



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ANDRESSA COIMBRA PEREIRA

**CYANOBACTÉRIAS: AVALIAÇÃO DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS,
TOXINA (MICROCISTINA), CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-
*LEISHMANIA***

João Pessoa - PB

2019

ANDRESSA COIMBRA PEREIRA

**CIANOACTÉRIAS: AVALIAÇÃO DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS,
TOXINA (MICROCISTINA), CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-
*LEISHMANIA***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de conclusão de curso do Centro de Biotecnologia na Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Cristiane Francisca da Costa Sassi

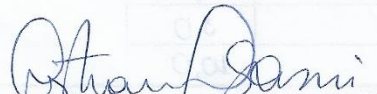
Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

João Pessoa – PB


2019

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO


Aos vinte dias do mês de setembro de 2019, às 10:00h, em sessão pública no auditório do Departamento de Sistemática e Ecologia deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Cristiane Francisca da Costa Sassi (CCEN/UFPB) e composta pelos avaliadores: 1. Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente (DBCM/CBIOTEC/UFPB), orientadora; 2. Dra. Jordana Kaline da Silva Santana, a discente Andressa Coimbra Pereira, matrícula 11507504, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“CIANOBACTÉRIAS: AVALIAÇÃO DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS, TOXINA (MICROCISTINA), CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTILEISHMANIA”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Cristiane Francisca da Costa Sassi, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.



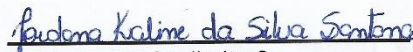
Presidente da Banca Examinadora



Orientadora e Avaliador 1



Discente



Avaliador 2

João Pessoa/PB, 20 de setembro de 2019.

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P436c Pereira, Andressa Coimbra.

CIANOBACTÉRIAS: AVALIAÇÃO DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS,
TOXINA (MICROCISTINA), CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE
ANTI-LEISHMANIA / Andressa Coimbra Pereira. - João
Pessoa, 2019.

47 f.

Orientação: Cristiane Francisca da Costa Sassi.
Coorientação: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Caracterização genotípica. 2. Cianobactérias
dulcícolas. 3. Leishmania amazonensis. 4. Metabólitos
primários. 5. Microcistina. I. Sassi, Cristiane
Francisca da Costa. II. Clemente, Tatjana Keesen de
Souza Lima. III. Título.

UFPB/BC

AGRADECIMENTOS

Primeiro eu tenho que agradecer o fato de ter tanto a agradecer! Obrigada, universo!

Sou uma pessoa extremamente agraciada por ter tido e por ter tanto, tantos amigos, tantas memórias, tantas experiências, tantas risadas, nesses 5 anos de faculdade

Aos meus pais, por todo o apoio, dedicação, esforço e devoção para que eu pudesse ter a melhor experiência na graduação, obrigada por tudo, por priorizarem a minha educação desde sempre.

Aos meus irmãos, Anderson, Amanda e Arthur pelas constantes conversas e momentos de descontração. Obrigada por aguentarem a minha incerteza no início do curso até eu me achar nele, e depois as discussões sobre qual curso “bio” é melhor, e lógico que biotecnologia continua ganhando de biologia e biomedicina, mas amo vocês mesmo assim!

Aos meus demais familiares em que mesmo na distância se fizeram presente ao longo da minha vida acadêmica, aos meus avós, Júlia, Joel, Lelei e Omar vocês são um exemplo pra mim. Dinda Lu e dindo César, todo apoio e interesse de vocês significa muito.

E voltando a atmosfera universitária, agradeço aos meus amigos de sala e agora da vida. Cibele, minha dupla de trabalhos, seminários e provas, obrigada por tudo, não teria sido tão leve sem essa parceria. Karla Karoline, nem sei por onde começar, são tantas coisas que vou me restringir a um te amo e muito obrigada. Rafaela, que ao contar cada história, a torna em um filme digno de Oscar, obrigada por assistir as melhores séries e discutir comigo. César, que chegou pra somar e completar esse time. E aos que ficaram no meio do caminho, porém tempo o suficiente para fazerem falta, Amanda, Bárbara e John.

E finalmente chegamos ao LARBIM, o laboratório que me acolheu desde o primeiro segundo na pessoa do professor Roberto Sassi, lembro como se fosse hoje o dia que cheguei para falar com o senhor para pedir para fazer estágio, o senhor estava na parte de fora da sua sala dando ração para os gatos, e desde esse momento eu vi que ali era mais que um ambiente de trabalho, era um lar também, o meu lar por 3 anos. O senhor terminou de dar comida aos gatos e me mostrou todo o laboratório, sala por sala, explicando tudo, lembro de ter olhado pra Cibele e pra Karla e o nosso olhar ter sido de espanto pela receptividade. O senhor foi meu primeiro mentor/orientador, profunda gratidão e admiração pela pessoa que és. A professora Cristiane Sassi por ter me dado a oportunidade de ser bolsista PIBIC, e com isso ter agregado tanto a minha formação acadêmica, obrigada pelos ensinamentos passados diretamente, obrigada por ter pego na minha mão e me ensinado as análises da biologia molecular, a senhora é uma professora diferenciada no laboratório, obrigada pela paciência e dedicação na orientação.

Ao time LARBIM, essa imensa família que se ajuda em todos os momentos, sem vocês não teria sido tão legal e proveitoso passar o dia no laboratório. Obrigada Amanda

Evandro, Jéssica, Jordana, Luís, Maria Helena, Nyelson, Patrícia, Vivi, Viviane, Rebeca, Roberta e Thaciana. Cada um de vocês significa muito pra mim, porém tenho que falar um pouco da Roberta.

Uma das melhores, senão a melhor coisa que me aconteceu nessa trajetória LARBIM foi ter começado a te ajudar no doutorado. Tu que muitas vezes foi chamada de “mãe da Andressa”, foi a pessoa com quem mais convivi no laboratório, que me ensinou boa parte do que sei hoje, que sempre me ajudou em tudo, e me acolheu no seu doutorado e hoje fala nosso trabalho, gratidão talvez seja a melhor palavra existente que eu consiga pensar, mas definitivamente não chega nem perto do definir tudo o que sinto. Obrigada!

Aos técnicos do LARBIM, Jonas e Seu Ramos obrigada pela dedicação de vocês e desculpa pela bagunça na época das análises.

Ao LABIDIC, a professora Tatjana por ter prontamente aceito fazer parte dessa pesquisa, por ter oferecido todo suporte necessário, e pela compreensão. A Pâmela, Fernanda, Juliana, Thamyris e Raquel por toda a ajuda.

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica

Aos professores e funcionários do Cbiotec

Aos professores, George Miranda e Cláudio Pereira pelas oportunidades oferecidas

Aos demais amigos extra universidade, curso, ou sala de aula

Obrigada a todos por fazerem parte desse momento tão importante e especial, para sempre grata a vocês!

Agora chega de sentimentalismo, vamos pra parte séria da coisa, o TCC!

“ Na minha opinião, nós ainda não desenvolvemos pesquisas científicas suficientes para encontrar a cura dos ignorantes. ”

Bill Watterson

CIANOBACTÉRIAS: AVALIAÇÃO DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS, TOXINA (MICROCISTINA), CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA*

RESUMO

Cianobactérias, conhecidas também como alga verde-azulada, são bactérias capazes de realizar fotossíntese e produzir oxigênio sendo organismos promissores para uma gama de aplicações biotecnológicas. Este trabalho teve como objetivo realizar ensaios laboratoriais de produção de biomassa com cepas de cianobactérias dulcícolas do banco de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas – LARBIM/UFPB, para caracterização dos níveis de toxicidade, metabólitos primários e das atividades inibidora de *Leishmania amazonensis*. Ensaio de produção de biomassa foram realizados em mariotes de vidro de 20L em meio de cultura Zarrouk, em câmara climatizada ($24^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C) com sistema de iluminação de fotoperíodo de 12 horas. O acompanhamento dos cultivos foi feito por fluorescência e contagem celular sendo interrompidos na fase estacionária. A biomassa produzida foi liofilizada e armazenada até a realização das análises. Além disto, foram determinados os teores de carboidratos, proteína, lipídios e a caracterização dos níveis de toxicidade através do teste de Elisa. Foi realizada também a caracterização genotípica da cianobactéria D502Z e ainda foi avaliada a atividade anti-*Leishmania* através do método MTT. Dentre as linhagens cultivadas, estão as espécies *Arthrospira platensis*, *Stanieria sp.* e uma até o momento não identificada. Em relação a composição nutricional, as biomassas apresentaram altos teores de proteínas (50,6% e 54,46%), exceto a D39Z (12,32%) e altos teores lipídicos (de 19,6 a 24,6%). Nessas linhagens os valores de microcistina foram detectadas em níveis abaixo do valor mínimo de detecção do Kit Abraxis® (0,15ppb) para *A. platensis* e *Stanieria sp.*, quanto que na cepa não identificada não foi identificado em nenhum nível. A caracterização genotípica da cepa D502Z está em processo, tendo sido realizado até a etapa de PCR. Apesar de nenhum dos extratos testados terem apresentado atividades contra a *Leishmania amazonensis*, eles não apresentaram citotoxicidade, portanto corroborado com outras pesquisas cujo houve atividade, fica claro que as cianobactérias são uma promissora fonte de pesquisa para o descobrimento de novos compostos de interesse biotecnológico capaz de agir contra agentes patogênicos.

Palavras-Chave: Caracterização genotípica. Cianobactérias dulcícolas. *Leishmania amazonensis*. Metabólitos primários. Microcistina.

CYANOBACTERIAS: PRIMARY METABOLITES EVALUATION, TOXIN (MICROCYSTIN), CYTOTOXICITY AND ANTI-*LEISHMANIA* ACTIVITY

ABSTRACT

Cyanobacterias, also associated as blue-green algae, are bacterias capable of perform photosynthesis and oxygen production, being promising organisms for a range of biotechnological applications. The objective of this work was to perform laboratory assays of biomass production with freshwater cyanobacteria from the microalgae bank of the Laboratory of Reef Environments and Microalgae Biotechnology - LARBIM / UFPB, to characterize the levels of toxicity, primary metabolites and *Leishmania amazonensis* activity. Biomass production assays were performed in 20L glass flasks in Zarrouk culture medium, in a climate chamber ($24^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C) with a 12-hours photoperiod illumination system. Cultivation follow-up was done by fluorescence and cell count being interrupted at the stationary phase. The biomass produced was lyophilized and stored until the analyzes were performed. Furthermore, carbohydrate, protein and lipid levels were characterized as well the toxicity levels through the Elisa test. A genetic characterization of cyanobacteria D502Z was also performed and an anti-*Leishmania* activity was evaluated by the MTT method. Among the cultivated strains are the species *Arthrospira platensis*, *Stanieria sp.* and one so far unidentified. Regarding the nutritional composition, as biomass presented high protein contents (50.6% and 54.46%), except D39Z (12.32%) and high lipid contents (from 19.6 to 24.6%). In these lines the microcystin values were detected at levels below the minimum detection value of the Abraxis® Kit (0.15ppb) for *A. platensis* and *Stanieria sp.*, whereas the unidentified strain was not identified at any level. Genetic characterization of the D502Z strain is in process and performed until the PCR step. Although none of the extracts tested have activities against *Leishmania amazonensis*, they are not citotoxic, so corroborating with other research on the activities that take place, it is clear that cyanobacteria are a promising source of research for the discovery of new biotechnologies. interest capable of acting against pathogens.

Keywords: Freshwater cyanobacteria. Genotypic characterization. *Leishmania amazonensis*. Microcystin. Primary metabolites

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Sala do banco de cultura de microalgas do LARBIM/UFPB. (A= Câmaras de germinação). 9
- Figura 2:** Fotografias das três cepas de cianobactérias dulcícolas selecionadas do banco de cultura do LARBIM/UFPB para o desenvolvimento deste trabalho **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3:** Fotos dos cultivos das cepas de cianobactérias selecionadas para estudo. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4:** Realização das leituras dos níveis de microcistina das cepas de cianobactérias selecionadas para estudo. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), utilizado para o cultivo das cepas de cianobactérias selecionadas do Banco de cultura do LARBIM/UFPB..	Erro! Indicador não definido.
Tabela 2: Constante de crescimento k (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g/L). (NI= Cianobactéria não identificada).....	21
Tabela 3: Concentração de microcistina/nodularina ($\mu\text{g.g}$ de células liofilizadas) das cepas de cianobactérias dulcícola selecionadas do banco de cultura do LARBIM/UFPB. (NI= Cianobactéria não identificada).....	23
Tabela 4: Metabólitos primários das três linhagens de cianobactérias dulcícolas selecionadas do banco de cultura do LARBIM/UFPB. (NI= Cianobactéria não identificada).....	24
Tabela 5: Resultado da extração do DNA 16S da linhagem de cianobactéria D502Z do Banco de Cultura do LARIM/UFPB. (NI= Cianobactéria não identificada)	25

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Resultado da citotoxicidade dos extratos frente aos sangues coletados..... 25

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRIA	15
2.1 CIANOBACTÉRIAS	15
2.2 CIANOTOXINAS	16
2.3 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	17
2.4 LEISHMANIOSE	19
3 OBJETIVO	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 SELEÇÃO DAS CIANOBACTÉRIAS DO BANCO DE CULTURA DE MICROALGAS DO LARBIM/UFPB	22
4.2 ENSAIOS LABORATORIAIS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DAS CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS SELECIONADAS PARA ESTUDO	24
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE TOXICIDADE (MICROCISTINA/NODULARINA) DAS CIANOBACTÉRIAS SELECIONADAS ATRAVÉS DO TESTE ELISA	27
4.4 ANÁLISE DOS METABÓLITOS PRIMÁRIOS DAS ESPÉCIES CULTIVADAS	28
4.4.1 Análise de Carboidrato totais	28
4.4.2 Análise de Proteínas hidrossolúveis	28
4.4.3 Análise de Lipídios totais.....	29
4.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DA CEPA DE CIANOBACTÉRIA D502Z.....	29
4.5.1 Extração do DNA	29
4.5.2 Quantificação e determinação da pureza do DNA.....	30
4.5.3 Condições da PCR (= Polymerase Chain Reaction).....	31
4.6 POTENCIAL DO EXTRATO DAS CIANOBACTÉRIAS PARA AVALIAR ATIVIDADE ANTI- <i>LEISHMANIA</i>	31
4.6.1 Obtenção dos extratos.....	31
4.6.2 Ensaio de lise de glóbulos vermelhos	32
4.6.3 Determinação de atividade anti- <i>Leishmania</i> pelo método do MTT	32
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	34
5.1 ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	34

5.3 ANÁLISE DOS METABÓLITOS PRIMÁRIOS DAS ESPÉCIES CULTIVADAS	35
5.3.1 Análise de Carboidrato totais	36
5.3.2 Análise de Proteína	36
5.3.3 Análise de Lipídios totais	36
5.4 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICAS DA LINHAGEM DE CIANOACTÉRIA D502Z	37
5.5 POTENCIAL DO EXTRATO DAS CIANOACTÉRIAS PARA AVALIAR ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA	38
5.5.1 Citotoxicidade dos extratos	38
5.5.2 Atividade Anti- <i>Leishmania</i>	40
6 CONCLUSÃO	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

Cianobactérias, conhecidas também como alga verde-azulada, são bactérias capazes de realizar fotossíntese e produzir oxigênio, constituindo o grupo mais antigo de produtores primários de fotossíntese, acarretando no acúmulo de oxigênio na atmosfera proporcionando condições para o surgimento de seres mais complexos como, as algas eucarióticas, macro e microalgas, porém devido a diversidade desses organismos o termo “alga” não possui valor taxonômico (LOURENÇO, 2006).

Esses microrganismos constituem de uma grande diversidade de espécies existentes, devido a essa pluralidade, há diversas aplicações biotecnológicas possíveis, dependendo da composição bioquímica (ANANYA; AHMAD, 2014). Algumas espécies são capazes de apresentar metabólitos secundário tóxicos a humanos e animais (GERWICK et al., 2008). Sendo mudanças de fatores abióticos a razão para eutrofização desses organismos com carga toxicológica, caracterizando sérios problemas de saúde pública (CARMICHAEL et al., 2001; SIQUEIRA; OLIVEIRA FILHO, 2008).

A investigação do potencial da biomassa cultivada, quando voltada para a área da saúde, traz novas formas de tratar e combater infecções por microrganismos patogênicos como, bactérias, fungos, protozoários, parasitas, e até casos inflamatórios e cancerígenos (FAULKNER, 2001). A aplicação biotecnológica desse trabalho, tem o intuito de contribuir com os dados sobre a utilização de cianobactérias com atividade anti-*Leishmania*, visto que os medicamentos disponíveis no mercado são escassos e tóxicos. Aliado ao fato dessa doença atingir populações carentes de países subdesenvolvidos, devido a forma de transmissão através da picada de mosquitos contaminados com esse parasita, configurando entre as doenças classificadas como negligenciadas pela OMS (WHO, 2019a).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRIA

2.1 CIANOBACTÉRIAS

Cianobactérias são seres microscópicos, unicelulares, procariotos fotossintetizantes, que surgiram na Terra há cerca de 3,5 bilhões de anos, e este fato foi indispensável para a conversão da atmosfera primitiva à atual. Tal persistência explica a elevada capacidade de adaptação das cianobactérias a diferentes tipos de habitats e a enorme dispersão e colonização do grupo em diferentes ambientes, tais como os ecossistemas aquáticos dulcícolas, estuarinos e marinhos, além dos ecossistemas terrestres (SINHA; HADER, 2008; MILANO et al., 2016). Elas ocupam papel chave no ciclo global do carbono e no ciclo do nitrogênio de diversos ecossistemas aquáticos, inclusive no meio marinho (SINHA; HADER, 2008; CAPONE et al., 2005).

As cianobactérias exibem diversidade de formas podendo ser cocóides ou filamentosas, com os seguintes morfótipos: filamentosas sem ramificação, filamentosas com falsa ramificação e filamentosas com ramificação verdadeira, podendo ainda ser unisseriadas ou multisseriadas (SANT'ANNA 2006 et al. 2004). Tanto as formas cocóides como as filamentosas podem ocorrer individualmente ou em agrupamentos, características estas que contribuem para sua classificação taxonômica. Os filamentos são formados a partir dos tricomas (uma cadeia de células que podem ou não estar envoltas por uma bainha de polissacarídeos). Já os grupos coloniais não filamentosos estão imersos em uma bainha que confere à célula um contorno irregular ou esférico (CHORUS; BARTRAM 1999).

Estima-se que existam cerca de 150 gêneros de cianobactérias e aproximadamente 2.000 espécies, sendo que cerca 40 gêneros são conhecidos por produzirem metabólitos secundários com propriedades biotóxicas, genericamente chamadas de cianotoxinas (CARMICHAEL, 1994; GERWICK et al., 2008), que podem impactar organismos terrestres e aquáticos, e muitos desses efeitos também podem ser letais a humanos (BORGES et al., 2015). No Brasil são conhecidas 32 espécies tóxicas de cianobactérias, sendo que apenas dois gêneros (*Microcystis* e *Anabaena*) contribuem com 40% desse total; o primeiro, com 7 espécies tóxicas, e o segundo, com 6 (SANTANNA Et al., 2004). Os principais gêneros de cianobactérias tóxicas encontradas nas regiões tropicais e subtropicais são: *Microcystis*, *Radiocystis*,

Planktothrix, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis* (SANT'ANNA et al., 2004).

2.2 CIANOTOXINAS

As cianotoxinas são classificadas conforme o seu modo de ação, em: Neurotoxinas, Dermatotoxinas e Hepatotoxinas. A primeira atua como agentes bloqueadores nas transmissões neuromusculares causando a morte de animais por paralisia dos músculos respiratórios (CARMICHAEL, 1994); as dermatotoxinas, estão associadas à irritação na pele e mucosa e intoxicações gastrintestinais, e as hepatotoxinas, promovem danos às células do fígado e outros órgãos, além de fraqueza, anorexia, inchaço das membranas mucosas e vômito, levando os animais e os seres humanos à morte em poucas horas ou em poucos dias por choque hemorrágico (CARMICHAEL, 1994; MORENO et al., 2005; SANCHES et al. 2012).

As hepatotoxinas (microcistina e nodularina; e cilindrospermopsina) são as mais detectadas em ambientes dulcícolas e elas podem ser bioacumuladas nas cadeias alimentares (ZHAO et al., 2015). Diversos organismos aquáticos, incluindo zooplâncton, moluscos, camarões e peixes acumulam essas cianotoxinas seja através da alimentação direta de células cianobacterianas ou indiretamente, por meio da ingestão de alimentos cianotóxicos mediados pela teia alimentar (GURBUZ et al., 2016).

Florações de cianobactérias planctônicas são globalmente registradas em corpos d'água lênticos (lagos, lagoas, açudes, barragens, etc.) e lóticos (rios e riachos), e são consideradas um risco para a saúde dos seres humanos e animais (CHORUS; BARTRUM, 1999). O aparecimento de florações de cianobactérias tóxicas em lagos eutróficos, reservatórios e águas de recreação é um problema mundialmente difundido e, entre as cianotoxinas que são comumente produzidas, as microcistinas e cilindrospermopsina são consideradas os grupos mais perigosos, devido suas atividades hepatotóxicas e carcinogênicas (GURBUZ et al., 2016). Mas existem cianobactérias que produzem a saxtoxina e anatoxina-a causadoras de distúrbios neurológicos, em vários organismos inclusive nos seres humanos, e que por isso também são consideradas um risco a saúde humana (SANCHES et al., 2012; BORGES et al., 2015). Os sintomas em humanos, provocados pela ingestão de água com a presença de cianotoxina, vão desde vômitos, diarreias e dor de cabeça, até a paralização de órgãos e/ou morte do indivíduo.

As cianotoxinas quando provenientes de casos de floração constituem graves casos de saúde pública, sendo o caso brasileiro mais grave e conhecido datado da década de 90 em Pernambuco, causado pela contaminação da água utilizada por pacientes de hemodiálise (AZEVEDO et al., 2002). Esse caso serviu de gatilho para investigação da correlação de cianotoxinas na microcefalia causada pelo vírus da Zika, sendo descoberto que a saxitoxina agrava a má formação cerebral, ocasionando casos mais severos de microcefalia (PEDROSA et al., 2019).

2.3 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Embora se saiba da toxicidade das cianobactérias muitos grupos têm sido considerados como organismos promissores para várias aplicações biotecnológicas tendo em vista que essas microalgas também são produtoras de metabólitos primários, tais como carboidratos, lipídios e proteínas além de produzir diversos grupos de carotenoides que têm sido utilizados como aditivo alimentar de rações de salmão visando intensificar sua coloração, e como antioxidantes naturais (DREW; DEMAIN, 1977; SANCHEZ; DEMAIN, 2008). Diante disto, o grupo vem sendo alvo de estudos para a obtenção de compostos químicos úteis, tanto para alimentação humana como ração animal, além de produtos farmacêuticos, biofertilizantes, entre outras aplicações (SPOLAORE et al., 2006). Há registro, por exemplo, do uso de cianobactérias para produção de biodiesel e bioquerosene (CHU et al. 2010; PARMAR et al. 2011), como fonte de enriquecimento de alimento humano e ração animal, como fonte de produção de corantes naturais, produção de produtos de alto valor comercial, a exemplo de ômega-3 e ômega-6, entre outros (WIJFFELS 2007; AMBROSI et al. 2008; CHU et al. 2010). A vasta aplicação biotecnológica das cianobactérias vai desde a utilização como fonte de nutrientes alimentares e ativos para medicamentos, até como provedor de substratos para utilização em biocombustíveis e biorremediadores ambientais (SPOLAORE et al., 2006).

Na área de alimentos, por exemplo, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) libera a utilização da cianobactéria da espécie *Arthrospira platensis*, conhecida popularmente como *Spirulina*, como fonte de suplementos alimentares já que possuem altos teores de nutrientes como carboidratos, proteínas, vitaminas, minerais etc. e são facilmente digeríveis, sendo aplicados na alimentação humana e animal, em

diferentes formas, como cápsulas, comprimidos, pó (biomassa seca e/ou liofilizada), flocos e xaropes, sendo comercializados em todos os continentes. (VARANDAS, 2016; ABED et al., 2009; PRIYADARSHANI; RATH, 2012).

Na área de produção de biocombustíveis tem sido utilizado cepas de cianobactérias produtoras de altas taxas de lipídeos. Já para produção do bioetanol, tem sido selecionado cepas que produzem altos teores de carboidratos. Sendo esses teores passíveis de aumento através do processo de cultivo em condição de estresse, ou seja, fora dos seus parâmetros ideais de crescimento. Como por exemplo, alteração no fotoperíodo e na composição dos nutrientes do meio de cultura mediante a depressão ou suplementação de nutrientes em específico (MARKOU et al., 2012).

Outra importante forma de utilização das cianobactérias é no tratamento de efluentes industriais. Por exemplo, existem grupos de cianobactérias que se destacam como biorremediadoras pelas vantagens em relação a outros microrganismos, pelo fato de serem fotoautotróficas e capazes de fixar altas taxas de nitrogênio atmosférico (EL-BESTAWY et al., 2007, DUBEY et al., 2011). E no campo da agricultura, cianobactérias potentes fixadoras de N₂ são exploradas como biofábrica para produzir biofertilizante para enriquecer a fertilidade do solo (VIJAYAKUMAR; MENAKHA, 2015).

Na área da saúde também existem diversas pesquisas utilizando cepas de cianobactérias que apresente atividade biológica, como antibacteriana (BARBOZA et al., 2017), antifúngica (SHERWANI et al., 2015), anticancerígena (FELCZYKOWSKA et al., 2015), entre outros como, anti-*Leishmania*. Envolvendo a investigação dessa atividade desde extratos até compostos bioativos extraídos da biomassa. Por exemplo, Broniatowska et al. (2011) encontrou atividade anti-*Leishmania* de extrato das cianobactérias *Nostoc commune* e *Rivularia biasolettiana* em *Leishmania donovani*. Já Simmons et al. (2008) extraiu viridamida A (lipodepsipeptídeo) da cianobactéria *Oscillatoria nigro-viridis* que apresentou atividade em *Leishmania mexicana*.

2.4 LEISHMANIOSE

A leishmaniose faz parte do grupo de doenças tropicais classificada como negligenciada pela OMS (Organização Mundial da Saúde), sendo transmitido através da mordida de fêmeas infectadas da subfamília de insetos flebotomíneos (WHO, 2019a). *Leishmania* spp. é um parasita de mais de 20 espécies com variação geográfica da sua distribuição, tendo em comum países tropicais com população carente (PACE, 2014). Sendo o Brasil, o país do continente americano em que há mais casos registrados de leishmaniose, cerca 25.000 casos anualmente, registrados em todos os estados, sendo a região Nordeste a mais afetada, apresentando um grave problema de saúde pública no Brasil (CARVALHO et al., 2015; MACHADO, 2014). Em 2017 foi reportado 22.145 novos casos, sendo 94% (20.792) provenientes de 7 países, sendo o Brasil um deles, enquanto em Bangladesh programas de erradicação estão em satisfatório progresso, diminuindo os casos de mais de 9.000 em 2006, para 192 novos casos em 2017 (WHO 2019b).

A manifestação clínica da doença é dividida em forma visceral, cutânea e/ou mucocutânea. A leishmaniose cutânea (CL) é geralmente caracterizada por uma úlcera na pele, podendo afetar a mucosa, e a visceral (VL) é o estabelecimento da infecção nos órgãos internos como, baço e fígado. (SCOTT; NOVAIS, 2016). Sendo a *Leishmania amazonensis* uma das principais espécies do continente americano, e no Brasil é uma das causadoras da forma tegumentar americana (lesões na pele e/ou mucosas) (BRASIL, 2007).

O inseto previamente contaminado ao realizar repasto sanguíneo com sangue infectado transmite para o hospedeiro mamífero através de um novo repasto sanguíneo, caracterizando assim um ciclo infinito de transmissão. Devido a essa forma de contaminação, o controle do vetor é a forma ideal de prevenção da doença, (KAMHAWI, 2006).

Porém uma vez infectado, os tratamentos disponíveis além de escassos são de alto custo, e apresentam uma elevada carga toxicológica causando efeitos colaterais (SINGH et al., 2016). Por ser uma doença que afeta predominantemente pessoas com baixas condições socioeconômicas, o desenvolvimento de novas drogas não é prioridade da indústria farmacêutica. Com tudo, laboratórios de pesquisa acadêmica procuram por novas formas de combater a Leishmaniose (MARTIN et al., 2003), através de produtos

naturais derivados de plantas (SILVA et al., 2016), bem como de cianobactérias (NOWRUZI et al., 2018)

Tendo em vista esses entraves no tratamento da leishmaniose, estudos de bioprospecção de novas drogas utilizando microrganismos de fácil cultivo, faz-se necessário (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). Foi com essas informações em mente que este trabalho buscou encontrar cepas de cianobactérias dulcícolas capazes de serem utilizadas como inibidora das atividades de *Leishmania amazonensis* e caracterizar essas cepas quanto aos aspectos cianotóxicos e dos metabólitos primários.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar ensaios laboratoriais de produção de biomassa com cepas de cianobactérias dulcícolas do banco de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas – LARBIM/UFPB, para caracterização dos níveis de toxicidade, metabólitos primários e das atividades inibidora de *Leishmania amazonensis*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensaios laboratoriais de produção de biomassa em condições controladas de cultivo e meios de culturas apropriados, com três cepas de cianobactérias dulcícolas.
- Determinar os níveis de toxicidade de microcistina das três cepas de cianobactérias selecionadas, mediante teste Elisa.
- Caracterizar as cepas de cianobactérias selecionadas quanto aos teores dos metabólitos primários (carboidrato, lipídeo e proteína);
- Realizar a caracterização genotípica da cepa D502Z que é a única das selecionadas que não está identificada taxonomicamente, no banco de cultura do LARBIM/UFPB
- Avaliar o potencial do extrato das cepas de cianobactérias selecionadas em relação a atividade anti-*Leishmania*.

4 METODOLOGIA

4.1 SELEÇÃO DAS CIANOBACTÉRIAS DO BANCO DE CULTURA DE MICROALGAS DO LARBIM/UFPB

O Banco de Cultura de Microalgas do LARBIM/UFPB (Figura 1) possui cerca de 727 linhagens de microalgas isoladas principalmente das regiões Nordeste e Norte do Brasil, e algumas cepas isoladas de amostras de água trazidas do Arquipélago do Cabo Verde e de Israel. Dentre as microalgas isoladas da região Nordeste a maioria é procedente de ambientes dulcícolas (69,0%) e marinhos (31,0%). Dentre as dulcícolas, 52,28% são clorofíceas e 42,50% são cianobactérias e dentre as marinhas e estuarinas, a maioria (63,11%) são cianobactérias, seguidas por bacilariofíceas (28,44%), com predominância de isolados de amostras de plâncton (54,66%), seguidos por isolados de invertebrados bênticos (43,55%) como ascídias, esponjas, corais e zoantídeos de recifes costeiros e locais de até 18 m de profundidade, do estado da Paraíba, principalmente. As culturas unialgais são mantidas em tubos de ensaio com meio de cultura específico em câmara de germinação com sistema de iluminação e fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, e também nas estantes dentro da sala de cultivo do LARBIM/UFPB, com repicagens mensais.

Figura 1: Sala do banco de cultura de microalgas do LARBIM/UFPB. (A= Câmaras de germinação)



Para o desenvolvimento deste trabalho foram selecionadas do banco de cultura do LARBIM/UFPB três cepas de cianobactérias dulcícolas (**D39Z**, **D112Z** e **D502Z**),

cujas informações morfológicas, procedência da coleta e isolamento, código de depósito no banco de cultura do LARBIM/UFPB, e identificação taxonômica são apresentadas abaixo:

Cepa D39Z (*Arthrospira platensis* Gomont 1892)

Arthrospira platensis é uma cianobactéria filamentosa planctônica composta por células individuais com cerca de 8µm de comprimento. A morfologia das células é caracterizada por apresentarem filamentos solitários, raramente reunidos que se desintegram facilmente. São livremente flutuantes, podendo ser retos ou levemente ondulados (Figura 2A). Essa cianobactéria foi coletada no Açude de Acauã, oficialmente chamado de Açude Argemiro de Figueiredo, localizada no município de Itatuba - PB e incorporada ao banco de cultura do LARBIM/UFPB no ano de 2009. Através dos caracteres morfológicos esta cepa foi classificada inicialmente como *Plankthrotrix isothrix*, porém após a caracterização genotípica realizadas por pesquisadores do LARBIM/UFPB e sequenciamento genético, ela foi redescrita como sendo *Arthrospira platensis*.

Cepa D112Z (*Stanieria* sp. (Komárek & Hindák) Komárek & Anagnostidis 1986).

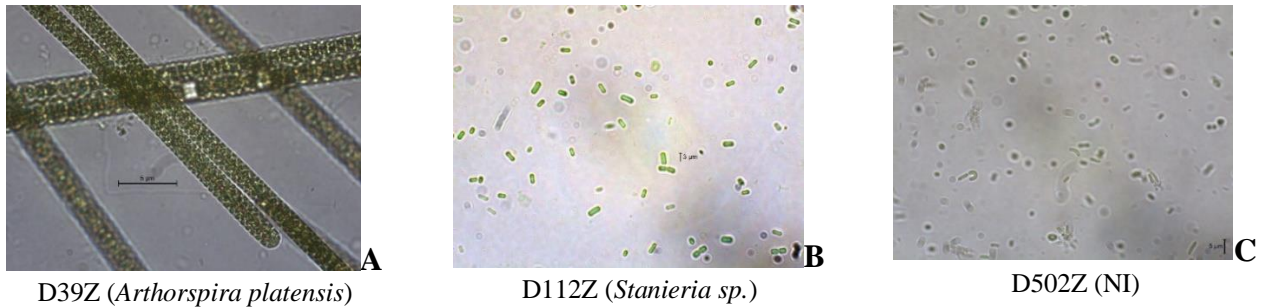
As células dessa cianobactéria apresentam morfologia cilíndrica levemente alongadas que podem atingir 3µm de comprimento (Figura 2B). A divisão celular ocorre por fissão binária em um plano perpendicular ao eixo maior da célula. Essa cianobactéria foi coletada e isolada do Açude de Quixabá, localizado no município de Quixabá – Paraíba incorporada ao banco de cultura do LARBIM/UFPB no ano de 2012. Através dos caracteres morfológicos esta cepa foi classificada inicialmente como *Synechococcus nidulans*, porém após a caracterização genotípica realizadas por pesquisadores do LARBIM/UFPB e sequenciamento genético, ela foi redescrita como sendo *Stanieria* sp.

Cepa D502Z (Não identificada)

As células dessa cianobactéria apresentam morfologia cilíndrica alongadas e podem atingir 4µm de comprimento (Figura 2C). Essa cianobactéria foi coletada e isolada no Açude da Fazenda Panati, localizado no município de Taperoá – PB e depositada no banco de cultura do LARBIM/UFPB no ano de 2014. Até a presente data esta cepa encontra-se sem identificação taxonômica no banco de cultura do

LARBIM/UFPB. Diante disto a caracterização genotípica da mesma foi realizada nessa pesquisa.

Figura 2: Fotografias das três cepas de cianobactérias dulcícolas selecionadas do banco de cultura do LARBIM/UFPB para o desenvolvimento deste trabalho. (NI=Não identificado)



4.2 ENSAIOS LABORATORIAIS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DAS CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS SELECIONADAS PARA ESTUDO

Os ensaios para produção de biomassa foram realizados em câmara de cultura climatizada ($25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$), e fotoperíodo ajustado para 12 horas, em mariotes de 20 litros com o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) cujas formulações estão descritas na tabela 1. O meio de cultura foi constituído com água destilada autoclavada e deixada em repouso por 24 horas em temperatura ambiente para a re-oxigenação. Após este tempo, foram adicionados dentro dos balões os macronutrientes, micronutrientes e vitaminas.

Tabela 1: Composição do meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), utilizado para o cultivo das cepas de cianobactérias selecionadas do Banco de cultura do LARBIM/UFPB.

Reagentes	Quantidades (g)
1- KNO ₃	15,0 em 200 MI de água destilada
2- NaCl	33,0 em 200 MI
3- MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 em 200 MI
4- K ₂ HPO ₄	1,5 em 200 MI
5- CaCl ₂ .2H ₂ O	0,58 em 200 MI
6- Na ₂ EDTA	6,4 em 100 MI
7- FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 em 100 MI
8- H ₃ BO ₃	1,142 em 100 MI
9- Solução mista (*)	Quantidade
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,049g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,144g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,882g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0157g
MoO ₃	0,071g

*Solução mista. Dissolver os cinco sais em 100 ml de água destilada

Após a constituição do meio de cultura, foram feitos os inóculos das cepas selecionadas para estudo, sendo o cultivo mantido em mariotes de 20 litros contendo 18 litros de meio de cultura Zarrouk, com aeração fornecida por um minicompressor de membrana Resun AOC2 (Figura 3).

Figura 3: Fotos dos cultivos das cepas de cianobactérias selecionadas para estudo.



O crescimento das espécies foi acompanhado por meio de contagens celulares em câmaras de Fuchs Rozenthal (para as cepas D112Z e D502Z) e em câmaras de Sedgewick-Rafter (para a cepa filamentosa D39Z), em microscópio binocular Leica, e através de medidas da fluorescência “in vivo” usando um fluorômetro Turner Design, em triplicatas. As curvas de crescimento de cada cepa cultivada foram traçadas utilizando os parâmetros das contagens celulares e da fluorescência, a partir das quais foi possível determinar o tempo de cultivo, a duração da fase exponencial, a velocidade de crescimento (k), e o rendimento final em biomassa. A velocidade de crescimento (k), a qual representa o número de divisões celulares da população em estudo por unidade de tempo (dia), foi determinada através da seguinte equação proposta por Stein et al. (1973):

$$k = \frac{3,322}{T_2 - T_1} \times \log \frac{N_2}{N_1}$$

Onde:

3,322: corresponde ao fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10;

T₁ e T₂: compreendem o início e o final da fase exponencial de crescimento;

N₁ e N₂: referem-se à densidade celular inicial e final dessa fase, respectivamente.

Os experimentos foram interrompidos na fase estacionária. A biomassa produzida das cepas D112Z e D502Z foi concentrada em centrifuga refrigerada a 18^oC, congelada em ultrafreezer a -40^oC, liofilizada usando um liofilizador (Marca: Terroni, Modelo: LD1500). A biomassa da cepa D39Z foi concentrada mediante o uso de uma rede de plâncton de 20µm de diâmetro de abertura de malha, sendo posteriormente congeladas em ultrafreezer a -40^oC, liofilizadas. A biomassa seca obtida de cada cepa cultivada (rendimento máximo final dos cultivos) foi determinada em balança analítica e armazenada em sacos ziplock, devidamente identificado, em refrigerador, para as posteriores análises.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE TOXICIDADE (MICROCISTINA/NODULARINA) DAS CIANOBACTÉRIAS SELECIONADAS ATRAVÉS DO TESTE ELISA

Nessas análises, 5 mg da biomassa liofilizada de cada cepa foi pesada em balança analítica de precisão e colocada em tubos criogênicos com 1,5mL de água Milli-Q autoclavada. Posteriormente, as amostras foram lisadas mediante três ciclos alternados de congelamento em banhos em nitrogênio líquido (5 segundo cada banho) e descongelamento em temperatura ambiente. Após a lise celular as amostras foram transferidas para tubos de eppendorf de 1,5mL e centrifugadas a 3000rpm durante 5 minutos a 18°C. Posteriormente o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novos tubos de eppendorf e as amostras assim preparadas foram usadas diretamente para análise de microcistina, utilizando o Kit Abraxis® o qual ler microcistiana e nodularina, seguindo as instruções do fabricante.

As leituras foram efetuadas a 450nm de absorbância em uma leitora de placa modelo Multiskan Fc (Thermo SCIENTIFIC), com o programa Skanlt Software 3.1.0.4 *RE for Multiskan FC*, do LARBIM/UFPB (Figura 4). Os limites máximos e mínimos de detecção para microcistina são de 5,0 e 1,0ppb, respectivamente. Segundo as recomendações do fabricante Abraxis®, amostras com concentrações menor que 0,015ppb devem ser reportadas como contendo <0,015 ppb de microcistina, ou seja, como não detectada.

Figura 4: Realização das leituras dos níveis de microcistina das cepas de cianobactérias selecionadas para estudo.



4.4 ANÁLISE DOS METABÓLITOS PRIMÁRIOS DAS ESPÉCIES CULTIVADAS

4.4.1 Análise de Carboidrato totais

Os teores de carboidrato total foram determinados pelo método de Kochert (1987), adaptado por Derner et al. (2006) mediante a adição de 4mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1N em 5mg da biomassa das cepas de cianobactérias liofilizadas. Em seguida, cada amostra foi aquecida em banho-maria à 100°C por 1 hora, depois resfriada em temperatura ambiente e centrifugada a 3.000rpm por 10min. Posteriormente, foi adicionado 0,5mL do sobrenadante (extrato alcalino) em três tubos falcon de 15mL, adicionando-se em cada um 1,0mL de NaOH 1N e 5mL de Fenol 4%, sendo em seguida agitado em vortex e deixado em repouso por 30min. Após esse período adicionou-se 2,5mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado em cada amostra, agitando-se em vortex novamente, deixando para esfriar em temperatura ambiente. As amostras assim preparadas foram lidas em espectrofotômetro UV-vis (marca Thermo Fisher Scientific, modelo Evolution 60S) no comprimento de onda de 485nm. Para calibração dos dados, uma curva padrão com glicose anidra foi preparada com gradiente de concentração de 0 - 400µg/mL.

4.4.2 Análise de Proteínas hidrossolúveis

Os teores de proteínas hidrossolúveis foram determinados pelo método de Lowry et al. (1951), adaptado por Derner et al. (2006) mediante a adição de 4mL de NaOH 1N em 5mg da biomassa liofilizada das cepas selecionadas, aquecida em banho-maria à 100°C por 1 hora, depois resfriada em temperatura ambiente, e em seguida centrifugada a 3.000rpm por 30min. Posteriormente, em três tubos falcon de 15mL foi adicionado 0,5mL do sobrenadante (extrato alcalino) e 5,0mL da solução de carbonato de sódio a 2,0% em NaOH 1N, da solução de sulfato de cobre II pentahidratado a 0,5% e da solução de tartarato de sódio e potássio 1,0% na proporção de 100:1:1, sendo em seguida agitado em vortex e deixado em repouso por 10min. Após esse período em cada tudo contendo as amostra foi adicionado 0,5mL da solução 1:1 de Folin-Ciocalteu e água destilada, agitado em vortex novamente e deixado em repouso por 30min, sendo

todo esse processo realizado no escuro. As amostras assim preparadas foram lidas em espectrofotômetro UV-vis (marca Thermo Fisher Scientific, modelo Evolution 60S) no comprimento de onda de 750nm. Para calibração dos dados obtidos, uma curva padrão com proteína de soro bovino (albumina) foi preparada com gradiente de concentração de 0 - 400µg/mL.

4.4.3 Análise de Lipídios totais

Os teores de lipídeos totais foram determinados pelo método de Bligh; Dyer (1959) mediante a adição de 3mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (1:2) com 2 mL de água em 50mg das amostras e então levadas ao sonicador (marca Unique, modelo USC-1400A). Adicionou-se 1mL de clorofórmio e 1mL de uma solução de cloreto de potássio a 1,5%, sendo centrifugado a 4.000 x g por 10 min. As amostras formaram duas fases em que a parte superior foi descartada. As amostras foram então filtradas com papel de filtro e essa solução transferida para frascos de vidros pré-pesados em balança analítica para determinação dos lipídios totais por gravimetria após a evaporação total do solvente em estufa à 80 °C.

4.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DA CEPA DE CIANOBACTÉRIA D502Z

4.5.1 Extração do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada conforme o método descrito em Morin et al. (2010) com modificações. Para isso 30 mg de biomassa liofilizada foram colocadas dentro de tubos criogênicos e ressuspensa em 0,5 ml de tampão de lise (NaCl a 0,15M e EDTA a 0,1M), sendo os tubos invertidos suavemente por cinco segundos. Em seguida, a biomassa ressuspensa sofreu três ciclos de descongelamento e congelamento, alternando em congelamento em nitrogênio líquido (5 segundos de imersão) e descongelamento em banho maria a 37°C. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas por 10 min, à 8.000rpm e 24°C, sendo em seguida descartado o sobrenadante. Após o descarte do sobrenadante as células foram ressuspensas em 500 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8); em seguida foi adicionado 100 µL de lisozima à 50 mg/mL, e incubado por 30 min à 37°C.

Após a lise, acrescentou-se 5 µL de proteinase K, agitou suavemente por inversão e adicionou-se SDS à 2%, e incubado por 1h à 37°C.

Para se obter uma melhor pureza do DNA, adicionou-se na amostra 150 µL de NaCl à 5M e 0,1 v/v de CTAB à 10%, os tubos foram homogenizados levemente por inversão, em seguida foi incubado durante 10 min à 65°C. Depois desse procedimento, os ácidos nucleicos foram extraídos adicionando 1 v/v na proporção de 24:1 de clorofórmio:álcool isoamílico, sendo em seguida incubado em banho de gelo por 30 min e depois centrifugado por 10 min à 8000 rpm.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de eppendorf, acrescentou-se 0,6 volume de isopropanol e agitou suavemente por inversão até o DNA precipitar. Após esse procedimento, as amostras foram centrifugadas por 10 min à 15000 rpm à 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. As amostras foram novamente centrifugadas por 5 min à 15000 rpm à 4°C, depois da centrifugação foram submetidos ao fluxo para secagem, durante 20 min. Por fim, o pellet foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE com adição de 1 µL de RNase, incubou por 30 min à 37°C.

4.5.2 Quantificação e determinação da pureza do DNA

A quantificação e a determinação da pureza do DNA extraído foram acessadas por espectrofotometria usando o NanoDrop (marca Thermo Scientific, modelo 2000/2000c Spectrophotometers). As absorvâncias de 230, 260 e 280 nm foram medidas em 2µL de DNA da amostra. A concentração do DNA foi estimada por quantificações espectrofotométricas na absorvância de 260nm. A pureza total foi calculada pela taxa da absorvância de 260/230. Altos valores para ambas as taxas ($260/280 > 1.8$; $260/230 > 2$) foram aceitas como bom indicador da pureza do DNA. Em contraste, uma baixa razão de 260/280 destaca uma contaminação de proteína e/ou fenol dentro da amostra, enquanto que uma baixa razão de 260/230 irá indicar a presença de compostos orgânicos, tal como, fenolato tiocianatos, hidratos de carbono, sais no extrato (MANCHESTER, 1995).

4.5.3 Condições da PCR (= Polymerase Chain Reaction)

A amplificação do DNAr 16S da cepa D502Z foi realizada usando os iniciadores: (*forward*) **27** (5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAG-3') e (*reverse*) **907** (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') seguindo Nubel et al. (1997) e Amacher et al. (2013). A amplificação do DNA foi feita em volume de 50µl usando o Mater Mix (promega), com 100ng de DNA (5µl da amostra diluída), 5µl de cada iniciador, 25µl do tampão de PCR 10x (1,5 mM MgCl₂) e 10µl. de água Milli-Q. A amplificação do gene DNAr 16S foi realizada em um termociclador (marca Biocycler, modelo MGL96G) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 15 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e trinta segundos. Sendo feito um segundo ciclo de 15x, com as seguintes condições: anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e trinta segundos e extensão final a 72°C por 10 min. A homogeneidade dos produtos de PCR será verificada em gel de agarose 0,8% (80V, 80A), corado com Gelred Nucleic Acid Gel Stain 10.000x (1µg/ml), utilizando como marcador de peso molecular o Ladder 100pb (marca Ludwig Biotec).

4.6 POTENCIAL DO EXTRATO DAS CIANOBACTÉRIAS PARA AVALIAR ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA*

4.6.1 Obtenção dos extratos

O extrato bruto de cada uma das cepas das cianobactérias selecionadas para a pesquisa foi obtido conforme o método descrito em Niedermeyer et al. (2014) com modificações. Para isso, 50g de biomassa seca liofilizada de cada cepa foi colocado dentro de erlenmeyer de 1L e ressuspendido com 750mL de solução de MeOH:H₂O (metanol:água) a 50%, sendo a amostra sonicada em 3 ciclos de 30 minutos em banho de ultrassom (Sanders medical, SoniClean6) e extraídas em agitador magnético de bancada (Solab, SL - 91) por 2 horas e 30 minutos e deixado decantar overnight. Após decantação, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novo erlenmeyer de 1L e reservado. O pellet restante foi ré-extraído em 750mL de solução de MeOH:H₂O a 80%, e novamente sonicado em 3 ciclos de 30 minutos em banho de ultrassom (Sanders

medical, SoniClean6) e extraído em um agitador magnético de bancada (Solab, SL – 91) durante 2 horas e 30 minutos e deixado decantar. Após decantação, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para dentro do erlenmeyer do primeiro sobrenadante e o pellet foi descartado. Em seguida o conjunto do sobrenadante de cada cepa estudada foi filtrado à vácuo, secado à vácuo (para a cepa D39Z) e, para as cepas D112Z e D502Z, ele foi liofilizado em um liofilizador (Terroni, LD1500).

4.6.2 Ensaio de lise de glóbulos vermelhos

Foi realizada a coleta de sangue por punção de indivíduos voluntários adultos saudáveis (n=3). Utilizando material estéril adquirido comercialmente (agulhas e seringas BD Plastipak® – BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e colhidos em tubos a vácuo (Greiner bione, Vacuette, Americana, SP, Brasil) contendo solução anticoagulante EDTA (Etilenodiamino Tetra-Acético). Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias. Foram realizadas diluições dos extratos obtendo as concentrações de 3,12 µg/mL, 6,25µg/mL, 12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL, 100,µg/mL, 200µg/mL,400µg/mL. Em seguida foram adicionados os extratos em concentrações pré-estabelecidas diluídos em um volume de 20 µL de PBS (Tampão Fostato Salino).Em seguida, foram incubados durante 1 h a 37°C e a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de PBS. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 1000rpm, por 10 min. a temperatura ambiente e o sobrenadante foram coletados e transferidos para placas de 96 poços e mensurado em leitora de microplaca (550 nm). A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril (lise por choque hipotônico), respectivamente (JAIN et al., 2015).

4.6.3 Determinação de atividade anti-*Leishmania* pelo método do MTT

O teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT – Amresco, Ohio, EUA), foi utilizado para analisar a atividade anti-*Leishmania* dos extratos sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* na quantidade de 1×10^6 *Leishmanias* por poço, os parasitos foram cultivados em placas de cultivo celular com

96 poços contendo 50µL de meio Schneider® pH 7,00 suplementado a 20% de SFB(Soro Bovino Fetal), 2% de urina estéril humana e 1% de antibiótico (penicilina 200U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL). As formas promatigostas dos parasitos foram então expostas às concentrações pré-estabelecidas dos extratos e dos fármacos de referência. As placas foram incubadas em estufa B.O.D na temperatura de 26°C por 72 h. Ao final da incubação foram adicionados 10 µL de MTT diluído em PBS, atingindo uma concentração final de 5mg/mL e incubadas por mais 4 h. Em seguida foram adicionados 50 µL de uma solução de PBS a 10% de dodecil sulfato de sódio (DSS) e deixado *overnight* para completa dissolução do formazan. Por último, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Biotek modelo ELx800) a 570 nm. O controle negativo foi realizado com meio Schneider® e considerado como 100% de viabilidade dos parasitas (RODRIGUES et al., 2015).

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Os ensaios de produção de biomassa de todas as cepas selecionadas para estudo, revelaram que a cepa D502Z (cianobactéria não identificada) teve a maior taxa de divisão celular ($0,89\pm 0,23$), atingindo a fase exponencial do cultivo em oito dias, e a cepa D39Z (*Arthorspira platensis*) teve a menor ($0,33\pm 0,12$), muito embora a mesma atingiu a fase exponencial em apenas 4 dias (Tabela 2), isso demonstra o rápido crescimento da mesma em condições controladas de cultivo. A cepa em que se obteve a maior quantidade de biomassa foi a D39Z com 0,63g/L de cultivo, e as cepas D112Z (*Stanieria sp.*) e D502Z (cianobactéria não identificada) tiveram a menor com 0,60g/L de cultivo cada uma. Devido ao alto rendimento dos cultivos de todas as cepas estudadas, as mesmas se mostram eficientes para estudo de bioprospecção.

Tabela 2: Constante de crescimento k (divisões celulares/dia), duração da fase exponencial de cultivo (dias), rendimento em biomassa (g/L). (NI= Cianobactéria não identificada).

Código	k (d ⁻¹)	Duração da fase Log (dias)	Biomassa (g/L)
D39Z (<i>Arthorspira platensis</i>)	$0,33\pm 0,12$	4	0,63
D112Z (<i>Stanieria sp.</i>)	$0,71\pm 0,45$	6	0,60
D502Z (NI)	$0,89\pm 0,23$	8	0,60

Comparando os dados sobre constante de crescimento, tempo de duração da fase exponencial e com a *Arthorspira platensis* (cepa D39Z) com a literatura, observa-se uma similaridade nos dados, conforme dados apresentados por Varandas (2016).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE TOXICIDADE (MICROCISTINA/NODULARINA) DAS CIANOBACTÉRIAS SELECIONADAS ATRAVÉS DO TESTE ELISA

As análises dos níveis de microcistina/nodularina efetuadas nas cepas de cianobactérias selecionadas para estudo revelaram que nenhuma delas apresentou teste positivo para essas toxinas, visto que os valores obtidos foram abaixo do limite de detecção do kit (padrão 0,15), conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Concentração de microcistina/nodularina ($\mu\text{g.g}$ de células liofilizadas) das cepas de cianobactérias dulcícola selecionadas do banco de cultura do LARBIM/UFPB. (NI= Cianobactéria não identificada)

Amostras	Microcistina/Nodularina
Padrão 0,15	0,017
Cepa D39Z (<i>Arthrospira platensis</i>)	0,004
Cepa D112Z (<i>Stanieria sp.</i>)	0,013
Cepa D502Z (NI)	Não detectado

Não há relatos na literatura de estudos com a *Stanieria sp.* relacionados a cianotoxinas a não ser o trabalho de Santana (2019) que também constatou que esta espécie não mostra toxicidade para microcistina/nodularina. Este é o segundo relato da análise de microcistina nessa espécie e os dados obtidos convergem com a única fonte de comparação disponível.

A cianobactéria *Arthrospira platensis* (D39Z) estudada neste projeto apresenta filamentos lineares, conforme mostrado na figura 2A. Usualmente *A. Platensis* tem filamentos espiralados, sendo essa uma variação encontrada. Wu et al., (2005) consideram que fatores ambientais como radiação solar e temperatura podem acarretar mudanças morfológicas. A forma da célula não afeta, entretanto, a produção de microcistina cujos valores obtidos estiveram abaixo dos padrões de detecção. O fato de *A. platensis* não mostrar nenhuma toxicidade reforça o fato de que esta espécie é considerada um alimento seguro e nutritivo, sendo certificado pelo FDA (*Food and Drugs Administration*) como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), sendo mundialmente utilizada na indústria de alimentos.

5.3 ANÁLISE DOS METABÓLITOS PRIMÁRIOS DAS ESPÉCIES CULTIVADAS

Segundo os trabalhos de Rajeshwari; Rajashekhar (2011); Becker et al. (1994) e Hays et al. (2014) foi estabelecido que sob condições ideais de cultivo, as cianobactérias tendem a ser compostas de 10-30% de carboidrato, 40-79% de proteína, e 5-10% de lipídeo.

5.3.1 Análise de Carboidrato totais

As análises obtidas demonstraram diferenças nos teores de carboidrato entre as cepas estudadas, sendo que as cepas D502Z (cianobactéria não identificada) e D112Z (*Stanieria sp.*) apresentaram os maiores teores de carboidrato ($21,41 \pm 0,49\%$ e $18,85 \pm 0,30\%$, respectivamente) e dentro da faixa estabelecida na literatura, por outro lado a cepa D39Z (*A. platensis*) apresentou o menor teor de carboidrato ($7,94 \pm 0,86\%$), corroborando dados de outros autores (HUANG, 2006; DONATO, 2010; BARROS, 2016).

5.3.2 Análise de Proteínas hidrossolúveis

Em relação ao teor de proteína os resultados revelaram mais uma vez que as cepas D502Z (cianobactéria não identificada) e D112Z (*Stanieria sp.*) apresentaram os maiores teores desse metabólito primário ($50,69 \pm 1,02\%$ e $54,46 \pm 0,33\%$ respectivamente) e dentro da faixa estabelecida na literatura; por outro lado, a cepa D39Z (*A. platensis*) apresentou o menor teor ($12,32 \pm 0,38\%$). *A. platensis* é mundialmente reconhecida como uma espécie que apresenta altos valores de proteína, razão pela qual é muito utilizada na indústria de alimentos. Dados da literatura mostram, para esta espécie, valores de 48,25% a 60,68% (SASSI, 2016), 59,65% (DONATO et al., 2010), 62,43% (HUANG, 2006), evidenciando esses registros que a linhagem estudada nesta pesquisa pode ser uma variante da espécie com menor capacidade de síntese para este metabólito.

5.3.3 Análise de Lipídios totais

Em relação ao teor de lipídios totais todas as espécies estudadas apresentaram teores muito acima da faixa estabelecida na literatura, sendo assim consideradas como promissoras para aplicações biotecnológicas. Os dados revelaram que a linhagem D502Z (Cianobactéria não identificada) foi a que apresentou o maior teor de lipídios totais ($24,6 \pm 1,10\%$) e as cepas D112Z (*Stanieria sp.*) e D39Z (*A. platensis*) os menores ($22,70 \pm 1,05\%$ e $19,60 \pm 1,62\%$, respectivamente). Esses valores indicam que elas têm potencialidades para serem utilizadas na produção de biodiesel, por exemplo.

A análise da relação dos três metabólitos primários (carboidratos/proteínas/lipídios) revelou valores em torno de 96% para as linhagens D502Z (cianobactéria não identificada) e D112Z (*Stanieria sp.*), evidenciando baixa quantidade de resíduos minerais e baixa umidade nas células, enquanto que a somatória desses três metabólitos na espécie *Arthrospira platensis* (D39Z) foi de 39,86% de metabólitos primários, evidenciando que essa linhagem possui elevada quantidade de resíduos minerais e/ou umidade em sua composição centesimal (Tabela 4).

Tabela 4: Metabólitos primários das três linhagens de cianobactérias dulcícolas selecionadas do banco de cultura do LARBIM/UFPB. (NI= Cianobactéria não identificada)

Amostras	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Total (%)
D39Z (<i>A. platensis</i>)	7,94±0,86	12,32±0,38	19,60±1,62	39,86
D112Z (<i>Stanieria sp.</i>)	18,85±0,30	54,46±0,33	22,70±1,05	96,01
D502Z (NI)	21,41±0,49	50,69±1,02	24,6±1,10	96,70

Registros efetuados por Varandas (2016) para a mesma linhagem de *A. platensis* (D39Z) previamente identificada como *Plankthotrix isothrix*, mostraram valores similares para carboidrato 3,80% e lipídeo 22,70% na mesma condição de cultivo, porém os valores de proteína foram mais elevados por se tratarem de proteínas totais.

Não há relatos na literatura de estudos com a *Stanieria sp.* relacionada ao teor de metabólitos primários (carboidrato, proteína e lipídeo), a não ser o trabalho de Santana (2019), em que os dados obtidos foram 13,3% de carboidrato, 36,7% de proteína e 6% de lipídeo, muito inferiores aos obtidos neste trabalho.

5.4 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DA LINHAGEM DE CIANOACTÉRIA D502Z

A biomassa da linhagem de cianobactéria D502Z apresentou bom índice de pureza, tanto para a absorvância 260/280 que verifica a contaminação de proteínas e/ou fenol; como para absorvância 260/230 que verifica a possível contaminação por compostos orgânicos, a exemplo de fenolato, tiocinatos, hidratos de carbono, etc. (Tabela 1). Além disso, a concentração de DNA foi extremamente alta (6.554,5ng/μL), evidenciando uma necessidade de diluição da amostra para as subseqüentes etapas da

caracterização genômica (tabela 5), as quais se acham em andamento. Os dados aqui obtidos evidenciam a eficiência do protocolo utilizado para a extração do DNA.

Tabela 5: Resultado da extração do DNA 16S da linhagem de cianobactéria D502Z do Banco de Cultura do LARIM/UFPB. (NI= Cianobactéria não identificada)

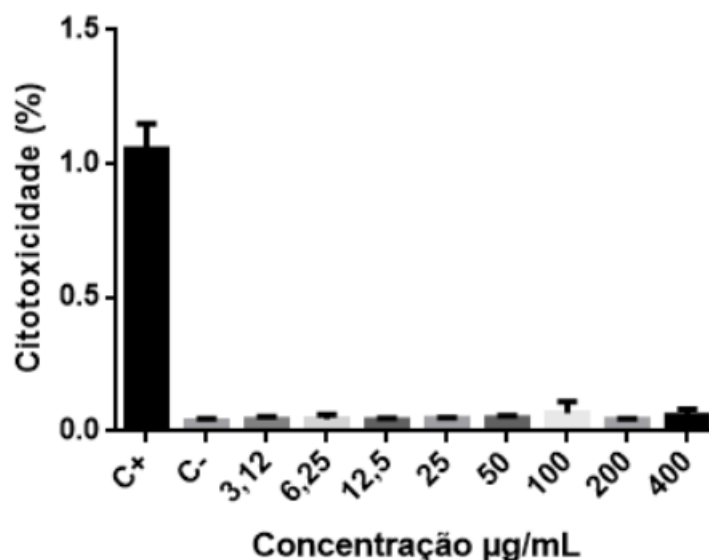
Amostra	Dosagem de DNA ng/μL	Grau de pureza	
		260/280	260/230
D502Z (NI)	6554,5	2,11	2,21

5.5 POTENCIAL DO EXTRATO DAS CIANOBACTÉRIAS PARA AVALIAR ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA

5.5.1 Citotoxicidade dos extratos

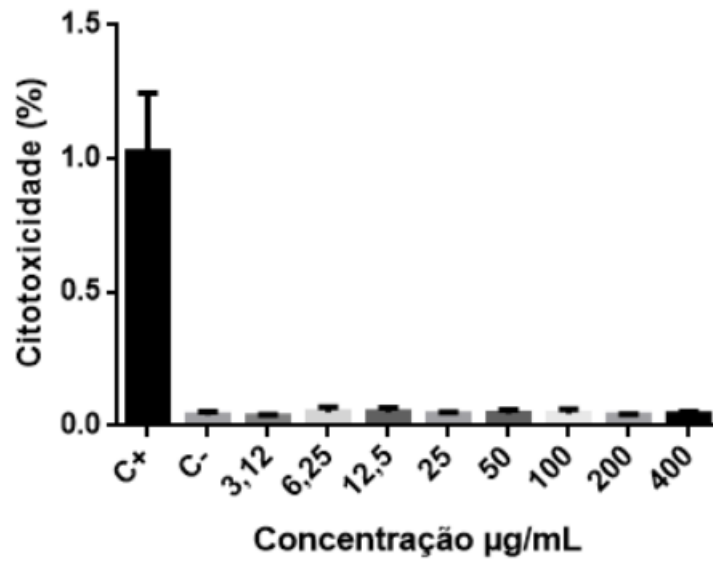
Nenhum extrato testado apresentou citotoxicidade aos sangues coletados, ou seja, os extratos não causam o rompimento da membrana das hemácias, fato que tornou os extratos aptos para serem testados contra *L. amazonensis*.

Gráfico 1- Resultado da citotoxicidade dos extratos frente aos sangues coletados

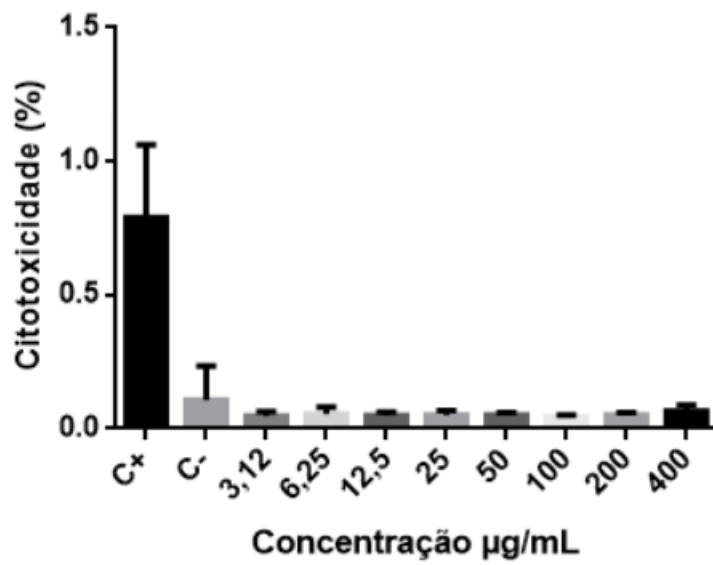


Legenda: Citotoxicidade do extrato da cepa D39Z.

C+ = controle positivo, C- = controle negativo



Legenda: Citotoxicidade do extrato da cepa D112Z



Legenda: Citotoxicidade do extrato da cepa D502Z

5.5.2 Atividade Anti-*Leishmania*

Os extratos não apresentaram atividade contra *L. amazonensis* em nenhum nível passível de ser mensurado. Sendo dados novos em relação as espécies *A. plantensis* e *Stanieria sp.* em que não há relatos anteriores de atividade anti-*Leishmania*, sendo o primeiro registro de atividade em *L. amazonensis*.

A espécie *A. platensis* possui uma vasta forma de aplicação, porém não apresentou atividade contra *L. amazonensis*, apesar de apresentar atividade contra outros microrganismos como, bactéria (*Staphylococcus aureus*), fungo (*Aspergillus fumigatus*) e leveduras (*Candida albicans* e *Candida parapsilosis*) conforme Santana (2019).

Os dados na literatura sobre *Stanieria sp.* é escasso e até então apenas Santana (2019) tem investigado a atividade biológica contra microrganismo, constatando a inibição do crescimento de bactéria (*S. aureus*), fungo (*A. fumigatus*) e levedura (*C. albicans*).

6 CONCLUSÃO

As cianobactérias sem dúvidas são uma promissora fonte de aplicações biotecnológicas devido a sua vasta gama de compostos bioativos, e trabalhos de bioprospecção de novas espécies para tais aplicações continuam sendo relevantes devido à grande quantidade de espécies existentes do grupo.

Apesar do potencial demonstrado na literatura sobre as cepas trabalhadas em relação a outros microrganismos, nenhuma delas apresentou atividade contra *L. amazonensis*.

Devido à ausência de toxina (microcistina/nodularina) e de citotoxicidade, essas cepas devem continuar sendo testadas em relação a outras atividades biológicas.

A caracterização genômica da linhagem D502Z revelou alta concentração de DNA, evidenciando a eficiência do protocolo utilizado para extração do seu DNA. O que agregará confiabilidade em relação a espécie trabalhada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABED, R. M. M. et al. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **J. Appl. Microbiol**, v.106, p.1-12, 2009.

AMBROSI, M. A. et al. Propriedades de saúde da microalga Spirulina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.2, p. 115-123, 2008.

ANANYA, A. K.; AHMAD, I. Z. Cyanobacteria" the blue green algae" and its novel applications: A brief review. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 7, n. 1, p. 251, 2014.

AZEVEDO, Sandra MFO et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441-446, 2002.

BARBOZA, G. F. et al. Microcystins production and antibacterial activity of cyanobacterial strains of Synechocystis, Synechococcus and Romeria from water and coral reef organisms (Brazil). **Revista de Biología Tropical**, v. 65, n. 3, p. 890-899, 2017.

BARROS, K. K. S. Produção de biomassa de Arthrospira platensis (Spirulina platensis) para alimentação. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Alimento da Universidade Federal da Paraíba**, 112p, 2016.

BECKER, E. W. Microalgae: biotechnology and microbiology. **Cambridge University Press, Cambridge**, 1994.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911–917, 1959.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde**. Brasília, 2ª edição, p. 180, 2007

BRONIATOWSKA, B. et al. Antiprotozoal, antitubercular and cytotoxic potential of cyanobacterial (blue-green algal) extracts from Ireland. **Natural product communications**, v. 6, n. 5, p. 1934578X1100600523, 2011.

BORGES, H. L. H. Z. et al. Cyanotoxin production and phylogeny of benthic cyanobacterial strains isolated from the northeast of Brazil. **Harmful Algae**, v.43, p.46-57, 2015.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911–917, 1959.

CARVALHO, F. S. et al. Leishmania (Viannia) braziliensis in dogs in Brazil: epidemiology, co-infection, and clinical aspects. **Genetics and Molecular Research**, v.14, p.12062-12073, 2015.

CAPONE, D. G. et al. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: an important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. **Global Biogeochem Cycles**, v.19, 2005.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v.270, p.64-7, 1994.

CARMICHAEL, W. W. et al. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental health perspectives**, v.109, n.7, p. 663-668, 2001.

CHAKRAVARTY, J; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 167, 2010.

CHORUS, I; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. **Lodon**, 1, 1999.

CHU, W. L. et al. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BCM Complementary and Alternative Medicine**, v.10, n.53, p.1472-6882, 2010.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1959- 1967, 2006.

DREW, S. W; A. L. DEMAIN. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. **Ann. Rev. Microbiol**, v.31, p.343-56, 1977.

DONATO, N. R. et al. Uso da *Spirulina platensis* na recuperação de ratos submetidos à dieta de restrição protéica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69:1, 2010.

DUBEY, S. K. et al. Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. **African journal of Biotechnology**, v. 10, n. 7, p. 1125-1132, 2011.

EL-BESTAWY, E. A. et al. Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 3, p. 180-192, 2007.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 18, n. 1, p. 1R-49R, 2001.

FELCZYKOWSKA, Agnieszka et al. Selective inhibition of cancer cells' proliferation by compounds included in extracts from Baltic Sea cyanobacteria. **Toxicon**, v. 108, p. 1-10, 2015.

GERWICK, L.; et al. Integrating chemical and biochemical approaches to natural products drug discovery from marine cyanobacteria, Proceedings from the New Developments in Drug Discovery on Natural Products and Traditional Medicines. **NIPER**, 33-43. 2008

- GURBUZ, F. et al. Occurrence of microcystins in water, bloom, sediment and fish from a public water supply. **Sci. Total Environ.** v.15, p.860–868, 2016.
- HAYS, S. G.; DUCAT, D. C. Engineering cyanobacteria as photosynthetic feedstock factories. **Photosynth Res**, 2014.
- HUANG, Z. et al. Chemical composition and selenium distribution in selenium-enriched *Spirulina platensis* biomass. **Chemistry of Natural Compounds**, v.42(6), p.636-640, 2006.
- JAIN, K. et al. Surface-engineered dendrimeric nanoconjugates for macrophage-targeted delivery of amphotericin B: formulation development, in vitro and in vivo evaluation. **Antimicrob Agents Chemother**, v.59, p.2479-87, 2015.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends Parasitol**, v.22, p.439-445, 2006.
- KOCHERT, G. Carbohydrate determination by phenol-sulfuric method. HILLEMBUST, J. A., CRAIGIE, J. S. (eds.). Handbook of physiological methods. **Physiological and biochemical methods**. Cambridge: Cambridge University, p.95-97, 1987.
- LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. **São Paulo: Rima**, 2006.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, p.265–275, 1951.
- MACHADO, M. M. Análise de diferentes cepas de Leishmania (*Leishmania*) amazonensis e *Leishmania* (*Viannia*) braziliensis quanto a infectividade/virulência e perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos murinos infectados. **Dissertação -Mestrado em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro**, 2014
- MANCHESTER, K. L. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. **Biotechniques**, v.19, p.208-210, 1995.
- MARKOU, Giorgos. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under various amounts of limited phosphorus. **Bioresour. Technol.** v. 116, p. 533-535, 2012.
- MARTIN, W. et al. Secondary loss of chloroplasts in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 3, p. 765-767, 2003.
- MILANO, J. et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.58, p.180–197, 2016.
- MORENO, I., et al., Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. **Toxicol.** Vol. 45, pp. 395-402. 2005

- MORIN, N. et al. An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. **Journal of Microbiological Methods**, v.80, p.148-154, 2010.
- NIEDERMEYER, T. H. J. et al. Isolation of microcystins from the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* strain No80. **Natural products and bioprospecting**, v. 4, n. 1, p. 37-45, 2014.
- NOWRUZI, B. et al. Nostoc cyanobacteria species: A new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. **Journal of Pharmaceutical Health Services Research**, v. 9, n. 1, p. 5-12, 2018.
- NÜBEL, U. et al. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3327-3332, 1997.
- PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**. v.69, p.10-18, 2014.
- PARMAR, A. et al. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10163-10172, 2011.
- PEDROSA, C. S. G. et al. The cyanobacterial saxitoxin exacerbates neural cell death and brain malformations induced by Zika virus. **bioRxiv**, p. 755066, 2019.
- PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of microalgae—a review. **J. Algal Biomass Util.** 3, 89–100, 2012.
- RAJESHWARI, K. R.; RAJASHEKHAR, M. Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from different aquatic habitats of Western Ghats, southern India. **Braz Arch Biol Technol**, v.54, n.5, p.849-857, 2011.
- RODRIGUES, K. A. F. *Syzygium cumini* (L.) skeels essential oil and its major constituent a-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **J. Ethnopharmacol**, v.160, p.32-40, 2015.
- SANCHES, S. M.; PRADO, E. L. DO; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F.; VIEIRA, E. M. Presença da toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.33, n.2, p.181-187, 2012.
- SANCHEZ, S; DEMAÏN, A. L. Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. **Microbial Biotechnology**, v.1, n.4, p.283-319, 2008.
- SANTANA, J. K. S. Bioprospecção de cianobactérias dulcícolas isoladas do semiárido. **Tese de Doutora do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba**. 2019.
- SANT'ANNA, C. L. et al. Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, n. 2, p. 213-227, 2004.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat. Rev. Immunol**, v.16, 2016.

SHERWANI, N. et al. Antibacterial and Antifungal Activities of Cyanobacterial Strains Isolated from Hot Springs in Oman. **Sultan Qaboos University Journal for Science [SQUJS]**, v. 20, n. 1, p. 11-19, 2015.

SILVA, B. J. M. et al. Physalis angulata induces death of promastigotes and amastigotes of Leishmania (Leishmania) amazonensis via the generation of reactive oxygen species. **Micron**, v.82, 2016.

SIMMONS, L. T. et al. Viridamides A and B, lipodepsipeptides with antiprotozoal activity from marine cyanobacterium. Oscillatoria Nigro Viridis. **J Nat Prod**, v.71, p.1544–1550, 2008.

SINGH, K. et al. Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. **Current Drug Metabolism**, v.17, p.1-23, 2016.

SINHA, R. P.; HADER, D. Uv-protectants in Cyanobacteria. **Plant Science**, v.174, p.278-289, 2008.

SIQUEIRA, D. B; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. **Universitas Ciências da Saúde** v03, n01, -109-127, 2008

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **J Biosci Bioeng**, v.101, p.89-96, 2006.

STEIN, J. R. Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. **Cambridge University Press**, 1973.

VIJAYAKUMAR, S.; MENAKHA, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria—A review. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15-23, 2015.

VARANDAS, R. C. R. FORMULAÇÃO DE RAÇÃO PARA JUVENIS DE Litopenaeus vannamei A PARTIR DE ESPÉCIES REGIONAIS DE MICROALGAS **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Alimento da Universidade Federal da Paraíba**. 75p, 2016.

WIJFFELS, René H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 26-31, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Leishmaniasis*. 2019a. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis/>. Acesso em: setembro de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Leishmaniasis*. 2019b. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/#>. Acesso em: setembro de 2019.

WU, Hongyan et al. Effects of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of filamentous cyanobacterium Arthrospira platensis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 9, p. 5004-5013, 2005.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques Sur la Croissance et la Photosynthèse de *Spirulina maxima*. **Ph.D. Thesis, Université De Paris, Paris.** 1966.

ZHAO, S. et al. A proteomic analysis of prenatal transfer of microcystin-LR induced neurotoxicity in rat offspring. **J. Proteome**, v.114, p.197–213, 2015.