



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PROSPEÇÃO DE AMINOÁCIDOS TIPO MICOSPORINAS (MAAs) EM
CIANOBACTÉRIAS DA AMAZÔNIA ORIENTAL

SANCLAYVER CORRÊA ARAÚJO

BELÉM - PA
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PROSPECÇÃO DE AMINOÁCIDOS TIPO MICOSPORINAS EM
CIANOBACTÉRIAS DA AMAZÔNIA ORIENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Aluno: Sanclayver Corrêa Araújo, BPharm.

Orientador: Dr. Evonnildo Costa Gonçalves

BELÉM – PA

2014

Dados Internacionais de Catalogação–na–Publicação (CIP)
Sistema de Biblioteca da UFPA

Araújo, Sanclayver Corrêa

Prospecção de Aminoácidos Tipo Micosporinas em
Cianobactérias da Amazônia Oriental/ Sanclayver Corrêa Araújo.
– 2014.

Orientador: Evonnildo Costa Gonçalves

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Belém, 2014

1. Cianobactérias. 2. Aminoácidos Tipo Micosporinas. 3.
Amazônia

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SANCLAYVER CORRÊA ARAÚJO

PROSPECÇÃO DE AMINOÁCIDOS TIPO MICOSPORINAS EM
CIANOBACTÉRIAS DA AMAZÔNIA ORIENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves

Profa. Dra. Luciana Pereira Xavier

Prof. Dr. José Maria Vieira

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnoll

Prof. Dr. Antônio Sergio Costa Carvalho (Suplente)

Dedico à Dulcirene Araújo
Carinhosamente, Mãe Dô
(*in memorian*)

AGRADECIMENTOS

Em primeiríssimo lugar agradeço a Deus, que merece todo amor do mundo. A ele glória e louvor, eternamente!

Ao meu pai Sandoval, minha mãe Vera, por toda a herança que já recebi de vocês, que é a Educação. Aos meus irmãos Sanderson, Sandy e Ana Keuria, por todo o apoio que sempre me deram. Em particular à minha avó Edith e tia-avó Dulcirene (*in memorian*) por serem presença silenciosa, mas determinante na minha história. Aos meus tios José Adalilson e Dulcinês pela torcida.

Ao meu orientador Dr. Evonnildo Gonçalves por confiar em mim e confiar a mim grandes responsabilidades, e proporcionar um ambiente de aprendizado favorável. Sanclayverson agradece.

Ao CNPQ (Edital 66/2009) e FAPESPA (ICAAF 006/2012) pelo apoio financeiro e à CAPES pela bolsa.

À, Rafaella, Laise, Pablo, Jonatas, Ryan, e todos os que passaram pela equipe do Laboratório de Tecnologia Biomolecular pela convivência, partilha e aprendizado. Em particular, agradeço ao Fabio, Andrey, Bruno, Thiago e Eduardo pela ajuda nas várias etapas do meu trabalho. Valeu pessoal!

À Seção de Inovação Tecnológica do Instituto Evandro Chagas pessoa do Dr. Márcio Nunes, por acolher nosso grupo confiando a estrutura do Núcleo de Proteômica. À equipe do CIT, Dr. João Vianez, Jedson, Davi, Alex, Daisy, Janaína, Layanna, Clayton, Keley, Rodrigo, Eduardo, Edivaldo, Sandro, por compartilhar as alegrias e desafios da ciência. À Seção de Arbovírus, com todo o seu pessoal, sempre acolhedores, prestativos, em particular à Dra. Valéria, Dra. Edna, pelos socorros em vários momentos. Muito obrigado!

Aos especialistas da AB Sciex do Brasil: Lygia Marques, Hélio Martins, e Débora Santos pelo suporte nos momentos de dificuldade na operação e resolução de problemas do espectrômetro de massas. Não sei o que seria de mim sem vocês.

Ao professor Alberdan Santos e sua equipe do Laboratório de Investigação Sistemática e Biotecnologia e Biodiversidade Molecular, pelos preciosos ensinamentos, acessibilidade e prestatividade em indução da produção de metabólitos. Também meu muito obrigado!

À minha eterna família Universidades Renovadas que me ensinou a sonhar com os mais altos ideais, e aos meus irmãos Profissionais do Reino, que me ensinaram a tirar os sonhos do papel. Vocês têm um papel determinante na minha formação profissional.

Enfim, a todos os colegas que junto comigo ingressaram na turma de pós-graduação por compartilhar as experiências e os desafios, bem como aos professores que compartilharam sua experiência e conhecimento para nosso desenvolvimento profissional. Valeu!

“Até mesmo quando pensamos que o trabalho de Deus a nós confiado foi por água abaixo, podemos estar lançando os fundamentos de uma obra de Deus definitiva dentro de nós”

Catherine Doherty

RESUMO

Aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) são compostos de baixa massa molecular solúveis em água, cuja biossíntese, pensava-se ocorrer pela via do ácido chiquímico em bactérias, fitoplâncton e macroalgas. Recentemente, evidências mostram sua biossíntese pela via das pentoses em uma cianobactéria. Devido seu alto coeficiente de extinção molar na região do UV, proporcionam proteção contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta tendo potencial para a utilização em protetores solares. Em trabalhos anteriores foi descrito um cluster biossintético para chinorina que consistia nas enzimas Dehidroquinato sintase, presente na via do chiquimato, O-metiltransferase, uma enzima assimiladora de ATP e um homólogo de NRPS. Foi verificado ainda que a enzima 2-epi-5-epi-valiolona sintase, enzima que interligaria a via das pentoses, poderia formar o intermediário cíclico 4-desoxigadusol, precursor dos MAAs. Neste trabalho foi feita uma abordagem genômica para a busca destes genes, de modo a investigar o potencial de produção de MAAs nas cianobactérias da Coleção Amazônia de Cianobactérias e Microalgas, CACIAM 14, CACIAM 53, CACIAM 54 e CACIAM 57, bem como uma análise por cromatografia líquida capilar acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização de *Electrospray* dos metabólitos em CACIAM 14. Os genes da Dehidroquinato sintase e da O-metiltransferase foram encontrados em todas as linhagens estudadas. Os genes da via das pentoses Ribulose-fosfato-3-epimerase e Transcetolase foram detectados nas linhagens CACIAM 14, CACIAM 53 e CACIAM 57, o que sugere que nestas linhagens os MAAs podem ser produzidos por ambas as vias enquanto que na linhagem CACIAM 54 que os MAAs podem ser produzidos apenas pela via do chiquimato. Na linhagem CACIAM 14, foram detectados os fragmentos de relação massa/carga 186 e 197 no mesmo tempo de retenção de um íon precursor de m/z 333, valor esse sugestivo da presença de chinorina. Dessa forma, as linhagens CACIAM 53, 54 e 57 são potencialmente produtoras de MAAs por possuírem os genes biossintéticos, e a linhagem CACIAM 14 é produtora de chinorina.

Palavras-chave: Cianobactérias, aminoácidos tipo micosporinas, amazônia

ABSTRACT

Mycosporine-like amino acids (MAAs) are low molecular weight water soluble compounds whose biosynthesis was thought to occur via shikimate pathway in bacteria, phytoplankton and macroalgae. Recent evidences show its biosynthesis via the pentose pathway in a cyanobacterium. Due to its high extinction molar coefficient in UV region, they provide protection against the damaging effects of UV radiation and have potential for use in sunscreens. In previous works it was described a biosynthetic cluster for shinorine with the enzymes dehydroquinate synthase, present in the shikimate pathway, O-methyltransferase, and *ATP-grasp* and *NRPS-like* enzymes. It was observed that the enzyme 2-epi-5-epi-valiolone synthase, which link the pentose pathway with MAAs production would lead to formation of 4-deoxygadusol, precursor of MAAs. In this work a genomics approach was carried out to find these genes so that MAAs production potential in Amazonian cyanobacteria of the Coleção Amazônica de Cianobactérias e Microalgas, CACIAM 14, CACIAM 53, CACIAM 54 and CACIAM 57 strains was assessed, as well as an analysis through capillary chromatography coupled to electrospray mass spectrometry of the metabolites in CACIAM 14. The genes Dehydroquinate synthase and o-methyltransferase were found in all the strains studied. The genes of pentose pathway Ribulose-phosphate-3-epimerase and transketolase were detected in the strains CACIAM 14, CACIAM 53 and CACIAM 57, what may suggest that in these strains MAAs could be produced by both pathways while in CACIAM 57 MAAs could be produced by shikimate pathway only. In CACIAM 14 strain, fragments of mass to charge relationship 186 and 197 were found in the same retention time of a precursor ion of m/z 333, what could be related to shinorine. Therefore, the strains CACIAM 53, 54 and 57 are potentially producers of MAAs due to possessing biosynthetic genes and CACIAM 14 is shinorine producer.

Keywords: cyanobacteria, mycosporine-like aminoacids, amazon

Lista de Figuras

Figura 1	Diversidade morfológica de cianobactérias	2
Figura 2	Estruturas de alguns metabólitos tóxicos de cianobactérias	4
Figura 3	Representação esquemática da Peptídeo sintase não-ribossomal . .	6
Figura 4	Representação Esquemática da Policetídeo-sintase	8
Figura 5	Estrutura Básica das micosporinas e MAAs	9
Figura 6	Estruturas de Micosporinas	12
Figura 7	Estruturas de MAAs	13
Figura 8	Estruturas de MAAs	14
Figura 9	Via do Chiquimato e sua relação com a biossíntese de MAAs	21
Figura 10	Biossíntese de Micosporina-glicina	25
Figura 11	Biossíntese de chinorina a partir da conjugação de micosporina-glicina e serina via enzima tipo-NRPS	26
Figura 12	Vias Redundantes da Biossíntese de chinorina	28
Figura 13	Espectro de massas modo <i>full scan</i> (MS1) dos metabólitos da linhagem cianobacteriana CACIAM 14: a) Faixa de m/z 50 a 1000 ; b) zoom na faixa faixa de m/z 300 a 600	40
Figura 14	Espectro de fragmentação do pico de razão massa/carga 333 da amostra	41
Figura 15	Cromatograma de íons totais de <i>Cyanobium</i> sp. CACIAM 14	42
Figura 16	Seleção de íons precursores de m/z 333	43
Figura 17	Seleção de íons filho (mz/ 186 em azul e 197 em vermelho) dos íons precursores de m/z 333	44

Lista de Tabelas

Tabela 1	Alguns metabólitos secundários de cianobactérias	5
Tabela 2	Dados Espectrais de massa em Whitehead	32
Tabela 3	Valores de relação massa/carga monitoradas no primeiro quadrupolo	36
Tabela 4	Dados do sequenciamento e montagem das linhagens CACIAM 53, 54 e 57	38
Tabela 5	Prospecção de genes relacionados à biossíntese de MAAs em cianobactérias da Amazônia	38

Lista de abreviaturas

4-DG – 4-desoxigadusol
ATCC – American type Culture Colection
ATP – Adenosina tri-fosfato
CACIAM – Coleção Amazônica de Cianobactérias e Microalgas
CO₂ – Dióxido de Carbono
Co²⁺ - íon cobalto
DAHPS – 3-Desoxi-D-arabinoheptulosinato-7-fosfato.
DHQ – Dehidroquinato
DHQS – Dehidroquinato sintase
DHS – Dihidrochiquimato
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EPSP - 5-enoilpiruvilchiquimato-3-fosfato
eV – elétronvolt
EVS – Epivaliolona-sintase
Kb - quilobase
kDa – Quilodaltons
LC/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
m/z – Relação massa/carga
MAAs – Aminoácidos tipo Micosporinas
Mg²⁺ - íon magnésio
MH⁺ - Massa protonada em ESI
mM - milimolar
MS – Espectrometria de Massas
MS1 – Espectro de íons pai ou molecular
MS2 – Espectro de íons filo ou produto
N₂ – Nitrogênio
NAD – Nicotinamida Adenina dinucleotídeo
NADP – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nm – nanômetro
NRPS – Peptídeo Sintase não ribossômica
O-MT – O-Metiltransferase
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAR – Radiação fotossintética ativa
PCC – Pasteur Culture Colection
PEP – Fosfoenolpiruvato
pH – potencial hidrogeniônico
PKS – Policetídeo sintase
SH-7P – Sedoheptulose-7-fosfato
UV – Ultravioleta
UVA – Radiação Ultravioleta do tipo A
UVB – Radiação Ultravioleta do tipo B
μM – micromolar

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	XI
	LISTA DE TABELAS	XII
	LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	MAAS: ASPECTOS ESTRUTURAIS	9
1.2	MAAS COMO FOTOPROTETORES	15
1.3	MAAS EM CIANOBACTÉRIAS	18
1.4	BIOSSÍNTESE DE MAAS	20
1.5	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MAAS	28
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	AMOSTRAGEM	34
3.2	CULTIVO DE LINHAGENS	34
3.3	ANÁLISE GENÔMICA	34
3.4	EXTRAÇÃO DE MAAS	35
3.5	ANÁLISE DE MAAS POR LC/MS	35
4	RESULTADOS	37
4.1	SEQUENCIAMENTO	37
4.2	ANÁLISE DE MAAS	39
5	DISCUSSÃO	46
5.1	ANÁLISE GENÔMICA	46
5.2	EXTRAÇÃO DE MAAS	47
5.3	ANÁLISE DE MAAS	48
6	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1. Introdução

Surgidos à 3,9 bilhões de anos, os microrganismos foram os primeiros seres vivos da terra, onde foram a forma de vida predominante pela maior parte da sua história. Nos dois primeiros bilhões de anos, a atmosfera da terra era anóxica, e somente microrganismos com metabolismo anaeróbico eram capazes de sobreviver nessas condições. Um bilhão de anos depois surgiram os primeiros microrganismos fototróficos, que realizavam fotossíntese anoxigênica, os quais existem até hoje distribuídos em ambientes anóxicos. As cianobactérias evoluíram dos microrganismos fototróficos anoxigênicos, e devido ao oxigênio como produto de seu metabolismo, prepararam a atmosfera terrestre para o desenvolvimento de formas mais complexas de vida como plantas e animais (MADIGAN *et al.*, 2012).

Outrora conhecidas como Cyanophyceae, Cyanophyta, Cyanoprocariota, Cyanochloronta, Cyanophycophyta, algas azuis ou algas verde azuladas devido sua coloração (MELCHER, 2007), as cianobactérias são bactérias gram-negativas que colonizam uma grande variedade de ambientes, como oceanos, corpos de água doce, rochas, desertos, placas de gelo, bem como apresentam relação simbiótica com plantas, líquens e protozoários (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009). Em ambientes marinhos, as cianobactérias podem representar cerca de 40% da biomassa (SINHA; HÄDER, 2008). Elas realizam fotossíntese (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009) na presença de luz e, no escuro, fermentação (STAL; MOEZELAAR, 1997).

As cianobactérias podem se apresentar, morfológicamente, como estruturas unicelulares, coloniais, filamentosas simples ou ramificadas (Figura 1). Também existem células vegetativas unicelulares, que variam de cerca de 0,4 a mais de 40 μm de diâmetro. O termo tricoma é utilizado apenas para o conjunto de células dispostas linearmente e filamento para o conjunto da bainha mucilaginosa mais o tricoma (Figura 1). Os filamentos são constituídos em sua maioria de células vegetativas e podem ou não apresentar células especializadas chamadas de acinetos e heterócitos, que funcionam como esporos de resistência durante condições ambientais não favoráveis, e como células fixadoras de nitrogênio atmosférico, respectivamente.

Para a realização da fotossíntese, as cianobactérias possuem pigmentos, isto é, a clorofila e as ficobiliproteínas, que as permitem converter a energia solar em ATP. Tais microrganismos realizam fotossíntese oxigênica e algumas espécies podem

realizar também a fotossíntese anoxigênica, com alternância entre elas (MADIGAN *et al.*, 2012).

Na fotossíntese anoxigênica, o principal pigmento é a bacterioclorofila A, que se associa a bacteriofeofitina, quinonas e carotenoides. O fotocomplexo consiste de duas moléculas de bacterioclorofila A, chamados de par especial, duas bacterioclorofilas A adicionais, que funcionam como fluxo fotossintético de elétrons, duas moléculas de bacteriofeofitina (moléculas de bacterioclorofila sem o magnésio), duas moléculas de quinona e um pigmento carotenoide. Todos esses pigmentos são integrados de forma que possam interagir na rápida transferência de elétrons nos primeiros estágios na conversão de energia fotossintética (MADIGAN *et al.*, 2012).

Na fotossíntese oxigênica, os pigmentos presente são a clorofila A e as ficobiliproteínas ficocianina, aloficocianina, e ficoeritrina. Estes estão organizados em estruturas chamadas Fotossistema I e Fotossistema II. Cada um tem um centro de reação espectralmente distinto de clorofila A. No fotossistema I, a clorofila absorve em comprimentos de onda mais distantes do vermelho, e no fotossistema II, em comprimento de onda mais próximo. Além destes, também são encontrados carotenóides como agentes fotoprotetores que impedem a oxidação de componentes do sistema fotossintético, os quais estão localizados intracelularmente nos tilacóides.

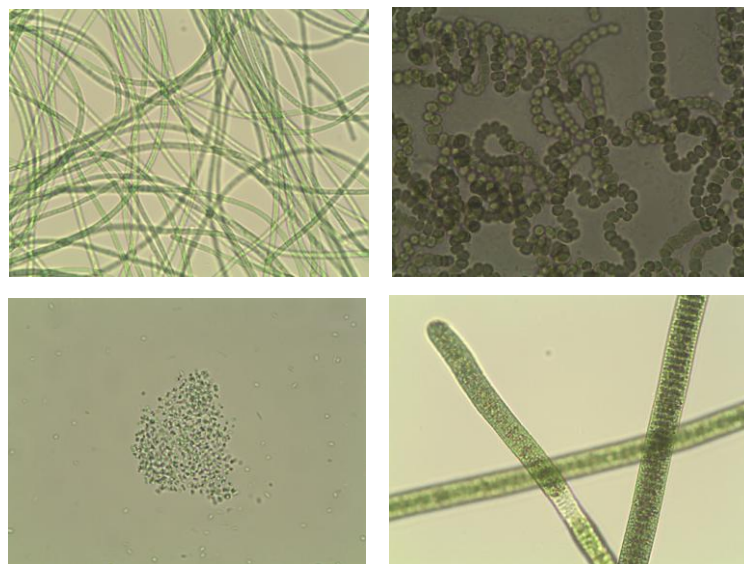


Figura 1: Diversidade Morfológica de cianobactérias: Morfologia filamentosa (acima) e unicelular (abaixo a esquerda). Tricoma em cianobactéria filamentosa (abaixo a direita)

Foto de Fábio Daniel Florêncio da Silva

Através de seu metabolismo, as cianobactérias produzem diversas substâncias de importância ecológica (LEÃO *et al.*, 2012), sanitária (CODD; MORRISON; METCALF, 2005) e biotecnológica (ABED; DOBRETISOV; SUDESH, 2009; RASTOGI; SINHA, 2009a). Tais metabólitos permitem sua interação com o ambiente e/ou com os organismos presentes nesses ambientes.

As cianotoxinas, alguns dos metabólitos secundários de cianobactérias - MSCs, têm implicações para a saúde humana devido sua toxicidade e, com base nos seus efeitos tóxicos, podem ser classificadas como: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas e toxinas com potencial irritante (lipopolissacarídeos), que atuam também no sistema gastrointestinal (CODD; MORRISON; METCALF, 2005).

Dentre os exemplos dessa classe de compostos estão as cilindrospermopsinas (Figura 2a), que possuem atividade mutagênica e carcinogênica e as saxitoxinas (Figura 2b) e as anatoxinas (Figura 2c), que possuem atividades neurotóxicas. As cianotoxinas relacionadas à hepatotoxicidade em mamíferos e outros vertebrados são as microcistinas (Figura 2d) (RASTOGI; SINHA, 2009b).

As cianotoxinas são produzidas por várias espécies de cianobactérias, por exemplo, as anatoxinas e saxitoxinas podem ser produzidas por *Aphanizomenon* sp., *Anabaena* sp. e *Lyngbya* sp. As anatoxinas podem ser produzidas também por *Planktothrix* sp. e *Cilindrospermum* sp. As microcistinas são produzidas por espécies dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Anabaenopsis*, *Nostoc* e *Hapalosiphon*, enquanto as cilindrospermopsinas, por cianobactérias de água doce.

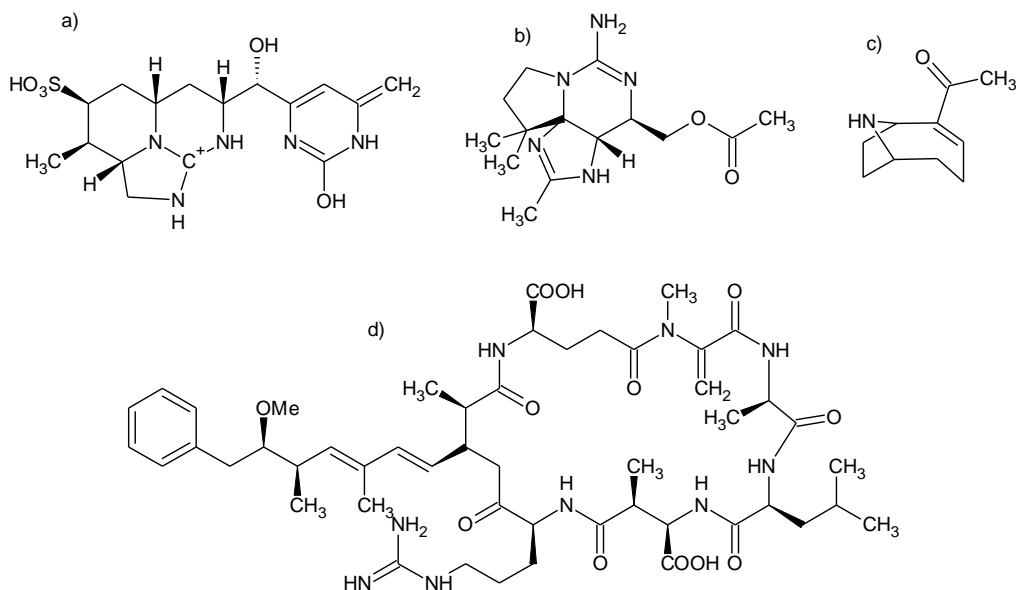


Figura 2 – Estruturas de alguns metabólitos tóxicos de cianobactérias: a) Cilindrospermopsina, b) saxitoxina, c) anatoxina e d) microcistina-LR.

As cianotoxinas, em particular as microcistinas, podem estar confinadas dentro das células bacterianas e/ou dissolvidas na água, dependendo da natureza da toxina e do estágio de crescimento da cianobactéria (APELDOORN *et al.*, 2007). A concentração exata de cianotoxinas em formas dissolvidas e no interior das células pode variar em relação a seu nível total produzido por indivíduo, assim algumas cianotoxinas podem estar em maior nível na forma dissolvida do que no interior das células e vice-versa (APELDOORN *et al.*, 2007; WELKER *et al.*, 2005).

Devido à diversidade de habitats onde se encontram, seu metabolismo adaptou-se de modo a produzir uma gama de substâncias com potencial biotecnológico (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009; RASTOGI; SINHA, 2009b). Assim, as cianobactérias têm sido utilizadas na pesquisa de biocombustíveis (GAO *et al.*, 2012), na bioremediação de áreas degradadas por vazamento de petróleo, na produção de bioplásticos (ABED; DOBRETSOV; SUDESH, 2009).

Essas e outras aplicações se devem a uma gama de MSCs cuja maioria apresenta enorme potencial para o desenvolvimento de novas drogas devido sua ação de imunossupressão, antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticancerígena, antiplasmodial e algicida (Tabela 1).

Tabela 1 – Alguns metabólitos secundários de cianobactérias (ABED; DOBRETISOV; SUDESH, 2009).

Organismo	Produto	Atividade	REFERÊNCIA
FAMÍLIA OSCILLATORIACEAE			
<i>Lyngbya majuscula</i>	Curacina A	Antimitótico	GERWICK 1994
<i>L. lagerheimii</i>	Sulfolipidio	anti-hiv	RAJEEV & XU (2004)
<i>Oscillatoria raoi</i>	sulfoglico-lipidio acacetilado	anti-viral	RESHEF <i>et al.</i> (1997)
<i>Phormidium tenue</i>	Galactosildiacylglicerol	Algicida anti-hiv	MURAKAMI <i>et al.</i> (1991) RAJEEV & XU (2004)
<i>Spirulina platensis</i>	Espirulana	Antiviral	HAYASHI <i>et al.</i> (1991)
FAMÍLIA HYELLACEAE			
<i>Hyella caespitose</i>	Carazostatina	Antifúngico	BURJA <i>et al.</i> (2001)
FAMÍLIA NOSTOCACEAE			
<i>Nostoc spongiaeforme</i>	nostocina A	Algicida	HIRATA <i>ET AL.</i> (1996)
<i>N. commune</i>	Nostodiona	Antifúngico	BHADURY & WRIGHT (2004)
<i>N. sp</i>	Nostociclamida	Antifúngico	MOORE <i>et al.</i> (1988)
<i>N. sphaericum</i>	Norharmane	antibacteriano	VOLK & FURKERT (2006)
<i>Anabaena circinalis</i>	indolocarbazoles anatoxina-a	antiviral inflamatório	COHEN (1999) RAJEEV & XU (2004)
FAMÍLIA SCYTONEMACEAE			
<i>Scytonema hofmanni</i>	Cianobactericina	Algicida	ABARZUA <i>et al.</i> (1999)
<i>S. ocellatum</i>	Tolitoxina Fitoalexina	Antifúngico	PATTERSON & CARMELI (1992) PATTERSON & BOLIS (1997)
<i>S. pseudohofmanni</i>	<i>Scytophycins</i>	Antifúngico	BURJA <i>et al.</i> (2001)
FAMÍLIA MICROCHAETACEAE			
<i>Tolypothrix tenuis</i>	Toiocamicina	Antifúngico	BANKER & CARMELI (1998)
<i>T. tjipanensis</i>	Tjipanazoles	Antifúngico	BONJOUKLIAN <i>et al.</i> (1991)
FAMÍLIA STIGONEMATACEAE			
<i>Fischerella muscicola</i>	Fischerelina	antifúngico, algicida	DAHMS <i>et al.</i> (2006)
<i>Hapalosiphon fontinalis</i>	Hapalindol	Antifúngico	BURJA <i>et al.</i> (2001)
FAMÍLIA MERISMOPEDIACEAE			
<i>Gomphosphaeria aponina</i>	Aponina	Algicida	BHADURY & WRIGHT (2004)
FAMÍLIA CHROOCOCCACEAE			
<i>Micricystis aeruginosa</i>	kawaguchipectina B	antibacteriano	DAHMS <i>et al.</i> (2006)

Como em outros microrganismos, a síntese natural de produtos bioativos de cianobactérias ocorre principalmente pela ação de enzimas multifuncionais, chamadas de peptídeo sintetase não-ribossômica - NRPS, policetídeo sintase - PKS ou por um misto dos dois sistemas enzimáticos. Semelhante a uma linha de produção, cada uma delas possui um domínio funcional individual, organizado em módulo, que é responsável por uma transformação específica na substância que ela gera (Figura 3).

O conjunto mínimo necessário para um ciclo de extensão consiste em domínios de adenilação (A), tiolação (T ou PCP, de proteína carreadora de peptídica) e condensação (C) (LAMBALOTI et al., 1996; MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; MOOTZ; SCHWARZE; MARAHIEL, 2002). Durante o processo de síntese, a cadeia peptídica permanece ligada à enzima por meio do último domínio T. Sua liberação depende de um domínio de tioesterificação ou clivagem (TE ou CV), presente na porção C-terminal da NRPS e que é crucial para sua funcionalidade. Baseado no ataque nucleofílico de um sítio com serina à peptídica-tioéster preso no último domínio T, o peptídeo pode ser liberado ou por hidrólise na forma de um peptídeo linear ou ainda sofrer uma reação intramolecular originando um peptídeo cíclico (SCHWARZER; MOOTZ; MARAHIEL, 2001). Além dos domínios A, T, C e TE básicos para todas as NRPS, outros domínios adicionais, como por exemplo, os de epimerização (E) e o de metilação (NMT), podem compor a estrutura de um ou mais módulos de acordo com o produto final. O domínio E catalisa a racemização dos *L*-aminoácidos, permitindo a presença de *D*-aminoácidos nos peptídeos formados (LUO et al., 2002), enquanto o NMT metila a substância nascente (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997).

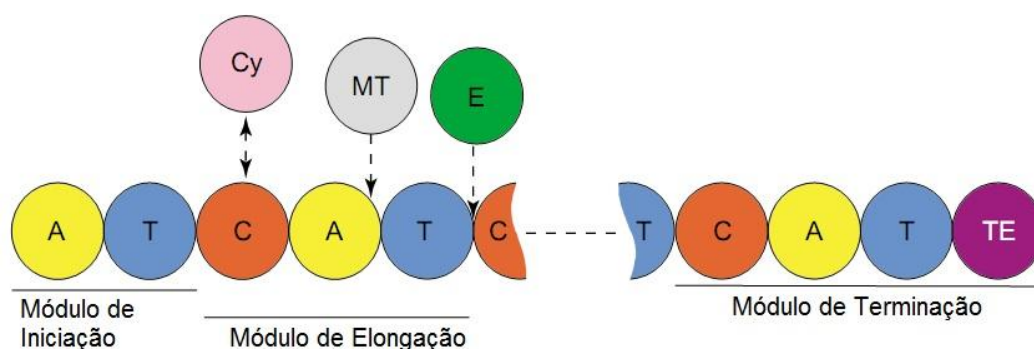


Figura 3 – Representação esquemática da Peptídeo sintetase não-ribossomal (CHALLIS; NAISMITH, 2004)

A: Domínio de Adenilação
T: Domínio de Tiolação
C: Domínio de Condensação
Cy: Domínio de ciclização

MT: Domínio de Metilação
E: Domínio de Epimerização
TE: Domínio de Esterificação ou clivagem

Outra via biossintética presente em algumas cianobactérias é aquela mediada pelas enzimas policetídeos sintases - PKS. Até o momento foram descritos três tipos de PKS: (i) a PKS tipo 1, que são enzimas multifuncionais organizadas em módulos que possuem atividades não iterativas e sintetizam policetídeos reduzidos, como macrolídeos, poliésteres e polienos (CORTES et al., 1990; DONADIO et al., 1991); (ii) a PKS tipo 2, que é um complexo multienzimático com um único conjunto de atividades que agem iterativamente que sintetiza policetídeos aromáticos (MALPARTIDA; HOPWOOD, 1984; MOTAMEDI; HUTCHINSON, 1987), e (iii) a PKS tipo 3, que é uma enzima homodimérica com domínios agindo iterativamente, que também sintetiza policetídeos aromáticos (FUNA et al., 1999). Distintamente da peptídeo-sintetase não-ribossomal que adiciona aminoácidos, a policetídeo sintase adiciona unidades derivados de acil-CoA (SHEN, 2003).

As PKS possuem domínios acil-transferase (AT), ceto-sintase (KS), ceto-redutase (KR), Desidratase (DH), enoil-redutase (ER) e Tioesterase (TE). O domínio acil-transferase catalisa a transferência de um grupo acil-CoA para um resíduo tiol, localizado no sítio ativo de uma proteína transportadora de acila (ACP) (KHOSLA et al., 2007). A figura 4 mostra a representação esquemática da policetídeo sintase. Por sua característica nucleofílica, o acil-CoA acoplado na ACP ataca a ligação eletrofílica tioéster no domínio KS onde ocorre uma descarboxilação e condensação, formando um beta-cetoéster. Devido sua reatividade, a beta-carbonila é reduzida em um grupo hidroxila no domínio KR. No próximo passo, que ocorre no domínio DH, o grupo hidroxila previamente formado é eliminado como água, formando uma dupla ligação naquela região. Subsequentemente, no domínio ER, a dupla ligação é removida. Este grupo formado será adicionado de outro grupo acetato ou derivado, que sofrerá novamente as reações nos domínios dos outros módulos, durante o alongamento do policetídeo e ao final do último módulo, no domínio TE, é liberado o policetídeo (KHOSLA et al., 2007). Na PKS, os módulos nem sempre terão todos os domínios catalíticos. É possível que em um módulo existam todos os domínios e no próximo módulo, já não existirá, o domínio desidratase, e não haverá a perda de água, por exemplo. Em outro, já não haverá a ceto-redução, e assim sucessivamente. Isto permitirá uma variedade estrutural muito grande aos policetídeos (KHOSLA et al., 2007; SHEN, 2003).

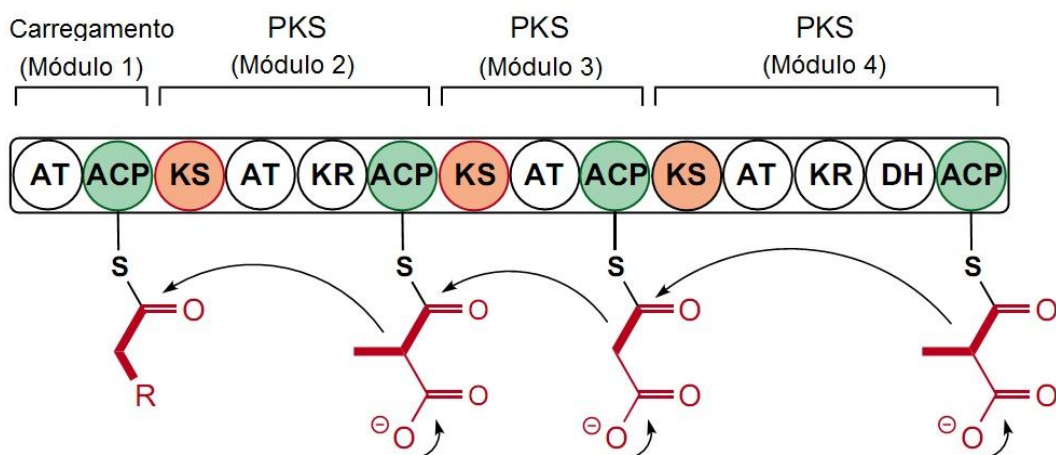


Figura 4 – Representação Esquemática da Poliketido-sintase (SHEN, 2003)

AT: Domínio Acil transferase

ACP: Proteína transportadora de acila

KS: Domínio ceto-sintase

KR: Domínio ceto-redutase

DH: Domínio desidratase

Outras vias biossintéticas em cianobactérias incluem a via do chiquimato, a qual liga o metabolismo de carboidratos à biossíntese de compostos aromáticos (HERRMANN; WEAVER, 1999). Um dos metabólitos produzidos ao longo desta via é o 3-dehidroquinato que pode entrar em outra via metabólica, ainda não completamente elucidada, levando à produção de micosporinas e aminoácidos tipo micosporinas - MAAs, metabólitos secundários que têm como uma de suas principais funções a proteção contra a radiação ultravioleta (BANDARANAYAKE, 1998). Adicionalmente, Dunlap & Yamamoto (1995) sugerem que a micosporina-glicina pode funcionar como um anti-oxidante biológico em organismos marinhos .

1.1 MAAs: Aspectos estruturais

As micosporinas e os aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) São compostos de baixa massa molecular (< 400 Da), incolores, solúveis em água. As micosporinas diferem dos MAAs por conterem cromóforos aminociclohexenona conjugados com um nitrogênio substituinte de um aminoácido ou um aminoálcool, enquanto que os MAAs possuem um cromóforo aminociclohexenimina. Dois cromóforos foram descritos diferenciando micosporinas (2-OMe,) e nor-micosporina (2-OH,) (Figura 5) (BANDARANAYAKE, 1998; SINHA; HÄDER, 2008; SINHA; SINGH; HÄDER, 2007). Alguns

MAAs também contêm ésteres de sulfato ou ligações glicosídicas. As variações nos grupos laterais e nos substituintes do nitrogênio causam diferenças nos espectros de absorção dos MAAs (SINGH *et al.*, 2008a).

As micosporinas são consideradas bases de Schiff (enamino cetonas) que possuem em comum o sistema de anel aminociclohexenona ligado a um aminoácido ou a um aminoálcool. Em ambos os grupos, as estruturas variam de acordo com a porção amino. Nas micosporinas fúngicas, com exceção da micosporina-alanina (Figura 6d), isolada da mucilagem conidial de *Colleotrichum graminicola*, o único aminoácido envolvido é a serina e seu alfa-aminoálcool correspondente serinol, e os pares relacionados glutamina/glutaminol e ácido glutâmico/glutamicol. A primeira substância desse grupo que teve sua estrutura elucidada foi a micosporina-1, também chamada de micosporina-serinol, isolado dos carpóforos do basidiomiceto *Stereum hirutum* (FAVRE-BONVIN; ARPIN; BREVARD, 1976), caracterizado por um anel ciclohexenona ligado a uma porção de serina reduzida. A micosporina-2, isolada de *Botrytis cinera*, possui um derivado de ácido glutâmico e parece ser mais distribuído entre os fungos e possui cadeia aberta, formando também um anel. A micosporina-2 ocorre *in vivo* como glicosídeo, e as micosporinas glicosídeos descobertas até agora são descritas em fungos. A nor-micosporina-glutamina, a única nor-micosporina, é descrita como a principal substância que absorve UV no fungo *Pyronema omphalodes* (BANDARANAYAKE, 1998).

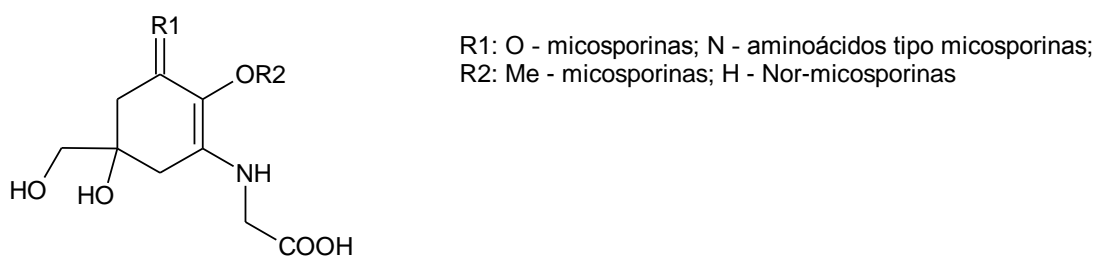


Figura 5: Estrutura básica das micosporinas e MAAs.

Com apenas duas exceções, os metabólitos que absorvem UV em organismos marinhos são derivados imino de micosporina ou MAAs que contém sistemas de anel aminociclohexeninima com absorção máxima de UV entre 310 e 360 nm. A glicina é o

aminoácido mais comum presente em todos os MAAs, geralmente acoplado no terceiro carbono (SINHA; HÄDER, 2008). Uma exceção é a imino-micosporina micosporina-metilamina-treonina, isolada de recifes de corais de *Pocillopora damicornis* e *Stylophora pistillata* onde a glicina é substituída pela metilamina. Outras exceções incluem dois ésteres sulfatos de micosporinas palitina-treonina-sulfato e palitina-serina-sulfato do coral *Stylophora pistillata*, onde a glicina é substituída pela treonina e serina, respectivamente, e a anêmona *Anthopleura elegantissima* que contém micosporina-aurina (BANDARANAYAKE, 1998).

A micosporina-glicina, que foi o primeiro MAA estruturalmente caracterizado (ITO; HIRATA, 1977), e a micosporina-aurina são os únicos MAAs do tipo aminociclohexenona de fontes marinhas. O usujireno é um aminomicosporina de algas. Até 1998, 17 aminociclohexeniminas e 15 aminociclohexenonas tinham sido identificadas de organismos marinhos e terrestres (BANDARANAYAKE, 1998). Algumas substâncias induzidas por UV nos comprimentos de onda entre 312 e 355 nm têm sido descritos ligados covalentemente a oligossacarídeos na cianobactéria terrestre *Nostoc commune* (BANDARANAYAKE, 1998; SINGH et al., 2008a). Compostos espectralmente similares e solúveis em água têm sido isolados em outras cianobactérias (BANDARANAYAKE, 1998).

Os MAAs quando presentes em invertebrados marinhos que apresentam relações simbióticas com algas, como no caso do coral *Acropora formosa* em simbiose com o molusco gigante *Tridachna formosa*, são livremente difusos, mas não associados com proteínas, enquanto que em invertebrados sem algas simbióticas, como no caso da estrela do mar *Acanthaster planci* e em simbiose com peixes teleósteos, os MAAs estão associados a proteínas oculares (BANDARANAYAKE, 1998).

Nesses invertebrados, as proteínas associadas aos MAAs se localizam nos tecidos epidérmicos externos, enquanto nos peixes teleósteos a interação dos MAAs com proteínas formam complexos nas lentes oculares que podem ser estáveis ou instáveis BANDARANAYAKE (1998). Os exemplos destes complexos incluem aquele da asterina-330 ($\lambda = 330$ nm) em associação com uma proteína de 80 a 100 kDa ($\lambda = 280$ nm), formando um complexo altamente instável com absorção de 330 nm e do gadusol, um composto precursor de MAAs ($\lambda_{\text{max}} = 268$ nm) que se associa a uma

proteína de 20 - 30 KDa ($\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$), formando um complexo relativamente estável com absorção de 323 nm (BANDARANAYAKE, 1998).

As massas moleculares das proteínas destes dois complexos são característicos de β - e γ -cristalinas, que constituem duas das três principais proteínas cristalinas solúveis presentes nas lentes oculares de peixes (BANDARANAYAKE, apud BANDARANAYAKE, 1998). A associação de γ -cristalina com o gadusol é de natureza similar à associação do pigmento visual rodopsina, uma base de schiff que contém 11-cis-retinal, um grupo prostético e uma lipoproteína opsina ($\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$) (BANDARANAYAKE, 1998; SHICK; DUNLAP, 2002).

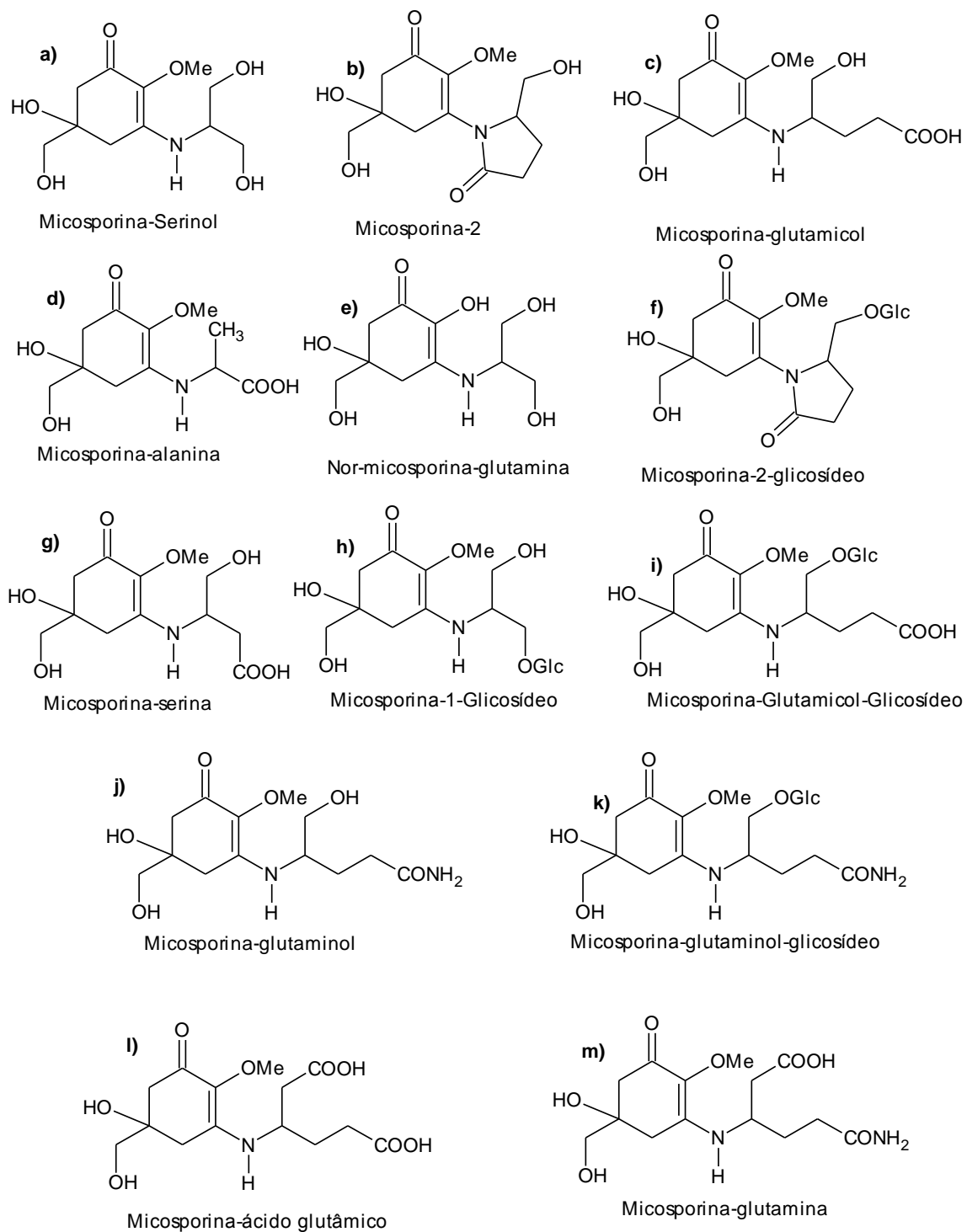


Figura 6: Estruturas de Micosporinas (BANDARANAYAKE, 1998)

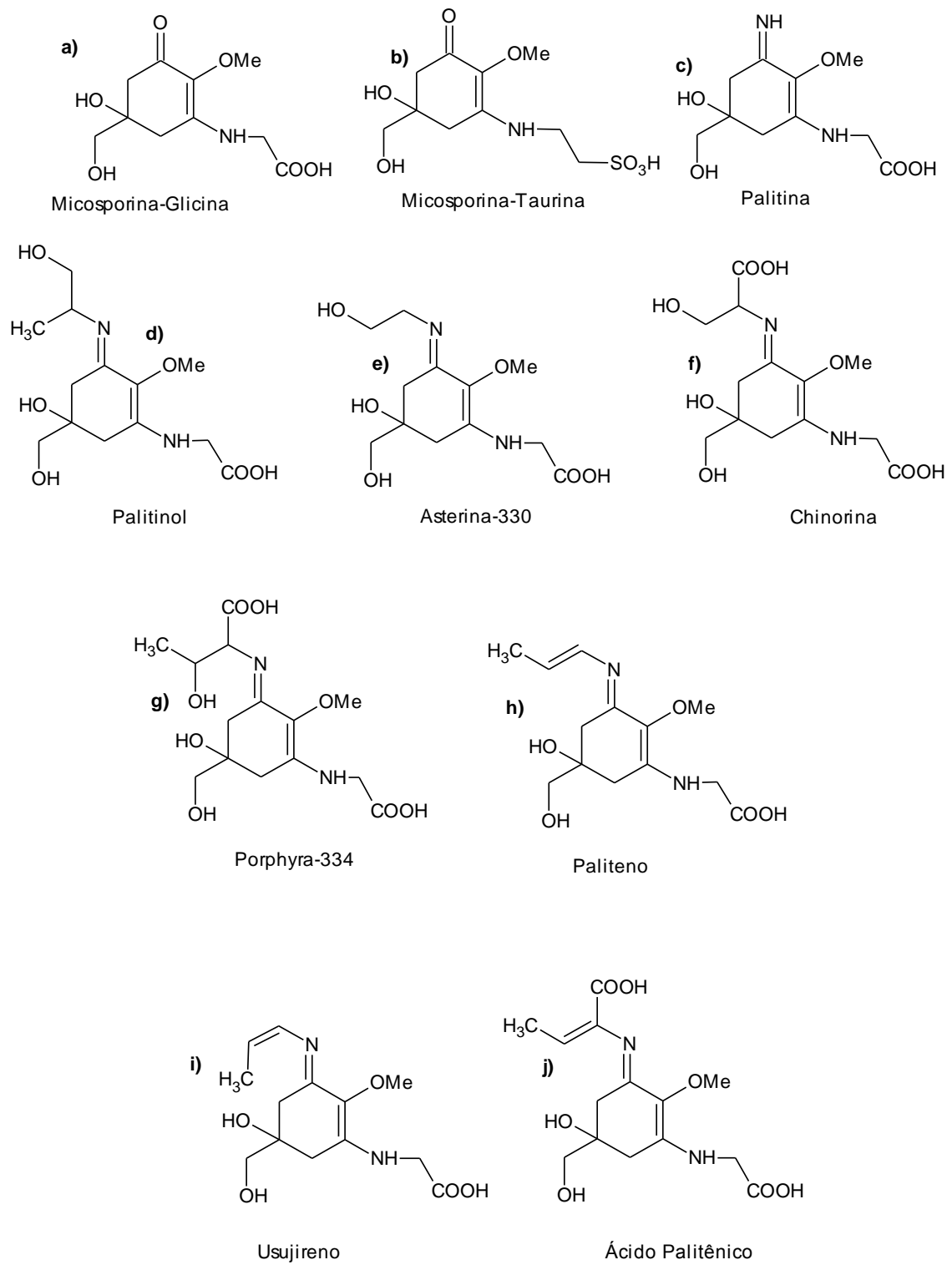


Figura 7: Estruturas de MAAs (BANDARANAYAKE, 1998)

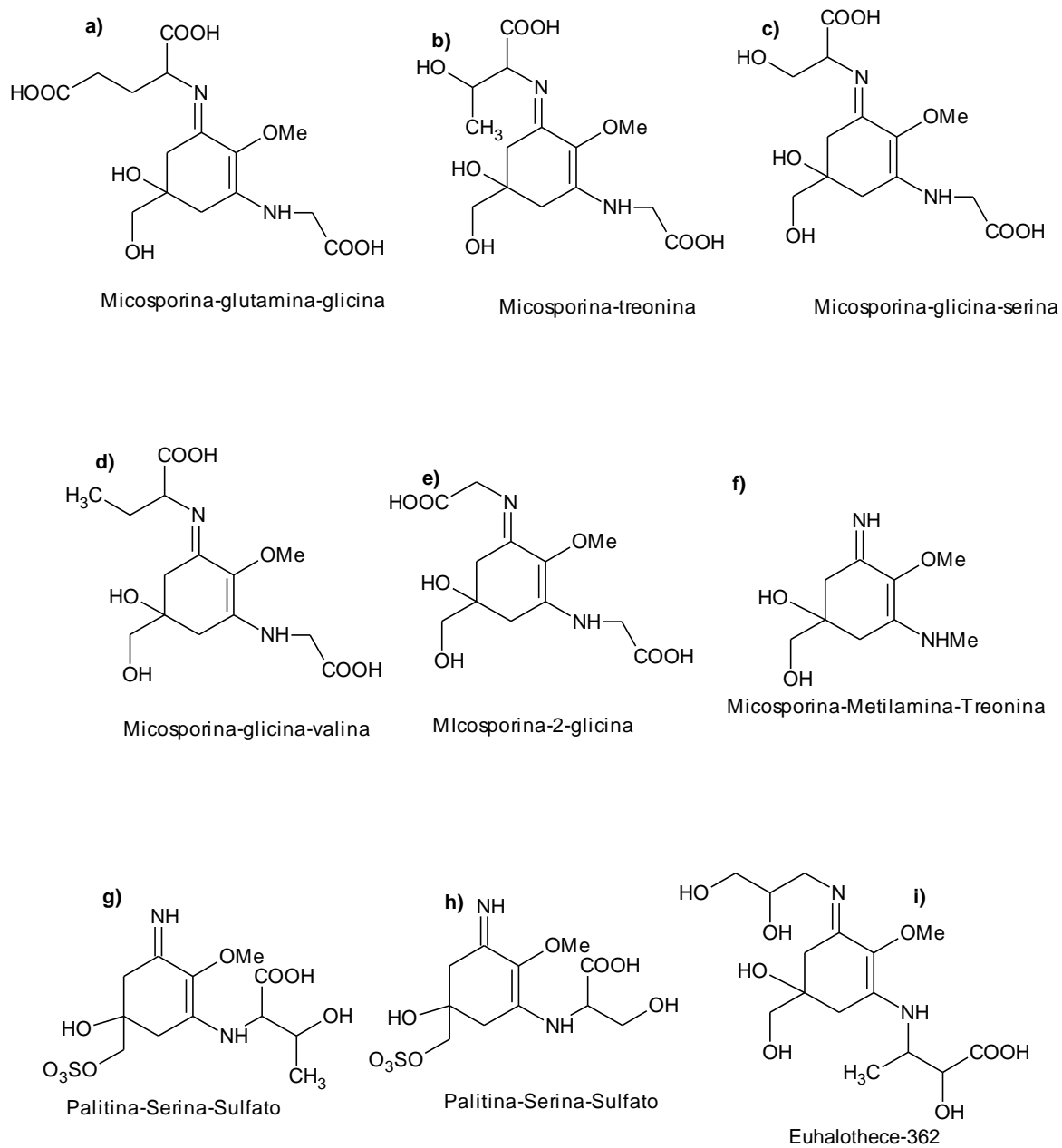


Figura 8: Estruturas de MAAs (continuação)

Fonte: (BANDARANAYAKE, 1998)

1.2 MAAs como fotoprotetores

As micosporinas e os MAAs são considerados compostos captadores de energia ou transdutores de comprimentos de onda na região do ultravioleta para comprimentos de onda úteis em fotossíntese ou precursores biossintéticos para outros compostos ou pigmentos. Um número de MAAs tem seu máximo de absorção na região do UVB enquanto outros absorvem no UVA. Sua forte absorção entre os comprimentos de onda 310 a 360 nm, seu alto coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 28,100 - 50,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e fotoestabilidade em água doce ou salgada apoiam a idéia de que eles têm papel fotoprotetor (KLISCH; HÄDER, 2008; RASTOGI; SINHA, 2009a; SINGH et al., 2008a, 2010; SINHA; HÄDER, 2008; WHITEHEAD; HEDGES, 2005).

OYAMADA et al. (2008) relataram os efeitos protetores de chinorina, porphyrina-334 e micosporina-glicina, que protegem fibroblastos humanos da morte celular induzida por radiação UV. (SCHMID; SCHÜRCH; ZÜLLI, 2006) observaram que uma mistura de porphyrina-334 e chinorina apresentou efeito anti-idade na pele humana, enquanto MISONOU et al. (2003) observaram que os MAAs podem bloquear a produção do fotoproduto 6-4 e a formação do dímeros de pirimidina.

Desde que podem dissipar a radiação absorvida como calor sem produzir espécies reativas de oxigênio (CONDE; CHURIO; PREVITALI, 2000; SUH et al., 2003), estes compostos têm sido biotecnologicamente explorados, tendo como principal exemplo o produto comercial Helioguard 365, que é baseado em MAAs oriundos da alga vermelha *Porphyra umbilicalis*. De fato, os MAAs são verdadeiros compostos multipropósito, que podem ser explorados biotecnologicamente em várias formas, com grande potencial de uso na indústria de cosméticos e produtos de higiene pessoal como filtro solar e ativador da proliferação celular.

Os MAAs parecem ser altamente resistentes aos estresses abióticos como temperatura, radiação UV, solventes e variações de pH (SINGH; HÄDER; SINHA, 2012; SINGH et al., 2008a). Alguns MAAs aumentam em concentração durante a exposição a raios UV, mas isso não parece ser uma resposta direta da radiação UV, mas sim do acúmulo de mudanças sazonais, reprodutivas ou de dieta (SINGH et al., 2008a).

No ambiente marinho, os efeitos deletérios dos raios UV têm sido detectados em organismos que habitam profundezas de 20 a 30 m e incluem efeitos diretos de UVB e efeitos indiretos de UVA. Os efeitos dos altos níveis solares da radiação incluem

inibição do crescimento, da calcificação de corais, do crescimento de esqueletos, da fotossíntese, redução da motilidade e sobrevivência, redução da concentração de pigmentos fotossintéticos e sua destruição, fotoinibição, diminuição da fixação de carbono e captação de nitrogênio, diminuição do potencial reprodutivo, e danos do DNA e proteínas (BANDARANAYAKE, 1998).

Enquanto as micosporinas e os MAAs conferem proteção aos organismos que os produzem, acredita-se que animais marinhos se protegem da radiação UV adquirindo-os estes compostos através de sua dieta, pois estes conferem proteção solar não somente nos organismos produtores, mas também aos seus consumidores primários e secundários ao longo da cadeia alimentar (CARRETO; CARIGNAN, 2011; FERRONI *et al.*, 2010; SINHA; SINGH; HÄDER, 2007).

Acredita-se que alguns organismos fitoplanctônicos e dinoflagelados, que são de longe os maiores produtores de biomassa dos oceanos e formam a base da cadeia alimentar, produzam os MAAs através da via do chiquimato, fornecendo assim proteção contra a radiação UV a organismos que vivem em relações simbióticas com eles (SHICK; DUNLAP, 2002; SINGH *et al.*, 2011). Como a via do chiquimato está presente somente em algas, fungos, bactérias e alguns protozoários, a dieta é tida como evidência da bioacumulação de MAAs em organismos marinhos. Adicionalmente, é possível que bactérias heterotróficas presentes em algum desses organismos realizem a síntese *de novo* dos precursores desses compostos, fornecendo-os a seus hospedeiros (SHICK; DUNLAP, 2002).

Singh *et al.* 2008, observaram que no dinoflagelado *Alexandrium excavatum* a mudança de ambiente com baixo nível de radiação fotossintética ativa – PAR (do inglês, *Photosynthetically Active Radiation*) para um ambiente de altos níveis de PAR causou uma mudança na composição de MAAs, bem como um aumento geral na absorção UV. O *Prorocentrum micans* produziu elevadas concentrações de MAA quando cultivado na presença de radiação UV (SINGH *et al.*, 2008a).

Quando cultivados sob PAR, dinoflagelados que formam florações tendem a ter a grande capacidade de acumular MAAs e quando estimulado pela mudança na irradiação pode alterar seus complementos de MAA e assim seu espectro de absorção na ordem de horas (SHICK; DUNLAP, 2002). No dinoflagelado *Gyrodinium dorsum* o acúmulo de MAAs foi estimulado pela PAR e pela radiação UV (SINGH *et al.*, 2008a),

enquanto que em *Phaeocystis Antarctica* a indução da síntese de MAAs ocorre somente pela radiação UVA e UVB (SINGH *et al.*, 2008a).

As macroalgas são os principais produtores de biomassa ao longo da costa e das plataformas continentais. São exploradas comercialmente em larga escala e são utilizadas como alimento por estágios larvais de animais economicamente importantes. Exposições a curto ou longo prazo à radiação solar inibe o crescimento para as fases adultas de muitas espécies de macroalgas devido à destruição de cloroplastos e mitocôndrias e da ocorrência de metabólitos produzidos sob estresse por UV (SINGH *et al.*, 2008a).

O papel fotoprotetor de compostos que absorvem UV foi descrito em macroalgas pela primeira vez em 1961. Desde então, os estudos qualitativos e quantitativos têm sido feitos para avaliar a distribuição dos MAAs em algas comercialmente importantes, que variam entre classes, profundidade e latitude (SINGH *et al.*, 2008a). Como resultado destes estudos, observou-se que, enquanto, poucas algas verdes produzem MAAs, a maioria das macroalgas produtoras de MAAs pertencem à família Rodophyceae, que são seguidas daquelas da família Phaeophyceae (SINGH *et al.*, 2008a). Há evidências de que a exposição à luz azul e à radiação UV possa induzir a produção de MAAs em macroalgas da espécie *Chondrus crispus* (FRANKLIN; KRABS; KUHLENKAMP, 2001).

As simbioses constituem um arranjo heterogêneo de MAAs, onde sua concentração pode variar de acordo com a profundidade do hábitat de forma que as simbioses têm sido estudadas relacionando os determinantes ambientais para os níveis de MAAs (SHICK; DUNLAP, 2002). Os recifes de Corais (Scleractinia) são particularmente bem estudados e coletivamente utilizam pelo menos 13 MAAs diferentes que são produzidos pelos organismos simbióticos (SHICK; DUNLAP, 2002). Corais e moluscos gigantes do indo-pacífico se sobrepõem em seus complementos de MAAs, porque eles formam simbioses com o mesmo filotipo de *Symbiodinium* (SHICK; DUNLAP, 2002).

Os MAAs são mais concentrados nos hospedeiros que nos simbiontes frescos isolados deles, sugerindo que por causa da sua alta concentração de MAAs e relativamente longo caminho ótico os tecidos do hospedeiro conferem a primeira linha de defesa contra a radiação UV (SHICK; DUNLAP, 2002). Células pequenas têm sua

capacidade de absorção limitada porque a absorção do UV é uma função tanto da concentração do cromóforo como do tamanho da célula, ou seja, o comprimento do caminho ótico, com a diminuição do fator de proteção solar (SHICK; DUNLAP, 2002). Em células grandes os MAAs são mais eficientes devido a grande área de superfície, enquanto as células menores compensam a menor área formando densas populações celulares (SINGH *et al.*, 2008a).

Como filtros solares convenientes, os MAAs são mais concentrados nos tecidos superficiais de moluscos tridacnidos e o ascídio *Lissoclinum patella* que nas camadas subjacentes dos tecidos onde as algas residem (SHICK; DUNLAP, 2002). Da mesma forma na anêmona do mar *Anemonia viridis* os MAAs são mais concentrados no ectoderma tentacular que no endoderma, onde as zooxantelas estão localizadas (SHICK; DUNLAP, 2002). O achado de que as zooxantelas no hospedeiro apresentam padrão de expressão de proteínas diferentes da alga *in vitro*, é um indício de que o hospedeiro pode alterar a bioquímica do endosimbionte, o que pode explicar as diferenças de MAAs sintetizados em cultura e nas algas em simbiose (SHICK; DUNLAP, 2002)

Dois dos MAAs encontrados nos olhos de peixes, paliteno e palitinol, além de chinorina também ocorrem nos olhos do molusco cefalópode *Sepia officinalis*, onde o espectro de absorção dos MAAs oculares está na faixa de 332 a 360 nm e o pigmento visual não associado em torno de 490 nm, o que sugere que os MAAs em *Sepia officinalis* provavelmente não afetam sua sensibilidade visual (SHICK; DUNLAP, 2002).

1.3 MAAs em cianobactérias

Acredita-se que compostos que absorvem radiação UV como os MAAs permitiram a sobrevivência das cianobactérias quando não havia a camada de ozônio estratosférica (SINGH *et al.*, 2008a). O acúmulo de grandes quantidades de MAAs em cianobactérias foi descrita pela primeira vez em 1969 (SHIBATA, 1969). A localização exata dos MAAs nas cianobactérias não é exatamente conhecida, porém, em *Nostoc commune* é extracelular e ligada a oligossacarídeos da bainha (BÖHM *et al.*, 1995).

Segundo Rastogi & Sinha (2009), cianobactérias produtoras de MAAs são abundantes em ambientes hipersalinos. Dois MAAs foram obtidos de uma linhagem de *Eubhalothece* sp. oriunda de uma crosta de gesso em uma lagoa hipersalina sob

luminosidade intensa. O primeiro, deles, identificado como micosporina-2-glicina, foi descrito pela primeira vez em cianobactérias, e o segundo, foi identificado como Euhalothece-362 permitindo a inferência de que a linhagem cianobacteriana supracitada utilizava micosporina-2-glicina e euhalothece 362 para proteger sua maquinaria celular dos efeitos danosos da radiação UV (KEDAR; KASHMAN; OREN, 2002).

Três MAAs foram identificados a partir da cianobactéria *Synechocystis* sp. PCC 6803, o desidroxiusujireno e o M-343, que são induzíveis por radiação UVA, e a micosporina-aurina, que é induzida tanto pela radiação UVA como pela UVB (ZHANG; LI; WU, 2007). Segundo SINGH et al. (2008a), a presença de chinorina e porphyrina-334 (Figura 8g) em *Microcystis aeruginosa*, talvez explique sua habilidade de desenvolver e manter florações superficiais mesmo em grandes quantidades de radiação solar (SINGH et al., 2008a).

Uma colônia de *Leptolygbya* da Antártica foi significativamente inibida sob UVB suplementar enquanto a inibição de *Phormidium* sp. foi menos proeminente devido seu conteúdo 25 vezes maior de MAAs que em *Leptolygbya* (SINGH et al., 2008a). A indução da síntese de MAAs dependente de UVB em *Anabaena* sp., *Nostoc commune* e *Scytonema* sp. resultou na síntese de chinorina somente (SINHA; HÄDER, 2008). Sinha et al. (2003) relataram a presença de chinorina e porphyrina-334 em três espécies de *Nodularia* (*N. báltica*, *N. harveyana* e *N. spumigena*). De acordo com SOMMARUGA; GARCIA-PICHEL (1999) os MAAs asterina-330, chinorina, palitinol e micosporina-glicina foram descritos como tendo um papel fotoprotetor em cianobactérias epilíticas em lagos de água doce.

Singh et al. (2010), avaliaram a habilidade de *Anabaena variabilis* PCC 7937, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Synechocystis* sp. PCC 6803 e *Synechococcus* sp. PCC 6301 em sintetizar MAAs, bem como, objetivaram identificar os genes que podem estar envolvidos em sua biossíntese, realizaram uma análise genômica e filogenética nestas linhagens. A detecção de MAAs foi observada somente em *Anabaena variabilis* PCC 7937 e como resultado da mineração genômica, Singh et al. (2010) propuseram que o produto dos genes YP_324358 (uma DHQ sintetase predita [DHQS]) e YP_324357 (uma O-metiltransferase [O-MT]) estão envolvidos na biossíntese do core comum, o deoxiguadusol, de todos os MAAs.

1.4 Biossíntese de MAAs

Acreditava-se que a biossíntese dos MAAs ocorria pela via do ácido chiquímico (Figura 9), sem evidências conclusivas em sua maior parte. Entretanto, estudos de biologia molecular e especialmente de bioinformática em cianobactérias trouxeram novas informações que sugerem outras vias envolvidas em sua biosíntese (BALSKUS; WALSH, 2010; SPENCE *et al.*, 2012). Contudo, na via do ácido chiquímico o 3-dehidroquinato age como precursor para a síntese de micosporinas fúngicas e MAAs via gadusóis (BANDARANAYAKE, 1998; SHICK; DUNLAP, 2002). O primeiro MAA, micosporia-glicina, é sintetizado pela via do chiquimato e é transformado por conversões químicas ou bioquímicas em outros MAAs. Favre-Bonvin *et al.* (1987) demonstraram que em *Trichothecium roseum*, um fungo fitopatogênico, o 3-dehidroquinato é o precursor de anéis carbônicos de cinco membros comuns às micosporinas fúngicas.

A síntese de micosporinas provavelmente ocorre a partir do 3-dehidroquinato via gadusóis (BANDARANAYAKE, 1998). O bloqueio da síntese de MAAs no coral *Stylophora pistillata* por N-fosfometilglicina (glifosato) um bloqueador específico da via do chiquimato, forneceu evidência direta de que os MAAs são formados por esta via (SHICK *et al.*, 1999). O DHQ é formado pelo 3-desoxi-D-arabinoheptulosinato-7-fosfato (DAHP) no segundo passo da via do chiquimato, pela enzima 3-dehidroquinato sintase (DHQS). Esta, que é uma isoenzima de DAHP sintase, que cataliza a primeira reação da via, a condensação do fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato, exige cobalto (Co^{2+}) e a quelação desse metal pelo glifosato pode ser a base de sua inibição (Figura 10) (SHICK; DUNLAP, 2002).

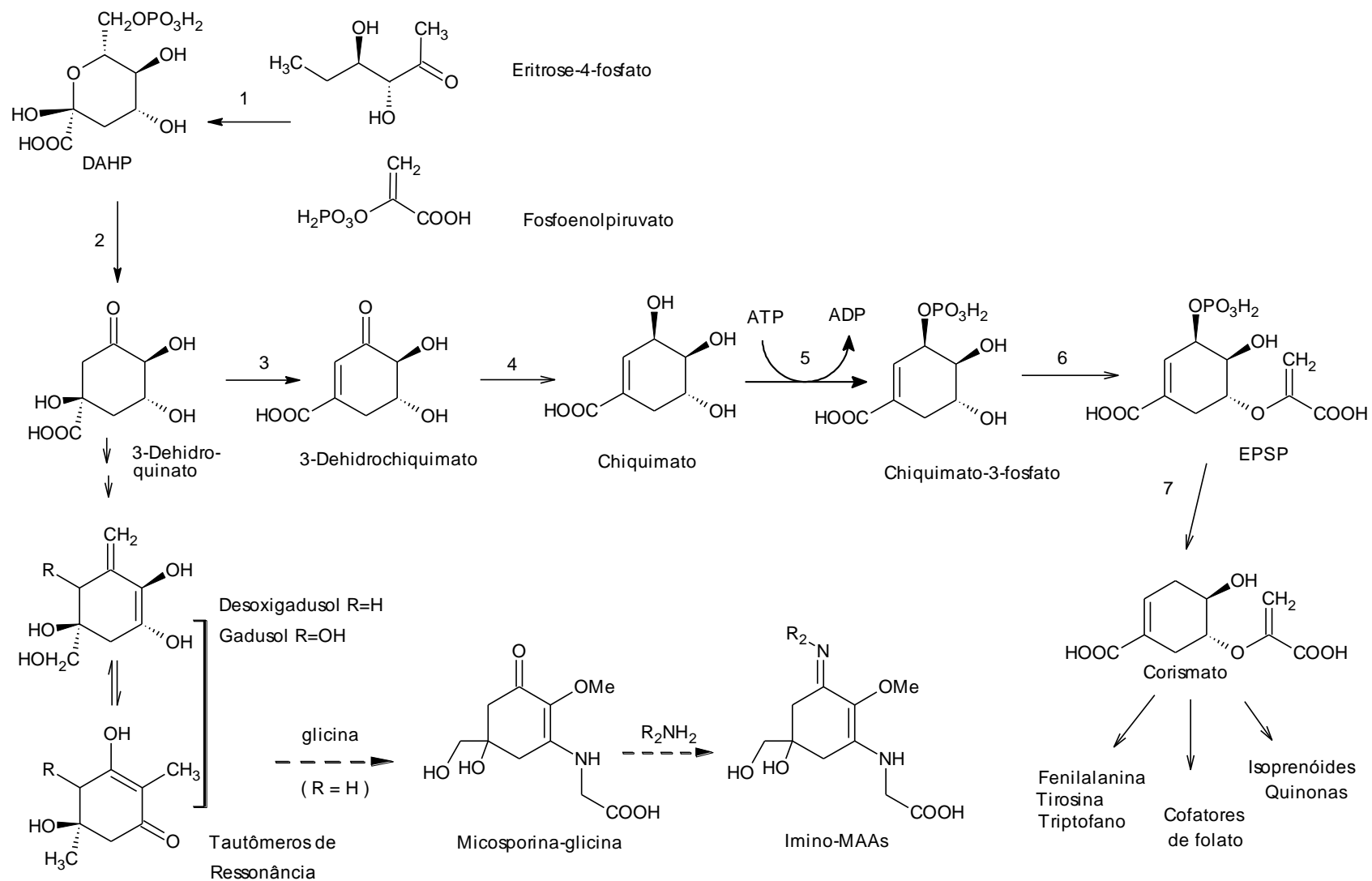


Figura 9: Via do Chiquimato e sua relação com a biossíntese de MAAs. Enzimas: 1, DAHP sintase; 2, DHQ sintase; 3, DHQ desidratase; 4, chiquimato desidrogenase; 5, chiquimato cinase; 6, EPSP sintase; 7, corismato sintase. As setas tracejadas representam as relações biossintéticas putativas entre 3-dehidroquinato (DHQ), gadusóis, e MAAs. R2, aminoácidos e amino alcoóis caracterizando MAAs individuais (SHICK; DUNLAP, 2002)

O glifosato na concentração de 1 μM é um inibidor competitivo com o PEP da 5-enoilpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSP), a sexta enzima na via. Isso é importante porque se a síntese dos MAAs na verdade prossegue a partir do DHQ e a inibição do EPSP sintase somente pode não bloquear o acúmulo de MAAs (SHICK; DUNLAP, 2002).

A análise genômica de dinoflagelados, cianobactérias e fungos, mostrou que as regiões de leitura aberta que codificam a DHQS e um outro gene, o-metiltransferase (O-MT) não relacionado à via do chiquimato, eram acompanhada de uma terceira ORF conservada, usualmente anotada como uma proteína hipotética (SINGH et al., 2010). Uma busca por domínios conservados usando esse gene revelou homologia à superfamília de assimilação de ATP (SINGH et al., 2010). Como essas enzimas catalizam a formação de ligações peptídicas BALSUS; WALSH (2010) sugerem elas podem estar envolvidas na inclusão de aminoácidos. Adicionalmente, BALSUS; WALSH (2010), comparando os *clusters* gênicos dessa classe de enzimas de cianobactérias e de fungos notaram variações genéticas consistentes com as diferenças estruturais entre os MAAs de cianobactérias e as micosporinas de fungos (BALSUS; WALSH, 2010).

Segundo BALSUS; WALSH (2010), enquanto fungos contêm enzimas adicionais ou domínios anotados como redutases, as cianobactérias apresentam uma segunda enzima putativa formadora de ligação amida, que pode ser tanto uma enzima assimiladora de ATP (*ATP-grasp sintase*) quanto um homólogo de peptídeo sintase não ribossomal (NRPS). Na análise do *cluster* gênico produtor de MAAs em *Anabaena variabilis* (ATCC) 29413, linhagem produtora de chinorina que contém um gene putativo consistindo em quatro ORFs (do inglês, *Open Reading Frame*), foi sugerido que o homólogo de DHQS e O-MT poderia formar 4-desoxigadusol, e que o homólogo assimilador de ATP e a enzima tipo NRPS pode ser responsável por acoplar glicina e serina ao 4-desoxigadusol via ligações imina (BALSUS; WALSH, 2010).

Adicionalmente, BALSUS & WALSH (2010), demonstram uma ligação direta desses genes quatro genes (*DHQS*, *O-MT*, *ATP-grasp sintase* e *NRPS*) à biossíntese de MAAs clonando, em *Escherichia coli*, todo o *cluster* (6,5 Kb) biossintético de chinorina, assim como dois *clusters* truncados, isto é, um que não continha os genes para a enzima tipo NRPS outro que não continha tanto à enzima tipo NRPS quanto o gene codificador do homólogo assimilador de ATP. Após a indução da expressão gênica,

BALSKUS & WALSH (2010) detectaram a produção de chinorina somente na linhagem que abrigava o *cluster* gênico inteiro. A linhagem que continha os *clusters* truncados produziram micosporina-glicina (sem a enzima tipo NRPS) e 4-desoxigadusol (sem a enzima tipo NRPS e a assimiladora de ATP). Esse achado sugere que o referido *cluster* está associado à produção de MAAs (BALSKUS; WALSH, 2010).

Buscando entender a química da formação dos MAAs BALSKUS & WALSH (2010), perceberam que não era produzido o 4-desoxigadusol quando adicionado 3-dehidroquinato com às enzimas DHQS (NpR5600) e a O-MT (NpR5599) de *Nostoc punctiforme* em *E. coli*, juntamente com os cofatores S-adenosilmetionina (SAM) nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e cobalto (Co²⁺). Uma observação mais refinada entre NpR5600 e a DHQS canônica, enzima com a sequência mais comum, revelou que os resíduos dos sítios ativos das enzimas associadas com a biossíntese de micosporinas se assemelham a um homólogo de DHQS, 2-epi-5-epi-valiolona sintase (EVS) do que com a DHQS canônica, o que sugere que essas enzimas podem partilhar um substrato comum, o intermediário sedoheptulose-7-fosfato (SH-7P) da via das pentoses. Quando SH-7P foi adicionada ao experimento no lugar do DHQ nas mesmas condições, foi observada a produção de 4-DG. Esse resultado contradiz o que se conhecia até então, de que as micosporinas eram biossintetizadas somente pela via do chiquimato (BALSKUS; WALSH, 2010).

Investigando os passos finais da biossíntese de chinorina, que é o acoplamento de uma glicina e de uma serina, BALSKUS & WALSH (2010) sugeriram um mecanismo distinto de biossintese de micosporinas, como a micosporina-glicina que não vai sofrer condensação para formar MAAs. Ao clonar as enzimas assimiladoras de ATP (Ava_3856) e a enzima tipo NRPS (Ava_3855) de *Anabaena variabilis* em *E. coli*, foi percebido a capacidade de Ava_3856 de produzir 4-DG na presença de ATP e de Mg²⁺. Dois mecanismos potenciais para essa formação são a fosforilação do do 4-DG seguida de adição 1,4 no nitrogênio do aminoácido à ciclohexenona ativada (Figura 11), e outro que requer a fosforilação da glicina para fornecer um acil fosfato que poderia ser atacado pelo 4-DG. O enol acilado poderia então sofrer rearranjo de O para N dirigido por uma adição 1,4 intramolecular do aminogruppo da glicina (Figura 12) (BALSKUS; WALSH, 2010).

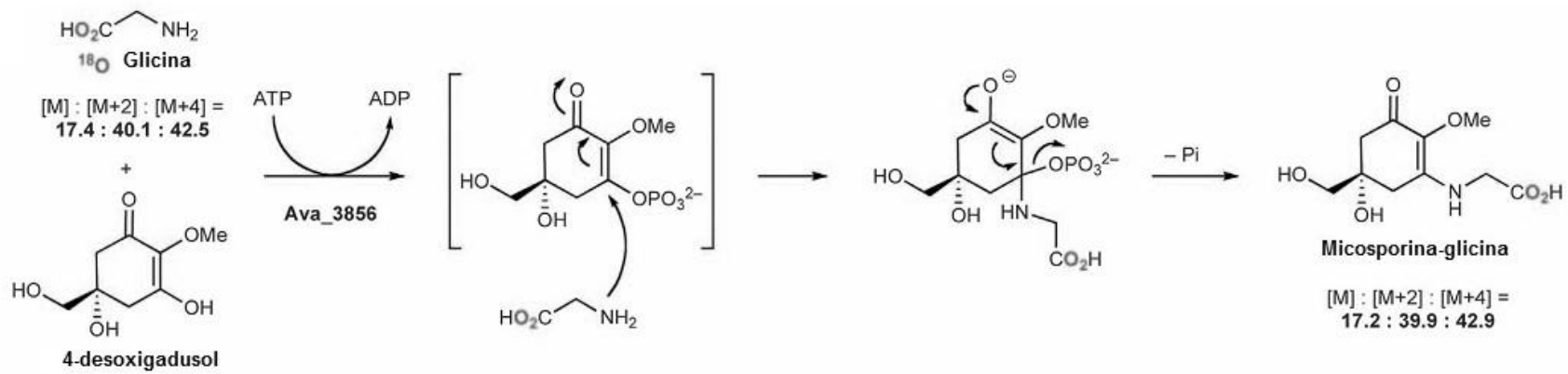


Figura 10: Biossíntese de Micosporina-glicina (BALSKUS; WALSH, 2010)

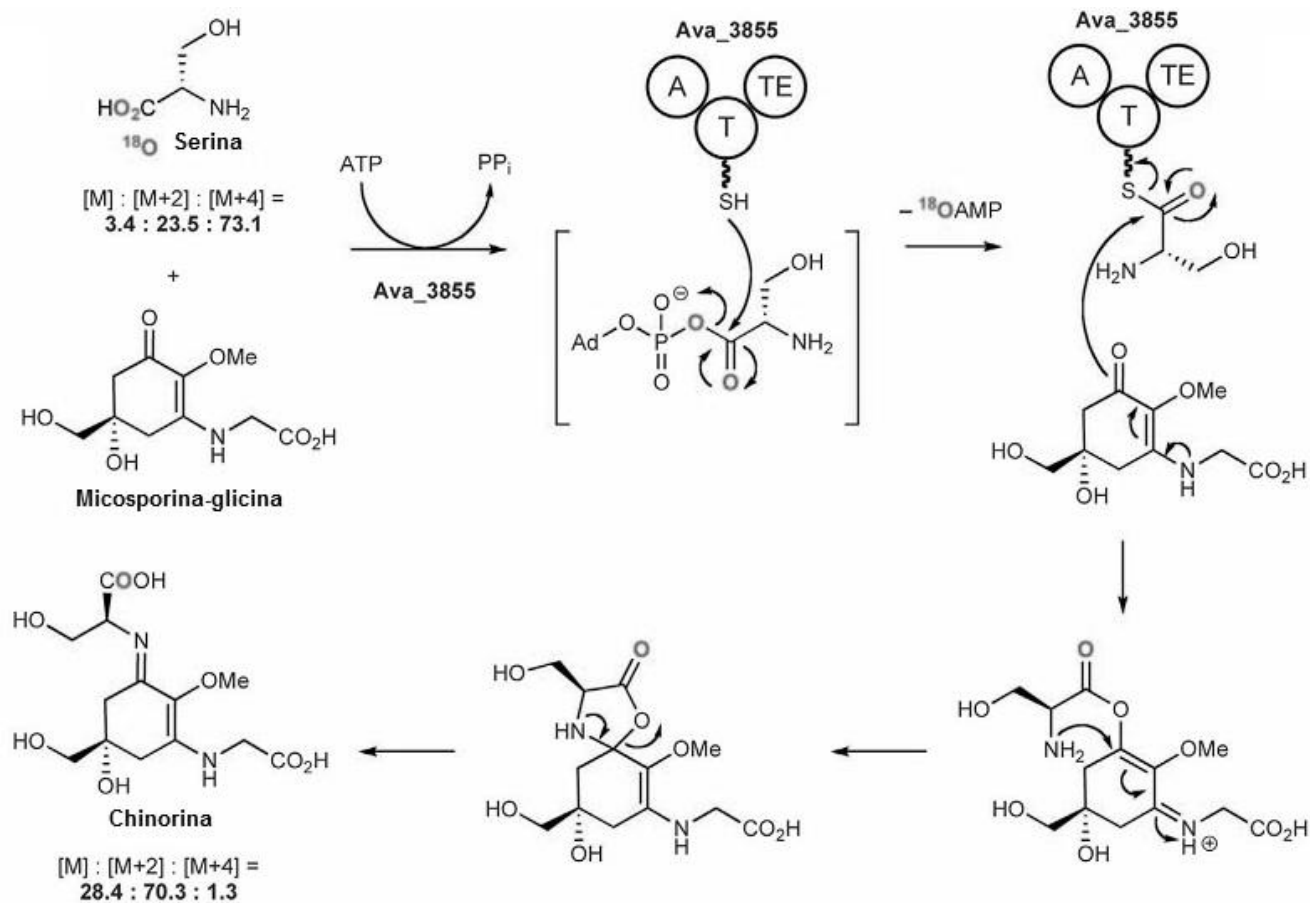


Figura 11: Biossíntese de chinorina a partir da conjugação de micosporina-glicina e serina via enzima tipo-NRPS (BALSKUS; WALSH, 2010).

A: Domínio de adenilação

T: Domínio de Tioação

TE: Domínio Tioesterase

Spence (2012) testou na linhagem de *Anabaena variabilis* ATCC 29133 onde o gene EVS havia sido removido, comparando sua produção de MAAs à linhagem onde não havia ocorrido sua remoção, e observou que a linhagem mantinha sua capacidade de produzir chinorina através do intermediário 4-DG, sugerindo assim que as vias do chiquimato e das pentoses são redundantes na produção desse MAA (Figura 13).

Os MAAs então, surgiram da linhagem plastídea, onde algas eucarióticas produzem um grupo de MAAs que se sobrepõe e é mais abrangente que em cianobactérias indicando a diversidade evolucionária das vias biossintéticas de MAAs em eucariotos fotossintéticos (SHICK; DUNLAP, 2002). A ocorrência de simbioses fototróficas de endosimbiontes que perdem MAAs e de cianobactérias em cultura podem indicar bioconversão de MAAs primários ou síntese *de novo* pelos hospedeiros dos simbiontes (SHICK; DUNLAP, 2002).

Com relação ao custo energético da biossíntese de MAAs, com base em estequiometria e coeficientes de acoplamento de ATP, HASLAM (1993) diz que o custo de 60 equivalentes de ATP para sintetizar um mol de corismato. Presumivelmente, o custo para sintetizar um mol de MAA seria similar se ele prosseguisse a partir do DHQ (Figura 10), mas com o custo de ATP correspondente para condensar os aminoácidos com a estrutura básica ciclohexenona. Isso é ao redor do dobro do custo para a síntese mais direta da maioria dos aminoácidos não aromáticos através dos intermediários do ciclo glicolítico e do ácido cítrico. RAVEN (1984) estima um custo de 300 moles de fótons capturados na fotossíntese por mol de MAA sintetizado, o que é em torno do mesmo custo de sintetizar clorofila e um décimo do custo de produzir o complexo de captura de luz de clorofila II, proteínas e pigmentos acessórios. Porque os MAAs são de 5 a 10 vezes mais concentrados que a clorofila em células de microalgas e de cianobactérias (SHICK; DUNLAP, 2002). O custo da síntese de MAAs é considerável: Talvez 19% do custo total da produção celular. Assim, apesar de que a biossíntese de MAAs em fotótrofos é acoplado à fotossíntese, a necessidade frequentemente observada de estímulos de UV pode posteriormente verificar a operação de um processo anabólico custoso que pode competir com outra demanda de energia e de material. Em particular, a biossíntese de novo de MAAs exige nitrogênio, (escasso em águas oligotróficas) e pode desviar esse nutriente limitante para as necessidades de crescimento e reprodução.

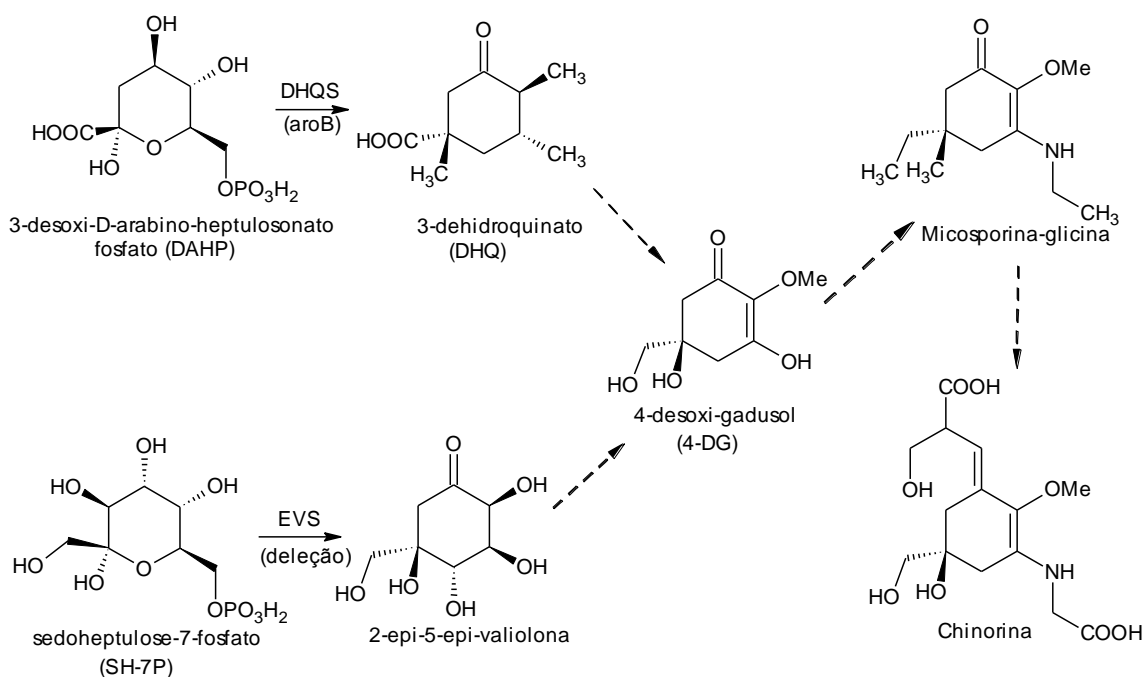


Figura 12: Vias redundantes da biossíntese de chinorina (SPENCE *et al.*, 2012)

1.5 Isolamento e Identificação de MAAs

Dentre as técnicas utilizadas para analisar compostos orgânicos estão os métodos cromatográficos e espectrométricos, que têm permitido o estudo de amostras complexas de origem variada e natureza físico-química diversa, devido à facilidade com que realizarem separação, identificação e quantificação de espécies química presentes nas amostras em questão (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Para a análise de metabólitos de cianobactérias, técnicas cromatográficas envolvendo colunas de permeação em gel, resinas de troca iônica, norito A, carbono e celulose e placas preparativas de cromatografia em camada delgada de sílica gel têm sido utilizadas, tendo como amostras de extratos hidrometanólicos ou hidroetanólicos de amostras frescas ou liofilizadas (BOUILLANT *et al.*, 1981; DUNLAP; CHALKER; OLIVER, 1986; NAKAMURA; KOBAYASHI, 1982; TAKANO *et al.*, 1979). A eluição com etanol, água, HCl diluído e vários tampões resultou em micosporinas como óleos, pós amorfos ou cristalinos. Entretanto, HPLC de fase reversa em escala preparativa com detecção de UV parece ser o método mais popular empregado na separação e quantificação desses metabólitos (FAVRE-BONVIN; ARPIN; BREVARD, 1976;

NAKAMURA; KOBAYASHI, 1982; WU WON; CHALKER; RIDEOUT, 1997). Uma solução aquosa de ácido acético na concentração de 0,1% é usada como fase móvel para separar compostos menos polares, enquanto que esta fase móvel contendo metanol é usada para a separação de componentes mais polares (BANDARANAYAKE, 1998).

Até 2005, poucos métodos de HPLC para separação de MAAs tinham sido desenvolvidos (CARRETO; CARIGNAN; MONTROYA, 2004). Destes nenhum método foi capaz de separar misturas de mais de 20 MAAs como nas mais complexas amostras de organismos marinhos. As técnicas de separação de MAAs incluem aquelas de NAKAMURA (1982), DUNLAP & CHALKER (1986) e suas modificações (SHICK *et al.*, 1999; STOCHAJ; DUNLAP; SHICK, 1994 CARRETO *et al.*, 2001). Os métodos clássicos foram baseados em colunas de fase reversa octadecilsilano (C-18) com baixo nível de grupos silanóis livres e eluição isocrática com ácido acético 0,02% (NAKAMURA; KOBAYASHI, 1982). Sob estas condições, 7 dos 9 MAAs conhecidos até então foram separados com base em suas propriedades hidrofóbicas esse método tem a desvantagem de que não elui os compostos mais hidrofóbicos como o usujireno e paliteno e muitos dos complexos de MAAs descritos (CARRETO, 2001).

DUNLAP & CHALKER (1986) introduziu pela primeira vez as colunas monoméricas octilsilano (C8). O método original foi baseado em coluna de fase reversa C8 não encapado e eluição isocrática com ácido acético 0,1% e 10% de metanol. Sob essas condições, os compostos mais fracamente acídicos (micosporina-glicina, palitina, asterina-330, palitinol e paliteno) foram eluídos separadamente. Entretanto isso não foi capaz de separar claramente os fortemente acídicos chinorina e porphyra-334 (DUNLAP; CHALKER, 1986). Após a descoberta de micosporina-2-glicina e micosporina-aurina na anêmona do mar *Anthopleura elegantissima* (STOCHAJ; DUNLAP; SHICK, 1994) uma nova desvantagem foi adicionada, já que o método não foi capaz de separar micosporina-2-glicina de porphyra-334 e micosporina-glicina de micosporina-aurina.

STOCHAJ (1994) mostrou que a separação cromatográfica dos compostos acídicos poderia ter sido melhorada se o conteúdo de metanol fosse aumentado para mais de 75%. Nessa condição, os compostos altamente polares interagiram com as propriedades fracas de troca iônica dos grupos silanóis para melhorar a separação cromatográfica desses compostos. Apesar de que esses métodos e suas modificações

posteriores usando a mesma fase estacionária conseguiram boa separação de vários compostos (SHICK *et al.*, 1999), nenhum foi capaz de segurar em uma única corrida os MAAs mais fortemente e mais fracamente acídicos. A separação destes compostos só foi possível pela eluição isocrática com duas fases móveis diferentes (HELBLING *et al.*, 1996 ADAMS & SHICK, 2001; SHICK *et al.*, 2002). Entretanto, a resolução pra alguns pares críticos como micosporina-glicina e micosporina-aurina, os ésteres sulfatados de MAAs e a mistura isomérica usujireno e paliteno foi insuficiente. Mesmo as mais recentes modificações destes métodos não resolveram completamente estas misturas de MAAs. A resolução de micosporina-glicina e a mistura de ésteres de MAAs sulfatados foi recentemente melhorada com o uso de cromatografia de troca iônica com coluna de amino com fase ligada (WU WON; CHALKER; RIDEOUT, 1997).

DIONISIO-SESE *et al.* (1997) foram os primeiros a usar colunas de fase reversa (C18) e eluição gradiente em metanol aquoso, mas suas aplicações foram bem sucedidas apenas para a separação de quatro MAAs. Carreto (2001) mostrou que usando eluentes com acetonitrila e colunas poliméricas com duplo revestimento (C18), uma mistura de MAAs extremamente acídicos e neutros poderia ter sido separadas em uma única corrida. Essa técnica também resolveu o par isomérico crítico usujireno e paliteno e sua aplicação revelou a ocorrência de muitos MAAs atípicos de baixa polaridade não descritos previamente na literatura. Não obstante, esse método e suas modificações posteriores (CONDE *et al.*, 2003) falhou em separar certos MAAs altamente polares como chinorina de micosporina-2-glicina e palitina-serina, características de alguns corais escleractianos (SHICK *et al.*, 1999; TEAI *et al.*, 1997; TEAI *et al.*, 1998; WU WON; CHALKER; RIDEOUT, 1997).

O método mais usual para detecção e quantificação de MAAs por HPLC, era o ultravioleta com base nas suas propriedades espectrais com comprimentos de onda entre 310 a 340 nm, ou varreduras por detecção de arranjos de diodo (WHITEHEAD; HEDGES, 2002). Uma dificuldade neste método é a inexistência de padrões comercialmente disponíveis, cuja preparação é onerosa e laboriosa. Adicionalmente, é comum a ocorrência de dificuldades na identificação dos MAAs, especialmente devido possíveis alterações pela dieta, degradação química ou bacteriana (SHICK; DUNLAP, 2002). Finalmente, existem condições onde compostos proximamente relacionados compartilham espectros de absorção similares e tempos de retenção (RT), como por

exemplo, a chinorina [$\lambda = 334$ nm, RT= 3,5 min] e porphyra-334 [$\lambda = 334$ nm, RT = 3,7 min], o que posteriormente dificulta o processo de identificação (WHITEHEAD; HEDGES, 2002).

A caracterização de compostos pelo UV, era limitada por obter unicamente os tempos de retenção e o comprimento de onda máximo, sem informações adicionais relacionadas às suas características estruturais (WHITEHEAD; HEDGES, 2002). WHITEHEAD (2002) sugeriu que para melhor avaliar a diversidade e concentrações de MAAs nos ambientes aquáticos seria necessário usar uma abordagem por espectrometria de massas, pois sua fragmentação característica, pode eventualmente ser utilizada para avaliar a diversidade estrutural mesmo na ausência de padrões bem definidos, possibilitando inclusive identificar novos MAAs e permitindo inferências estruturais com base em seus padrões de fragmentação.

Uma abordagem por espectrometria de massas foi desenvolvida para caracterização de MAAs usando cromatografia líquida acoplada com ionização por *electrospray* (WHITEHEAD; HEDGES, 2002). Com a excessão do par isomérico usujireno/paliteno, essa abordagem permite a identificação de MAAs individuais sem necessidade de alta resolução cromatográfica (WHITEHEAD; HEDGES, 2002; WHITEHEAD; KARENTZ; HEDGES, 2001). A abordagem de WHITEHEAD E HEDGES (2002) foi pioneira em analisar MAAs por espectrometria de massas (WHITEHEAD; HEDGES, 2002) os MAAs chinorina ($MH^{+1} = m/z$ 333), Porphyra-334 ($MH^{+1} = m/z$ 347), Ácido Palitênico ($MH^{+1} = m/z$ 329), Palitina ($MH^{+1} = m/z$ 245), Paliteno ($MH^{+1} = m/z$ 285), Palitinol ($MH^{+1} = m/z$ 303) e Asterina-330 ($MH^{+1} = m/z$ 289) através da técnica de ionização por *electrospray*. Com a aplicação desta técnica Whitehead (2002) pôde detectar os íons MH^{+1} com sensibilidade até 100 vezes maior que a absorção no UV, e uma boa ionização usando uma voltagem de cone de 40 eV com mínima fragmentação dos íons MH^{+1} . A palitina em especial não fragmentou. Compostos mais polares como a chinorina e a porphyra-334 mostraram uma diminuição em sensibilidade. Numa voltagem de cone maior, a extensão da fragmentação foi mais pronunciada (WHITEHEAD; HEDGES, 2002).

O padrão de fragmentação para cada MAA reflete variações em seus grupos laterais. A perda de grupos metila, hidroxila (desidratação) e carboxila foi observada por WHITEHEAD & HEDGES (2002). Uma vez que as perdas iniciais do íon molecular

parecem ser originadas dos substituintes imino, os padrões de fragmentação pode ser utilizado para caracterizar MAAs desconhecidos ou produtos de degradação. Além disso, WHITEHEAD & HEDGES (2002) observou muitos fragmentos em comum dos MAAs estudados como os de m/z 137, 186 e 197 (Tabela 2), que podem servir como íons diagnóstico dos mesmos em fragmentações. Cada MAA exibiu uma sensibilidade diferente a ionização, onde o paliteno foi o mais sensível. O grau de ionização parece ter correlação com a polaridade do substituinte imino do anel ciclexenimina. A chinorina e a porphyra-334, dois MAAs altamente polares foram os menos sensíveis enquanto que a palitina e o paliteno, os menos polares foram mais facilmente ionizados (WHITEHEAD; HEDGES, 2002).

No estudo de CARDOZO *et al.* (2006), sugeriu mecanismos de fragmentação de MAAs, em que foi possível detectar os fragmentos m/z 186 e 197. Em particular, CARDOZO *et al.* (2006) sugere que o fragmento de m/z 186, que sofre desmetilação (15 Da) seguido de descarboxilação (44 Da) seja utilizado como íon diagnóstico, apesar de que caso eliminações laterais não ocorram, este fragmento não é observado, como ocorre com paliteno e ácido palitênico que tem uma dupla na cadeia lateral (WHITEHEAD; HEDGES, 2003).

Tabela 2: Dados espectrais de massa em WHITEHEAD & HEDGES (2002).

MAA	Massa molecular	Massa Protonada (MH ⁺)	Fragmentos	Referência
Micosporina-glicina	245	246	[MH ⁺] 246, 228, 210, 200, 182, 168, 146	(WHITEHEAD; HEDGES, 2002)
Palitina	244	245	[MH ⁺] 245, 230, 209, 199, 186, 184, 162, 155, 150, 137	
Palitinol	302	303	[MH ⁺] 303, 288, 243, 231, 199, 197, 186, 168, 150, 137.	
Asterina-330	288	289	[MH ⁺] 289, 273, 243, 230, 213, 199, 197, 186, 168, 150, 137	
Chinorina	332	333	[MH ⁺] 333, 255, 241, 230, 211, 197, 186, 185, 168, 137	
Porphyra-334	346	347	[MH ⁺] 347, 303, 243, 231, 199, 197, 186, 168, 151, 137	
Paliteno	284	285	[MH ⁺] 285, 241, 223, 205, 197, 195, 193, 179, 166, 149, 137	
Ácido Palitênico	328	328	[MH ⁺] 329, 314, 296, 283, 268, 251, 241, 237, 225, 197, 193, 182, 175, 150, 138	

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Prospectar aminoácidos tipo micoporinas (MAAs) em cianobactérias de água doce isoladas da Amazônia Oriental.

2.2 Objetivos específicos

- Prospectar genes envolvidos na biossíntese de MAAs;
- Prospectar MAAs através da reprodução de Métodos de Extração e análise já existentes na literatura.

3. Materiais e Métodos

3.1 Amostragem

As amostras utilizadas constaram das linhagens CACIAM 14, CACIAM 53, CACIAM 54 e CACIAM 57 da Coleção Amazônica de Cianobactérias e Microalgas (CACIAM) do Laboratório de Tecnologia Biomolecular/UFGA, isoladas de água doce.

As linhagens foram cultivadas em meio BG-11 (ALLEN, 1968) em estufa de fotoperíodo com a programação de 13 horas claro e 11 horas escuro, com uma temperatura de 28°C, durante 49 dias. Foram utilizados 50 mL para a obtenção de DNA para a análise genômica e dois frascos com 2 L de cultura para análise de metabólitos (MAAs).

3.2 Análise Genômica

Os dados genômicos das linhagens CACIAM 53, CACIAM 54 e CACIAM 57 foram obtidos da análise de apenas um único cultivo. As amostras de DNA oriundas de culturas não axênicas de biomassa das cianobactérias CACIAM 53, CACIAM 54 e CACIAM 57 foram sequenciadas na plataforma GS FLX 454 (Roche Life Sciences®), utilizando bibliotecas de fragmentos.

Os dados obtidos foram processados de acordo com Nederbragt et al., 2010, sendo montados, separadamente, com o software gsAssembler (pacote Newbler 2.6) executado com parâmetros padrões.

As sequências montadas (contigs) acima de 500 pb com cobertura acima de 10 vezes foram submetidas a ferramenta BLASTX (ALTSCHUL et al., 1990) utilizando os parâmetros especificados no *pipeline* (NEDERBRAGT et al., 2010). O arquivo de saída foi dado como entrada para o programa MEGAN, versão 4 (HUSON et al., 2007). O valor de corte adotado para o *bit score* foi de 100 para todas as cepas. Somente os contigs pertencentes ao nó Cianobactéria foram recuperados.

As sequências obtidas foram anotadas com o servidor RAST (AZIZ et al., 2008) gerando um arquivo de saída que foi visualizado com a ferramenta Artemis (RUTHERFORD et al., 2000).

As sequências obtidas para a cianobactéria CACIAM 14 foram submetidas ao PGAP (ANGIUOLI et al., 2008) para a anotação estrutural. A visualização dos arquivos de anotação foi realizada no programa Artemis. A busca pelos *clusters* de rRNA foi feita pela ferramenta RNAmmer (LAGESEN et al., 2007), enquanto a identificação molecular de cada foi realizada com base no rRNA 16S (CACIAM 53, CACIAM 54 e CACIAM 57) ou nas subunidades alfa e beta do operon da ficocianina (CACIAM 14).

3.3 Extração de MAAs

As culturas dedicadas à análise de metabólitos foram centrifugadas em condições estéreis numa rotação de 5500 rpm a 20°C. Após desprezo do sobrenadante, à biomassa precipitada foi, então, adicionado 5 mL de metanol (grau HPLC). Esta mistura foi sonicada com uso do sonicador Unique DES500 por 60 segundos e armazenada a 4°C por 12 h. Em seguida, após centrifugação durante 5 minutos e 5500 rpm a 20°C o sobrenadante foi retirado e monitorado espectrofotometricamente entre 310 e 360 nm, com uso do espectrofotômetro Biospectro SP-220. À biomassa foi adicionado um novo volume de 5 ml de metanol (grau HPLC), seguida de mistura em vórtex por 1 min. Após nova centrifugação por 5 minutos e 5500 rpm a 20°C, o sobrenadante foi novamente monitorado como descrito acima. Estas extrações com metanol foram repetidas até a não absorção espectrofotométrica. Os volumes de sobrenadante coletados foram misturados até um total de 50 mL de extrato bruto.

Esse extrato bruto (50 mL) foi particionado líquido líquido de acordo com a seguinte proporção: 50 mL de extrato bruto, 20 mL de metanol (grau HPLC), 60 ml de clorofórmio (pureza), e 30 mL de água ultrapura. Com auxílio de um funil de decantação, a fase superior foi transferida para um novo frasco Erlenmeyer. À fase inferior (do funil de decantação) foram adicionados mais 60 mL de clorofórmio, 40 mL de metanol e 10 mL de água. Essa mistura foi mais uma vez particionada, com recolhimento da fase superior, que foi adicionada àquela coletada anteriormente.

As amostras obtidas foram secas em *speedvac* a 30°C e redissolvidas em 1 mL de ácido acético 0,02%.

3.4 Análise de MAAs por LC/MS

Cem microlitros da amostra obtida na etapa anterior foram diluídos para 1 mL de ácido acético 0,02% em Metanol grau cromatográfico. Uma análise preliminar foi feita por infusão direta num espectrômetro de massas AB Sciex QTRAP 5500 com analisador triplo quadrupolo, de baixa resolução. A seguir, as amostras foram analisadas com auxílio de um HPLC Agilent 1200 series com bomba capilar binária, injetor automático e coluna em temperatura ambiente (17°C). A programação da fase móvel constou de um sistema isocrático com tempo de corrida de 20 minutos, sendo o solvente A solução de ácido acético na concentração de 0,02% e o solvente B, metanol grau cromatográfico. Utilizou-se uma coluna Zorbax 300SB-C8 150 x 0,3 com tamanho de partícula de 3,5 micrômetros. O fluxo utilizado foi de 10 µL/min.

Para a detecção dos metabólitos foram programados experimentos de MS1, que detectam os íons moleculares e MS2, que fragmentam os íons, numa mesma corrida, sendo o MS1 os valores de voltagem do *ionspray* igual a 4000, baixa pressão de colisão, voltagem do cone igual a 60 eV e energia de colisão igual a 5 eV. Para o experimento de MS2 os valores da voltagem do *ionspray* foram de 4000, alta pressão de colisão, voltagem de cone de 60 eV e energia de colisão de 20 eV. As aquisições dependentes de informação selecionaram 5 dos íons mais abundantes que excederam a intensidade de 10000. Os valores de massa analisadas foram os valores protonados de palitina, micosporina-glicina, paliteno, asterina-330, palitinol, chinorina, ácido palitênico e porphyra-334, conforme a tabela 3. Desses valores os que estiveram dentro dos critérios da aquisição dependente de informação foram selecionados para o experimento de MS2.

Tabela 3: Valores de relação massa/carga monitoradas no primeiro quadrupolo

MAA	m/z
Micosporina-glicina	246
Palitina	245
Palitinol	303
Asterina-330	289
Chinorina	333
Porphyra-334	347
Paliteno	286
Ácido Palitênico	329

Fonte: (WHITEHEAD; HEDGES, 2002)

4 Resultados

4.1 Análise Genômica

Para a primeira e segunda corrida de CACIAM 14 foram geradas, respectivamente, 660.228 (~255 Gb) e 815.325 (~356 Gb) leituras. Após a montagem dos dados, foram obtidos respectivamente para a primeira e segunda corrida, 3.654 e 3.256 contigs de tamanho superior a 1 Kb, apresentando N50 de 2.149 e 37.998 bases, com 86.9% (~7,2 Gb) e 97.26% (~20,5 Gb) das bases com qualidade acima de 40 pontos na escala phred.

O *draft* recuperado apresenta 71 contigs (~3,2 Mb), variando de 5.275 a 403.256 bases, conteúdo GC de 68,56%, cobertura média de 25X e N50 igual a 61.937 bases.

O *pipeline* utilizado para a montagem do genoma estabelece o uso de 107 Modelos Ocultos de Markov para genes essenciais presentes em cópia única em 95% de todas as bactérias. O *draft* do genoma que foi obtido apresentou 104 genes únicos mais uma duplicação de cada um dos seguintes genes TIGR00436 (que é considerada normal) e TIGR02350, totalizando 108 genes essenciais encontrados.

Foram anotadas 2.935 CDS e 40 tRNA. Nenhum gene de rRNA 16S foi encontrado na anotação pelo PGAP ou predição pelo RNAmmer, logo a identificação da linhagem, pelo menos a nível de gênero foi realizada através dos genes que codificam as subunidades alfa e beta da ficocianina, que apresentaram, respectivamente, 93% e 88% de identidade com os mesmos genes de *Cyanobium gracile* PCC 6307.

Para as demais linhagens (CACIAM 53, CACIAM 54 e CACIAM 57), a tabela 4, apresenta os resultados obtidos, isto é, número de leituras, quantidade de contigs montados e recuperados, etc..

Tabela 4 – Dados do sequenciamento e montagem das linhagens CACIAM 53, 54 e 57

	CACIAM 53	CACIAM 54	CACIAM 57
Nº de leituras	742.679	281.605	617.553
Nº de contigs (> 500 pb)	7.084	4.247	7.076
N50	13.637	2.885	7.339
Nº de contigs recuperados (cianobactéria)	95	158	125
N50 contigs recuperados	79.729	30.921	78.488

A análise genômica revelou que as quatro linhagens cianobacterianas foco deste estudo possuem os genes DHQS e O-MT. Contudo, os os gene das enzimas assimiladoras de ATP, bem como o tipo NRPS não foi observado para nenhuma delas. Com relação aos genes da via das pentoses, foram encontrados genes de Ribulose-fosfato-3-epimerase e transcetolase em todas as linhagens, exceto na linhagem CACIAM 54 entretanto, em nenhuma linhagem foi encontrado o gene 2-epi-5-epivaliolona sintase, que converteria a sedoheptulose-7-fosfato em 2-epi-5-epivaliolona.

Tabela 5 - Prospecção de genes relacionados à biossíntese de MAAs em cianobactérias da Amazônia.

Genes	CACIA 14	CACIAM 53	CACIAM 54	CACIAM 57
Via do Chiquimato				
Deidroquinato Sintase	+	+	+	+
Via das Pentoses-fosfato				
Ribulose-fosfato-3-epimerase	+	+	-	+
Transcetolase	+	+	-	+
2-epi-5-epivaliolona sintase	-	-	-	-
Não ribossomal				
O-Metiltransferase	+	+	+	+
<i>ATP-grasp</i>	-	-	-	-
<i>NRPS-like</i>	-	-	-	-

4.2 Análise de MAAs da linhagem CACIAM 14

O resultado da análise por infusão direta, no experimento de MS1 mostrou a presença de íons precursores com m/z variando de aproximadamente 300 a 600. A figura 13a apresenta o resultado da análise na faixa de m/z 50 a 1000, e a figura 13b um zoom na região entre 300 a 600. Neste experimento de MS1 não foram observados íons de relação massa/carga sugestiva de MAAs (ver tabela 3). Entretanto, ao configurar o equipamento para o experimento de fragmentação (MS2) de íons com m/z referentes a MAAs (ver tabela 3), foi possível detectar um íon com m/z 186 (Figura 14), quando da seleção do íon precursor m/z 333, o qual é sugestivo da presença de chinorina. Adicionalmente, o espectro de fragmentação do íon de m/z 333, mostrou outros íons filhos (Figura 14).

A figura 15, 16 e 17 mostram os resultados da análise cromatográfica do extrato obtido para a linhagem CACIAM 14, sendo estes: cromatograma de íons totais (Figura 16), extratos de íons precursores com m/z 333, resultantes do experimento de MS1 (Figura 16), e extrato de fragmentos dos íons precursores com m/z 333, resultante do experimento de MS2 (Figura 17). Na figura 18 é possível observar o fragmento de m/z 186 (azul) e 197 (vermelho), com tempo de retenção igual a 9 minutos, o qual coincide com o mesmo tempo de retenção, isto é, 9 minutos observado para o íon m/z 333 (Figura 16).

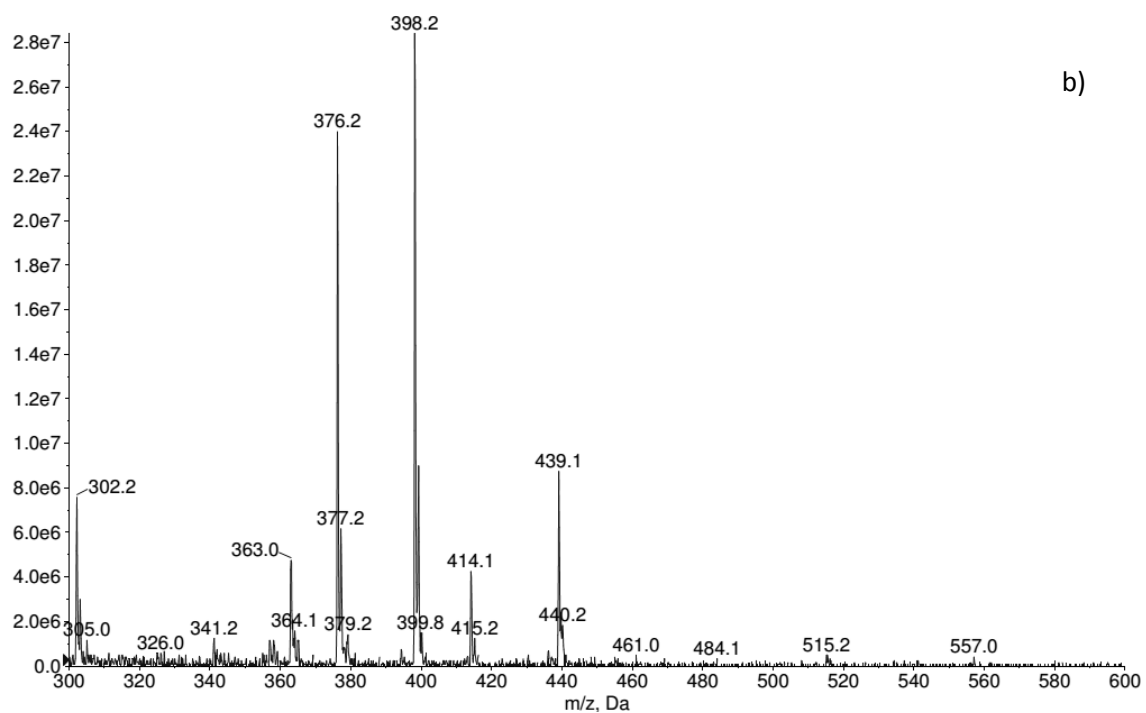
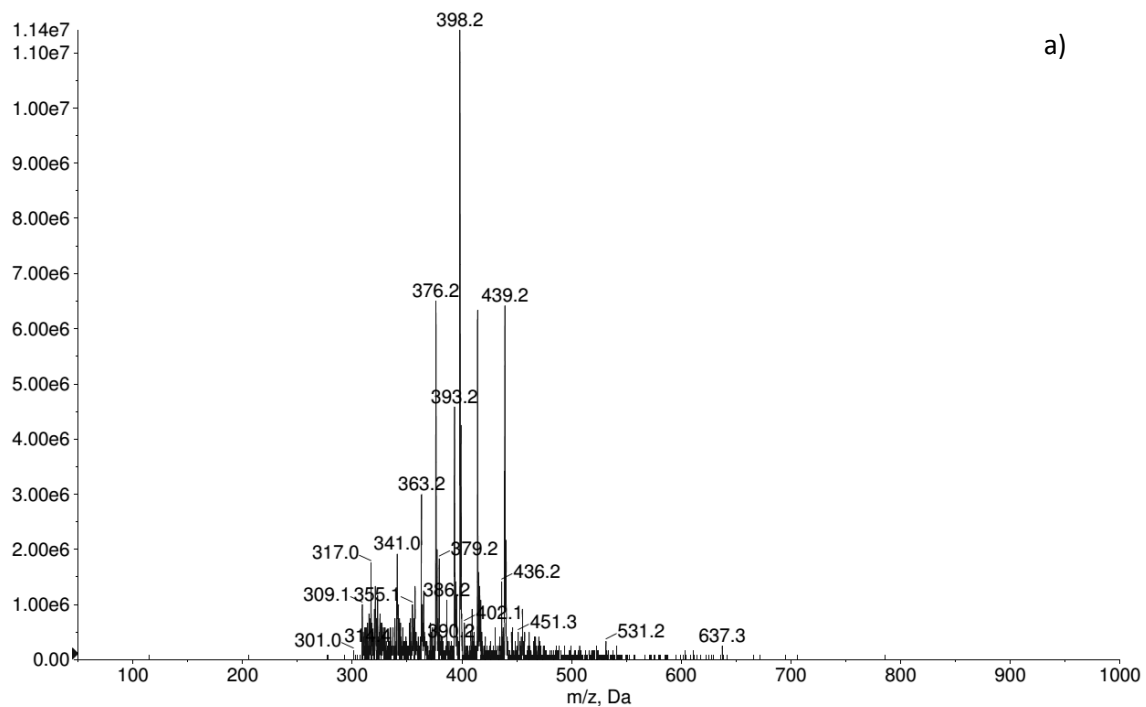


Figura 13 - Espectro de massas modo *full scan* (MS1) dos metabólitos da linhagem cianobacteriana CACIAM 14: a) Faixa de m/z 50 a 1000 ; b) zoom na faixa de m/z 300 a 600.

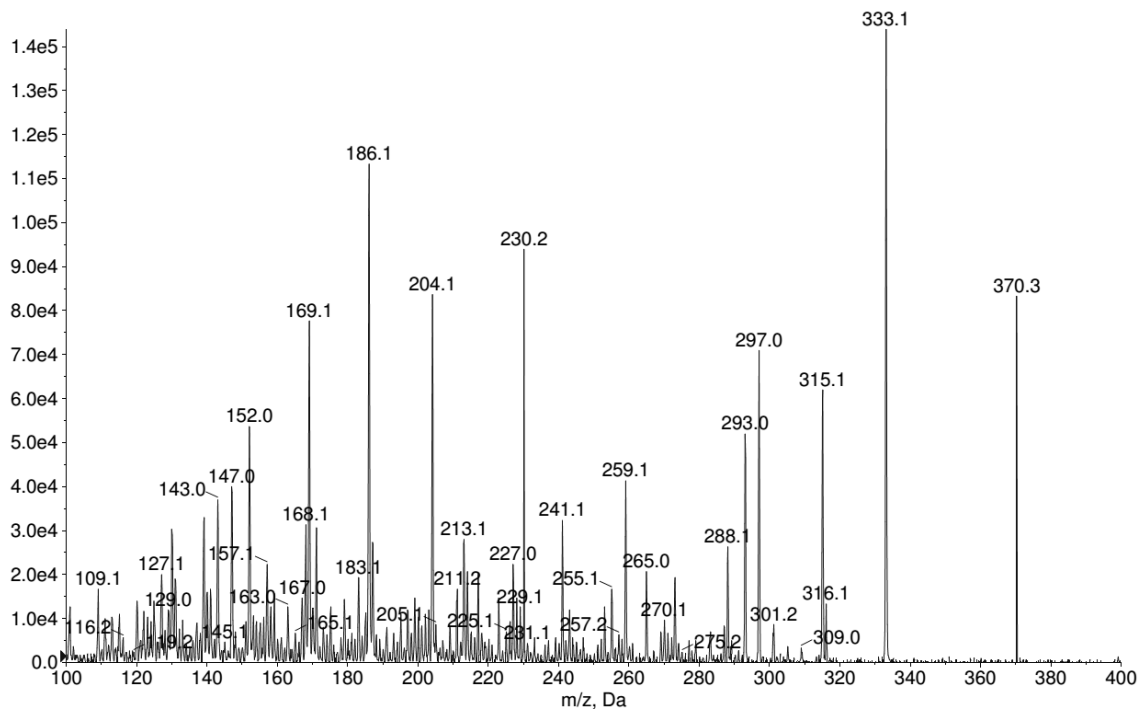


Figura 14 - Espectro de fragmentação (MS2) do íons m/z 333 observados no experimento de infusão direta dos metabólitos da linhagem cianobacteriana CACIAM 14 (*Cyanobium* sp.).

■ TIC of +EMS: Exp 1, from Sample 17 (Branco) of Cyanobium.wiff (Turbo Spray)

Max. 2.4e6 cps.

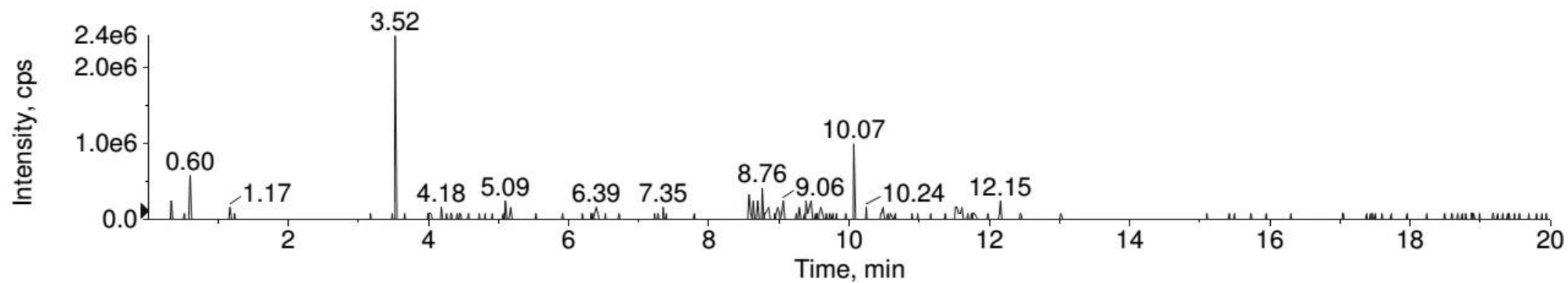


Figura 15: Cromatograma de íons totais de. CACIAM 14.

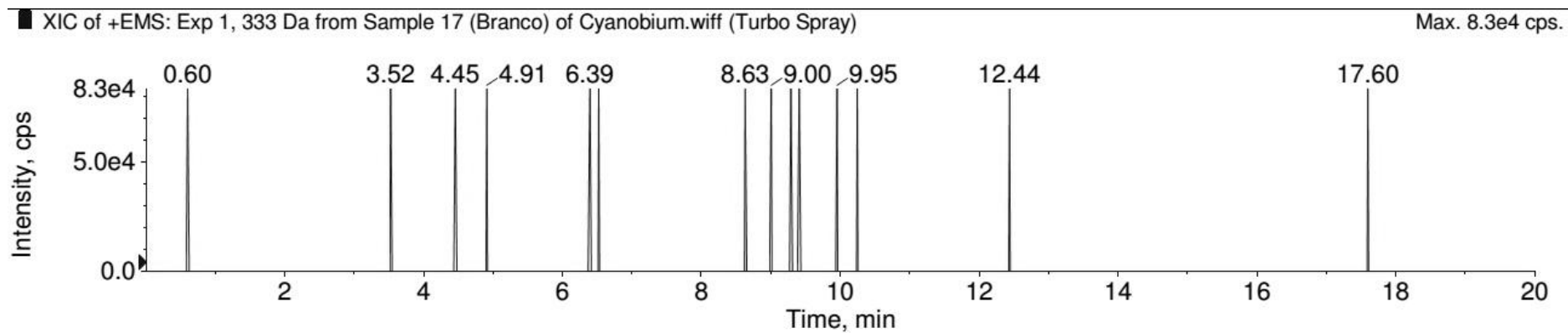


Figura 16: Seleção de íons precursores de m/z 333

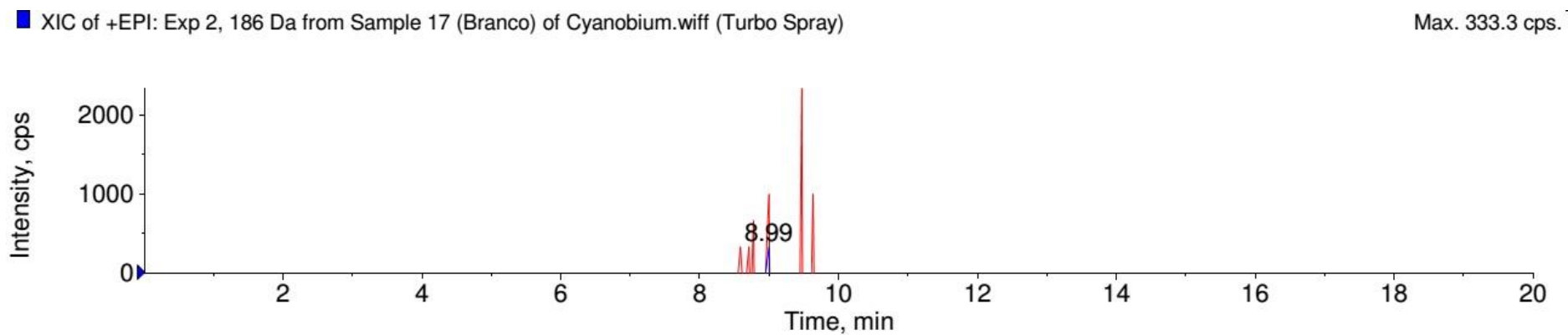


Figura 17: Seleção de íons filho (m/z 186 em azul e 197 em vermelho) dos íons precursores de m/z 333.

5 Discussão

5.1 Análise Genômica

Singh (2010), analisando as cianobactérias *Anabaena variabilis* PCC 7937 comparada com *Anabaena* sp. PCC7120, *Synechocystis* sp. PCC 6803 e *Synechococcus* sp. PCC 6301, verificaram que *Anabaena variabilis* PCC 7937 foi a única a sintetizar MAAs provavelmente devido possuir os genes DHQS e O-MT. Adicionalmente, segundo Singh (2010), o arranjo de O-MT downstream ao gene DHQS seria responsável por formar o núcleo comum dos MAAs, o 4-Desoxigadusol, que tem um grupo metil em sua estrutura.

De acordo com Balskus (2010), o cluster gênico responsável pela biossíntese de chinorina em *Anabaena variabilis* ATCC 29413, inclui, além dos genes DHQS e O-MT os genes ATP grasp e NRPS-like. No presente estudo, foram detectados somente os genes DHQS e O-MT. Com relação aos genes da via das pentoses, foram encontrados genes de Ribulose-fosfato-3-epimerase e transcetolase em três das quatro linhagens foco deste estudo. Entretanto, em nenhuma das quatro foi encontrado o gene 2-epi-5-epi valiolona sintase (EVS), que converteria a sedoheptulose-7-fosfato em 2-epi-5-epi valiolona. Como parte da fase não oxidativa ou recicladora da via das pentoses, os genes ribulose-fosfato-3-epimerase e transcetolase, junto com a transaldolase irá formar novamente glicose6-fosfato. A sedoheptulose-7-fosfato entraria no metabolismo secundário dos açúcares e dependendo do organismo formaria compostos como o hipoglicemiante acarbose (WU *et al.*, 2007), ou o antifúngico validamicina (YU *et al.*, 2005), bem como MAAs (BALSKUS; WALSH, 2010).

Segundo Spence (2012) a cianobactéria *Anabaena variabilis* ATCC 29413 poderia produzir MAAs tanto pela via do chiquimato como pela via das pentoses. Este pode ser o caso das quatro linhagens do presente estudo visto que em todas elas foram encontrados genes de ambas as vias. A não identificação dos genes EVS (via das pentoses) bem como dos genes *ATP-grasp* e *NRPS-like* que foram sugeridos por Balskus (2010) como necessários para a biossíntese de chinorina, pode ser um artefato técnico, isto é, nenhuma das linhagens foco deste estudo teve seu genoma completamente montado, logo a presença destes genes pode estar incluída nos *contigs* que não foram representados no produto final da análise genômica dessas linhagens.

Nesse contexto, e considerando que das quatro linhagens cianobacterianas analisadas por Singh (2010), somente uma possuía o potencial para a biossíntese de MAAs, um dos resultados mais interessantes deste estudo é a identificação de genes de pelo menos uma das vias envolvidas na biossíntese de MAAs nas quatro linhagens cianobacterianas isoladas de ambientes amazônicos. Isto pode refletir uma provável adaptação a este ambiente. Singh et al. (2013) analisando duas espécies de *Anabaena* isoladas de campos de arroz da Índia também observaram a presença de MAAs em ambas. Assim, a forte influência da radiação UV em ambientes próximos à linha do Equador, como é o caso da Índia e da Amazônia, pode ser um fator de seleção de linhagens cianobacterianas detentoras de mecanismos de mitigação dos efeitos deletérios da radiação UV. Vale ressaltar que o ambiente amazônico compreende águas barrentas, e a maioria dos dados sobre análise de MAAs ocorreu em amostras provenientes do mar, uma vez que a luz pode penetrar nas águas barrentas em até 10 metros de profundidade e na água do mar até 30 m.

5.2 Extração de MAAs

A maioria dos métodos descritos na literatura mostram extrações com metanol em diversas amostras. Em cianobactérias foram descritas extrações com metanol 20% em água (FERRONI et al., 2010; KEDAR; KASHMAN; OREN, 2002) e metanol 100% (BALSKUS; WALSH, 2010; SINGH et al., 2008b, 2010; SINHA et al., 2003) em temperaturas de 4°C (SINGH et al., 2008b, 2010; SINHA et al., 2003) 45°C (KEDAR; KASHMAN; OREN, 2002) e ambiente (BALSKUS; WALSH, 2010; FERRONI et al., 2010). Podemos inferir que a extração em temperatura de 4°C e a utilização de metanol, como solvente extrator é uma condição que auxilia a extração de MAAs, uma vez que foi detectada chinorina neste trabalho.

O preparo de amostras para a análise de MAAs em cianobactérias descrita na literatura pode compreender extração líquido-líquido (SINGH et al., 2008b, 2010), filtração em MWCO (KEDAR; KASHMAN; OREN, 2002), centrifugação (SINHA et al., 2003) ou não foi feito nenhum preparo (BALSKUS; WALSH, 2010; FERRONI et al., 2010). Neste trabalho, a combinação do método de preparo de amostra de Cardozo (2006) com Whitehead (2002), utilizada neste trabalho permitiu que pudéssemos detectar chinorina. Ainda, foi possível observar no espectro de massas da figura 13, que o

método de preparo de amostra forneceu uma amostra com substâncias dentro de uma faixa de massas estreita (300 a 650 Da), que pode ser algo restrito à *Cyanobium* sp. CACIAM 14, ou pode ser um resultado esperado à outras cianobactérias. Não existe na literatura informações detalhadas com relação ao enriquecimento de amostras.

5.3 Análise de MAAs

A cromatografia líquida acoplada a arranjo de fotodiodos têm sido utilizada em vários trabalhos como método de análise (FERRONI et al., 2010; SINGH et al., 2008b, 2010; SINHA et al., 2003), bem como e espectrometria de massas (BALSKUS; WALSH, 2010). Neste trabalho, a análise foi feita por HPLC com detecção de espectrometria de massas. Os trabalhos foram em sua grande maioria utilizaram HPLC analítico. A presente abordagem utilizou HPLC capilar, que utiliza colunas de dimensões de até 0,5 mm e fluxos de fase móvel de até 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, bem como utiliza um quantidade muito pequena de amostra, da ordem de 10 μg . Foi o primeiro relato desta modalidade de cromatografia na análise de MAAs. Houve comparável desempenho. Como a detecção foi feita por espectrometria de massas com fonte de aspensão de elétrons (ESI), que tem seu desempenho ótimo em fluxos de 1 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, o HPLC capilar é facilmente acoplável, e seu fluxo de trabalho vai ao encontro desse máximo desempenho (DE HOFFMAN; STROOBANT, 2007). A disponibilidade de amostra não foi um desafio neste trabalho, entretanto, em trabalhos futuros envolvendo análise de MAA, menor quantidade de amostra disponível, não será problema. A fase móvel utilizada foi adaptada de Cardozo (CARDOZO, 2007).

Não foram pesquisados adutos de sódio ou potássio das substâncias em questão, o que pode ser uma informação perdida, ainda que não tenham sido relatadas na literatura adutos de MAAs. Ainda que maioria das referências utiliza como método de análise a cromatografia acoplada à detecção de arranjos de fotodiodo, e que este têm detecção seletiva de acordo com o comprimento de onda escolhido, este não detecta substâncias que não absorvam no comprimento estabelecido, que podem coeluir. Na espectrometria de massas, pode ser feito uma varredura mais abrangente dentro de uma faixa de razões massa/carga e subsequentemente selecionar as razões massa/carga de interesse.

Os resultados da análise de MAAs indicaram a provável produção de chinorina pela linhagem *Cyanobium* sp. CACIAM 14.

Na análise por infusão direta no experimento de MS1, não foram observados os íons precursores sugestivos de MAAs (Figura 13), contudo a presença de íons mais concentrados podem mascarar a de outros menos concentrados. No presente estudo, no espectro de MS2 (Figura 14) foi detectado o pico de m/z 333 com intensidade de 10^5 cps, e no espectro de MS1 da figura 13 foi observado que o sinal mínimo está em torno de 10^6 , uma diferença de 10 vezes para a quantidade apontada no espectro de MS2. Em suma, isso sugere que a presença de alguns íons em menor concentração pode não ter sido detectada no espectro MS1. De fato, no experimento de MS2 detectou-se a fragmentação do íon de m/z 333, sugestivo de chinorina.

Nesse espectro MS2, vários íons de fragmentos foram observados, dentre eles o fragmento de m/z 186, o qual de acordo com Whitehead & HEDGES (2002) é diagnóstico da presença de MAAs. Os outros íons sugerem a presença de isóbaros (Figura 14). Vale ressaltar que se tratando de isóbaros, a intensidade do sinal é relativa a todas as substâncias do referido m/z , uma vez que o sinal analítico no espectrômetro de massas não distingue compostos de mesmo m/z . Apesar de se tratar de um espectro resultante da fragmentação de vários isóbaros, além do fragmento de m/z 186 é possível observar fragmentos de m/z 255, 241, 230 e 211, também reportados por Whitehead & Hedges (2002), que reforçam a presença de chinorina.

A presença desses isóbaros pode ser confirmada pela detecção de vários íons de m/z 333 em diferentes tempos de retenção (Figura 16) na análise cromatográfica. Nesta análise a intensidade dos íons de m/z 333 está em torno de 10^4 cps. No cromatograma de íons totais (Figura 15), não foi observado alta intensidade de sinal no tempo de retenção 9 minutos, o que é consistente com os dados de MS2 (Figura 16).

Na Figura 18, onde têm-se o extrato de fragmentos oriundos dos dos íons de m/z 333, no tempo de retenção 9 minutos, é possível observar os fragmentos 186 e 197, que tanto Whitehead & HEDGES (2002) quanto Cardozo (2006) sugerem como diagnóstico para a presença de MAAs. No presente estudo, estes íons fragmentos (m/z = 186 e 197) apareceram no mesmo tempo de retenção de m/z 333 (Figura 16), sugerindo a produção de chinorina, cuja m/z = 333, pela linhagem *Cyanobium* sp CACIAM 14, contudo são necessários mais experimentos no sentido de aumentar o

volume ou a concentração de amostra injetada, uma vez que existem recomendações de até 10 µg de amostra no sistema cromatográfico utilizado.

No estudo de Singh et al. (2013), a chinorina foi o MAA mais comum nas duas espécies de *Anabaena* analisadas, enquanto porphyrina-334 e microsporina-glicina foi observado apenas em uma delas, a *Anabaena doliloum*. Este resultado levou Singh et al. (2013) a sugerir que a chinorina desempenhe um papel chave na proteção contra os danos causados pela radiação UV-B.

Para testar esta hipótese, a análise aqui realizada apenas para a cianobactéria *Cyanobium* sp. CACIAM 14 deve ser realizada para as outras linhagens que também apresentaram os genes das vias biossintéticas de MAAs.

6 CONCLUSÃO

Como conclusões deste trabalho, tem-se que:

- A linhagem CACIAM 14 é potencialmente produtora de MAAs pela via do chiquimato ou pela via das pentoses devido apresentar os genes biossintéticos O-MT, DHQS, bem como os genes da via das pentoses Ribulose-fosfato-3-epimerase e transcetolase, bem como por ter identificado o MAA chinorina por espectrometria de massas.
- As linhagens CACIAM 53 e 57 são potencialmente produtoras de MAAs, pela via do chiquimato como pela via das pentoses por apresentar os genes O-MT, DHQS, e os genes da via das pentoses Ribulose-fosfato-3-epimerase e transcetolase.
- A linhagem CACIAM 54 é potencialmente produtora de MAAs pela via do chiquimato por possuir os genes O-MT e DHQS.
- A cromatografia capilar é uma técnica que pode ser utilizada para análise de MAAs especialmente acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização de *Electrospray*, devido sua alta sensibilidade, e necessitar de pouquíssima quantidade de amostra.
- As cianobactérias da Amazônia podem ser fontes de MAAs para aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ABED, R. M. M.; DOBRETISOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. v. 106, p. 1–12, 2009.
- ALLEN, M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, v. 4, n. 1, p. 1–4, 1968.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ANGIUOLI, S. V et al. Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation. **Omics : a journal of integrative biology**, v. 12, p. 137–141, 2008.
- APELDOORN, M. E. VAN et al. Toxins of cyanobacteria. **Molecular and Nutritional Food research**, n. 51, p. 7–60, 2007.
- AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, p. 75, 2008.
- BALSKUS, E. P.; WALSH, C. T. The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 329, n. 5999, p. 1653–6, 24 set. 2010.
- BANDARANAYAKE, W. M. Mycosporines: are they nature's sunscreens? **Natural Product Reports**, v. 15, n. 2, p. 159, 1998.
- BÖHM, G. A. et al. Structure of a Novel Oligosaccharide-Mycosporine-Amino Acid Ultraviolet A/B Sunscreen Pigment from the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 15, p. 8536–8539, 1995.
- BOUILLANT, M. et al. Mycosporins from *Ascochyta pisi* Cladosporium herbarium and *Septoria nodorum*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 12, p. 2705–2707, 1981.
- CARDOZO, K. H. M. **Estudos de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas : aminoácidos tipo micosporinas (MAAs)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2007.
- CARRETO, J. I.; CARIGNAN, M. O. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. **Marine drugs**, v. 9, n. 3, p. 387–446, jan. 2011.
- CARRETO, J. I.; CARIGNAN, M. O.; MONTOYA, N. G. A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. **Marine Biology**, v. 146, n. 2, p. 237–252, 26 ago. 2004.
- CHALLIS, G. L.; NAISMITH, J. H. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. **Current opinion in structural biology**, v. 14, n. 6, p. 748–56, dez. 2004.
- CODD, G. A.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins : risk management for health protection. v. 203, p. 264–272, 2005.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1st. ed. [s.l.] Editora Unicamp, 2006. p. 452

CONDE, F. R. et al. In Vitro cis – trans Photoisomerization of Palythene and Usujirene . Implications on the In Vivo Transformation of Mycosporine-like Amino Acids In Vitro cis – trans Photoisomerization of Palythene and Usujirene . Implications on the In Vivo Transformation. v. 77, n. 2, p. 146–150, 2003.

CONDE, F. R.; CHURIO, M. S.; PREVITALI, C. M. The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyrin-334 in aqueous solution. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 56, n. 2-3, p. 139–44, jul. 2000.

CORTES, J. et al. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. **Nature**, v. 348, p. 176–178, 1990.

DE HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. Ion Sources. In: DE HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. (Eds.). **Mass Spectrometry Principles and Applications**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. p. 489.

DONADIO, S. et al. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. **Science**, v. 252, p. 675–679, 1991.

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

DUNLAP, W. C.; CHALKER, B. E.; OLIVER, J. K. Bathymetric adaptations of reef-building corals at Davies Reef , Great Barrier Reef , Australia . III . UV-B absorbing compounds. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 104, n. 345, p. 239–248, 1986.

FAVRE-BONVIN, J.; ARPIN, N.; BREVARD, C. Isolation and structure of mycosporine P 310 extracted from fruit bodies of *Stereum hirsutum* Willd. ex Fr. Fr. Basidiomycete, Aphyllophorale. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 54, p. 1105, 1976.

FERRONI, L. et al. Complementary UV-absorption of mycosporine-like amino acids and scytonemin is responsible for the UV-insensitivity of photosynthesis in *Nostoc flagelliforme*. **Marine drugs**, v. 8, n. 1, p. 106–21, jan. 2010.

FRANKLIN, L. A.; KRABS, G.; KUHNENKAMP, R. Blue Light and Uv-a Radiation Control the Synthesis of Mycosporine-Like Amino Acids in *Chondrus Crispus* (Florideophyceae). **Journal of Phycology**, v. 37, n. 2, p. 257–270, 18 abr. 2001.

FUNA, N. et al. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*1999,400:897-899. **Nature**, v. 400, p. 897–899, 1999.

GAO, Q. et al. Effects of fatty acid activation on photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in *Synechocystis* sp. PCC6803. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 17, jan. 2012.

HELBLING, E. W. et al. Photoacclimation of antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. n. 96, 1996.

HERRMANN, K. M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, n. 50, p. 473–503, 1999.

HUSON, D. H. et al. MEGAN analysis of metagenomic data. **Genome research**, v. 17, p. 377–386, 2007.

ITO, S.; HIRATA, Y. Isolation and Structure of a mycosporine from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. **tetrahedron Letters**, v. 188, n. 28, p. 2429–2430, 1977.

KEDAR, L.; KASHMAN, Y.; OREN, A. Mycosporine-2-glycine is the major mycosporine-like amino acid in a unicellular cyanobacterium (*Euhalothece* sp.) isolated from a gypsum crust in a hypersaline saltern pond. **FEMS microbiology letters**, v. 208, n. 2, p. 233–7, 5 mar. 2002.

KHOSLA, C. et al. Structure and mechanism of the 6-deoxyerythronolide B synthase. **Annual review of biochemistry**, v. 76, p. 195–221, jan. 2007.

KLISCH, M.; HÄDER, D.-P. Mycosporine-like amino acids and marine toxins--the common and the different. **Marine drugs**, v. 6, n. 2, p. 147–63, jan. 2008.

LAGESSEN, K. et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. **Nucleic acids research**, v. 35, p. 3100–3108, 2007.

LAMBALOTI, R. et al. A new enzyme transferases superfamily - the phosphopantetheinyl. **Chemistry and Biology**, v. 3, p. 923–936, 1996.

LEÃO, P. N. et al. The chemical ecology of cyanobacteria. **Natural product reports**, v. 29, n. 3, p. 372–91, mar. 2012.

LUO, L. et al. Timing of epimerization and condensation reactions in nonribosomal peptide assembly lines: kinetic analysis of phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B. **Biochemistry**, v. 41, p. 9184–9196, 2002.

MADIGAN, M. T. et al. Other Bacteria. In: MADIGAN, M. T. et al. (Eds.). **Brock's Biology of Microorganisms**. 13. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2012. p. 517–555.

MALPARTIDA, F.; HOPWOOD, D. A. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. **Nature**, v. 309, p. 462–464, 1984.

MARAHIEL, M. A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H. D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. **Chemistry Reviews**, v. 97, p. 2651–2673, 1997.

MELCHER, S. S. **Estudos morfológicos e moleculares de cianobactérias potencialmente tóxicas dos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon* e *Raphidiopsis* (Nostocales)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2007.

MOOTZ, H. D.; SCHWARZE, D.; MARAHIEL, M. A. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. **ChemBiochem**, v. 3, p. 490–504, 2002.

MOTAMEDI, H.; HUTCHINSON, C. R. Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 4445–4449, 1987.

- NAKAMURA, H.; KOBAYASHI, J. Separation of Mycosporine-like aminoacids in marine organisms using reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 250, n. 3, p. 113–118, 1982.
- NEDERBRAGT, A. J. et al. Identification and Quantification of Genomic Repeats and Sample Contamination in Assemblies of 454 Pyrosequencing Reads. **Sequencing**, v. 2010, p. 1–12, 2010.
- RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 521–539, 2009a.
- RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 521–539, 2009b.
- RUTHERFORD, K. et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 16, n. 10, p. 944–5, out. 2000.
- SCHMID, D.; SCHÜRCH, C.; ZÜLLI, F. Mycosporine-like Amino Acids from Red Algae Protect against Premature Skin-Aging Abstract : **Euro Cosmetics**, v. September, p. 1–4, 2006.
- SCHWARZER, D.; MOOTZ, H. D.; MARAHIEL, M. A. Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases. **Chemistry and Biology**, v. 8, p. 997–1010, 2001.
- SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 285–295, abr. 2003.
- SHIBATA, K. Pigments and UV-absorbing substance in corals and a blue green alga living on the great barrier reef. **Plant Cell Physiology**, v. 10, p. 325, 1969.
- SHICK, J. M. et al. Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. **Limnology and Oceanography**, v. 44, n. 7, p. 1667–1682, 1999.
- SHICK, J. M.; DUNLAP, W. C. Mycosporine-like amino acids and related Gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. **Annual review of physiology**, v. 64, n. 1, p. 223–62, jan. 2002.
- SINGH, R. K. et al. Cyanobacteria : an emerging source for drug discovery. **The Journal of Antibiotics**, n. July 2009, p. 1–12, 2011.
- SINGH, S. P. et al. Mycosporine-like amino acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. **Indian journal of experimental biology**, v. 46, n. 1, p. 7–17, jan. 2008a.
- SINGH, S. P. et al. Mycosporine-like amino acids (MAAs) profile of a rice-field cyanobacterium *Anabaena doliolum* as influenced by PAR and UVR. **Planta**, v. 229, n. 1, p. 225–33, dez. 2008b.
- SINGH, S. P. et al. Genome mining of mycosporine-like amino acid (MAA) synthesizing and non-synthesizing cyanobacteria: A bioinformatics study. **Genomics**, v. 95, n. 2, p. 120–8, fev. 2010.

- SINGH, S. P.; HÄDER, D.-P.; SINHA, R. P. Bioinformatics evidence for the transfer of mycosporine-like amino acid core (4-deoxygadusol) synthesizing gene from cyanobacteria to dinoflagellates and an attempt to mutate the same gene (YP_324358) in *Anabaena variabilis* PCC 7937. **Gene**, v. 500, n. 2, p. 155–63, 1 jun. 2012.
- SINHA, R. P. et al. UV-B-induced synthesis of mycosporine-like amino acids in three strains of *Nodularia* (cyanobacteria). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 71, n. 1-3, p. 51–58, out. 2003.
- SINHA, R. P.; HÄDER, D.-P. UV-protectants in cyanobacteria. **Plant Science**, v. 174, n. 3, p. 278–289, mar. 2008.
- SINHA, R. P.; SINGH, S. P.; HÄDER, D.-P. Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 89, n. 1, p. 29–35, 12 nov. 2007.
- SOMMARUGA, R.; GARCIA-PICHEL, F. UV-absorbing mycosporine-like compounds planktonic and benthic organisms from a. **Archives in Hydrobiology**, n. February, p. 255–269, 1999.
- SPENCE, E. et al. **Redundant Pathways of Sunscreen Biosynthesis in a Cyanobacterium.PDF**, 2012.
- STAL, L. J.; MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria 1. v. 21, 1997.
- STOCHAJ, W. R.; DUNLAP, W. C.; SHICK, J. M. Two new UV-absorbing mycosporine-like amino acids from the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and the effects of zooxanthellae and spectral irradiance on chemical composition and content. **Marine Biology**, v. 118, p. 149–156, 1994.
- SUH, A. H. et al. Mycosporine Glycine Protects Biological Systems Against Photodynamic Damage by Quenching Singlet Oxygen with a High Efficiency Mycosporine Glycine Protects Biological Systems Against Photodynamic Damage by Quenching Singlet Oxygen with a High Efficiency. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78, n. 2, p. 109–113, 2003.
- TAKANO, S. et al. Isolation and Structure of a 334 nm UV-absorbing Substance, porphyra-334 from the red Alga *Porphyra tenera* Kjellman. **Chemistry Letters**, p. 419–420, 1979.
- TEAL, T. T. et al. Structure de Deux Nouvelles Iminomycosporines isolées de *Pocillopora eydouxi*. v. 38, n. 33, p. 5799–5800, 1997.
- WELKER, M. et al. Microcystins (cyanobacterial toxins) in surface waters of rural Bangladesh : Pilot study. n. Ahmed 2002, p. 325–337, 2005.
- WHITEHEAD, K.; HEDGES, J. I. Analysis of mycosporine-like amino acids in plankton by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. **Marine Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 27–39, dez. 2002.
- WHITEHEAD, K.; HEDGES, J. I. Electrospray ionization tandem mass spectrometric and electron impact mass spectrometric characterization of mycosporine-like amino acids. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 17, n. 18, p. 2133–8, jan. 2003.

WHITEHEAD, K.; HEDGES, J. I. Photodegradation and photosensitization of mycosporine-like amino acids. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 80, n. 2, p. 115–21, 1 ago. 2005.

WHITEHEAD, K.; KARENTZ, D.; HEDGES, J. Mycosporine-like amino acids (MAAs) in phytoplankton, a herbivorous pteropod (*Limacina helicina*), and its pteropod predator (*Clione antarctica*) in McMurdo Bay, Antarctica. **Marine Biology**, v. 139, n. 5, p. 1013–1019, 1 nov. 2001.

WU WON, J. J.; CHALKER, B. E.; RIDEOUT, J. A. Two new UV-absorbing compounds from *Stylophora pistillata*: sulphate esters of mycosporine-like amino acids. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 14, p. 2525–2526, 1997.

WU, X. et al. A comparative analysis of the sugar phosphate cyclase superfamily involved in primary and secondary metabolism. **Chembiochem : a European journal of chemical biology**, v. 8, n. 2, p. 239–48, 22 jan. 2007.

YU, Y. et al. Gene Cluster Responsible for Validamycin Biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* subsp . *jinggangensis* 5008 Gene Cluster Responsible for Validamycin Biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* subsp . *jinggangensis* 5008. 2005.

ZHANG, L.; LI, L.; WU, Q. Protective effects of mycosporine-like amino acids of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and their partial characterization. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 86, n. 3, p. 240–5, 1 mar. 2007.