

MESTRADO

TOXICOLOGIA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAIS

# Manipulação das condições de crescimento de cianobactérias para potencializar a produção de compostos de alto valor para o tratamento da obesidade

Sara Fidalgo Marques

M

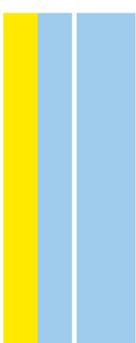
2021

Sara Fidalgo Marques. Manipulação das condições de crescimento de cianobactérias para potencializar a produção de compostos de alto valor para o tratamento da obesidade



Manipulação das condições de crescimento de cianobactérias para potencializar a produção de compostos de alto valor para o tratamento da obesidade

Sara Fidalgo Marques



Sara Fidalgo Marques

**Manipulação das condições de crescimento de cianobactérias  
para potencializar a produção de compostos de alto valor para o  
tratamento da obesidade**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador - Doutor Ralph Urbatzka

Categoria – Investigador Pós-Doutorado

Afiliação - CIIMAR, Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

Co-orientador - Professor Vítor Vasconcelos

Categoria - Professor Catedrático

Afiliação - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Categoria - Diretor

Afiliação - CIIMAR, Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

# Agradecimentos

Perto do fim de mais uma etapa importante na minha formação académica, só me resta agradecer a todas as pessoas que fizeram parte desta caminhada e me ajudaram a chegar até aqui.

Primeiramente ao meu orientador, Dr. Ralph Urbatzka, por acreditar e me orientar durante todo este ano, por todos os esforços feitos desde o início, todos os ensinamentos e o tempo despendido, e sem dúvida, por me dar a oportunidade de realizar o meu trabalho de dissertação no CIIMAR.

Ao Professor Vítor Vasconcelos por me ter aceite no laboratório Blue Biotechnology and Ecotoxicology (BBE) para que assim conseguisse realizar a minha dissertação, e por ter aceite ser co-orientador da mesma.

Ao Tiago, à Natália, ao Diogo, ao Flávio, à Sandra e à Catarina, agradeço por me acolherem e pela contínua disponibilidade em me auxiliar sempre que fosse necessário, por me terem orientado logo desde início e ensinado tudo o que precisava de saber em termos de prática laboratorial. Da mesma forma, agradeço ao grupo de alunos do Ralph, que se formou aos poucos, mas que no final se manteve muito forte, partilhando frustrações e sorrisos, o que tornou este ano um pouco mais fácil. Um agradecimento especial à minha colega de laboratório, Mariana, que foi muito importante durante este ano, tanto na vida pessoal como também no trabalho, uma pessoa que certamente irei levar para a vida.

Às minhas amigas mais próximas, especialmente Raquel e Alexandra, só me resta agradecer por esta amizade incrível e por todo o apoio que me deram durante este ano, que sem dúvida que foi um dos mais desafiantes e difíceis de toda a minha vida.

À minha família, especialmente aos meus pais, agradeço todo o amor, suporte e todo o apoio a cada passo que dou, pois mostram-me que serei sempre capaz de realizar tudo o que me comprometo a fazer. Por fazerem o seu melhor para permitir que eu desenvolva o meu ser pessoal e profissional da melhor maneira possível.

Ao projeto ATLANTIDA (ref. NORTE-01-0145-FEDER-000040) pelo financiamento deste trabalho, apoiado pelo Programa Operacional Regional do Norte de Portugal (NORTE 2020), no âmbito do Acordo de Parceria PORTUGAL 2020 e através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (ERDF).

# Abstract

Obesity is one of the main threats to human health, causing more than 4 million deaths per year worldwide, in addition to being strongly associated with other pathologies. Currently, as an alternative to drugs on the market, research has focused on discovering products of natural origin for the treatment of diseases. Natural compounds have shown promising anti-obesity properties, and cyanobacteria are considered a source of these compounds, called secondary metabolites, with biological activity.

In this work, *Cyanobium* sp. LEGE06097, a cyanobacterium with previously described anti-obesity activity, was exposed to various light and temperature conditions and tested for lipid reduction activity using zebrafish larvae. An anti-obesity bioassay was also carried out with the same culture, but coming directly from the vivarium (BOGA), in order to analyze whether the growth conditions and/or the biomass extraction methods affected the production of metabolites. The objective was to discover the culture conditions that potentiated the anti-obesity activity and, consequently, the production of responsible metabolites. The metabolic profiles of extracts of interest were characterized by mass spectrometry (LC-MS/MS), and a molecular network was produced in order to compare active and non-active samples to identify unique metabolites.

The results of the light and temperature experiments suggested that the responsible metabolites are not synthesized under chosen stress conditions, but that the extraction methodology influenced the obtained results. The DM-B fraction, belonging to the culture of the strain LEGE06097 under BOGA conditions, from the extraction with dichloromethane and methanol, followed by the ABC fractionation, revealed significant antiobesity activity ( $p < 0.05$ ). In contrast, methanol extraction from the same cyanobacterial culture conditions did not result in anti-obesity activity. The molecular networks between both extraction methodologies allowed the putative identification of several MS/MS mass peaks, unique to the active sample. Some of those had matches in the mass spectrometry databases (1st analysis: 63,16% and 2nd: 35,71%), while others were unknown (1st analysis: 36,84% and 2nd: 64,29%) and could represent new molecules. Of all the compounds identified, only the compound Pheophytin A seemed to have a connection with anti-obesity activities, which could be the origin of the observed bioactivity, but any other of the identified compounds, even the unknown ones, could also be responsible for it. More experiments are needed to validate these results.

# Resumo

Atualmente, a obesidade é uma das principais ameaças à saúde humana, causando mais de 4 milhões de mortes por ano em todo o mundo, além disso, está fortemente associada a outras patologias. Como alternativa aos fármacos no mercado, a pesquisa tem-se focado na descoberta de produtos de origem natural para o tratamento de doenças. Compostos naturais têm mostrado propriedades promissoras anti-obesidade, sendo as cianobactérias consideradas uma fonte desses compostos, denominados metabolitos secundários, com atividade biológica.

Neste trabalho, *Cyanobium* sp. LEGE06097, uma cianobactéria com atividade anti-obesidade anteriormente descrita, foi exposta a várias condições de luz e temperatura, e testada para atividade redutora de lípidos, usando larvas de peixe-zebra. Também foi realizado um bioensaio anti-obesidade com a mesma cultura, mas proveniente diretamente do biotério (BOGA), a fim de analisar se as condições de crescimento e/ou os métodos de extração de biomassa afetavam a produção de metabolitos. O objetivo era descobrir as condições de cultura que potenciavam a atividade anti-obesidade e, conseqüentemente, os metabolitos responsáveis. Os perfis metabólicos dos extratos de interesse foram caracterizados por espectrometria de massa (LC-MS/MS), e redes moleculares foram produzidas com o intuito de comparar amostras ativas e não ativas para identificação de metabolitos únicos.

Os resultados das experiências da luz e temperatura sugeriram que os metabolitos responsáveis não foram sintetizados nas condições de stress escolhidas, mas que a metodologia de extração influenciou os resultados obtidos. A fração DM-B, pertencente à cultura da estirpe LEGE06097, com as condições do BOGA, proveniente da extração com diclorometano e metanol, seguida de fracionamento ABC, revelou atividade anti-obesidade significativa ( $p < 0,05$ ). Em contraste, a extração de metanol efetuada com as mesmas condições de cultura, não resultou em atividade anti-obesidade. Foram efetuadas duas redes moleculares que permitiram a identificação putativa de vários picos de massa MS/MS, exclusivos da amostra ativa. Alguns deles tinham correspondência nas bases de dados de espectrometria de massa (1ª análise: 63,16% e 2ª: 35,71%), enquanto outros eram desconhecidos (1ª análise: 36,84% e 2ª: 64,29%) e podiam representar novas moléculas. De todos os compostos identificados, apenas Pheophytin A pareceu ter ligação à atividade anti-obesidade, podendo estar na origem da bioatividade observada, sendo que qualquer outro dos compostos identificados, até os desconhecidos, também pode ser responsável pela mesma. Mais ensaios são necessários para validar estes resultados.

# Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Obesidade .....	1
1.1.1. Tecido adiposo .....	3
1.2. Estratégias de tratamento para obesidade e mecanismos de ação de drogas anti-obesidade.....	4
1.3. Compostos naturais com atividade anti-obesidade .....	6
1.4. Produtos naturais marinhos com atividade anti-obesidade .....	8
1.5. Cianobactérias como potencial fonte para o tratamento da obesidade .....	9
1.6. Organismos modelo fisiologicamente relevantes para o estudo da obesidade: Peixe-zebra.....	11
1.7. Objetivos .....	13
2. Materiais e Métodos .....	14
2.1. Crescimento, Cultura e Colheita de Cianobactérias.....	14
2.1.1. Manipulação das condições de cultura – Fotobiorreatores .....	15
2.2. Caracterização Bioquímica .....	17
2.2.1. Biomassa Seca.....	17
2.2.2. Conteúdo de Carboidratos.....	17
2.2.3. Conteúdo de Proteínas.....	18
2.2.4. Conteúdo de Lípidos.....	19
2.2.5. Pigmentos .....	19
2.3. Extração Orgânica .....	19
2.4. Fracionamento com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC.....	20
2.5. Fracionamento – ABC .....	21
2.6. Bioensaio do metabolismo lipídico com peixe-zebra corados com Vermelho de Nilo.....	22
2.7. Análise Estatística .....	23
2.8. Perfil do Metabolito .....	24

<b>2.8.1.</b>	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS/MS).....	24
<b>2.8.2.</b>	Redes Moleculares e Análise Metabolómica .....	24
<b>3.</b>	Resultados.....	26
<b>3.1.</b>	Experiência da Luz .....	26
<b>3.1.1.</b>	Biomassa Liofilizada .....	26
<b>3.1.2.</b>	Biomassa Seca.....	26
<b>3.1.3.</b>	Conteúdo de Proteínas.....	27
<b>3.1.4.</b>	Conteúdo de Lípidos.....	27
<b>3.1.5.</b>	Pigmentos .....	28
<b>3.1.6.</b>	Bioensaio em Peixes-Zebra – Experiência da Luz.....	30
<b>3.2.</b>	Bioensaio em Peixe-Zebra: Condições do BOGA.....	32
<b>3.3.</b>	Experiência das diferentes temperaturas.....	34
<b>3.3.1.</b>	Biomassa Liofilizada .....	34
<b>3.3.2.</b>	Biomassa Seca.....	35
<b>3.3.3.</b>	Conteúdo de Proteínas.....	35
<b>3.3.4.</b>	Conteúdo de Carboidratos.....	35
<b>3.3.5.</b>	Conteúdo de Lípidos.....	36
<b>3.3.6.</b>	Pigmentos .....	36
<b>3.3.7.</b>	Bioensaio em Peixes-Zebra - Experiência da Temperatura .....	38
<b>3.4.</b>	Perfil do Metabolito .....	40
<b>3.4.1.</b>	1ª Análise .....	41
<b>3.4.2.</b>	2ª Análise .....	42
<b>4.</b>	Discussão.....	45
<b>5.</b>	Conclusão.....	57
	Referências .....	58
	Anexos .....	79

# Índice de Figuras

<b>Figura 1-</b> Imagem representativa da expansão do tecido adiposo por hiperplasia e hipertrofia.....	3
<b>Figura 2-</b> Fotobiorreatores utilizados no ensaio (sistema Algem®, Algenuity) .....	15
<b>Figura 3-</b> Software programável do sistema Algem®, Algenuity.....	15
<b>Figura 4-</b> Esquema de montagem do sistema de fracionamento ABC. ....	22
<b>Figura 5-</b> Biomassa liofilizada e biomassa seca obtidas para cada condição na experiência da luz. Os valores são expressos em g de biomassa liofilizada / L de cultura (n = 1) e em g biomassa seca / L cultura (n = 3).As diferenças significativas entre grupos foram analisadas pela One-Way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Dunnet's. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes (p< 0.05). ....	27
<b>Figura 6-</b> Conteúdo de proteína e conteúdo de lípidos obtidos para cada condição na experiência da luz. Os valores do conteúdo de lípidos são expressos em unidades de intensidade de fluorescência (UFI) / g de biomassa seca (n=3). As diferenças significativas foram analisadas por Kruskal-Wallis através do teste de comparação múltipla de Dunn. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes (p< 0.05). ....	28
<b>Figura 7-</b> Conteúdo de pigmentos (Clorofila A, Clorofila B e Carotenoides) obtido para cada condição na experiência da luz. Os valores são expressos na unidade Abs 652 nm / g de biomassa seca. Cada condição com 3 réplicas (n = 3). As diferenças entre grupos foram analisadas pela One-Way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Dunnet's. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes (p < 0.05). ....	29
<b>Figura 8-</b> Atividade anti-obesidade observada em peixes-zebra corados com Vermelho de Nilo – ensaio dos diferentes tipos de luz (10 µg/mL). O controlo solvente tinha 0,1% de DMSO e o controlo positivo 50 µM de REV. Os valores foram expressos como intensidade média de fluorescência (MFI) em relação ao grupo DMSO. Cada grupo de tratamento tinha 6 a 8 réplicas (n = 6-8). As diferenças estatísticas foram analisadas por Kruskal-Wallis com teste posthoc de Dunn e foram indicadas comparativamente ao controlo solvente, com o símbolos * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001. ....	31
<b>Figura 9-</b> Imagens representativas do bioensaio do metabolismo lipídico com peixe-zebra corados com Vermelho de Nilo – ensaio dos diferentes tipos de luz (10 µg / mL). Imagem <b>A</b> representa o controlo solvente do ensaio, DMSO (0,1%), a <b>B</b> representa o controlo positivo, REV (50 µM), a <b>C</b> representa a fração 2B-F (10 µg / mL) e a <b>D</b> representa a fração 3B-B (10 µg / mL). À esquerda estão representadas as imagens que mostram a fluorescência com contraste vermelho, e à direita as imagens de contraste de fase de larvas de peixe-zebra. ....	31

<b>Figura 10-</b> Atividade anti-obesidade com peixes-zebra corados com Vermelho de Nilo-ensaio das culturas com as condições do BOGA (25 µg / mL). O controlo solvente tinha 0,1% de DMSO e o controlo positivo 50 µM de REV. Os valores foram expressos como intensidade média de fluorescência (MFI) em relação ao grupo DMSO. Cada grupo de tratamento tinha 6 a 8 réplicas (n = 6-8). Os dados foram representados com diagramas de caixa. As diferenças estatísticas foram analisadas por Kruskal-Wallis com teste posthoc de Dunn e foram indicadas comparativamente ao controlo solvente, com o símbolos * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p <0,0001.....	33
<b>Figura 11-</b> Imagens representativas do ensaio do metabolismo lipídico com peixes-zebra corados com Vermelho de Nilo – Condições BOGA. Imagem <b>A</b> representa o controlo solvente do ensaio, DMSO (0,1%) , a <b>B</b> representa o controlo positivo, REV (50 µM) e a <b>C</b> representa a fração DM-B (fração B da extração com diclorometano e metanol) a 25 µg/mL, que possui diferenças significativas em relação ao controlo. À esquerda estão representadas as imagens da fluorescência com contraste vermelho, e à direita as imagens de contraste de fase de larvas de peixe-zebra.....	34
<b>Figura 12-</b> Biomassa liofilizada e biomassa seca obtidas para cada condição na experiência da temperatura. Os valores são expressos em g de biomassa liofilizada / L de cultura (n = 1) e g biomassa seca / L cultura (n=3). As diferenças significativas entre grupos foram analisadas pela One-Way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Dunnet´s. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes (p < 0.05). .....	35
<b>Figura 13-</b> Conteúdo de proteínas, carboidratos e lípidos, obtidos para cada condição na experiência da temperatura. Os valores são expressos em g proteína / g biomassa seca, g hidratos de carbono / g biomassa seca e em unidade de intensidade de fluorescência (UFI) / g biomassa seca (n 3).Os dados foram apresentados em gráficos de barras com desvio padrão. As diferenças significativas do conteúdo de proteínas e carboidratos foram analisadas pela One-Way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Dunnet´s e do conteúdo de lípidos foram analisadas por Kruskal-Wallis através do teste de comparação múltipla de Dunn. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes.....	36
<b>Figura 14-</b> Conteúdo de pigmentos (Clorofila A, Clorofila B e Carotenoides), obtidos para cada condição da experiência da temperatura. Os valores são expressos em unidade Abs 652 nm / g de biomassa seca para Clorofila A, unidade Abs 665 nm / g de biomassa seca para Clorofila B e Unidade Abs 470 nm / g de biomassa seca para Carotenóides (n =3). As diferenças entre grupos foram analisadas pela One-Way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Dunnet´s. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes (p < 0.05). .....	37

**Figura 15-** Atividade redutora de lípidos no ensaio metabolismo lipídico com peixe-zebra corados com Vermelho de Nilo- ensaio de exposição da estirpe LEGE06097 crescida a diferentes temperaturas (25 µg / mL). O controlo solvente tinha 0,1% de DMSO e o controlo positivo 50 µM de REV. Os valores foram expressos como intensidade média de fluorescência (MFI) em relação ao grupo DMSO. Cada grupo de tratamento tinha 10-12 réplicas (n = 10-12). As diferenças estatísticas foram analisadas por Kruskal-Wallis com teste posthoc de Dunn e foram indicadas comparativamente ao controlo solvente, com o símbolos \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001. ....39

**Figura 16-** Imagens representativas do ensaio do metabolismo lipídico com peixe-zebra corados com Vermelho de Nilo – Ensaio da exposição das culturas a diferentes temperaturas. **A** representa o controlo solvente do ensaio, DMSO (0,1%) , **B** representa o controlo positivo, REV (50 µM), **C** representa a fração 1B-B (fração B, a 14°C) e **D** representa a fração 3A-A (fração A, a 26°C), ambas a uma concentração de 25 µg/mL, que não apresentaram diferenças significativas em relação ao controlo. À esquerda estão representadas as imagens da fluorescência com contraste vermelho, e à direita as imagens de contraste de fase de larvas de peixe-zebra.....39

**Figura 17-** Rede molecular das frações B BOGA (Extração com DM:MeOH vs extração com MeOH) obtida pela plataforma GNPS e visualizada com o programa Cytoscape. A azul-claro está representada a fração ativa (fração B DM:MeOH), a vermelho está apresentada a fração não ativa (fração B MeOH) e a cinzento está representado o branco da análise. ....41

**Figura 18-** Rede molecular dos extratos brutos BOGA (Extração com diclorometano e metanol vs extração metanólica) obtida pela plataforma GNPS e visualizada com o programa cytoscape. A azul-claro está representada a fração ativa (extrato bruto DM:M), a vermelho está apresentada a fração não ativa (extrato bruto MeOH) e a cinzento está representado o branco da análise.....42

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Visão geral dos resultados obtidos para a caracterização bioquímica da experiência da luz: + representa aumento, - representa diminuição.....	30
<b>Tabela 2-</b> Atividade redutora de lípidos de todas as frações estudadas, de ambas as extrações ( DM: M e M), obtidas através das culturas com as condições do BOGA, com a média e desvio padrão (SD) apresentados. ....	33
<b>Tabela 3-</b> Visão geral dos resultados obtidos para a caracterização bioquímica da experiência da temperatura: + representa aumento, - representa diminuição. ....	38
<b>Tabela 4-</b> Tabela representativa dos compostos únicos identificados através da segunda análise molecular, no Cytoscape. Compostos esses pertencentes exclusivamente ao extrato bruto com as condições BOGA, extraído com diclorometano e metanol. Na tabela estão representados os compostos identificados, e também os não identificados (moléculas novas).....	44
<b>Tabela 5-</b> Compostos únicos identificados através da primeira análise molecular, no Cytoscape. Compostos esses pertencentes exclusivamente à fração B extraída com diclorometano (DM) e metanol (M), com as condições BOGA. Na tabela estão representados os compostos identificados, e também os não identificados (moléculas novas).....	79

# Lista de Abreviações

**BBE:** Blue Biotechnology and Ecotoxicology

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PIB:** Produto Interno Bruto

**DCNT:** Doenças crônicas não-transmissíveis

**TAB:** Tecido adiposo branco

**TAM:** Tecido adiposo castanho

**EMA:** Agência europeia de medicamentos

**FDA:** Administração de alimentos e medicamentos

**CIIMAR:** Centro interdisciplinar de investigação marinha e ambiental

**MeOH:** Metanol

**DPF:** Dias pós fertilização

**MS-222:** Tricaína metano sulfonato

**MFI:** Intensidade média de fluorescência

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**HPLC:** Cromatografia líquida de alta eficiência

**LC-MS:** Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

**FIMT:** Tolerância de massa do íon do fragmento

**MMP11:** Inibidor de estromelisinase

**BSA:** Albumina de soro bovino

**ATP:** Adenosina trifosfato

**NADP:** Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

**DNP:** Dicionário de produtos naturais

**DCM:** Diclorometano

**GNPS:** Rede global molecular social de produtos naturais

**LED:** Diodo emissor de luz

**OD:** Densidade ótica

**TAG:** Triacilglicerol

**PIMT:** Tolerância de massa de iões precursores

**PTU:** Feniltiourea

**REV:** Resveratrol

**ppm:** Partes por milhão

**PSII:** Fotossistema II

**RIPA:** Ensaio de radioimunoprecipitação

**ROS:** Espécies reativas de oxigénio

**UFI:** Unidade de intensidade de fluorescência

**GluTR:** Glutamil-tRNA redutase

**GSA-AT:** Glutamato 1-semialdeído aminotransferase

# Índice de Anexos

<b>Anexo I-</b> Tabela (5) onde estão representados todos os compostos possíveis pertencentes aos principais picos encontrados na análise metabolómica da fração B com as condições do BOGA (extraída com DM:M).....	79
--	----

# 1. Introdução

A introdução deste trabalho irá focar-se principalmente na problemática da obesidade em todo o mundo e o potencial dos microrganismos, em particular das cianobactérias, para produzir compostos secundários naturais que podem ajudar na superação ou no melhoramento desta doença crónica.

## 1.1. Obesidade

A obesidade é considerada uma epidemia mundial, visando não só os adultos, mas também os mais jovens. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), até 2016, existiam 1,9 biliões de adultos com excesso de peso, dos quais 650 milhões eram obesos (39% e 13% da população mundial, respetivamente). O excesso de peso também afeta a população mais jovem, sendo que, em 2020, 39 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade apresentavam excesso de peso ou eram obesas (World Health Organization, 2021). Esta doença afeta mais de 28% da população portuguesa, além de que quase 40% da população apresenta excesso peso (Gaio et al., 2018). Também apresenta consequências económicas, sendo que em Portugal a obesidade e as suas comorbidades foram estimadas em mais de 199 milhões de euros num único ano, e o impacto económico global da obesidade foi estimado em 2,0 triliões de dólares, o que representa quase 3% do produto interno bruto (PIB) global (Pereira e Mateus, 2003; Tremmel et al., 2017). A obesidade pode ser definida como uma doença metabólica complexa, caracterizada por um acúmulo anormal ou excessivo de gordura nos adipócitos, seja pelo aumento em número (hiperplasia) ou pelo aumento do tamanho (hipertrofia) dos mesmos. Estas células são importantes reguladores do metabolismo e da homeostase de todo o corpo, produzindo hormonas como a adiponectina, que regula o metabolismo da glicose e dos lípidos, ou como a leptina que regula a ingestão de alimentos e a energia (Castro et al., 2016).

Um indivíduo é considerado com excesso de peso, se tiver um índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 25 kg/m<sup>2</sup>, obeso com um IMC igual ou superior a 30 kg/m<sup>2</sup> e obeso mórbido caso tenha um IMC superior a 40 kg/m<sup>2</sup> (Mitchell et al., 2011).

A obesidade é uma das doenças que integra o grupo de doenças crónicas não-transmissíveis (DCNT). As DCNT podem ser caracterizadas como doenças com história natural prolongada, múltiplos fatores de risco complexos, interação de fatores etiológicos desconhecidos, causa desconhecida, presença ou ausência de microrganismos entre os determinantes da doença, longo período de latência, longo período assintomático, manifestações clínicas com períodos de alívio momentâneo dos sintomas e posterior

agravamento dos mesmos, lesões celulares irreversíveis e evolução para diferentes graus de incapacidade ou até levar à morte (Pinheiro et al., 2004).

Nos mamíferos, existem dois tipos principais de gorduras que compõem o tecido adiposo: os adipócitos brancos, responsáveis pelo armazenamento de energia, e os adipócitos castanhos, responsáveis pela termorregulação, permitindo a manutenção da temperatura corporal. Segundo Castro et al., 2016, a obesidade é uma doença inflamatória crónica, caracterizada pela existência de uma acumulação anormal de adipócitos, em particular hiperplasia, o que se torna um sério risco para a saúde, uma vez que estes têm muitos outros papéis essenciais no organismo, tais como respostas imunitárias, regulação endócrina, lactação e fornecimento de energia. Portanto, várias doenças crónicas são consequência direta da obesidade, tais como hipertensão, problemas respiratórios e cardiovasculares, diabetes (Diabetes Mellitus Tipo 2 – DMT2), apneia do sono, dislipidemia, perturbações músculo-esqueléticas e, por fim, alguns tipos de cancro (Kang e Park, 2012; Rodgers et al., 2012; Hruby e Hu, 2015; Daneschvar et al., 2016). Segundo a Associação Americana de Diabetes, cerca de 90% dos casos de DMT2 resultam de peso corporal excessivo, facto pelo qual as sociedades profissionais recomendam a perda de peso como peça-chave inicial no tratamento de doentes com DMT2 obesos ou com excesso de peso. Além disso, verifica-se um aumento de cinco a seis vezes de casos de hipertensão em indivíduos obesos, comparando com o número de casos nos indivíduos com peso normal (Stamler et al., 1978).

Assim, a obesidade é uma perturbação metabólica extremamente complexa que ocorre devido a um balanço energético positivo entre o consumo calórico elevado e o baixo consumo de energia (González-Muniesa et al., 2017). No entanto, a obesidade não ocorre apenas devido a um distúrbio alimentar ou a um estilo de vida sedentário, mas pode, de facto, ser influenciada por vários outros aspetos, tais como fatores biológicos, ambientais, de desenvolvimento, socioeconómicos e genéticos (Blüher, 2019; González-Muniesa et al., 2017; Hruby e Hu, 2015; Srivastava e Apovian, 2018).

Esta doença ganhou uma maior importância nos últimos anos à medida que os números estão a crescer e a solução parece estar longe de ser alcançada. Nenhuma outra tentativa feita, quer através de dieta, cirurgia ou mesmo medicamentos, está a obter resultados na resolução desta ameaça à saúde, de forma permanente e saudável, apesar dos esforços feitos pela comunidade médica e organizações privadas e governamentais (Urbatzka et al., 2018). Sendo que é bom salientar que a melhor solução para o combate a esta doença seria a mudança prévia nos hábitos alimentares e no estilo de vida, tendo uma alimentação mais saudável, auxiliada pela prática de exercício físico regular. Portanto, até hoje, nenhuma cura fácil, rápida e única foi encontrada.

### 1.1.1. Tecido adiposo

O tecido adiposo dos humanos é subdividido em tecido adiposo branco (TAB) e castanho (TAM). O TAB, localizado periféricamente nas regiões subcutânea e visceral, armazena energia sob a forma de triglicerídeos e participa na regulação do balanço energético mediante processos de lipogénese e lipólise. O TAM, que pode estar localizado em diversas regiões do corpo apresenta função termogénica, é mais vascularizado, possui maior número de mitocôndrias e diminui com a idade (Leite et al., 2009).

O tecido adiposo passa por um processo de remodelação continuamente dinâmico que mantém a saúde do tecido e permite a adaptação às alterações no aporte de nutrientes. Este processo no estado obeso é acelerado patologicamente a uma capacidade quase ilimitada de expansão do tecido, por hiperplasia ou hipertrofia. Esta expansão pode levar a diversos efeitos, incluindo redução da remodelação angiogénica (hipoxia), superprodução da matriz extracelular, infiltração de células imunes e subseqüentes respostas inflamatórias, caracterizando disfunção do tecido adiposo. Deste modo, a obesidade pode transformar uma mera estratégia adaptativa numa síndrome metabólica, que consiste numa agregação de fatores de risco cardiovasculares representada por hipertensão arterial, obesidade abdominal, hipertrigliceridemia, baixa concentração de lipoproteínas de alta densidade e intolerância à glicose, dando origem às chamadas comorbidades associadas à obesidade, já revisadas em vários artigos (Gustafson et al., 2013; Lee et al., 2010; Sun et al., 2011).



**Figura 1-** Imagem representativa da expansão do tecido adiposo por hiperplasia e hipertrofia (adaptado de flores et al.,2011)

## 1.2. Estratégias de tratamento para obesidade e mecanismos de ação de drogas anti-obesidade

Estratégias complementares são cada vez mais necessárias para a superação desta problemática que é a obesidade, além de todas as ações já existentes para minimizar as complicações associadas, que hoje se centram praticamente no tratamento cirúrgico e farmacológico.

Embora ultimamente se tenha observado uma mudança gradual no estilo de vida da população, tal como nos seus hábitos alimentares, e no aumento da atividade física, tudo isto não combate a doença, apenas pode ajudar na sua prevenção. Em casos mais urgentes tem sido realizada a cirurgia bariátrica, o que não tem sido suficiente para tratar a obesidade e as comorbidades associadas (Jakobsen et al., 2018). A cirurgia bariátrica deve ser considerada adequada para adultos obesos mórbidos, uma vez que as complicações cirúrgicas ou a necessidade de reoperação são bastante frequentes. Estas intervenções são comprovadamente eficazes para a perda de peso e melhora das comorbidades nesses casos e, por consequência, na qualidade de vida e mortalidade geral (Kang e Park, 2012). Por outro lado, a farmacoterapia geralmente é aplicada em pacientes obesos para reduzir os riscos à saúde relacionados à obesidade e também para melhorar a qualidade de vida, seja visando o consumo ou a absorção de alimentos (Rodgers et al., 2012; Yumuk et al., 2015). No entanto, os medicamentos anti-obesidade existentes são considerados um tratamento complementar, pois o seu sucesso a longo prazo é limitado. Muitos efeitos colaterais adversos já se observaram e, uma vez que o medicamento é interrompido, existe uma forte possibilidade de recuperar o peso (Kang e Park, 2012). A terapêutica farmacológica foi proposta como um adjuvante à dieta e às mudanças no estilo de vida, de forma a melhorar a manutenção da perda de peso (Cannon e Kumar, 2009).

Os medicamentos anti-obesidade podem ser divididos em quatro grupos, dependendo do mecanismo de ação destes. Podem ser medicamentos que suprimem o apetite, medicamentos que aumentam a sensibilidade à insulina, medicamentos que visam co-transportadores de sódio/glicose e medicamentos que diminuem a absorção de lípidos (Castro et al., 2016).

No entanto, a principal questão quando se fala em medicamentos anti-obesidade, são os possíveis efeitos colaterais que podem ser problemáticos e perigosos, e por isso as principais agências reguladoras, EMA (Agência Europeia de Medicamentos) e FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos), retiraram a maioria do mercado (Daneschvar et al., 2016; Kang e Park, 2012; Rodgers et al., 2012; Yumuk et al., 2015). No que se refere ao tratamento farmacológico da obesidade, até ao ano de 2016, apenas cinco medicamentos foram aprovados pela FDA, incluindo três deles pela EMA (Daneschvar et

al., 2016). Os medicamentos aprovados por ambas as agências foram a combinação de bupropiona/naltrexona, orlistat e liraglutida (Yumuk et al., 2015).

A combinação de naltrexona com bupropiona culminou em diversas vantagens, sendo assim aceita tanto pela FDA quanto pela EMA (Kang e Park, 2012), sendo que também já foram aprovadas separadamente para outros tipos de tratamentos clínicos. No entanto, apesar do modo de ação destes medicamentos ainda não ser totalmente compreendido, e de já terem apresentado diversos efeitos colaterais tais como náuseas, dores de cabeça, tonturas, podendo até ter possíveis efeitos no coração e vasos sanguíneos e aumentar o risco de convulsões, estes foram aprovados pela EMA em 2015 (Kang e Park, 2012; Srivastava e Apovian, 2018; Yumuk et al., 2015). No caso dos medicamentos que diminuem a absorção de lípidos, por meio da inibição das lipases, a absorção gastrointestinal de lípidos será diminuída, pois a hidrólise dos triglicerídeos da dieta será evitada. Consequentemente, as gorduras serão excretadas inalteradas em vez de serem alteradas na forma de ácidos gordos e monoglicerídeos, que são posteriormente absorvidos pelos enterócitos (Costa et al., 2009). Por este motivo, inibidores de lipase já têm sido utilizados como agentes anti-obesidade, como é o caso do orlistat, que é uma droga sintética derivada da lipstatina, um produto natural isolado da bactéria *Streptomyces toxytricini* (Castro et al., 2016). Este medicamento anti-obesidade aprovado, é um inibidor potente e seletivo das lipases gástricas e pancreáticas. Previne a degradação dos lípidos da dieta, resultando na excreção de mais de 30% das gorduras ingeridas em ensaios clínicos. No entanto, embora o orlistat tenha sido aprovado pela EMA em 2006, já demonstrou poder gerar lesões renais agudas ocasionais, que podem ocorrer devido a distúrbios na absorção de gordura (Castro et al., 2016; Kang e Park, 2012; Yumuk et al., 2015). Por último, o liraglutido aumenta a insulina e suprime o glucagon para controlar o nível de açúcar no sangue, que é normalmente utilizado para controlar a diabetes. Este composto demonstrou resultar em perda de peso e foi aprovado pelo FDA em 2015. Alguns dos efeitos colaterais deste medicamento podem ser náuseas e pancreatites (Kang e Park, 2012; Srivastava e Apovian, 2018; Yumuk et al., 2015).

Apesar de alguns efeitos colaterais mais ameaçadores associados ao uso terapêutico destes fármacos para a perda de peso, eles foram aprovados devido à sua relação risco-benefício aceitável. No entanto, é crucial e urgente desenvolver medicamentos mais seguros como parte de uma estratégia abrangente para o controle desta doença.

Devido aos efeitos colaterais prejudiciais de muitos compostos, o potencial dos produtos naturais para serem usados como agentes anti-obesidade tem sido, mais recentemente, investigado para encontrar novas estratégias de desenvolvimento de medicamentos. No entanto, é importante não descuidar a complexidade desta doença

metabólica para criar nutracêuticos mais eficazes e seguros que possam combater a obesidade e suas comorbidades relacionadas (Costa-Lotufo et al., 2009).

### 1.3. Compostos naturais com atividade anti-obesidade

As novas estratégias de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos têm aumentado nos últimos anos e cada vez mais se centram em fármacos sintéticos ou baseados em produtos naturais. Muitos dos compostos naturais já estudados, demonstraram possuir atividades para a prevenção ou tratamento da obesidade e outras doenças como cancro e diabetes (Carrageta et al., 2018; Karri et al., 2019).

Os compostos naturais apresentam estruturas químicas interessantes, porém, tais compostos devem ser submetidos a testes toxicológicos, em laboratório, tal como os compostos sintéticos (Khan et al., 2019). A maioria dos compostos naturais com propriedades anti-obesidade descritos na literatura científica são fenóis ou polifenóis (Ojulari et al., 2019). Os polifenóis são compostos que possuem propriedades antioxidantes conhecidas e estão naturalmente presentes em plantas. São classificados como flavonoide, não flavonoide, ácido fenólico, flavonol, flavona, isoflavona, flavanona, antocianidina, flavanol e lignana (Ferreira, 2020) e a diferença entre eles está nas suas estruturas químicas, com a presença de um ou mais anéis aromáticos, ligados a um ou mais grupos hidroxila. Além de atuarem como antioxidantes, possuem ainda propriedades anti-inflamatórias, anti-cancerígenas, anti-envelhecimento e anti-obesidade (Link et al., 2010; Bakker et al., 2010). Os efeitos anti-obesidade dos polifenóis tem sido pesquisados, e estudos celulares *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os compostos polifenólicos reduzem a viabilidade dos adipócitos e a proliferação de pré-adipócitos, suprimem a diferenciação dos adipócitos e o acúmulo de triglicerídeos, estimulam a lipólise e a  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos, e reduzem a inflamação. Simultaneamente, os polifenóis modulam vias de sinalização que regulam a adipogênese (Wang et al., 2014). Alguns dos compostos fenólicos foram descritos como tendo propriedades anti-obesidade, por exemplo galato de epigallocatequina presente no chá verde, que promove um aumento da oxidação de ácidos gordos, estimulação da lipólise e melhora da termogênese (Arraes e Funchal, 2017) e a catequina que auxilia no aumento do gasto de energia e metabolismo, redução do peso e gordura corporal, aumento da oxidação lipídica, melhora da atividade insulínica e aumento da atividade do sistema nervoso simpático pela inibição de catecol-O-metil transferase, enzima responsável pela quebra de noradrenalina (Chen et al., 2009). Estudos realizados em ratos confirmaram os efeitos benéficos da epigallocatequina-3-galato (EGCG) ou do extrato de chá verde sobre parâmetros relacionados com a obesidade, incluindo redução do peso corporal, massa

adiposa, lípidos totais, colesterol e triglicerídeos no fígado e no plasma, além de redução da resistência à insulina (Jones et al., 2014; Tian et al., 2013) e resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados com humanos (Ueda e Ashida, 2012; Suliburska et al., 2012), sendo que o consumo de chá verde, nas formas de EGCG ou extrato de chá verde, com ou sem cafeína, por indivíduos obesos, reduziu o peso corporal, IMC, circunferência da cintura e do quadril, gordura corporal total e gordura abdominal visceral e subcutânea (Wang et al., 2014).

Pesquisas recentes também provaram que extratos brutos e compostos isolados como metabolitos secundários de diferentes fontes naturais, como plantas, cianobactérias, fungos ou fitoplâncton, possuem atividades anti-obesidade, por exemplo patentearam (US 8247001 B2) o produto anti-obesidade e o método de preparação do extrato alcoólico de sementes de *Cassia obtusifolia*, que contém as antraquinonas aurantio-obtusina, obtusifolina e seus glicosídeos, para uso no tratamento da obesidade e doenças metabólicas e hepáticas relacionadas (Huang et al., 2013). Tzeng et al., 2012, na sua investigação à cerca dos efeitos anti-obesidade e anti-hiperlipidêmicos de emodin, descobriram que esta antraquinona causou reduções relacionadas à dose no triglicerídeo hepático e conteúdo de colesterol, e diminuição do acúmulo de gotículas de lípidos hepáticos em ratos alimentados com dieta rica em gordura (Noinart et al., 2017).

Estes compostos naturais auxiliam na perda de peso, tendo como alvo diferentes partes do corpo, dependendo do seu mecanismo molecular. Um dos modos de ação possível é a inibição das lípases, que impede a absorção intestinal da gordura da dieta.

Os produtos naturais também podem atuar como supressores do apetite, regulando a fome por meio de diversas hormonas e neurotransmissores como a histamina e serotonina (5-HT), por exemplo esta última desempenha um importante papel no sistema nervoso, com diversas funções, como a liberação de algumas hormonas, regulação do sono, temperatura corporal, apetite, humor, atividade motora e funções cognitivas, posto isto, alterações nos níveis de 5-HT (baixos níveis ou problemas na sinalização com o recetor) têm sido relacionadas ao aumento do desejo de ingerir doces e carboidratos. Com quantidades normais de 5-HT, a pessoa atinge mais facilmente a saciedade e consegue ter um maior controlo sobre a ingestão de açúcares. Os níveis adequados deste neurotransmissor no cérebro dependem da ingestão alimentar de triptofano (aminoácido precursor da serotonina) e de carboidratos (Naves e Paschoal, 2007; Lam et al., 2008).

#### 1.4. Produtos naturais marinhos com atividade anti-obesidade

Organismos marinhos como é o caso de fungos marinhos, cianobactérias, algas e esponjas, têm sido estudados como fontes de compostos com diversas ações benéficas aplicadas na medicina (atividade anticancerígena, anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana e anticoagulante) ou na indústria (cosméticos e nutracêuticos), biotecnologia e agricultura (Kiuru et al., 2014). No entanto, a sustentabilidade e a segurança são os conceitos chave no processo de transformação de compostos marinhos em produtos industriais (Kiuru et al., 2014).

Algas e cianobactérias já começam a ganhar grande atenção em relação aos recursos orgânicos, o que pode ser explicado pela presença de uma quantidade abundante de moléculas bioativas com estruturas químicas interessantes (Heydarizadeh et al., 2013).

O consumo de organismos marinhos e compostos bioativos marinhos como é o caso de peixes, tunicados, esponjas, crustáceos, fungos, cianobactérias e algas, demonstrou ter a capacidade de reduzir a incidência de doenças crônicas, incluindo obesidade (Hu et al., 2016; Suleria et al., 2016). Assim, os produtos naturais marinhos podem reduzir a inflamação e a resistência à insulina, auxiliando na perda de peso (Castro et al., 2016; Hu et al., 2016).

Um dos compostos que tem forte potencial de perda de peso é a fucoxantina, isolada da alga marinha *Undaria pinnatifida*, que pode reduzir o stress oxidativo e tem efeitos antidiabéticos e anti-obesogênicos. A fucoxantina demonstrou estimular o gasto de energia, causando uma diminuição no ganho de peso corporal e gordura abdominal em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura C57BL / 6J (Yang et al., 2019).

Extratos de água quente de *Gelidium amansii* provaram em ensaios anteriores que produzem efeitos benéficos na redução do peso corporal e do tecido adiposo, no colesterol total no plasma, nos níveis de triglicerídeos e no acúmulo de lípidos hepáticos em hamsters obesos (Yang et al., 2017)

Um extrato metanólico de *Eisenia bicyclis*, uma alga marinha castanha, composta principalmente por florotaninos, inibiu a lipase pancreática e a diferenciação de adipócitos, reduzindo assim o acúmulo de lípidos e o consumo de glicose (Castro et al., 2016; Wan-Loy e Siew-Moi, 2016). Outro composto com potencial para ajudar na perda de peso é o fucoidan, extraído da alga castanha *Sargassum henslowianum*. Este pertence a um grupo de polissacarídeos sulfatados que podem estimular a lipólise usada para mobilizar a energia armazenada durante o jejum ou o exercício (Castro et al., 2016). Este composto pode também reduzir os níveis de colesterol e triglicerídeos no sangue em ratos alimentados com um dieta rica em gordura BALB / c (Wan-Loy e Siew-Moi, 2016).

A macroalga verde *Caulerpa okamurae* é rica em minerais, fibras, vitamina A, vitamina C, alcaloides,  $\beta$ -sitosterol e ácidos gordos insaturados essenciais (Sharma et al., 2017). Um estudo conduzido por Sharma et al. 2017, revelou que extratos desta alga marinha diminuíram o peso corporal e o tecido adiposo, e os perfis de lípidos hepáticos plasmáticos em ratos induzidos com uma dieta rica em gordura via regulação da adipogênese, além de inibir fortemente o acúmulo de lípidos nos adipócitos 3T3-L1 e reduzir a expressão de PPAR-  $\gamma$  e C / EBP $\alpha$ .

Os alginatos são um polissacarídeo gelificante extraído de algas marinhas castanhas que também demonstraram poder controlar o apetite humano, produzindo uma sensação de saciedade pós-prandial, levando a uma ingestão reduzida de alimentos, com forte potencial de perda de peso (Castro et al., 2016; Jensen et al., 2012).

## 1.5. Cianobactérias como potencial fonte para o tratamento da obesidade

As cianobactérias são um grupo primitivo de procariontes fotossintéticos gram-negativos, tanto planctônicos quanto bentônicos, e estão distribuídas mundialmente num amplo espectro de condições ambientais (Brito et al., 2015; Sharma et al., 2011; Singh et al., 2005). Estas devido à sua longa história evolucionária, com seus primeiros registros fósseis datados em 3,5 bilhões de anos, foram capazes de colonizar praticamente todos os ecossistemas do planeta (Molica e Azevedo, 2009). Também possuem mecanismos que permitem tolerar a incidência de raios ultravioleta (UV), concentrações elevadas de metais pesados, baixas concentrações de oxigênio, temperaturas baixas e altas e podem até ser encontradas em desertos (Whitton e Potts, 2000).

As cianobactérias conseguem desenvolver-se abundantemente em águas doces e marinhas, com elevadas cargas de nutrientes.

Embora algumas cianobactérias possam desencadear doenças gastrointestinais, danos renais e hepáticos, estas também apresentam várias propriedades benéficas, como atividade anticancerígena, antimicrobiana e anti-inflamatória, por exemplo. Por essas razões, as cianobactérias têm diversos usos biotecnológicos, farmacêuticos, cosméticos e industriais (Mazard et al., 2016; Singh et al., 2017).

Possuem numerosas vias biossintéticas que levam à produção de metabolitos secundários, estruturalmente diversos e biologicamente ativos, que estão regularmente envolvidos na causa ou no tratamento de doenças, como é o caso da obesidade, pois contêm componentes interessantes como carotenoides, ficocianina, fibras, ácido  $\gamma$ -linoleico e esteróis vegetais que auxiliam na perda de peso (Dittmann et al., 2015).

Extratos de cianobactérias contendo compostos bioativos, como é o caso de proteínas, lípidos, polissacarídeos, óleos, vitaminas, terpenos, ésteres, polifenóis, clorofilas e carotenoides exibem também propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes e anticancerígenas, e por isso que cada vez mais são procuradas para o desenvolvimento de novos medicamentos (Michalak e Chojnacka, 2015).

Um exemplo conhecido é a *Arthrospira* (anteriormente conhecida como *Spirulina*), pertencente à ordem Oscillatoriales, tem sido consumida mundialmente devido aos seus efeitos benéficos para a saúde, sendo que possui atividades anti-tumoral, anti-inflamatória, anti-hiperglicemia, anti-hipercolesterolemia e antiviral (Castro et al., 2016). As três principais espécies que possuem efeitos terapêuticos são *Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxima* e *Arthrospira fusiformis*. Atualmente esta cianobactéria está disponível para venda ao público e não requer receita médica. É utilizada como suplemento dietético, sendo que demonstrou reduzir os níveis de colesterol e triglicérides hepáticos em ensaios clínicos em humanos, auxiliando assim na prevenção e tratamento da obesidade (Castro et al., 2016; Cheong et al., 2010; Park e Lee, 2016; Szulinska et al., 2017; Yang et al., 2011).

Segundo Gerwick et al., 2008, a maioria dos metabolitos secundários promissores tendem a ser produzidos por cianobactérias marinhas filamentosas. Mais recentemente, os autores Vijayakumar et al., 2016 e Mi et al., 2017 confirmaram que a maioria dos metabolitos secundários eram isolados de cianobactérias da ordem Oscillatoriales e mais precisamente dos gêneros Oscillatoria, Lyngbya, Moorea e Okeania, nos quais 58% dos produtos naturais relatados seriam do gênero Oscillatoria e 35% de Lyngbya.

Outras cianobactérias como *Nostoc commune* var. *sphaeroides* Kützinger (N. commune) podem auxiliar no controle do peso. *N. commune* tem potencial para reduzir a absorção intestinal de colesterol e pode estimular a excreção de esteróis, por meio do seu efeito hipocolesterolêmico (Castro et al., 2016; Rasmussen et al., 2009; Yang et al., 2011).

Por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro*, caracterização bioquímica e avaliação toxicológica, estudos anteriores descobriram frações promissoras de cianobactérias, devido à presença de compostos não identificados com potenciais efeitos anti-obesidade (por exemplo, na redução de lípidos) (Costa et al., 2019). Descobriu-se que compostos derivados da clorofila encontrados em cianobactérias marinhas, reduzem os lípidos nas larvas de peixe-zebra (Freitas et al., 2019). Assim, as cianobactérias contêm um forte potencial de possuir outros compostos bioativos desconhecidos, não tóxicos e com propriedades anti-obesidade (Costa et al., 2019; Freitas et al., 2019).

O Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) acolhe uma coleção de cultura de cianobactérias (LEGE-CC) com cerca de 400 estirpes de cianobactérias - principalmente recolhidas em ambientes de água doce, estuarinos e marinhos (Ramos et al., 2018). Uma pequena parte dessa diversidade química já foi

explorada para a identificação de atividades anticancerígenas (Costa et al., 2014), no entanto, o potencial anti-obesidade só há pouco começou a ser analisado.

As cianobactérias podem ser classificadas em cinco subsecções principais, onde a subsecção I (Chroococcales) e II (Pleurocapsales) representam as bactérias unicelulares e a subsecção III (Oscillatoriales), IV (Nostocales) e V (Stigonematales) compreendem as estirpes filamentosas (Brito et al., 2012).

## 1.6. Organismos modelo fisiologicamente relevantes para o estudo da obesidade: Peixe-zebra

Bioensaios são importantes para a triagem de bioatividades de amostras derivadas de compostos naturais, bibliotecas de extratos ou frações (Carten e Farber, 2009). Os modelos experimentais cada vez mais se tornam uma ferramenta indispensável para estudar vários distúrbios humanos, e existem diferentes abordagens possíveis para avaliar a atividade anti-obesidade de produtos naturais, por exemplo, usando linhas celulares estáveis *in vitro*. No entanto, as células não representam nem a complexidade de um organismo inteiro, nem a sua interação entre diferentes tecidos ou órgãos, o que é particularmente importante para a obesidade, sendo ela uma doença complexa. Além disso, muitos compostos ativos em sistemas *in vitro*, não se traduzem em fármacos eficazes *in vivo* ou podem vir a apresentar problemas de toxicidade.

A utilização de organismos aquáticos em investigação iniciou-se no século XVII, mas foi há cerca de 200 anos que a utilização de peixes como organismos-modelo se começou a desenvolver. Nos últimos anos, o peixe-zebra (*Danio rerio*), um pequeno teleosteo de água doce, tornou-se um organismo modelo atraente para a pesquisa em várias áreas de investigação, incluindo a biomédica, pois apresenta vantagens logísticas consideráveis em relação aos modelos clássicos de vertebrados, como é o caso do rato (Giacomotto e Ségalat, 2010; Hölttä-Vuori et al., 2010; Nguyen et al., 2013; Tabassum et al., 2015).

O peixe-zebra apresenta alta homologia fisiológica e genética com os mamíferos, pois possui vias endócrinas e neurais bem desenvolvidas, alta sensibilidade a alterações ambientais, custo relativamente baixo de manutenção, facilidade de manipulação experimental, alta fecundidade, disponibilidade de modelos adultos e larvais, e por último condições de cultura compatíveis com triagem de alto rendimento para larvas (Giacomotto e Ségalat, 2010; Hölttä-Vuori et al., 2010; Oka et al., 2010; Nguyen et al., 2013; Tabassum et al., 2015). Este modelo, mesmo na fase larval, apresenta uma resposta rápida à eficácia e toxicidade dos compostos e desenvolve-se rapidamente nas primeiras 24 a 48 horas

após a fertilização. O peixe-zebra tem mostrado ser um excelente modelo para estudar a disfunção metabólica, pois este organismo possui os órgãos-chave que são importantes para a regulação da homeostase energética e do metabolismo em mamíferos, incluindo órgãos digestivos, tecido adiposo e músculo esquelético (Lieschke e Currie, 2007; Schlegel e Stainier, 2007). Além disso, o seu corpo pequeno e transparente permite imagens não invasivas. Por todas estas razões, o uso de larvas de peixe-zebra no estudo do metabolismo lipídico humano é muito vantajoso. As funções-chave como regulação do apetite, regulação da insulina e armazenamento de lípidos também são bem conservadas neste modelo (Elo et al., 2007; Flynn et al., 2009; Nishio et al., 2012).

Embora existam muitas vantagens no uso do peixe-zebra como modelo na descoberta de novos compostos promissores, e essas vantagens continuam a aumentar à medida que a tecnologia avança, também existem algumas desvantagens no seu uso. É importante lembrar que, embora o metabolismo deste organismo se assemelhe ao de um mamífero (endotérmico), o tipo de organismo não é o mesmo, pois não possuem tecido adiposo castanho e, portanto, o seu organismo ectotérmico e a duplicação do genoma podem afetar o metabolismo e a regulação neuroendócrina e, conseqüentemente, os fármacos podem ser metabolizados de forma diferente, alterando a sua função (Giacomotto e Ségalat, 2010; Hölttä-Vouri et al., 2010; Nguyen et al., 2013). Também a variabilidade inerente está associada a qualquer tipo de estudo *in vivo*, portanto, deve-se ter cautela para minimizar a variabilidade biológica, tentando escolher larvas que apresentem fases de desenvolvimento semelhantes e sem quaisquer sinais de doença (Carten e Farber, 2009). Apesar de tudo, vários artigos têm sido publicados sobre o uso de *D. rerio* em estudos de obesidade, e surpreendentemente, semelhanças significativas foram observadas no metabolismo lipídico de peixes-zebra e mamíferos, o que permitiu desenvolver um novo ensaio de triagem usando fluorescência do Vermelho de Nilo (Jones et al., 2008). Esta ferramenta de triagem permite a identificação de novos compostos ativos que podem ser posteriormente validados em mamíferos, e ajuda a reduzir a lista de potenciais futuros alvos de fármacos para o tratamento clínico da obesidade. (Hölttä-Vuori et al., 2010; Jones et al., 2008; Oka et al., 2010; Tingaud-Sequeira et al., 2011). No nosso laboratório, o ensaio do metabolismo lipídico com peixe-zebra corados com Vermelho de Nilo já foi aplicado com sucesso, para identificar compostos com atividades redutoras de lípidos sem qualquer toxicidade geral de fungos marinhos, polifenóis vegetais quimicamente modificados, cianobactérias, actinobactérias e esponjas (Costa et al., 2019; Santos et al., 2019).

## 1.7. Objetivos

Este trabalho tem o propósito de contribuir para a descoberta de novos compostos cianobacterianos que possam ajudar no combate a esta doença ameaçadora, que é a obesidade, para que no futuro se desenvolvam nutracêuticos inovadores, seguros para consumo humano, com efeitos benéficos tanto na obesidade, como também nas comorbidades relacionadas.

Em particular, o objetivo principal do presente trabalho de pesquisa centrou-se em manipular o crescimento da estirpe *Cyanobium sp.* LEGE06097, que mostrou em ensaios de triagem anteriores, atividades redutoras de lípidos promissoras, para a produção de compostos e/ou metabolitos anti-obesidade, e analisar quais as melhores condições de crescimento que possam favorecer a produção de tais compostos.

Especificamente, este estudo foi constituído por vários objetivos específicos, sendo eles:

- Realizar ensaios em fotobiorreatores, manipulando as condições de luz e da temperatura;
- Realizar análises bioquímicas (conteúdo de carboidratos, proteínas, lípidos e pigmentos) para verificar se a luz e mais tarde, a temperatura têm influência no perfil metabólico das estirpes em estudo;
- Analisar a bioatividade dos extratos obtidos através do ensaio de anti-obesidade usando larvas de peixe zebra;
- Analisar o perfil metabólico utilizando a Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) e aplicar molecular networking;
- Filtrar os metabolitos responsáveis pela bioatividade.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Crescimento, Cultura e Colheita de Cianobactérias

A estirpe de cianobactérias utilizada neste estudo, pertence à Coleção de Culturas de Biotecnologia e Ecotoxicologia (LEGE-CC), um centro de recursos biológicos localizado no Centro Interdisciplinar de Pesquisas Marinhas e Ambientais (CIIMAR). Esta coleção contém mais de 400 estirpes de cianobactérias, principalmente recolhidas em ambientes de água doce, estuarinos e marinhos (Ramos et al., 2018). *Cyanobium sp.* LEGE06097, pertencente à ordem Synechococcales, foi isolada por Vitor Ramos e descoberta por Rui Seabra na zona intertidal (zona entremarés), numa macroalga verde. De acordo com os resultados de ensaios de triagem anteriores de compostos bioativos, conduzidos pela equipa do BBE, esta cianobactéria demonstrou atividades redutoras de lípidos promissoras - atividade anti-obesidade (Costa et al., 2019). Portanto, esta estirpe foi selecionada para cultivo em larga escala, ou seja, foi cultivada numa manga no biotério do CIIMAR, sendo que o volume final pretendido era de pelo menos 100L. A cultura foi mantida à temperatura do biotério, cerca de 20°C, com um fotoperíodo de 16 h de luz: 8 h de escuro, e intensidade de luz cerca de 60-90  $\mu\text{mol m/s}^2$ .

As estirpes marinhas, como é o caso da utilizada neste estudo, são cultivadas com meio de cultura Z8 que integra macro e micronutrientes (Solução A, Solução B e Ferro) e suplementadas com 25g /L NaCl e 20 ug / L de vitamina B12 (Kotai, 1972). O crescimento da estirpe foi realizado através um processo padrão denominado “scale up”, que serve para aumentar a escala já existente. O crescimento iniciou-se a partir de um frasco de cultura de 50mL, sempre sob condições estéreis, sendo que para isso utilizou-se a câmara de fluxo laminar Telstar Bio II Advance (Telstar, Terrassa, Spain). De seguida, parte dessa cultura foi retirada e transferida para outro frasco de 500mL, contendo água destilada (previamente autoclavada), meio Z8 e suplementação com sal e vitamina B12. No frasco de 50mL, um volume de cultura é mantido sempre de reserva para o caso de existir contaminação nos volumes superiores.

A biomassa cianobacteriana foi obtida por centrifugação a 5000 g, a 4°C por 8 minutos (Thermo Scientific MEGAFIGE 16R). Em estirpes marinhas, pelo menos são necessários dois ciclos de lavagem iniciais com água desionizada, para remover o sal existente na biomassa. No final da centrifugação, obteve-se um pellet que foi mantido a -20°C, e posteriormente liofilizado usando um Telstar LyoQuest. O pellet de biomassa liofilizado foi armazenado à temperatura ambiente até à posterior extração.

### 2.1.1. Manipulação das condições de cultura – Fotobiorreatores

Este processo de manipulação das condições de crescimento de cianobactérias, envolve várias variáveis de interação que precisam ser avaliadas e otimizadas para o rendimento máximo da molécula que fornece a atividade anti-obesidade previamente descrita.

Com o objetivo de compreender como é que as condições de luz e temperatura afetam o perfil metabólico e a bioatividade das cianobactérias, foi utilizado um fotobiorreator à escala de laboratório, Algem® da Algenuity.

No CIIMAR estão disponíveis três sistemas (sistema 1, 2 e 3), cada um com dois fotobiorreatores individuais programáveis (fotobiorreator A e fotobiorreator B) (Fig. 2), que permitem o estabelecimento e a escolha de condições específicas, e o acompanhamento das culturas ao longo do tempo do ensaio.

Os parâmetros controláveis e programáveis incluem o controlo do ciclo da luz (16:8, 16h dia e 8h horas noite), medição automática da densidade ótica (DO), controlo de pH via CO<sub>2</sub>, controlo do perfil de luz (incluindo luz branca, luz LED vermelha e azul) e controlo do perfil da temperatura (aquecimento e arrefecimento ativos). Tudo isto é possível devido à própria interface do usuário Algenuity's, projetada de forma personalizada (Fig.3), que exhibe simultaneamente todos estes parâmetros principais e em tempo real.



Figura 2- Fotobiorreatores utilizados no ensaio (sistema Algem®, Algenuity)

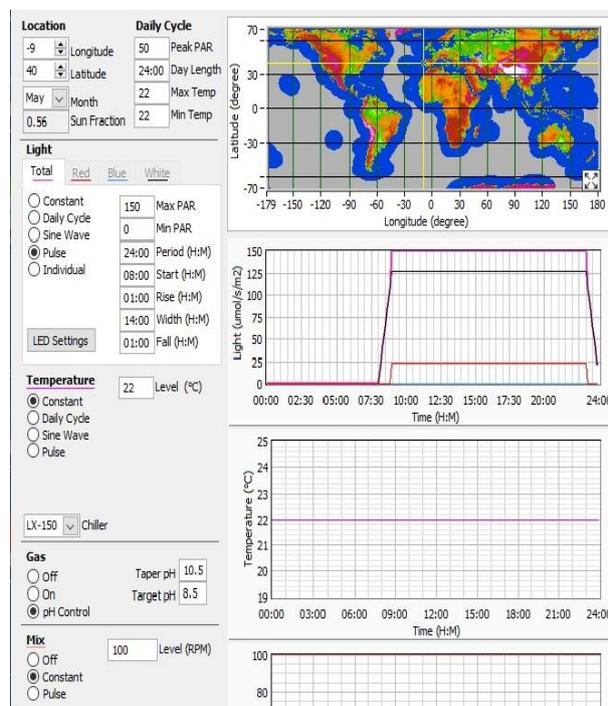


Figura 3- Software programável do sistema Algem®, Algenuity

Uma quantidade de cultura do BOGA foi necessária para atingir uma densidade ótica inicial de 1 (por vezes recorreríamos a uma diluição necessária para que a densidade ótica fosse de 1) medida a 750 nm (Biotek, Synergy HT plate reader). Essa cultura foi transferida para um Erlenmeyer Algem® de 600 mL, previamente autoclavado, e colocou-se também água desionizada com sal marinho tropical e a quantidade ajustada de compostos do meio Z8, todo este procedimento foi realizado em condições estéreis, usando a câmara de fluxo laminar, Telstar Bio II.

As culturas foram mantidas nos fotobiorreatores por um período de 21 dias, o que permitiu que atingissem a fase estacionária de crescimento. O pH era constante de 8,5, e o fotoperíodo de 8 horas noturnas: 16 horas de dia (exceto para o fotobiorreator 2B no ensaio da luz, com fotoperíodo de 24h dia).

As condições de cultura no ensaio da luz foram as seguintes:

- Fotobiorreator 1A: luz de intensidade baixa (15% vermelha, 85% LED branca), 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 25°C
- Fotobiorreator 1B: luz intermédia, (15% vermelha, 85% branca), 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 25°C
- Fotobiorreator 2A: luz forte, (15% vermelha, 85% branca), 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 25°C
- Fotobiorreator 2B: luz contínua, 24h dia (15% vermelha, 85% branca), 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 25°C
- Fotobiorreator 3A: LED azul (85% azul, 15% branco), 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 25°C
- Fotobiorreator 3B: LED vermelho (85% vermelho, 15% branca), 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 25°C

Quando o ensaio das diferentes intensidades de luz estava a iniciar, foi encontrado um erro na sonda de pH do fotobiorreactor 1A, que não permitiu o arranque deste reactor. Como tal, foi decidido não dar seguimento a esta experiência neste fotobiorreactor, ficando apenas com 5 fotobiorreatores em funcionamento.

As condições de cultura no ensaio da temperatura foram as seguintes:

- Fotobiorreator 1A: 10°C (15% vermelha, 85% branca), 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Fotobiorreator 1B: 14°C, (15% vermelha, 85% branca), 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Fotobiorreator 2A: 18°C, (15% vermelha, 85% branca), 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Fotobiorreator 2B: 22°C, (15% vermelha, 85% branca), 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Fotobiorreator 3A: 26°C, (15% vermelha, 85% branca), 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Fotobiorreator 3B: 30°C, (15% vermelha, 85% branca), 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

## 2.2. Caracterização Bioquímica

Com o intuito de obter resultados preliminares sobre como diferentes condições de luz e temperatura afetam o perfil bioquímico das cianobactérias e, portanto, o tipo de metabolitos sintetizados, diversos parâmetros bioquímicos foram testados e apresentados de seguida.

### 2.2.1. Biomassa Seca

Para este processo foram necessários filtros redondos de celulose (Fisherbrand, 47MM, 1,2 UM), previamente pesados. Colocou-se 5 mL de amostra de cada cultura e 20 mL de água destilada num falcon de 50 mL (diluição 1:5). Prepararam-se triplicados para cada amostra, das diferentes condições. De seguida filtraram-se as amostras com ajuda da bomba de vácuo (VWR PM20405-86, mini laboratory pump). Por último, colocaram-se os filtros a secar na estufa, a cerca de 60°C, por pelo menos 24h. No dia seguinte pesaram-novamente os filtros (Método adaptado de Bradford, 1976).

A biomassa seca expressa-se em g / L de cultura, e foi usada como um fator de normalização para os outros parâmetros bioquímicos.

### 2.2.2. Conteúdo de Carboidratos

Um volume de 5 mL de cada cultura foi colocado em tubos falcon de 15 mL. Foram preparados triplicados para cada amostra. Os tubos falcon foram centrifugados a 5000 g, a 4°C por 8 minutos (Centrifuga Thermo Scientific Megafuge 16R) e o sobrenadante foi descartado. O pellet existente em cada falcon foi misturado com ajuda de um vortéx e de seguida pipetou-se 200 µL de água destilada para cada um.

Numa placa de 96 poços, adicionou-se a cada poço 50 µL de amostra (cultura), 150 µL de 98% p/p de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 30 µL de 5% p/v de fenol, colocados por esta ordem. De seguida, preparou-se uma reta padrão de glicose, utilizando a solução stock a 1M (1,8 g de glicose + 10 mL de água destilada), dando origem a 8 standards, de 8 mM a 0,0625 mM, diluição em série (2 vezes). Para preparar o standard a 8 mM de glicose, num eppendorf dissolveu-se 8 µL da solução stock em 1 mL de água destilada. Em seguida, os seguintes 7 Eppendorfs continham 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL do padrão anterior (padrão 4 mM: 0,5 mL de água + 0,5 mL padrão 8 mM; padrão 2 mM: 0,5 mL água + 0,5 mL padrão 4 mM; ...). Na mesma placa de 96 poços, adicionou-se a curva padrão, ou seja, 50 µL de cada standard (em duplicado), 2 brancos compostos por 50 µL de água destilada, e à reta padrão e aos brancos adicionou-se também 150 µL de 98% p/p de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 30 µL de 5% p/v de fenol. A placa foi colocada na estufa por 10 min a 60°C. Seguidamente o conteúdo de carboidratos foi medido a 490 nm, no Cytation (Biotek Synergy HT).

Com os dados da absorvância dos standards da reta padrão, conseguimos descobrir a qual a concentração de carboidratos presente em cada amostra, sendo que:

$$y = m.x + b$$

$y$  = Absorvância medida através do espectrofotômetro

$x$  - Concentração de carboidratos presente na amostra

A concentração de carboidratos presentes em cada amostra, foi normalizada para g de carboidratos / g biomassa seca (Método adaptado de Papadopoulos et al., 2020).

### **2.2.3. Conteúdo de Proteínas**

Para obtenção do conteúdo de proteínas, foram colocados 10 mL de cultura da estirpe LEGE06097, num tubo falcon de 15 mL e foram preparados triplicados para todas as amostras testadas. De seguida centrifugaram-se as amostras (centrifuga MEGAFUGE 16R) a alta velocidade 5000 g, a 4°C durante 8 min, e descartaram-se os sobrenadantes (geralmente límpidos ou transparentes).

Adicionou-se 200 µL de tampão RIPA aos pellet's, dissolveu-se com ajuda do vortéx, e pipetou-se para Eppendorfs de 2 mL. O pellet foi dissolvido por ultrassons (Vibra Cell VC50 Sonics & Materials Inc. Danbury, CT. USA), 10 vezes (1x pulso com intervalo de 1 seg). De seguida colocaram-se os Eppendorfs num recipiente com gelo durante 30 min. Posteriormente centrifugaram-se a alta velocidade 17.000 g, a 4°C, por 5 min. Transferiu-se o sobrenadante para um novo Eppendorf e o pellet foi descartado. Para quantificação, utilizaram-se novos Eppendorfs para diluir o sobrenadante (diluição 1:10 em água destilada), e o conteúdo de proteínas foi obtido através do reagente Bradford. Numa placa de 96 poços, adicionou-se 195 µL de reagente de Bradford a todos os poços necessários e adicionou-se 5 µL de cada amostra. Utilizou-se padrões BSA (7 standards BSA preparados em tampão RIPA, 20 mg/ml - 0,3 mg/ml, diluição em série 2 vezes), e de seguida realizou-se a curva padrão em duplicado, colocando 5 µL de cada standard em cada poço e dois brancos com 5 µL de tampão RIPA (1:10 diluído em água destilada), acrescentou-se aos poços da reta padrão e brancos, 195 µL de reagente de Bradford e por fim mediu-se a absorvância a 595 nm, no Cytation (Biotek Synergy HT). Com os dados da absorvância dos standards da reta padrão, conseguimos descobrir a qual a concentração/quantidade de proteínas presente em cada amostra, sendo que:

$$y = m.\ln(x) + b$$

$y$  = Absorvância medida através do espectrofotômetro;

$x$  = Concentração de proteínas existente em cada amostra (variável dependente).

A concentração de proteína foi então normalizada para a unidade g de proteína / g de biomassa seca (Método adaptado de Bradford, 1976).

#### **2.2.4. Conteúdo de Lípidos**

O conteúdo de lípidos foi determinado utilizando o método de Marsh e Weinstein (1966). Foram adicionados 0,2 mL de cultura por poço numa placa de 96 poços. Realizaram-se triplicados para todas as amostras testadas. De seguida adicionaram-se 2 µL da solução stock de Vermelho de Nilo (500 µg / mL), concentração final de 5 µg / mL. Preparou-se uma amostra em branco em triplicado (meio Z8 + 2 µL NR). Depois manteve-se a placa 10 min à temperatura ambiente, e de seguida, leu-se a fluorescência do Vermelho de Nilo, no Cytation (Biotek Cytation 5), através de um comprimento de onda de excitação de 488 nm e de um comprimento de onda de emissão de 640nm.

O conteúdo lipídico foi então normalizado para UFI (unidade de intensidade de fluorescência) / g de biomassa seca (Método adaptado de Alboresi et al., 2016).

#### **2.2.5. Pigmentos**

Adicionou-se 0,2 mL de cultura por poço numa placa de 96 poços. Realizaram-se triplicados para todas as amostras testadas. Seguidamente leu-se a absorvância diretamente no leitor Cytation (Biotek Cytation 5), sendo que a clorofila A se mediu a um comprimento de onda de 652,4 nm, clorofila B a 665,2 nm e carotenoides a 470 nm. Este procedimento poderá ser realizado na mesma placa do procedimento do conteúdo de lípidos, mas em poços diferentes. Cada tipo de pigmento foi então normalizado por unidade de absorvância/g biomassa seca (Método adaptado de Duarte e Costa, 2018).

### **2.3. Extração Orgânica**

As culturas da experiência dos diferentes tipos de luz foram extraídas utilizando metanol (MeOH) como solvente orgânico. Todas as biomassas liofilizadas - 1B (125,68 mg); 2A (291,05 mg); 2B (286,19 mg); 3A (366,3 mg) e 3B (266,11 mg) - foram sonicadas primeiramente em 50 mL de MeOH, usando um sonificador (Bandelin Sonorex RK100H) por 10 minutos, para lisar as células. Este processo foi repetido mais duas vezes usando 25 mL de MeOH. O solvente foi evaporado do extrato bruto com a utilização de um rotavapor sob vácuo, a 30°C. A massa de extratos brutos obtidos foi de 1B (100,25 mg); 2A (116,23 mg); 2B (124,09 mg); 3A (114,6 mg) e 3B (122,92 mg).

O ensaio com as culturas com as condições do BOGA, teve como um dos objetivos perceber se o tipo extração afeta ou não a bioatividade da estirpe LEGE06097, por isso, realizaram-se dois tipos de extrações orgânicas, uma apenas com metanol e a outra com metanol e diclorometano.

Na extração metanólica (M) a biomassa liofilizada de *Cyanobium sp.* LEGE06097 (183,3mg) foi primeiramente sonificada em 15 mL de MeOH usando um sonificador (Bandelin Sonorex RK100H) por 15 min para lisar as células. A biomassa foi então exaustivamente extraída usando MeOH (5 x 15 mL) até que o líquido resultante da extração ficasse incolor, garantido o sucesso da mesma. O solvente foi evaporado do extrato bruto usando um rotavapor sob vácuo, a 30°C. Através desta extração, foram obtidos 82,07 mg de extrato bruto. Na extração com diclorometano e metanol (DM), a biomassa liofilizada 185,6 mg, foi primeiramente sonificada em 15 mL de MeOH usando o sonificador (Bandelin Sonorex RK100H) por 15 min para lisar as células. Este processo foi repetido mais três vezes utilizando o MeOH, seguido por mais quatro vezes utilizando o mesmo volume, 15 mL, de Diclorometano (CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>), até que o líquido resultante da extração ficasse transparente. Os solventes foram evaporados do extrato bruto usando um rotavapor sob vácuo, a 30°C. Através desta extração foram obtidos 43,73 mg de extrato bruto.

Por último, as culturas do ensaio das diferentes temperaturas foram extraídas de forma semelhante às culturas BOGA, utilizando MeOH e CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>, como solventes. Todas as biomassas liofilizadas 1A (127,6 mg), 1B (296,8 mg), 2A (379,1 mg), 2B (400,9 mg), 3A (447,8 mg), 3B (370,4 mg) - foram sonicadas 3 vezes em 10 mL de MeOH utilizando o sonificador (Bandelin Sonorex RK100H) por 15 min. A biomassa foi então extraída usando também 10 mL de CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>, várias vezes (3 vezes para 1A; 5 vezes para 1B; 4 vezes para 2A; 3 vezes para 2B; 5 vezes para 3A e 3 vezes para 3B), até que a mistura se tornasse transparente. Através desta extração foram obtidos - 1A (43,73 mg); 1B (82,07 mg); 2A (111,73 mg); 2B (116,2 mg); 3A (140,74 mg) e 3B (124,52 mg).

O volume de solvente que colocamos em cada etapa poderá ser diferente de amostra para amostra, pois esse volume deverá cobrir todo o pellet existente no falcon, e os pellets não têm todos a mesma massa e/ou dimensão. Normalmente colocamos entre 10-50 mL de solvente, por etapa.

## 2.4. Fracionamento com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um procedimento que serve para separar componentes de uma mistura de substâncias químicas: uma combinação de separação, identificação, e medições quantitativas.

Este procedimento foi realizado para os extratos do ensaio das diferentes intensidades de luz, com o objetivo de fracionar os extratos brutos existentes, dando origem a 8 frações por extrato (A a H), para que assim essas frações fossem utilizadas no bioensaio do metabolismo lipídico com peixe-zebra corados com Vermelho de Nilo.

O gradiente do HPLC consistia em 10% Acetonitrilo, 90% de água Ultrapura. Os dois solventes utilizados foram, solvente C: Acetonitrilo (filtrado) e solvente D: Água Ultrapura (filtrada). Como branco foi utilizado o Metanol (de grau LC-MS). A seringa utilizada foi a Waters 2500 µL, o LOOP Watters 1000 µL e a coluna de HPLC utilizada neste procedimento foi ACE 10C8 50 x 10 mm.

A separação do extrato metanólico por HPLC, é realizada através do sistema Watter Alliance e2695. As 8 frações são separadas de forma automatizada, utilizando o módulo coletor de frações da Alliance. A recolha das frações é realizada numa placa de 48 poços, sendo o número mínimo de extratos para executar uma placa 6, e o ideal 12.

Para garantir que tudo corre como esperado, primeiro deve-se deixar correr no sistema uma placa “falsa”, ou seja, sem as amostras do ensaio. Deve-se também identificar a placa que vamos utilizar com os nomes ou números pertencentes a cada amostra, para depois conseguimos saber a que coluna/linha pertencem. Antes de correr o programa devemos ainda verificar se tanto a pressão como o gradiente estão corretos, e se o tubo coletor de ligação à dissipação de resíduos não está a dificultar o processo de fracionamento.

O ideal para utilizarmos este tipo de procedimento, era conseguir raspar cerca de 40 mg/mL de cada extrato e colocar em outro vial, mas se não for possível, pode-se calcular o volume de Metanol que produz uma concentração final de 40 mg/mL e adicionar essa quantidade de solvente de grau LC-MS ao vial que contém o extrato. Para homogeneizar a amostra utilizou-se o sonificador (Bandelin Sonorex RK100H). Após terminar o fracionamento devem-se armazenar as frações obtidas a -20°C. Caso seja necessário secar as frações, pode-se utilizar a bomba de alto vácuo (speedvac) ou então secar uma a uma no rotavapor, até posterior utilização.

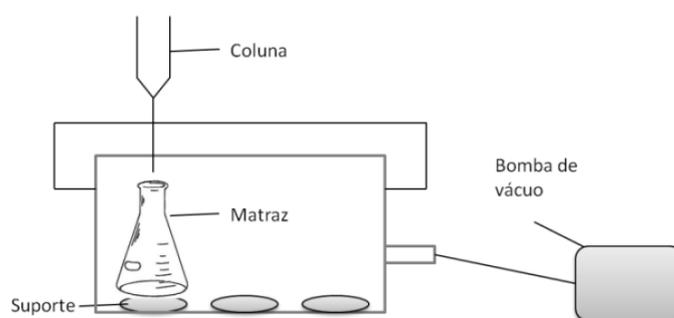
## 2.5. Fracionamento – ABC

Primeiramente montou-se o equipamento necessário para realizar o fracionamento, como apresentado na figura 4.

Os estratos brutos das condições do BOGA, e da experiência das diferentes temperaturas foram fracionados utilizando um protocolo de fracionamento sequencial simples denominado extração de polaridade aumentada (ABC). Primeiramente, uma coluna de sílica de 2 g ou 5 g, dependendo da massa do extrato bruto (pelo menos 30 - 40 vezes a massa do extrato), é ativada usando hexano e, em seguida, o extrato diluído em 1 mL de hexano é adicionado à coluna. As frações foram obtidas por extração sequencial

com solventes de polaridade crescente, hexano - apolar - (fração A), acetato de etilo (fração B) e metanol - polar - (fração C). No final do processo, resultam três frações por cada amostra fracionada (fração A, B e C) essas três frações, portanto, contêm os compostos (de acordo com sua polaridade) presentes na biomassa liofilizada.

Os solventes foram evaporados das frações utilizando um rotavapor sob vácuo, a 30°C, seguido por um sistema de vácuo durante toda noite, para que assim as frações ficassem totalmente secas até ao uso das mesmas nos ensaios anti-obesidade. Sendo depois dissolvidas em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO), ficando com uma concentração final de 10 mg/mL. O DMSO é um solvente orgânico, amplamente utilizado em testes toxicológicos aquáticos, tendo uma grande capacidade de solubilização (Huang et al., 2018)



**Figura 4-** Esquema de montagem do sistema de fracionamento abc (retirado do protocolo fornecido pelo BBE).

## 2.6. Bioensaio do metabolismo lipídico com peixe-zebra corados com Vermelho de Nilo

Os embriões de peixe-zebra utilizados nos ensaios foram obtidos do BOGA, local onde se mantêm todos os organismos aquáticos que se utilizam no CIIMAR. O procedimento original foi publicado por Jones et al., 2008, e otimizado pela equipa do BBE. Foi aplicado visando a possível descoberta de compostos com atividade anti-obesidade de diversas frações produzidas ao longo deste trabalho.

Os embriões foram recolhidos no dia da fecundação (0 DPF), separaram-se os ovos viáveis dos não viáveis, e também se descartaram todas as impurezas presentes. Posteriormente foram colocados num aquário com água desclorada e incubados a 28°C, para sua aclimação. No dia seguinte, que corresponde ao primeiro dia pós fertilização (1DPF), os ovos são novamente limpos e separados em placas de petri com 20 mL de egg water, um meio com sal e feniltioureia (PTU), com uma densidade máxima de 40 embriões por placa de petri, e novamente mantidos a 28°C. A egg water, previamente preparada, consiste em água salgada marinha com concentração final de 60 µg/ml e 200 µM de PTU,

sendo que o PTU serve para suprimir a melanização. No dia 3 DPF, 5 a 7 larvas de peixe-zebra foram adicionadas aos poços necessários (em placas de 48 poços), para iniciar o ensaio.

As frações diluídas em DMSO foram testadas nas concentrações finais de 10 µg/ml e 25 µg/ml. Em cada ensaio colocou-se na mesma placa 2 controlos positivos - REV (resveratrol, concentração final de 50 µM) e 3 controlos de solvente - DMSO (0,1% dimetilsulfóxido). No 4 DPF, os controlos e as frações foram renovados, e caso existissem larvas mortas estas seriam removidas. Em 5 DPF, último dia do ensaio, as larvas foram anestesiadas com tricáína (MS-222, 0,03%), por 2 min, e analisadas num microscópio de fluorescência (Leica DM6000 M). A intensidade da fluorescência no saco vitelino/intestino de cada larva foi quantificada através do programa ImageJ. A média da fluorescência das frações testadas (MFI) foi normalizada para a média do valor do controlo DMSO (100%).

## 2.7. Análise Estatística

Os dados foram analisados quanto a diferenças estatísticas com o programa GraphPad Prism 9.

A distribuição gaussiana foi testada através de testes de normalidade, nomeadamente pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov (valor  $P < 0,05$ ), e para homogeneidade de variâncias usando Bartlett's teste. Se a suposição gaussiana fosse atendida (distribuição normal ou paramétrica) e os dados tivessem variância igual, as diferenças eram analisadas pela One-Way ANOVA com o teste de comparação múltipla de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Se a suposição gaussiana fosse atendida, mas os dados não tinham variância igual, aplicava-se a ANOVA de Brown-Forsythe e Welch com teste de comparação múltipla de Dunnett T3 ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, se os dados tivessem distribuição não paramétrica, eram transformados através da transformação de raiz quadrada, e testados novamente para a normalidade. Se a suposição gaussiana fosse atendida, os dados seriam tratados conforme mencionado acima. Caso contrário, as diferenças seriam analisadas por Kruskal-Wallis através do teste de comparação múltipla de Dunn ( $p$  valor  $< 0,05$ ).

Os dados da caracterização bioquímica foram representados através de gráficos de barras com desvio padrão, e as diferenças significativas entre os grupos foram indicadas por letras diferentes ( $p < 0,05$ ). Por último, os dados dos bioensaios de peixe-zebra foram representados através de diagramas de caixa ou Box-plot, e as frações com diferenças

significativas em comparação com o controlo solvente foram indicadas pelo símbolo "\*" =  $p < 0.05$ .

## 2.8. Perfil do Metabolito

### 2.8.1. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS/MS)

Retirou-se uma quantidade de cada amostra escolhida para análise (cerca de 0.2 mg de cada amostra) do perfil do metabólito, posteriormente estas foram secas e, em seguida, ressuspensas em acetonitrilo grau LC-MS, a uma concentração de 1 mg/mL e filtradas com uma seringa de 0,2  $\mu$ m de diâmetro (Millex Syringe Filter, Merck Milipore Millex, Darmstadt, Germany) em vials de 2 mL (Merck Milipore Millex, Darmstadt, Alemanha).

A análise LC/MS foi realizada por Orbitrap Exploris 120 Mass Spectrometer (Thermo Scientific™), acoplado a uma coluna ACE UltraCore 2.5 SuperC18 (50x2,1 mm; 5  $\mu$ m ACE® UltraCore™, Aberdeen, Escócia), com fonte de ionização por eletrospray (ESI), operando em modo positivo e controlado por Xcalibur 4.4.16.14 (Thermo Scientific™). Cada amostra foi injetada com um volume de 5  $\mu$ l e as amostras foram eluídas com um gradiente de 99,5% da fase móvel A (95% H<sub>2</sub>O + 5% MeOH + 0,1% de ácido fórmico), diminuindo a fase móvel A para 10% e aumentando a fase móvel B para 90% em 9,5 minutos, eventualmente subiu para 99,5% a fase móvel A e diminuiu para 0,5% a fase móvel B em 17 minutos. O gradiente foi estabelecido numa vazão de 0,35ml/min por 20 minutos. A temperatura de separação foi mantida a 40°C para toda a análise.

### 2.8.2. Redes Moleculares e Análise Metabolómica

Utilizando o programa de software MSConvert (pertencente ao ProteoWizard) (versão 3.0.21225), os dados foram convertidos do formato original RAW para o formato mzML (Chambers et al., 2012). Em seguida, redes moleculares foram criadas na plataforma online do GNPS, um banco de dados de acesso aberto com o objetivo de compartilhar dados de espectrometria de massa em tandem (MS / MS) (M. Wang et al., 2016).

A tolerância de massa de iões precursores (PIMT) e a tolerância de massa de fragmentos de iões (FIMT) foram definidas para 0,02 Da (equipamento de alta resolução como qTOF ou Orbitrap). Os resultados obtidos da plataforma GNPS foram então visualizados e analisados utilizando o programa de software Cytoscape 3.8.2.

Realizaram-se duas análises moleculares, visando a identificação de potenciais compostos conhecidos ou desconhecidos responsáveis pelas bioatividades observadas. A primeira análise realizou-se com a Fração B BOGA extraída com diclorometano (DM) e metanol (M) considerada a fração ativa e a Fração B BOGA extraída apenas com M (fração não ativa), e a segunda análise realizou-se com os extratos brutos que deram origem às frações da análise anterior, ou seja, extrato bruto BOGA DM + M vs Extrato bruto BOGA M. Cada análise além das frações ativa e não ativa possuía também um branco. Os metabolitos presentes nas frações ativas foram então comparados com os das frações não ativas. Os espectros MS/MS dos metabolitos presentes apenas nas frações ativas (metabolitos de uma só cor) foram comparados com vários bancos de dados de espectros MS/MS incluídos na plataforma GNPS, como é o caso do Dereplicator, Dereplicator Plus e MoINetEnhancer (Wang et al., 2016). Esta comparação foi realizada na plataforma GNPS, na secção " Análise de dados " - "Biblioteca de Pesquisa" com PIMT e FIMT de 2,0 e 0,5, respetivamente, porque muitos dados em bancos de dados MS/MS vêm de equipamentos de baixa resolução. Para picos não identificados nas bases de dados anteriores, foram realizadas buscas manuais através de outras bases de dados, como o Dicionário de Produtos Naturais Marinhos (DMNP, <https://dmnp.chemnetbase.com>) e Dicionário de Produtos Naturais (DNP, <https://dnp.chemnetbase.com>). Por último, o erro m/z foi calculado em partes por milhão:

$$\frac{m}{z} \text{ error (ppm)} = \frac{\left(\frac{m}{z} \text{ peak} - \frac{m}{z} \text{ data base}\right) \times 10^6}{\frac{m}{z} \text{ peak}}$$

## 3. Resultados

### 3.1. Experiência da Luz

Com o objetivo de perceber como a luz afeta o tipo de metabolitos produzidos por *Cyanobium sp.* LEGE06097, vários parâmetros bioquímicos foram avaliados e analisados quanto a possíveis diferenças entre as condições de luz às quais as culturas foram expostas (1B- luz intermédia; 2A- luz forte; 2B- luz contínua; 3A- luz azul; 3B: luz vermelha). Em seguida, as culturas foram extraídas e fracionadas, e as frações testadas quanto à atividade anti-obesidade.

#### 3.1.1. Biomassa Liofilizada

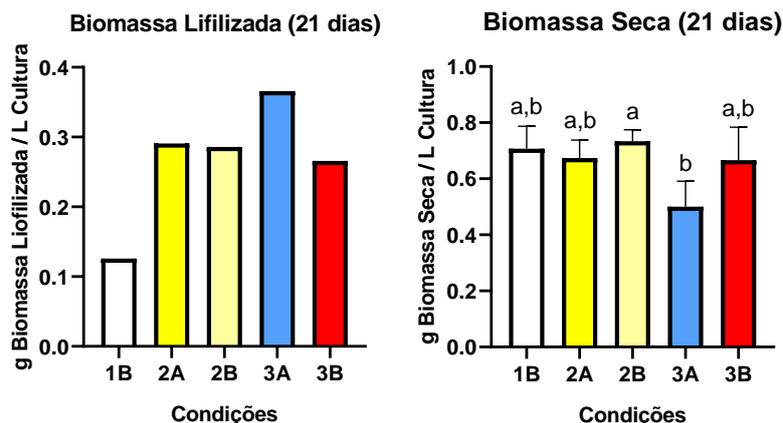
O volume de cultura necessário para a caracterização bioquímica foi retirado, e o volume restante foi centrifugado e o pellet liofilizado para futura extração. As biomassas liofilizadas foram pesadas, o que permitiu uma avaliação do crescimento da cultura. As massas obtidas foram: 1B (125,68 mg); 2A (291,05 mg); 2B (286,19 mg); 3A (366,3 mg) e 3B (266,11 mg) (Fig.5).

#### 3.1.2. Biomassa Seca

A biomassa seca é considerada uma medida para o crescimento de cianobactérias e foi usada como fator de normalização para todos os outros parâmetros deste ensaio.

As culturas expostas às condições 1B (luz intermédia), 2A (luz forte), 2B (luz contínua) e 3B (luz vermelha) mostraram valores de biomassa seca semelhantes, e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre essas condições. Diferenças significativas de crescimento foram encontradas entre as condições 2B e 3A (luz azul), sendo que a condição 3A apresentou o menor crescimento (Fig.5).

Teoricamente, os resultados obtidos para biomassa liofilizada e biomassa seca não devem ser muito diferentes. No entanto, a condição 3A (luz azul) aparece com forte crescimento na biomassa liofilizada, ao contrário do que acontece na biomassa seca. Esta cianobactéria tem tendência a sedimentar, especialmente em densidades mais altas. Como resultado, as amostras recolhidas para a biomassa seca contabilizam apenas a biomassa suspensa, bem como as amostras recolhidas para os parâmetros bioquímicos. Assim, a biomassa seca normaliza-se para a densidade de um determinado volume, para assim ser possível avaliar o conteúdo de proteínas, carboidratos, lípidos e pigmentos.



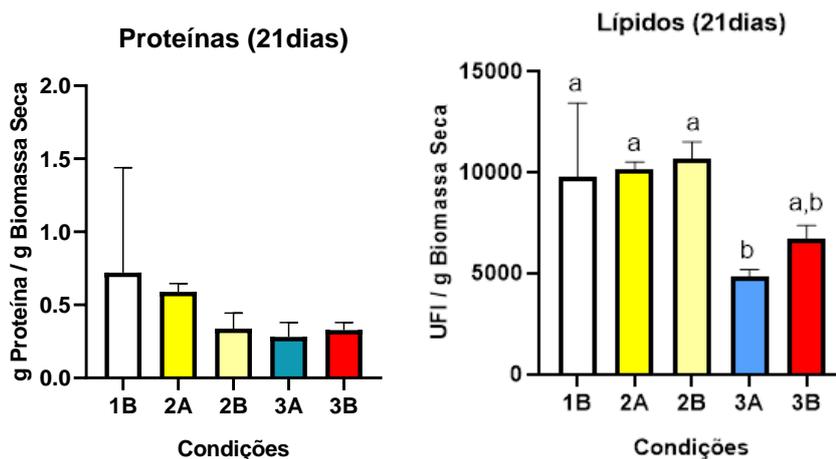
**Figura 5-** Biomassa liofilizada (à esquerda) e biomassa seca (à direita) obtidas para cada condição na experiência da luz (1B - luz intermédia; 2A - luz forte; 2B - luz contínua; 3A - luz azul; 3B - luz vermelha). À esquerda, os valores são expressos em g de biomassa liofilizada / L de cultura ( $n = 1$ ). À direita, os valores são expressos em g biomassa seca / L cultura ( $n = 3$ ). As diferenças significativas entre grupos foram analisadas pela One-Way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Dunnett's. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes ( $p < 0.05$ ).

### 3.1.3. Conteúdo de Proteínas

Durante a colheita para a análise de proteínas, ocorreu um imprevisto e uma das réplicas foi descartada, sendo que apenas ficaram duas réplicas, não sendo assim possível analisar diferenças significativas entre grupos. Mesmo assim parece que a luz intermédia (1B) e forte (2A) apresentaram uma maior quantidade de proteínas, comparativamente com a luz contínua (2B), azul (3A) ou vermelha (3B) (Fig.6).

### 3.1.4. Conteúdo de Lípidos

A culturas expostas às condições 1B (luz intermédia), 2A (luz forte), 2B (luz contínua) e 3B (luz vermelha) mostraram quantidades de lípidos semelhantes, não apresentando diferenças entre elas. Todas estas condições, com a exceção da 3B, apresentaram diferenças significativas em comparação com a condição 3A (luz azul), a condição que apresentou a menor quantidade de lípidos (Fig.6).



**Figura 6-** Conteúdo de proteína (à esquerda) e conteúdo de lípidos (à direita) obtidos para cada condição na experiência da luz (1B - luz intermédia; 2A - luz forte; 2B - luz contínua; 3A - luz azul; 3B - luz vermelha). Os valores do conteúdo de lípidos são expressos em unidades de intensidade de fluorescência (UFI) / g de biomassa seca. Cada condição teve 3 réplicas ( $n=3$ ). As diferenças significativas foram analisadas por Kruskal-Wallis através do teste de comparação múltipla de Dunn. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes ( $p < 0.05$ ).

### 3.1.5. Pigmentos

#### a) Clorofila A

As culturas expostas às condições 1B (luz intermédia) e 2B (luz contínua) mostraram quantidades de Clorofila A semelhantes, sendo que não existiram diferenças significativas entre essas condições. Mas apresentaram diferenças significativas tanto em comparação com cultura 2A (luz forte), cultura que apresentou uma menor quantidade de Clorofila A, como com a cultura 3B que tinha maior quantidade.

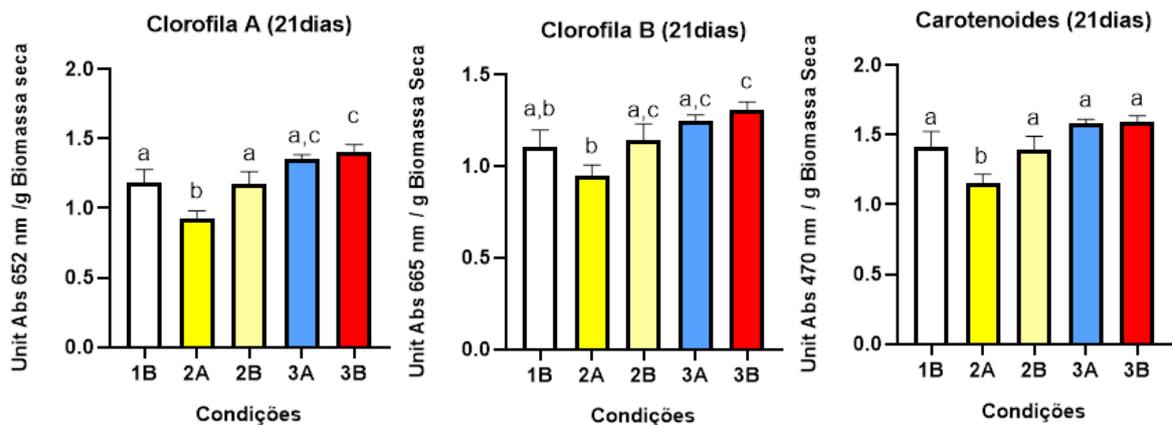
As condições 3A (luz azul) e 3B (luz vermelha), não apresentaram diferenças significativas, sendo as que apresentaram a maior quantidade de Clorofila A, neste ensaio (Fig.7)

#### b) Clorofila B

No caso da quantidade do pigmento Clorofila B, as culturas expostas às condições 2B (luz contínua), 3A (luz azul) e 3B (luz vermelha) mostraram quantidades semelhantes, sendo que não existiram diferenças significativas entre elas, mas apresentaram em comparação com a condição 2A (luz forte), cultura que apresentou novamente a menor quantidade de Clorofila B e apenas não mostrou diferenças significativas quando em comparação com a condição 1B (luz intermédia). A cultura exposta à condição 3B (luz vermelha) foi a que apresentou a maior quantidade de Clorofila B, apresentando diferenças significativas quando em comparação com as condições 1B e 2A (Fig.7).

### c) Carotenoides

No caso da quantidade de Carotenoides, as culturas expostas às condições 1B (luz intermédia), 2B (luz contínua), 3A (luz azul) e 3B (luz vermelha) apresentaram quantidades semelhantes, sendo que não existiram diferenças significativas entre elas. A cultura exposta à condição 2A (luz forte), foi a que apresentou a menor quantidade de Carotenoides, quando em comparação com as outras condições, apresentando diferenças significativas com todas (Fig.7).



**Figura 7-** Conteúdo de pigmentos (Clorofila A, Clorofila B e Carotenoides) obtido para cada condição na experiência da luz (1B - luz intermédia ; 2A - luz forte; 2B - luz contínua; 3A - luz azul; 3B - luz vermelha). Os valores são expressos na unidade Abs 652 nm / g de biomassa seca. Cada condição teve 3 réplicas (n = 3). As diferenças entre grupos foram analisadas pela One-Way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Dunnet's. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes ( $p < 0.05$ ).

Resumindo, a condição de luz azul provou diminuir a quantidade de biomassa que é produzida e também o conteúdo de lípidos. Em termos de quantidade de pigmentos, a luz vermelha e azul mostraram ser as condições mais favoráveis para a produção dos mesmos (clorofilas e carotenoides), contrariamente, a luz forte provocou uma diminuição na produção de todos os pigmentos.

Uma visão geral dos resultados é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1-** Visão geral dos resultados obtidos para a caracterização bioquímica da experiência da luz: + representa aumento, - representa diminuição.

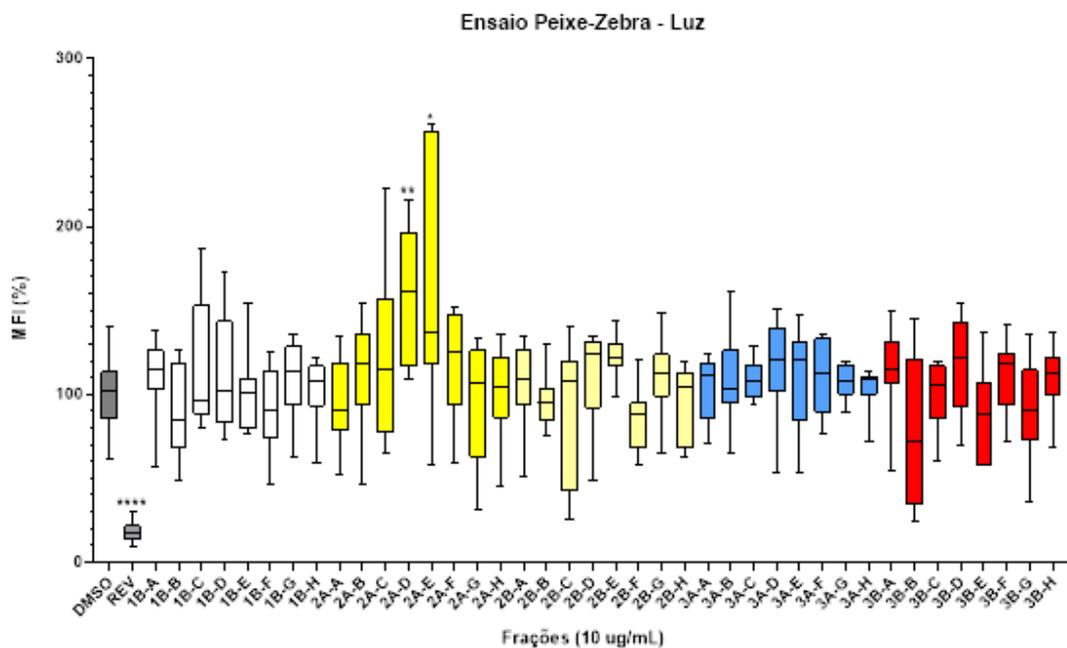
Condição	Parâmetros Bioquímicos			
	Biomassa	Proteínas	Lípidos	Pigmentos
1B (luz intermédia)				
2A (luz forte)				-
2B (luz contínua)				
3A (luz azul)	-		-	
3B (luz vermelha)				+

### 3.1.6. Bioensaio em Peixes-Zebra – Experiência da Luz

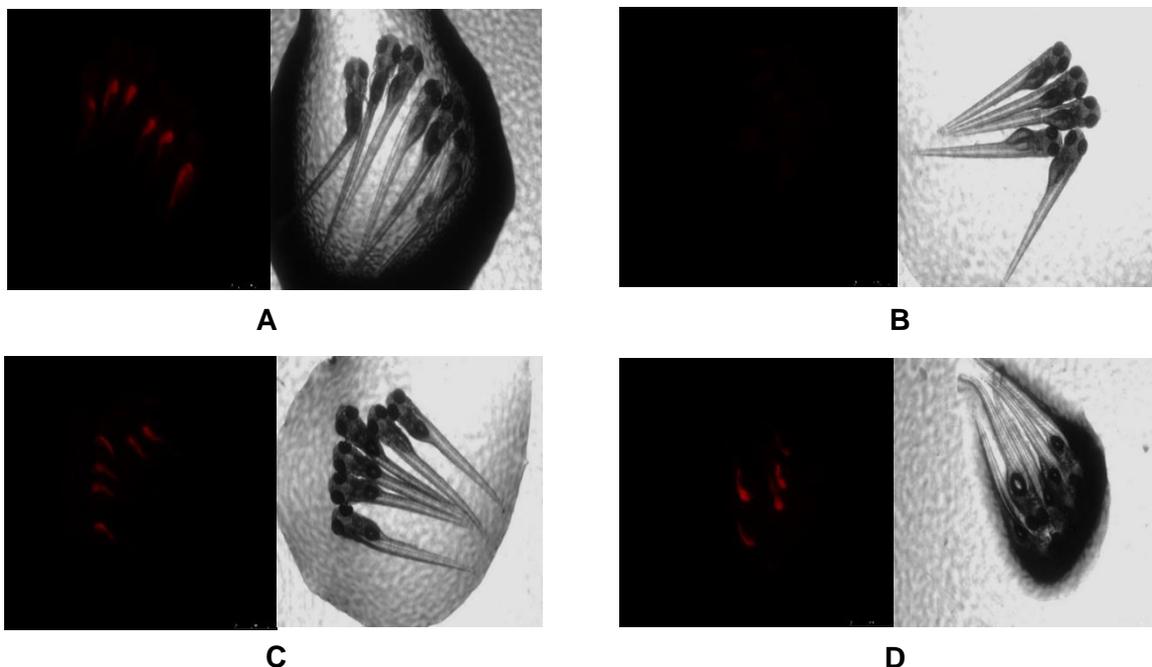
Neste bioensaio foram testadas 40 frações diferentes (8 por extrato) obtidas através do fracionamento por HPLC. Na figura 8, são representados os resultados de dois ensaios independentes, com uma concentração final de 10 µg/mL.

Duas frações obtiveram atividade estatística significativamente diferente do controlo, sendo que tanto a fração 2A-D (fração D pertencente à condição luz forte) como a 2A-E (fração E pertencente à condição luz forte) aumentaram significativamente a intensidade de fluorescência vermelho, correspondente à quantidade de lípidos. As frações 2B-F (fração F pertencente à condição luz contínua) e 3B-B (fração B pertencente à condição luz vermelha) reduziram a quantidade de lípidos em 12,8% ± 19,0 e 25,4% ± 43,2 respetivamente, mas não foram significativamente diferentes em comparação com o controlo DMSO, apresentando uma variabilidade grande entre réplicas.

O controlo positivo reduziu o conteúdo lipídico em 80%, validando a qualidade do ensaio.



**Figura 8-** Atividade anti-obesidade observada em peixes-zebra corados com Vermelho de Nilo – ensaio dos diferentes tipos de luz (10 µg/mL). O controle solvente tinha 0,1% de DMSO e o controle positivo 50 µM de REV. Os valores foram expressos como intensidade média de fluorescência (MFI) em relação ao grupo DMSO, e cada grupo de tratamento tinha 6 a 8 réplicas (n = 6-8). Os dados foram representados com diagramas de caixa. As diferenças estatísticas foram analisadas por Kruskal-Wallis com teste posthoc de Dunn e foram indicadas comparativamente ao controle solvente, com o símbolos \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001.



**Figura 9-** Imagens representativas do bioensaio do metabolismo lipídico com peixe-zebra corados com Vermelho de Nilo – ensaio dos diferentes tipos de luz (10 µg / mL). Imagem **A** representa o controle solvente do ensaio, DMSO (0,1%), a **B** representa o controle positivo, REV (50 µM), a **C** representa a fração 2B-F (10 µg / mL) e a **D** representa a fração 3B-B (10 µg / mL). À esquerda estão representadas as imagens que mostram a fluorescência com contraste vermelho, e à direita as imagens de contraste de fase de larvas de peixe-zebra.

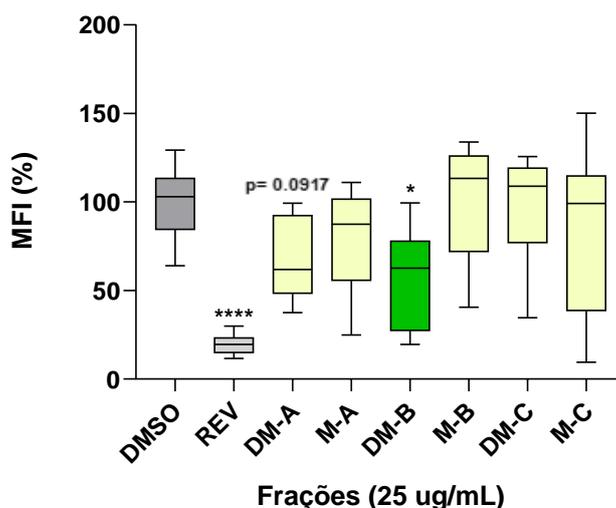
### 3.2. Bioensaio em Peixe-Zebra: Condições do BOGA

Após o término do ensaio com diferentes tipos de luz, e este não ter obtido qualquer bioatividade anti-obesidade como era de esperar, considerando os resultados anteriores, resolvemos rever o procedimento utilizado. Posto isto, verificou-se o tipo de extração orgânica usado, tal como as condições de cultura. Para analisar o efeito destes dois parâmetros realizaram-se dois tipos de extração orgânica, uma utilizando diclorometano e metanol (DM:M) como solventes e a outra apenas utilizando metanol (M), a partir da biomassa da estirpe LEGE06097 que cresceu nas condições do biotério do CIIMAR (BOGA) (temperatura: 20°C, intensidade de luz: 60-90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A extração com M foi utilizada no ensaio de luz (ensaio anterior), e a extração DM:M foi utilizada para este ensaio, com as condições do BOGA. Este procedimento teve como objetivo perceber se o tipo de extração e as condições de cultura, afetam ou não a bioatividade da estirpe LEGE06097.

As frações utilizadas neste bioensaio foram obtidas através do fracionamento ABC, resultando três frações por cada condição a testar (do apolar para polar), sendo que as frações M-A, M-B e M-C pertencem às frações obtidas através da extração metanólica, e as frações DM-A, DM-B e DM-C pertencem à extração com os solventes diclorometano e metanol. As frações foram testadas nos ensaios a uma concentração final de 25  $\mu\text{g/mL}$ .

Como podemos observar pela figura 10, a única fração que obteve diferenças significativas quando comparada com o controlo DMSO, foi a fração **DM-B** (fração B da extração com diclorometano e metanol - DM:M), que reduziu a quantidade de lípidos em cerca de 45.1%  $\pm$  26,90 (Tabela 2.). Também a fração DM-A (fração A da extração com diclorometano e metanol - DM:M) mostrou diferenças em comparação com o controlo (33,6%  $\pm$  22,7), mas não foram significativas ( $p = 0.0917$ ). Pelo contrário, as frações obtidas a partir do extrato de metanol não mostraram quaisquer diferenças vs controlo solvente.

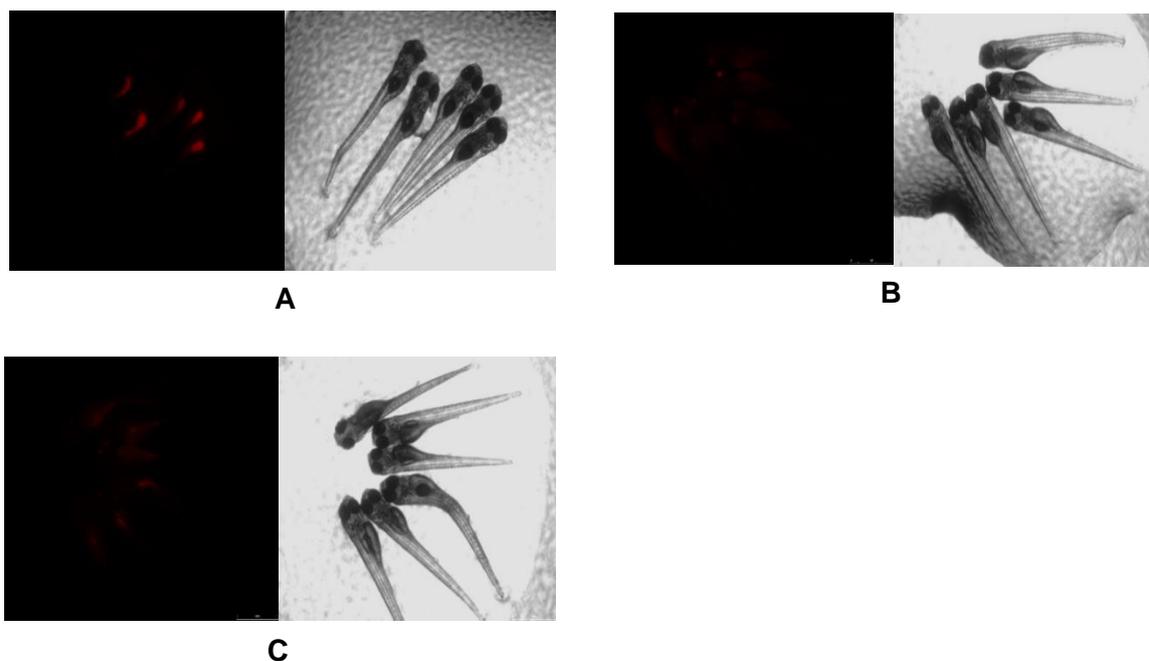
### Ensaio Peixe-Zebra - DCM:MeOH vs MeOH



**Figura 10-** Atividade anti-obesidade com peixes-zebra corados com Vermelho de Nilo- Ensaio das culturas com as condições do BOGA (25  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). O controlo solvente tinha 0,1% de DMSO e o controlo positivo 50  $\mu\text{M}$  de REV. Os valores foram expressos como intensidade média de fluorescência (MFI) em relação ao grupo DMSO, e cada grupo de tratamento tinha 6 a 8 réplicas ( $n = 6-8$ ). Os dados foram representados com diagramas de caixa. As diferenças estatísticas foram analisadas por Kruskal-Wallis com teste posthoc de Dunn e foram indicadas comparativamente ao controlo solvente, com o símbolos \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Tabela 2-** Atividade redutora de lípidos de todas as frações estudadas, de ambas as extrações (DM: M e M), obtidas através das culturas com as condições do BOGA, com a média e desvio padrão (SD) apresentados.

Frações	Tipo de extração	Redução
DM-A	Fração A da extração DM: M	33,6 $\pm$ 22,7
DM-B	Fração B da extração DM: M	45,1 $\pm$ 26,9
DM-C	Fração C da extração DM: M	1,8 $\pm$ 30,1
M-A	Fração A da extração M	20,1 $\pm$ 27,2
M-B	Fração B da extração M	0,33 $\pm$ 32,4
M-C	Fração C da extração M	16,0 $\pm$ 46,3



**Figura 11-** Imagens representativas do ensaio do metabolismo lipídico com peixes-zebra corados com Vermelho de Nilo – Condições BOGA. Imagem **A** representa o controle solvente do ensaio, DMSO (0,1%) , a **B** representa o controle positivo, REV (50 µM) e a **C** representa a fração DM-B (fração B da extração com diclorometano e metanol) a 25 µg/mL, que possui diferenças significativas em relação ao controle. À esquerda estão representadas as imagens da fluorescência com contraste vermelho, e à direita as imagens de contraste de fase de larvas de peixe-zebra.

### 3.3. Experiência das diferentes temperaturas

Com o objetivo de entender como é que a produção de metabolitos é afetada pela temperatura nesta cianobactéria, uma faixa de temperaturas (1A- 10°C; 1B- 14°C; 2A- 18°C; 2B- 22°C; 3A- 26°C; 3B- 30°C) foi testada e diversos parâmetros bioquímicos foram avaliados e analisados quanto a diferenças significativas. Posteriormente, as culturas foram extraídas através da extração com DM:M e fracionadas com o método de fracionamento ABC. As frações resultantes foram testadas quanto à atividade redutora de lípidos, em peixes-zebra.

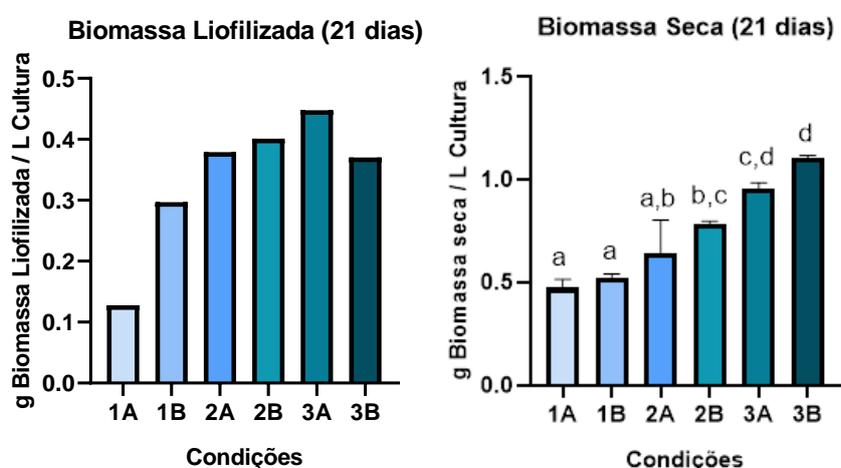
#### 3.3.1. Biomassa Liofilizada

O volume de cultura necessário para a caracterização bioquímica foi retirado, e posteriormente o volume restante foi centrifugado, e o pellet obtido liofilizado para futura extração. As biomassas liofilizadas foram pesadas, o que permitiu uma avaliação do crescimento das culturas. As massas obtidas 1A (127,6 mg), 1B (296,8 mg), 2A (379,1 mg), 2B (400,9 mg), 3A (447,8 mg), 3B (370,4 mg) (Fig.12).

### 3.3.2. Biomassa Seca

A biomassa seca é considerada uma medida para o crescimento de cianobactérias e foi usada como fator de normalização para todos os outros parâmetros deste ensaio.

As culturas expostas às condições 1A (10°C), 1B (14°C) e 2A (18°C) mostraram valores de biomassa seca semelhantes, e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre elas, sendo as culturas que apresentaram um menor crescimento. As condições 1A, e 1B apresentaram diferenças significativas com as condições 2B (22°C), 3A (26°C) e 3B (30°C), sendo esta última condição a que apresentou o maior crescimento neste ensaio e apenas não apresentou diferenças significativas com a condição 3A (Fig.12).



**Figura 12-** Biomassa liofilizada (à esquerda) e biomassa seca (à direita) obtidas para cada condição na experiência da temperatura (1A- 10°C; 1B – 14°C; ; 2A – 18°C; 2B – 22°C; 3A – 26°C; 3B – 30°C). À esquerda, os valores são expressos em g de biomassa liofilizada / L de cultura (n = 1) e à direita g biomassa seca / L cultura (n=3). As diferenças significativas entre grupos foram analisadas pela One-Way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Dunnet's. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes ( $p < 0.05$ ).

### 3.3.3. Conteúdo de Proteínas

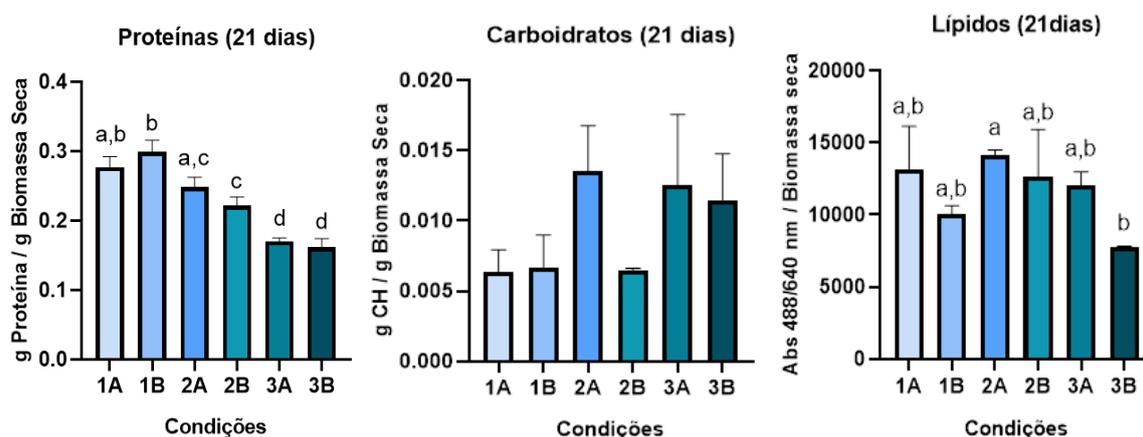
A cultura exposta à condição 1B (14°C) foi a que mostrou o maior conteúdo de proteínas deste ensaio, sendo que não apresentou diferenças significativas com a condição 1A (10°C), mas apresentou diferenças significativas com todas as outras condições, 2A (18°C), 2B (22°C), 3A (26°C) e 3B (30°C), sendo esta última a que apresentou um menor conteúdo de proteínas (Fig.13).

### 3.3.4. Conteúdo de Carboidratos

Não foram encontradas diferenças significativas no conteúdo de carboidratos entre as diferentes condições de temperatura testadas (Fig.13).

### 3.3.5. Conteúdo de Lípidos

A culturas expostas às condições 1A (10°C), 1B (14°C), 2A (18°C), 2B (22°C), e 3A (26°C) mostraram quantidades de lípidos semelhantes e não apresentaram diferenças significativas entre elas. Pelo contrário, a condição 2A, que obteve a maior quantidade de lípidos, apresentou diferenças significativas em relação à cultura exposta à condição 3B (30°C), que foi a condição que obteve a menor quantidade de lípidos (Fig.13).



**Figura 13-** Conteúdo de proteínas (esquerda), carboidratos (meio) e lípidos (direita), obtidos para cada condição na experiência da temperatura (1A 10 °C; 1B 14 °C; 2A 18 °C; 2B 22 °C; 3A 26 °C; 3B 30 °C). Os valores são expressos em g proteína / g biomassa seca (esquerda), g hidratos de carbono / g biomassa seca (meio) e em unidade de intensidade de fluorescência (UFI) / g biomassa seca (direita) (n 3). Os dados foram apresentados em gráficos de barras com desvio padrão. As diferenças significativas do conteúdo de proteínas e carboidratos foram analisadas pela One-Way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Dunnet's e do conteúdo de lípidos foram analisadas por Kruskal-Wallis através do teste de comparação múltipla de Dunn. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes

### 3.3.6. Pigmentos

#### a) Clorofila A

A cultura exposta à condição 1A (10°C), que obteve a menor quantidade de Clorofila A, demonstrou ser significativamente diferente quando comparada com todas as outras condições estudadas, à exceção da condição 1B (14°C). A condição 3B (30°C), foi a que obteve a maior quantidade deste pigmento (Fig.14).

#### b) Clorofila B

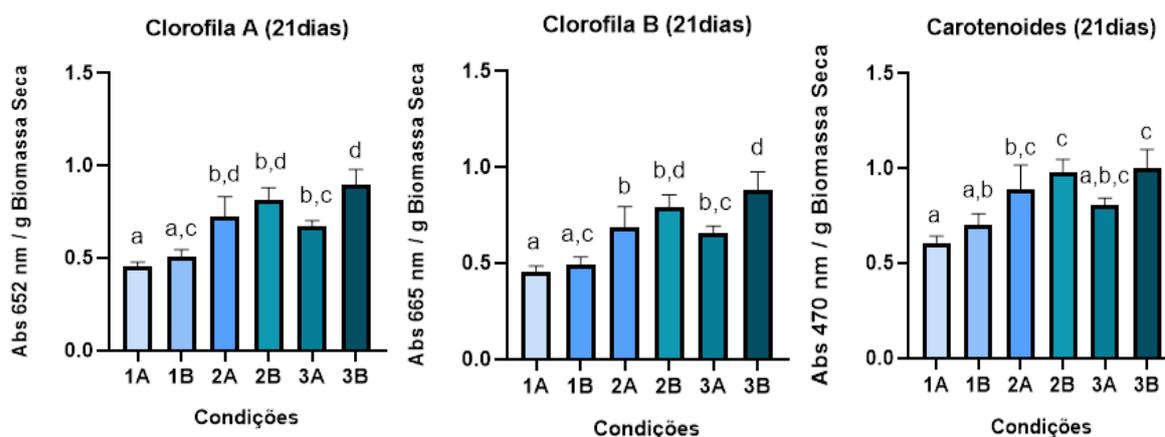
As culturas expostas às condições 1A (10°C) e 1B (14°C) mostraram quantidades de Clorofila B semelhantes, sendo que não existiram diferenças significativas entre elas. Também as culturas expostas às condições 2A (18°C), 2B (22°C) e 3A (26°C) demonstraram quantidades de Clorofila B semelhantes, sendo que não existiram diferenças significativas entre elas.

A condição 1A, que obteve a menor quantidade de Clorofila B, demonstrou ser significativamente diferente quando comparada com todas as outras condições estudadas, à exceção da condição 1B. A condição 3B (30°C), foi a que obteve a maior quantidade deste pigmento, demonstrando diferenças significativas com todas as outras condições (Fig.14).

### c) Carotenoides

As culturas expostas às condições 1A (10°C), 1B (14°C) e 3A (26°C), mostraram quantidades de Carotenoides semelhantes, sendo que não existiram diferenças significativas entre elas. Ocorreu o mesmo com as culturas expostas às condições 1B, 2A (18°C) e 3A que demonstraram também quantidades de Carotenoides semelhantes, e por isso, não apresentaram diferenças significativas entre elas.

A condição 1A foi a que obteve a menor quantidade deste pigmento, e a condição 3B (30°C) obteve a maior quantidade, sendo significativamente diferentes entre elas (Fig.14).



**Figura 14-** Conteúdo de pigmentos (Clorofila A, Clorofila B e Carotenoides), obtidos para cada condição da experiência da temperatura (1A 10 °C; 1B 14 °C; 2A 18 °C; 2B 22 °C; 3A 26 °C; 3B 30 °C). Os valores são expressos em unidade Abs 652 nm / g de biomassa seca para Clorofila A, unidade Abs 665 nm / g de biomassa seca para Clorofila B e Unidade Abs 470 nm / g de biomassa seca para Carotenóides (n =3). As diferenças entre grupos foram analisadas pela One-Way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Dunnett's. Diferenças significativas foram representadas com letras diferentes (p < 0.05).

Os resultados desta experiência mostraram que quanto mais alta é a temperatura, maior é o crescimento, sendo que a maior produção de biomassa foi a 30°C e a menor a 10°C. Em termos de conteúdo de proteínas, o maior conteúdo foi obtido a temperaturas mais baixas (10°C e 14°C), e o menor a temperaturas mais altas (26°C e 30°C). O conteúdo de lípidos apenas foi afetado, e negativamente, pela temperatura mais alta do ensaio, 30°C.

Contrariamente, o maior conteúdo de pigmentos foi obtido na condição a 30°C e o menor pela condição a 10°C. Ou seja, quanto maior for a temperatura, menor será a produção de lípidos e maior será a quantidade de pigmentos.

Uma visão geral dos resultados é apresentada na Tabela 3.

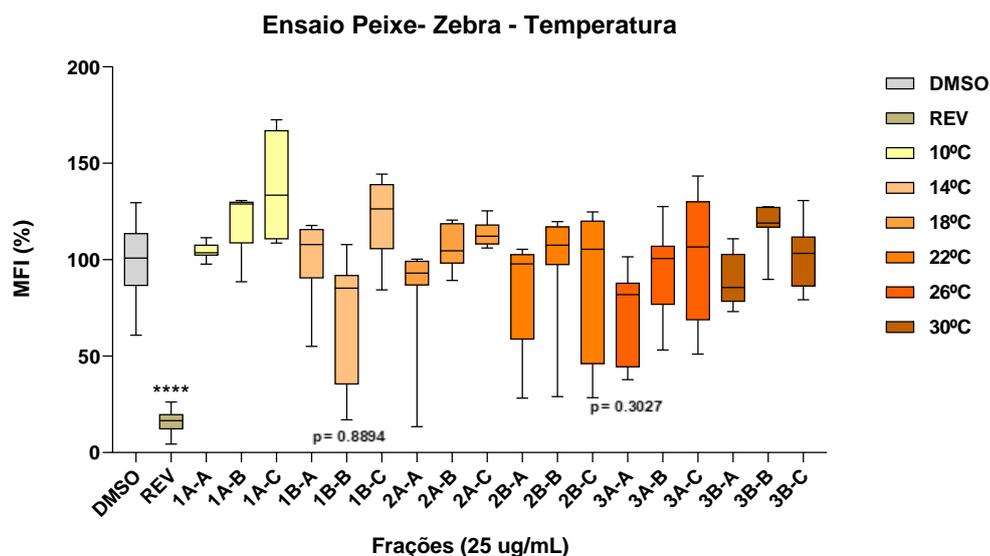
**Tabela 3-** Visão geral dos resultados obtidos para a caracterização bioquímica da experiência da temperatura: + representa aumento, - representa diminuição.

Condição	Parâmetros Bioquímicos				
	Biomassa	Proteínas	Carboidratos	Lípidos	Pigmentos
1A (10°C)	-	+			-
1B (14°C)	-	+			
2A (18°C)					
2B (22°C)					
3A (26°C)	+	-			
3B (30°C)	+	-		-	+

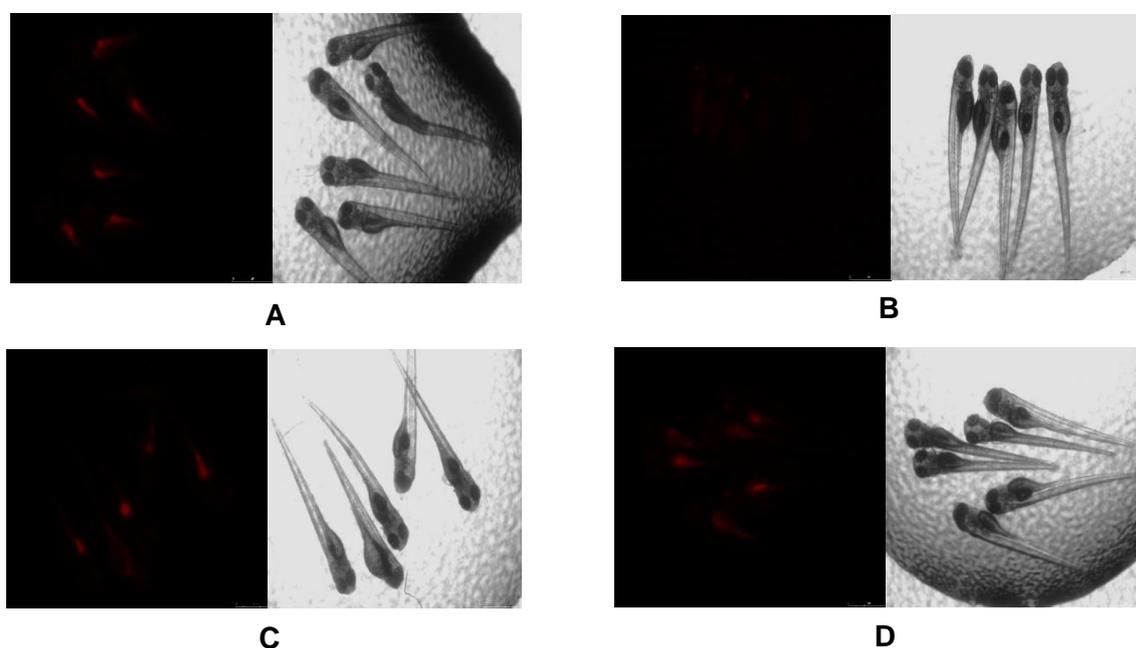
### 3.3.7. Bioensaio em Peixes-Zebra - Experiência da Temperatura

Neste bioensaio foram testadas 18 frações diferentes (3 por extrato) obtidas através do fracionamento ABC e extraídas com os solventes diclorometano e metanol. Na figura 15 estão representados os resultados de dois ensaios independentes (n= 10-12) referentes às diferentes temperaturas testadas.

As frações obtidas foram analisados a uma concentração final de 25 µg/mL. Nenhuma das frações testadas obteve atividade estatística significativamente diferente do controlo, ou seja, nenhuma apresentou atividade de redução de lípidos. As frações 1B-B (fração B, 14°C) e 3A-A (fração A, 26°C) apresentaram uma redução de 28,0% ± 6,0 (valor p = 0,8894) e 27,8% ± 7,6 (valor p = 0,3027), respetivamente, mas não apresentaram diferenças significativas.



**Figura 15-** Atividade redutora de lípidos no ensaio metabolismo lipídico com peixe-zebra corados com Vermelho de Nilo – ensaio de exposição da estirpe LEGE06097 crescida a diferentes temperaturas (25 µg / mL). O controlo solvente tinha 0,1% de DMSO e o controlo positivo 50 µM de REV. Os valores foram expressos como intensidade média de fluorescência (MFI) em relação ao grupo DMSO, e cada grupo de tratamento tinha 10-12 réplicas (n = 10-12). Os dados foram representados com diagramas de caixa. As diferenças estatísticas foram analisadas por Kruskal-Wallis com teste posthoc de Dunn e foram indicadas comparativamente ao controlo solvente, com o símbolos \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001.



**Figura 16-** Imagens representativas do ensaio do metabolismo lipídico com peixe-zebra corados com Vermelho de Nilo – Ensaio da exposição das culturas a diferentes temperaturas. **A** representa o controlo solvente do ensaio, DMSO (0,1%), **B** representa o controlo positivo, REV (50 µM), **C** representa a fração 1B-B (fração B, a 14°C) e **D** representa a fração 3A-A (fração A, a 26°C), ambas a uma concentração de 25 µg/mL, que não apresentaram diferenças significativas em relação ao controlo. À esquerda estão representadas as imagens da fluorescência com contraste vermelho, e à direita as imagens de contraste de fase de larvas de peixe-zebra.

### 3.4. Perfil do Metabolito

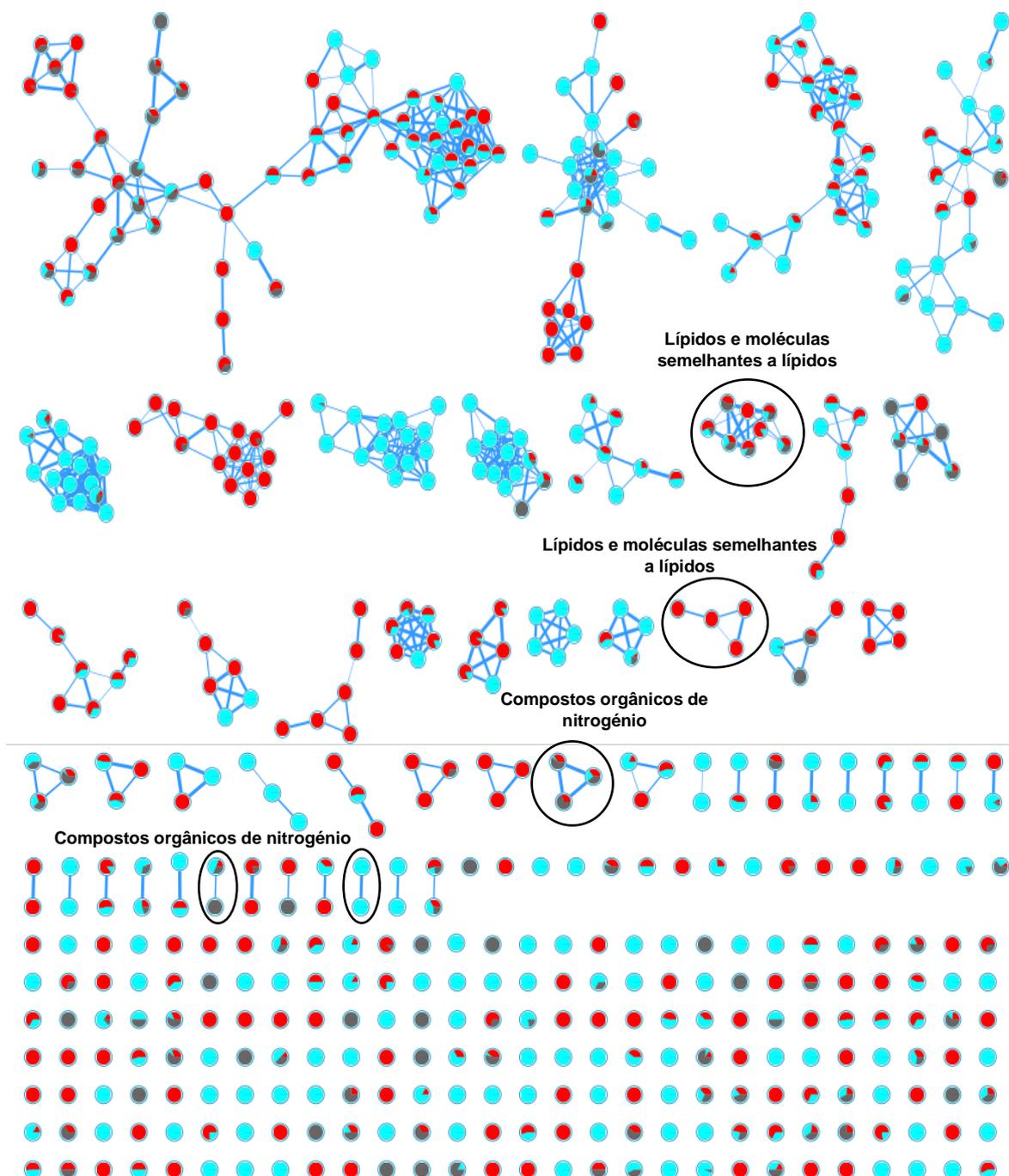
Para realizar a análise através de LC-MS/MS, escolhemos as frações provenientes do ensaio com as condições do BOGA, em que realizámos duas extrações diferentes (DM:M vs M). O objetivo era identificar os metabolitos que foram extraídos com o tipo de extração orgânica que alterou significativamente a bioatividade das frações obtidas.

Para tal, foram selecionadas duas frações bioativas (Fração B Diclorometano + Metanol (DM:M) e extrato bruto de DM:M) e duas frações não ativas (Fração B Metanol (M) e extrato bruto M), sendo que todas as amostras pertenciam à mesma cianobactéria, *Cyanobium sp.* LEGE 06097. Efetuaram-se duas análises diferentes, a primeira realizou-se com a Fração B extraída com DM e M (ativa), e a Fração B extraída apenas com M (não ativa). A análise comparativa do metaboloma permitiu a identificação de compostos conhecidos ou desconhecidos, exclusivos das frações bioativas (ativas). Na segunda análise foram comparados os extratos brutos, o extrato bruto extraído com DM:M e o extrato bruto extraído com M.

As duas redes moleculares (Figura 17 e 18) foram então obtidas através da análise pela plataforma GNPS (Rede Global de Material Molecular de Produtos Naturais).

As redes moleculares são compostas por nodos, sendo que cada um representa um pico de massa (valor  $m/z$  e tempo de retenção). As ligações entre nodos (espectro a espectro) são chamadas de aresta (Wang et al., 2016). Através de um nodo de cor no programa Cytoscape, é possível visualizar conjuntos de nodos (clusters) pertencentes a frações ativas, sugerindo estruturas moleculares bioativas comuns. Os nodos representados por uma única cor indicam que ele pertence apenas a uma fração, ativa ou não ativa. No entanto, os nodos também podem conter várias cores, o que significa que eles estão presentes em várias frações, ativas e não ativas. No entanto, se os nodos pertencerem a uma fração ativa específica, os possíveis compostos encontrados serão provavelmente a causa da bioatividade observada, em relação a outra (Olivon et al., 2017).

### 3.4.1. 1ª Análise

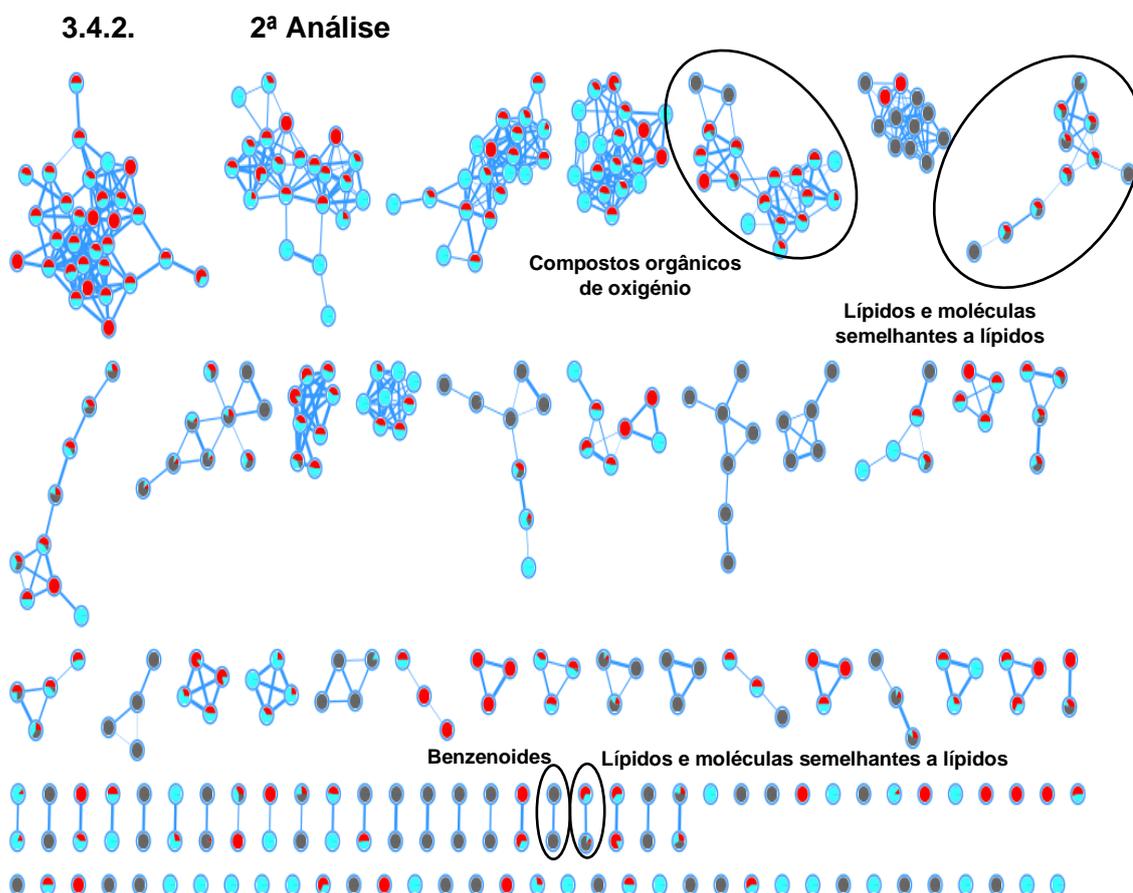


**Figura 17-** Rede molecular das frações B BOGA (Extração com DM:M vs extração com M) obtida pela plataforma GNPS e visualizada com o programa Cytoscape. A **azul-claro** está representada a fração ativa (fração B DM:M), a **vermelho** está representada a fração não ativa (fração B M) e **cinzento** está representado o branco da análise.

Através da figura 17, podemos observar a primeira análise molecular efetuada às frações B BOGA, os nodos da fração B ativa (extraída com diclorometano e metanol) foram representados a azul-claro. Os metabolitos constituintes da fração não ativa (fração B

extraída com metanol), também foram incluídos na análise, sendo esses os nodos representados a vermelho e o branco da análise foi representado a cinzento. Todos os principais picos encontrados na fração ativa analisada, bem como todas as informações obtidas pelas bases de dados (GNPS, DNP e Atlas) e o cálculo do erro m/z dos mesmos, em ppm, foram descritos na tabela 5, em anexo (Anexo I).

Na rede molecular da primeira análise foram encontrados 57 nodos exclusivos da fração ativa e 6 nodos compartilhados entre a fração ativa e não ativa. Sendo que dos 57 nodos pertencentes exclusivamente à fração ativa, apenas 36 foram efetivamente identificados através das bases de dados disponíveis, ou seja, identificaram-se putativamente 63,16% dos metabolitos e cerca de 36,84% eram considerados desconhecidos, sendo que podem pertencer a moléculas novas. Através do cytoscape verificámos qual a classificação dos clusters presentes, sendo que na maioria pertenciam a lípidos/moléculas semelhantes e compostos orgânicos de nitrogénio.



**Figura 18-** Rede molecular dos extratos brutos BOGA (Extração com diclorometano e metanol vs extração metanólica) obtida pela plataforma GNPS e visualizada com o programa cytoscape. A **azul-claro** está representada a fração ativa (extrato bruto DM:M), a **vermelho** está apresentada a fração não ativa (extrato bruto M) e a **cinzento** está representado o branco da análise.

Na Figura 18, podemos observar a segunda análise molecular efetuada aos extratos que deram origem as frações analisadas primeiramente, sendo novamente extraídos de forma diferente, um com diclorometano e metanol e o segundo apenas com metanol. Os nodos do extrato DM:M (fração ativa) foram representados a azul-claro, os metabolitos constituintes do extrato M (fração não ativa) foram representados a vermelho e o branco da análise foi representado a cinzento.

Na rede molecular da segunda análise foram encontrados 14 nodos exclusivos da fração ativa e 20 nodos compartilhados entre a fração ativa e não ativa. Dos 14 nodos pertencentes exclusivamente à fração ativa, apenas 5 foram efetivamente identificados através das bases de dados disponíveis, ou seja, identificaram-se putativamente 35,71% dos metabolitos e cerca de 64,29% são desconhecidos, sendo que podem pertencer a moléculas novas. Através do cytoscape verificámos qual a classificação dos clusters presentes, sendo que na maioria pertenciam a lípidos/moléculas semelhantes, compostos orgânicos de oxigénio e benzenoides.

Os principais picos encontrados e não encontrados na análise do extrato ativo, bem como todas as informações obtidas pelas bases de dados (GNPS, DNP e Atlas) e o cálculo do erro  $m/z$  dos mesmos, em ppm, estão representados na Tabela 4.

**Tabela 4-** Tabela representativa dos compostos únicos identificados através da segunda análise molecular, no Cytoscape. Compostos esses pertencentes exclusivamente ao extrato bruto com as condições BOGA, extraído com diclorometano e metanol. Na tabela estão representados os compostos identificados, e também os não identificados (moléculas novas).

M+H	RT	Putative identification	Adduct	PPM	Fórmula	Fonte
871,573	954,35	Haliclonamide_B_O-(2-Hydroxy-3-methyl-3-butenyl)	M+H			Dereplicator
		Pheophytin a	M+H	-0,8627	C55H74N4O5	DNP
893,542	828,05	Chlorophyll a		-1,2806	C55H72MgN4O5	DNP
		Oscilol		0,5490	C52H76O12	
737,451	945,40	Antanapeptin A		2,7891	C41H60N4O8	DNP
819,530	1107,91	1,2-Diacylglycerol 6-sulfoquinovosides		0,9395	C43H78O12S	DNP
764,470	954,82	Rolloamide A		-1,4120	C41H61N7O7	DNP
817,514	1082,85	Não identificado				
792,502	1063,92	Não identificado				
761,452	916,16	Não identificado				
1425,02	767,41	Não identificado				
915,524	839,74	Não identificado				
869,558	883,43	Não identificado				
869,558	868,98	Não identificado				
1742,14	882,04	Não identificado				

## 4. Discussão

As cianobactérias são organismos capazes de uma adaptação incrível ao meio ambiente, conseguindo alterar as suas vias metabólicas para produzir metabolitos secundários que lhes permitem sobreviver e crescer em situações de stress (Mazard et al., 2016). Esses metabolitos muitas vezes têm propriedades bioativas, que podem apresentar potencial no tratamento de muitas doenças, nomeadamente doenças metabólicas, como é o caso da obesidade (Brito et al., 2015). Juntamente com os metabolitos secundários, a concentração de outros componentes das células cianobacterianas, como é o caso das proteínas, carboidratos, lípidos e pigmentos, também são alterados com essa adaptação (Encarnação et al., 2015). Assim, modificações na composição bioquímica das células são um indicador de metabolismo alterado (Chen et al., 2017; Paliwal et al., 2017).

Como organismos fotoautotróficos, as cianobactérias necessitam de uma fonte de luz para obter energia e convertê-la em energia química como ATP e NADP, sendo que tanto a quantidade, como a qualidade da luz, afetam o metabolismo celular e, portanto, modulam a composição da biomassa (Choi et al., 2015; Sánchez-Bayo et al., 2020).

O fotoperíodo regula a divisão celular, que ocorre durante o período de luz, e é acelerado sob condições de iluminação contínua (Sánchez-Bayo et al., 2020). No entanto, a fotossíntese oxigenada leva ao fotodano do fotossistema II (PSII). Uma vez que o fluxo fotossintético dos eletrões inicia com a redução da plastoquinona por eletrões libertados pela oxidação da água no PSII, o acúmulo de PSII fotodanificado diminui a atividade fotossintética (Zavafer et al., 2015). Quando a taxa de fotodano ultrapassa a taxa de reparo PSII, ocorre a fotoinibição e, quando severa, pode levar à diminuição do crescimento, ou até à morte celular (Komenda et al., 2012). Tal acontecimento normalmente ocorre em condições de stress ambiental, como é o caso de quando as células de microalgas são submetidas a altas intensidades de luz ou a outras formas de stress, o excesso de eletrões na cadeia de transporte de eletrões fotossintéticos induz a produção de numerosos ROS, causando assim, a inibição da fotossíntese, co-oxidação de pigmentos, peroxidação de lípidos, destruição de membrana, ou até desnaturação de proteínas (He et al., 2015). Para minimizar os efeitos do stress oxidativo nas células, as cianobactérias podem produzir lípidos ou carboidratos, que podem servir como recetores para dissipar o excesso de eletrões, sendo que o tipo de composto produtor de energia que se acumula na célula microalgal parece ser específico de cada espécie (Ho et al., 2014). O conhecimento das condições individuais de crescimento das cianobactérias permite a produção de biomassa com uma composição precisamente definida, podendo utilizar a influência combinada da luz e da temperatura (Khan et al., 2018). As espécies de cianobactérias variam em termos

das suas necessidades de luz para o máximo crescimento e acúmulo de biomassa, sendo que expostas a intensidades de luz muito baixas e muito altas, tendem a não crescer com eficiência (Mata et al., 2010; Ye et al., 2012).

Um estudo utilizando *Scenedesmus obliquus*, no qual se expôs microalga a 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de luz branca sob fotoperíodo de 24 horas dia e 12 horas dia:12 horas noite, revelou que condições de luz contínua levaram a uma acumulação de biomassa. No entanto, no mesmo estudo observou-se que a luz contínua diminuiu o conteúdo de clorofila, e o conteúdo de proteínas (Vendruscolo et al., 2019). No presente estudo, com LEGE06097, a condição de luz contínua não pareceu interferir negativamente no teor de clorofilas e carotenóides, porém provocou uma diminuição na produção de proteínas. Ainda assim, uma diminuição na quantidade de clorofilas com a longa exposição à luz é consistente com a natureza deste pigmento, pois as duas principais enzimas envolvidas na síntese biológica de clorofila A, glutamil-tRNA redutase (GluTR) e glutamato 1-semialdeído aminotransferase (GSA-AT), são sensíveis à luz e por isso, a sua atividade pode ser inibida com a exposição excessiva à luz (Ma et al., 2017). Além disso, quando expostas às condições ideais de cultivo, as cianobactérias tendem a produzir mais proteínas para manter a multiplicação celular e a produção de biomassa (da Fontoura Prates et al., 2018), por isso, o baixo teor de proteína sob luz contínua pode indicar que as células não se encontravam em condições ideais e a longa exposição à luz possivelmente podia estar a causar fotodano, sendo que o conteúdo de pigmentos pode mostrar que foram acumulados durante o crescimento ideal e ainda não tinham sido afetados por este processo no momento em que o ensaio terminou.

O crescimento sob luz forte neste ensaio foi apenas ligeiramente inferior ao verificado sob luz intermédia e contínua. Além disso, estas três condições induziram a produção de lípidos, o que sugere que as células se encontravam sob stress (Ho et al., 2014). No estudo desenvolvido por Guyon et al., 2018, a estirpe OTTH595 de *Ostreococcus* mostrou um crescimento similar ao ser exposta a uma intensidade de luz de 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e 500  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . No estudo de He et al., 2015, as microalgas *Chlorella sp.* e *Monoraphidium dybowskii*, expostas a 40, 200 e 400  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidade de luz, verificou-se que a maior intensidade de luz levou a um crescimento rápido nos primeiros dias, mas acabou por ser superada pela intensidade de luz intermédia, provavelmente devido à fotoinibição. De acordo com Khatoon et al., 2018, o maior conteúdo total de ficobiliproteína foi encontrado no extrato aquoso de *P. mucicola* quando cultivado sob luz intermédia (180  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Foi relatado por Ojit et al., 2015, que o aumento da disponibilidade de luz costuma levar à diminuição do teor de clorofila A nas cianobactérias, como estratégia para prevenção de danos foto-oxidativos causados pela produção de

radicais livres. No mecanismo de fotoinibição, a luz forte induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que inativa diretamente o centro de reação fotoquímica do PSII (Murata et al., 2007).

Além disso, também a luz vermelha potencializou um forte crescimento, tal como no estudo de Olaizola e Duerr, 1990, em avaliaram o potencial de *A. platensis* cultivado sob luzes branca, azul e vermelha, provaram que esta última forneceu uma produção semelhante à luz branca, sendo as condições onde existiu maior quantidade de biomassa a ser produzida. Por outro lado, a luz vermelha obteve uma menor quantidade de lípidos, sendo que obteve um dos maiores crescimentos do nosso ensaio, com LEGE06097, indicando que as células não se encontravam sob stress, pois a produção de lípidos não foi estimulada (Ho et al., 2014). No estudo de Pagels et al., 2020, onde avaliaram a acumulação de pigmentos em *Cyanobium sp.* LEGE06113, usando diferentes qualidades de luz, os resultados mostraram a regulação positiva da produção de carotenoides sob a suplementação de luz vermelha.

Já foi provado que LEDs azuis podem causar stress celular, resultando numa maior produção e consequente acumulação de lípidos, sendo que neste trabalho aconteceu o oposto, tal como no estudo de Singh et al., 2010, onde a cianobactéria estudada quando exposta a luz azul, diminuiu a produção de lípidos. Esta redução com luz azul pode acontecer devido à peroxidação lipídica induzida por essa qualidade de luz. Além disso, a luz azul e a radiação UV foram sugeridas como principais fatores reguladores da composição lipídica em cianobactérias e microalgas (Schulze et al., 2014; Montero et al., 2016). Tal como no presente estudo, uma diminuição no crescimento com luz azul também foi observado por Katsuda et al., 2004, sendo que *H. pluvialis* apresentou maior crescimento vegetativo quando exposta a LED vermelho, e quando submetida a LED azul, foi observada uma supressão no crescimento. Nas cianobactérias, a absorção da luz azul é feita de forma menos eficaz (Schulze et al., 2014), dando muitas vezes origem a uma diminuição na produção de biomassa e no conteúdo de lípidos (Duarte e Costa, 2018). A luz azul não provocou assim stress celular, e por isso a produção de lípidos não foi estimulada (da Fontoura Prates et al., 2018). Esta condição de luz, muito provavelmente via fotorreceptores como as fototropinas, parece induzir a acumulação de pigmentos em várias espécies (Fu et al., 2013; Katsuda et al., 2004). Foi observada essa tendência nos resultados do presente estudo, sendo que a condição de luz azul, juntamente com a luz vermelha, foram as que apresentaram maior conteúdo de pigmentos. Além disso, como a energia dos fótons azuis é maior do que a necessária para a fotossíntese (Kommareddy e Anderson, 2003), a luz azul pode resultar em extinção não fotossintética (NPQ), gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) (Fu et al., 2013), e portanto, para proteger o aparelho

fotossintético contra ROS, as algas e plantas acumulam pigmentos fotoprotetores (por exemplo, xantofilas) (Olle e Viršile, 2013; Fu et al., 2013).

No geral, a luz forte parece causar stress a *Cyanobium sp.* LEGE06097, principalmente devido ao aumento da produção de lípidos. A luz vermelha surge como uma condição ideal para um crescimento robusto. A luz contínua também induziu um forte crescimento, no entanto, o conteúdo de proteína diminuiu, o que pode sugerir fotoinibição. A luz intermédia foi a condição mais semelhante com as condições existentes no BOGA, e revelou tanto um dos maiores crescimentos, como também a maior produção de proteína do ensaio, o que indica que as cianobactérias não se encontravam sob stress e as funções celulares estavam a funcionar normalmente. Se o objetivo fosse produzir uma grande quantidade de biomassa, a luz vermelha seria a melhor escolha, pois apresenta um dos maiores crescimentos, e parece não induzir stress. Porém, o objetivo era otimizar as condições de cultivo para produção de metabolitos com propriedades anti-obesidade.

O bioensaio do metabolismo da gordura vermelha de Nilo em peixes-zebra, realizado com as frações obtidas na experiência da luz, mostrou que nenhuma das frações testadas apresentava a capacidade de reduzir os lípidos neutros em larvas de peixe-zebra, ou seja, nenhuma demonstrou atividade anti-obesidade. Sendo que duas frações mostraram aumentar significativamente a quantidade de lípidos (2A-D e 2A-E, fração D e E pertencentes ao tratamento de luz forte), o que dá a entender que o tratamento com luz forte parece favorecer a acumulação de lípidos nas larvas. Muito provavelmente nesta acumulação de lípidos esta envolvido o recetor PPAR $\gamma$ , que controla a regulação da adipogenese e metabolismo dos lípidos. Agonistas do PPAR $\gamma$  são utilizados no tratamento da diabetes, mas não para a obesidade (Gross e Staels, 2007). A ausência da esperada atividade anti-obesidade como descrito num estudo anterior (Costa et al., 2019), mostrou que as próprias condições de luz podem estar a afetar a produção de metabolitos, porque embora as condições de luz intermédia fossem semelhantes às condições existentes no BOGA, existiam algumas disparidades importantes, nomeadamente intensidade de luz ( $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  vs  $60\text{-}90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e temperatura ( $25^\circ\text{C}$  vs  $20^\circ\text{C}$ ). Além disso, as culturas da experiência da luz foram extraídas utilizando apenas o solvente metanol (M), e a metodologia de extração original, aplicada na triagem inicial, foi realizada com diclorometano e metanol (DM:M). Assim, as culturas extraídas usando diferentes metodologias foram comparadas no bioensaio do peixe-zebra, e esses podem ter sido os motivos para os resultados terem sido diferentes. Só é possível efetuar uma correta separação, identificação e caracterização de compostos bioativos, se o processo de extração for bem realizado, e se o solvente for o mais apropriado (Azmir et al., 2013).

De seguida, culturas do biotério do CIIMAR (BOGA) foram extraídas com as duas metodologias. Os resultados revelaram que a metodologia de extração teve um impacto substancial nas bioatividades, sendo que utilizando a extração orgânica apenas com o solvente metanol não se observou bioatividade em nenhuma das frações testadas, enquanto a extração com diclorometano e metanol já revelou bioatividade, nomeadamente na fração B com uma redução de cerca de 45% ( $45,1 \pm 26,9$ ). Além disso, os resultados obtidos com a extração diclorometano:metanol mostraram desvios padrões menos variáveis, sendo este método de extração escolhido para as culturas da experiência da temperatura.

A temperatura é um dos fatores mais importantes no cultivo de microalgas, e está altamente correlacionado com a taxa de crescimento (Ho et al., 2014), também influencia diretamente os processos bioquímicos, incluindo a fotossíntese, e o fabrico de células, bem como o tamanho da célula e as necessidades de nutrientes. Cada espécie tem sua própria temperatura ótima de crescimento (Pagels et al., 2020; Fatma, 2009), sendo que se aumentarmos exponencialmente a temperatura para a faixa ideal irá aumentar também o seu crescimento, mas um aumento ou diminuição na temperatura além do ponto ideal retarda ou mesmo interrompe o crescimento e a atividade das algas (Béchet et al., 2017). Em condições supra-ótimas de temperatura, a degradação da proteína é induzida levando à mortalidade celular. Além disso, o stress provocado pela temperatura afeta fortemente a dinâmica de ROS, causando dano oxidativo progressivo e, em última instância, morte celular (Serra-Maia et al., 2016).

LEGE06097 foi exposta a uma gama de temperaturas, nomeadamente 10°C, 14°C, 18°C, 22°C, 26°C e 30°C. Como esperado, a produção de biomassa aumentou gradualmente com o aumento da temperatura. O crescimento celular foi semelhante e particularmente alto a 26°C e 30°C, sugerindo que a temperatura ideal de crescimento para esta cianobactéria está em torno desta faixa. Observações semelhantes foram relatadas por muitos outros pesquisadores, Ranjitha e Kaushik, 2005, relataram que a maior biomassa em *Nostoc muscorum* foi obtida a 30°C. A faixa de temperatura ideal para a maioria das espécies de cianobactérias é entre os 20°C e os 30°C, sendo que existem estirpes que suportam temperaturas superiores (Singh et al., 2015).

Baixas temperaturas podem afetar a fotossíntese, reduzindo a atividade de assimilação de carbono, enquanto temperaturas muito altas reduzem a fotossíntese ao inativar as proteínas fotossintéticas e perturbar o equilíbrio de energia na célula. O declínio na fotossíntese resulta numa diminuição da taxa de crescimento (Atkinson et al., 2003). Em termos de proteínas produzidas pela cianobactéria em estudo, observou-se um

decréscimo no conteúdo das mesmas, a partir da temperatura 14°C, onde apresentou o maior conteúdo de proteínas, até aos 30°C, sendo a condição com o menor conteúdo de proteínas. No estudo de Pagels et al., 2019, foi observado o efeito negativo do aumento da temperatura na produção de ficobiliproteína, uma proteína existente em *Cyanobium sp.*, o que se opõe à tendência geral das cianobactérias, que costumam associar uma maior produção de proteínas a altas temperaturas ( $\geq 30^\circ\text{C}$ ), também no estudo de Sakamoto e Bryant, 1997, fixaram como condição ótima 22°C para a produção de proteínas em *Synechococcus sp.* PCC 7002, sendo que a temperaturas superiores observava-se uma diminuição.

A temperatura também afeta diretamente o conteúdo lipídico e a composição de ácidos gordos nos organismos, mas a natureza e a magnitude desse efeito ainda não é bem caracterizada (Pettitt et al., 1989; Guschina e Harwood, 2006). Várias descrições distintas de como a temperatura afeta o acúmulo de lípidos foram relatadas, por exemplo, *Synechocystis sp.* O PCC6803 demonstrou um crescimento ideal entre 30-33°C, e inibição da produção de lípidos a 18°C, 22°C e 40°C (Sheng et al., 2011). A temperaturas mais baixas, as células frequentemente modificam a sua membrana celular para incorporar mais ácidos gordos insaturados, conferindo maior fluidez à membrana, enquanto a temperaturas mais altas a membrana celular torna-se mais saturada, para aumentar a sua rigidez (Hilditch e Williams, 1964). Têm sido documentados em vários grupos funcionais de microalgas, altos níveis de insaturação de lípidos a baixas temperaturas (Renaud et al., 2002; Lynch e Thompson Jr, 1982), sendo importante lembrar que também existem evidências que sugerem que essa tendência pode mudar de espécie para espécie (Guschina e Harwood, 2006; Patterson, 1970). O conteúdo de lípidos observado no nosso ensaio, mostra-nos uma tendência decrescente à medida que a temperatura aumenta para 30°C, sendo esta última a condição que apresenta uma menor quantidade de lípidos. No entanto, geralmente é aceite que as proporções de lípidos mudam em situações de stress (Chen et al., 2017; Ho et al., 2014). Em condições ideais de crescimento, os ácidos gordos são sintetizados principalmente para esterificação em lípidos de membrana à base de glicerol. Por outro lado, sob um ambiente desfavorável ao crescimento, as vias biossintéticas dos lípidos são alteradas em direção à formação e acumulação de lípidos neutros na forma de triacilglicerol (TAG), como um tipo de armazenamento de carbono e energia (Roleda et al., 2013). No presente estudo, existiu um nítido aumento na produção de lípidos a 10°C, o que é consistente com um maior acúmulo de lípidos neutros em condições de stress.

Ao contrário, altas temperaturas (26°C e 30°C) induziram a síntese de carboidratos, isso sugere uma mudança nas vias metabólicas para o armazenamento de carbono na

célula quando a temperatura aumenta e excede a temperatura de crescimento ideal. Foi proposto que a síntese de carboidratos e de lípidos seriam duas vias concorrentes, principalmente em estudos relacionados à depleção de nitrogénio (Fan et al., 2012; Li et al., 2015). No entanto, num estudo realizado por Chokshi et al., 2015, foi demonstrado que a microalga *Acutodesmus dimorphus* exposta a 25°C, 35°C e 38°C, aumentou gradualmente a produção de carboidratos e diminuiu a acumulação de lípidos com o aumento da temperatura, confirmando ainda mais a relação entre a produção de lípidos e carboidratos sob stress. Para LEGE06097, parece que o caminho preferido para o armazenamento de carbono depende da temperatura, sendo que a baixa temperatura induz a produção de lípidos e a alta temperatura leva à acumulação de carboidratos.

Nesta experiência a quantidade de Clorofila A, B e Carotenoides aumentou à medida que a temperatura também aumentava, à exceção da condição 3A (26°C), que provocou em todos uma diminuição na quantidade de pigmentos produzidos. No estudo de Pagels et al., 2020, a produção de pigmentos em *Cyanobium sp.*, foi maior quando expostos a 30°C, tal como nos resultados do nosso ensaio. Segundo Kłodawska et al., 2019, as células cultivadas a 15°C apresentaram as menores concentrações de clorofilas e de carotenoides, em *Anabaena sp.*, e também observaram na mesma cianobactéria, uma acumulação de clorofilas e carotenoides à temperatura de 23°C e 30°C, sendo que o conteúdo de carotenoides diminuiu a temperaturas baixas (15°C), e a temperaturas acima de 30°C (37°C).

Os resultados obtidos na caracterização bioquímica da experiência da temperatura revelaram que abaixo da temperatura de 14°C e acima da temperatura de 22°C, as cianobactérias passam a gerar respostas ao stress, nomeadamente aumentando a produção de lípidos a 10°C e a síntese de carboidratos acima de 26°C. Além disso, o razoável crescimento de biomassa, conteúdo de proteínas e pigmentos a 22°C sugere que, de todas as temperaturas testadas, esta é a que estimula um melhor rendimento de biomassa, sem indução de stress (He et al., 2015; da Fontoura Prates et al., 2018; Serra-Maia et al., 2016). Considerando que as culturas do BOGA se encontravam a 20°C, as condições mais próximas nesta experiência foram as culturas mantidas a 18°C e 22°C.

As frações obtidas através da experiência da temperatura também foram testadas no bioensaio do metabolismo da gordura vermelha de Nilo em peixes-zebra, sendo que nenhuma das frações testadas obteve atividade estatística significativamente diferente do controlo (DMSO), ou seja, nenhuma apresentou atividade de redução de lípidos. Com isto depreendemos que a causa para não existir bioatividade pode estar relacionada com a intensidade de luz a que as culturas se encontravam expostas, sendo que na experiência

da luz a intensidade era 150-500  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , no ensaio das diferentes temperaturas todas se encontravam a 150  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , e no BOGA a cultura estava exposta a uma intensidade de luz 60-90  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , o que sugere que as condições para a produção de metabolitos anti-obesidade nesta estirpe são muito dependentes das condições de luz a que está exposta, parecendo assim preferir condições de baixa intensidade, como é o caso das existentes no biotério, pois foi o único ensaio anti-obesidade que demonstrou a existência de bioatividade. No entanto mais ensaios são necessários para entender estas inconsistências e compreender verdadeiramente o papel das condições de cultura no potencial anti-obesidade desta cianobactéria, sendo que seria interessante testar o crescimento da mesma sob intensidades de luz inferiores a 150  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Neste trabalho, frações de diversas condições de luz e temperatura às quais a cianobactéria *Cyanobium sp.* LEGE06097 foi exposta, foram testadas quanto à atividade de redução de lípidos. No bioensaio com as culturas do BOGA, a fração DM-B (fração B pertencente à extração efetuada com diclorometano e metanol) demonstrou redução lipídica estatisticamente significativa. Como tal, esta fração foi selecionada para a realização do perfil metabólico (1ª análise), juntamente com a fração que não apresentou atividade redutora de lípidos (M-B: fração B da extração com metanol). Posteriormente, numa 2ª análise do perfil metabólico, foi selecionado o extrato bruto que deu origem à fração B com bioatividade, extraído com diclorometano e metanol, juntamente com o extrato bruto da condição que não apresentou atividade redutora de lípidos (extraído apenas com metanol). A comparação entre os perfis metabólicos dos extratos ativos e não ativos, permitiu a descoberta de espectros MS / MS presentes apenas nos extratos ativos (metabolitos únicos), os quais foram identificados por meio de pesquisas em diversos bancos de dados de espectrometria de massa. Considerando as informações obtidas pelos bancos de dados e o cálculo do erro  $m/z$ , vários compostos foram sugeridos como metabolitos únicos na fração com atividade anti-obesidade e, portanto, potencialmente envolvidos nesta bioatividade. Quanto menor for a diferença entre o pico de massa no banco de dados e nos dados da rede molecular (erro  $m/z$  mais próximo de 0), maior será a probabilidade do pico de massa coincidir com o composto. Na primeira análise, foram identificados 57 picos pertencentes exclusivamente à fração ativa, sendo que desses 36 foram efetivamente identificados através das bases de dados disponíveis, enquanto os picos de massa não identificados podem representar novas moléculas, uma vez que nenhuma correspondência foi encontrada em nenhum banco de dados. De seguida, apenas irão ser aprofundados aqueles que já possuem algum tipo de bioatividade descrita, e com relevância para o âmbito deste trabalho. Nenhum metabolito identificado foi associado à obesidade na literatura científica, mas foram encontrados picos com

atividade anti-cancro e antiviral. O pico de massa  $[M + H]^+$  321,240, supostamente identificou o composto 2-(Hydroxynitrosoamino)-12-methyl-1,3,12-tetradecanetriol ( $C_{15}H_{32}N_2O_5$ ), com um erro m/z de 3,270 ppm. Este é produzido por *Streptomyces sp.* e considerado um inibidor de estromelina (MMP11). A expressão de MMP11 é associada a tumores, sendo produzida por fibroblastos estromais próximos ao mesmo, levando em consideração o seu envolvimento com a progressão de alguns tipos de cancro. Já existem estudos sugerindo esta proteína como alvo de imunoterapia para o tratamento da doença, como é o caso de Peruzzi et al., 2009, que utilizaram a técnica de microarray, confirmando a superexpressão de mRNA de MMP11 num grande painel de amostras de tumor humano. MMP11 induziu uma resposta imune mediada por células e anticorpos, e exerceu proteção anti-tumoral significativa em ratos com cancro do cólon, em ambientes profiláticos e terapêuticos.

O pico de massa  $[M + H]^+$  279,137, apresentou correspondência com o composto Makaluvamine D ( $C_{18}H_{18}N_3O_2$ ), com um erro m/z de -2,376 ppm, que em estudos anteriores demonstrou atividade anticancerígena significativa, embora o seu limite de disponibilidade tenha impedido avaliações farmacológicas mais completas (Sadanandan et al., 1995).

O pico de massa  $[M + H]^+$  309,147 foi associado ao composto Makaluvamine A ( $C_{19}H_{18}N_3O_2$ ), com um erro m/z de -2,287 ppm, isolado de *Zyzya fuliginosa*. Makaluvamines exibiram citotoxicidade *in vitro* contra a linha de células de tumor do cólon humano HCT 116, mostraram toxicidade diferencial contra a linha de células CHO sensível à topoisomerase II xrs e inibiram a topoisomerase II *in vitro* (Radisky et al., 1993; Barrows et al., 1993). Makaluvamina A exibiu atividade anti-tumoral *in vivo* contra o carcinoma ovárico humano Ovar 3 implantado em ratos atímicos (Radisky et al., 1993; Barrows et al., 1993; Matsumoto et al., 1999).

O pico de massa  $[M + H]^+$  571,235 apresentou correspondência com o composto Staurosporine (STU) ( $C_{35}H_{30}N_4O_4$ ), com um erro m/z de 0,814 ppm, um alcaloide indolocarbazol que foi isolado pela primeira vez de *Streptomyces staurosporeus*, em 1977 (Omura et al., 1977) e, subsequentemente, de outros actinomicetes (Takahashi et al., 1989). STU demonstrou possuir atividade antifúngica e hipotensiva pela primeira vez, mas atraiu maior atenção em 1986, quando mostrou ser um inibidor altamente potente da proteína quinase C (PKC) e mostrou um forte efeito citotóxico nas células cancerígenas (Tamaoki et al., 1986). Outras atividades incluem a inibição da agregação plaquetária, inibição da contração do músculo liso, bloqueio de certas fases do ciclo de crescimento celular e a reversão da multirresistência (Omura et al., 1995; Beltran et al., 1997; Utz et al., 1998).

O pico de massa  $[M + H]^+$  743,309, supostamente identificou o composto como Stylostatin 1 na plataforma GNPS, mais propriamente através do banco de dados Dereplicator (identificações baseadas em espectros de MS / MS), isolado da esponja marinha *Stylotella sp.*, e considerado um heptapéptido citotóxico (Bourne et al., 1999). Segundo Forns et al., 2003, o cicloheptapéptido stylostatin mostrou uma inibição do crescimento celular ED50 de 0,8  $\mu\text{g/mL}$  contra células de leucemia linfocítica P388.

8 picos de massa foram identificados através da plataforma GNPS, mais propriamente através do banco de dados Dereplicator<sup>+</sup> (identificações baseadas em espectros de MS / MS). Estes compostos pertencem à superclasse dos lípidos ou moléculas semelhantes a lípidos, classe glicerolípidos e subclasse triacilglicerol. São variações de triglicerídeos de ácido monoa-linolénico. Os triglicerídeos (TGs ou TAGs) também são conhecidos como triacilgliceróis ou triacilglicerídeos, o que significa que são glicerídeos nos quais o glicerol é esterificado com três grupos de ácidos gordos (Ghosh et al., 1997). Os TAGs podem servir como depósitos de ácidos gordos em todas as células, mas principalmente nos adipócitos do tecido adiposo (Simons e Toomre, 2000; Watson, 2006; Sethi e Vidal-Puig, 2007; Gunstone, 2007).

O pico de massa  $[M+H]^+$  723,375 identificou o composto Tiahuramide A, identificada através da plataforma GNPS, mais propriamente pelo banco de dados Dereplicator (identificações baseadas em espectros de MS / MS). Este composto foi isolado da cianobactéria marinha *Lyngbya majuscula*. Os compostos de *Lyngbya majuscula* mostraram citotoxicidade contra linhagens de células cancerígenas e atividade anti-inflamatória (Alvariño et al., 2016).

O pico de massa  $[M+H]^+$  767,401 identificou Hymenamida F, identificado através da plataforma GNPS, mais propriamente pelo banco de dados Dereplicator (identificações baseadas em espectros de MS / MS). Este composto pertence a uma classe de peptídeos cíclicos isolados da esponja marinha de Okinawa, *Hymeniacidon sp.* (Kobayashi et al., 1993; Tsuda et al., 1994), sendo que até ao momento dez peptídeos foram isolados, compostos por poucos resíduos de aminoácidos e apresentaram atividades antifúngica, citotóxica e inibidora de enzimas.

Por último, o pico de massa  $[M+H]^+$  355,260 identificou o composto Glutamine ( $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4$ ) com um erro m/z de 0,881 ppm. Este composto possui atividade antiviral, sendo que é um nutriente essencial para as funções dos leucócitos (linfócitos, macrófagos e neutrófilos), de pacientes infetados com vírus. O desenvolvimento de medicamentos antivirais que têm como alvo o metabolismo da glutamina devem então ser direcionados especificamente às células hospedeiras infetadas por vírus para evitar efeitos negativos

nas funções imunológicas. Outro papel significativo da glutamina está associado à sua capacidade de modular as respostas de proteção e resistência às lesões, também conhecidas como efeitos antioxidantes e citoprotetores (Cruzat et al., 2018). Este composto é fornecido como um componente da suplementação nutricional clínica para pacientes de pré e pós-operatórios, e também para muitos atletas de elite com o objetivo de restaurar as funções imunológicas, mas embora haja uma crescente evidência de apoio aos efeitos imunomediadores da suplementação de glutamina, várias questões e considerações específicas ainda permanecem (Cruzat., 2018).

Para perceber melhor as diferenças entre as duas metodologia da extração, foi realizada uma segunda análise metabolômica. Foram identificados 14 picos pertencentes exclusivamente ao extrato bruto com as condições do BOGA, extraído com diclorometano e metanol, sendo que desses apenas 5 foram efetivamente identificados através das bases de dados disponíveis, sendo apenas aprofundados aqueles que já possuíam algum tipo de bioatividade identificada, com relevância para este trabalho.

O pico de massa  $[M+H]^+$  871,573 identificou o composto Pheophytin A ( $C_{55}H_{74}N_4O_5$ ) com um erro  $m/z$  de -0,863 ppm, isolado de *Brachystelma togoense*. Este composto, no estudo de Ekalu et al., 2019, mostrou possuir atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumonia*, *S. typhi* e *C. albicans*, com zona de inibição de 12 a 27 mm. Também no estudo de Gomes et al., 2015, o composto Pheophytin A exibiu ação antimicrobiana contra estirpes padrão de fungos e bactérias. O composto 13<sup>2</sup>-hidroxi-feofitina, é um derivado da clorofila que está presente em organismos marinhos e terrestres. A alta taxa de produção dessa molécula em *Spirulina* pode possibilitar o desenvolvimento de um futuro nutracêutico (Freitas et al., 2019). As proteínas-alvo de 13<sup>2</sup>-hidroxi-feofitina a estão associadas a propriedades benéficas para a **obesidade e comorbidades relacionadas à obesidade**. Os próximos passos para progredir em direção a uma aplicação futura como um possível nutracêutico será a realização de pesquisas adicionais a fim de validar os alvos *in vivo*, num contexto de organismos mais complexos (Carrasco del Amor et al., 2019).

O pico de massa  $[M+H]^+$  893,542 identificou o composto Chlorophyll A ( $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$ ) com um erro  $m/z$  de -1,281 ppm. Além deste composto possuir moléculas fundamentais para a vida e provavelmente ser o pigmento natural mais importante de todos, as clorofilas têm sido muito procuradas devido às suas propriedades bioativas. Na natureza, a clorofila A e B predominam nos organismos fotossintéticos (Zepka et al., 2019). As atividades biológicas atribuídas às clorofilas e aos seus catabolitos consistem na prevenção do cancro, atividades antioxidantes, anti-mutagénicas, modulação do metabolismo xenobiótico, indução de apoptose, propriedades antimicrobianas e atividades

anti-inflamatórias, sendo que a clorofila A apenas é responsável pela atividade anti-mutagénica, quimiopreventiva, antioxidante e anti-inflamatória (Zepka et al., 2019; Subramoniam et al., 2012).

Por último, o pico de massa  $[M+H]^+$  764,470, identificou o composto Rolloamide A ( $C_{41}H_{61}N_7O_7$ ) com um erro m/z de -1,412 ppm. Este foi isolado da esponja marinha dominicana *Eurypon laughlini*. Rolloamide A, exibiu atividade supressora de crescimento contra um painel de linhas de células cancerosas histologicamente diversas (Williams et al., 2009). Também no estudo de Dahiya et al., 2019, foi observada uma atividade antimicrobiana promissora deste composto, contra *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *K. pneumonia*, em comparação aos medicamentos convencionais, além da atividade moderada contra dermatófitos.

Apesar de muitos dos compostos em acima identificados apresentarem bioatividades já descritas (anti-inflamatórias, anticancerígenas, antimicrobianas..), apenas um pareceu ter alguma ligação com propriedades anti-obesidade, é o caso da **Pheophytin A**, pois as proteínas-alvo de um dos seus derivados, **13<sup>2</sup>-hidroxi-feofitina a**, estão associadas a propriedades benéficas para a obesidade e comorbidades relacionadas, podendo ser responsável pela atividade redutora de lípidos observada nos bioensaios em peixe-zebra. Sendo que também existiram muitos compostos que não foram identificados, ou seja, que são desconhecidos, mas que também podem estar relacionados com a bioatividade observada. No entanto, mais ensaios são necessários para validar estes resultados, e esforços adicionais também são necessários para fortalecer as identificações putativas.

## 5. Conclusão

O principal objetivo deste trabalho centrou-se na manipulação das condições de crescimento de *Cyanobium sp.* LEGE06097, uma cianobactéria com atividade redutora de lipídios relatada anteriormente, a fim de identificar e otimizar a produção de metabolitos secundários responsáveis. Os efeitos das condições de luz e temperatura foram analisados através de vários parâmetros bioquímicos, e a bioatividade das frações foi testada no bioensaio do metabolismo lipídico com peixe-zebra corados com vermelho de nilo.

As análises aos parâmetros bioquímicos comprovaram que as condições de luz e temperatura afetaram o metabolismo da cianobactéria, dados os diferentes valores de proteínas, carboidratos, lípidos e pigmentos, bem como o crescimento de biomassa obtido.

Não obtivemos bioatividades nos ensaios anti-obesidade realizados em peixes-zebra, com as frações provenientes das duas experiências (luz e temperatura). Sendo que concluímos que tanto as condições a que a cultura estava exposta, como também o tipo de extração orgânica utilizada no processo, podem afetar a bioatividade da estirpe, pois apenas o ensaio realizado com a cultura proveniente do BOGA obteve bioatividade, sendo que essa cultura estava exposta a condições diferentes das utilizadas nas experiências. Assim, conseguimos otimizar o protocolo e pelos resultados obtidos, seria interessante repetir o procedimento, mas utilizando intensidades de luz inferiores a  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , e com a utilização da extração com os solventes diclorometano e metanol.

Os resultados experimentais permitiram a criação de duas redes moleculares, com foco na comparação das duas metodologias da extração, e conseqüentemente entre amostras ativas e não ativas, (extratos brutos condições BOGA e frações B dos mesmos), a fim de identificar compostos únicos presentes nas amostras ativas. Muitos dos compostos identificados putativamente nas duas análises já possuíam bioatividades previamente descritas. Sendo que apenas Pheophytin A, um dos compostos identificados na análise dos extratos brutos, pareceu ter ligação com atividade-anti-obesidade, devido ao facto das proteínas-alvo de um dos seus derivados, 13<sup>2</sup>-hidroxi-feofitina a, estarem associadas a propriedades benéficas para a obesidade e comorbidades relacionadas. Também existiram muitos compostos que não foram identificados, ou seja, que são desconhecidos, mas que também podem estar relacionados com a bioatividade observada. Posto isto, mais ensaios são necessários para validar estes resultados, e esforços adicionais também são necessários para fortalecer as identificações putativas.

# Referências

Afiyatullo, S. S., Kalinovsky, A. I., Antonov, A. S., Ponomarenko, L. P., Dmitrenok, P. S., Aminin, D. L., Krasokhin, V. B., Nosova, V. M., & Kisin, A. V. (2007). Isolation and structures of erylosides from the Caribbean sponge *Erylus gofrilleri*. *Journal of natural products*. **70**: 1871-1877.

Alboresi, A., Perin, G., Vitulo, N., Diretto, G., Block, M., Jouhet, J., Meneghesso, A., Valle, G., Giuliano, G., Maréchal, E., & Morosinotto, T. (2016). Light remodels lipid biosynthesis in *Nannochloropsis gaditana* by modulating carbon partitioning between organelles. *Plant physiology*. **171**: 2468-2482.

Alvariño, R., Alonso, E., Abou Mansour, E., Bornancin, L., Bonnard, I., Banaigs, B., Alfonso, A., & Botana, L. M. (2016). Tiahuramides, novel compounds isolated from *L yngbya majuscula*, display cytotoxic effects in human neuroblastoma cells. *International Meeting on Marine Research*, Peniche, Portugal, 2016. [https://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fmars.2016.04.00064/event\\_abstract](https://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fmars.2016.04.00064/event_abstract)

Amaro, H. M., Pagels, F., Azevedo, I. C., Azevedo, J., Pinto, I. S., Malcata, F. X., & Guedes, A. C. (2020). Light-emitting diodes- A plus on microalgae biomass and high-value metabolite production. *Journal of Applied Phycology*. **32**: 3605-3618.

American Diabetes Association. (2012). Standards of medical care in diabetes: 2012. *Diabetes care*. **35**: S11-S63.

Apovian, C. M., & Gokce, N. (2012). Obesity and cardiovascular disease. *Circulation*. **125**: 1178-1182.

Arraes, G. C. F., & Funchal, C. (2017). Influência dos polifenóis do chá verde na obesidade. *Nutrição Brasil*. **16**: 43-56.

Arya, A., Nahar, L., Khan, H. U., & Sarker, S. D. (2020). Anti-obesity natural products. *Medicinal Natural Products: A Disease-Focused Approach*. **55**: 411.

Atkinson, D., Ciotti, B. J., & Montagnes, D. J. (2003). Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% C<sup>-1</sup>. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. **270**: 2605-2611.

Azevedo, S. M. F. O., & Vasconcelos, V. M. (1998). Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. *Medicina online*. **3**: 1-19.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Grafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*. **117**: 426-436.

Bakker, G. C., Van Erk, M. J., Pellis, L., Wopereis, S., Rubingh, C. M., Cnubben, N. H., Kooistra, T., Ommen, B. V., & Hendriks, H. F. (2010). An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach. *The American journal of clinical nutrition*. **91**: 1044-1059.

Barrows, L. R., Radisky, D. C., Copp, B. R., Swaffar, D. S., Kramer, R. A., Warters, R. L., & Ireland, C. M. (1993). Makaluvamines, marine natural products, are active anti-cancer agents and DNA topoisomerase II inhibitors. *Anti-cancer drug design*. **8**: 333-347.

Béchet, Q., Laviale, M., Arsapin, N., Bonnefond, H., & Bernard, O. (2017). Modeling the impact of high temperatures on microalgal viability and photosynthetic activity. *Biotechnology for biofuels*. **10**: 1-11.

Beltran, P. J., Fan, D., Fidler, I. J., & O'Brian, C. A. (1997). Chemosensitization of cancer cells by the staurosporine derivative CGP 41251 in association with decreased P-glycoprotein phosphorylation. *Biochemical pharmacology*. **53**: 245-247.

Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*. **15**: 288–298.

Bourne, G. T., Meutermans, W. D., Alewood, P. F., McGeary, R. P., Scanlon, M., Watson, A. A., & Smythe, M. L. (1999). A backbone linker for Boc-based peptide synthesis and on-resin cyclization: synthesis of stylostatin 1. *The Journal of organic chemistry*. **64**: 3095-3101.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. **72**: 248-254.

Brito, A., Gaifem, J., Ramos, V., Glukhov, E., Dorrestein, P. C., Gerwick, W. H., Vasconcelos, V. M., Mendes, M. V., & Tamagnini, P. (2015). Bioprospecting Portuguese Atlantic coast cyanobacteria for bioactive secondary metabolites reveals untapped chemodiversity. *Algal Research*. **9**: 218-226.

Brito, Â., Ramos, V., Seabra, R., Santos, A., Santos, C. L., Lopo, M., Ferreira, S., Martins, A., Mota, R., Frazão, B., Martins, R., Vasconcelos, V., & Tamagnini, P. (2012). Culture-dependent characterization of cyanobacterial diversity in the intertidal zones of the Portuguese coast: A polyphasic study. *Systematic and Applied Microbiology*. **35**: 110–119.

Bui-Xuan, N. H., Tang, P. M. K., Wong, C. K., Chan, J. Y. W., Cheung, K. K. Y., Jiang, J. L., & Fung, K. P. (2011). Pheophorbide a: A photosensitizer with immunostimulating activities on mouse macrophage RAW 264.7 cells in the absence of irradiation. *Cellular immunology*. **269**: 60-67.

Cannon, C. P., & Kumar, A. (2009). Treatment of overweight and obesity: lifestyle, pharmacologic, and surgical options. *Clinical cornerstone*. **9**: 55-71.

Carrageta, D. F., Dias, T. R., Alves, M. G., Oliveira, P. F., Monteiro, M. P., & Silva, B. M. (2018). Anti-obesity potential of natural methylxanthines. *Journal of functional foods*. **43**: 84-94.

Carrasco del Amor, A., Freitas, S., Urbatzka, R., Fresnedo, O., & Cristobal, S. (2019). Application of bioactive thermal proteome profiling to decipher the mechanism of action of the lipid lowering 132-hydroxy-pheophytin isolated from a marine Cyanobacteria. *Marine drugs*. **17**: 371.

Carten, J., and Farber, S. (2009). A new model system swims into focus: using the zebrafish to visualize intestinal lipid metabolism in vivo. *Clinical Lipidology*. **4**: 501–515.

Castro, M., Preto, M., Vasconcelos, V., & Urbatzka, R. (2016). Obesity: The metabolic disease, advances on drug discovery and natural product research. *Current topics in medicinal chemistry*. **16**: 2577-2604.

Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T. A., Brusniak, M. Y., Paulse, C., Creasy, D., Flashner, L., Kani, K., Moulding, C., Seymour, S. L., Nuwaysir, L. M., Lefebvre, B., Kuhlmann, F., Roark, J., Rainer, P., Detlev, S., Hemenway, T., Huhmer, A., Langridge, J., Connolly, B., Chadick, T., Holly, K., Eckels, J., Deutsch, E. W., Moritz, R.L., Katz, J. E., Agus, D. B., MacCoss, M., Tabb, D. L., & Mallick, P. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature biotechnology*. **30**: 918-920.

Chen, B., Wan, C., Mehmood, M. A., Chang, J. S., Bai, F., & Zhao, X. (2017). Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—a review. *Bioresource technology*. **244**: 1198-1206.

Chen, N., Bezzina, R., Hinch, E., Lewandowski, P. A., Cameron-Smith, D., Mathai, M. L., Jois, M., Sinclair, A. J., Begg, D. P., Wark, J.D., Weisinger, H. S., & Weisinger, R. S. (2009). Green tea, black tea, and epigallocatechin modify body composition, improve glucose tolerance, and differentially alter metabolic gene expression in rats fed a high-fat diet. *Nutrition research*. **29**: 784-793.

Cheong, S. H., Kim, M. Y., Sok, D. E., Hwang, S. Y., Kim, J. H., Kim, H. R., Lee, J. H., Kim, Y.B., & Kim, M. R. (2010). Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Journal of nutritional science and vitaminology*. **56**: 34-40.

Choi, Y. K., Kumaran, R. S., Jeon, H. J., Song, H. J., Yang, Y. H., Lee, S. H., Song, K. G., Kim, K.J., Singh, V., & Kim, H. J. (2015). LED light stress induced biomass and fatty acid production in microalgal biosystem, *Acutodesmus obliquus*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **145**: 245-253.

Chokshi, K., Pancha, I., Trivedi, K., George, B., Maurya, R., Ghosh, A., & Mishra, S. (2015). Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. *Bioresource Technology*. **180**: 162-171.

Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. **48**: 1146-1151.

Costa, M., Coello, L., Urbatzka, R., Pérez, M., & Thorsteinsdottir, M. (2019). New aromatic bisabolane derivatives with lipid-reducing activity from the marine sponge *Myrmekioderma* sp. *Marine drugs*. **17**: 375.

Costa, M., Garcia, M., Costa-Rodrigues, J., Costa, M. S., Ribeiro, M. J., Fernandes, M. H., Barros, P., Barreiro, A., Vasconcelos, V., & Martins, R. (2014). Exploring bioactive properties of marine cyanobacteria isolated from the Portuguese coast: high potential as a source of anticancer compounds. *Marine drugs*. **12**: 98-114.

Costa, M., Rosa, F., Ribeiro, T., Hernandez-Bautista, R., Bonaldo, M., Gonçalves Silva, N., Eiríksson, F., Thorsteinsdóttir, Ussar, S., & Urbatzka, R. (2019). Identification of cyanobacterial strains with potential for the treatment of obesity-related co-morbidities by bioactivity, toxicity evaluation and metabolite profiling. *Marine drugs*. **17**: 280.

Costa-Lotufo, L. V., Wilke, D. V., Jimenez, P. C., & Epifanio, R. D. A. (2009). Marine organisms as a source of new pharmaceuticals: history and perspectives. *Quimica Nova*. **32**: 703-716.

Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R., & Newsholme, P. (2018). Glutamine: metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients*. **10**: 1564.

da Fontoura Prates, D., Radmann, E. M., Duarte, J. H., de Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2018). Spirulina cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. *Bioresource technology*. **256**: 38-43.

Dahiya, R., Rampersad, S., Ramnanansingh, T., Kaur, K., Kaur, R., Fairman, R., & Jals, N. (2019). *Synthetic and antimicrobial studies on natural cyclopolypeptide from Caribbean marine-sponge and its analogs* [Poster]. Poster presented in the University of the West Indies, Faculty of Medical Sciences. Faculty of Medical Sciences, Research Day. St. Augustine, Caribbean Medical Journal, March 21, 2019. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1025488>

Daneschvar, H. L., Aronson, M. D., & Smetana, G. W. (2016). FDA-approved anti-obesity drugs in the United States. *The American journal of medicine*. **129**: 879-e1.

Danesi, E. D. G., Rangel-Yagui, C. D. O., De Carvalho, J. C. M., & Sato, S. (2002). An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*. **23**: 261-269.

Dictionary of Natural Products. Search Chemicals. Retrieved in october 5, 2021 from: <https://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml>

Dittmann, E., Gugger, M., Sivonen, K., & Fewer, D. P. (2015). Natural product biosynthetic diversity and comparative genomics of the cyanobacteria. *Trends in microbiology*. **23**: 642-652.

Duarte, J. H., & Costa, J. A. V. (2018). Blue light emitting diodes (LEDs) as an energy source in *Chlorella fusca* and *Synechococcus nidulans* cultures. *Bioresource technology*. **247**: 1242-1245.

Ekalu, A., Ayo, R. G. O., Habila, J., & Hamisu, Í. (2019). Bioactivity of Phaeophytin a,  $\alpha$ -Amyrin and lupeol from *Brachystelma togoense* Schltr. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*. **6**: 411-418.

Elo, B., Villano, C. M., Govorko, D., & White, L. A. (2007). Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds. *Journal of molecular endocrinology*. **38**: 433-440.

Encarnaç o, T., Pais, A. A., Campos, M. G., & Burrows, H. D. (2015). Cyanobacteria and microalgae: a renewable source of bioactive compounds and other chemicals. *Science progress*. **98**: 145-168.

Fan, J., Yan, C., Andre, C., Shanklin, J., Schwender, J., & Xu, C. (2012). Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*. **53**: 1380-1390.

Fatma, T. (2009). Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. **83**: 509.

Ferreira, D. (2020). Bioactivity screening of cyanobacteria for appetite reduction. Master's Thesis in Biochemistry in Health- Biotechnology- Escola Superior de Saúde of the Polytechnic Institute of Porto, Porto, 87pp.

Flores-Lázaro, J. R., Rodríguez-Martínez, E., & Rivas-Arancibia, S. (2011). Consecuencias metabólicas de la alteración funcional del tejido adiposo en el paciente con obesidad. *Revista Médica del Hospital General de México*. **74**: 157-165.

Flynn, E. J., Trent, C. M., & Rawls, J. F. (2009). Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of lipid research*. **50**: 1641-1652.

Forns, P., Piró, J., Cuevas, C., García, M., Rubiralta, M., Giralt, E., & Diez, A. (2003). Constrained derivatives of stylostatin 1. 1. Synthesis and biological evaluation as potential anticancer agents. *Journal of medicinal chemistry*. **46**: 5825-5833.

Freifeld, L., Odstrcil, I., Förster, D., Ramirez, A., Gagnon, J. A., Randlett, O., Costa, E. K., Asano, S., Celiker, O. T., Gao, R., Martin-Alarcon, D. A., Reginato, P., Dick, C., Chen, L., Schoppik, D., Engert, F., Baier, H., & Boyden, E. S. (2017). Expansion microscopy of zebrafish for neuroscience and developmental biology studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **114**: E10799-E10808.

Freitas, S., Silva, N. G., Sousa, M. L., Ribeiro, T., Rosa, F., Leão, P. N., Vasconcelos, V., Reis, M. A., & Urbatzka, R. (2019). Chlorophyll derivatives from marine cyanobacteria with lipid-reducing activities. *Marine drugs*. **17**: 229.

Fu, W., Guðmundsson, Ó., Paglia, G., Herjólfsson, G., Andrésón, Ó. S., Pálsson, B. Ø., & Brynjólfsson, S. (2013). Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied microbiology and biotechnology*. **97**: 2395-2403.

Gaio, V., Antunes, L., Namorado, S., Barreto, M., Gil, A., Kyslaya, I., Rodrigues, A. P., Santos, A., Böhler, L., Castilho, E., Vargas, P., Carmo, I. D., Nunes, B., Dias, C. M., & INSEF Research group. (2018). Prevalence of overweight and obesity in Portugal: results from the first Portuguese Health Examination Survey (INSEF 2015). *Obesity research & clinical practice*. **12**: 40-50.

Gerwick, W. H., Coates, R. C., Engene, N., Gerwick, L., Grindberg, R. V., Jones, A. C., & Sorrels, C. M. (2008). Giant marine cyanobacteria produce exciting potential pharmaceuticals. *Microbe-American Society for Microbiology*. **3**: 277.

Ghosh, S., Strum, J. C., & Bell, R. M. (1997). Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. *The FASEB Journal*. **11**: 45-50.

Giacomotto, J., & Ségalat, L. (2010). High-throughput screening and small animal models, where are we?. *British journal of pharmacology*. **160**: 204-216.

Gomes, R. A., Teles, Y. C. F., Pereira, F. D. O., Rodrigues, L. A. D. S., Lima, E. D. O., Agra, M. D. F., & Souza, M. D. F. V. D. (2015). Phytoconstituents from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) Fryxell (Malvaceae) and antimicrobial activity of pheophytin a. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **51**: 861-867.

González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F. B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., Moreno, L. A., Bray, G. A., & Martinez, J. A. (2017). Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*. **3**: 1–18.

Gross, B., & Staels, B. (2007). PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. **21**: 687-710.

Gunstone, F. D., & Harwood, J. L. (2007). *The lipid handbook with CD-ROM*. 3rd Edition. CRC Press, Boca Raton, Flórida, 1472p.

Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*. **45**: 160-186.

Gustafson, B., Hammarstedt, A., Hedjazifar, S., & Smith, U. (2013). Restricted adipogenesis in hypertrophic obesity: the role of WISP2, WNT, and BMP4. *Diabetes*. **62**: 2997-3004.

Guyon, J. B., Vergé, V., Schatt, P., Lozano, J. C., Liennard, M., & Bouget, F. Y. (2018). Comparative Analysis of Culture Conditions for the Optimization of Carotenoid Production in Several Strains of the Picoeukaryote *Ostreococcus*. *Marine drugs*. **16**: 76.

He, Q., Yang, H., Wu, L., & Hu, C. (2015). Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource technology*. **191**: 219-228.

- Heydarizadeh, P., Poirier, I., Loizeau, D., Ulmann, L., Mimouni, V., Schoefs, B., & Bertrand, M. (2013). Plastids of marine phytoplankton produce bioactive pigments and lipids. *Marine drugs*. **11**: 3425-3471.
- Hilditch, T. P., & Williams, P. N. (1964). The chemical constitution of natural fats. Vol 4, 4th edition. Chapman and Hall, Essex St., London, xix + 664 pp.
- Ho, S. H., Ye, X., Hasunuma, T., Chang, J. S., & Kondo, A. (2014). Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae—a critical review. *Biotechnology advances*. **32**: 1448-1459.
- Hölttä-Vuori, M., Salo, V. T., Nyberg, L., Brackmann, C., Enejder, A., Panula, P., & Ikonen, E. (2010). Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *Biochemical Journal*. **429**: 235-242.
- Hruby, A., & Hu, F. B. (2015). The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharmacoeconomics*. **33**: 673-689.
- Hu, H. Y., Vats, D., Vizovisek, M., Kramer, L., Germanier, C., Wendt, K. U., Rudin, M., Turk, B., Pettenburg, O., & Schultz, C. (2014). Visualisierung von Maustumoren mit einem lipidierten Cathepsin-S-Substrat. *Angewandte Chemie*. **126**: 7802-7806.
- Hu, X., Tao, N., Wang, X., Xiao, J., & Wang, M. (2016). Marine-derived bioactive compounds with anti-obesity effect: A review. *Journal of Functional Foods*. **21**: 372-387.
- Huang, B., Chen, N., & Blair, E. D. (2013). - Anti-obesity product and its method of preparation. *U.S. Patent No. 8,524,291*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. <https://patents.google.com/patent/US8524291B2/en>
- Huang, Y., Cartlidge, R., Walpitagama, M., Kaslin, J., Campana, O., & Wlodkowic, D. (2018). Unsuitable use of DMSO for assessing behavioral endpoints in aquatic model species. *Science of the Total Environment*. **615**: 107-114.
- Jakobsen, G. S., Småstuen, M. C., Sandbu, R., Nordstrand, N., Hofsø, D., Lindberg, M., Hertel, J. K., & Hjelmæsæth, J. (2018). Association of bariatric surgery vs medical obesity treatment with long-term medical complications and obesity-related comorbidities. *Jama*. **319**: 291-301.
- Jensen, M. G., Kristensen, M., & Astrup, A. (2012). Effect of alginate supplementation on weight loss in obese subjects completing a 12-wk energy-restricted diet: A randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*. **96**: 5–13.

Jones, D. A., Prior, S. L., Barry, J. D., Caplin, S., Baxter, J. N., & Stephens, J. W. (2014). Changes in markers of oxidative stress and DNA damage in human visceral adipose tissue from subjects with obesity and type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. **106**: 627-633.

Jones, K. S., Alimov, A. P., Rilo, H. L., Jandacek, R. J., Woollett, L. A., & Penberthy, W. T. (2008). A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. *Nutrition & metabolism*. **5**: 1-11.

Kang, J. G., & Park, C. Y. (2012). Anti-obesity drugs: a review about their effects and safety. *Diabetes & metabolism journal*. **36**: 13-25.

Karri, S., Sharma, S., Hatware, K., & Patil, K. (2019). Natural anti-obesity agents and their therapeutic role in management of obesity: A future trend perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **110**: 224-238.

Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., & Katoh, S. (2004). Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and microbial technology*. **35**: 81-86.

Khan, A., Raza, S., Khan, Y., Aksoy, T., Khan, M., Weinberger, Y., & Goldman, J. (2012). Current updates in the medical management of obesity. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery*. **6**: 117-128.

Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories*. **17**: 1-21.

Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2019). Crude microcystins extracted from *Microcystis aeruginosa* exert anti-obesity effects by downregulating angiogenesis and adipogenesis related signaling molecules in HUVEC and 3 T3-L1 cells. *BMC complementary and alternative medicine*. **19**: 1-10.

Khaton, H., Leong, L. K., Rahman, N. A., Mian, S., Begum, H., Banerjee, S., & Endut, A. (2018). Effects of different light source and media on growth and production of phycobiliprotein from freshwater cyanobacteria. *Bioresource technology*. **249**: 652-658.

Kiuru, P., D'Auria, M. V., Muller, C. D., Tammela, P., Vuorela, H., & Yli-Kauhaluoma, J. (2014). Exploring marine resources for bioactive compounds. *Planta medica*. **80**: 1234-1246.

- Kłodawska, K., Bujas, A., Turos-Cabal, M., Żbik, P., Fu, P., & Malec, P. (2019). Effect of growth temperature on biosynthesis and accumulation of carotenoids in cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 under diazotrophic conditions. *Microbiological research*. **226**: 34-40.
- Kobayashi, J. I., Tsuda, M., Nakamura, T., Mikami, Y., & Shigemori, H. (1993). Hymenamides A and B, new proline-rich cyclic heptapeptides from the Okinawan marine sponge *Hymeniacion* sp. *Tetrahedron*. **49**: 2391-2402.
- Komenda, J., Sobotka, R., & Nixon, P. J. (2012). Assembling and maintaining the photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria. *Current opinion in plant biology*. **15**: 245-251.
- Kommareddy, A., & Anderson, G. (2003). Study of light as a parameter in the growth of algae in a photo-bio reactor (PBR), Las Vegas, NV, in *2003 ASAE Annual Meeting* (p. 1). American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Kotai, J. (1972). Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. *Norwegian Institute for Water Research, Oslo*. **11**: 5.
- Lam, D. D., Przydzial, M. J., Ridley, S. H., Yeo, G. S., Rochford, J. J., O'Rahilly, S., & Heisler, L. K. (2008). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. *Endocrinology*. **149**: 1323-1328.
- Lee, M. J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2010). Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. **13**: 371.
- Leite, L. D., de Medeiros Rocha, É. D., & Brandão-Neto, J. (2009). Obesidade: uma doença inflamatória. *Ciência & Saúde*. **2**: 85-95.
- Li, T., Gargouri, M., Feng, J., Park, J. J., Gao, D., Miao, C., Dong, T., Gang, D. R., & Chen, S. (2015). Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource technology*. **180**: 250-257.
- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*. **8**: 353-367.
- Lindequist, U. (2016). Marine-derived pharmaceuticals—challenges and opportunities. *Biomolecules & therapeutics*, *24*(6), 561. Link, A., Balaguer, F., & Goel, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochemical pharmacology*. **80**: 1771-1792.

- Liu, F., Zhang, Y., Sun, Q. Y., Yang, F. M., Gu, W., Yang, J., Niu, H. M., Wang, Y. H., & Long, C. L. (2014). Diarylheptanoids and phenylphenalenones from *Musa itinerans* fruits. *Phytochemistry*. **103**: 171-177.
- Lynch, D. V., & Thompson Jr, G. A. (1982). Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membranes of *Dunaliella salina*. *Plant physiology*. **69**: 1369-1375.
- Ma, C., Zhang, Y. B., Ho, S. H., Xing, D. F., Ren, N. Q., & Liu, B. F. (2017). Cell growth and lipid accumulation of a microalgal mutant *Scenedesmus* sp. Z-4 by combining light/dark cycle with temperature variation. *Biotechnology for biofuels*. **10**: 1-13.
- Marsh, J. B., & Weinstein, D. B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of lipid research*. **7**: 574-576.
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., & Santos, S. (2014). Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Marine drugs*. **12**: 1066-1101.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*. **14**: 217-232.
- Matsumoto, S. S., Haughey, H. M., Schmehl, D. M., Venables, D. A., Ireland, C. M., Holden, J. A., & Barrows, L. R. (1999). Makaluvamines vary in ability to induce dose-dependent DNA cleavage via topoisomerase II interaction. *Anti-Cancer Drugs*. **10**: 39-45.
- Mazard, S., Penesyan, A., Ostrowski, M., Paulsen, I. T., & Egan, S. (2016). Tiny microbes with a big impact: the role of cyanobacteria and their metabolites in shaping our future. *Marine drugs*. **14**: 97.
- Mi, Y., Zhang, J., He, S., & Yan, X. (2017). New peptides isolated from marine cyanobacteria, an overview over the past decade. *Marine drugs*. **15**: 132.
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*. **15**: 160-176.
- Mitchell, N. S., Catenacci, V. A., Wyatt, H. R., & Hill, J. O. (2011). Obesity: overview of an epidemic. *Psychiatric clinics*. **34**: 717-732.
- Molica, R., & Azevedo, S. M. F. O. (2009). Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. *Oecologia brasiliensis*. **13**: 229-246.

Montero, O., Velasco, M., Sanz-Arranz, A., & Rull, F. (2016). Effect of different broad waveband lights on membrane lipids of a cyanobacterium, *Synechococcus* sp., as determined by UPLC-QToF-MS and vibrational spectroscopy. *Biology*. **5**: 22.

Morist, A., Montesinos, J. L., Cusido, J. A., & Godia, F. (2001). Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*. **37**: 535-547.

Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., & Allakhverdiev, S. I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. **1767**: 414-421.

Murti, Y., & Agrawal, T. (2010). Marine derived pharmaceuticals-development of natural health products from marine biodiversity. *International Journal of Chem Tech Research*. **2**: 2198-2217.

Naves, A., & Paschoal, V. C. P. (2007). Regulação funcional da obesidade. *ConScientiae Saúde*. **6**: 189-200.

Nguyen, M., Yang, E., Neelkantan, N., Mikhaylova, A., Arnold, R., Poudel, M. K., Stewart, A. M., & Kalueff, A. V. (2013). Developing 'integrative' zebrafish models of behavioral and metabolic disorders. *Behavioural brain research*. **256**: 172-187.

Nguyen, N. T., Magno, C. P., Lane, K. T., Hinojosa, M. W., & Lane, J. S. (2008). Association of hypertension, diabetes, dyslipidemia, and metabolic syndrome with obesity: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *Journal of the American College of Surgeons*. **207**: 928-934.

Nishio, S. I., Gibert, Y., Berekelya, L., Bernard, L., Brunet, F., Guillot, E., Le Bail, J.C., Sánchez, J.A., Galzin, A. M., Triqueneaux, G., & Laudet, V. (2012). Fasting induces CART down-regulation in the zebrafish nervous system in a cannabinoid receptor 1-dependent manner. *Molecular endocrinology*. **26**: 1316-1326.

Noinart, J., Buttachon, S., Dethoup, T., Gales, L., Pereira, J. A., Urbatzka, R., Freitas, S., Lee, M., Silva, A. M. S., Pinto, M. M. M., Vasconcelos, V., & Kijjoo, A. (2017). A new ergosterol analog, a new bis-anthraquinone and anti-obesity activity of anthraquinones from the marine sponge-associated fungus *Talaromyces stipitatus* KUFA 0207. *Marine drugs*. **15**: 139.

Ojit, S. K., Indrama, T., Gunapati, O., Avijeet, S. O., Subhalaxmi, S. A., Silvia, C., Indira, D. W., Romi, K., Minerva, S., Thadoi, D. A., Tiwari, O. N., & Sharma, G. D. (2015). The response of

phycobiliproteins to light qualities in *Anabaena circinalis*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. **3**: 1-6.

Ojulari, O. V., Lee, S. G., & Nam, J. O. (2019). Beneficial effects of natural bioactive compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. on obesity. *Molecules*. **24**: 210.

Oka, T., Nishimura, Y., Zang, L., Hirano, M., Shimada, Y., Wang, Z., Umemoto, N., Kuroyanagi, J., Nishimura, N., & Tanaka, T. (2010). Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC physiology*. **10**: 1-13.

Olaizola, M., & Duerr, E. O. (1990). Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*. **2**: 97-104.

Olivon, F., Allard, P. M., Koval, A., Righi, D., Genta-Jouve, G., Neyts, J., Apel, C., Pannecouque, C., Nothias, L.F., Cachet, X., Marcourt, Laurence, M., Roussi, F., Katanaev, V. L., Touboul, D., Wolfender, J. L., & Litaudon, M. (2017). Bioactive natural products prioritization using massive multi-informational molecular networks. *ACS chemical biology*. **12**: 2644-2651.

Olle, M., & Viršile, A. (2013). The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. *Agricultural and food science*. **22**: 223-234.

Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchya, H., Takahashi, Y., & Asuma, R. (1977). A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of antibiotics*. **30**: 275-282.

Omura, S., Sasaki, Y., Iwai, Y., & Takeshima, H. (1995). Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *The Journal of antibiotics*. **48**: 535-548.

Pagels, F., Barufi, J. B., Veja, J., Abdala-Díaz, R., Vasconcelos, V., Guedes, A. C., & Figueroa, F. L. (2020). Light regulating metabolic responses of *Cyanobium* sp.(Cyanobacteria). *Fundamental and Applied Limnology*. **193**: 285–297.

Pagels, F., Bonomi-Barufi, J., Vega, J., Abdala-Díaz, R., Vasconcelos, V., Guedes, A. C., & Figueroa, F. L. (2020). Light quality triggers biochemical modulation of *Cyanobium* sp.- photobiology as tool for biotechnological optimization. *Journal of Applied Phycology*. **32**: 2851-2861.

Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoa, A., & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology advances*. **37**: 422-443.

Pagels, F., Lopes, G., Vasconcelos, V., & Guedes, A. C. (2020). White and red LEDs as two-phase batch for cyanobacterial pigments production. *Bioresource technology*. **307**: 123105.

Pagels, F., Salvaterra, D., Amaro, H. M., Lopes, G., Sousa-Pinto, I., Vasconcelos, V., & Guedes, A. C. (2020). Factorial optimization of upstream process for *Cyanobium* sp. Pigments production. *Journal of Applied Phycology*. **32**: 3861-3872.

Pagels, F., Vasconcelos, V., & Guedes, A. C. (2021). Carotenoids from Cyanobacteria: Biotechnological Potential and Optimization Strategies. *Biomolecules*. **11**: 735.

Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource technology*. **244**: 1216-1226.

Papadopoulos, K. P., Economou, C. N., Tekerlekopoulou, A. G., & Vayenas, D. V. (2020). Two-step treatment of brewery wastewater using electrocoagulation and cyanobacteria-based cultivation. *Journal of environmental management*. **265**: 110543.

Park, H. J., & Lee, H. S. (2016). The influence of obesity on the effects of spirulina supplementation in the human metabolic response of Korean elderly. *Nutrition research and practice*. **10**: 418-423.

Patterson, G. W. (1970). Effect of culture temperature on fatty acid composition of *Chlorella sorokiniana*. *Lipids*. **5**: 597-600.

Pereira, J., and Mateus, C. (2003). Custos indirectos associados à obesidade em Portugal [Indirect costs associated with obesity in Portugal]. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. **3**: 65–80.

Peruzzi, D., Mori, F., Conforti, A., Lazzaro, D., De Rinaldis, E., Ciliberto, G., Monica, N. L., & Aurisicchio, L. (2009). MMP11: a novel target antigen for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. **15**: 4104-4113.

Pettitt, T. R., Jones, A. L., & Harwood, J. L. (1989). Lipid metabolism in the red marine algae *Chondrus crispus* and *Polysiphonia lanosa* as modified by temperature. *Phytochemistry*. **28**: 2053-2058.

Pinheiro, A. R. D. O., Freitas, S. F. T. D., & Corso, A. C. T. (2004). Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Revista de Nutrição*. **17**: 523-533.

Radisky, D. C., Radisky, E. S., Barrows, L. R., Copp, B. R., Kramer, R. A., & Ireland, C. M. (1993). Novel cytotoxic topoisomerase II inhibiting pyrroloiminoquinones from Fijian sponges of the genus *Zyzya*. *Journal of the American Chemical Society*. **115**: 1632-1638.

Ramos V, Morais J, Castelo-Branco R, Pinheiro Â, Martins J, Regueiras A, Pereira AL, Lopes V, Frazão B, Gomes D, Moreira C, Costa MS, Brûle S, Faustino S, Martins R, Saker M, Osswald J, Leão PN and Vasconcelos VM (2018a) Cyanobacterial diversity held in microbial biological resource centers as a biotechnological asset: the case study of the newly established LEGE Culture Collection. *Journal of Applied Phycology*. **30**: 1437-1451.

Ranjitha, K., & Kaushik, B. D. (2005). Influence of environmental factors on accessory pigments of *Nostoc muscorum*. *Indian Journal of Microbiology*. **45**: 67.

Rasmussen, H. E., Blobaum, K. R., Jesch, E. D., Ku, C. S., Park, Y. K., Lu, F., Carr, T. P., & Lee, J. Y. (2009). Hypocholesterolemic effect of *Nostoc commune* var. *sphaeroides* Kützing, an edible blue-green alga. *European journal of nutrition*. **48**: 387-394.

Renaud, S. M., Thinh, L. V., Lambrinidis, G., & Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*. **211**: 195-214.

Rodgers, R. J., Tschöp, M. H., & Wilding, J. P. (2012). Anti-obesity drugs: past, present and future. *Disease models & mechanisms*. **5**: 621-626.

Roleda, M. Y., Slocombe, S. P., Leakey, R. J., Day, J. G., Bell, E. M., & Stanley, M. S. (2013). Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource technology*. **129**: 439-449.

Sadanandan, E. V., Pillai, S. K., Lakshmikantham, M. V., Billimoria, A. D., Culpepper, J. S., & Cava, M. P. (1995). Efficient syntheses of the marine alkaloids D and discorhabdin C: the 4, 6, 7-trimethoxyindole approach. *The Journal of Organic Chemistry*. **60**: 1800-1805.

Sakamoto, T., & Bryant, D. A. (1997). Growth at low temperature causes nitrogen limitation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Archives of microbiology*. **169**: 10-19.

Sánchez-Bayo, A., Morales, V., Rodríguez, R., Vicente, G., & Bautista, L. F. (2020). Cultivation of microalgae and cyanobacteria: effect of operating conditions on growth and biomass composition. *Molecules*. **25**: 2834.

Santos, J. D., Vitorino, I., De la Cruz, M., Díaz, C., Cautain, B., Annang, F., Pérez-Moreno, G., Martínez, I. G., Tormo, J. R., Martín, J. M., Urbatzka, R., Vicente, F. M., & Lage, O. M. (2019). Bioactivities and extract dereplication of Actinomycetales isolated from marine sponges. *Frontiers in microbiology*. **9**: 727.

Schlegel, A., & Stainier, D. Y. R. (2007). Lessons from “lower” organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. *PLoS genetics*. **3**: e199.

Schulze, P. S., Barreira, L. A., Pereira, H. G., Perales, J. A., & Varela, J. C. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in biotechnology*. **32**: 422-430.

Schwartzmann, G., & Workman, P. (1993). Anticancer drug screening and discovery in the 1990s: a European perspective. *European Journal of Cancer*. **29**: 3–14.

Serra-Maia, R., Bernard, O., Gonçalves, A., Bensalem, S., & Lopes, F. (2016). Influence of temperature on *Chlorella vulgaris* growth and mortality rates in a photobioreactor. *Algal research*. **18**: 352-359.

Sethi, J. K., & Vidal-Puig, A. J. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *Journal of lipid research*. **48**: 1253-1262.

Sharma, B. R., Kim, H. J., Kim, M. S., Park, C. M., & Rhyu, D. Y. (2017). *Caulerpa okamurae* extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and prevents high-fat diet–induced obesity in C57BL/6 mice. *Nutrition Research*. **47**: 44-52.

Sharma, N. K., Tiwari, S. P., Tripathi, K., & Rai, A. K. (2011). Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *Journal of Applied Phycology*. **23**: 1059-1081.

Sheng, J., Kim, H. W., Badalamenti, J. P., Zhou, C., Sridharakrishnan, S., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B. E., & Vannela, R. (2011). Effects of temperature shifts on growth rate and lipid characteristics of *Synechocystis* sp. PCC6803 in a bench-top photobioreactor. *Bioresource Technology*. **102**: 11218-11225.

Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology*. **1**: 31-39.

Singh, R., Parihar, P., Singh, M., Bajguz, A., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2017). Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: current status and future prospects. *Frontiers in microbiology*. **8**: 515.

Singh, S. P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*. **50**: 431-444.

Singh, S. P., Häder, D. P., & Sinha, R. P. (2010). Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing research reviews*. **9**: 79-90.

Singh, S., Kate, B. N., & Banerjee, U. C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical reviews in biotechnology*. **25**: 73-95.

Srivastava, G., and Apovian, C. M. (2018). Current pharmacotherapy for obesity. *Nature Reviews Endocrinology*. **14**: 12–24.

Stamler, R., Stamler, J., Riedlinger, W. F., Algera, G., & Roberts, R. H. (1978). Weight and blood pressure: findings in hypertension screening of 1 million Americans. *Jama*. **240**: 1607-1610.

Subramoniam, A., Asha, V. V., Nair, S. A., Sasidharan, S. P., Sureshkumar, P. K., Rajendran, K. N., Karunagarar, D., & Ramalingam, K. (2012). Chlorophyll revisited: anti-inflammatory activities of chlorophyll a and inhibition of expression of TNF- $\alpha$  gene by the same. *Inflammation*. **35**: 959-966.

Suleria, H. A. R., Gobe, G., Masci, P., & Osborne, S. A. (2016). Marine bioactive compounds and health promoting perspectives; innovation pathways for drug discovery. *Trends in Food Science and Technology*. **50**: 44–55.

Suliburska, J., Bogdanski, P., Szulinska, M., Stepien, M., Pupek-Musialik, D., & Jablecka, A. (2012). Effects of green tea supplementation on elements, total antioxidants, lipids, and glucose values in the serum of obese patients. *Biological trace element research*. **149**: 315-322.

Sun, K., Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation*. **121**: 2094-2101.

Suyono, E. A., Pradani, L., Mu'Avatun, U., Habiba, R. N., & Rohma, E. F. (2015). Combination of blue, red, white, and ultraviolet lights for increasing carotenoids and biomass of microalga *Haematococcus pluvialis*. *Procedia Environmental Sciences*. **28**: 399-405.

Szulinska, M., Gibas-Dorna, M., Miller-Kasprzak, E., Suliburska, J., Miczke, A., Walczak-Gałezewska, M., Stelmach-Mardas, M., Walkowiak, J., & Bogdanski, P. (2017). *Spirulina maxima* improves insulin sensitivity, lipid profile, and total antioxidant status in obese patients with well-treated hypertension: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Review for Medical and Pharmacological Sciences*. **21**: 2473-2481.

Tabassum, N., Tai, H., Jung, D. W., & Williams, D. R. (2015). Fishing for nature's hits: Establishment of the zebrafish as a model for screening antidiabetic natural products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2015**: 1–16.

Takahashi, I., Asano, K., Kawamoto, I., Tamaoki, T., & Nakano, H. (1989). UCN-01 and UCN-02, new selective inhibitors of protein kinase C I. Screening, producing organism and fermentation. *The Journal of antibiotics*. **42**: 564-570.

Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., & Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipidCa<sup>++</sup> dependent protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications*. **135**: 397-402.

Tian, C., Ye, X., Zhang, R., Long, J., Ren, W., Ding, S., Liao, D., Jin, X., Wu, H., Xu, S., & Ying, C. (2013). Green tea polyphenols reduced fat deposits in high fat-fed rats via erk1/2-PPAR $\gamma$ -adiponectin pathway. *PloS one*. **8**: e53796.

Tingaud-Sequeira, A., Ouadah, N., & Babin, P. J. (2011). Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *Journal of lipid research*. **52**: 1765-1772.

Tremmel, M., Gerdtham, U. G., Nilsson, P. M., & Saha, S. (2017). Economic burden of obesity: a systematic literature review. *International journal of environmental research and public health*. **14**: 435.

Tsuda, M., Sasaki, T., & Kobayashi, J. I. (1994). Hymenamides G, H, J, and K, four new cyclic octapeptides from the Okinawan marine sponge Hymeniacion sp. *Tetrahedron*. **50**: 4667-4680.

Tzeng, T. F., Lu, H. J., Liou, S. S., Chang, C. J., & Liu, I. M. (2012). Emodin, a naturally occurring anthraquinone derivative, ameliorates dyslipidemia by activating AMP-activated protein kinase in high-fat-diet-fed rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012: 781812.

Ueda, M., & Ashida, H. (2012). Green tea prevents obesity by increasing expression of insulin-like growth factor binding protein-1 in adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *Journal of agricultural and food chemistry*. **60**: 8917-8923.

Urbatzka, R., Freitas, S., Palmeira, A., Almeida, T., Moreira, J., Azevedo, C., Afonso, C., Correia-da-Silva, M., Sousa, E., Pinto, M., & Vasconcelos, V. (2018). Lipid reducing activity and toxicity profiles of a library of polyphenol derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **151**: 272–284.

Utz, I., Spitaler, M., Rybczynska, M., Ludescher, C., Hilbe, W., Regenass, U., Grunicke, H., & Hofmann, J. (1998). Reversal of multidrug resistance by the staurosporine derivatives CGP 41251 and CGP 42700. *International journal of cancer*. **77**: 64-69.

Van Apeldoorn, M. E., Van Egmond, H. P., Speijers, G. J., & Bakker, G. J. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Molecular nutrition & food research*. **51**: 7-60.

Vendruscolo, R. G., Fagundes, M. B., Maroneze, M. M., do Nascimento, T. C., de Menezes, C. R., Barin, J. S., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., & Wagner, R. (2019). Scenedesmus obliquus metabolomics: effect of photoperiods and cell growth phases. *Bioprocess and biosystems engineering*. **42**: 727-739.

Vijayakumar, S., Manogar, P., & Prabhu, S. (2016). Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel cannabinoid drugs from cyanobacteria. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **83**: 362-371.

Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapono, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M.J, Liu, W. T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R. D, Pace, L. A, Quinn, R. A, Duncan, K. R., Hsu, C. C., Floros, D. J., Gavilan, R. G., Kleigrewe, K., Northen, T., Dutton, R. J., Parrot, D., Carlson, E. E, Aigle, B., Michelsen, C. F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B. T., Gerwick, L., Liaw, C. C., Yang, Y. L., Humpf, H. U., Maansson, M., Keyzers, R. A., Sims, A. C., Johnson, A. R, Sidebottom, A. M., Sedio, B. E., Klitgaard, A., Larson, C. B., P, C. A .B., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D. J., Silva, D. B., Marques, L. M., Demarque, D. P., Pociute, E., O'Neill, E. C., Briand, E., Helfrich, E. J. N., Granatosky, E. A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J. J., Zeng, Y., Vorholt, J. A., Kurita, K. L., Charusanti, P., McPhail, K. L., Nielsen, K. F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M. F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O. B., Baric, R., Silva, R. R., Mascuch, S. J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P. G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A. M. C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B. M., Almaliti, J., Allard, P. M., Phapale, P., Nothias, L. F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J. L., Kyle, J. E., Metz, T. O., Peryea, T., Nguyen, D. T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K. M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B.O., Pogliano, K., Lington, R. G., Gutiérrez, M., Lopes, N. P., Gerwick, W. H., Moore, B. S., Dorrestein, P. C., & Bandeira N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature biotechnology*. **34**: 828-837.

Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I., & Shen, C. L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*. **25**: 1-18.

Wan-Loy, C., & Siew-Moi, P. (2016). Marine algae as a potential source for anti-obesity agents. *Marine Drugs*. **14**: 1–19.

Watson, A. D. (2006). Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *Journal of lipid research*. **47**: 2101-2111.

Whitton, B. A., & Potts, M. (Eds.). (2000). *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Cap1. Kluwer Academic Publishers. Blacksburg, USA.

Williams, D. E., Yu, K., Behrisch, H. W., Van Soest, R., & Andersen, R. J. (2009). Rolloamides A and B, cytotoxic cyclic heptapeptides isolated from the Caribbean marine sponge *Eurypon laughlini*. *Journal of natural products*. **72**: 1253-1257.

Wilmotte, A., & Golubic, S. (1991). Morphological and genetic criteria in the taxonomy of cyanophyta cyanobacteria. *Archiv für Hydrobiologie*. **92**: 1-24.

World Health Organization (2021). Obesity and overweight. Retrieved in september 28th, 2021, from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.

Yang, H. W., Fernando, K. H. N., Oh, J. Y., Li, X., Jeon, Y. J., and Ryu, B. M. (2019). Anti-obesity and anti-diabetic effects of *ishige okamurae*. *Marine Drugs*. **17**: 1–11.

Yang, T. H., Yao, H. T., & Chiang, M. T. (2017). Red algae *Gelidium amansii* hot-water extract ameliorates lipid metabolism in hamsters fed a high-fat diet. *Journal of food and drug analysis*. **25**: 931-938.

Yang, Y., & Weathers, P. (2015). Red light and carbon dioxide differentially affect growth, lipid production, and quality in the microalga, *Ettlia oleoabundans*. *Applied microbiology and biotechnology*. **99**: 489-499.

Yang, Y., Park, Y., Cassada, D. A., Snow, D. D., Rogers, D. G., & Lee, J. (2011). In vitro and in vivo safety assessment of edible blue-green algae, *Nostoc commune* var. *sphaeroides* Kützing and *Spirulina plantensis*. *Food and chemical toxicology*. **49**: 1560-1564.

Ye, C. P., Zhang, M. C., Yang, Y. F., & Thirumaran, G. (2012). Photosynthetic performance in aquatic and terrestrial colonies of *Nostoc flagelliforme* (Cyanophyceae) under aquatic and aerial conditions. *Journal of arid environments*. **85**: 56-61.

Yumuk, V., Tsigos, C., Fried, M., Schindler, K., Busetto, L., Micic, D., & Toplak, H. (2015). European guidelines for obesity management in adults. *Obesity facts*. **8**: 402-424.

Zang, L., Maddison, L. A., & Chen, W. (2018). Zebrafish as a model for obesity and diabetes. *Frontiers in cell and developmental biology*. **6**: 91.

Zavafer, A., Cheah, M. H., Hillier, W., Chow, W. S., & Takahashi, S. (2015). Photodamage to the oxygen evolving complex of photosystem II by visible light. *Scientific Reports*. **5**: 1-8.

Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., & Roca, M. (2019). Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Current Opinion in Food Science*. **26**: 94-100.

## Anexos

**Anexo I-** Tabela com todos os compostos possíveis pertencentes aos principais picos encontrados na análise metabolómica da fração B com as condições do BOGA (extraída com DM:M)

**Tabela 5-** Compostos únicos identificados através da primeira análise molecular, no Cytoscape. Compostos esses pertencentes exclusivamente à fração B extraída com diclorometano (DM) e metanol (M), com as condições BOGA. Na tabela estão representados os compostos identificados, e também os não identificados (moléculas novas).

M+H	RT	Putative identification	Adduct	S. Peaks	MQScore	PPM	Formula	Source
243,135	533,07	Bicycloamide				2,114595742	C11H18N2O4	DNP
		Cyclo(glutamylleucyl)				2,114595742	C12H14N6	DNP
		Parazoanthoxanthin A				-3,403158744	C12H14N6	DNP
321,240	539,70	2-(Hydroxynitrosoamino)-12-methyl-1,3,12-tetradecanetriol				3,269513563	C15H32N2O5	DNP
425,410	750,13	1,2-Ethanediamine; N,N'-Didodecanoyl				-1,668226199	C26H52N2O2	DNP
441,405	673,05	Ostreogrycin_B_Oxime	M+2H		7			GNPS
625,587	729,09	Destruxins_3-Isoleucine_analogue,_4'-hydroxy	M+H		3			GNPS
251,142	563,85	(R)-form, 11-Deoxy, 8,9,10,11-tetradecahydro(8E,10Z-)				-3,08848348	C11H22N2O4S	DNP
279,137	512,90	Makaluvamine D				-2,37554434	C18H18N3O2	DNP
		1,14-Diisothiocyanato-1,13-tetradecadiene				3,504922095	C16H24N2S2	DNP
309,147	529,66	4-Chloro-10,11-epoxy-7(14)-bisabolene-1,2,3,8-tetrol				0,36546619	C15H25ClO5	DNP
		Makaluvamine A				-2,286500356	C19H18N3O2	DNP
		Pantetheine (R)-form, S-Ac				-4,448045723	C13H24N2O5S	DNP
323,163	543,52	Makaluvamine A				-1,143180168	C20H20N3O2	DNP

335,199	586,73	Asperrubrol				-4,090161497	C22H24O3	DNP
		Makaluvamine A				-0,095189593	C20H22N3O2	DNP
337,179	556,40	(2-Hydroxyethyl)phosphonic acid				1,808412056	C16H33O5P	DNP
339,158	500,00	Xyloallenolide B				-3,949191341	C23H24O3	DNP
349,179	554,69	1,17-Diisothiocyanato-1,16-heptadecadiene				3,226865431	C19H30N2S2	DNP
341,157	380,07	Antibiotic FU 10				2,901676532	C12H24N2O9	DNP
		Antibiotic SF 98				-1,026019384	C13H20N6O5	DNP
399,162	348,27	Cryptolepicarboline				2,571874693	C27H18N4	DNP
485,199	388,97	Roseotoxin_S	M+H					Dereplicator
571,235	415,54	Staurosporine				0,81371145	C35H30N4O4	DNP
		Cambodianin E				3,156646643	C34H34O8	DNP
		Tetronothiodin				-2,755034755	C31H38O8S	DNP
599,267	466,49	"SB_245255;Cyclo(N-methyl-L-alanyl-b-al"	M+H					Dereplicator
657,272	435,19	Arenamide_C	M+H					Dereplicator
671,288	456,15	Nomilinic_acid_Ring_D_hydroxyacid,_O-de-Ac,_17-O-?-D-glucopyranoside	M+H					Dereplicator +
729,293	428,45	Musaitinerin A				2,595144021	C41H44O12	DNP
743,309	453,10	Stylostatin_1	M+H					Dereplicator
829,346	467,89	Amphibactins_Amphibactin_S	M+H					Dereplicator
813,694	1007,47	TG(15:0/16:0/18:3(9Z,12Z,15Z))	M+H					Dereplicator+
825,694	995,14	TG(15:0/17:1(9Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	M+H					Dereplicator e Dereplicator+
827,709	1031,13	TG(16:1(9Z)/16:0/18:3(9Z,12Z,15Z))	M+H					Dereplicator+
839,709	1016,43	TG(15:0/18:1(11Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))	M+H					Dereplicator+
841,725	1056,49	TG(15:0/18:1(9Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))	M+H					Dereplicator+
853,725	1041,03	TG(16:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/18:1(11Z))	M+H					Dereplicator+
855,740	1084,62	TG(18:1(11Z)/16:0/18:3(9Z,12Z,15Z))	M+H					Dereplicator+
867,741	1066,49	TG(17:0/18:1(9Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	M+H					Dereplicator+

679,349	257,93	Ervafolidene				-0,834387699	C40H46N4O6	DNP
723,375	267,52	Tiahuramide_A	M+2H					Dereplicator
767,401	270,57	hymenamamide_F	M+2H					Dereplicator
355,260	473,87	Glutamine				0,880729325	C19H34N2O4	DNP
230,248	468,76	N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide	M+H	6	0,8971			GNPS
269,209	602,80	<b>Não identificado</b>						
271,188	437,18	<b>Não identificado</b>						
313,235	580,02	<b>Não identificado</b>						
355,282	668,22	<b>Não identificado</b>						
425,410	750,13	<b>Não identificado</b>						
443,334	664,05	<b>Não identificado</b>						
351,194	558,34	<b>Não identificado</b>						
353,210	553,89	<b>Não identificado</b>						
427,194	423,48	<b>Não identificado</b>						
453,173	426,46	<b>Não identificado</b>						
471,184	358,75	<b>Não identificado</b>						
513,230	446,23	<b>Não identificado</b>						
729,293	428,45	<b>Não identificado</b>						
771,647	948,15	<b>Não identificado</b>						
799,678	986,11	<b>Não identificado</b>						
811,427	274,17	<b>Não identificado</b>						
855,455	277,27	<b>Não identificado</b>						
299,198	326,32	<b>Não identificado</b>						
327,229	408,65	<b>Não identificado</b>						
258,279	518,29	<b>Não identificado</b>						
319,284	650,10	<b>Não identificado</b>						