UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

OCORRÊNCIA DE INIBIDORES DE GLICOSIDASES EM CIANOBACTÉRIAS E MICROALGAS DOS ESTADOS DO AMAPÁ E TOCANTINS

VÍVIAN CÁSSIA OLIVEIRA DA SILVA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFPA como requisito para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia. Orientação: Profª. Dra. Luciana Pereira Xavier.

BELÉM

JULHO 2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Da Silva, Vivian Cssia Oliveira, 1991-
Ocorrência de inibidores de glicosidases em cianobactérias e microalgas dos estados do amapá e tocantins / Vivian Cssia Oliveira Da Silva. - 2015.

Orientadora: Luciana Pereira Xavier.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém, 2015.

1. Biotecnologia. 2. Cianobactéria. 3. Alga. I. Título.

CDD 23. ed. 600.6

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Agências financiadoras:
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAPESPA – Fundação Amazônia Paraense de Amparo a Pesquisa

Laboratórios e Centros de Pesquisa onde o trabalho foi realizado:
CGBS – Centro de Genômica e Biologia de Sistemas
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
LBE – Laboratório de Biologia Estrutural
LGFB – Laboratório de Genômica Funcional e Biotecnologia
LPDNA – Laboratório de Polimorfismo do DNA

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo amor e suporte durante todos esses anos.

À minha orientadora, Dr.ª Luciana Xavier por toda a dedicação, ensinamentos, paciência, persistência e por me apresentar esse mundo incrível e até então pouco conhecido das cianobactérias e microalgas.

À Dr.ª Maria Paula Cruz Schneider por ter cedido seu laboratório e suporte para a realização desse trabalho.

Ao Dr. Chubert Bernardo Castro De Sena pelas contribuições tanto na qualificação como por ter cedido seu laboratório.

Aos meus colegas de laboratório Diana Gradíssimo, Murilo Mourão, Roberta Rezende e Samuel Cavalcante pelas suas contribuições.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **10**

1.1 MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS 10

1.1.1 Aplicações na Biotecnologia **11**

1.2 GLICOSIDASES E SEUS INIBIDORES 13

1.2.1 Inibidores de glicosidases **14**

2 OBJETIVOS **16**

2.1 OBJETIVO GERAL 16

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16

3 MATERIAL E MÉTODOS **17**

3.1 AMOSTRAGEM 17

3.1.1 Coleta **17**

3.1.2 Processamento das amostras **18**

3.1.3 Cultivo **18**

3.1.4 Identificação **19**

3.1.5 Seleção **19**

3.2 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO 20

3.3 ENSAIO DE DETECÇÃO EM PLACA DE PETRI 21

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO 22

3.4.1 Potencial inibitório do extrato frente α-glicosidase **23**

3.4.2 Potencial inibitório do extrato frente β-glicosidase **24**

4 RESULTADOS **26**

4.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO EM PLACA 26

4.2 ENSAIO DE DETECÇÃO EM PLACA NOS EXTRATOS BRUTOS 28

4.3 FRACIONAMENTO 29

4.4 ENSAIO DE DETECÇÃO EM PLACA NAS FRAÇÕES 29

4.5 ENSAIO DE DETECÇÃO EM PLACA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES 32

4.6 ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO 33

4.6.1 Para α-glicosidase **34**

4.6.2 Para β-glicosidase **36**

5 DISCUSSÃO **38**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **40**

ANEXO – I **43**

LISTAS DE ABREVIATURAS

EPS – Exopolissacarídeos

IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

NCBI – National Center for Biotecnology Information

pNPG - α – p-nitrofenil α-D-glicopiranosídeo

pNPG – β – p-nitrofenil β-D-glicopiranosídeo

PHA – Polihidroxialcalonatos

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Mapa com coordenadas dos pontos de coleta. 17
Figura 2 – Teste de padronização do ensaio *Synechococcus* sp. 26
Figura 3 – Teste de padronização do ensaio (*Aphanocapsa* sp); 27
Figura 4 – Teste de diferentes concentrações Monoraphidium com 60 minutos de teste. 32
Figura 5 – Teste de diferentes concentrações *Synechococcus* sp. com 60 minutos de teste. 33
Figura 6 – Teste potencial inibitório para α-glicosidase na fração metanólica – *Synechococcus* sp. 34
Figura 7 – Teste potencial inibitório para α-glicosidase na fração metanólica – Monoraphidium. 35
Figura 8 – Teste potencial inibitório para β-glicosidase na fração metanólica – *Synechococcus* sp. 36
Figura 9 – Teste potencial inibitório para β-glicosidase na fração metanólica – Monoraphidium. 37
Tabela 1 – Meio BG-11. 19
Tabela 2 – Lista de amostras com seus respectivos pontos de origem. 20
Tabela 3 – Relação de volumes de reagentes na mistura reacional. 22
Tabela 4 – Relação de volumes de reagentes na microplaca – α. 23
Tabela 5 – Relação de volumes de reagentes na microplaca – β. 24
Tabela 6 – Ensaio em placa para extrato bruto – Tempo de inibição. 28
Tabela 7 – Peso seco das frações em µg. 29
Tabela 8 – Ensaio em placa para fração aquosa – Tempo de inibição. 30
Tabela 9 – Ensaio em placa para fração metanólica – Tempo de inibição 31
Tabela 10 - Potencial inibitório para α-glicosidase na fração metanólica – *Synechococcus* sp. 34
Tabela 11 – Teste potencial inibitório para α-glicosidase com fração metanólica – Monoraphidium. 35
Tabela 12 – Teste potencial inibitório para β-glicosidase com fração metanólica –*Synechococcus* sp. 36

Tabela 13 – Teste potencial inibitório para β-glicosidase com fração metanólica. – Monoraphidium. 37

RESUMO

As cianobactérias apresentam-se como uma nova fonte de metabólitos secundários para produção de bioprodutos em diversos setores industriais, sendo utilizadas, principalmente, devido ao seu fácil cultivo, com utilização de poucas fontes nutricionais, assim como uma grande produção de biomassa. Ainda não se tem muitos relatos na literatura de cianobactérias amazônicas, assim como de seus metabólitos e seu uso em bioprodutos. Glicosidases são enzimas de extrema importância como alvos para desenvolvimento de fármacos que são utilizados para o tratamento de diversas patologias assim como seus inibidores. O presente trabalho teve como objetivo identificar em 24 amostras de cianobactérias e microalgas provenientes dos estados do Tocantins e do Amapá, os isolados que produzem esses inibidores, assim como extrair, fracionar e identificar os mesmos. Inicialmente, o teste de detecção em placa de petri, com o substrato esculina, para inibidores de glicosidase foi padronizado, bem como a metodologia de extração. Como resultado observou-se atividade inibitória de glicosidase em extrato bruto e na fração metanólica de quatro culturas (*Synechococcus* sp, Monoraphydium, P29 e *Limnotrix* sp), não foi detectada atividade inibitória nas frações aquosas de nenhuma cultura. Duas frações metanólicas que apresentaram atividade foram selecionadas para a realização de ensaio de potencial inibitório frente α–glicosidase com o substrato p-nitrofenil α-D-glicopiranosídeo e β–glicosidase com o substrato p-nitrofenil β-D-glicopiranosídeo, onde ambas amostras apresentaram maior porcentagem de inibição para α-glicosidase em relação a β-glicosidase.

Palavras-chave: cianobactéria, microalgas, inibidor de β-glicosidase, Amazônia.

ABSTRACT

Cyanobacteria are presented as a new source of secondary metabolites for the production of bio-products in many industrial sectors and are used primarily because of its easy cultivation, using few nutritional sources, as well as a large biomass production. Until now we don't have many report in literature of cyanobacteria from amazon, as well as their metabolites and their use in bioproducts. Glycosidases are enzymes of extreme importance as targets for developing drugs that are used for the treatment of various diseases, as well as their inhibitors. This study aimed to identify 24 samples of cyanobacteria and microalgae from the states of Tocantins and Amapá, isolates that produce these inhibitors, as well as extract, fractionate and identify them. Initially, the detection test in petri dishes with esculin the substrate for glycosidase inhibitors has been standardized and the extraction methodology. As a result there was glucosidase inhibitory activity of crude extract and the methanol fraction of four samples (Synechococcus sp, Monoraphydium, P29 and Limnotrix sp), inhibitory activity was detected in the aqueous fractions of any culture. Two methanolic fractions that showed activity was selected for potential assay conducting inhibiting α-glycosidase face with the substrate p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside and β-glucosidase to the substrate p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside, where both samples had a higher percentage of inhibition for α-glucosidase compared to β-glucosidase.

Keywords: cyanobacteria, microalgae, inhibitors of β-glucosidase, Amazon.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS

Segundo Lee (2008) as algas são talófitas, ocorrem comumente na água, mas podendo ser encontradas em todos os ambientes e são basicamente dois tipos, procariotas (cianobactérias) que não possuem organelas e eucariotas que possuem organelas.

Microalgas apresentam uma grade diversidade de formas, tanto entre espécies como em diferentes fases da vida de uma mesma espécie, sendo as formas mais comuns definidas como: amebóides, palmelóides, cocóides, filamentosas, flageladas e sarcinóides (RICHMOND, 2013).

Cianobactérias também conhecidas como algas verdes-azuis, são procariotos, gram-negativos, fotossintetizantes, possuem clorofila A, assim como ficobilinas (pigmentos acessórios) do tipo ficocianina (que confere a cor azul) e do tipo ficoeritina (que confere a cor vermelha), sendo que algumas possuem mucilagem, vivem em simbiose intra ou extracelular com outros microorganismos, além de apresentam alterações morfológicas como heterocistos (fixação de nitrogênio), acinetos (células de resistência) e vacúolos de gás (LEE, 2008).

As cianobactérias foram classificadas primeiramente de acordo com o Código Botânico (STAFEU et al, 1972), que se baseia principalmente em identificação morfológica, quando foram classificadas como procarioto, utilizou-se também de técnicas de biologia molecular, através de identificação por 16S rRNA, para classificação das mesmas.

O NCBI (National Center for Biotecnology Information, 2014) classifica as cianobactérias, baseada em Rippka et al. (1979), em seis classes: Gloeobacteria, Nostocales, Oscillatoriophycideae, Pleurocapsales, Prochlorales e Stigonematales. São cinco ordens: Chroococales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales (WATERBURY,2006).

1.1.1 Aplicações na Biotecnologia

Segundo Stall (1995) as cianobactérias são capazes de executar diferentes vias do metabolismo, e possuem a capacidade de mudar de uma para a outra. Pelo fato de trocarem a via metabólica e realizarem fotossíntese como plantas, as cianobactérias tornam-se extremamente interessantes para pesquisas e utilização das mesmas e seus produtos pelas diversas indústrias.

As cianobactérias possuem várias aplicações biotecnológicas, entre elas destacam-se a produção de Polihidroxialcalonatos (PHA) para a produção de bioplásticos, produção de energia através do nitrogênio produzido, aplicações na indústria farmacêutica e outras, com utilização de compostos bioativos, inibidores de proteases e glicosidases, cianotoxinas entre outros.

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são sintetizados principalmente por procariotas, algumas plantas e células animais (SAMANTARAY, 2014). Os PHA acumulam-se intracelularmente na forma de inclusões amorfas em condições de excesso de oferta de fontes de carbono e nutrientes essenciais limitadas no meio de crescimento (ANDERSON e DAWES, 1990).

Dentre as cianobactérias que são utilizadas como fonte de alimento, destaca-se a Spirulina a qual se referem como “o alimento do futuro”. Uma vez que foi relatado que elas possuem a capacidade de sintetizar grande quantidade de nutrientes de alta qualidade além de possuir cerca de 60% do seu peso seco constituído de proteína (OHMORI e EHIRA, 2014).

As cianobactérias são um dos poucos grupos de micro-organismos que possuem uma gama de adaptações evolutivas para fotoproteção, nesse sentido foram estudados desde o comportamento, até a bioquímica e fisiologia. As cianobactérias possuem dois principais grupos de compostos que podem ser utilizados comercialmente, os antioxidantes (representados principalmente pelos carotenoides) e os compostos de proteção de radiação ultravioleta (Scytonemina e Myscoporina). O primeiro grupo que somente é encontrado em cianobactérias age combatendo as espécies reativas de oxigênio que foram geradas pelo fotodano, enquanto que o segundo age como protetor solar (SOULE e GARCIA-PICHEL, 2014).

Cianobactérias são capazes de produzir e acumular compostos que são utilizados na produção de biocombustíveis, principalmente biodiesel a partir de lipídeos (SHARATHCHANDRA e RAJASHEKHAR, 2011). As cianobactérias podem também ser concebidas para produzir etanol com alta eficiência pela combinação de transformação genética, desenvolvimento de estirpe, e engenharia metabólica. Os gêneros *Synechococcus* sp. e *Synechocystis* sp. são as cianobactérias melhores caracterizadas para a produção de biocombustíveis (SHARMA e STAL, 2014).

Os exopolissacarídeos (EPS), em sua maioria, são heteropolissacarídeos complexos constituídos por 2 a 14 monossacarídeos diferentes, que compõe a mucilagem produzida pelas cianobactérias. Produzidos em diversas espécies, apresentam mais de 160 tipos de polímeros. Exopolissacarídeos de cianobactérias possuem diferentes aplicações que vão desde agentes antivirais, uso em cosméticos, até bio-sorção de metais (COLICA e DE PHILIPPIS, 2014).

Ficobiliproteínas são proteínas que formam o complexo Antena (Ficobilissomas) e atuam como pigmentos fotossintéticos acessórios em cianobactérias (algas azuis), em Rhodophyta (algas vermelhas), e em Criptófitas (criptofíceas) (BERMEJO, 2014). As ficocianinas são ficobiliproteínas solúveis em água, com extraordinárias propriedades fluorescentes, e são alvo para produção de agentes terapêuticos devido a sua atividade anticarcinogênica, anti-inflamatória e antioxidante (BERMEJO, 2014).

As cianotoxinas são metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias que podem ter efeito tóxico em humanos ou animais. As cianotoxinas são divididas em quatro grupos de acordo com a sua atuação no organismo: hepatoxinas, neurotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas. Além disso, esses metabólitos podem ser usados para a produção de fungicidas, herbicidas, inseticidas e entre outros (BIONDI et al., 2004).

1.2 GLICOSIDASES E SEUS INIBIDORES

As Glicosidases (EC 3.2.1) são uma classe de enzimas que realizam a hidrólise de polissacarídeos e oligossacarídeos a monômeros (IUBMB). Das diferentes glicosidases as enzimas mais comuns são as α-glicosidases (EC 3.2.1.20) e as β-glicosidases (EC 3.2.1.21), que clivam respectivamente as ligações α- e β-glicosídicas.

Estas enzimas participam de eventos biológicos importantes, tais como digestão extracelular, incluindo a de glico-conjugados (McMAHON et al., 1997), reconhecimento celular (SEARS e WONG, 1998) e, possivelmente, na defesa de invertebrados contra patógenos, através da modificação de antígenos de superfície (ZELCK et al., 1996).

As alfa-glicosidases hidrolisam o terminal não-redutor de sacarídeos, constituídos de resíduos de glucose com ligação alfa-1,4, liberando uma única molécula de alfa-glicose. As alfa-glicosidases possuem papel central no metabolismo dos açúcares, sendo portanto alvos biotecnológicos no desenvolvimento de fármacos para diferentes distúrbios metabólicos como diabetes, influenza, infecção pelo virus HIV, metastases tumorais, e para doenças de armazenamento de glicoesfingolipídeos (FERREIRA et al., 2010; KAJIMOTO & NODE, 2009; MELO & CARVALHO, 2006).

As beta-glicosidases são exoenzimas, que removem monossacarídeos a partir da ponta não-redutora de di- e/ou oligossacarídeos. Dependendo do monossacarídeo que é removido, a beta-glicosidases é chamada de beta-glucosidase (glicose), beta-galactosidase (galactose), beta-xilosidase (xilose), e assim por diante. Frequentemente uma mesma glicosidase é capaz de hidrolisar vários diferentes resíduos de monossacarídeos de glicosídeos (TERRA & FERREIRA, 1994). As beta-glicosidase podem-se destacar na hidrólise de compostos cianogênicos presentes em resíduos agro-industriais, a deglicosilação de flavonóides, processo de sacarificação para produção de etanol de segunda geração (LIU et al., 2006; SINGHANIA et al., 2013).

1.2.1 Inibidores de glicosidases

Segundo Melo e Carvalho (2006) os inibidores de α- e β-glicosidases são alvos para o desenvolvimento de fármacos, uma vez que glicosidases estão envolvidas em diversos processos biológicos e patológicos, são utilizados na terapêutica de doenças como diabetes, doença de Gaucher, obesidade, doenças de acúmulo lisossomal, câncer, HIV, entre outros.

Inibidores de glicosidases são divididos de acordo com a classe a qual pertecem: dissacarídeos, iminoaçúcares, carbaçúcares e pseudo-açúcares, tioaçúcares e derivados não glicosídicos (MELO et al., 2006).

Os compostos naturais que apresentam potencial de inibição para alfa e beta-glicosidase pertencem às classes estruturais dos dissacarídeos (kojibiose, nigerose, inibidores de alfa-D-glucosidase I e alfa-D-glucosidase II), iminoaçúcares (alcalóides polihidroxilados e nojirimicina), carbaçúcares e pseudo-açúcares (acarbose, validamicina, valiolamina, hidroxivalidamina, voglibose e conduritol), tioaçúcares (salacinol) e derivados não-glicosídicos (N-p-cumaroil-N-feruloilputrescina e N-N –diferuloilputrescina) (MELO e CARVALHO, 2006).

O inibidores de α-glicosidase, nojirimicina, isolada de *Streptomyces* sp, e deoxinojirimicina têm potencial para tratamento de diabetes. A casternospermina, isolado de *Caustanopermum australe*, inibidor α-glicosidase, mostrou atividade anti-HIV, inibindo a replicação do vírus, assim como o inibidor N-butil deoxinojirimicina. A nojirimicina, e alguns de seus derivados – sintéticos ou naturais – apresentam atividade inibidora de β-glicosidase, além de inibirem α-glicosidases (MELO e CARVALHO, 2006).

Inibidores do tipo iminoaçúcares, a isofagomina, apresentam menor inibição para α-glicosidase, mas forte inibição para β-glicosidases, chegando a inibir 440 vezes mais que compostos derivados da nojirimicina (PANDEY et al., 2013).

A acarbose, pseudoaminoaçúcar, apresenta ação inibitória para β-glicosidase, nesta classe de inibidores temos ainda a família dos conduritóis, importantes inibidores irreversíveis para β-glicosidase e de ação moderada para α (MELO e CARVALHO, 2006).

Até o presente momento a presença de inibidores de glicosidases em cianobactérias e microalgas não foi bem documentado, sendo a principal referência o trabalho realizado por Cannel et al. (1987) onde, de 500 linhagens estudadas, apenas 38 espécies demonstraram resultado positivo, a maioria das linhagens inibiram alfa-glicosidase e apenas uma inibiu a atividade beta-galactosidase. As microalgas cujos extratos inibiram a atividade alfa-glicosidásca perteciam as famílias: Chlorophyceae (Chlorococcales, Conjugales, Tetrasporales, Volvocales, Cladophorales e Shiphonales), Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Prasinophyceae, Prymnesiophyceae e Rhodophyceae. As cianobactérias testadas que apresentaram a mesma atividade foram *Anabena spirodes*, *Anacystis nidulans, Coelosphaerium kuetzingianum, Microcystis aeroginosa, Nostoc* sp. e *Oscillatoria animalis.* A atividade beta-galactosidase foi inibida apenas pelo extrato da Chlorophyceae *Chlamydomonas plethora*.

A obtenção de Inibidores de glicosidases pode ser extremamente importante na caracterização cinética das enzimas e desenvolvimento de fármacos. Além disso, aplicações terapêuticas podem ser vislumbradas para glicosidases que participam do processo de reconhecimento celular. Isto ocorre, por exemplo, para alfa-glicosidases envolvidas no processamento de oligossacarídeos ligados à capa protéica do vírus HIV. (BRIGGS et al., 1995).

Neste contexto, as cianobactérias e microalgas tornam-se atrativas por produzirem naturalmente metabólitos secundários, que pertencem a diferentes classes estruturais de inibidores enzimáticos, com atividade farmacológicas como antibiótico, inunossupressor, anticancer, antiviral e antiinflamatório. Muitas destas atividades biológicas estão relacionadas à ação de inibidores de proteases e de glicosidases (RASTOGI e SINHA, 2009; CANNELL et al., 1987). Desta forma, a bioprospecção e o estudo do potencial de inibição enzimática destes metabólitos pode contribuir efetivamente para o desenvolvimento biotecnológico e/ou descoberta de novos fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Prospectar e caracterizar inibidores de glicosidases presentes em cianobactérias e microalgas dos estados de Tocantins e Amapá.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar, identificar e cultivar cianobactérias e microalgas coletadas nos estados de Tocantins e Amapá;
2. Obter extrato das culturas;
3. Obter frações aquosas e metanólicas dos extratos;
4. Selecionar cianobactérias e microalgas quanto à presença ou ausência de inibição nos extratos;
5. Avaliar as frações quanto ao potencial de inibição de alfa e beta-glicosidase.

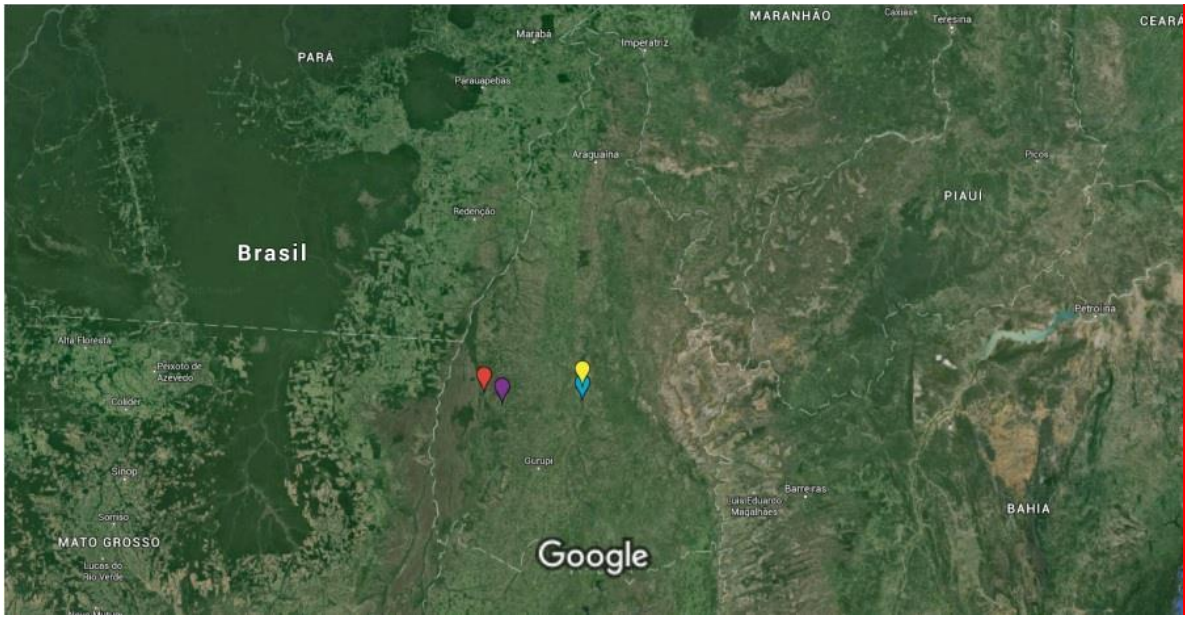
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

3.1.1 Coleta

As amostras do Tocantins foram coletadas entre os dias 12 e 13 de novembro de 2013 nos seguintes pontos (Figura 1): (1) Lagoa da Confusão (10°47’40.5”S 49°37’23.8”W); (2) Ilha Verde (A e B) (10°37’8.1”S 49°53’40.0”W); (3) Km 22 da Rodovia TO-010 (10°32’26.6”S 48°24’39.4”W); (4) Cidade de Porto Nacional (10°44’35.5”S 48°24’39,4”W); (5) Orla de Palmas (sem coordenadas). Em cada um dos pontos foi coletado 50mL de amostra ambiental de água

Figura 1 – Mapa com coordenadas dos pontos de coleta - Tocantins.



Pontos de coleta: (1) roxo: Lagoa da Confusão, (2) vermelho: Ilha Verde, (3) amarelo: Km 22 Rodovia TO-010, (4) azul: Cidade de Porto Nacional. Fonte: Google Maps.

As amostras do Amapá foram cedidas pela Dra. Sílvia Faustino, professora da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), e foram coletadas na Lagoa dos Índios e na bacia hidrográfica do Igarapé Fortaleza.

A Lagoa dos Índios que está situada no estado do Amapá entre as cidades de Macapá e Santana, no Km 3 da Rodovia Duque de Caxias é uma área de ressaca inserida na bacia hidrográfica do Igarapé Fortaleza (BRASIL, 2014).

3.1.2 Processamento das amostras

As amostras coletadas no estado do Tocantins foram processadas, na chegada ao laboratório, como se segue:

- As provenientes dos pontos 1 e 4 possuíam seixos originários do local da coleta e foram homogeneizada, as pedras retiradas, em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm e o precipitado formado foi ressuspendido em meio BG-11 (VONSHAK, 1986);
- As demais amostras foram completadas com água destilada até atingir o volume final de 500mL, sendo 250mL separados para estoque em um erlenmeyer e os 250mL restantes filtrado a vácuo com membrana (Millipore) com *cut-off* de 0,45µm, os filtros foram então transferidos para tubos tipo falcon contendo meio BG-11 e homogeneizados, em seguida foi feito diluições seriadas de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000 e posteriormente plaqueadas em meio BG-11 sólido. Os isolados obtidos foram cultivados em erlenmeyer contendo meio BG-11.

As amostras provenientes do Amapá foram repicadas em erlenmayers contendo meio BG-11.

3.1.3 Cultivo

O meio de cultura utilizado foi o BG-11 (Tabela 1) descrito por Rippka et al. (1979) que é amplamente utilizado para o cultivo de cianobactéria, salvo culturas que necessitam de nutrientes diferenciados. Para obtenção do meio BG-11 sólido o que difere é a adição de ágar 1%.

Tabela 1 - Meio BG-11. Fonte: modificado (RIPPKA et al., 1979). *Após autoclavado.

Nutrientes	Quantidade
$NaNO_3$	1.5g
$K_2HPO_4 + 3H_2O$	0.04g
$MgSO_4 + 7H_2O$	0.075g
$CaCl_2 + 2H_2O$	0.036g
Ácido cítrico	0.006g
Citrato de amônio férrico	0.006g
EDTA	0.001g
Na_2CO_3	0.02g
Traços de metal - H_3BO_4 - $MnCl_2 + 4H_2O$ - $ZnSO_4 + 7H_2O$ - $Na_2MoO_4 + 2H_2O$ - $CuSO_4 + 5H_2O$ - $Co(NO_3)_2 + 6H_2O$	 2.86g 1.81g 0.222g 0.390g 0.079g 0.494g
Água deionizada	1000mL
pH*	7.4

3.1.4 Identificação

As culturas foram identificadas morfologicamente por microscopia, entretanto para as duas culturas R8 e P38 foi realizado também identificação molecular através do gene 16SrRNA indicando as espécies *Synechococcus* sp. e *Limnothrix* sp. respectivamente. As fotos de cada cultura estão disponíveis no Anexo-I.

3.1.5 Seleção

Foram selecionadas 24 amostras (Tabela 2) sendo 8 amostras do Tocantins e 16 do Amapá que foram cultivadas em meio BG-11 completo com fotoperíodo de 12 horas de fase clara e 12 horas de fase escura. As culturas utilizadas neste estudo fazem parte da coleção de culturas de cianobactérias e microalgas do Laboratório de Genômica Funcional e Biotecnologia.

Tabela 2 - Lista de amostras com seus respectivos pontos de origem.

Amostra	Ponto de coleta	Estado	Identificação morfológica (gênero)*
A1	Ilha Verde	Tocantins	Chlorella
A24	Lagoa da Confusão	Tocantins	-
A25	Plantação de arroz	Tocantins	-
A26	Orla de Palmas	Tocantins	-
B3	Orla de Palmas	Tocantins	Chlorella
B4	Orla de Palmas	Tocantins	Chlorella
B5	Ilha Verde	Tocantins	-
B6	Lagoa da Confusão	Tocantins	Chlorella
G	-	Amapá	Limnothrix
M	-	Amapá	Monoraphidium
P	-	Amapá	Planktothrix
P15	Lagoa dos Índios	Amapá	Nostoc
P29	Lagoa dos Índios	Amapá	Limnothrix
P38	Igarapé Fortaleza	Amapá	Limnothrix
Q17	Igarapé Fortaleza	Amapá	Limnothrix
Q20	-	Amapá	-
Q29	Igarapé Fortaleza	Amapá	Merismopedia
Q30	Igarapé Fortaleza	Amapá	Limnothrix
Q33	Lagoa dos Índios	Amapá	Limnothrix
Q35	-	Amapá	Merimospedia
Q36	Igarapé Fortaleza	Amapá	Limnothrix
R8	Lagoa dos Índios	Amapá	Synechococcus
R11	Igarapé Fortaleza	Amapá	Limnothrix
R13	Igarapé Fortaleza	Amapá	Limnothrix

(*) a confirmar.

3.2 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

A metodologia de extração e fracionamento utilizada foi baseada em Pandey et al. (2013). A quantidade de 50mL de cada uma das amostras selecionadas foram adicionadas em tubos tipo falcon e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante composto pelo meio de cultura foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 10mL de água deionizada, em seguida cada amostra foi levada para ser sonicada em um ultrassom de ponta em 3 ciclos de 10 segundos com potência média de 40%. Uma vez as células rompidas, uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos foi realizada, o sobrenadante então

denominado extrato bruto foi reservado em um novo tubo tipo falcon e o precipitado descartado.

Para o fracionamento utilizou-se 10% de resina de interação hidrofóbica (Diaion HP-20 da Sigma-Aldrich) empacotada em seringas de 10mL contendo fibra de vidro no fundo. O extrato bruto foi vertido na seringa e em seguida foi vertido 30 mL de água deionizada, o conteúdo não retido na coluna e o eluído com água foi denominado fração aquosa e armazenado em tubo tipo falcon previamente pesado e identificado. Posteriormente foi vertido na seringa 30mL de metanol, o conteúdo eluído com metanol foi denominado fração metanólica e armazenado em tubo tipo falcon previamente pesado e identificado. Esse processo foi feito para cada uma das amostras, gerando duas frações de cada extrato.

As frações aquosas e metanólicas foram liofilizadas e todos os tubos foram novamente pesados, as frações aquosas foram ressuspendidas em 1mL de água deionizada e as frações metanólicas em 1mL de solução metanol 1%.

3.3 ENSAIO DE DETECÇÃO EM PLACA DE PETRI

O ensaio de detecção de inibidores em placa foi baseado nas metodologias de Eberhart e colaboradores (1964) e Pandey e colaboradores (2013) com modificações, que foram necessárias para a adaptação do método para cianobactérias e microalgas.

O ensaio consiste inicialmente de uma mistura reacional composta por 1mg/mL da enzima β-glicosidase de amêndoas (7,7U/mg, Sigma-Aldrich) reconstituída em tampão de acetato de sódio 0,1M pH 5, o inibidor padrão β-epóxido de conduritol (5mg/mL, Sigma-Aldrich), no ensaio 0,025mg/µL, ou a amostra (extrato bruto, fração aquosa ou metanólica) e tampão de acetato de sódio 0,1M pH 5, adicionados em tubos 1,5mL tipo eppendorf com os volumes descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Relação de volumes de reagentes na mistura reacional. (*) Extrato bruto, fração aquosa ou fração metanólica.

	Controle positivo (+)	Contole negativo (-)	Amostra teste
Conduritol	20µL	-	-
Enzima	4 µL	4 µL	4 µL
Amostra*	-	-	30 µL
Soluçao Tampão	26 µL	46 µL	16 µL

Após 1 hora de incubação em temperatura ambiente, para que ocorra ou não a formação do complexo enzima-inibidor, 20 µL da mistura reacional foram adicionadas em poços feitos em placa de petri composta por ágar a 2% (p/v), solução tampão de acetato de sódio 0,1M pH 5, cloreto de ferro III 5% (p/v) e o substrato β-glicosídeo, esculina 0,2% (p/v).

A análise da atividade inibitória se faz pela visualização por um período de 1h em intervalos pré-determinados (5min, 10min, 15min, 30min e 60min). Ocorre formação de halo na cor escura em caso de ausência de inibidor e a ausência de halo na presença do inibidor. Os controles utilizados foram: positivo para atividade inibitória com a enzima o inibidor irreversível β-epóxido de conduritol e negativo somente a enzima β-glicosidase em volumes descritos na tabela 3.

Segundo Eberhart e colaboradores (1964) uma vez que não ocorra a formação de halo por um período de pelo menos 30 minutos será considerado a presença de inibidor na amostra. A formação do halo em cor escura é devido a reação do ferro presente na placa com a esculetina oriunda da hidrólise do substrato esculina pela enzima β-glicosidase em esculetina + glicose (PANDEY et al., 2013).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO

As amostras que apresentaram extratos com resultado positivo para inibição foram então novamente selecionadas, uma vez que sendo a esculina um substrato para β-glicosidases que pode ser hidrolisado em menor proporção por α-glicosidase, portanto se fez necessário a realização de dois novos testes, sendo cada um com substrato específico para α- ou β-glicosidase, para analisar a

especificidade e caracterizar a porcentagem de inibição de cada extrato em relação as enzimas.

3.4.1 Potencial inibitório do extrato frente α-glicosidase

A análise do potencial de inibição de α-glicosidase foi realizado por método colorimétrico em microplacas utilizando metodologia adaptada com base nas descritas por Cannel e colaboradores (1987) e Shinde e colaboradores (2008). Nos poços da microplaca foram adicionados os seguintes reagentes de acordo com a tabela 4.

Tabela 4 - Relação de volumes de reagentes na microplaca - α

Reagentes	Branco	Controle Negativo	Inibidores [1]	[2]	[3]	[4]	Condição
Tampão	50µL	50µL	40µL	30µL	20µL	10µL	30 min 37°C incubação
Enzima	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	
Inibidor	-	-	10µL	20µL	30µL	40µL	
Substrato	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	30 min 37°C reação enzimática
Paralisador	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	Paralisação

Foi utilizada na microplaca: a enzima α-Glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich) 1mg/mL dissolvida em tampão fosfato 50mM pH 7 e então diluída em tampão acetato 50mM até atingir a concentração de 0,04U na placa, o tampão acetato pH5 diluído até atingir a concentração de 50mM na microplaca e as 4 diferentes quantidades de inibidor. Foi realizada então uma incubação da placa por 30 minutos em 37°C para que ocorresse a formação do complexo enzima-inibidor, após esse período foi adicionado o substrato específico p-nitrofenil α-D-glicopiranosídeo (pNPG – α) que foi dissolvido em tampão fosfato 10mM pH 7 e estocado na concentração de 20mM, sendo que no ensaio a concentração foi de 5mM, seguido de uma nova incubação de 30 minutos em 37°C para que ocorra a reação enzimática e ao final foi adicionado Na_2CO_3 para que ocorra a paralisação de reação devido a elevação de pH que induz a inativação da enzima. Para o branco foi realizada a paralisação antes da adição

do substrato. Após a paralisação de reação as placas foram lidas a 405nm em leitor de microplaca.

Os dados de absorbância obtidos pela leitura das microplacas foram analisados através da fórmula, onde o coeficiente de extinção molar do pNPG – α equivale a 18,1 e onde, uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima a qual produz um mol de pNPG – α por minuto a 37°C e pH7 (SUZIKI et al, 1984).

$$\mathrm{U/mL} = \frac{\Delta Abs\ (Absteste - Absbranco)\ .Vt\ .df}{18{,}1\ .\ 1{,}0\ .\ \mathrm{t}\ .\ \mathrm{Vs}}$$

$$\mathrm{U/mL} = \Delta\mathrm{Abs}\ .\ 0{,}0295\ .\ \mathrm{df}$$

Vt = volume total (mL)
Vs = volume da amostra (mL)
18,1 = coeficiente de extinção molar pNPG-α
1,0 = comprimento de cubeta (cm)
df = fator de diluição
t = tempo de reação (min)

3.4.2 Potencial inibitório do extrato frente β-glicosidase

A análise do potencial de inibição de β-glicosidase foi realizado com método colorimétrico em microplacas (Tabela 5) utilizando metodologia adaptada com base nas descritas por Zelck, Trippense, Becker (1996) e Kaur e colaboradores (2007).

Tabela 5 - Relação de volumes de reagentes na microplaca - β

Reagentes	Branco	Controles		Inibidores				Condição
		+	-	[1]	[2]	[3]	[4]	
Tampão	50µL	30µL	50µL	40µL	30µL	20µL	10µL	30 min 37°C incubação
Enzima	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	
Inibidor	-	20µL*	-	10µL	20µL	30µL	40µL	
Substrato	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	30 min 37°C reação enzimática
Paralizador	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	Paralisação

Foi utilizada na microplaca: a enzima β-Glicosidase de amêndoas (Sigma-Aldrich) 1mg/mL dissolvida em tampão tris-HCl 50mM pH 7,4 e então diluída em tampão acetato de sódio 50mM pH 5 até atingir a concentração de 0,04U na placa, e 4 diferentes concentrações de inibidor, como controle positivo foi utilizado o inibidor padrão β-epóxido de conduritol. Foi realizada então uma incubação da placa por 30 minutos à 37°C para que ocorra a formação do complexo enzima-inibidor, após esse período foi adicionado o substrato específico p-nitrofenil β-D-glicopiranosídeo (pNPG – β) seguido de uma nova incubação de 30 minutos em 37°C para que ocorra a reação enzimática e ao final foi adicionado Na_2CO_3 para que ocorra a paralisação de reação devido a elevação de pH que induz a inativação da enzima. Para o branco foi realizada a paralisação antes da adição do substrato. Após a paralisação de reação as placas foram lidas a 405nm em leitor de microplaca.

Os dados de absorbância obtidos pela leitura das microplacas foram analisados através da fórmula, onde o coeficiente de extinção molar do pNPG – β equivale a 18,1 e onde, uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima a qual produz um mol de pNPG – β por minuto a 37°C e pH5 (GROVER, 1977).

$$\mathrm{U/mL} = \frac{\Delta Abs\ (Absteste - Absbranco)\ .Vt\ .df}{18{,}1\ .\ 1{,}0\ .\ \mathrm{t}\ .\ \mathrm{Vs}}$$

$$\mathrm{U/mL} = \Delta\mathrm{Abs}\ .\ 0{,}0295\ .\ \mathrm{df}$$

Vt = volume total (mL)
Vs = volume da amostra (mL)
18,1 = coeficiente de extinção molar pNPG-β
1,0 = comprimento de cubeta (cm)
df = fator de diluição
t = tempo de reação (min)

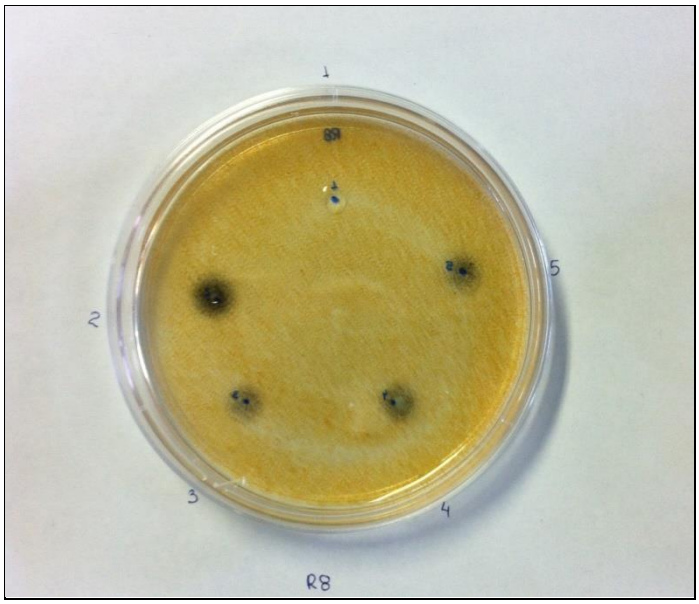
4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE ENSAIO EM PLACA

O ensaio de padronização do teste foi realizado com as amostras *Synechococcus* sp. e *Aphanocapsa* sp. provenientes do Amapá. As modificações do método mostrou eficiência, produzindo resultados rápidos e reprodutivos. Entretanto como as amostras utilizadas neste teste foram ressuspendidas com DMSO, este foi utilizado como um terceiro controle, apresentando uma pequena inibição seguida da formação do halo, para se evitar falsos positivos este foi excluído e substituído pela solução metanol 1% nos demais testes.

A figura 2 apresenta o teste com a amostra *Synechococcus* sp no tempo de 60 minutos. Verifica-se a ausência de halo no controle positivo (1) e a presença no controle negativo (2), assim validando o teste. A fração aquosa (4) apresentou halo indicando a ausência de inibidores. A fração metanólica (5) apresentou o halo somente na leitura de 60 minutos, indicando a presença de inibição de acordo com os parâmetros estabelecidos.

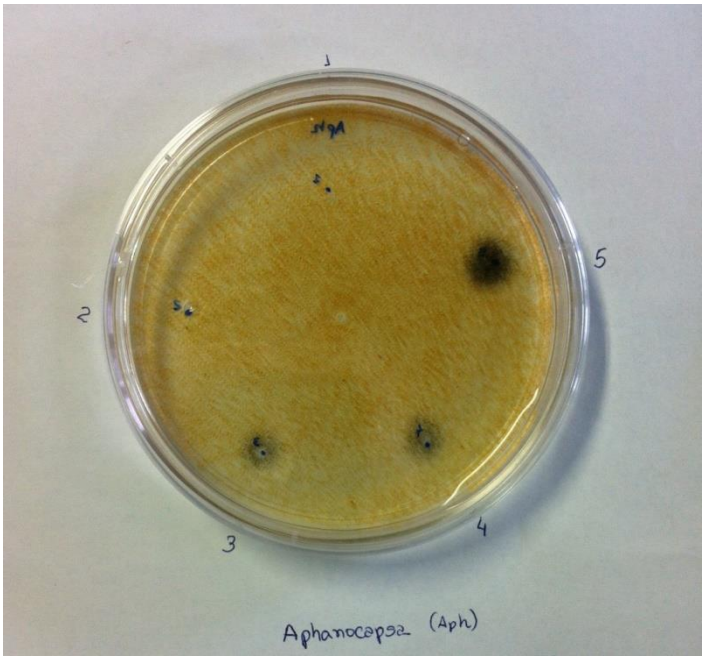
Figura 2 – Teste de padronização do ensaio *Synechococcus* sp.



(1) controle positivo, (2) controle negativo, (3) controle DMSO, (4) fração aquosa, (5) fração metanólica.

A figura 3 – apresenta o teste com a amostra *Aphanocapsa* sp. no tempo de 60 minutos. Verifica-se a ausência de halo no controle positivo (1) e a presença no controle negativo (5), assim validando o teste. A fração aquosa (4) apresentou halo indicando a ausência de inibidores. A fração metanólica (2) não apresentou o halo durante todo o teste, indicando a presença de inibição.

Figura 3 – Teste de padronização do ensaio (*Aphanocapsa sp*).



(1) controle positivo, (2) fração metanólica, (3) controle DMSO, (4) fração aquosa, (5) controle negativo.

Em uma nova verificação extra da placa após 24 horas da conclusão do teste foi comprovado a presença de inibição na fração metanólica da amostra *Aphanocapsa sp.* sendo igualada ao controle positivo (1) que até o presente momento foram os únicos que não apresentaram a formação de halo.

4.2 ENSAIO DE DETECÇÃO EM PLACA NOS EXTRATOS BRUTOS

Uma vez obtidos os extratos brutos e o ensaio em placa padronizado, foi realizado o teste (Tabela 6) antes do fracionamento para de forma qualitativa avaliar se dentre as amostras utilizadas existiam potenciais inibidores.

Tabela 6 – Ensaio em placa para extrato bruto – Tempo de inibição

Amostra	5 min	10min	15min	30min	60min
A1	-	+	+	+	+
A24	-	+	+	+	+
A25	-	+	+	+	+
A26	-	+	+	+	+
B3	-	+	+	+	+
B4	-	+	+	+	+
B5	-	+	+	+	+
B6	-	+	+	+	+
G	-	+	+	+	+
M	-	-	-	-	+
P	-	-	+	+	+
P15	-	-	+	+	+
P29	-	-	-	-	+
P38	-	-	-	-	+
Q17	-	-	-	+	+
Q20	-	+	+	+	+
Q29	-	+	+	+	+
Q30	-	+	+	+	+
Q33	-	+	+	+	+
Q35	-	+	+	+	+
Q36	-	-	+	+	+
R8	-	-	-	-	+
R11	-	+	+	+	+
R13	-	-	-	+	+

(-) Não formação do halo; (+) Formação do halo.

O resultado do teste (Tabela 6) aponta que: entre as amostras do Tocantins nenhuma apresentou inibição, pois todas apresentaram halo na leitura de 10 minutos; dentre as amostras do Amapá sete amostras (G, Q20, Q29, Q30, Q33, Q35 e R11) apresentaram halo na leitura de 10 minutos, três amostras (Planktothrix, P15 e Q36) apresentaram halo na leitura de 15 minutos, duas

amostras (Q17, Q36 e R13) apresentaram halo na leitura de 30 minutos e quatro amostras (Monoraphidium, P29, P38 e *Synechococcus* sp) apresentaram halo na leitura de 60 minutos.

Um teste adicional para cada amostra foi feito, este com o extrato bruto e sem a enzima foram adicionados em poços na placa para avaliar a presença de glicosidases, entretanto nenhuma das amostras houve a formação do halo.

4.3 FRACIONAMENTO

Após a liofilização das amostras os tubos tipo falcon foram pesados sendo obtida a quantidade em gramas de cada uma das frações. Sabendo-se a quantidade em gramas do peso seco (tabela 7), posteriormente foi realizado o cálculo de concentração em µg/mL para cada fração utilizada nos demais testes.

Tabela 7 – Peso seco das frações em µg.

Amostra	Aquosa	Metanólica	Amostra	Aquosa	Metanólica
A1	0.013	0.007	P29	0.547	0.542
A24	0.017	0.007	P38	0.546	0.546
A25	0.012	0.023	Q17	0.549	0.550
A26	0.010	0.017	Q20	0.543	0.546
B3	0.012	0.019	Q29	0.543	0.546
B4	0.012	0.017	Q30	0.540	0.547
B5	0.011	0.015	Q33	0.547	0.609
B6	0.014	0.004	Q35	0.549	0.551
G	0.018	0.017	Q36	0.547	0.543
M	0.017	0.015	R8	0.017	0.022
P	0.020	0.008	R11	0.541	0.542
P15	0.033	0.009	R13	0.543	0.542

4.4 ENSAIO DE DETECÇÃO EM PLACA NAS FRAÇÕES

Considerando o resultado obtido nos extratos brutos foi feito o fracionamento e em seguida um novo teste qualitativo foi realizado, agora com as frações aquosas e metanólicas.

O teste qualitativo das frações aquosas (Tabela 8) foi realizado para identificar a presença ou ausência de inibidores na parte hidrofílica dos extratos.

Tabela 8 – Ensaio em placa de petri para fração aquosa – Tempo de inibição.

Amostra	5 min	10min	15min	30min	60min
A1	-	+	+	+	+
A24	-	+	+	+	+
A25	-	+	+	+	+
A26	-	+	+	+	+
B3	-	+	+	+	+
B4	-	+	+	+	+
B5	-	+	+	+	+
B6	-	+	+	+	+
G	-	+	+	+	+
M	-	+	+	+	+
P	-	+	+	+	+
P15	-	+	+	+	+
P29	-	+	+	+	+
P38	-	+	+	+	+
Q17	-	+	+	+	+
Q20	-	+	+	+	+
Q29	-	+	+	+	+
Q30	-	+	+	+	+
Q33	-	+	+	+	+
Q35	-	+	+	+	+
Q36	-	+	+	+	+
R8	-	+	+	+	+
R11	-	+	+	+	+
R13	-	+	+	+	+

(-) Não formação do halo; (+) Formação do halo.

O resultado do teste (Tabela 8) aponta a ausência de inibidores na fração aquosa dos extratos de todas as amostras.

O teste qualitativo das frações metanólicas (Tabela 9) foi realizado para identificar a presença ou ausência de inibidores na parte hidrofóbica dos extratos.

Tabela 9 – Ensaio em placa de petri para fração metanólica – Tempo de inibição

Amostra	5 min	10min	15min	30min	60min
A1	-	+	+	+	+
A24	-	+	+	+	+
A25	-	+	+	+	+
A26	-	+	+	+	+
B3	-	+	+	+	+
B4	-	+	+	+	+
B5	-	+	+	+	+
B6	-	+	+	+	+
G	-	+	+	+	+
M	-	-	-	-	-
P	-	-	+	+	+
P15	-	-	+	+	+
P29	-	-	-	-	-
P38	-	-	-	-	-
Q17	-	-	-	+	+
Q20	-	+	+	+	+
Q29	-	+	+	+	+
Q30	-	+	+	+	+
Q33	-	+	+	+	+
Q35	-	+	+	+	+
Q36	-	-	+	+	+
R8	-	-	-	-	-
R11	-	+	+	+	+
R13	-	-	-	+	+

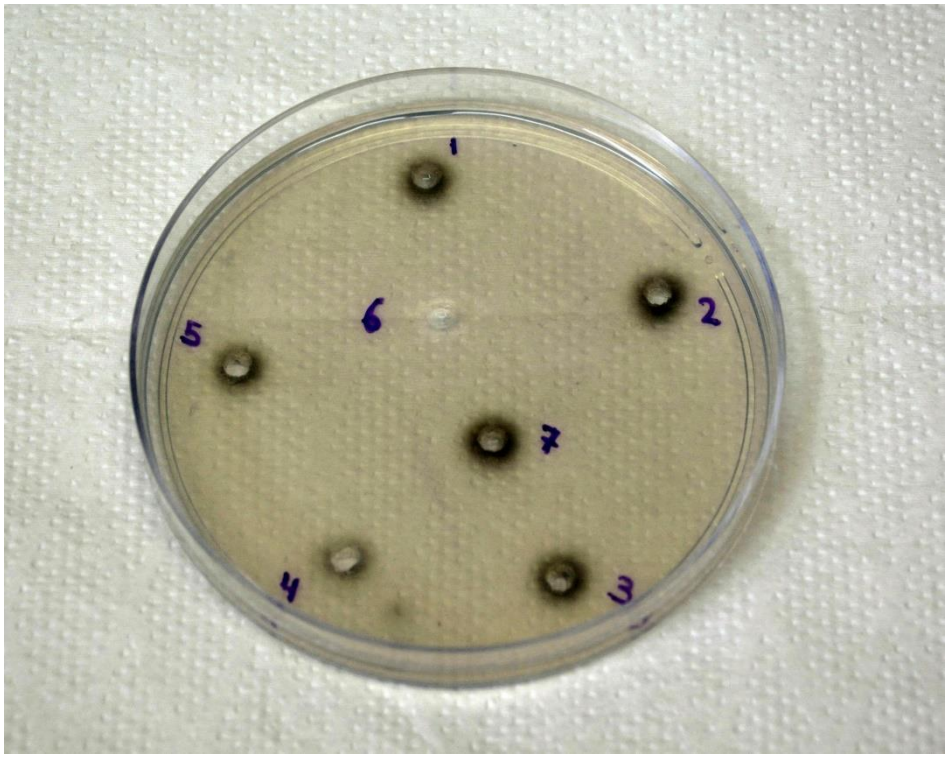
(-) Não formação do halo; (+) Formação do halo.

Dentre as frações metanólicas testatas (Tabela 9) nenhuma das amostras do Tocantins apresentaram inibidores, pois todas apresentaram halo na leitura de 10 minutos; dentre as amostras do Amapá sete amostras (G, Q20, Q29, Q30, Q33, Q35 e R11) apresentaram halo na leitura de 10 minutos, três amostras (Planktothrix, P15 e Q36) apresentaram halo na leitura de 15 minutos, duas amostras (Q17, Q36 e R13) apresentaram halo na leitura de 30 minutos e quatro amostras (Monoraphidium, P29, P38 e *Synechococcus* sp.) não apresentaram halo até na leitura de 60 minutos.

4.5 ENSAIO DE DETECÇÃO EM PLACA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

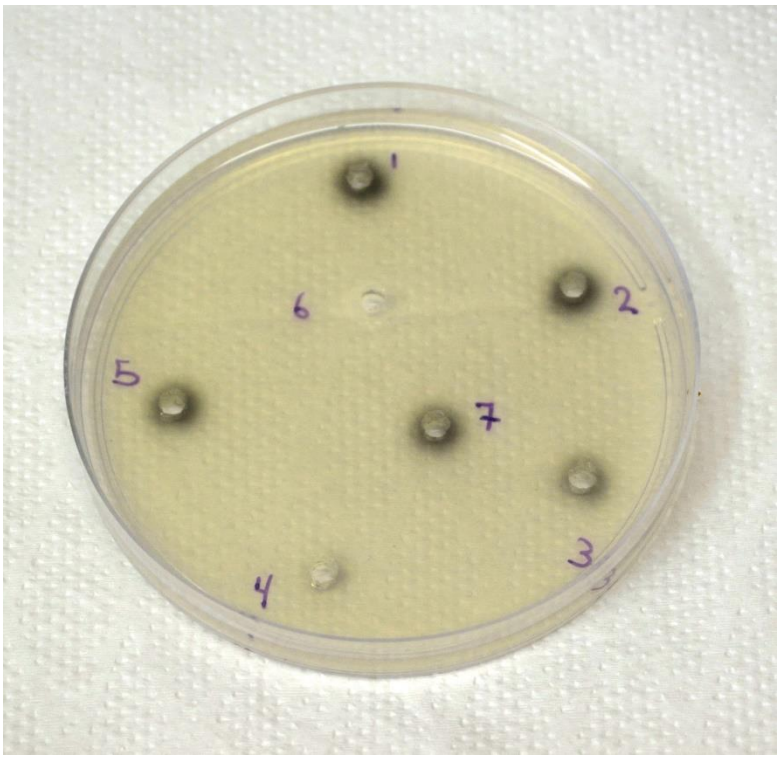
Uma vez conhecidas as amostras que apresentaram inibidores, tanto no extrato bruto quanto nas frações foram escolhidas as que apresentaram maior potencial inibitório e realizou-se um novo teste em placa. Desta vez foi utilizado além dos controles positivo, negativo e metanol, quatro diferentes volumes de frações (10µL, 20µL, 30µL e 40µL) para se avaliar a qualitativamente qual a concentração da fração foi necessária para se obter inibição. Para este teste foram selecionas duas amostras do Amapá: Monoraphidium (Figura 4) e *Synechococcus* sp. (Figura 5).

Figura 4 – Teste de diferentes concentrações Monoraphidium com 60 minutos de teste.



Concentração no ensaio: (1) 0,06µg/µL, (2) 0,12µg/µL, (3) 0,18µg/µL, (4) 0,24µg/µL, (5) controle metanol, (6) controle positivo, (7) controle negativo.

Figura 5 – Teste de diferentes concentrações *Synechococcus* sp. com 60 minutos de teste.



Concentração no ensaio: (1) 0,088µg/µL, (2) 0,176µg/µL, (3) 0,264µg/µL, (4) 0,352µg/µL, (5) controle metanol, (6) controle positivo, (7) controle negativo.

Ambas as amostras apresentaram inibição por 30 minutos na concentração 4 que corresponde a 40µL da fração metanólica. Contudo a amostra *Synechococcus* sp. apresentou inibição de até 30 minutos também na concentração 3 e de até 60 minutos na concentração 4.

4.6 ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO

Após os ensaios qualitativos foi realizado então o ensaio quantitativo de potencial inibitório com substrato específico, classificando a fração metanólica das duas amostras selecionadas de acordo com a porcentagem de inibição para α- e β-glicosidases.

4.6.1 Para α-glicosidase

Para caracterizar o potencial de inibição de α-glicosidase foram utilizados as frações metanólicas das amostras selecionadas sendo *Synechococcus* sp (tabela 10 e figura 6) e Monoraphidium (tabela 11 e figura 7).

Tabela 10 - Potencial inibitório para α-glicosidase na fração metanólica – *Synechococcus* sp.

U/mL	Amostra – Inibidor (µg/µL)	Atividade (%)	Inibição (%)
0,0530	0	100	0
0,0592	0,088	99	1
0,0462	0,176	87	13
0,0380	0,264	71	29
0,0246	0,352	46	54

Figura 6 – Teste potencial inibitório para α-glicosidase na fração metanólica – *Synechococcus* sp.

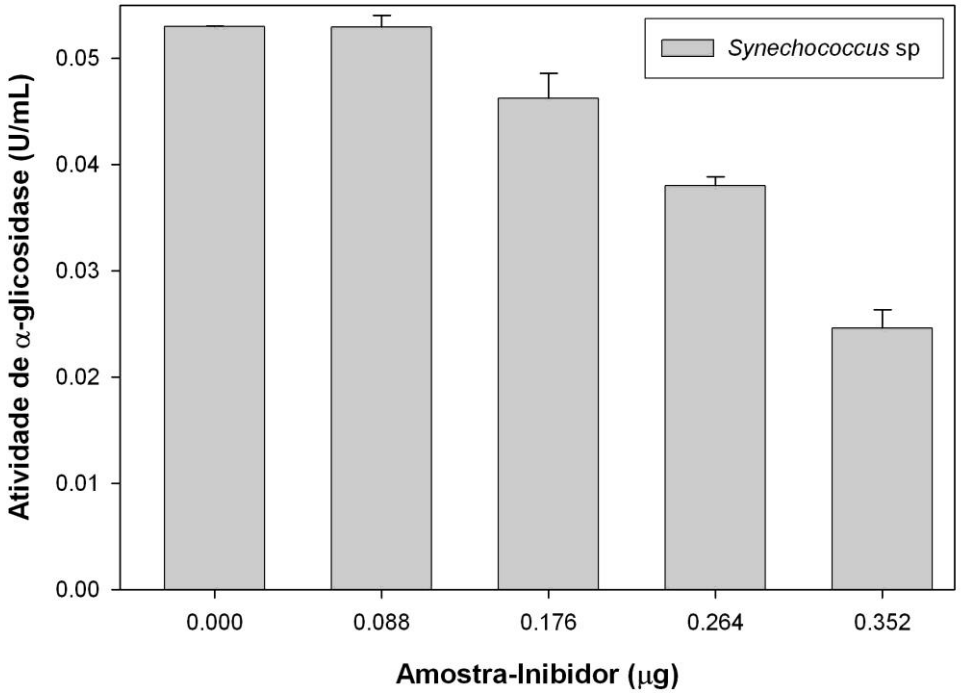
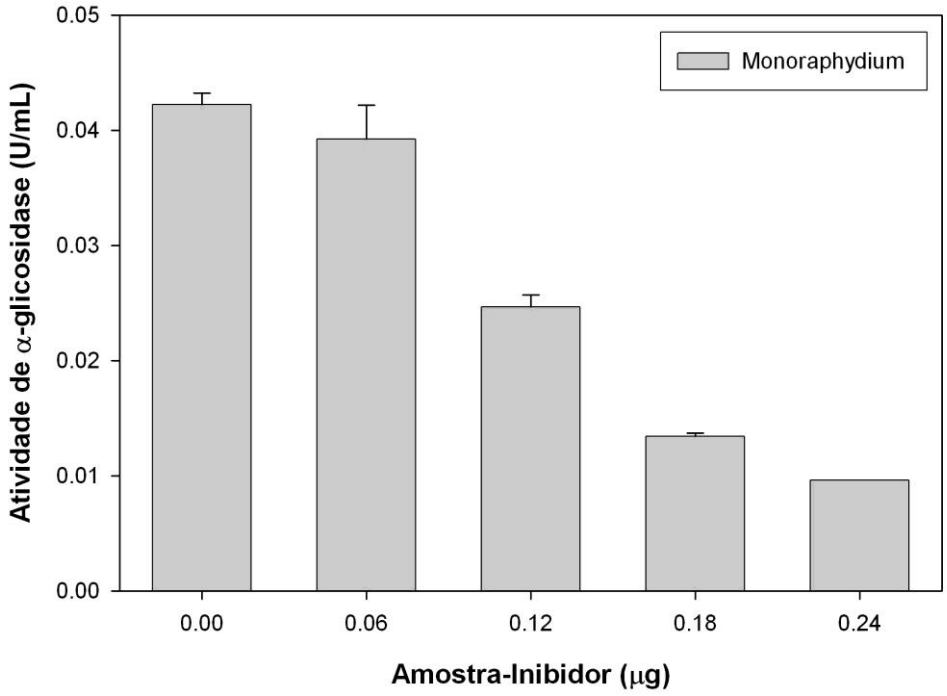


Tabela 11 - Potencial inibitório para α-glicosidase na fração metanólica – Monoraphidium.

U/mL	Amostra – Inibidor (µg/µL)	Atividade (%)	Inibição (%)
0,0422	0	100	0
0,0392	0,06	92	8
0,0247	0,12	58	42
0,0134	0,18	31	69
0,0096	0,24	22	78

Figura 7 – Teste potencial inibitório para α-glicosidase na fração metanólica – Monoraphidium.



4.6.2 Para β-glicosidase

Para caracterizar o potencial de inibição de β -glicosidase foram utilizados as frações metanólicas das amostras selecionadas sendo *Synechococcus* sp. (tabela 12 e figura 8) e Monoraphidium (tabela 13 e figura 9).

Tabela 12 - Potencial inibitório para β-glicosidase na fração metanólica – *Synechococcus* sp.

U/mL	Amostra – Inibidor (µg/µL)	Atividade (%)	Inibição (%)
0,0485	0	100	0
0,0471	0,088	97	3
0,0463	0,176	95	5
0,0432	0,264	89	11

Figura 8 – Teste potencial inibitório para β-glicosidase na fração metanólica – *Synechococcus* sp.

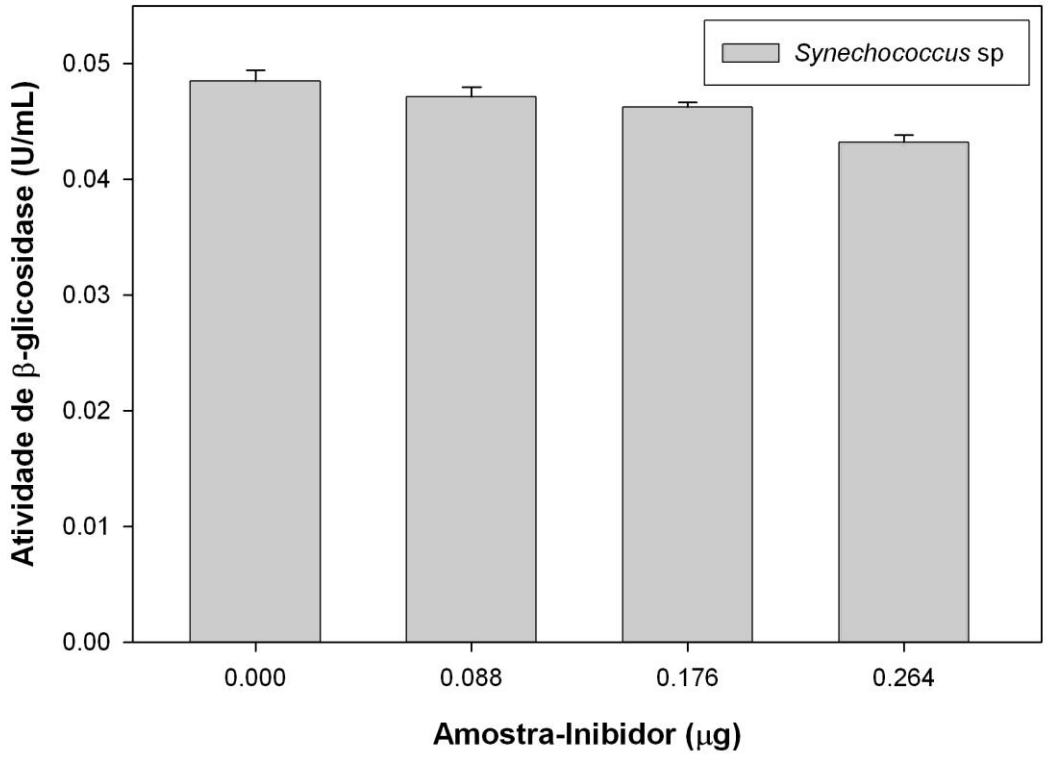
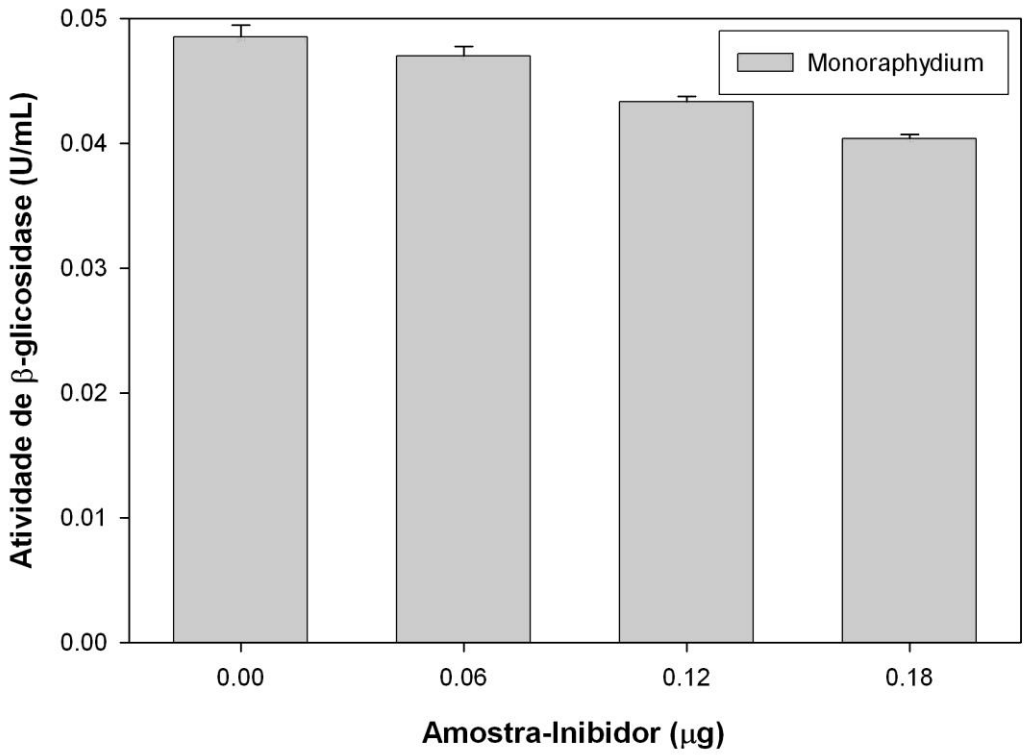


Tabela 13 - Potencial inibitório para β-glicosidase na fração metanólica – Monoraphidium.

U/mL	Amostra – Inibidor (µg/µL)	Atividade (%)	Inibição (%)
0,0485	0	100	0
0,0470	0,06	96	4
0,0433	0,12	89	11
0,0404	0,18	83	17

Figura 9 – Teste potencial inibitório para β-glicosidase na fração metanólica – Monoraphidium.



5 DISCUSSÃO

O teste com a metodologia adaptada com base nas descritas por Eberhart e colaboradores (1964) e Pandey e colaboradores (2013) foi padronizado com duas amostras provenientes do Amapá sendo a *Synechococcus* sp e *Aphanocapsa* sp., ambas as amostras apresentaram inibição nos 60 minutos que compreendem o teste, sendo que amostra *Aphanocapsa* sp. permaneceu inibindo por 24 horas assim como o inibidor padrão conduritol.

Uma vez o teste padronizado realizou-se a extração de todas as amostras selecionadas. Entretanto após a realização da padronização a amostra *Aphanocapsa* sp. foi perdida pela ocorrência de contaminação e o extrato obtido para o teste de padronização não possuía quantidade suficiente para que esta amostra fosse incluída nos demais testes.

O primeiro teste foi realizado nos extratos brutos das amostras para avaliar se dentre estas possuíam possíveis inibidores e sendo constatada a presença dos mesmos.

O próximo teste foi realizado na fração aquosa e metanólica das amostras para avaliar em qual fração se detecta a presença de possíveis inibidores. O resultado do teste aponta que no ensaio em placa nenhuma fração aquosa apresentou inibição enquanto que nas frações metanólicas detectou-se a presença de inibidores. Sendo assim considera-se que os inibidores detectados são hidrofóbicos, pois foram fracionados utilizando resina adsorvente de componentes hidrofóbicos.

Ainda com a fração metanólica foi realizado o teste de concentração em placa em duas amostras selecionadas (*Synechococcus* sp e Monoraphidium), onde se verificou que conforme o aumento da concentração houve o aumento do tempo de inibição, pois em ambas amostras testadas as maiores concentrações atingiram o tempo mínimo de 30 minutos para se considerar a amostra como positivo para presença de inibidores.

Considerando que o substrato esculina pode ser clivado por ambas glicosidases, fez-se necessário a aplicação de um último teste que foi composto

por um ensaio que avalia o potencial inibitório de cada fração assim como sua especificidade para α- ou β-glicosidase em diferentes concentrações.

O teste com o substrato específico demostrou que a fração metanólica da amostra *Synechococcus* sp. apresentou inibição de 54% para α-glicosidase e 11% para β-glicosidase, enquanto que a fração metanólica da amostra Monoraphidium apresentou inibição de 78% para α-glicosidase e 17% para β-glicosidase. Contudo verificou-se que ocorre uma maior concentração de inibidores de α-glicosidase em relação a β-glicosidase.

Comparando os testes com as frações metanólicas em placa de petri e microplaca verificou-se que tanto na amostra *Synechococcus* sp. quanto na amostra Monoraphidium mesmo em menores concentrações o teste em microplaca apresentou grande porcentagem de inibição para α-glicosidase e uma pequena porcentagem para β-glicosidase indicando que, no teste em placa, além de possuir uma maior concentração de amostra – inibidor pode ter ocorrido o sinergismo de inibidores para a inibição de β-glicosidase.

Contudo conclui-se que tanto cianobactérias e microalgas amazônicas tem grande potencial na produção de inibidores de glicosidase; O ensaio em placa de petri com o substrato esculina se mostrou eficiente e pode ser utilizado em screening de inibidores de glicoses em geral; As amostras provenientes do Tocantins que foram testadas não apresentaram inibidores nas concentrações avaliadas; O método de extração foi eficiente na obtenção das frações metanólicas e aquosas; Os inibidores obtidos possuem características hidrofóbicas, pois foram fracionados em resina de interação hidrofóbica; A cianobactéria *Synechococcus* sp. e a microalga Monoraphidium apresentaram maior inibição para α-glicosidase; Dentre as 24 amostras avaliadas, quatro provenientes do estado do Amapá se mostraram promissoras.

Entretanto faz-se necessário a aplicação de novos testes com maiores concentrações além da identificação e purificação dos inibidores

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, A.J., DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiological Reviews, 54: p.450-472. 1990.

BERMEJO, R. Phycocyanins. In: SHARMA, N. K., RAI, A.K., STAL, L.J. Cyanobacteria an economic perspective. Willey Blacwell. p.209-225. 2014.

BIONDI N.; PICCARDI R.; MARGHERI M. C.; RODOLFI L.; SMITH G. D.; TREDICI M. R. Evaluation of Nostoc strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. Applied and Environmetal Microbiology; 70: p.3313–3320. 2004.

BORGES DE MELO, E.; DA SILVEIRA GOMES, A.; CARVALHO, I. α- and β-Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. Tetrahedron, v. 62, n. 44, p. 10277–10302. 2006.

BRIGGS, J. C.; HAINES, A. H. and TAYLOR, R. J. K. (Halogenomethyl) phenyl α-D-glucopyranosides as enzyme-activated irreversible inhibitors of yeast α-glucosidase and potential anti-HIV agents. Journal of the Chemical Society, Perkin Tansactions 1. p.27-37. 1995

CANNEL, R.J.P.; KELLAM, S.J.; OWSIANKA, A.M.; WALKER, J.M. Microalgae and cyanobacteria as a source of glycosidase inhibitors. Journal of general microbiology, v. 133, n. 7, p. 1701–1705. 1987.

COLICA, G., DE PHILIPPIS, R. Exopolysaccharides from cyanobacterial and their possible industrial applications. In: SHARMA, N. K., RAI, A.K., STAL, L.J. Cyanobacteria an economic perspective. Willey Blacwell. p.197-207. 2014.

FERREIRA, S.B.; SODERO, A.C.R.; CARDOSO, M.F.C.; LIMA, E.S.; KAISER, C.R.; SILVA JR., F.P.; FERREIRA, V.F. Synthesis, biological activity, and molecular modeling studies of 1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates as α-glucosidades inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry. 53. p.2364-2375, 2010.

IUBMB. Enzyme Nomenclature IBMB. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Acesso em: 29 set. 2014.

KAJIMOTO, T. & NODE, M. Inhibitors against glycosidases as medicines. Current Topics in Medicinal Chemistry 9. p.13-23. 2009.

KAUR, J. et al. Purification and characterization of ß-glucosidase from Melanocarpus sp. MTCC 3922. Electronic Journal of Biotechnology, v. 10, n. 2. p. 260–270. 2007.

LEE, R.E. Phycology, fourth edition, Cambridge University Press. 2008.

LIU, J.; YUAN, X.; ZENH, G.; SHI, J.; CHEN, S. Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by Trichoderma viride in solid substrate fermentation. Process Biochemistry. v.41. p.2347-2351. 2006.

McMAHON, L. G.; NAKANO, H.; LEVY, M. D.; GREGORY III, J. F. Cytosolic pyridoxine-β-D-glucoside hydolase from porcine jejunal mucosa. Purification, properties, and comparison with broad specificity β-glucosidase. Journal of Biological Chemestry. 272. p.32025-32033. 1997.

MELO, E. B.; CARVALHO, I. α e β-glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. Quimica Nova. v. 29, n. 4. p. 840–843. 2006.

MELO, E. B.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α- e β-glucosidases inhibitors: chemical structure and biological activity. Tetrahedron 62: p.10277–10302. 2006.

OHMORI, M., EHIRA, S. Spirulina: an exemple of cyanobacterial as nutraceuticals. In: SHARMA, N. K., RAI, A.K., STAL, L.J. Cyanobacteria an economic perspective. Willey Blacwell. p.103-118. 2014.

PANDEY, S. et al. A novel method for screening beta-glucosidase inhibitors. BMC microbiology, v. 13, n. 1, p. 55, 2013.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. Biotechnology Advances, v. 27, n. 4, p. 521–539, 2009.

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Ed. Blackwell Science. Oxford, 2004.

RIPPKA, R. et al. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Journal of General Microbiology, v. 111, n. 1, p. 1–61. 1979.

SAMANTARAY, S., BHATI, R., MALLICK, N. Cyanobacterial polyhydroxyalkanoates: an alternative source for plastics. In: SHARMA, N. K., RAI, A.K., STAL, L.J. Cyanobacteria an economic perspective. Willey Blacwell. p.227-244. 2014.

SHARATHCHANDRA, K. & RAJASHEKHAR, M. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. Journal of Algal Biomass Utilization. v. 2, p.83-97, 2011.

SHARMA, N. K., RAI, A.K., STAL, L.J. Cyanobacteria na economic perspective. Willey Blacwell. 2014.

SHARMA, N. K., STAL, L.J. The economics of cyanobacterial-based biofuel production: challenges and opportunities. In: SHARMA, N. K., RAI, A.K., STAL, L.J. Cyanobacteria an economic perspective. Willey Blacwell. p.167-180. 2014

SEARS, P. & WONG, C-H. Mechanism-based inhibition of carbohydrate-mediated biological recognitions. Chemical Communications. p.1161-1170. 1998.

SHINDE, J. et al. α-Glucosidase inhibitory activity of Syzygium cumini (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto–Kakizaki (GK) rats. Carbohydrate Research. v. 343, n. 7, p. 1278–1281. 2008.

SINGHANIA, R., R.; PATEL, A.; SUKUMARAN, K., R., K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. Bioresource Technology. v.127, p.500–507. 2013.

SOULE, T., GARCIA-PICHEL, F. Ultraviolet photoprotective compounds from cyanobacteria in biomedical applications. In: SHARMA, N. K., RAI, A.K., STAL, L.J. Cyanobacteria an economic perspective. Willey Blacwell. p.119-143. 2014.

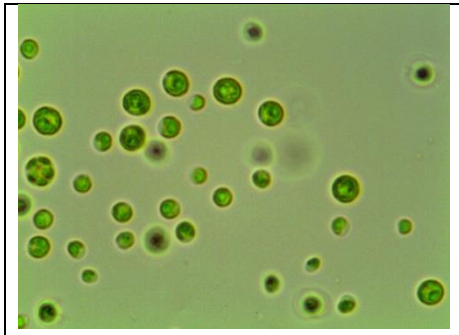
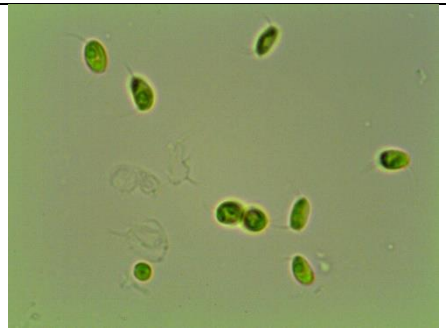
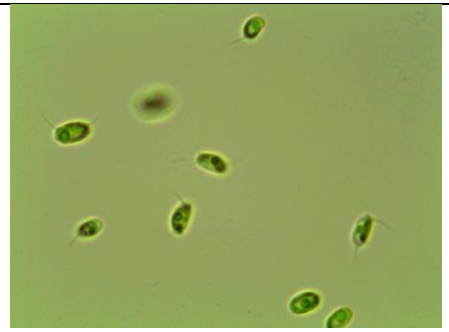
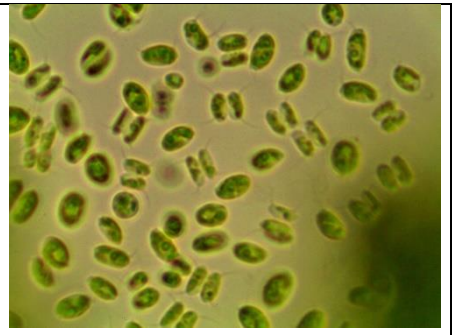
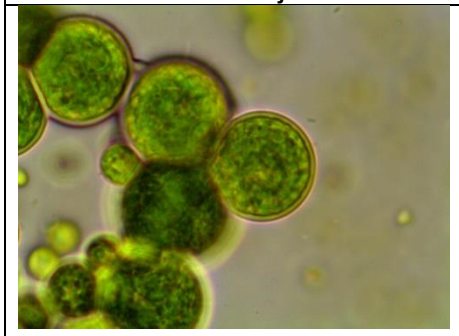
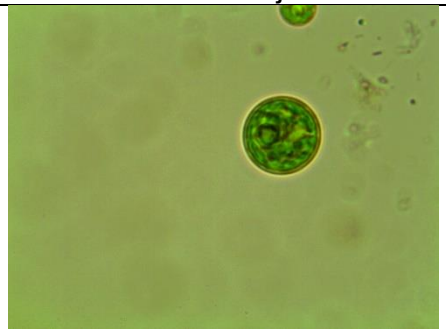
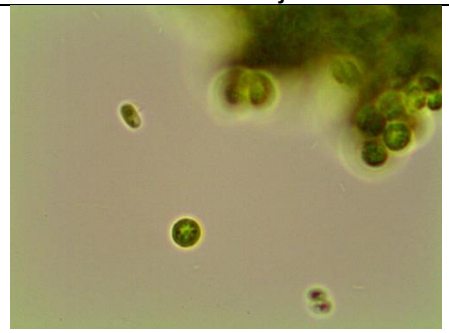
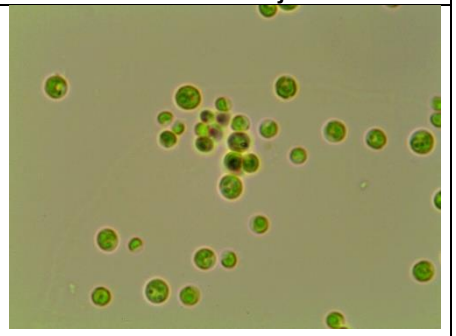
STAL, L. J. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. New Phytology, 31: p.1–32. 1995.

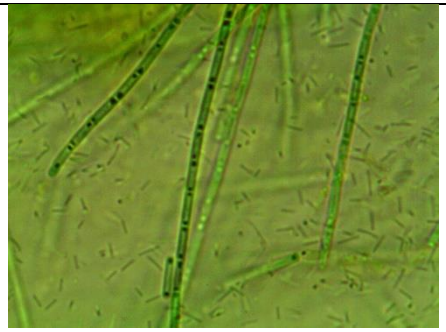
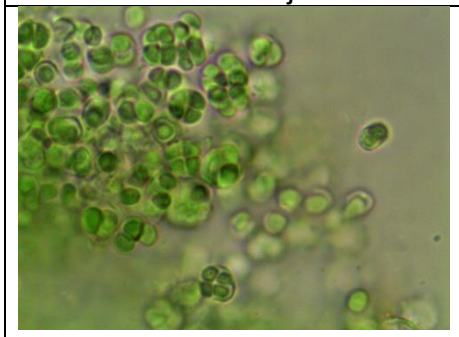
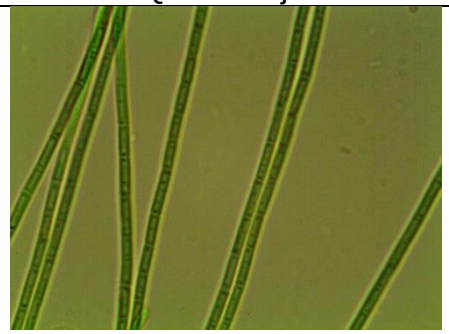
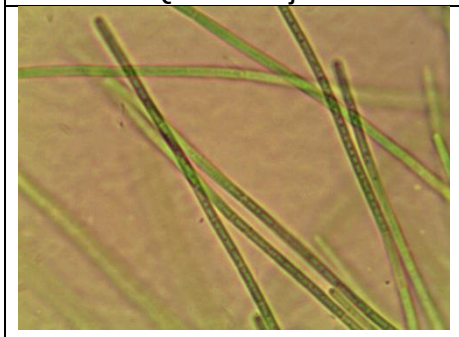
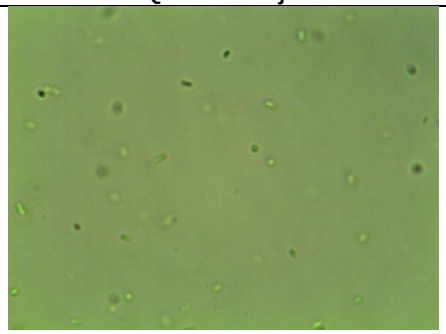
TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology. 109 B (1): 1-62, 1994.

WATERBURY, J. B. The Cyanobacteria: Isolation, Purification and Identification. In: The Prokaryotes. BALOWS, M. DWORKIN, H. G. SCHLEGEL AND H. TRUPER (eds.). Springer-Verlag. Berlin. p.2058-2078. 2006.

ZELCK, U. E.; TRIPPENSEE, G.; BECKER, W. Detection and partial characterization of glycosidases in the hemolymph of Biomphalaria glabrata (gastropoda). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 114, n. 3, p. 281–286, 1996.

ANEXO – I

 Amostra A1 – Objetiva 100x	 Amostra A24 – Objetiva 100x	 Amostra A25 – Objetiva 100x	 Amostra A26 – Objetiva 100x
 Amostra B3 – Objetiva 100x	 Amostra B4 – Objetiva 100x	 Amostra B5 – Objetiva 100x	 Amostra B6 – Objetiva 100x
Amostra G – Objetiva 100x	Amostra M – Objetiva 100x	Amostra P – Objetiva 40x	Amostra P15 – Objetiva 100x

Amostra P29 – Objetiva 100x	 Amostra P38 – Objetiva 100x	Amostra Q17 – Objetiva 100x	Amostra Q20 – Objetiva 100x
 Amostra Q29 – Objetiva 100x	Amostra Q30 – Objetiva 100x	 Amostra Q33 – Objetiva 100x	Amostra Q35 – Objetiva 100x
 Amostra Q36 – Objetiva 100x	 Amostra R8 – Objetiva 100x	Amostra R11 – Objetiva 40x	Amostra R13 – Objetiva 100x