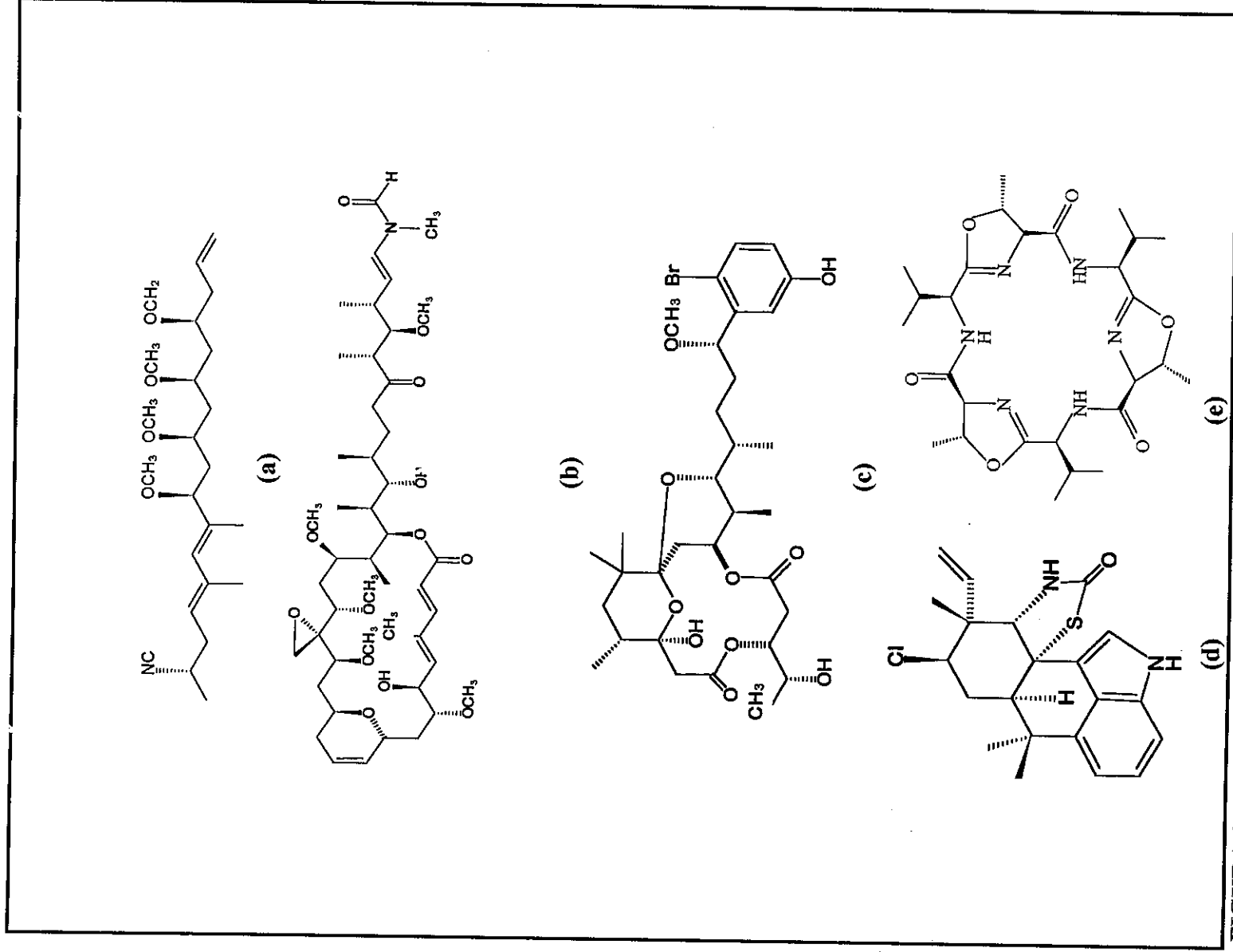
Testes com uma ampla variedade de extratos potencialmente bioativos vêm sendo realizados, e têm levado a descoberta e identificação de numerosos metabólitos bioativos incluindo: acetogeninas, bromofenóis, ácidos graxos, terpenos, esteróis, alcalóides, amidas, oligossacarídeos cíclicos, imidas, isonitrilas, macrolídeos, peptídeos, nucleosídeos e glicosídeos (Gerwick *et al.*, 1989; Patterson *et al.*, 1994). Alguns desses exemplos têm sua estrutura química apresentadas nas figuras 1 e 2.





(b)

**Figura 1** - Estrutura química da neurotoxina Anatoxina-a (a) e fórmula geral da hepatotoxina Microcistina, onde X e Y representam os dois L aminoácidos que podem variar; R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são os locais de possíveis metilações (b). De acordo com Carmichael (1994).



**FIGURA 2** - Estruturas química de alguns metabólitos secundários produzidos por algumas cepas de cianobactérias, (a) Mirabileno isonitrila A, (b) Tolitoxina, (c) Aplysiatoxina, (d) Hapalindol T e (e) Westiellamida.

A liberação desses metabólitos é geralmente considerada contínua, um processo passivo controlado mais pela disponibilidade de nutrientes, taxa fotossintética e condições físicas de crescimento, do que pelas condições bióticas do ambiente (Scott *et al.*, 1981; Keating 1987; Pearl, 1988-citados em Patterson & Boilis, 1997).

Dentre os metabólitos secundários mais bem estudados nas cianobactérias estão as toxinas, que podem ser agrupadas em duas categorias: biotoxinas e citotoxinas.

### 1.2.1 - Biotoxinas

As biotoxinas são substâncias tóxicas para animais invertebrados, aves, peixes e mamíferos, podendo causar sérios danos à saúde pública, uma vez que essas toxinas podem encontrar-se diluídas na água e serem ingeridas por animais ou até mesmo seres humanos.

As toxinas de cianobactérias constituem a maior fonte de produtos naturais no ambiente dulce aquícola, e podem ser encontradas na superfície de águas de reservatórios de abastecimento público (Carmichael, 1992).

O primeiro caso confirmado de intoxicação humana ocorreu em 1996, na cidade de Caruaru-PE, onde mais de 60 pessoas morreram, durante tratamento de hemodiálise em decorrência da água estar contaminada com microcistina, uma hepatotóxina produzida por algumas cepas de cianobactéria (Jochimsen *et al.*, 1998).

As biotoxinas podem ser divididas em duas categorias: neurotoxinas e hepatotoxinas.

#### 1) Neurotoxinas

As neurotoxinas até agora caracterizadas são produzidas pelos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Trichodesmium* (Mahmood & Carmichael 1986a; Sivonen *et al.*, 1989; Carmichael *et al.*, 1990; Hawser *et al.*, 1991; Skulberg *et al.*, 1992-citados em Carmichael, 1992; Carmichael *et al.*, 1997; Lagos *et al.*, 1997).

A primeira neurotoxina identificada, Anatoxina-a (Antx-a), foi isolada de uma cepa de cianobactéria do gênero *Anabaena* (Figura 1a) Trata-se de um alcalóide neurotóxico que age nas ligações sinápticas como potente despolarizador e bloqueador neuromuscular, competindo com os receptores de acetilcolina e levando a uma superestimulação do músculo. Outra neurotoxina produzida por cepas do gênero *Anabaena* e *Aphanizomenon* é a Anatoxina-a(s) - (Antx-a(s)), um organofosforado, que inibe a enzima acetilcolinesterase. Embora a estrutura química e o mecanismo de ação da Anatoxina-a(s) seja diferente da Anatoxina-a, ambas são bloqueadores neuromusculares (Mahmood & Carmichael, 1986b, 1987)

Podemos citar ainda dois alcalóides neurotóxicos: A Saxitoxina (STX) e a Neosaxitoxina (NeoSTX), também produzidos por cepas do gênero *Anabaena* e *Aphanizomenon*, que agem inibindo a condução nervosa através do bloqueio dos canais de sódio, afetando assim o transporte sódio-potássio pela membrana dos axônios, impedindo desta maneira a liberação de acetilcolina e levando à paralisção neuromuscular (Carmichael, 1991; 1992 e 19944). Estas toxinas também ocorrem em espécies de dinoflagelados marinhos causadores de marés vermelhas e são identificadas pela sigla PSP ("Paralytic Shellfish Poisoning" - Veneno paralisante de molusco).

## 2) Hepatotoxinas

As hepatotoxinas são as toxinas mais comuns produzidas pelas cianobactérias, principalmente nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia* e *Coelosphaerium* (Carmichael, 1992; Carmichael & Falconer, 1993).

A primeira hepatotoxina identificada foi a Microcistina (MCYST) isolada da cepa *Microcystis aeruginosa* WR70 (=UV-010) (Figura 1b). Esta toxina é um heptapeptídeo cíclico contendo 5 D e 2 L aminoácidos. Dois dos D aminoácidos são incomuns, o N-metil-dehidroalanina (Mdha) e um aminoácido apolar denominado ADDA (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico) que confere atividade biológica à molécula. A estrutura química das microcistinas varia de acordo com a combinação dos L aminoácidos presentes ou com as metilações e isomerizações

no grupo  $\beta$  metil-aspartato (Botes *et al.*, 1982 a,b,c e Santikarn *et al.*, 1983-citado em Carmichael, 1992).

Outra hepatotoxina com estrutura semelhante a microcistina, é a nodularina (NODLN), um pentapeptídeo cíclico que foi isolado pela primeira vez de uma cepa de cianobactéria filamentosa, *Nodularia spumigena*. Outras espécies também são capazes de produzir esta toxina (Sivonen *et al.*, 1990 e Namikoshi *et al.*, 1990-citados em Carmichael, 1992).

A mais recente hepatotoxina caracterizada foi isolada de uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii*, e denominada cilindrospermopsina. Difere das demais hepatotoxinas por tratar-se de um alcalóide citotóxico, no entanto, apresenta os mesmos sinais clínicos das hepatotoxinas (Harada *et al.*, 1994 e Ohtani *et al.*, 1992-citados em Sivonen, 1996).

Os principais sinais clínicos das hepatotoxicoses em animais de laboratório são: fraqueza, anorexia, vômito, extremidades do corpo frias e pálidas, diarreia e morte ocorrendo de poucas horas a poucos dias após exposição inicial, como resultado de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico (Carmichael, 1992).

### 1.2.2 - Citotoxinas

As citotoxinas não são altamente letais para os animais, mas mostram um amplo espectro de bioatividade contra algas, bactérias, fungos, vírus e linhagens de células de mamíferos (Carmichael, 1992).

A descoberta das citotoxinas está associada às pesquisas para novos compostos farmacêuticos e agroquímicos, incluindo atividade algicida, antibacteriana, antifúngica, antineoplásica, citotóxica, antiviral, inibidora enzimática e inflamatória.

### 1.3 - ATIVIDADE ALGICIDA E ALELOPÁTICA

Testes com metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias contra outros organismos fotoautotróficos (cianobactérias, algas e vegetais superiores) são escassos, embora o conhecimento destes compostos sejam importantes no

desenvolvimento de novos herbicidas degradáveis e para a compreensão de reações alelopáticas nos ecossistemas (Hagmann & Jüttner, 1996).

Várias espécies de cianobactérias exercem um efeito inibitório no crescimento de outras espécies algais e esta interação tem sido atribuída a metabólitos extracelulares como polissacarídeos, compostos nitrogenados ou peptídeos (Flores & Wolk, 1986; Gleason & Wood, 1987; Bagchi *et al.*, 1990; Carmichael *et al.*, 1990).

Extratos das espécies *Scytonema hofmanni* UTEX 2349 (Mason *et al.*, 1982 and Pignatello *et al.*, 1983), *Nostoc linkia* CALU 892 (Gromov *et al.*, 1991), *Oscillatoria late-virens* (Chauhan *et al.*, 1992), *Fischerella* sp (Bagchi & Marwah, 1994) e *Fischerella muscicola* (Hagmann & Jüttner, 1996) têm tido as propriedades químicas e biológicas caracterizadas (Bagchi, 1995). Estas substâncias apresentam como função comum a inibição do transporte fotossintético de elétrons no PS II (Mason *et al.*, 1982; Pignatello *et al.*, 1983; Gleason & Paulson, 1984; Gleason *et al.*, 1986; Bagchi & Marwah, 1994; Bagchi, 1995).

Inibidores do crescimento, como antibióticos e herbicidas, têm papel em natureza como agentes alelopáticos produzidos para inibir o crescimento de espécies competidoras, e fornecer uma vantagem para os organismos produtores (Gleason & Wood, 1987 e Keating, 1977, 1987-citados em Patterson & Bolis, 1997). Como exemplo podemos citar o estudo de uma espécie do gênero *Oscillatoria* de um lago eutrófico, que exibiu um forte efeito inibitório quando cresceu com uma clorofíceia ou com outras cianobactérias, incluindo a espécie *Phormidium* sp que a antecedia na sucessão sazonal das espécies planctônicas daquele ambiente aquático. No entanto, este efeito não foi observado para as bactérias e nem para *Synechococcus* sp, que ocorriam concomitantemente no ambiente natural (Bagchi *et al.*, 1990). Isto faz com que em uma única comunidade, a separação espaço-temporal permita que duas ou mais cianobactérias produtoras de algicidas e sensíveis aos mesmos, co-habitem (Bagchi & Marwah, 1994).

A liberação de metabólitos extracelulares pode ser responsável, entre outros fatores, pela seleção natural de cianobactérias dominantes (Bagchi *et al.*, 1990). Desta forma, compostos alelopáticos são ecologicamente importantes, uma vez que algicidas naturais poderiam ser aplicados no controle de "blooms" tóxicos, como foi proposto por Keating (1977-citado em Chauhan *et al.*, 1992), que verificou a inibição "in vitro"

de um tipo de alga, por uma cultura de cianobactéria, ambas isoladas do mesmo ambiente, onde a primeira espécie antecedia a segunda na sucessão sazonal. Isto pode ser relevante em países que frequentemente apresentam florações de cianobactérias tóxicas, como é o caso do Brasil.

No entanto, poucos esforços têm sido feitos para elucidar o papel destes produtos naturais em condições ambientais (Chauhan *et al.*, 1992). Como exemplo de estudo nesta área podemos citar o trabalho feito por Mason *et al.* (1982) que verificaram que a espécie *Scytonema hofmanni*, uma cianobactéria filamentosa de água doce, produz metabólitos secundários que inibem o crescimento de outras cianobactérias e algas verdes. Este metabólito é um composto aromático clorado e recebeu o nome de cianobacterina.

Compostos halogenados são muito comuns em algas marinhas, principalmente nas rodófitas. No entanto, estes compostos nunca tinham sido encontrados em espécies de água doce. Muitos destes têm propriedades tóxicas ou antibióticas. Toxinas halogenadas têm sido encontradas em cianobactérias marinhas. O isolamento de um antibiótico clorado de uma cianobactéria de água doce confirma que estes organismos têm capacidade metabólica de produzir compostos halogenados (Mason *et al.*, 1982). Uma pesquisa sobre compostos aromáticos halogenados em ecossistemas de água doce, onde as cianobactérias predominam, pode fornecer valiosas informações sobre sucessão de espécies e algicidas naturais (Mason *et al.*, 1982).

A cepa *Nostoc linckia* (CALU 892) também produz cianobacterina LU-1, que inibe o crescimento de muitas cianobactérias e algas eucarióticas. O antibiótico bloqueia a divisão celular e a liberação de O<sub>2</sub> dependente da luz, na espécie *Synechococcus* sp R-2 (PCC 7942) (Gromov *et al.*, 1991). A cianobacterina LU-1 age similarmente a cianobacterina produzida por *Scytonema hofmanni*, apesar da composição química das duas cianobacterinas, mecanismo de ação e os organismos produtores serem diferentes.

A cianobacterina pode ser uma substância alelopática, permitindo que uma espécie com crescimento lento como *Scytonema hofmanni* possa sobreviver na presença de espécies mais aptas (Mason *et al.*, 1982 e Pignatello *et al.*, 1983).

A maioria dos estudos alelopáticos em cianobactérias têm focalizado a produção e liberação de compostos que afetam o crescimento de outras cianobactérias (Patterson & Bolis, 1997).

Testes realizados com 65 cianobactérias filamentosas para a verificação da produção de antibiótico, identificaram 7 cepas fixadoras de N<sub>2</sub> como produtoras de antibióticos muito ativos contra outras cianobactérias. O antibiótico produzido pela cepa *Nostoc* sp (78-11 A-E) representa a primeira bacteriocina de baixo peso molecular produzida por uma cianobactéria. A cepa *Nostoc* sp (ATCC 29132) parece secretar, junto com um antibiótico, uma proteína que inibe sua ação. Isto é característico de um número de bacteriocinas, que têm um baixo espectro de ação e que são secretadas junto com uma proteína que torna a cepa produtora imune ao efeito da bacteriocina. As cepas *Fischerella muscicola* (UTEX 1829) e *Nostoc* sp (31) foram ativas contra quase todas as cepas testadas (Flores & Wolk, 1986).

Várias cianobactérias filamentosas, sob condições naturais e de laboratório, secretam substâncias alelopáticas, antibióticas ou herbicidas que matam outras cepas de cianobactérias, algas verdes e vegetais superiores (Bagchi & Marwah, 1994 e Bagchi, 1995).

#### 1.4 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os registros de atividade biológica de cianobactérias sobre bactérias são escassos. Estudos prévios estabeleceram que cepas da espécie *Nostoc muscorum* produzem substâncias que afetam o crescimento de algumas bactérias como as espécies *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Como exemplo, podemos citar o extrato etílico de uma cepa da espécie *N. muscorum* que mostrou um efeito inibitório de e de 28,77 % no crescimento de *S. aureus*. Os produtos extracelulares testados contra *S. aureus*, por técnica de difusão em ágar (antibiograma), exibiram promoção ou inibição do crescimento, dependendo das condições experimentais. Um outro exemplo são os compostos fenólicos encontrados no extrato metanólico de uma cepa da espécie *N. muscorum*, que inibiu o crescimento de *S. aureus* em 88,2 % (Canell *et al.*, 1988 e Cano *et al.*, 1986 e 1990).

Um amplo espectro antimicrobiano também foi produzido por extratos de outra cepa da espécie *N. muscorum*, o qual inibe o crescimento de bactérias, fungos e leveduras. A atividade inibitória foi encontrada tanto para bactérias Gram positivas e Gram negativas, quanto para organismos eucarióticos (Bloor & England, 1989). Estes



antibióticos ativos são importantes tanto na perspectiva de pesquisas com cianobactérias quanto comercialmente.

### 1.5 - ATIVIDADE FUNGICIDA

Há poucas referências no que diz respeito a substâncias antifúngicas produzidas por cianobactérias (Caire *et al.*, 1987).

Um dos primeiros registros de atividade antifúngica em cianobactéria foi verificado por uma espécie marinha filamentosa *Lyngbya majuscula* (Welch, 1962).

Esta espécie, juntamente com mais duas espécies de água doce, *Spirulina maxima* e *Rivularia haematitis*, apresentaram atividade inibitória contra diferentes fungos patogênicos (Accorinti, 1983-citado em Caire *et al.*, 1987).

Diferentes extratos e produtos celulares no meio de cultura de *Nostoc muscorum*, produzem um efeito inibitório no crescimento de fungos patogênicos como: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Candida albicans* e *Cunninghamella blakesleana* (Caire *et al.*, 1987 e 1990; Cano *et al.*, 1986 e 1990 e Mulé *et al.*, 1991).

Stewart *et al.*, (1988) descobriram nucleosídeos fungicidas em outras Nostocales. O efeito destas substâncias na espécie *C. albicans* é similar àquele produzido por compostos fenólicos de *Nostoc muscorum* na mesma espécie (Cano *et al.*, 1989-citado em Caire *et al.*, 1990).

Alguns compostos produzidos por outras espécies de cianobactérias também apresentam atividade antifúngica, tais como:

- O hapalindol-A é um novo alcalóide indólico contendo cloro e isonitrila, e é responsável pela maioria das atividades antibacterianas e antifúngicas associadas à cianobactéria *Hapalosiphon fontinalis*. Vários outros indóis ativos são encontrados em menor quantidade nas cianobactérias pertencentes a esta espécie, como os Hapalindóis B, C-Q e T-V (Moore *et al.*, 1984 e 1987).

- Os tjiapanazoles são glicosídeos isolados de uma cepa da espécie *Tolyptothrix tjiapanasensis* e exibem atividade fungicida contra vários fungos fitopatogênicos e fraca citotoxicidade para vários tipos de células cancerosas (Bonjouklian *et al.*, 1991-citado em Patterson *et al.*, 1994).

- A caloficina, que é um decapeptídeo cíclico, isolado de uma cepa da espécie *Calothrix fusca*, também exibe um amplo espectro antifúngico (Moon *et al.*, 1992-citado em Moore, 1996).

- As laxaficinas são peptídeos cíclicos responsáveis pela atividade antifúngica e citotóxica do extrato etanólico de uma cepa da espécie *Anabaena laxa*. Em cultivo, estes compostos exibem um sinergismo biológico incomum quando testados como agentes antifúngicos e citotóxicos. Quando as frações dos mesmos foram testadas individualmente a atividade parecia estar perdida ou bastante diminuída, no entanto, quando as mesmas foram recombinadas a atividade biológica foi recuperada (Frankmölle *et al.*, 1992a,b). Normalmente o efeito sinérgico parece resultar da combinação de drogas que exercem seus efeitos através de diferentes mecanismos de ação, com um facilitando a ação do outro (Medoff *et al.*, 1971-citado em Frankmölle *et al.*, 1992a,b). No entanto, com as laxaficinas A e B o mecanismo de ação parece ser o mesmo (Frankmölle *et al.*, 1992a,b).

- A tolitoxina, que é um potente agente fungicida e citotóxico, parece ter um papel ecológico como agente químico de defesa (fitoalexina) capaz de proteger *Scytonema ocellatum* contra invasão por fungos. Este papel ecológico faz com que as cianobactérias sejam capazes de responder a mudanças ambientais, através do acúmulo de um composto seletivamente tóxico contra um organismo invasor (Patterson & Bolis, 1997).

#### 1.6 - ATIVIDADE CITOTÓXICA OU ANTINEOPLÁSICA

Os registros de atividade biológica associada com as cianobactérias, levaram vários pesquisadores a examinar extratos de cianobactérias, coletadas no ambiente natural, para atividade antineoplásica e/ou citotóxica (Rinehart *et al.*, 1981; Norton & Wells, 1982; Patterson *et al.*, 1984).

Citotoxicidade indica a inibição da proliferação de células cancerosas "in vitro", enquanto que o termo antineoplásico indica a atividade "in vivo" em sistemas de modelos animais (Patterson *et al.*, 1994).

O reconhecimento das cianobactérias como uma fonte promissora de produtos naturais anticancer levou o Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos a iniciar

um programa de testes com estes organismos. Cepas de cianobactérias isoladas de ambientes terrestres, de água doce e marinhos foram cultivadas e seus extratos hidrofílicos e lipofílicos foram testados para atividades citotóxicas e antineoplásicas. As famílias Scytonemataceae e Stygonemataceae foram identificadas como produtoras de novos compostos citotóxicos. A taxa de compostos bioativos já conhecidos foi relativamente baixa; das 15 cepas examinadas, em detalhe, foram encontrados novos compostos em 12 delas (80%) (Stewart *et al.*, 1988 e Patterson *et al.*, 1991).

#### 1.6.1 - Atividade citotóxica ou antineoplásica nas famílias Scytonemataceae e Microchaetaceae:

Duas principais classes de compostos foram isolados, e são responsáveis pela atividade citotóxica nas famílias Scytonemataceae e Microchaetaceae: são os macrolídeos e os nucleosídeos.

##### 1) Macrolídeos

Os macrolídeos são lactonas macrocíclicas produzidas por espécies de cianobactérias pertencentes aos gêneros *Tolypothrix* (Microchaetaceae) e *Scytonema* (Scytonemataceae) (Patterson & Carmeli, 1992 e Patterson *et al.*, 1994), uma única exceção, foi encontrada na cepa *Cylindrospermum* sp (Nostocaceae) (Jung *et al.*, 1991-citado em Patterson *et al.*, 1994).

Um exemplo de macrolídeo é a scitoficina, que foi isolada pela primeira vez em uma cepa da espécie *Tolypothrix conglutinata* var. *colorata* (Moore, 1981-citado em Stewart *et al.*, 1988).

As scitoficinas A-E, são responsáveis pela atividade citotóxica das cepas *Scytonema pseudohofmanni* (BC-1-2; ATCC53141). Trata-se dos primeiros compostos desta classe de macrolídeos a serem completamente caracterizados (Moore *et al.*, 1986 e Ishibashi *et al.*, 1986).

A tolitoxina faz parte do grupo das scitoficinas e é a maior citotoxina associada com atividade citotóxica em *S. mirabile* (BY-8-1), *S. burmanicum* (DO-4-1) e *S. ocellatum* (DD-8-1, FF-65-1, FF-66-3). Menores quantidades de 3 novas scitoficinas

citotóxicas também foram isoladas destas 3 cianobactérias, sendo que a estrutura total foi determinada por Carmeli *et al.*, (1990). A tolitoxina apresenta atividade contra linhagens de células mamíferas como: P-388 (Leucemia linfocítica) e KB (Adenocarcinoma epidermóide de nasofaringe humano) sendo suas concentrações tempo-dose dependentes. É um potente antifúngico em doses extremamente baixas, além de ser tóxica para camundongos, não apresentando nenhum efeito aparente nas células procarióticas. O amplo espectro antifúngico e citotóxico da tolitoxina, bem como a ausência de efeito no crescimento bacteriano, leva-nos a pensar que a tolitoxina inibe algum processo fundamental, peculiar aos eucariotos. (Patterson & Carmeli, 1992).

Algumas scitoficinas, incluindo a tolitoxina não são sujeitas à super expressão da P-glicoproteína (proteína que media resistência à droga em células tumorais). Portanto, novos compostos que revertam a resistência às drogas ou que são tóxicos para células resistentes podem ser úteis no tratamento de células tumorais resistentes à drogas (Smith *et al.*, 1993).

Além de macrolídeos a cepa *S. mirabile* (BY-8-1) produz uma ampla variedade de metabólitos citotóxicos pertencentes a várias classes de compostos, entre os quais podemos citar: isonitilas, imidas, peptídeos e alcalóides (Patterson *et al.*, 1994).

## 2) Nucleosídeos

Os nucleosídeos estão representados nas famílias Scytonemataceae e Microchaetaeae pelos seguintes compostos: a tubercidina e a toiocamicina que foram isoladas, pela primeira vez, nas bactérias *Streptomyces tubercidicus* e *Streptomyces toyocaensis*, respectivamente. As estruturas químicas foram caracterizadas por Tolman *et al.*, 1968 e 1969-citados em Stewart *et al.*, 1988.

A tubercidina é a citotoxina encontrada em maior concentração em culturas de *Tolypothrix byssoidea* (H-6-2) e *Scytonema saleyeriense* var. *indica* (CN-14-1). Por outro lado, esta molécula é o menor constituinte em *Plectonema radiosum* (DF-6-1) e *Tolypothrix distorta* (BL-11-2), sendo a tubercidina 5'- $\alpha$ -D- glicopirranose responsável pela atividade citotóxica destas espécies.

Em *Tohyopthrix tenue* (BN-7-4), a responsável pela atividade citotóxica é a toiocamicina 5'- $\alpha$ -D-glicopirranose, sendo que a toiocamicina está em menor concentração (Barchi, 1983-citado em Stewart *et al.*, 1988).

### 1.6.2 - Atividade citotóxica e/ou antineoplásica nas famílias Oscillatoriaceae, Nostocaceae e Schizotrichaceae

Além dos macrolídeos e dos nucleosídeos produzidos pelas famílias Scytonemataceae e Microchaetaceae vários compostos com atividade citotóxica e/ou antineoplásica também foram encontrados nas famílias Oscillatoriaceae, Nostocaceae e Schizotrichaceae. Como exemplo podemos citar a cianobactéria *Hormothamnion enteromorphoides* (Nostocaceae), que produz mistura complexa de peptídeos com atividade biológica. Um desses peptídeos é a hormotamina A, um undecapeptídeo cíclico, altamente citotóxico para uma variedade de linhagem de células cancerosas e moderadamente ictiotóxica para o *Carassius carassius*, o que pode explicar a ausência de predação da espécie *H. enteromorphoides* por peixes herbívoros (Gerwick *et al.*, 1989).

A cianobactéria marinha *Lyngbya majuscula* (Oscillatoriaceae) produz dois agentes altamente inflamatórios, a aplisiatoxina e a debromoaplisiatoxina causadoras de várias dermatites de contato; a debromoaplisiotoxina juntamente com a oscilatoxina-A e outras toxinas brominadas, também foram isoladas de uma mistura de duas cepas de cianobactérias da ordem Oscillatoriales, *Schizothrix calcicola* (Schizotrichaceae) e *Oscillatoria nigroviridis* (Oscillatoriaceae). A debromoaplisiotoxina mostrou atividade antineoplásica, enquanto a aplisiotoxina e oscilatoxina-A mostraram atividade promotora de tumor (Mynderse *et al.*, 1977; Mynderse *et al.*, 1978; Serdula *et al.*, 1982 e Fujiki *et al.*, 1982-citados em Moore *et al.*, 1984). A estereoquímica absoluta da aplisiatoxina-A e da oscilatoxina-A foi determinada por Moore *et al.*, (1984).

Extratos de duas cepas de cianobactérias pertencentes à família Nostocaceae, *Cylindrospermum licheniforme* (ATCC 29204) e *Nostoc linckia* (UTEX B1932) apresentaram moderada citotoxicidade contra linhagens de células tumorais KB e LoVo, e levaram ao isolamento e identificação das seguintes substâncias: a cilindrociclofano-A,

e a nostociclofano-D, ambas pertencentes à classe dos paraciclofanos (Moore et al., 1989; Moore et al., 1990).

### 1.7 - ATIVIDADE ANTIVIRAL

Em 1987, vários extratos de cianobactérias foram testados para atividade antiviral em um programa com o objetivo de descobrir novos compostos para utilização farmacêutica e agroquímica. (Patterson et al., 1993).

Extratos lipofílicos e hidrofílicos de aproximadamente 600 cepas de cianobactérias em culturas, representando 300 espécies aproximadamente, foram examinadas para atividade antiviral contra 3 vírus patogênicos: HSV-2 (Vírus Herpes simplex tipo 2), RSV (Vírus da insuficiência respiratória) e HIV-1 (Vírus da imunodeficiência humana adquirida). Aproximadamente 10% das culturas produziram substâncias que causaram redução significativa no efeito citopático, normalmente associado a infecção viral (Patterson et al., 1993).

A ordem Chroococcales foi identificada como a maior produtora de agentes antivirais (Patterson et al., 1993).

Concomitantemente ao programa de testes, o Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos (NCI-USA) iniciou um programa de desenvolvimento de drogas pré-clínicas para AIDS, para avaliar produtos naturais e sintéticos quanto à atividade anti HIV-1. Este programa de testes foi direcionado principalmente para materiais que ainda não haviam sido pesquisados, como plantas, organismos marinhos e outros microorganismos tais como fungos, bactérias anaeróbicas e cianobactérias (Boyd, 1988 citado em Patterson et al., 1993).

Como parte do programa do Instituto Nacional do Câncer, extratos de culturas de cianobactérias foram testados para a inibição do efeito citopático do HIV-1, que é o agente causador da AIDS (Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida) (Gustafson et al., 1989).

Extratos celulares de *Lyngbya lagerheimii* e *Phormidium tenue* protegeram células linfoblastóides T humanas do efeito citopático causado pelo HIV-1. Com a utilização de um ensaio "in vitro", para orientar no fracionamento, uma nova classe de compostos anti HIV-1, glicolipídeos contendo ácido sulfônico (sulfolipídeos) foram

isolados. Os sulfolípidos identificados representam uma nova classe estrutural de compostos potencialmente antivirais, que nunca havia sido associada à atividade anti HIV-1. Estes sulfolípidos são componentes estruturais de membranas de cloroplastos, ocorrendo amplamente em plantas, algas e microorganismos fotossintetizantes (Mudd & Kleppinger-Sparace, 1987 and Harwood, 1980-citado em Gustafson, *et al.*, 1989).

Outras espécies de cianobactérias que inibiram o HIV-1 foram: *Phormidium cabense*, *Oscillatoria raciborskii*, *Scytonema burmanicum*, *Calothrix elenkinii* e *Anabaena variabilis*. Todos positivos para a presença de sulfolípidos (Gustafson, *et al.*, 1989).

Muitos dos extratos anti HIV-1 identificados pelo programa de testes são devidos à presença de sulfolípidos ou polissacarídeos (Patterson *et al.*, 1993).

A bioatividade e o fracionamento direto de um extrato aquoso da cianobactéria *Spirulina platensis* levou ao isolamento de um polissacarídeo sulfatado chamado Cálcio spirulan (Ca-Sp), que inibe a replicação do envelope de vários vírus como: HSV-1, HIV-1, Influenza A, entre outros (Hayashi *et al.*, 1996).

Outras atividades antivirais vêm sendo registradas para extratos das cianobactérias. Como exemplo podemos citar os indolocarbazóis heterocíclicos, isolados da cepa *Nostoc sphaericum* (EX-5-1) que são ativos contra o HSV-2 (Vírus *Herpes simplex* tipo 2) e mostra citotoxicidade fraca contra linhagens de células KB e LoVo (Carcinoma Humano) (Knübel *et al.*, 1990).

### 1.8 - INIBIDORES ENZIMÁTICOS

Uma variedade de doenças são mediadas pela excessiva atividade proteolítica, sendo responsável pela formação de tumores, processos inflamatórios, doenças de pele, e outras doenças (Cannell *et al.*, 1988).

O desenvolvimento e a identificação de inibidores enzimáticos nas cianobactérias cria um potencial para o desenvolvimento de novas drogas, uma vez que muitos compostos que agem como inibidores enzimáticos exibem outras atividades biológicas. Entretanto, o estudo de inibidores enzimáticos tem sido concentrado quase que exclusivamente em testes com estreptomicetos (Cannell *et al.*, 1988).

O primeiro registro de inibidores enzimáticos em cianobactérias foi realizado por Cannell *et al.* (1988) que realizou testes com 580 espécies entre algas e cianobactérias de ambientes marinhos e de água doce.

Até o momento, a ocorrência de compostos que agem como inibidores enzimáticos nas cianobactérias foram isolados apenas em dois gêneros *Microcystis* e *Oscillatoria*.

Dentre os inibidores enzimáticos já identificados e caracterizados nas cianobactérias estão:

- A microginina que é um pentapeptídeo linear isolado de uma cepa formadora de "blooms" tóxicos: *M. aeruginosa* (NIES-100), e inibe a enzima que converte a angiotensina, podendo ser usada no desenvolvimento de drogas anti-hipertensivas (Okino *et al.*, 1993a). A síntese total de Microginina foi realizada por Matura *et al.*, (1994);

- As micropeptinas A e B, que são depsipeptídeos que inibem a plasmina e a tripsina, foram isoladas da mesma cepa de *M. aeruginosa* (NIES-100) em cultivo (Okino *et al.*, 1993b);

- A cianopeptolina S, que é um novo depsipeptídeo cíclico sulfatado isolado de uma cepa da espécie *M. aeruginosa*, e inibe a tripsina. A cianopeptolina S difere dos já conhecidos depsipeptídeos de cianobactérias, tanto na sequência de aminoácidos quanto na estrutura química da cadeia (Jakobi *et al.*, 1995);

- As aeruginopeptolinas, que são depsipeptídeos cíclicos que ocorrem juntos com as microcistinas nas cepas de *M. aeruginosa* (TAC 95 e M228) (Harada *et al.*, 1993 citado em Moore, 1996);

- A microviridina, que é um novo depsipeptídeo tricíclico de uma cepa da espécie *M. viridis*, e inibe a tirosinase (Gerwick *et al.*, 1989 e Ishitsuka *et al.*, 1990 citados em Moore, 1996); e

- A oscilapeptina, que é um inibidor da elastase e da quimiotripsina, e foi isolada da cepa *O. agardii* (NIES-204) (Shin *et al.*, 1995 citado em Moore, 1996).



## 1.9 - ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

Registros de atividade inflamatória produzida por extratos de cianobactérias são escassos.

Um dos exemplo de atividade inflamatória, ocorreu com uma cianobactéria marinha da espécie *Lyngbya majuscula*, causando dermatite de contato em nadadores e banhistas durante alguns meses de verão no Havai. Duas toxinas altamente inflamatórias foram isoladas: aplisiatoxina e debromoaplisiatoxina. A toxina debromoaplisiatoxina tem sido encontrada em outras cianobactérias pertencentes a família Oscillatoriaceae. Como exemplo podemos citar o isolamento de debromoaplisiatoxina de uma mistura de duas cianobactérias das espécies *Schizothrix calcicola* e *Oscillatoria nigroviridis* com oscillatoxina A e 3 outras toxinas bromadas (Mynderse *et al.*, 1977; Mynderse & Moore 1978; Serdula *et al.*, 1982-citados em Moore *et al.*, 1984).

Podemos citar ainda a identificação de compostos brominados bi-indólicos, com atividade antiinflamatória, analgésica e antialérgica em extratos da cianobactéria *Rivularia firma* (Baker, 1984).

## 1.10 – OUTROS AGENTES BIOATIVOS

Alguns agentes bioativos tiveram a estrutura química elucidada, porém não estão incluídos em nenhuma das atividades biológicas citadas acima ou não tiveram suas atividades biológicas identificadas até o presente momento.

Estes compostos estão incluídos em duas principais classes químicas: os alcalóides e os peptídeos

Dentro da classe dos alcalóides podemos citar:

- A muscoride-A, isolada de uma cepa da espécie *Nostoc muscorum*, que possui baixa atividade antibacteriana (Nagatsu *et al.*, 1995); e
- As welwitindolinonas, isoladas das espécies *Hapalosiphon welwitschii* com atividade antifúngica e que também reverte a P-glicoproteína que media a resistência multi-droga (Stratmann *et al.*, 1994).

E dentro da classe dos peptídeos podemos citar:

- As cianopeptolinas A,B,C e D, que são decapeptídeos cíclicos (peptídeo lactona) isolados da cepa *Microcystis* sp PCC 7806 (Martin *et al.*, 1993);
- A antolatoxina, que é um decapeptídeo cíclico icriotóxico isolado de uma cepa da espécie *Lyngbya majuscula* (Orjala *et al.*, 1995 citado em Moore, 1996);
- A puwainaficina-C, que é um decapeptídeo cíclico contendo cloro isolado da cepa *Anabaena* sp (BQ-16-1), que aumenta a contração muscular em átrio de camundongo fazendo com que melhore a insuficiência cardíaca (Moore *et al.*, 1989);
- A scitonemina A, um peptídeo cíclico isolado da cepa *Scytonema* sp (V-3-3), que é um potente antagonista de cálcio (Helms *et al.*, 1988);
- As anabaenopeptinas A e B, que são peptídeos cíclicos isolados da cepa *Anabaena flos-aquae* (NCR 525-17) (Harada *et al.*, 1995 citado em Moore, 1996); e
- As oscilagininas A e B, que são tetrapeptídeos lineares com um resíduo Ahda (ácido 3-amino-2-hidroxi-decanoico) isoladas de uma cepa da espécie *Oscillatoria agardii* (Sano & Kaya, 1996).

#### 1.11 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

A indústria farmacêutica tem mostrado pouco interesse nas cianobactérias, refletindo em parte a posição que as cianobactérias têm em relação às tradicionais fontes de microorganismos como produtoras de fármacos. Por serem elas fotoautotróficas obrigatórias, há diferenças nas técnicas de cultivo e na dificuldade de obtenção de material, pois a quantidade de biomassa e de produtos naturais produzidos pelas cianobactérias é geralmente menor do que a obtida nos processos de fermentação de microorganismos heterotróficos. Em geral a produção ótima ocorre sob condições que promovem o acúmulo de biomassa (Armstrong *et al.*, 1991; Patterson *et al.*, 1991; Patterson *et al.*, 1994).

Avanços com culturas em larga escala e engenharia genética têm reduzido estes problemas (Ciferri *et al.*, 1989-citado em Patterson *et al.*, 1991). No entanto, extratos de cianobactérias em cultura, geralmente, apresentam menor atividade quando comparadas com material coletado no ambiente (Gerwick *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1988-citado em Armstrong *et al.*, 1991).

Além disso, uma cepa da espécie *Lyngbya* sp em cultura em larga escala, iniciou que os princípios citotóxicos produzidos no início e no final da fase exponencial de crescimento foram diferentes (Armstrong *et al.*, 1991).

A sistemática avaliação de fatores químicos e ambientais que influenciam a produção de metabólitos secundários em *Scytonema ocellatum* (FF-66-3), produtora de tolitoxina, tem mostrado que as cianobactérias podem ser manipuladas em cultura para aumentar o crescimento e produzir compostos bioativos (Patterson *et al.*, 1994).

Estes fatores têm levado vários pesquisadores a desenvolver novas metodologias e a otimizar as condições de cultivo, objetivando maximizar a produção de um metabólito secundário. Para tanto, são necessárias duas etapas: a que visa a otimização das condições físicas e químicas e a das condições biológicas.

#### 1) Condições físicas e químicas

Esta etapa inclui a avaliação das condições físicas e químicas do cultivo no crescimento e acúmulo de um metabólito secundário, procurando estabelecer condições ótimas de temperatura, iluminação, nutrientes, pH e tempo de cultivo. Vários estudos de otimização das condições de cultivo vêm sendo realizados; como exemplos podemos citar:

Para a cepa *Scytonema ocellatum* (FF-66-3), o crescimento e o acúmulo de tolitoxina só ocorreu com as variações nas concentrações de nutrientes. Foram estabelecidas condições ótimas de N, S, P, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>. E quando as concentrações de Ca<sup>2+</sup> aumentaram no meio BG-11 houve aumento na produção de tolitoxina (Patterson *et al.*, 1994).

A produção máxima de antibiótico, por uma cepa da espécie *Nostoc muscorum*, só foi alcançada quando a concentração de nitrato no meio foi aumentada e a de ferro diminuída (Bloor & England, 1991). O mesmo aconteceu com uma cepa termotolerante, *Phormidium* sp, para a qual o aumento na concentração de nitrato e o decréscimo na temperatura e nas concentrações de ferro, estimularam o aumento na produção do material bioativo produzido (Fish & Cood, 1994).

Estudos de otimização na produção de sideróforos (pigmentos extracelulares que assimilam ferro) por *Agmenellum quadruplicatum* PRG indicaram que a biossíntese

não é só dependente da deficiência de ferro, mas também da intensidade luminosa, temperatura de incubação, fonte de nitrogênio, interação de metais traços e tempo de cultivo (Armstrong & Van Baalen, 1979- citado em Armstrong *et al.*, 1991).

Vários trabalhos têm concluído que variações nas concentrações de nutrientes podem levar à produção diferenciada de metabólitos secundários nas diferentes fases de crescimento celular, assim como o aumento na produção de compostos biologicamente ativos, pelas cianobactérias, pode ocorrer pela otimização das condições de cultivo, seja através da limitação de um ou mais nutrientes, de variações na temperatura, pH, intensidade luminosa, tempo de cultivo, adição de extratos fúngicos ou mesmo através do conhecimento das propriedades físico-químicas destes compostos (Bloor & England, 1989; Chetsumon *et al.*, 1993 e 1994; Patterson & Bolis, 1997).

Vale a pena ressaltar que nem sempre as condições "ótimas" para o crescimento celular, são "ótimas" para a produção de um metabólito bioativo (Jakob, 1961- citado em Bloor & England, 1989).

## 2) Condições biológicas

A etapa de otimização das condições biológicas visa o aumento de produção, de uma dada espécie, pela seleção dos clones mais promissores na população natural, ou através de tratamento mutagênico, como aconteceu com um clone axênico de *Scytonema ocellatum*, derivado da população natural sem tratamento mutagênico, que produziu aproximadamente duas vezes mais tolytoxina do que a cepa original (Patterson *et al.*, 1994).

### 1.12 - TESTES BIOLÓGICOS

Tendo em vista o que foi exposto, fica evidente o papel das cianobactérias não só como produtoras de toxinas, mas também como potenciais fontes de novos metabólitos a serem utilizados no futuro para o desenvolvimento de novas drogas. Para tanto, se faz necessária a utilização de um sistema de testes biológicos para identificar o potencial de cada cepa individualmente, pois a pesquisa e descoberta de antibióticos e

compostos bioativos não pode ser realizada satisfatoriamente apenas por meios químicos.

A maior importância do sistema de testes biológicos é detectar a atividade das culturas com o máximo de sensibilidade, uma vez que a maioria dos compostos biologicamente ativos, estão presentes em quantidades mínimas (cerca de 0,1 %) nos extratos brutos. Assim, é necessário otimizar as condições de cultivo para obter o máximo na produção de antibiótico (Bloor & England, 1989).

A investigação de cepas de cianobactérias isoladas de corpos d'água brasileiros, quanto à ocorrência de compostos biologicamente ativos, é de grande importância uma vez que não se tem conhecimento de que este tipo de estudo já tenha sido realizado em nosso país. Por outro lado, já se tem estabelecido que diferenças fisiológicas e metabólicas podem ser observadas em cepas da mesma espécie, provenientes de regiões distintas (Costa & Azevedo, 1994).

As cianobactérias, em particular as pertencentes à ordem Oscillatoriales, são fontes potenciais de novos agentes citotóxicos, no entanto poucos estudos vêm sendo realizados quanto a outras atividades biológicas, o que estimula a investigação desta ordem em particular. No presente trabalho, detivemos-nos apenas aos testes biológicos, que apresentam grande relevância acadêmica uma vez que este trabalho poderá servir de subsídio para futuras investigações farmacológicas, químicas e biotecnológicas.

## 2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar o potencial de 11 cepas de cianobactérias da ordem Oscillatoriales como fonte produtora de metabólitos biologicamente ativos, em especial com atividade antibacteriana, antifúngica, inflamatória, citotóxica e antiviral.
- Fornecer subsídios para investigações químicas e biotecnológicas, de modo que estes metabólitos possam vir a ser utilizados, no futuro, para o desenvolvimento de novas drogas.

### 3 - METODOLOGIA

#### 3.1 - ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS CEPAS

Cepas de cianobactérias da ordem Oscillatoriales foram obtidas através de isolamentos realizados no próprio laboratório, a partir de material de campo ou de outros bancos de culturas.

Alíquotas de amostras de cianobactérias da população natural (10-20µl) foram plaqueadas em meio sólido Z-8 (Hugues *et al.*, 1958 modificado por Kotai, 1972), descrito no Anexo III.

O meio foi preparado da seguinte maneira: água deionizada com 2% de ágar (BBL - Microbiology Systems) foi aquecida à aproximadamente 86°C. O ágar solidificado foi cortado, em pedaços e lavado 3 vezes em água deionizada para livrá-lo de impurezas que pudessem interferir no experimento. O meio Z-8 foi preparado com sua concentração de nutrientes duplicada (2 x Z-8) e pH 9,0. Quantidades iguais do ágar solidificado e do meio (2 x Z-8) foram autoclavadas separadamente. A seguir, os mesmos foram misturados ainda quentes e vertidos em placas de Petri, previamente autoclavadas, até solidificarem. As células plaqueadas foram então incubadas por 2-4 semanas aproximadamente, com intensidade luminosa de  $20\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , temperatura de  $\pm 24^\circ\text{C}$  e um fotoperíodo de 12 h, para o isolamento das cepas.

Após o crescimento, os filamentos foram plaqueados novamente em meio sólido, e este procedimento foi repetido várias vezes com o objetivo de se obter cepas com o mais elevado nível de pureza possível. O processo entre coleta da amostra e isolamento das cepas durava aproximadamente 6 meses.

Para testar a contaminação bacteriana, as cepas foram plaqueadas no meio Luria-Bertani → LB (Sambrook *et al.*, 1989), descrito no Anexo I, em pH 7,0 e incubadas por 24 h a 37°C.

Para testar a contaminação por fungos, as cepas foram plaqueadas em meio de ágar GYP (Von Arx & Schipper, 1978 modificado por Hagler, 1978), descrito no Anexo II e incubadas por 48 h a temperatura ambiente.

A contaminação das cepas foi controlada pela adição de Fungizon®\* (Anfotericina-b) -  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ , no caso de contaminação por fungos e Tienam®\* (Imipinem) -  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$  para bactérias.

### 3.2- CEPAS UTILIZADAS

Foram utilizadas neste trabalho 11 cepas pertencentes a ordem Oscillatoriales, representadas pelas famílias: Pseudoanabaenaceae; Phormidiaceae e Oscillatoriaceae. São elas:

#### PSEUDOANABAENACEAE

- Leptolyngbya* sp - NPRG-1
- NPDF-2
- NPPE-3
- NPFX-1

- Limnothrix* sp - NPCD-2
- NPLJ-5

- Pseudoanabaena galeata* - NPLB-5

#### PHORMIDIACEAE

- Planktothrix* sp - NPPE-1

- Tychonema* sp - NPFE-1
- NPBT-1

#### OSCILLATORIACEAE

- Oscillatoria* sp - NPBT-2

Todas estas cepas encontram-se isoladas e mantidas em cultivo no Banco de Culturas de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), associado ao Laboratório de Cultivo e



Fisiologia de Microalgas, nas seguintes condições: meio Z-8 (Hugues *et al.*, 1958 modificado por Kotai,1972), pH 7 - 8, temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , intensidade luminosa de  $20 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo 12 h, com repiques mensais.

### 3.3 - CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio selecionado para cultivo foi o Z-8 (Hugues *et al.*, 1958 modificado por Kotai,1972) com pH 8,0 (ANEXO III)

Para cada cultura foram utilizados 10 L de meio Z-8 em garraões de 13 L, o cultivo foi do tipo "batch" com sistema de aeração contínuo, temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , intensidade luminosa de  $20 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo 12 h. Os inóculos representaram 10% do volume total da cultura.

Entre o 19º e o 29º dia, as culturas foram concentradas por centrifugação a 3300 G por 10 min (Centrifuga eppendorf - Brinkmann Instruments Co.- modelo 54030), as mesmas foram congeladas à  $-18^{\circ}\text{C}$  e liofilizadas (Liofilizador Labconco Co., FreeZone® 12 L - modelo 77545). O material liofilizado foi mantido a  $-18^{\circ}\text{C}$  até serem preparados os extratos das células para a realização dos testes.

### 3.4 - DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO CELULAR

A produção de cada cepa foi determinada pela razão biomassa/volume. A biomassa foi calculada pelo peso seco (g) do material celular liofilizado e o volume final das culturas foi medido em litro (L).

### 3.5 - PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos das células liofilizadas foram preparados por extração sequencial da massa celular com  $\text{H}_2\text{O}$ , MeOH 20% e MeOH 80%, processo que denominamos normal (N).

### 3.5.1 – Extração

A extração foi realizada inicialmente com 40mL H<sub>2</sub>O deionizada por grama(g) de material celular liofilizado e homogeneizado em uma placa agitadora Corning por 60 min. O material homogeneizado foi separado por centrifugação a 9167 G por 30 min, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi extraído mais duas vezes com o mesmo volume de H<sub>2</sub>O deionizada. O mesmo procedimento foi utilizado na extração com MeOH 20% e posteriormente MeOH 80%.

Uma vez obtidos os extratos brutos, os mesmos foram secos por evaporação a temperatura ambiente (evaporador rotatório Yamato Scientific Co. L<sup>td</sup>. - modelo RE 47) e/ou por liofilização. O peso seco de cada extrato foi determinado para a realização dos testes.

Ao longo dos experimentos decidiu-se inverter o gradiente de polaridade dos solventes durante o processo de extração, uma vez que nos antibiogramas realizados posteriormente, os resultados não se mostraram satisfatórios com o processo de extração normal (N). Desta maneira, a extração se iniciou na ordem MeOH 80%, MeOH 20% e H<sub>2</sub>O, processo que denominamos invertido (I), seguindo-se o mesmo procedimento do processo de extração normal.

#### 3.5.1 - Fracionamento dos extratos

Os extratos das cepas NPCD-2, NPDF-2 e NPBT-1, que apresentaram resultados positivos nos antibiogramas, foram passados em cartuchos de octadesililano (C-18) para um fracionamento sequencial com 30 mL de cada um dos seguintes solventes: H<sub>2</sub>O, MeOH 20%, MeOH 80% e MeOH 100%. O solvente do material coletado no cartucho foi evaporado e posteriormente, o material foi resolubilizado em 1 mL de H<sub>2</sub>O deionizada para a realização de outro antibiograma.

Os extratos das cepas NPPE-3, NPDF-2, NPFE-1 e NPLJ-5 foram submetidos a um processo de partição com os seguintes solventes: hexano, cloroformio e acetato de etila, para que pudéssemos separar as classes de compostos do extrato. A partição dos extratos brutos se deu da seguinte maneira: a fração MeOH 80% foi evaporada em rotavapor, o extrato seco foi resuspenso em 30 mL de MeOH 20% e colocado em um

funil de separação com 20 mL de hexano, este procedimento foi repetido 3 vezes. A fração hexânica foi separada da fração metanólica e evaporada, o extrato metanólico foi evaporado e extraído 3 vezes com clorofórmio. A fração clorofórmica também foi separada da fração metanólica e evaporada, o mesmo procedimento foi feito com acetato de etila. Posteriormente foi realizado um antibiograma com cada uma dessas frações.

## 3.6 - TESTES BIOLÓGICOS

### 3.6.1 - Antibiograma

Para a realização dos antibiogramas foram utilizadas as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)  $\Rightarrow$  Gram (+); *Escherichia coli* (ATCC 25922)  $\Rightarrow$  Gram (-); e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442)  $\Rightarrow$  Gram (-) gentilmente cedidas pela Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup> Rosalie Reed Rodrigues Coelho do Laboratório de Microbiologia do Solo. *Candida albicans* IM-UFRJ 51501 (=ATCC 18804), foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Allen Norton Hägler, do Laboratório de Coleção de Culturas de Leveduras, ambos do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### 3.6.1.1 - Impregnação dos discos

A impregnação de discos de papel de filtro Whatmann nº 1 (6 mm Ø) se faz necessária para que se tenha conhecimento da concentração do extrato presente no disco, e também para padronizar a mesma concentração para todos os extratos. Os extratos brutos secos foram resuspensos em 3 mL de H<sub>2</sub>O deionizada por grama (g) de célula liofilizada, e a cada duas horas foi adicionado 20µL do extrato no disco até completar 100µL. Uma vez secos, os discos foram utilizados imediatamente no antibiograma.

### 3.6.1.2 - Realização dos testes

O antibiograma, também conhecido como técnica de difusão em ágar (Barry & Thomsberry, 1991), foi realizado no Laboratório de Radiobiologia Molecular sob Coordenação do Prof. Dr. Álvaro Augusto da Costa Leite, do Programa de Biofísica Ambiental e Radiobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ.

As bactérias cresceram em meio BHI líquido (Brain Heart Infusion - Difco) e a levedura cresceu em meio de ágar GYP (Von Arx & Schipper, 1978 modificado por Hagler, 1978) descrito no Anexo II, por 24 h à 37°C. Após 24 h, os microorganismos testes foram diluídos em solução salina (NaCl 0,9%), e a turvação produzida foi comparada à escala 0,5 de Mc Farland (Barry & Thomsberry, 1991). Posteriormente, os microorganismos testes foram inoculados em placas na superfície do meio de ágar Muller Hinton (Difco), confluentemente em três direções, para que houvesse um crescimento uniforme. Passados 3 à 5 min, os discos impregnados com os extratos celulares brutos a serem testados, foram colocados na superfície do meio previamente inoculado com bactérias. As placas foram então incubadas à 37°C. Após 18 h foi observado o diâmetro da zona de inibição dos microorganismos testes utilizados, os valores foram expressos em mm, zonas de inibição com diâmetro abaixo de 8mm foram consideradas como resultados negativos, indicando resistência dos microorganismos aos extratos.

**OBS:** Todos os extratos de cada uma das cepas foram utilizados nos antibiogramas no processo normal de extração (N). Porém, no processo invertido de extração (I) utilizamos apenas a fração MeOH 80% dos extratos, por esta fração ter apresentado os melhores resultados nos primeiros antibiogramas realizados.

### 3.6.2 - Atividade inflamatória

A reação inflamatória envolve um processo complexo multimediado, com a participação de vários compartimentos do organismo (Rang, 1997). Diferentes modelos experimentais podem ser utilizados para a investigação da potencial ação pró ou anti inflamatória de produtos naturais ou sintéticos: a pleurisia (inflamação na pleura), a

peritonite (inflamação no peritônio), a agregação plaquetária, etc. Neste trabalho utilizamos como modelo inicial para a investigação da atividade pró ou anti inflamatória o modelo de agregação plaquetária, por se tratar de um método rápido e que requer pequena quantidade de material, para os quais os extratos brutos secos foram resuspenso em solução salina.

Os testes de agregação plaquetária foram realizados no Laboratório de Inflamação do Prof. Dr. Renato Sérgio Balão Cordeiro, do Departamento de Farmacodinâmica, da Fundação Oswaldo Cruz.

#### 3.6.2.1 - Coleta de sangue para obtenção de plasma

Foram utilizados plasma de rato, carneiro e coelho. O sangue foi obtido através de punção cardíaca em seringa contendo citrato de sódio tribásico 1,8% como anticoagulante para rato na proporção 1:10 v/v (citrato de sódio:sangue) e 3,8% para coelho na proporção 1:10 v/v (citrato de sódio:sangue). O sangue de carneiro foi obtido por punção venosa com citrato de sódio 3,8% na proporção 1:10 v/v (citrato de sódio:sangue).

Os plasmas ricos em plaquetas (PRP) foram obtidos por centrifugação a 277 G por 15 min (Centrifuga Jouan - Modelo CR 422). O material sedimentado foi novamente centrifugado a 1733 G por 10 min para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).

#### 3.6.2.2- Contagem das plaquetas

As plaquetas do PRP foram contadas em contador automático de células (Coulter Counter ZM - Sampling Stand II) e a concentração final foi ajustada para  $4 \times 10^5/\mu\text{l}$  com o PPP.

### 3.6.2.3 - Agregação plaquetária

O ensaio de agregação foi avaliado em agregômetro de dois canais (Lumi dual aggregometer - Modelo 460VS - chrono-Log) de acordo com método turbidimétrico, segundo Born (1962), para o qual o aparelho foi calibrado com PRP e PPP de forma a obter-se 0 e 100% de transmitância respectivamente.

A agregação foi induzida pelo agente agregante PAF nas concentrações  $5 \times 10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $5 \times 10^{-7}$  M e/ou ADP nas concentrações  $5 \times 10^{-8}$  M;  $10^{-6}$  M;  $2 \times 10^{-6}$  M e  $10^{-5}$ , dependendo do tipo de sangue utilizado (rato - ADP e coelho - ADP e PAF), várias curvas dose-respostas foram obtidas, sendo escolhida a curva intermediária. As diferentes diluições foram feitas com solução salina (NaCl 0,9%). Uma alíquota de 300  $\mu$ l do PRP foi mantido a 37°C por 90s e após esse tempo, 3  $\mu$ l do agente agregante (PAF ou ADP), nas concentrações definidas, foi adicionado e a agregação registrada. A curva dose-resposta intermediária foi considerada como 100% de agregação (controle negativo).

### 3.6.2.4 - Efeito dos extratos sob a agregação de plaquetas

Para a avaliação do efeito dos extratos sob a agregação de plaquetas, 300  $\mu$ l do PRP foi mantido a 37°C por 90s, posteriormente, concentrações que variaram entre 0,6 - 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de cada extrato foram incubadas em uma cubeta durante 5 min no agregômetro. Após esse período o agente agregante foi adicionado e a agregação registrada.

Foi realizada também uma incubação do extrato sem a adição do PAF ou ADP, portanto, sem o agente agregante. A agregação foi registrada para termos um controle do efeito agregante do extrato sobre as plaquetas, sem a interferência do agente agregante. Nos primeiros teste de agregação plaquetária este procedimento não foi realizado.

Todos os resultados foram expressos em centímetros (cm) de agregação, e posteriormente convertidos para percentagem de agregação em relação ao controle.

**OBS:** Nos testes de agregação plaquetária, as frações MeOH 20% e H<sub>2</sub>O de todas as cepas foram testadas, tanto no processo inicial quanto no processo invertido de extração, para que pudéssemos compara melhor os resultados. A fração MeOH 80% de algumas cepas foi testada, porém não apresentou resultado satisfatório.

### 3.6.2.5 - Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes de agregação plaquetária foram submetidos à tratamento estatístico através do teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls-Student. Foram considerados estatisticamente diferentes em relação ao controle, os resultados com valores de  $p \leq 0,05$ . Os resultados foram expressos como Média, Desvio Padrão e Erro Padrão da Média (EPM).

Essas análises foram realizadas através do pacote estatístico Statistic 4.0 (Siegel, 1985).

### 3.6.3 - Atividade antiviral

Os testes para a verificação de atividade antiviral nos extratos de cianobactérias foram realizados no Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas (LEDAC) sob coordenação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Dutra Wigg, do Departamento de virologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Goés da UFRJ.

O vírus para sobreviver utiliza como fonte de energia um outro organismo, chamado hospedeiro. Assim, antes que seja avaliada a atividade antiviral de uma substância, esta deve ser estudada quanto a sua toxicidade para o sistema hospedeiro empregado. Um dos critérios para avaliação da citotoxicidade é baseado na alteração morfológica da célula (De Clercq *et al.*, 1980), portanto, a realização do teste envolve duas fases: 1<sup>a</sup>) Verificação da ação citotóxica do extrato sobre as células do hospedeiro, e 2<sup>a</sup>) Verificação da ação antiviral propriamente dita

### 3.6.3.1 - Teste de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade dos extratos foram realizados com as células cancerosas HEP-2 (células do tipo epitelíóide de tumor de laringe humana), previamente manipuladas para as condições do teste, salvo a presença dos extratos das cianobactérias.

#### 3.6.3.1.1 - Sistema hospedeiro

No presente trabalho foi escolhido como sistema hospedeiro a cultura de células. Este, além de ser um sistema amplamente empregado para o estudo de agentes antivirais (Hu & Hsiung, 1989), possibilita a triagem de um grande número de extratos (Brito *et al.*, 1981; Sidwell *et al.*, 1969; Suganda *et al.*, 1983). Foi utilizada a linhagem Hep-2 (células do tipo epitelíóide de tumor de laringe humana) pertencente ao Banco de células do Rio de Janeiro (Hospital Universitário Hélio Fraga Filho), por ser de fácil manutenção e conservação em laboratório, tendo rápida taxa de crescimento e alta sensibilidade para o vírus *Herpes simplex* (HSV).

#### 3.6.3.1.2 - Preparo das culturas de células

As células foram cultivadas em garrafas do tipo Roux, "milk dilution", tubos 13 x 100 mm e em microplacas descartáveis (96 cavidades), dependendo do experimento.

As células cultivadas em garrafas foram tripsinizadas (Schmidt, 1979) e resuspensas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM-Eagle - Sigma), acrescido de 5% de soro fetal bovino e 0,03 mg/mL de glutamina, 50 µg/mL de garamicina, 2,5 mg/mL de fungizona e solução de bicarbonato a 0,25%, com uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL. Após 48 h de incubação a 37°C, quando as monocamadas apresentaram confluência, novos repiques foram feitos. As culturas em garrafas e tubos foram incubadas em estufa a 37°C, por 48 h, sendo que as microplacas foram colocadas, previamente, em dessecador contendo atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, obtida pela reação de NaHCO<sub>3</sub> 1M com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, na proporção 2:1.



### 3.6.3.1.3 - Toxicidade dos extratos

As células foram cultivadas em microplacas (96 cavidades) e após 48 h de incubação, o meio de crescimento foi substituído por várias diluições dos extratos brutos, preparados em MEM-Eagle (sem soro e complementado com antibiótico e fungizona), usando 3 cavidades para cada concentração.

As monocamadas de células foram incubadas a 37°C, em ambiente de CO<sub>2</sub>, por 5 dias. Foram feitas observações diárias, ao microscópio ótico invertido, comparando com o controle de células sem extratos. O efeito tóxico foi avaliado pelo surgimento de granulações, vacúolos, retração, arredondamento ou deslocamento da monocamada celular. A maior concentração do extrato que não causou alterações morfológicas visíveis nas células foi designada a Concentração Máxima Não Tóxica (CMNT), sendo então usada em nossos experimentos.

### 3.6.3.2 - Avaliação da ação antiviral

A ação dos extratos de cianobactérias foi realizada sobre o HSV-1 (Vírus *Herpes simplex* tipo 1). As avaliações foram realizadas estatisticamente, segundo método de Reed & Muench (1938), e os índices de inibição viral calculados.

#### 3.6.3.2.1 - Amostra de vírus

Foi utilizada uma amostra de vírus *Herpes simplex* tipo 1, isolada em cultura de células, a partir do fluido de vesículas de um caso característico de Herpes labial. Essa amostra foi previamente estudada por Lagrota (1991) e comportou-se como resistente ao aciclovir (ACV).

#### 3.6.3.2.2 - Preparo do estoque de vírus e titulação

Para o preparo do estoque e titulação de vírus, foi utilizada a cultura Hep-2, cultivada em garrafa do tipo "milk dilution", substituindo o meio de crescimento com soro por meio de manutenção sem soro. Foram inoculados 500 µL de uma suspensão de

vírus apresentando título de  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL (dose de vírus capaz de infectar 50% das células de culturas inoculadas). A cultura foi incubada a 37°C, fazendo-se leituras diárias até que o efeito citopatogênico (CPE) fosse total. Após três ciclos de congelamento e descongelamento, as culturas de células foram lizadas e a suspensão viral foi dividida em alíquotas e mantidas à -20°C. Uma alíquota foi titulada em microplacas (96 cavidades), contendo monocamadas de células confluentes, através de diluições decimais de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ , inoculando-se 10 µL de cada diluição de vírus em cada uma das 6 cavidades. O título do vírus foi calculado, após 5 dias de incubação, pelo método de Reed & Muench (1938) e expresso em TCID<sub>50</sub>/mL.

### 3.6.3.2.3 - Redução do título viral frente aos extratos brutos

Inicialmente, foi realizada uma triagem dos extratos pela observação da redução do título viral, segundo Lagrota (1978) e adaptado para microtécnica por Brito *et al.* (1981).

As células foram cultivadas em microplacas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 h, período em que atingiram confluência. Posteriormente, o meio de crescimento foi substituído por concentrações do extrato na razão 2:1, a partir da concentração máxima não tóxica (CMNT). Cada concentração da substância (100µL/cavidade) foi distribuída em seis fileiras verticais (48 cavidades por concentração). Em outras seis fileiras verticais (48 cavidades), foi adicionado apenas meio de manutenção (controle de vírus). Diferentes diluições logarítmicas de suspensão viral ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) foram então inoculadas horizontalmente nas cavidades (10µL/cavidade). A última fileira, disposta horizontalmente, recebeu apenas meio de manutenção (MEM-Eagle sem soro), tornando-se então, controle de citotoxicidade das substâncias e controle de células, utilizaram-se seis cavidades por controle, respectivamente. As culturas de células foram incubadas a 37°C por cinco dias, em ambiente de CO<sub>2</sub>, realizando-se leituras diárias ao microscópio invertido. Ao final deste período, os títulos do vírus foram determinados, com base no método estatístico de Reed & Muench (1938). A atividade antiviral foi expressa em índice de inibição viral (IIV) e percentagem de inibição (PI).

O índice de inibição viral (IIV) foi obtido pela fórmula proposta por Lagrota (1978):

$$\text{IIV} = \text{B} - \text{A}$$

Onde B = título do vírus na cultura de células sem extrato (controle)

A = título do vírus na cultura de células com extrato.

A porcentagem de inibição viral (PI) foi calculada, de acordo com a fórmula proposta por Nishimura et al. (1977).

$$\text{PI} = 1 - (\text{T}/\text{C}) \times 100$$

Onde T = unidades infecciosas na cultura de células tratada com a substância.

C = unidades infecciosas na cultura de células não tratada (controle).

Todos os experimentos foram repetidos três vezes. Quando a redução no título do vírus foi superior a 3 log<sub>10</sub>, a porcentagem de inibição foi aferida para 100%.

**OBS:** Os testes antivirais foram realizados somente com a fração aquosa (N) das seguintes cepas: NPPE-3, NPBT-1, NPPE-1, NPBT-2, NPRG-1, NPDF-1, NPDF-2.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - OBTENÇÃO DE BIOMASSA

Foram necessários vários litros de cultura para a obtenção de uma quantidade razoável de material, suficiente para a realização dos testes biológicos, pois a biomassa produzida por cepa variava entre 0,124-0,225 g/L, ficando a média em apenas 0,178 g/L de cultura (Tabela I).

Novas metodologias de cultivo devem ser desenvolvidas, de maneira que a produção de metabólitos secundários biologicamente ativos seja estimulada, ou pelas variações nas concentrações dos nutrientes, temperatura e intensidade luminosa (condições abióticas) ou pela seleção de cepas mais promissoras na população natural, mutações gênicas, ou até mesmo através do desenvolvimento de bioreatores que aumente a produção de biomassa.

A Tabela I mostra 3 cepas com produção acima de 0,200 g/L; 6 cepas acima de 0,150 g/L e 2 cepas abaixo de 0,149 g/L; a literatura mostra que a otimização de produção de biomassa é dependente dos objetivos e em nosso caso, o objetivo é a obtenção de material biologicamente ativo. Observamos que a cepa NPFX-1 (*Leptolyngbya* sp) foi a que mostrou aparentemente o menor rendimento, porém, foi ativa para um dos testes biológicos. Por outro lado, a cepa NPPE-1 (*Planctothrix* sp), que apresentou o maior acúmulo de biomassa, não o foi para princípios biologicamente ativos.

Tabela I - Produção de biomassa pelas cepas de cianobactérias utilizadas nos testes biológicos:

CEPAS	Biomassa (g/L)
NPRG-1 ( <i>Leptolyngbya</i> sp)*	0,188
NPDF-2 ( <i>Leptolyngbya</i> sp) *	0,207
NPRE-3 ( <i>Leptolyngbya</i> sp) *	0,214
NPFX-1 ( <i>Leptolyngbya</i> sp) *	0,124
NPCD-2 ( <i>Limnothrix</i> sp) *	0,176
NPLJ-5 ( <i>Limnothrix</i> sp) *	0,192
NPLB-5 ( <i>Pseudoanabaena galeata</i> ) *	0,140
NPFE-1 ( <i>Tychonema</i> sp) **	0,163
NPBT-1 ( <i>Tychonema</i> sp) **	0,161
NPPE-1 ( <i>Planktothrix</i> sp) **	0,225
NPBT-2 ( <i>Oscillatoria</i> sp) ***	0,171

Famílias: \* - Pseudoanabaenaceae, \*\* - Phormidiaceae e \*\*\* - Oscillatoriaceae

#### 4.2 - ANTIBIOGRAMAS

Os extratos que apresentaram os mais altos índices de inibição foram obtidos com as cepas NPCD-2 (*Limnothrix* sp) (N) MeOH 80%, NPPE-1 (*Planktothrix* sp) (N) MeOH 20%, NPDF-2 (*Leptolyngbya* sp) (N) MeOH 80%, NPBT-1 (*Tychonema* sp) (N) MeOH 80% e NPFX-1 (*Leptolyngbya* sp) (N) MeOH 80%. Os extratos MeOH 80% (N) das cepas NPCD-2 (*Limnothrix* sp) e NPDF-2 (*Leptolyngbya* sp), apresentaram 12 mm e 15 mm de diâmetro, respectivamente, enquanto o extrato MeOH 80% (N) da cepa NPBT-1 (*Tychonema* sp) apresentou 9 mm de zona de inibição para a levedura *C. albicans* (Tabela II).

O extrato NPPE-1 (*Planktothrix* sp) (N) MeOH 20%, apresentou uma zona de inibição em torno de 8mm de diâmetro, para a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (ATCC 25923). O extrato NPFX-1 (*Leptolyngbya* sp) (N) MeOH 80% apresentou uma de zona de inibição de 9 mm diâmetro para a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* (ATCC 27853) (Tabela II).

É importante ressaltar que todos os extratos MeOH 80% (N) que apresentaram resultados positivos, pertencem aos gêneros *Limnothrix* sp, *Leptolyngbya* sp e *Tychonema* sp, sendo representados pelas famílias Pseudoanabaenaceae e Phormidiaceae. Como podemos observar as cepas NPDF-2 e NPFX-1 que pertencem ao gênero *Leptolyngbya* sp, apresentaram resultados positivos para diferentes microorganismos (*C. Albicans* e *S. Aureus*, respectivamente), o que sugere que estas cepas na verdade representem tipos fisiológicos diferentes.

De todos os extratos utilizados nenhum apresentou resultado positivo quando foram testados com a bactéria Gram-negativa *E. coli* (ATCC 25922) (Tabela II).

Além disso, todos os extratos das cepas NPRG-1; NPFE-1; NPPE -3; NPLJ-5; NPLB-5 e NPBT-2 apresentaram resultados negativos para todos os microorganismos testados.

Apenas os extratos das cepas NPDF-2 (*Leptolyngbya* sp) e NPCD-2 (*Limnothrix* sp) repetiram os resultados inibitórios sobre *C. Albicans*, após manutenção a - 18°C por 30-45 dias, porém o diâmetro da zona de inibição foi menor. (Tabela III).

**Tabela II** - Diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm) dos microorganismos testados com diferentes extratos feitos pelo processo de extração normal(N):

Extratos	<i>C. albicans</i> =ATCC 18804	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
NPDC-2 (Limnothrix sp) MeOH 80%	12 (++)	(-)	(-)	(-)
NPPE-1 (Planktothrix sp) MeOH 20%	(-)	(-)	(-)	8 (+)
NPDF-2 (Leptolyngbya sp) MeOH 80%	15 (++)	(-)	(-)	(-)
NPBT-1 (Tychonema sp) MeOH 80%	9 (+)	(-)	(-)	(-)
NPFX-1 (Leptolyngbya sp) MeOH 80%	(-)	(-)	(-)	(-)

Diâmetro da zona de inibição:

< 8 mm → (-) resistente; 8 - 11mm → (+) inibição fraca; 12 - 15mm → (++) inibição

**Tabela III** - Diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm) dos microorganismos no segundo teste com os extratos das cepas NPCD-2, NPPE-1, NPDF-2 e NPBT-1:

Extratos	<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 18804	ATCC 25922	ATCC 25923	ATCC 27853
NPDC-2 (Limnothrix sp) MeOH 80%			8 (+)	(-)
NPPE-1 (Planktothrix sp) MeOH 20%			(-)	(-)
NPDF-2 (Leptolyngbya sp) MeOH 80%			9 (+)	(-)
NPBT-1 (Tychonema sp) MeOH 80%			(-)	(-)

Diâmetro da zona de inibição:

< 8 mm → (-) resistente; 8 - 11mm → (+) inibição fraca; 12 - 15mm → (++) inibição

**Tabela IV** - Diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm) de alguns antibióticos contra algumas cepas controle (de acordo com Barry & Thornsberry, 1991):

Antibióticos	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
	ATCC 25922	ATCC 25923	ATCC 25923	ATCC 27853	ATCC 27853	A-26	A-26	A-26
Amoxicilina (20/10 µg)	19-25		28-36		-		-	
Ampicilina (10 µg)	16-22		27-35		-		-	
Imipinem (10 µg)	26-32		-		20-28		20-28	
Gentamicina (10 µg)	19-26		19-27		16-21		16-21	
Laxaficina A+B (25+50 µg) (Frankmölle <i>et al.</i> , 1992a)	-		-		-		-	26

Após o fracionamento desses extratos em cartuchos de octadesilsilano (C-18), nenhuma das frações apresentou atividade.

Outros cultivos foram realizados com todas as cepas de cianobactérias testadas, no entanto, não conseguimos reproduzir os resultados obtidos nos antibiogramas anteriores.

Os extratos MeOH 80%, obtidos pelo processo de extração utilizando solventes numa escala da menor para a maior polaridade (MeOH 80% → MeOH 20% → H<sub>2</sub>O), processo que denominamos como invertido (I), também não mostraram resultados satisfatórios, nem mesmo os extratos das cepas NPFE-3, NPDF-2, NPFE-1 e NPLJ-5 que foram submetidos ao processo de partição.

Os resultados obtidos na Tabela II estão de acordo com o trabalho de vários pesquisadores, que também encontraram atividade antimicrobiana em extratos de outras cepas de cianobactérias (Cano *et al.*, 1986; Caire *et al.*, 1987; Bloor & England, 1989; Cano *et al.*, 1990; Mulé *et al.*, 1991; Frankmölle *et al.*, 1992), como exemplo podemos citar um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra uma variedade de fungos e bactérias encontrado no produto extracelular de uma cepa da espécie *Nostoc muscorum*, com a zona de inibição de crescimento variando entre 0-15 mm (Bloor & England, 1989). Alguns compostos já isolados de extratos de cianobactérias apresentam o diâmetro da zona de inibição similar ao de muitos antibióticos já utilizados comercialmente. (Tabela IV), e como podemos ver as bactérias *E. Coli* e *S. Aureus* são as mesmas utilizadas em nosso experimento.

A diminuição no diâmetro da zona de inibição ou a perda de atividade dos extratos, levanta as seguintes hipóteses:

- 1) A concentração do metabólito bioativo no extrato bruto estaria em quantidades mínimas, não sendo possível detectá-lo através dos testes biológicos aqui realizados (antibiograma);
- 2) Em condições favoráveis de cultivo, as cianobactérias diminuiriam a produção de antibiótico ao longo do tempo e portanto testes sucessivos tenderiam a mostrar uma perda de atividade;
- 3) Os microorganismos utilizados para os testes poderiam não ter mantido o mesmo padrão de resposta, em consequência de modificações genéticas na população;



- 4) O tratamento das cepas com antibióticos (fungicidas e bactericidas) poderia levar à inibição da produção do metabólito bioativo;
- 5) Modificações genéticas poderiam ocorrer nas cianobactérias, devido ao grande número de repiques, o que levaria a perda de atividade biológica;
- 6) A variação na diversidade e densidade de outros microorganismos (bactérias ou fungos), mesmo em pequenas quantidades poderiam levar a uma alteração na produção do antibiótico.

Estes resultados estão em concordância com o trabalho realizado por Patterson *et al.*, (1991) onde ficou demonstrado que de 120 cepas classificadas como citotóxicas, apenas 56% das cepas confirmaram a bioatividade quando cultivadas novamente. Além disso, extratos de cianobactérias em cultura geralmente apresentam menor atividade, quando comparadas com material coletado no ambiente (Gerwick *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1988 -citado em Armstrong *et al.*, 1991). A perda de atividade ao longo dos cultivos pode ocorrer seja pela falta de competição interespecífica na cultura, ou pela disponibilidade elevada de nutrientes. Ambos os fatores fariam com que as cianobactérias em condições de cultivo alterassem muitas vias metabólicas, por não precisassem elaborar compostos metabolicamente dispendiosos para sobreviver pois não estariam sofrendo nenhum tipo de pressão ambiental.

Vale a pena ressaltar que em nossos experimentos a grande maioria das cepas que apresentaram resultados positivos no primeiro antibiograma foram isoladas no próprio laboratório (NPDF-2, NPCD-2, NPPE-1 e NPBT-1), ou seja, tinham menor tempo em cultivo, enquanto que das cepas que vieram de outros bancos de cultura, a única que apresentou resultado positivo foi a cepa NPFX-1. Um outro fator importante foi que o intervalo de tempo entre o primeiro cultivo "batch" e o segundo foi de aproximadamente de 1 ano, o que pode ter influenciado na perda de atividade dos extratos.

Em resumo, os antibiogramas demonstraram que:

- 1) Das 11 cepas testadas, 5 delas produziram extratos que apresentaram o diâmetro das zonas de inibição igual ou maior que 8 mm;
- 2) A levedura *Candida albicans* constitui o teste biológico mais sensível aos efeitos dos extratos das cepas estudadas neste trabalho.

### 4.3 - ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

A resposta inflamatória envolve um conjunto de eventos (trauma, injúria tecidual, presença de fagócitos e de mediadores inflamatórios, sintomas e sinais inflamatórios) que a caracterizam e podem determinar parâmetros fisiopatológicos para sua avaliação. Dependendo da natureza do estímulo injuriante, o processo pode ser iniciado através da ativação dos sistemas plasmáticos à saber: o das cininas (liberação de bradicinina), o do complemento (liberação de anafilatoxinas) e o da plasmina (formação de fibrina). Este último está diretamente relacionado com o processo de agregação plaquetária, uma vez que estas, quando ativadas durante o processo injuriante, constituem-se em foco de localização para a formação de fibrina (Rang, 1997). As plaquetas, também envolvidas no processo inflamatório, são capazes de operar no organismo mecanismos de defesa contra o agente injuriante, como liberação de estímulos quimiotáticos para leucócitos (Copley, 1979; Page, 1989; Capron *et al.*, 1987-citados em Mannaioni *et al.*, 1997). Desta forma, um dos modelos experimentais que pode indiretamente sugerir a potencial atividade pró ou antiinflamatória de novas drogas, principalmente dos produtos naturais, é o de agregação plaquetária "in vitro". Este modelo é baseado no contexto participativo das plaquetas na reação inflamatória e na capacidade agregante de vários mediadores endógenos (Fator de ativação de plaquetas - PAF, Difosfato de adenosina - ADP, colágeno, ácido aracônico, etc) que podem ser utilizados como parâmetros para comparação.

Nos testes de agregação plaquetária foram ensaiadas as frações MeOH 20% e H<sub>2</sub>O de todas as cepas, tanto no processo de extração normal (N) quanto no processo invertido (I). As frações MeOH 80% (N) de algumas cepas foram também testadas, porém apresentaram resultados ainda inconclusivos.

Os testes iniciais realizados com os agentes agregantes PAF e ADP (frações MeOH 20% e H<sub>2</sub>O) que apresentaram percentuais de agregação superiores a 55%, valores considerados muito altos, foram descontinuados e portanto não foram realizados os testes subsequentes de avaliação da influência dos extratos nas plaquetas, na ausência dos mediadores endógenos.

Nos primeiros testes os extratos pareciam estar inibindo a agregação plaquetária. Como podemos ver na Tabela V, os melhores resultados obtidos foram com os extratos da cepa NPFX-1 (I) MeOH 20%, que apresentou 28,57% de agregação plaquetária em

plaquetas de rato induzidas por ADP, e nos extratos das cepas NPFX-1 (I) H<sub>2</sub>O; NPFE-1 (I) MeCH 20% e NPCD-2 (I) H<sub>2</sub>O que apresentaram 54,42%, 52,31% e 0%, respectivamente, de agregação plaquetária em plaquetas de carneiro induzidas por PAF.

Estes resultados preliminares, fizeram com que selecionássemos estas três cepas para serem testadas nos experimentos posteriores de agregação plaquetária. Entretanto, ao longo dos experimentos, observamos que quando os extratos eram incubados sem o estímulo do ADP ou do PAF, os mesmos eram capazes de induzir agregação plaquetária, e quando se acrescentava o agonista (PAF ou ADP) ocorria apenas um pequeno aumento na agregação plaquetária, pois as plaquetas já haviam sido agregadas anteriormente. Por tanto, não podemos afirmar nos testes realizados anteriormente quanto da agregação plaquetária observada ocorreu pela adição do extrato e quanto ocorreu pela adição do agonista, pois, não foram feitos experimentos com os extratos sem a adição do agonista. Como pode ser visto na Tabela V, os percentuais baixos de agregação podem ser devidos à presença de um estoque de plaquetas que já haviam agregado por influência do agonista.

A utilização de plasma de carneiro, nos testes de agregação plaquetária, faz parte de um protocolo em estabelecimento no Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmacodinâmica da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). No entanto, a dificuldade na obtenção de sangue de carneiro, além do fato de não se ter conhecimento na literatura da utilização de plasma de carneiro em testes de agregação plaquetária, fez com que resolvessemos trabalhar apenas com sangue de rato e coelho nos experimentos posteriores.

**Tabela V** - Efeito dos extratos (I) de cepas de cianobactérias sobre a agregação plaquetária, com percentuais de agregação inferior à 55%:

Agonista	Antagonista	Agregação (cm)	EPM	N	P.A	Plasma
ADP $10^{-6}$ M	NaCl 0,9%	7,7 ± 0,2	0,157	6	28,57	Rato
ADP $10^{-6}$ M	NPFEX-1 MeOH 20% (0,5 mg/mL)	2,2 ± 0,1*	0,096	4		
PAF $10^{-7}$ M	NaCl 0,9%	7,3 ± 0,3	0,310	6		Carneiro
PAF $10^{-7}$ M	NPFEX-1 H <sub>2</sub> O (0,6 mg/mL)	3,9 ± 0,3*	0,248	5	54,42	
PAF $5 \times 10^{-7}$ M	NaCl 0,9%	6,5 ± 0,4	0,4	2		Carneiro
PAF $5 \times 10^{-7}$ M	NPFE-1 MeOH 20% (0,6 mg/mL)	3,4 ± 0,1*	0,1	2	52,31	
PAF $5 \times 10^{-7}$ M	NaCl 0,9%	6,1 ± 0,4	0,135	9		Carneiro
PAF $5 \times 10^{-7}$ M	NPCD-2 H <sub>2</sub> O (0,6 mg/mL)	0,0 ± 0,0*	0,0	4	0	

\* -  $p < 0,05$

\*\* -

\*\*\* - (0,6 mg/mL)

(I) - Processo de extração invertido

P.A - Percentual de agregação

N - Número de amostras

EPM - Erro Padrão da Média

#### 4.3.1 - TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

##### 4.3.1.1 - Cepa NPFX-1 MeOH 20% (*Leptolyngbya* sp)

###### A) Rato

Como poderemos ver a seguir, os testes em plasma de rato, induzido por ADP, realizados com o extrato da cepa NPFX-1 (I) 0,6 mg/mL, apresentaram índices de agregação plaquetária em torno de 29,35%, em relação ao controle. No entanto, quando o mesmo foi testado sem o estímulo do ADP, houve agregação plaquetária em torno de 54,35% (Figura 3 e Tabela VI). Várias concentrações do extrato da cepa NPFX-1 (I) foram testadas em plasma de rato, induzido ou não por ADP. Os resultados mostraram que o extrato induz agregação plaquetária, diretamente proporcional à sua concentração, sem pré-indução por ADP (Figura 4 e Tabela VI).

O extrato da cepa NPFX-1 (N) 0,6 mg/mL, apresentou agregação plaquetária de 49,45%, quando testado em plasma de rato induzido por ADP (Figura 5 e Tabela VI). Porém, quando várias concentrações do extrato foram testadas, em plasma de rato na ausência de ADP, os resultados mostraram que houve apenas uma pequena indução na agregação plaquetária entre 19,05 e 22,86% e esta agregação não foi dose dependente (Figura 6 e Tabela VI).

###### B) Coelho

O extrato da cepa NPFX-1 (I) 0,6 mg/mL testado em plasma de coelho apresentou um percentual de agregação plaquetária induzido por ADP em torno de 42,11% em relação ao controle; entretanto, no extrato NPFX-1 (N) 0,6 mg/mL o percentual de agregação plaquetária foi zero (Figuras 7 e 8 e Tabela VI).

Quando induzido por PAF o percentual de agregação plaquetária, nos testes com o extrato da cepa NPFX-1 (I) 0,6 mg/mL testado em plasma de coelho foi de 102,91%, ou seja, mais do que o controle porém estatisticamente sem significado. Enquanto que o extrato NPFX-1 (N) 0,6 mg/mL, apresentou um percentual de 8,86% (Figuras 9 e 10 e Tabela VI).

Quando 0,1 mg/mL do extrato NPFX-1 (N) foi testado em plasma de coelho sem o estímulo de PAF, a agregação plaquetária atingiu 93,20% em relação ao controle. Porém, o percentual de agregação plaquetária foi zero, quando o mesmo foi induzido pelo PAF. Neste resultado fica claro que o extrato NPFX-1 (N), mesmo em concentrações baixas, pode ter um potencial como agente agregante em plasma de coelho similar ao PAF (Figura 11 e Tabela VI).

Nestes resultados, aparentemente contraditórios, observamos agregação muito reduzida na presença dos agonistas, sendo 0% para ADP e 8,86% para PAF, e por outro lado a alta agregação plaquetária, de 93,20%, na ausência do agonista reflete o mesmo fenômeno. Como descrevemos, em material e métodos (3.6.2.4), os testes foram realizados por leituras sucessivas nas seguintes condições de incubação do plasma: 1) Salina + agente agregante (controle); 2) extrato e 3) extrato + agente agregante. Portanto, caso não seja feita uma determinação da agregação sem a presença do agonista, o teste desconsiderará toda a agregação que ocorreu antes da adição do agonista, o que pode levar a interpretações errôneas de um possível efeito de inibição de agregação plaquetária, quando na verdade, o que pode estar ocorrendo é uma agregação prévia à adição do agonista.

Podemos observar como conclusão que os extratos NPFX-1 obtidos pelo processo de extração (I) apresentaram um poder de agregação plaquetária maior do que os obtidos pelo processo de extração (N), independe do agonista (ADP/PAF) e do tipo de soro utilizado (rato/coelho).

Tabela VI - Agregação plaquetária do extrato MeOH 20% da cepa NPFX1:

Agonista	Extrato	Agregação (cm)	P. A.	EPM	N	Plasma
ADP $10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	9,2 ± 1,4	100,0	0,264	28	Rato
ADP $10^{-6}$ M	NPFX-1 (I) (0,6mg/mL)	2,7 ± 1,1*	29,35	0,211	25	
	NPFX-1 (I) (0,6mg/mL)	5,0 ± 0,8*	54,35	0,383	04	
ADP $10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	10,5 ± 1,0	100,0	0,421	6	Rato
ADP $10^{-6}$ M	NPFX-1 (I) (0,6mg/mL)	2,3 ± 0,2*	21,90	0,103	6	
	NPFX-1 (I) (0,6mg/mL)	5,0 ± 0,8*	47,62	0,383	4	
ADP $10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	10,5 ± 1,0	100,0	0,421	6	Rato
ADP $10^{-6}$ M	NPFX-1 (I) (0,3mg/mL)	4,7 ± 0,6*	44,76	0,278	4	
	NPFX-1 (I) (0,3mg/mL)	2,5 ± 0,3*	23,81	0,171	4	
ADP $10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	10,5 ± 1,0	100,0	0,421	6	Rato
ADP $10^{-6}$ M	NPFX-1 (I) (0,2mg/mL)	3,9 ± 0,3*	37,14	0,186	3	
	NPFX-1 (I) (0,2mg/mL)	0,6 ± 0,0*	5,71	6 x 10 <sup>-9</sup>	3	
ADP $10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	9,1 ± 1,2	100,0	0,287	18	Rato
ADP $10^{-6}$ M	NPFX-1 (N) (0,6mg/mL)	4,5 ± 0,6*	49,45	0,136	18	
ADP $10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	10,5 ± 1,0	100,0	0,421	6	Rato
ADP $10^{-6}$ M	NPFX-1 (N) (0,4mg/mL)	7,9 ± 0,2*	75,24	0,150	2	
	NPFX-1 (N) (0,4mg/mL)	2,0 ± 0,1*	19,05	0,100	2	
ADP $10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	10,5 ± 1,0	100,0	0,421	6	Rato
ADP $10^{-6}$ M	NPFX-1 (N) (0,3mg/mL)	8,7 ± 0,7*	82,86	0,332	4	
	NPFX-1 (N) (0,3mg/mL)	2,1 ± 0,4*	20,00	0,185	4	
ADP $10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	10,5 ± 1,0	100,0	0,421	6	Rato
ADP $10^{-6}$ M	NPFX-1 (N) (0,2mg/mL)	9,4 ± 0,1*	89,52	0,041	4	
	NPFX-1 (N) (0,2mg/mL)	2,4 ± 0,2*	22,86	0,111	4	
ADP 2 X $10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	7,6 ± 0,4	100,0	0,145	6	Coelho
ADP 2 X $10^{-6}$ M	NPFX-1 (I) (0,6mg/mL)	3,2 ± 0,4*	42,11	0,176	6	
ADP 2 X $10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	8,1 ± 0,7	100,0	0,285	6	Coelho
ADP 2 X $10^{-6}$ M	NPFX-1 (N) (0,6mg/mL)	0,0 ± 0,0*	0,0	0,0	6	
PAF 5 X $10^{-8}$ M	NaCl 0,9% (controle)	10,3 ± 0,9	100,0	0,377	6	Coelho
PAF 5 X $10^{-8}$ M	NPFX-1 (I) (0,6mg/mL)	10,6 ± 0,9	102,91	0,390	6	
PAF 5 X $10^{-8}$ M	NaCl 0,9% (controle)	7,9 ± 1,2	100,0	0,367	6	Coelho
PAF 5 X $10^{-8}$ M	NPFX-1 (N) (0,6mg/mL)	0,7 ± 0,8*	8,86	0,235	6	
PAF $10^{-7}$ M	NaCl 0,9% (controle)	10,3 ± 1,2	100,0	0,612	4	Coelho
PAF $10^{-7}$ M	NPFX-1 (N) (0,1 mg/mL)	0,0 ± 0,0*	0,0	0,0	6	
	NPFX-1(N) (0,1 mg/mL)	9,6 ± 0,6	93,20	0,252	6	

\* - p &lt; 0,05

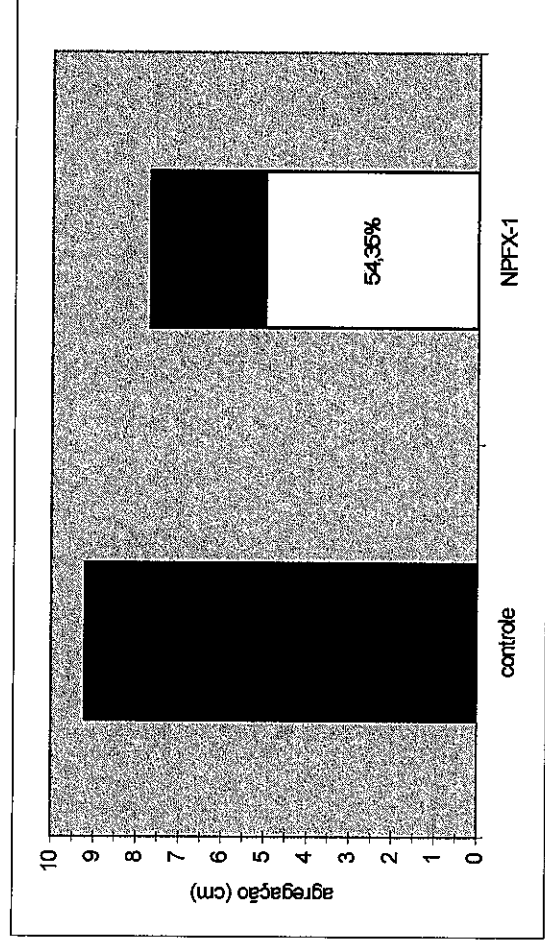
(I) - Processo de extração invertido

(N) - Processo de extração normal

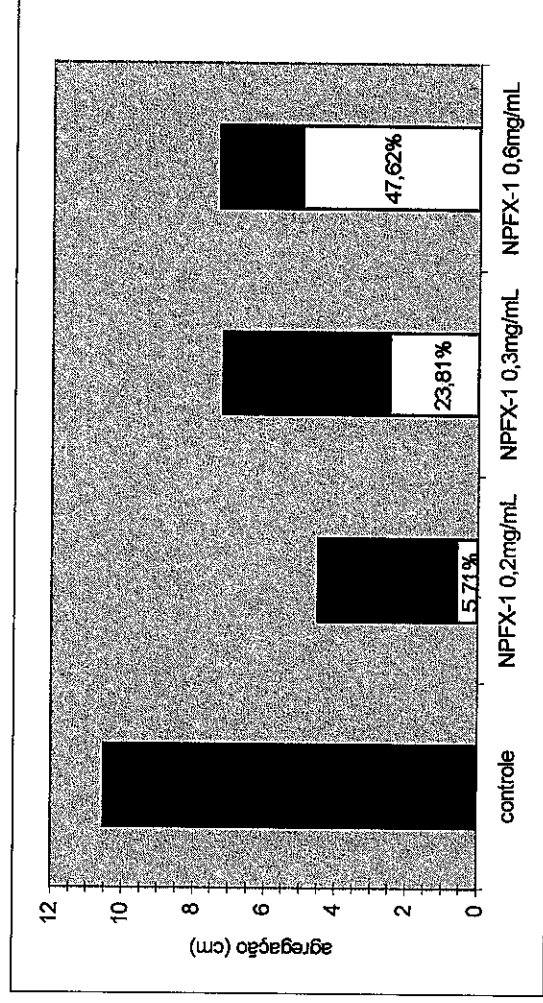
EPM - Erro Padrão da Média

N - Número de Amostras

P.A. - Percentual de Agregação

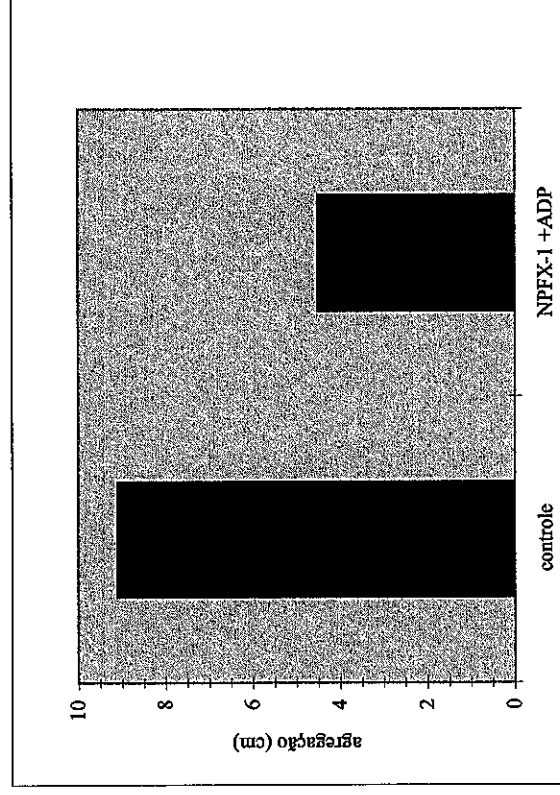


**Figura 3** - Agregação plaquetária em plasma de rato induzida pelo extrato da cepa NPFX-1 (I) MeOH 20% 0,6 mg/mL antes (□) e após (■) a adição de ADP à amostra, controle 100% (■).

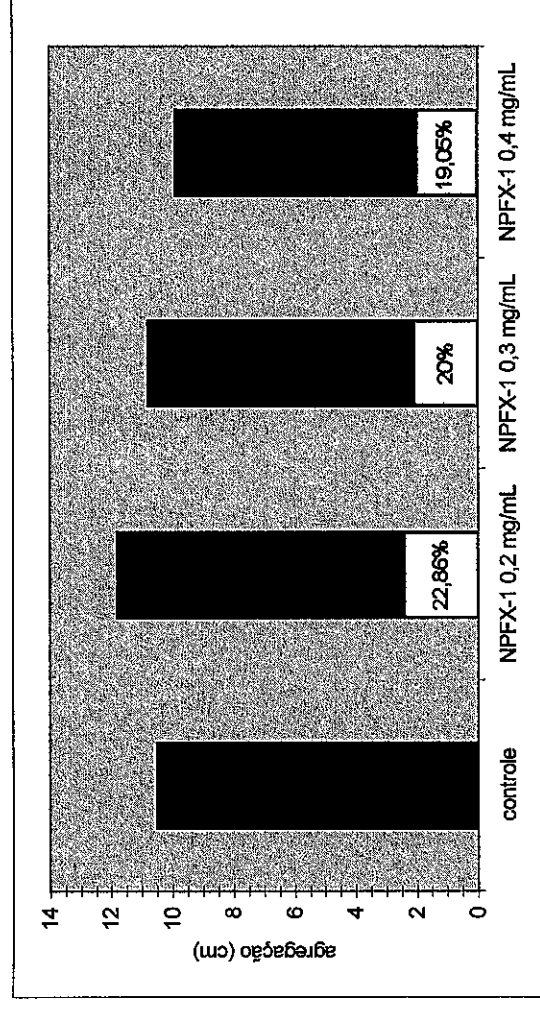


**Figura 4** - Agregação plaquetária em plasma de rato induzida pelo extrato da cepa NPFX-1 (I) MeOH 20%, sob várias concentrações, antes (□) e após (■) a adição de ADP à amostra, controle 100% (■).

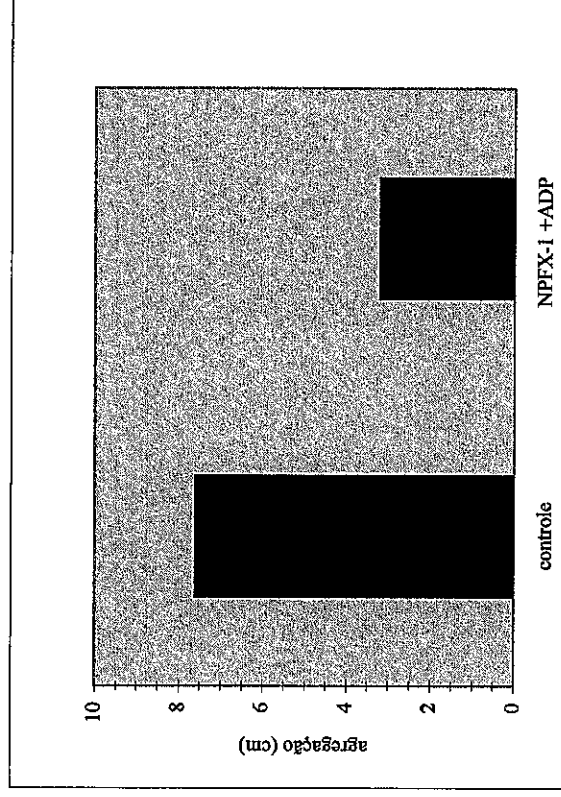




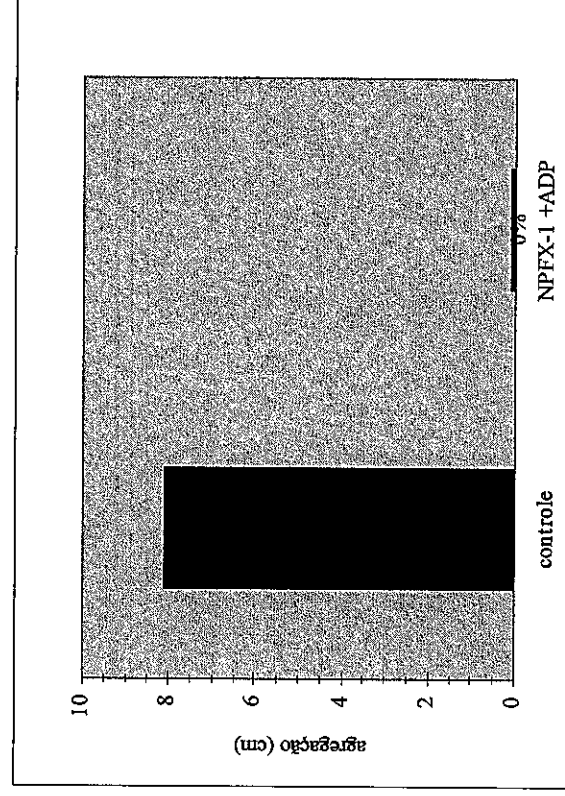
**Figura 5** - Agregação plaquetária em plasma de rato na presença do extrato da cepa NPEX-1 (N) MeOH 20% 0,6 mg/mL induzida por ADP (■), controle 100% (■).



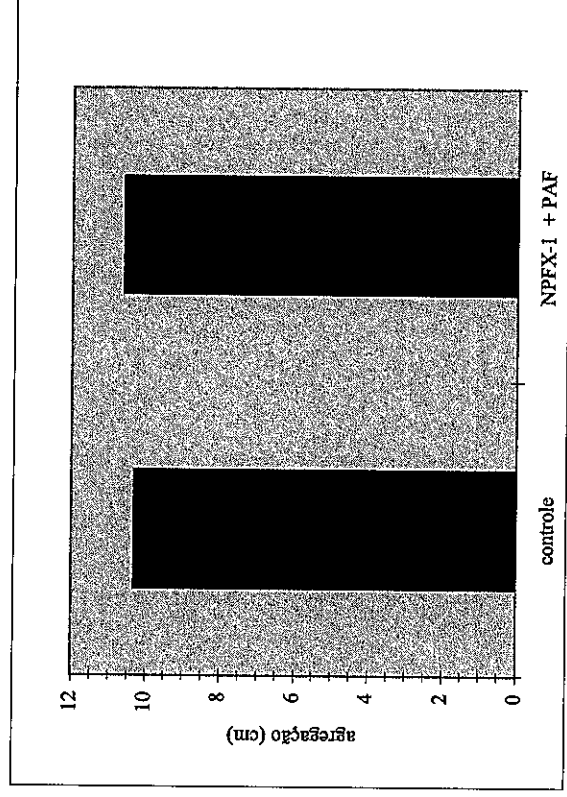
**Figura 6** - Agregação plaquetária em plasma de rato induzida pelo extrato da cepa NPEX-1 (N) MeOH 20%, sob várias concentrações, antes (□) e após (■) a adição de ADP à amostra, controle 100% (■).



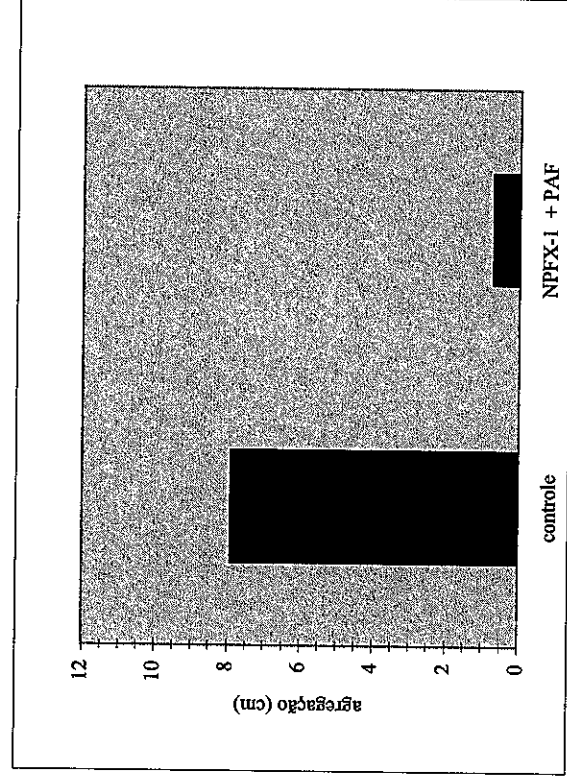
**Figura 7** - Agregação plaquetária em plasma de coelho na presença do extrato da cepa NPFX-1 (I) MeOH 20% 0,6 mg/mL induzida por ADP (■), controle 100% (■)



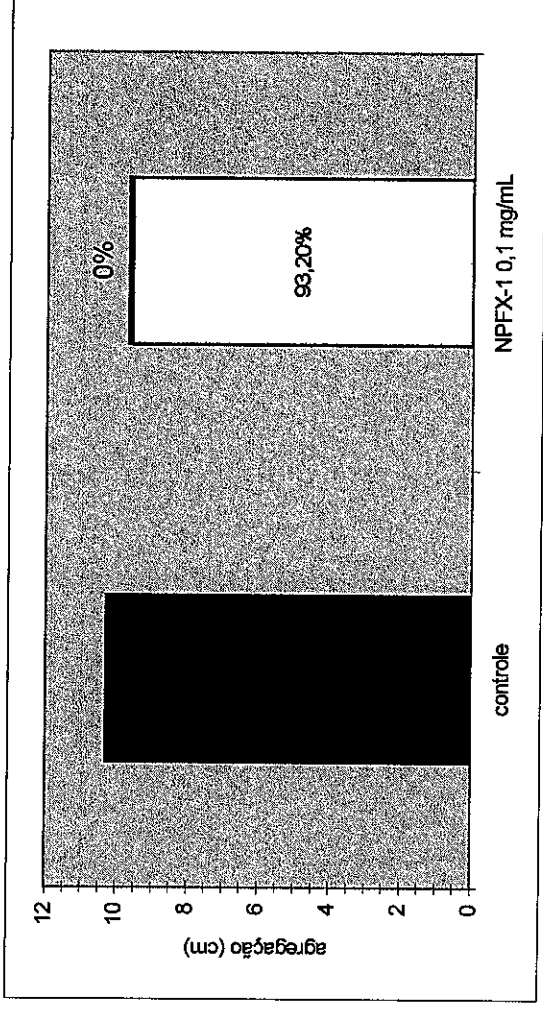
**Figura 8** - Agregação plaquetária em plasma de coelho na presença do extrato da cepa NPFX-1 (N) MeOH 20% 0,6 mg/mL induzida por ADP (■), controle 100% (■)



**Figura 9** - Agregação plaquetária em plasma de coelho na presença do extrato da cepa NPFX-1 (I) MeOH 20% 0,6 mg/mL induzida por PAF (■), controle 100% (■).



**Figura 10** - Agregação plaquetária em plasma de coelho na presença do extrato da cepa NPFX-1 (N) MeOH 20% 0,6 mg/mL induzida por PAF (■), controle 100% (■).



**Figura 11** - Agregação plaquetária em plasma de coelho induzida pelo extrato da cepa NPFX-1 (N) MeOH 20% 0,1 mg/mL antes (□) e após (■) a adição de PAF à amostra, controle 100% (■).

#### 4.3.1.2 - Cepa NPFE-1 MeOH 20% (*Tychonema* sp)

##### A) Rato.

O extrato da cepa NPFE-1 (I) 0,6 mg/mL quando testado em plasma de rato apresentou índices de agregação plaquetária induzida por ADP em torno de 96,77%. No entanto, não foram realizados testes sem o estímulo do ADP para avaliarmos o potencial de agregação plaquetária desses extratos. Também não foram feitos testes com o extrato da cepa NPFE-1 (N) em plasma de rato induzido ou não por ADP. (Figura 12 e Tabela VII).

##### B) Coelho

O extrato da cepa NPFE-1 (N) 0,6 mg/mL, quando testado em plasma de coelho apresentou um percentual de agregação plaquetária induzida por ADP, em torno de 8,14%. Não foram realizados testes sem o estímulo do ADP para avaliarmos o real potencial de agregação plaquetária dos extratos. Não foram feitos testes com o extrato da cepa NPFE-1 (I) em plasma de coelho induzido ou não por ADP (Figura 13 e Tabela VII).

São necessários mais testes com estes extratos para confirmarmos estes dados.

O extrato da cepa NPFE-1(I) 0,6 mg/mL, apresentou índices de agregação plaquetária induzido por PAF, em torno de 82,52%, quando testado em plasma de coelho, enquanto o extrato da cepa NPFE-1 (N) 0,6 mg/mL apresentou índices em torno de 30.10% de agregação plaquetária (Figuras 14 e 15 e Tabela VII).

Um teste realizado com várias concentrações do extrato NPFE-1(I) sem adição de PAF, demonstrou que houve uma indução na agregação plaquetária entre 73-83 %, mesmo em concentrações cerca de 1/5 das utilizadas em presença do indutor (Figura 16 e Tabela VII).

Infelizmente, não foram realizados testes com o extrato da cepa NPFE-1 (N) sem adição de PAF para avaliarmos o potencial de agregação.

Como podemos observar o extrato NPFE-1 obtido pelo processo de extração (I) independe do agonista (ADP/PAF) e do tipo de soro utilizado (rato/coelho), também apresentou um poder de agregação plaquetária maior do que o obtido pelo processo de extração (N).

**Tabela VII** - Agregação plaquetária pelo extrato MeOH 20% da cepa NPFE-1:

Agonista	Extrato	Agregação (cm)	P. A	EPM	N	Plasma
ADP $10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	9,3 ± 2,1	100,0	0,856	6	Rato
ADP $10^{-6}$ M	NPFE-1 (I) (0,6 mg/mL)	9,0 ± 0,9	96,77	0,432	4	
ADP $2 \times 10^{-6}$ M	NaCl 0,9% (controle)	8,6 ± 0,6	100,0	0,168	12	Coelho
ADP $2 \times 10^{-6}$ M	NPFE-1 (N) (0,6 mg/mL)	0,7 ± 0,8*	8,14	0,224	12	
PAF $5 \times 10^{-8}$ M	NaCl 0,9% (controle)	10,3 ± 0,9	100,0	0,271	6	Coelho
PAF $5 \times 10^{-8}$ M	NPFE-1 (I) (0,6 mg/mL)	8,5 ± 1,1*	82,52	0,307	6	
PAF $5 \times 10^{-8}$ M	NaCl 0,9% (controle)	10,3 ± 1,2	100,0	0,496	6	Coelho
PAF $5 \times 10^{-8}$ M	NPFE-1 (N) (0,6 mg/mL)	3,1 ± 0,4*	30,10	0,186	6	
PAF $10^{-7}$ M	NaCl 0,9% (controle)	12,3 ± 0,8	100,0	0,310	6	Coelho
---	NPFE-1 (I) (0,4mg/mL)	9,1 ± 0,1*	73,98	0,100	2	
---	NPFE-1 (I) (0,2mg/mL)	9,9 ± 0,1*	80,49	0,050	2	
---	NPFE-1 (I) (0,1mg/mL)	10,3 ± 0,8*	83,74	0,550	2	

\* -  $p < 0,05$

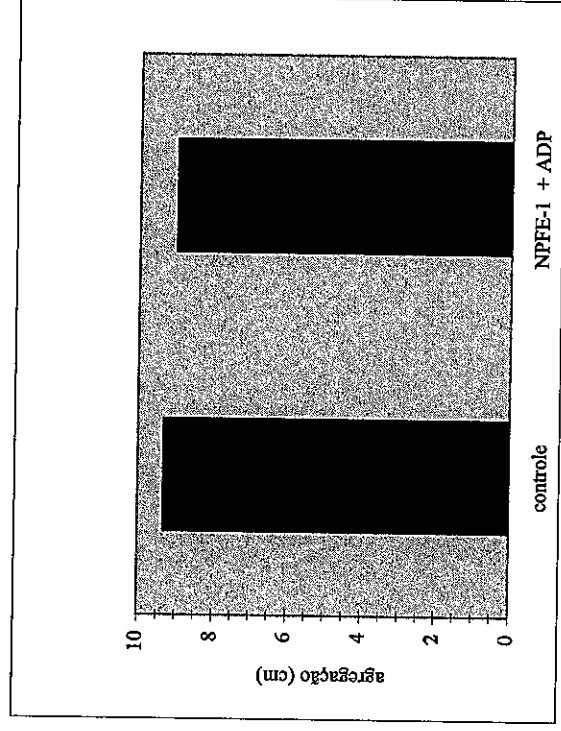
(N) - Processo de extração normal

(I) - Processo de extração invertido

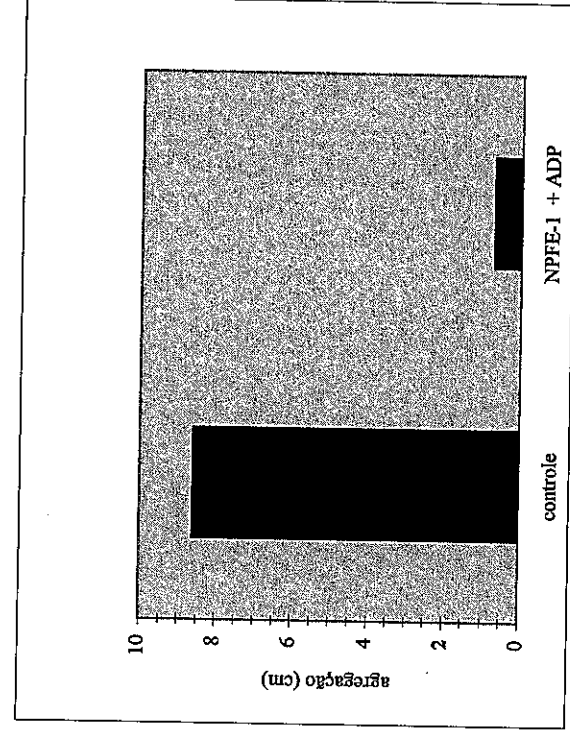
EPM\* - Erro Padrão da Média

N\* - Número de Amostras

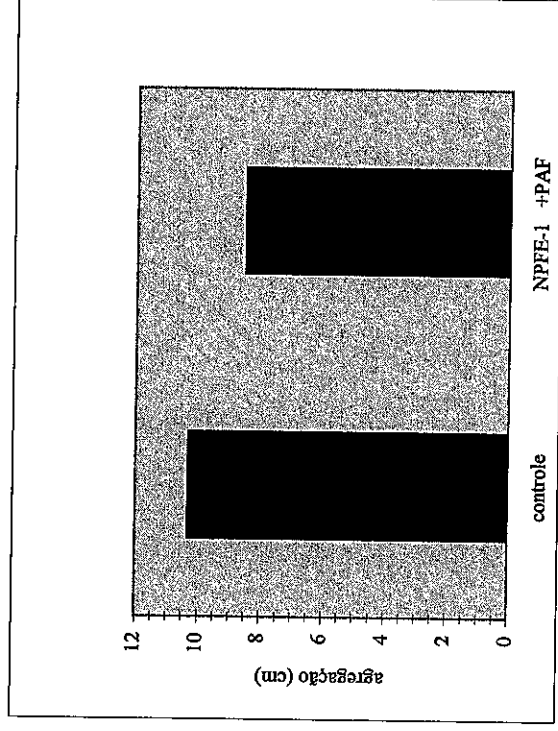
P.A.\* - Percentual de Agregação



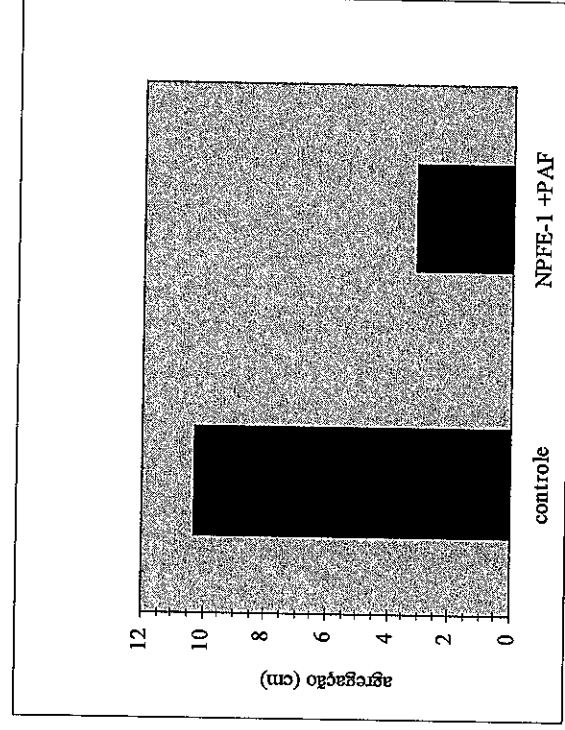
**Figura 12** - Agregação plaquetária em plasma de rato na presença do extrato da cepa NPFE-1 (D) MeOH 20% 0,6 mg/mL induzida por ADP (■), controle 100% (■).



**Figura 13** - Agregação plaquetária em plasma de coelho na presença do extrato da cepa NPFE-1 (N) MeOH 20% 0,6 mg/mL induzida por ADP (■), controle 100% (■).

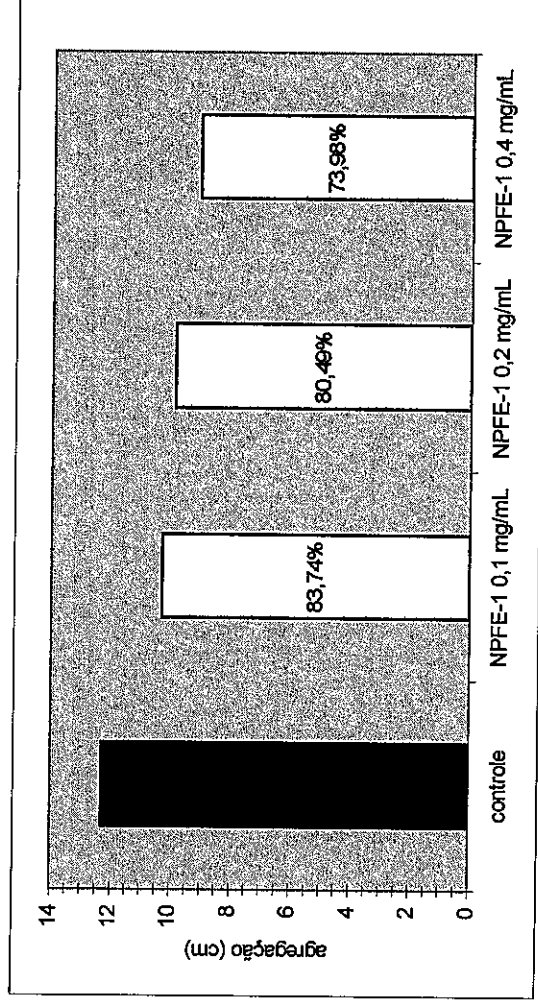


**Figura 14** - Agregação plaquetária em plasma de coelho na presença do extrato da cepa NPFE-1 (1) MeOH 20% 0,6 mg/mL induzida por PAF (■), controle 100% (■).



**Figura 15** - Agregação plaquetária em plasma de coelho na presença do extrato da cepa NPFE-1 MeOH 20% 0,6 mg/mL induzida por PAF (■), controle 100% (■).





**Figura 16** - Agregação plaquetária em plasma de coelho na presença do extrato da cepa NPFE-1 (I) MeOH 20% sob várias concentrações sem PAF (□), controle 100% (■).

#### 4.3.1.3 - Cepa NPCD-2 H<sub>2</sub>O (*Limnothrix* sp)

##### A) Coelho

O extrato da cepa NPCD-2 (I) H<sub>2</sub>O quando testado em plasma de coelho, apresentou um percentual de 4,6% na agregação plaquetária induzida por ADP e de 12,75% quando induzida por PAF. Porém, quando testados sem o estímulo dos agonistas os mesmos apresentaram percentuais de agregação acima do controle entre 113,9-115,7% (Figuras 17 e 18 e Tabela VIII). Como podemos ver estes extratos apresentaram um alto poder de agregação plaquetária, independente do agonista (ADP/PAF) utilizado.

Nos primeiros testes realizados com o extrato da cepa NPCD-2 (I) H<sub>2</sub>O em plasma de carneiro, os resultados pareciam mostrar uma inibição de 100% na agregação plaquetária induzida por PAF, o mesmo aconteceu nos testes posteriores realizados com plasma de coelho onde a agregação plaquetária também foi induzida por ADP ou PAF. Porém, quando realizamos os testes sem adição dos agonistas, os resultados evidenciaram o potente estímulo agregador dos extratos sobre as plaquetas. Este estímulo foi superior ao dos clássicos agentes endógenos ADP e PAF (Figuras 17 e 18 e Tabela VIII).

Estes resultados são decorrentes dos mesmos procedimentos discutidos para os extratos NPFX-1 (MeOH 20%) e NPFE-1 (MeOH 20%) (itens 4.2.1.1 e 4.2.1.2).

##### B) Rato

O extrato H<sub>2</sub>O da cepa NPCD-2 Não foi testada em plasma de rato.

Tabela VIII - Agregação plaquetária pelo extrato H<sub>2</sub>O da cepa NPCD-2:

Agonista	Antagonista	Agregação (cm)	EPM	N	P. A	Plasma
ADP 10 <sup>-5</sup> M	NaCl 0,9%	10,8 ± 0,9	0,264	12	100,0	Coelho
ADP 10 <sup>-5</sup> M	NPCD-2 (I) (0,6 mg/mL)	0,5 ± 0,7*	0,211	12	4,63	
	NPCD-2	12,3 ± 1,0*	0,302	12	113,89	
PAF 10 <sup>-7</sup> M	NaCl 0,9%	10,2 ± 0,6	0,177	012	100,0	Coelho
PAF 10 <sup>-7</sup> M	NPCD-2 (I) (0,6 mg/mL)	1,3 ± 0,9*	0,268	12	12,75	
	NPCD-2	11,8 ± 0,8*	0,232	12	115,69	

\* - p &lt; 0,05

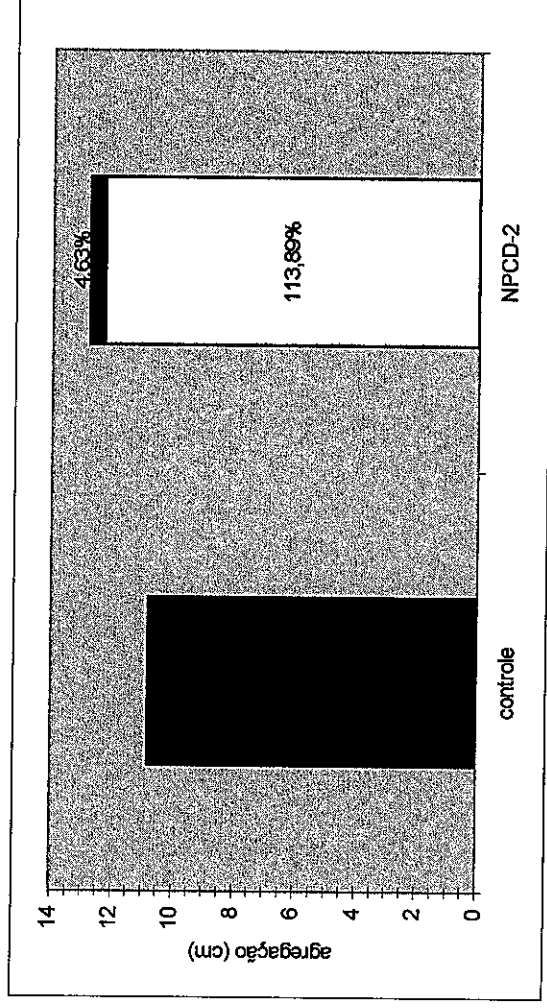
(I) - Processo de extração invertido

(N) - Processo de extração normal

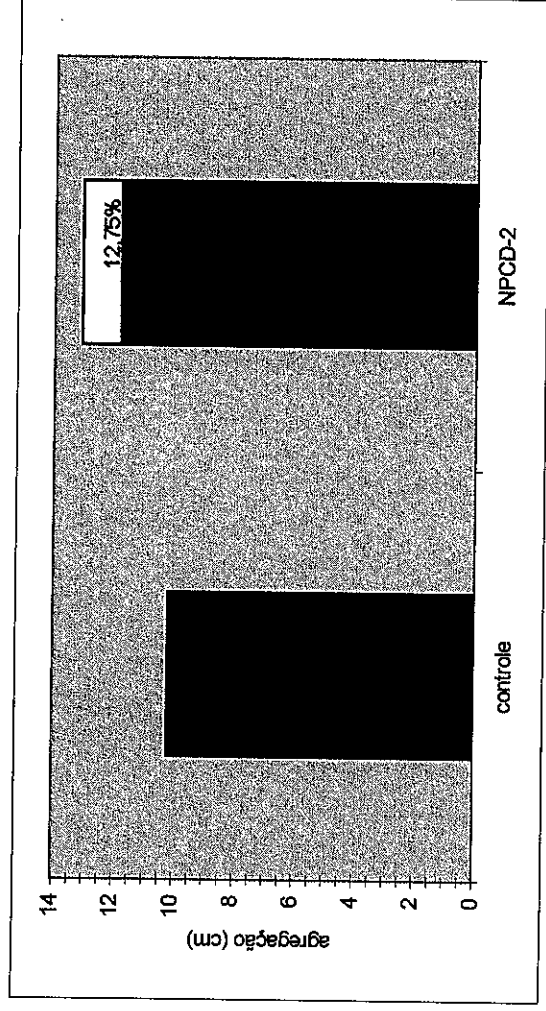
EPM - Erro Padrão da Média

N - Número de Amostras

P. A. - Percentual de Agregação



**Figura 17** – Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPCD-2 (□) H<sub>2</sub>O 0,6 mg/mL antes (□) e após (■) a adição de ADP à amostra, controle 100% (■).



**Figura 18** - Agregação plaquetária em plasma de coelho pelo extrato da cepa NPCD-2 (□) H<sub>2</sub>O 0,6 mg/mL antes (□) e após (■) a adição de PAF à amostra, controle 100% (■).

#### 4.4 - ATIVIDADE ANTIVIRAL E CITOTÓXICA

No teste antiviral e citotóxico foi utilizado o processo de extração normal (N), e somente as frações aquosas das cepas NPPE-3, NPBT-1, NPPE-1, NPBT-2, NPRG-1, NPDF-2 foram utilizadas. As outras cepas e as frações MeOH 20% e MeOH 80% não puderam ser analisadas quanto ao seu potencial antiviral e citotóxico.

Nos testes de citotoxicidade realizados para as células Hep-2, os extratos aquosos (N) das cepas NPRG-1 (*Leptolyngbya* sp) e NPDF-2 (*Leptolyngbya* sp) apresentaram 12,5 µg/mL, a cepa NPPE-3 (*Leptolyngbya* sp) apresentou 25 µg/mL e as cepas NPBT-1 (*Tychonema* sp), NPPE-1 (*Planktothrix* sp) e NPBT-2 (*Oscillatoria* sp) apresentaram 50 µg/mL de concentração máxima não tóxica, respectivamente (Tabela IX). Estes resultados podem ser considerados satisfatórios uma vez que a concentração inicial dos extratos foi de 200µg/mL, diminuindo até obtermos uma concentração não tóxica, para a realização dos ensaios antivirais. Esta alta citotoxicidade está de acordo com vários estudos realizados com extratos de cianobactéria, e podem vir a serem utilizados como potentes agentes anti câncer (Rinehart *et al.*, 1981; Norton & Wells, 1982; Barchi *et al.*, 1984; Moore *et al.*, 1984; Patterson *et al.*, 1984).

Nos testes antivirais realizados até o momento nenhum dos extratos testados apresentou atividade contra HSV-1 (Vírus herpes simplex tipo 1), embora exista uma grande quantidade de relatos na literatura de extratos de cianobactérias com atividade contra os vírus HSV-2 (Vírus Herpes simplex tipo 2), RSV (Vírus da insuficiência respiratória) e HIV-1 (Vírus da imunodeficiência humana adquirida) (Patterson *et al.*, 1993).

**Tabela IX** - Testes antivirais realizados com extratos aquosos (N) de cianobactérias:

Substância	Solução estoque	CMNT	PI
NPBT-1 ( <i>Tychonema</i> sp)	200µg/mL	50µg/mL	0,0
NPPE-1 ( <i>Planktothrix</i> sp)	200µg/mL	50µg/mL	0,0
NPBT-2 ( <i>Oscillatoria</i> sp)	200µg/mL	50µg/mL	0,0
NPRE-3 ( <i>Leptolyngbya</i> sp)	200µg/mL	25µg/mL	0,0
NPRG-1 ( <i>Leptolyngbya</i> sp)	200µg/mL	12,5µg/mL	0,0
NPDF- 2 ( <i>Leptolyngbya</i> sp)	200µg/mL	12,5µg/mL	0,0

**CMNT** - Concentração máxima não tóxica

**PI** - Porcentagem de inibição viral

#### 4.5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes biológicos realizados foram de grande importância, pois confirmaram o potencial dos extratos das cepas de cianobactérias da ordem *Oscillatoriales*, já observado por outros pesquisadores, como uma fonte promissora de novos metabólitos bioativos (Moore *et al.*, 1984; Armstrong *et al.*, 1991; Chauhan *et al.*, 1992 e Bagchi, 1995).

O fato, já suspeitado por outros pesquisadores, de que há perda de atividade de cepas em função do tempo de manutenção em cultura, foi confirmado neste trabalho e, foi um fator limitante nos testes para presença de substâncias antibióticas. Assim, só foi possível confirmar que as cianobactérias com os quais trabalhamos representam um potencial biotecnológico importante.

Tais cepas merecem uma investigação mais detalhada, que certamente permitirá o isolamento e purificação de moléculas de interesse farmacológico.

Os extratos das cepas NPFX-1 MeOH 20%, NPFE-1 MeOH 20% e NPCD-2 H<sub>2</sub>O, quando testados quanto a agregação plaquetária, tanto em plasma de rato quanto em plasma de coelho, na ausência dos agonistas (ADP ou PAF), demonstraram enorme capacidade de induzir agregação plaquetária, e este poder de agregação foi maior nos extratos obtidos pelo processo de extração (I), do que no obtido pelo processo de extração (N), independente do agonista (ADP/PAF) e do tipo de soro utilizado (rato/coelho).

A presença de substâncias que causam a agregação plaquetária em extratos de cianobactérias demonstram que a ocorrência desses microorganismos, em lagos e reservatórios, podem causar graves problemas ecológicos e/ou de saúde pública, ainda não devidamente estudados (Jochimsen *et al.*, 1997).

A utilização de água contaminada com esse tipo de metabólito, sem tratamento adequado, para consumo oral ou para a preparação de soluções de uso hospitalar como soros, soluções dialíticas, etc, poderá desencadear efeitos tóxicos de intensa gravidade, pois podem levar à formação de trombos na corrente sanguínea e conseqüentemente causar uma tromboembolia.

Além disso, a utilização desses corpos d'água contaminados, em atividade de lazer como esportes aquáticos e/ou pesca pode causar severas dermatites de contato (Moore *et al.*, 1984).

Os resultados obtidos quanto à alta citotoxicidade encontrada nos extratos de cepas NPRG-1 (N) H<sub>2</sub>O; NPDF-2 (N) H<sub>2</sub>O e da cepa NPPE-3 (N) H<sub>2</sub>O podem fornecer a base de dados científicos para o prosseguimento de um processo biotecnológico de desenvolvimento de novas drogas anti-câncer.

Os resultados apresentados neste trabalho são um primeiro passo para que análises químicas venham a ser realizadas, com o objetivo de caracterizar as moléculas responsáveis pelas atividades biológicas, e poderão servir para o desenvolvimento de novas drogas.



## 5- CONCLUSÕES

- A otimização nas condições de cultivo é de fundamental importância na produção de metabólitos bioativos;
- As cepas de cianobactérias estudadas neste trabalho demonstraram perda de atividade biológica, quando mantidas em cultivo por longos períodos, possivelmente decorrente da diminuição na produção do metabólito bioativo;
- Os extratos MeOH 80% das cepas NPCD-2; NPDF-2; NPBT-1; NPFX-1 (N) apresentaram os melhores resultados nos antibiogramas realizados;
- Das 11 cepas testadas, 5 delas produziram extratos que apresentaram zonas de inibição igual ou maior que 8 mm para um ou mais organismos testes utilizados;
- A levedura *Candida albicans* constitui o teste biológico mais sensível aos efeitos dos extratos das cepas estudadas neste trabalho.
- A bactéria Gram negativa *Escherichia coli* não foi inibida por nenhum dos três tipos de extratos (MeOH 80%; MeOH 20% e H<sub>2</sub>O) das 11 cepas utilizadas nos antibiogramas;
- Os extratos (N) e (I) das cepas NPFX-1 (MeOH 20%), NPFE-1 (MeOH 20%) e NPCD-2 (H<sub>2</sub>O) foram capazes de induzir intensa agregação plaquetária, sem o estímulo dos agonistas, ADP e PAF, tanto em plasma de rato quanto em plasma de coelho;
- Os extratos utilizados nos testes de citotoxicidade sugerem o potencial das cianobactérias como agentes anti-câncer;
- Os extratos das cepas utilizadas nos testes biológicos confirmaram que as cianobactérias são fonte promissora de metabólitos bioativos.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. (1985). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1- Introduction. Arch. Hydrobiol. / Suppl. 71, Algological Studies **38/39**: 291-302.
- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. (1988). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3- Oscillatoriales. Arch. Hydrobiol. / Suppl. 80, Algological Studies **50-53**: 327-472.
- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. (1990). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5- Stigonematales. Arch. Hydrobiol., Algological Studies **59**: 1-73.
- ARMSTRONG, J.E.; JANDA, K. E.; ALVARADO, B. & WRIGHT, A. E. (1991). Cytotoxin production by a marine *Lyngbya* strain (cyanobacterium) in a large-scale laboratory bioreactor. J. Appl. Phycol., **3**: 277-282.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; EVANS, W. R.; CARMICHAEL, W. W. & NAMIKOSHI, M. (1994). First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. J. Appl. Phycol., **6**: 261-265.
- BAKER, J. T. (1984). Seaweeds in pharmaceutical studies and applications. Hydrobiologia. **116/117**: 29-40.
- BARCHI, J. J.; MOORE, R. E. & PATTERSON, G. M. L. (1984) Acutiphycin and 20,21-didehydroacutiphycin, new antineoplastic agents from the cyanophyte *Oscillatoria acutissima*. J. Am. Chem. Soc., **106**: 8193-8197.
- BAGCHI, S. N. (1995). Structure and site of action of a algicide from a cyanobacterium, *Oscillatoria late-virens*. J. Plant. Physiol. **146**: 372-374.

- BAGCHI, S. N.; PALOD, A. & CHAUHAN, V. S. (1990) Algicidal properties of a bloom-forming blue-green alga, *Oscillatoria* sp. J. Basic. Microbiol., **30**: 21-29.
- BAGCHI, S. N. & MARWAH, J. B. (1994). Production of an algicide from cyanobacterium *Fischerella* species which inhibits photosynthetic electron transport. Microbios, **79**:187-193.
- BARRY, A. L. & THORNSBERRY, C. (1991). Susceptibility tests: Diffusion test procedures. In: Manual of Clinical Microbiology. 5<sup>a</sup> edição. Ed. Clyde Thornsberry, American society Microbiology, 1117-1125.
- BLOOR, S. & ENGLAND, R. R. (1989). Antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. J. Appl. Phycol., **1**: 367-372.
- BLOOR, S. & ENGLAND, R. R. (1991). Elucidation and optimization of the medium constituents controlling antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. Enzyme Microbiol. Technol., **13**: 76-81.
- BOLD, H. C. & WYNNE, M. J. (1985). Introduction to the algae. In: Division cyanophyta. 2<sup>a</sup> ed. Prentice-Hall, Inc., London: 34-67.
- BORN, G. V. R. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature, **4832**: 927-929.
- BRITO, M. A. V. P.; LAGROTA, M. H. C. & MACHADO, R. D. (1981). Emprego de microtécnica na triagem de substâncias antivirais. Rev. Microbiol., **12**: 65-69.
- CAIRE, G. Z.; MULÉ, M. C. Z. & CANO, M. S. (1979). Productos extracelulares de *Nostoc muscorum* Ag. (cepa 79a) obtenidos em medios con y sin nitrogeno combinado. I: Sus efectos sobre plantulas de arroz. Phyton. Rev. Int. Bot. Exp. **37**: 1-13.

- CAIRE, G. Z.; CANO, M. S.; MULÉ, M. C. Z.; HALPERIN, D. R. & GALVAGNO, M. (1987). Action of cell-free extracts and extracellular products of *Nostoc muscorum* on growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phyton, **47**(1/2): 43-46.
- CAIRE, G. Z.; CANO, M. S.; MULÉ, M. C. Z. & HALPERIN, D. R. (1990). Antimycotic products from the cyanobacterium *Nostoc muscorum* against *Rhizoctonia solani*. Phyton, **51**(1): 1-4.
- CANNELL, R. J. P.; OWSIANKA, A. M. & WALKER, J. M. (1988). Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. Planta med, **54**: 10-4.
- CANO, M. S.; MULÉ, M. C. Z.; CAIRE, G. Z. & HALPERIN, D. R. (1986). Growth control of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* by *Nostoc muscorum* (Cyanophyta). Phyton, **46**(2): 153-156.
- CANO, M. S.; MULÉ, M. C. Z.; CAIRE, G. Z. & HALPERIN, D. R. (1990). Inhibition of *Candida albicans* by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc muscorum*. J. Appl. Phycol., **2**: 79-81.
- CARMELL, S.; MOORE, R. E. & PATTERSON, G. M. L. (1990). Isonitriles from the blue-green alga *Scytonema mirabile*. J. Org. Chem., **55**: 4431-4438.
- CARMICHAEL, W. W. (1991). Blue-green algae: an overlooked health threat. Health and Environment. A publication of Freshwater Foundation **5**(6): 1-8.
- CARMICHAEL, W. W. (1992). A review. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. J. Appl. Bacteriol. **72**: 445-459.
- CARMICHAEL, W. W. (1994). The toxins of cyanobacteria. Scien. American. **270** (1): 63-72.

- CARMICHAEL, W. W.; MAHMOOD, N. A. & HYDE, E. G. (1990). Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In: Marine Toxins. Origin. Structure and Molecular-Pharmacology., Hall, S., Strichartz, G. eds., **418**: 87-106.
- CARMICHAEL, W. W. & FALCONER, I.R. (1993). Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: Algal toxins in seafood and drinking water. Harcourt Brace & Company Publishers (eds.). Academic Press, INC, San Diego, 187-209.
- CARMICHAEL, W. W.; EVANS, W. R.; YIN, Q. Q.; BELL, P. & MOCZYDLOWSKI, E. (1997). Evidence for Paralytic Shellfish Poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wolei* (Farlow ex Gomont) comb. Nov. Appl. and Environment. Microbiol. **63**(8): 3104-3110.
- CHAUHAN, V. S.; MARWAH, J. B. & BAGCHI, S. N. (1992). Effect of an antibiotic from *Oscillatoria* sp. on the phytoplankters, higher plants and mice. New Phytol., **120**: 251-257.
- CHETSUMON, A.; FUJIEDA, K.; HIRATA, K.; YAGI, K. & MIURA, Y. (1993). Optimization of antibiotic production by the cyanobacterium *Scytonema* sp. TISTR 8208 immobilized on polyurethane foam. J. Appl. Phycol., **5**: 615-622.
- CHETSUMON, A.; MAEDA, I.; UMEDA, F.; YAGI, K.; MIURA, Y. & MIZOGUCHI, T. (1994). Antibiotic production by the immobilized cyanobacterium, *Scytonema* Sp. TISTR 8208, In A seaweed -type photobioreactor. J. Appl. Phycol., **6**: 539-543.
- DE CLERCQ, E.; DESCAMPS, J.; VERHELST, G.; WALKER, R. T.; JONES, A. S.; TORRENCE, P. F. & SHUGAR, D. (1980). Comparative efficacy of antihelminthic drugs against different strains of *herpes simplex* virus. J. Infect. Dis., **141**: 563-574.

- FISH, S. A. & COOD, G. A. (1994). Analysis of culture conditions controlling the yield of bioactive material produced by the thermotolerant cyanobacterium (blue-green alga) *Phormidium*. Eur. J. phycol., **29**: 261-266.
- FLORES, E. & WOLK, C. P. (1986). Production by filamentous, nitrogen fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and of other antibiotics that kill related strains. Arch. Microbiol., **145**: 215-219.
- FRANKMÖLLE, W. P.; LARSEN, L. K.; CAPLAN, F. R.; PATTERSON, G. M. L.; KNÜBEL, G.; LEVINE, I. A. & MOORE, R. E. (1992a). Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*. I-Isolation and biological properties. J. Antibiotics, **45**(9): 1451-1457.
- FRANKMÖLLE, W. P.; KNÜBEL, G.; MOORE, R. E. & PATTERSON, G. M. L. (1992b). Antifungal cyclic peptides from terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*. II-Structures of laxaphycins A, B, D and E. J. Antibiotics, **45**(9): 1458-1466.
- GERWICK, W. H.; MROZEK, C.; MOGHADDAM, M. F. & AGAEWAL, S. K. (1989). Novel cytotoxic peptides from the tropical marine cyanobacterium *Homothamion enteromorphoides*. I- Discovery, isolation and initial chemical and biological characterization of the hormothammins from wild and cultured material. Experientia, **45**: 115-121.
- GLEASON, F. K. & PAULSON, J. L. (1984). Site of action of the natural algicide, cyanobacterin, in the blue-green alga, *Synechococcus*. Arch. Microbiol., **138**: 273-277.
- GLEASON, F. K.; CASE, D. E.; SIPPRELL, K. D. & MAGNUSON, T. S. (1986). Effect of the natural algicide, cyanobacterin, on a herbicide-resistant mutant of *Anacystis nidulans* R2. Plant Science, **46**: 5-10.

- GLEASON, F. K. & WOOD, J. M. (1987). Secondary metabolism in the cyanobacteria. In: The cyanobacteria, Fay, P. and Van Bealen, C. (eds). Elsevier Science Publishers, New York, 436-451.
- GROMOV, B. V.; VEPRITSKIY, A. A.; TITOVA, N. N.; MAMKAYEVA, K. A. & ALEXANDROVA, O. V. (1991). Production of the antibiotic cyanobacterin LU-1 by *Nostoc linckia* CALU 892 (cyanobacterium). J. Appl. Phycol., **3**: 55-59.
- GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA II, J. H.; FULLER, R. W.; WEISLOW, O. S.; KISER, R. F.; SNADER, K. M.; PATTERSON, G. M. L. & BOYD, M. R. (1989). AIDS-Antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). J. Nat. Can. Inst., **81**: 1254-1258.
- HAGLER, A. N. (1978). Ecologia e taxonomia de leveduras em um estuário poluído e ambientes marinhos do Rio de Janeiro. Tese de doutorado, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, 83.
- HAGMANN, L. & JUTTNER, F. (1996). Fischerellin A, a novel photosystem-II-inhibiting allelochemical of the cyanobacterium *Fischerella muscicola* with antifungal & herbicidal activity. Tetrahedron Letters, **37**(36): 6539-6542.
- HAYASHI T.; HAYASHI K.; MAEDA M. & KOJIMA I. (1996). Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. J. Nat. Prod., **59**(1):83-7.
- HELMS, G. L.; MOORE, R. E.; NIEMCZURA, W. P. & PATTERSON, G. M. L. (1988). Scytonemin A, a novel calcium antagonist from a blue-green alga. J. Org. Chem., **53**: 1298-1307.
- HU, J. M. & HSIUNG, G. D. (1989). Evaluation of new antiviral agents: *in vitro* perspectives. Antiviral Res., **11**: 217-232.

- ISHIBASHI, M.; MOORE, R. E.; PATTERSON, G. M. L.; X. U., C & CLARDY, J. (1986). Scytophycins, cytotoxic and antimycotic agents from the cyanophyte *Scytonema pseudohofmanni*. J. Org. Chem., **51**(26): 5300-5306.
- JAKOBI, C.; OBERER, L.; QUIQUEREZ, C; KÖNIG, W. A. & WECKESSER, J. (1995). Cyanopeptolin S, a sulfate-containing depsipeptide from a water bloom of *Microcystis* sp. FEMS Microbiol. Letters, **129**: 129-134.
- JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J.; CARDO, D. M.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. C.; MELO-FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V. S. T.; AZEVEDO, S. M. F. O. & JARVIS, W. R. (1998). Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. New England Journal of Medicine, **338**: 873-878.
- KNÜBEL, G.; LARSEN, L. K.; MOORE, R. E.; LEVINE, I. A. & PATTERSON, G. M. L. (1990). Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue-green belonging to the Nostocaceae. J. Antibiotics, **43**(10): 1236-1239.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1986). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2- Chroococcales. Arch. Hydrobiol., / Suppl. 73, Algological Studies **43**: 157-226.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1989). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4- Nostocales. Arch. Hydrobiol., / Suppl. 82, Algological Studies **56**:247-345.
- KOTAL, J. (1972). Instruction for preparation of modified nutrient solution Z-8 for algae. In: Norwegian Institute for water Research, Oslo.



- LAGOS, N.; LIBERONA, J. L.; ADRINOLO, D.; ZAGATTO, P. A.; SOARES, R. M. & AZEVEDO, S. F. M. O. (1997). First evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil. VIII International Conference On Harmful Algae - Vigo-España, (Only Abstract), 115.
- LAGROTA, M. H. C. (1978). Atividade antiviral *in vitro* de substâncias sintéticas e naturais. (Tese de Mestrado), UFRJ, Rio de Janeiro.
- LAGROTA, M. H. C. (1991). Efeito antiviral *in vitro* de extratos de plantas brasileiras tendo como modelo de estudo o vírus *herpes simplex*. (Tese de Doutorado), UFRJ, Rio de Janeiro.
- MAHMOOD, N. A. & CARMICHAEL, W. W. (1986). The pharmacology of anatoxin-a (s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. Toxicon, 24 (5): 425-434.
- MAHMOOD, N. A. & CARMICHAEL, W. W. (1987). Anatoxin-a (s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. Toxicon, 25 (11): 1221-1227.
- MANNAIONI, P. F.; DI BELLO, M. G. & MASINI, E. (1997). (Review) Platelets and inflammation: Role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. Inflamm. Res., 46: 4-18.
- MARTIN, C.; OBERER, L.; INO, T.; KÖNIG, W. A.; BUSCH, M. & WECKESSER, J. (1993). Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. PCC 7806. J. Antibiotics 46(10): 1550-1556.
- MASON, C. P.; EDWARDS, K. R.; PIGNATELLO, J.; GLEASON, F. K. & WOOD, J. M. (1982). Isolation of a chlorine-containing antibiotic from the freshwater cyanobacterium *Scytonema hofmanni*. Science, 215: 400-402.

- MATSURA, F.; HAMADA, Y. & SHIOIRI, T. (1994). Total synthesis of Microginin, an Angiotensin-converting enzyme inhibitory pentapeptide from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Tetrahedron, **50**(38): 11303-11314.
- MOORE, B. S.; CHEN, J. L.; PATTERSON, G. M. L.; MOORE, R. E.; BRINEN, L. S.; KATO, Y. & CLARDY, J. (1990). [7.7] Paracyclophanes from blue-green algae. J. Am. Chem. Soc., **112**(10): 4061-4063.
- MOORE, R. E. (1996). Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: A review. J. Ind. Microbiol. (United Kingdom), **16**(2): 134-143.
- MOORE, R. E.; BLACKMAN, A. J.; CHEUK, C. E.; MYNDERSE, J. S.; MATSUMOTO, G. K.; CLARDY, J.; WOODARD, R. W. & CRAIG, J. C. (1984). Absolute stereochemistries of the Aplysiatoxins and Oscillatoxin A. J. Org. Chem., **49**(13): 2484-2489.
- MOORE, R. E.; PATTERSON, G. M. L.; MYNDERSE, J. S. & BARCHI, J. J. (1986). Toxins from cyanophytes belonging to the Scytonemataceae. Pure and Appl. Chem., **58**(2): 263-271.
- MOORE, R. E.; CHEUK, C.; YANG, X. Q. G.; PATTERSON, G. M. L.; BONJOUKLIAN, R.; SMITKA, T. A.; MYNDERSE, J. S.; FOSTER, R. S.; JONES, N. D.; SWARTZENDRUBER, J. K. & DEETER, J. B. (1987). Hapalindoles, antibacterial and antimycotic alkaloids from the cyanophyte *Hapalosiphon fontinalis*. J. Org. Chem., **52**(6): 1036-1043.
- MOORE, R. E.; BANARJEE, S.; BORNEMANN, V.; CAPLAN, F. R.; CHEN, J. L.; CORLEY, D. G.; LARSEN, L. K.; MOORE, B. S.; PATTERSON, G. M. L.; PAUL, V. J.; STEWART, J. B. & WILLIAMS, D. E. (1989). Novel cytotoxins and fungicides from blue-green algae and marine animals possessing algal symbionts. Pure and Appl. Chem., **61**(3): 521-524.

- MULÉ, M. C. Z.; CAIRE, G. Z.; CANO, M. S. & HALPERIN, D. L. (1991). Bioactive compounds from *Nostoc muscorum* (Cyanobacteria). Cytobios., **66**: 169-172.
- NAGATSU, A.; KAJITANI, H. & SAKAKIBARA, J. (1995). Muscoride A: A new oxazole peptide alkaloid from freshwater cyanobacterium *Nostoc muscorum*. Tetrahedron Lett., **26**(23): 4097-4100.
- NAMIKOSHI, M. & RINEHART, K. L. (1996). Bioactive compounds produced by cyanobacteria. J. Ind. Microbiol. (United Kingdom), **17**(5/6): 373-384.
- NICHOLS, J. M. & ADAMS, D. G. (1982). Akinetes. In: The biology of cyanobacteria. Carr, N. G. and Whitton, B. A. (eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 387-412.
- NISHIMURA, T.; TOKU, K. & FUKUYASU, H. (1977). Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenil-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. Kitasato Arch. Med. **50**: 39-46.
- NORTON, R. S. & WELLS, R. J. (1982). A series of chiral polybrominated biindoles from the marine blue-green alga *Rivularia firma*. application of  $^{13}\text{C}$  NMR spin-lattice relaxation data and  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  coupling constants to structure elucidation. J. Am. Chem. Soc., **104**: 3628-3635.
- OKINO, T.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M. & YAMAGUCHI, K. (1993a). Microginin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Tetrahedron Lett., **34**(3): 501-504.

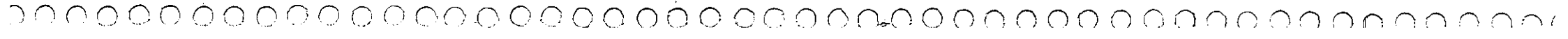
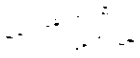
- OKINO, T.; MURAKAMI, M.; HARAGUCHI, R.; MUNEKATA, H.; MATSUDA, H. & YAMAGUCHI, K. (1993b). Micropeptins A & B, plasmin & trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Tetrahedron Lett., **34**(50): 8131-8134.
- PATTERSON, G. M. L.; NORTON, T. R.; FURUSAWA, E.; KASHIWAGI, M. & MOORE, R. E. (1984). Antineoplastic evaluation of marine algal extracts. Bot. Marina., **27**: 485-488.
- PATTERSON, G. M. L.; BALDWIN, C. L.; BOLIS, C. M.; CAPLAN, F. R.; KORUSO, H.; LARSEN, L. K.; LEVINE, I. A.; MOORE, R. E.; NELSON, C. S.; TSCHAPPAT, K.D. & TUANG, G. D. (1991). Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (cyanophyta). J. Phycol., **27**: 530-536.
- PATTERSON, G. M. L. & CARMELI, S. (1992). Biological effects of Toloxin (6-hydroxy-7-O-methyl-Scytopyhycin b), a potent bioactive metabolite from cyanobacteria. Arch. Microbiol., **157**: 406-410.
- PATTERSON, G. M. L.; BAKER, K. K.; BALDWIN, C. L.; BOLIS, C. M.; CAPLAN, F. R.; LARSEN, L. K.; LEVINE, I. A.; MOORE, R. E.; NELSON, C. S.; TSCHAPPAT, K.D. & TUANG, G. D. (1993). Antiviral activity of cultured blue-green algae (cyanophyta). J. Phycol., **29**: 125-130.
- PATTERSON, G. M. L.; LARSEN, K. L. & MOORE, R. E. (1994). Bioactive natural products from blue-green algae. J. Appl. Phycol., **6**: 151-157.
- PATTERSON, G. M. L. & BOLIS, C. M. (1997). Fungal cell-wall polysaccharides elicit na antifungal secondary metabolite (phytoalexin) in the cyanobacterium *Scytonema ocellatum*. J. Phycol., **33**: 54-60.

- PIGNATELLO, J. J.; PORWOLL, J.; CARLSON, R. E.; XAVIER, A.; GLEASON, F. K. & WOOD, J. M. (1983). Structure of the antibiotic cyarobacterin, a chlorine containing -lacton from the freshwater cyanobacterium *Scytonema hoffmanii*. J. Org. Chem., **48**: 4035-4038.
- RANG, H. P.; DALE, M. M. & RITTER, J. M. (1997). Farmacologia. In: Hemostasia e trombose. 3ª edição, pág. 264-279.
- REED, L. J. & MUENCH, H. (1938). A simple method of estimating fifty percents endpoints. Am. J. Hyg., **27**: 493-497.
- RINEHART, K. L., Jr.; SHAW, P. D.; SHIELD, L. S.; GLOER, J. B.; HARBOUR, G. C.; KOKER, M. E. S.; SAMAIN, D.; SCHWARTZ, R. E.; TYMIAK, A. A.; WELLER, D. L.; CARTER, G. T.; MUNRO, M. H. G.; HUGHES, R. G., Jr.; RENIA, H. E.; SWYNNENBERG, E. B.; STRINGFELLOW, D. A.; VAVA, J. J.; COATS, J. H.; ZURENKO, G. E.; KUENTZEL, S. L.; LI, L. H.; BAKUS, G. J.; BRUNSCA, R. C.; CRAFT, L. L.; YOUNG, D. N. & CONNER, J. L. (1981). Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial, and antineoplastic agents. Pure Appl. Chem., **53**: 795-817.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual / E.F. 2ª ed. Vol. III, Appendix A.1.
- SANO, T. & KAYA, K. (1996). A 3-amino-10-chloro-2-hydroxydecanoic acid-containing tetrapeptide from *Oscillatoria agardii*. Pergamon (Phytochemistry), **44(8)**: 1503-1505.
- SCHMIDT, N. J. (1979). Cell culture techniques for diagnostic virology. In: diagnostic procedures for viral & rickettsial infections, 5 ed., Edited by Lennette, E. H. & Schimidt, N. J., Amer. Publ. Heath Assoc. Inc., New York, 65-139.

- SIDWELL, R. W.; ARNETT, G.; DIXON, G. J. & SCHABEL, F. M. (1969). Purine analogs as potential anticytomegalovirus agents. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **131**: 1223-1230.
- SIEGEL, J. (1985). Statistic. User's Manual. Analytical Software, USA. 317.
- SIVONEN, K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. Phycologia, **35**(6): 12-24.
- SMITH, C. D.; CARMELI, S.; MOORE, R.E. & PATTERSON, G.M.L. (1993). Scytophycins, novel microfilament-depolymerizing agents which circumvent P-Glycoprotein-mediated multidrug resistance. Cancer Research, **53**: 1343-1347.
- STEWART, J. B.; BORNEMANN, V.; CHEN, J. L.; MOORE, R. E.; CAPLAN, F. R.; KARUSO, H. & LARSEN, L. K. (1988). Cytotoxic, fungicidal nucleosides from blue green algae belonging to the Scytonemataceae. J. Antibiotics, **41**(8): 1048-1056.
- STRATMANN, K.; BURGOYNE, D. L.; MOORE, R. E. & PATTERSON, G. M. L. (1994). Hapalosin, a cyanobacterial cyclic depsipeptide with multidrug-resistance reversing activity. J. Org. Chem., **59**: 7219-7226.
- SUGANDA, A. G.; AMOROS, M.; GIRRE, L. & FAUCONNIER, B. (1983). Effects inhibiteurs de quelques extraits bruts et semi purifiés de plantes indigènes françaises sur la multiplication de l'herpes virus human 1 et du poliovirus human 2 en culture cellulaire. J. Nat. Prod., **46**: 626-632.
- WELCH, A. M. (1962). Preliminary survey of fungistatic properties of marine algae. J. Bact., **83**: 97-99.

YOO, R. S.; CARMICHAEL, W. W.; HOEHN, R. C. & HRUDEY, S. E. (1995).  
Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: a resource guide. AWWA Research  
Foundation and American Water works Association, USA: 1-229.

7 - ANEXOS





## Anexo I

## Meio para bactérias Luria-Bertani - LB:

Nutrientes	Peso (g) p/ L de meio
NaCl	1g
Peptona	1g
Extrato de levedura	0,5g
ágar	1,7g

## Anexo II

Meio para *Candida albicans* - GYP modificado:

Nutrientes	peso (g) p/ L. de meio
Glicose	20g
Peptona	10g
Extrato de levedura	0,5g
ágar	20g

## Anexo III

## Meio Z-8 para cianobactérias:

Macronutrientes	Solução estoque (g/L H <sub>2</sub> O)	Volume p/ L meio (mL)
NaNO <sub>3</sub>	46,7	10
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	5,9	10
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,5	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,1	10
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,1	10
Fe-Edta	*	10
Elementos traços	**	1

## Fe-Edta\*:

Solução de FeCl <sub>3</sub>	
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	2,80g
HCl 0,1 N	100 mL

Solução Edta	
Edta- Na <sub>2</sub>	3,90g
NaOH 0,1 N	100 mL

\* 10 mL de solução FeCl<sub>3</sub> e 9,5 ml de solução Edta são misturados e completados para 1 L com H<sub>2</sub>O deionizada.

## Anexo III

## Solução de elementos traços \*\*:

Micronutrientes	peso(g)
NaWO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,330
(NH <sub>4</sub> ) <sub>10</sub> MoO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,880
KBr	1,20
KI	0,830
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,87
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	1,55
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	1,46
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	1,25
NiSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	1,98
Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> . 9 H <sub>2</sub> O	0,410
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,089
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . 24 H <sub>2</sub> O	4,74
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,10
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	2,23

\*\* Cada sal é completado para 1 L com H<sub>2</sub>O deionizada e para o preparo da solução estoque de Elementos traços é utilizado 10 mL de cada solução, exceto H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e MnSO<sub>4</sub>. 4H<sub>2</sub>O que se utiliza 100mL, sendo então completado para 1 L com H<sub>2</sub>O deionizada.

## Anexo IV

FAMÍLIAS	CEPAS / GÊNEROS	TESTES											
		ANTIBIOGRAMA			AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA			ANTIVIRAL			CITOTÓXICO		
		MeOH 80%	MeOH 20%	H <sub>2</sub> O	MeOH 80%	MeOH 20%	H <sub>2</sub> O	MeOH 80%	MeOH 20%	H <sub>2</sub> O	MeOH 80%	MeOH 20%	H <sub>2</sub> O
PSEUDOANABAENACEA	NPRG-1 <i>Leptolyngbya</i> sp	-	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	+
	NPDF-2 <i>Leptolyngbya</i> sp	+	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	+
	NPRE-3 <i>Leptolyngbya</i> sp	-	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	+
	NPFX-1 <i>Leptolyngbya</i> sp	+	-	-	NT	+	+	NT	NT	-	NT	NT	-
	NPCD-2 <i>Limnothrix</i> sp	+	-	-	NT	-	+	NT	NT	-	NT	NT	-
	NPLJ-5 <i>Limnothrix</i> sp	-	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
	NPLB-5 <i>Pseudoanabaena galeata</i>	-	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
PHORMIDIACEAE	NPPE-1 <i>Planktothrix</i> sp	-	+	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	+
	NPFE-1 <i>Tychonema</i> sp	-	-	-	NT	+	-	NT	NT	-	NT	NT	-
	NPBT-1 <i>Tychonema</i> sp	+	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	+
OSCILLATORIACEAE	NPBT-2 <i>Oscillatoria</i> sp	-	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	NT	NT	+

NT – Não testado