

Uso de ferramentas OMIC em cianobactérias para a bioprospecção de metabolitos secundários com atividade antitrombótica

Dissertação de Mestrado

Inês da Ponte Borges

Mestrado em

Ciências Biomédicas



Ponta Delgada
2024

Uso de ferramentas OMIC em cianobactérias para a bioprospecção de metabolitos secundários com atividade antitrombótica

Dissertação de Mestrado

Inês da Ponte Borges

Orientadoras

Professora Doutora Maria Amélia Oliveira Gonçalves da Fonseca

Doutora Rita Isabel Pereira Cordeiro

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas



“A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.”

Marie Curie

Ao longo desta tese, publicou-se os seguintes trabalhos:

- Borges, I., Cordeiro, R., Luz, R., Gonçalves, V. & Fonseca, A. Use of OMIC tools in cyanobacteria for bioprospecting of secondary metabolites with antithrombotic activity. Comunicação oral apresentada na 7ª edição do BIOISLE Spring Seminar 2024. 3- 4 Julho 2024, Açores, Portugal.
- Borges, I., Cordeiro, R., Luz, R., Gonçalves, V. & Fonseca, A. Exploring cyanobacteria genomes for antithrombotic secondary metabolites. Poster apresentado na XLII reunião da ECCO, 42nd ECCO meeting: Microbe & Microbiome Management for a Better Planet. 18-20 Setembro 2024, Bari, Itália.

Agradecimentos

Este projeto só foi possível graças ao apoio e à orientação de várias pessoas. Em primeiro lugar, agradeço às minhas orientadoras. À Prof. Doutora Amélia Fonseca, agradeço por ter-me acolhido como orientanda, pelo constante apoio e pela motivação transmitida. À Doutora Rita, agradeço por todo o tempo, conhecimento e paciência que dedicou a mim. Houve momentos em que senti-me um pouco perdida, mas, graças ao vosso apoio e incentivo consegui encontrar o caminho certo.

Ao Prof. Doutor Vítor Gonçalves, expresso o meu sincero agradecimento por permitir-me colaborar com o BACA na realização deste projeto e pela valiosa assistência em toda a logística da componente financeira.

Ao Rúben Luz, por todo o apoio prestado no tratamento de dados e na manipulação de *softwares*, assim como pela paciência em esclarecer as minhas dúvidas, muito obrigada.

Aos meus Pais, agradeço pelo apoio, incentivo e confiança que depositaram em mim desde o início deste meu percurso na Universidade dos Açores. Aos meus irmãos, sou igualmente grata pela amizade e companheirismo.

Agradeço ao Eduardo, por todo o alento e calma que transmitiu-me nos momentos mais desafiantes e por ter celebrado comigo todas as conquistas, desde o início desta jornada académica até hoje.

Às minhas amigas Beatriz e Margarida, o meu obrigada por estarem sempre ao meu lado, mesmo quando não pude estar tão presente. Ainda assim, os nossos momentos juntas permitiram-me encontrar um equilíbrio entre a realização deste projeto e a minha vida pessoal.

Por fim, agradeço novamente a todos, incluindo aqueles que se cruzaram comigo ao longo do meu percurso académico, pois, sem o vosso apoio não teria sido possível.

Resumo

As cianobactérias são microrganismos fotossintéticos capazes de produzir metabolitos com bioatividades relevantes para a saúde, incluindo propriedades anticoagulantes. Compostos como anabaenopeptinas (Aps), microviridinas (Mvs) e micropeptinas (Mps) demonstram efeitos antitrombóticos, com destaque para as Ap, que inibem o inibidor de fibrinólise ativado por Trombina na sua forma ativada (TAFIa). Neste estudo, utilizou-se 50 estirpes do Banco de Algas e Cianobactérias dos Açores (BACA), para investigar o potencial de síntese de compostos anticoagulantes utilizando uma abordagem OMIC. Esta abordagem inclui a sequenciação do genoma (*Illumina*), a pesquisa de *clusters* de genes responsáveis pela biossíntese dos compostos de interesse (*Gene Mining*), identificação destes compostos por HR-ESI-LC-MS/MS e a realização de um ensaio de bioatividade trombótica, relativo à ação de TAFIa. Das 50 estirpes isoladas, sete demonstraram a capacidade de sintetizar os compostos de interesse, ainda que não tenham sido os análogos diretamente responsáveis pela atividade anticoagulante. Entre estas estirpes, as Aphanizomenonaceae BACA0025, Aphanizomenonaceae BACA0031, Aphanizomenonaceae BACA0109 e *Dulcicalothrix* sp. BACA0344 foram identificadas como putativamente produtoras de Ap, tendo a Aphanizomenonaceae BACA0025 demonstrado capacidade para sintetizar Ap T. Além destas, a *Tolypothrix* cf. *helicophila* BACA0056 também mostrou potencial para sintetizar a Mv A, enquanto as *Pseudoaliinostoc* sp. BACA0057 e *Purpureonostoc* sp. BACA0751 apresentaram capacidade para produzir Mp 1120. Foi também identificado um quarto composto, a Vacarina (Vc), possivelmente sintetizada pela Aphanizomenonaceae BACA0025 e Aphanizomenonaceae BACA0031. Em suma, apesar de não terem sido encontrados análogos com atividade anticoagulante, os compostos identificados revelaram outras bioatividades relevantes, tais como a inibição de tirosinase, a inibição de quimotripsina e a promoção da proliferação de células endoteliais. Além disso, surgiram também descobertas científicas igualmente significativas, nomeadamente no que diz respeito à produção de compostos por géneros cuja relação ainda não havia sido descrita. Embora não estejam diretamente relacionados com a coagulação, estes resultados podem representar um avanço promissor no desenvolvimento de fármacos de origem natural.

Palavras-chave: TAFIa, Anabaenopeptinas, Microviridinas, Micropeptinas, Genómica, Metabolómica e HR-ESI-LC-MS/MS.

Abstract

Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms capable of producing metabolites with relevant bioactivities to human health, including anticoagulant properties. Compounds such as anabaenopeptins (Aps), microviridins (Mvs), and micropeptins (Mps) demonstrate antithrombotic effects, with particular emphasis on Ap, which inhibits the Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor in its active form (TAFIa). This study, using 50 strains from the Bank of Algae and Cyanobacteria of the Azores (BACA), investigated the potential for the synthesis of anticoagulant compounds using an OMIC approach. This approach includes genome sequencing (Illumina), searching for gene clusters responsible for the biosynthesis of the compounds of interest (Gene Mining), identifying these compounds by HR-ESI-LC-MS/MS, and conducting a thrombotic bioactivity assay related to TAFIa action. Seven of the 50 isolated strains demonstrated the ability to synthesise the compounds of interest, although they were not the direct analogues responsible for anticoagulant activity. Among these strains, Aphanizomenonaceae BACA0025, Aphanizomenonaceae BACA0031, Aphanizomenonaceae BACA0109 and *Dulcicalothrix* sp. BACA0344 were identified as putative producers of Ap, with Aphanizomenonaceae BACA0025 showing the ability to synthesise Ap T. Additionally, *Tolypothrix* cf. *helicophila* BACA0056 also showed potential to synthesise Mv A, while *Pseudoaliinostoc* sp. BACA0057 and *Purpureonostoc* sp. BACA0751 exhibited the capacity to produce Mp 1120. A fourth compound, Vaccarin (Vc), possibly synthesised by Aphanizomenonaceae BACA0025 and Aphanizomenonaceae BACA0031, was also identified. In summary, although no analogues with anticoagulant activity were found, the identified compounds revealed other relevant bioactivities, such as tyrosinase inhibition, chymotrypsin inhibition, and promotion of endothelial cell proliferation. Furthermore, significant scientific discoveries emerged, particularly regarding the production of compounds by genera that had not been previously described. While not directly related to coagulation, these results may represent a promising advance in developing naturally derived pharmaceuticals.

Key-words: TAFIa, Anabaenopeptins, Microviridins, Micropeptins, Genomic, Metabolomic and HR-ESI-LC-MS/MS.

Índice

| | |
|--|------|
| Agradecimentos | i |
| Resumo | ii |
| Abstract | iii |
| Lista de Figuras..... | vii |
| Lista de Tabelas | viii |
| Lista de Abreviaturas | ix |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 Enquadramento e objetivos..... | 1 |
| 1.2 Cianobactérias..... | 4 |
| 1.3 Metabolitos secundários | 5 |
| 1.3.1. Anabaenopeptinas | 6 |
| 1.3.2. Microviridinas | 9 |
| 1.3.3. Micropeptina K139..... | 12 |
| 1.4 Hemostasia e cascata de coagulação..... | 13 |
| 1.4.1 Patologias associadas a distúrbios da cascata..... | 15 |
| 2. Material e Métodos | 19 |
| 2.1 Análise filogenética e seleção das estirpes..... | 19 |
| 2.2 Produção de biomassa..... | 20 |
| 2.3 Análise Genómica | 21 |
| 2.3.1 Extração e quantificação de DNA..... | 21 |
| 2.3.2 Sequenciação, montagem dos genomas e pesquisa de BGCs..... | 21 |
| 2.4 Análise Metabólica | 22 |
| 2.4.1 Extração de metabolitos secundários..... | 22 |
| 2.4.2 HR-ESI-LC-MS/MS..... | 23 |
| 2.4.3 Rede molecular..... | 24 |

| | |
|---|------|
| 2.5 Bioatividade trombótica | 24 |
| 3. Resultados..... | 26 |
| 3.1 Análise genómica | 26 |
| 3.2 Bioatividade enzimática | 32 |
| 3.3 Identificação de metabolitos secundários..... | 33 |
| 3.4. Rede molecular | 34 |
| 4. Discussão | 36 |
| 4.1 Compostos com atividade antitrombótica | 36 |
| 4.2 Considerações sobre as ferramentas OMIC | 39 |
| 5. Conclusões..... | 41 |
| 5.1 Contributos do trabalho | 41 |
| 5.2 Perspetivas futuras | 42 |
| 6. Bibliografia | 44 |
| Anexo I | i |
| Anexo II..... | v |
| Anexo III | vii |
| Anexo IV | viii |
| Anexo V..... | x |
| Anexo VI | xi |
| Anexo VII..... | xii |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Principais fatores responsáveis pelo crescimento de cianobactérias, e, consequentemente, pela produção de metabolitos secundários com diversas aplicabilidades..... | 1 |
| Figura 2. Metabolitos secundários produzidos por cianobactérias e as suas aplicações no ramo da saúde (adaptado de Saad <i>et al.</i> , 2022)..... | 6 |
| Figura 3. Estrutura química geral das anabaenopeptinas. Esta classe divide-se em anabaenopeptinas de A- J e T, sendo “X” referente a diferentes aminoácidos nas respectivas posições (Monteiro <i>et al.</i> , 2021)..... | 8 |
| Figura 4. Esquema estrutural da organização do BGC de Ap em diferentes estirpes produtoras (Monteiro <i>et al.</i> , 2021)..... | 8 |
| Figura 5. Estrutura química das anabaenopeptinas com atividade antitrombótica: Ap B (Harada <i>et al.</i> , 1995), Ap C (Rouhiainen <i>et al.</i> , 2010) e Ap F (Shin <i>et al.</i> , 1997) (adaptado de: Monteiro <i>et al.</i> , 2021)..... | 9 |
| Figura 6. Esquema do BGC de Mv em diferentes estirpes de <i>Microcystis</i> e <i>Planktothrix</i> (Amaral <i>et al.</i> , 2021)..... | 10 |
| Figura 7. Estrutura química da microviridina B (Ziemert <i>et al.</i> , 2010)..... | 11 |
| Figura 8. Organização do BGC de micropeptinas, <i>mcnA-mcnE</i> (Nishizawa <i>et al.</i> , 2011)... | 12 |
| Figura 9. Estrutura química da micropeptina K139 (Labby <i>et al.</i> , 2015)..... | 12 |
| Figura 10. Estrutura química das micropeptinas MM978 e MZ859 (Piato & Graebin, 2020)..... | 13 |
| Figura 11. Representação simplificada da via intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação, e fibrinólise com e sem a ação da TAFIa (adaptada de Miranda-Vilela, 2012 & SANG Medicine Ltd., 2022)..... | 14 |
| Figura 12. As patologias mais comuns associadas a trombozes de origem arterial e venosa (adaptado de: Olivera <i>et al.</i> , 2021)..... | 17 |
| Figura 13. Árvore filogenética parcial da região do 16S rRNA (Anexo I - 1062 OTUs, 1393bp) com as estirpes que apresentam elevadas semelhanças entre si (sinalizadas a amarelo). Os valores da máxima verossimilhança encontram-se apresentados à frente dos <i>nodes</i> (>95%)..... | 30 |
| Figura 14. Comparação do BGC de anabaenopeptinas de BACA0025, BACA0031, BACA0109 e BACA0344, com outras estirpes portadores dos genes <i>apt</i> , publicadas no NCBI..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 15. Comparação do BGC de microviridinas de BACA0057, BACA0089, BACA0751, com outras estirpes portadores dos genes <i>mdn</i> disponíveis no NCBI..... | 31 |
| Figura 16. Cromatograma (MS2) da amostra Aphanizomenonaceae BACA0025 com resultado positivo para Ap T ((M+H ⁺) 866,5076 <i>m/z</i>)..... | 33 |
| Figura 17. Cromatogramas (MS2) das amostras <i>Pseudoaliinostoc</i> sp. BACA0057 e <i>Purpureonostoc</i> sp. BACA0751 com resultado positivo para a Mp 1120. A laranja encontra-se destacado o íão precursor (Isaacs <i>et al.</i> , 2014). | 33 |
| Figura 18. <i>Clusters</i> de anabaenopeptina T, microcistina e vacarina encontrados nas estirpes BACA0025, BACA0031 e BACA0089..... | 34 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Cianobactérias produtoras de compostos com atividade antitrombótica (adaptado de Amaral <i>et al.</i> , 2021; Monteiro <i>et al.</i> , 2021)..... | 7 |
| Tabela 2. Estirpes de cianobactérias do BACA usadas neste estudo, indicando-se o local e o habitat de onde foram isoladas..... | 19 |
| Tabela 3. Parâmetros de qualidade do DNA genómico das cianobactérias para sequenciação por <i>Illumina</i> , fornecidos pela empresa NovoGene (Cambridge, Reino Unido)..... | 21 |
| Tabela 4. Modo de distribuição das amostras em estudo para cromatografia..... | 24 |
| Tabela 5. Análise da qualidade dos genomas ensamblados, através do <i>CheckM v1.2.3</i> | 26 |
| Tabela 6. Bioatividades de compostos produzidos pelos BGCs identificados nas estirpes de cianobactérias em estudo..... | 27 |
| Tabela 7. Identificação das estirpes portadoras de BGCs de compostos com atividade antitrombótica de acordo com o <i>AntiSMASH v7.1.0</i> e o <i>Blast2GO v6.0</i> | 29 |
| Tabela 8. Resultados da análise One-way ANOVA, seguido do teste Kruskal–Wallis. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas com $p < 0.05$. Comparação entre os calibradores, controlos e amostras com o controlo negativo (água <i>milli-Q</i>)..... | 32 |
| Tabela 9. Estirpes de cianobactérias com potencial de produção de compostos com bioatividades relevantes para a saúde e respetivos locais de colheita..... | 35 |

Lista de Abreviaturas

Ap - Anabaenopeptina

AT - Antitrombina

AVC - Acidente Vascular Cerebral

BACA - Banco de Algas e Cianobactérias dos Açores

BGCs - *Biosynthetic Gene Clusters*

CPA - Carboxipeptidase A

CPU - Carboxipeptidase U

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* / Ácido desoxirribonucleico

GNPS - *Global Natural Product Social Molecular Networking*

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HR-ESI-LC-MS/MS – *High Resolution Electrospray Ionization Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry* / Cromatografia Líquida de Alta Resolução acoplada com Ionização por *Electrospray* e Espectrometria de Massa em tandem

LC-MS - *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry* / Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massa

Mp - Micropeptina

Mv - Microviridina

NRP - *Nonribosomal Peptides* / Peptídeos Não-Ribossomais

NRPS - *Non-Ribosomal Peptide Synthetases* / Sintetases de Peptídeos Não-Ribossomais

rRNA - *Ribosomal Ribonucleic Acid* / Ácido ribonucleico ribossômico

TAFI - *Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor* / Inibidor de Fibrinólise ativado pela Trombina

TAFIa - *Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor in its active form* / Inibidor de Fibrinólise ativado pela Trombina na forma ativa

TEV - Tromboembolismo Venoso

Vc - Vacarina

1. Introdução

1.1 Enquadramento e objetivos

Nos últimos anos, as cianobactérias têm despertado uma atenção significativa graças às suas diversas aplicações biotecnológicas. Isto deve-se à descoberta de metabolitos secundários, produzidos por estes microrganismos, com atividades aplicáveis na agricultura, no meio ambiente, na alimentação e na saúde (Figura 1) (Zahra *et al.*, 2020).

Na agricultura, as cianobactérias são promissoras como biofertilizantes, dado que conseguem controlar a deficiência de azoto nas plantas, melhorar a retenção da água, promover o arejamento do solo, auxiliar no controlo de pragas e adicionar vitamina B12 ao meio (Chittora *et al.*, 2020). No ramo ambiental, exibem uma ação de biorremediação, sendo utilizadas na descontaminação de ambientes terrestres e/ou marinhos (Sarmah & Rout, 2020; Dubey *et al.*, 2011). Para além disto, substituem recursos não-renováveis, já que a sua biomassa pode ser convertida em fontes de energia resultando em matéria-prima para a produção de biocombustíveis, como biohidrogénio, biodiesel e bioetanol, sendo uma opção natural e mais económica comparada a outros recursos (Sudhakar *et al.*, 2019; Parmar *et al.*, 2011).

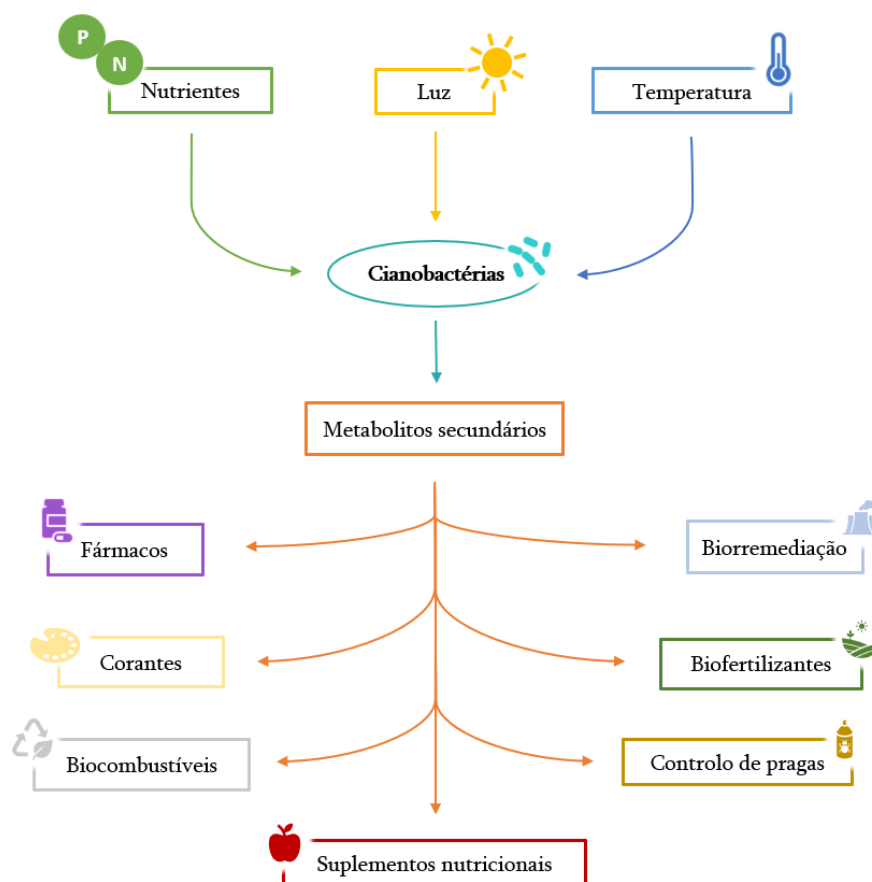


Figura 1. Principais fatores responsáveis pelo crescimento de cianobactérias, e, consequentemente, pela produção de metabolitos secundários com diversas aplicabilidades.

Além disso, devido ao seu elevado teor proteico e vitamínico, espécies como *Arthrospira platensis* e a *Limnospira maxima* foram utilizados na antiguidade como alimento nos continentes Africano e Americano, respetivamente (Ciferri, 1983). Atualmente, sabe-se que as cianobactérias possuem um alto valor nutricional como proteínas, carboidratos, ácidos gordos poli-insaturados, fibras alimentares, vitamina B12 e compostos bioativos com vários benefícios para a saúde. Para além de serem uma fonte nutricional, devido à presença de vários pigmentos são também amplamente utilizadas como corantes alimentares de origem natural (Udayan *et al.*, 2017; Miyamoto *et al.*, 2006).

Embora atualmente recebam muita atenção, as cianobactérias já eram utilizadas na medicina tradicional devido aos compostos que produzem e aos seus benefícios para a saúde humana. Um exemplo disto, é o consumo diário de *Arthrospira* pela tribo Kamemba, da Amazónia, que está epidemiologicamente associada a uma taxa reduzida de infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Teas *et al.*, 2004).

Após diversos estudos, verificou-se que estes microrganismos produzem metabolitos secundários com bioatividades relevantes para a saúde, tais como ação antimicrobiana (Rojas *et al.*, 2020; Cepas *et al.*, 2021; Frazzini *et al.*, 2022), anticancerígena (El-Naggar *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2018), anti-inflamatória (Gómez *et al.*, 2023; Costa *et al.*, 2020) e antitrombótica (Shiels *et al.*, 2022; Mousavian *et al.*, 2022). Portanto, os compostos produzidos pelas cianobactérias que apresentem este tipo de atividades constituem uma mais-valia no ramo da saúde para o desenvolvimento de novos fármacos (Rodríguez-Sifuentes *et al.*, 2021; Nandagopal *et al.*, 2021; Vo *et al.*, 2015).

Atualmente, a trombose é considerada como uma das principais causas de morte no mundo (Bentounes *et al.*, 2023). Caracterizada como uma doença multicausal (Rosendaal, 1999), a trombose está associada a várias patologias, como o cancro e as doenças inflamatórias, o que contribui para a sua complexidade e gravidade (Tichelaar *et al.*, 2012; Giannotta *et al.*, 2015). A trombose pode ser classificada em arterial ou venosa, consoante o calibre do vaso obstruído. Surgindo em diversos órgãos, incluindo o cérebro, coração, pulmões, ou em extremidades como braços e pernas (Olivera *et al.*, 2021). Em situações mais severas esta obstrução poderá resultar na morte celular ou na necrose dos tecidos envolvidos, devido à má oxigenação ou à escassa nutrição dos mesmos (Hosoda & Orikasa, 2022; Markwell *et al.*, 2022).

Diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento de coágulos, como o sexo feminino, idade, etnia negra, histórico familiar de tromboembolia, tabagismo, obesidade, quimioterapia, cirurgias, entre outros (Wang & Carrier, 2023; Elyamany *et al.*, 2014). Além destes fatores externos, as doenças hepáticas estão também ligadas ao risco de trombose, uma vez que o fígado desempenha um papel fundamental no processo de coagulação, sendo responsável pela síntese de fatores e inibidores da cascata de coagulação (Amitrano *et al.*, 2002).

O tratamento mais comum para trombose envolve o uso de anticoagulantes, que impedem o crescimento do trombo, embora possam aumentar o risco de sangramentos (Henke *et al.*, 2020).

Graças às várias propriedades dos compostos bioativos das cianobactérias, estes podem ser aplicados no tratamento de patologias que envolvem a formação de coágulos, conforme descrito anteriormente. Segundo a literatura, dos vários compostos sintetizados por estes organismos, as anabaenopeptinas (Aps), nomeadamente a Ap B, Ap C e Ap F, exibem atividade inibitória do inibidor da fibrinólise ativável pela trombina na sua forma ativada (TAFIa), que resulta na degradação do coágulo (Schreuder *et al.*, 2016). Para além destas, as microviridinas (Mvs), mais concretamente a Mv B, e a micropeptina (Mp) K139 encontram-se igualmente descritas como compostos com atividade anticoagulante (Amaral *et al.*, 2021, Piatto & Graebin, 2020), tendo ambas demonstrado uma atividade inibitória sobre a trombina e o fator VIIa (Anas *et al.*, 2017). Assim, esses compostos têm o potencial de apresentar resultados promissores no tratamento ou na prevenção destas patologias de forma natural.

A partir de ferramentas OMIC, que englobam tecnologias que analisam a estrutura e função do material genético (genómica), da expressão desses genes (transcriptómica), das proteínas (proteómica) e ainda dos metabolitos (metabolómica) (Gomez-Chiarri *et al.*, 2015) é possível determinar e caracterizar os compostos produzidos por cianobactérias.

Nos Açores, assim como no Banco de Algas e Cianobactérias dos Açores (BACA), existem várias estirpes de cianobactérias (Cordeiro *et al.*, 2020a, 2020b) potencialmente produtoras de metabolitos secundários (Luz *et al.*, 2023), podendo alguns destes ter propriedades benéficas para a saúde humana, como é o caso da ação anticoagulante.

Assim, este trabalho visa contribuir para (i) a caracterização genómica de estirpes de cianobactérias disponíveis no BACA, (ii) a identificação de *clusters* genéticos de síntese de compostos com atividade antitrombótica e (iii) a caracterização de estirpes quanto à produção de metabolitos secundários com atividades antitrombóticas. Espera-se encontrar metabolitos produzidos por espécies de cianobactérias dos Açores, previamente descritos na literatura com bioatividades e com aplicabilidade no ramo da saúde, sobretudo para o desenvolvimento de novos fármacos anticoagulantes. Deste modo, foram estabelecidos os seguintes objetivos:

- Sequenciação do genoma de estirpes de cianobactérias do BACA;
- Identificação de *Biosynthetic Gene Clusters* (BGCs);
- Detecção de compostos com atividade antitrombótica por HR-ESI-LC- MS/MS.

1.2 Cianobactérias

As cianobactérias foram dos primeiros organismos a surgir na terra há sensivelmente 2,7 bilhões de anos (Badger & Price, 2003). Estes microrganismos procarióticos fotossintéticos gram-negativos são bactérias (Codd, 1995), porém, diferenciam-se por conterem pigmentos fotossintéticos, como clorofila *a* e ficobilinas, sendo estas últimas subdivididas em ficoeritrina, aloficocianina e ficocianina, que conferem cor vermelha e azulada a estes organismos, respetivamente. As cianobactérias não têm cloroplastos, estando deste modo estes pigmentos presentes nos tilacoides (Chorus & Welker, 2021; Whitton & Potts, 2000, 2012). Além disso, organizam-se em formas unicelulares solitárias, coloniais ou multicelulares filamentosas, com dimensões que variam de 1 a 100 µm de diâmetro (Mehdizadeh & Peerhossaini, 2022).

Acredita-se que as cianobactérias foram o principal fator impulsionador do aumento do teor de oxigénio na atmosfera terrestre (Vioque, 2007). Isto deve-se à sua capacidade de capturar e converter CO₂ atmosférico em bioprodutos (Zhang *et al.*, 2017), como o O₂ (Shevela *et al.*, 2013), exercendo um impacto ecológico significativo (Vioque, 2007). Além disso, são as principais fixadoras de N₂ (diazotrofismo) dos oceanos, pois, em condições anaeróbicas, recorrem à enzima nitrogenase para converter N₂ em aminoácidos (Díez *et al.*, 2008; Mankiewicz *et al.*, 2003) graças aos heterócitos (Wolk *et al.*, 1994).

Estes microrganismos, além dos heterócitos, podem ainda apresentar outras células especializadas desencadeadas por condições ambientais, os acinetos (Adams & Duggan, 1999). Estas células, análogas aos endósporos, diferenciam-se a partir de células vegetativas (Golubic *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 1981) e são facilmente desprendidas devido à fraca conexão com as células adjacentes (Adams & Duggan, 1999; Chorus & Welker, 2021; Rippka *et al.*, 1979).

Segundo Wilmotte & Herdman (2001), as variações morfológicas e os padrões de divisão celular observados no Filo Cyanobacteria são sustentadas filogeneticamente pelo 16S rRNA das cianobactérias. Análises recentes permitiram classificar estes microrganismos em 20 ordens, como Gloeobacterales, Synechococcales, Leptolyngbyales, e em 55 famílias, como Oscillatoriaceae, Spirulinaceae e Aphanizomenonaceae (Strunecký *et al.*, 2023).

As cianobactérias habitam vários ambientes, entre estes: águas doces, marinhos e salobros (Kurmayer & Christiansen, 2009) como rios, lagos e lagoas, estando situadas maioritariamente na coluna de água, devido à presença de vesículas gasosas, constituindo o fitoplâncton (Van Apeldoorn *et al.*, 2007; Dokulil & Teubner, 2000). Podem também surgir na forma bentónica, isto é, presas ao substrato (Chorus & Welker, 2021). Além de massas de água, as cianobactérias habitam em ambientes terrestres, onde apresentam várias associações com outros seres, sejam procariontes, plantas ou animais (Paerl, 1996). Um exemplo comum de simbiose das cianobactérias envolve a sua associação com os fungos,

com os quais originam os líquenes (Ahmadjian, 1965). Graças ao seu metabolismo fotoautotrófico, esses microrganismos conseguem sobreviver em ambientes extremos, como em locais onde há escassez de luz e água (Vioque, 2007), além de suportar temperaturas extremamente baixas e altas, ambientes hipersalinos, alcalinos, entre outros (Stal, 2007).

1.3 Metabolitos secundários

As cianobactérias ocupam diferentes nichos ecológicos e, para se adaptarem ao ambiente em que se encontram, evoluíram com vista na produção de metabolitos secundários. Esses compostos pertencem a diferentes classes químicas, como polissacarídeos, lípidos, proteínas, enzimas, esteróis, vitaminas e possuem uma importância nutricional e farmacêutica (Figura 2) (Priyadarshani & Rath, 2012), podendo atuar como hormonas, antibióticos, aleloquímicos, toxinas, entre outros (Carmichael, 1992).

Na década de 1980, houve uma consciencialização dos impactos destes microrganismos para a saúde pública (Chorus & Welker, 2021), uma vez que as cianobactérias produzem cianotoxinas prejudiciais à saúde dos seres vivos (Carmichael, 1992). De entre as toxinas existentes, as anatoxinas e saxitoxinas são caracterizadas como neurotoxinas, as microcistinas como hepatotoxinas, e as cilindrospermopsinas desencadeiam hepatotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade (Chorus & Bartram, 1999).

Recentemente, a produção de compostos bioativos a partir de fontes naturais tem recebido grande atenção devido aos efeitos benéficos para a saúde (Herrero *et al.*, 2013; Raja *et al.*, 2016). Isto ocorre na medida em que estes microrganismos exibem atividades promissoras para a saúde (Figura 2) como os alcalóides indólicos, raramente encontrados em microrganismos e animais, que, apresentam atividades fungicidas associadas à sua estrutura, como é o caso da *Bauerine*, *Norharmane* e *Auxin* (Villa *et al.*, 2021; Amaral *et al.*, 2023; Chaïb *et al.*, 2021). Além destes, as cianobactérias também são capazes de produzir quelantes de ferro, como *Enterobactin*, *Desferrioxamine B* e *Vibriobacin*, uma mais-valia para os humanos, visto que devido à ausência de meios para excreção de ferro em excesso, surgem patologias como a hemocromatose, seguida por danos nos tecidos e, em casos mais severos, a morte (Gademann & Portmann, 2008).

Os metabolitos secundários produzidos pelas cianobactérias podem ainda inibir proteases de serina, como elastase, tripsina, trombina e quimotripsina, bem como tirosinase (Namikoshi & Rinehart, 1996). Esta inibição apresenta um efeito tóxico contra a *Daphnia* (o principal predador do fitoplâncton), que resulta numa redução da eficiência digestiva destes predadores, conferindo às cianobactérias uma ação de proteção (Lange *et al.*, 2018; Schwarzenberger *et al.*, 2010). Para além deste potencial, a inibição de proteases desencadeiam resultados promissores para a saúde humana, tendo sido cogitados como agentes promissores no tratamento de vários distúrbios metabólicos (Raja *et al.*, 2016). A

inibição de proteases de serina é desencadeada por alguns dos compostos produzidos por estes microrganismos como cianopeptolinas, microviridinas e anabaenopeptinas, que desencadeiam várias ações, entre elas a ação antitrombótica (Raja *et al.*, 2016; Monteiro *et al.*, 2021).

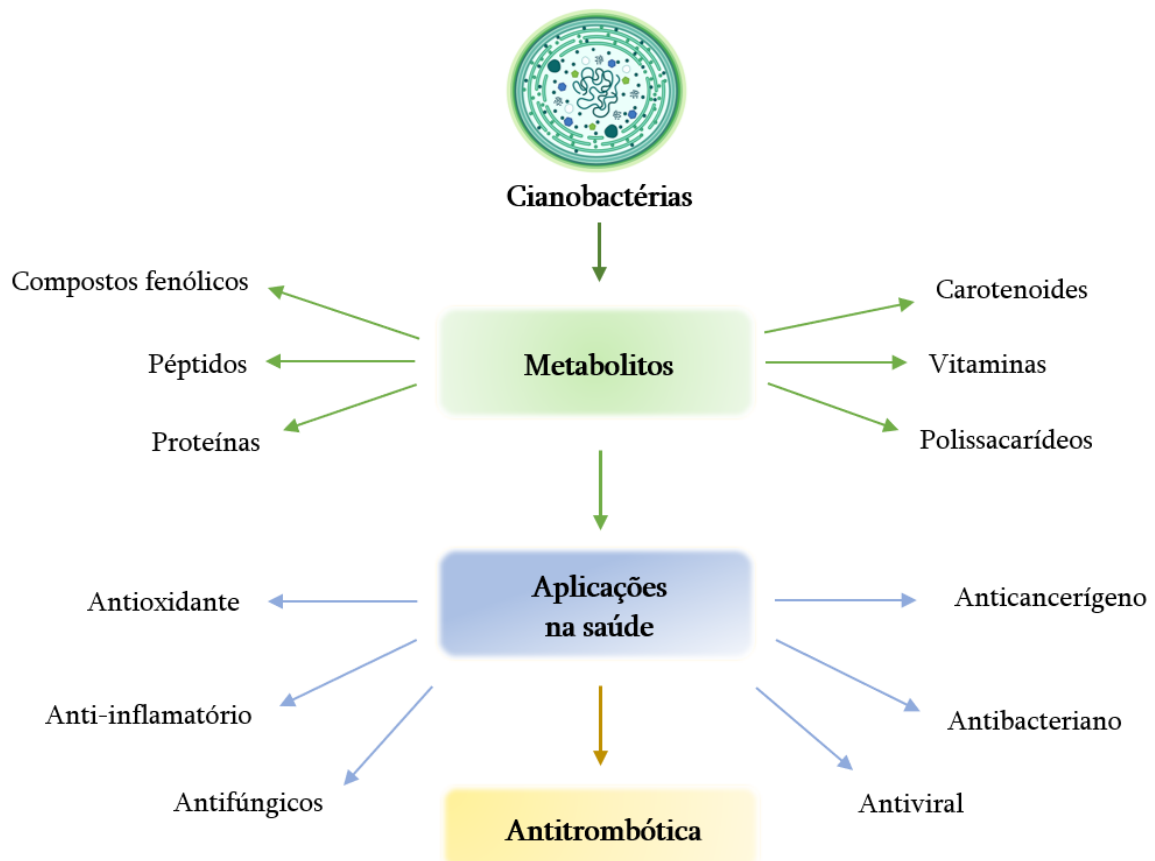


Figura 2. Metabólitos secundários produzidos por cianobactérias e as suas aplicações no ramo da saúde (adaptado de Saad *et al.*, 2022).

1.3.1. Anabaenopeptinas

As Aps correspondem a uma classe de péptidos cíclicos produzidos por cianobactérias dos géneros *Anabaena*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Microcystis*, *Lyngbya* e *Brasilonema* (Tabela 1; Rohrlack & Utkilen, 2007; Monteiro *et al.*, 2021). Estes péptidos, sintetizados por vias não ribossômicas, têm um anel de cinco aminoácidos conectados por uma ligação ureido a um aminoácido exocíclico (Figura 3). O anel é formado pela ciclização do carboxil C-terminal do aminoácido na posição 6 com o ϵ -NH₃ da D-lisina bem conservada na posição 2 (Welker & Von, 2006).

Tabela 1. Cianobactérias produtoras de compostos com atividade antitrombótica (adaptado de Amaral *et al.*, 2021; Monteiro *et al.*, 2021).

| Composto | Análogo | Organismo | Referências |
|------------------|--|--|--|
| Anabaenopeptinas | A e B | <i>Anabaena flos-aquae</i> NRC 525-17 | Harada <i>et al.</i> , 1995 |
| | A | <i>Planktothrix prolifica</i> NIVA-CYA 98 <i>Planktothrix prolifica</i> NIVA-CYA 540 <i>Planktothrix agardhii</i> NIVA-CYA 34 <i>Planktothrix agardhii</i> NIVA-CYA 15 <i>Planktothrix mougeotii</i> NIVA-CYA 405 | Tooming-Klunderud <i>et al.</i> , 2013 |
| | B | <i>Planktothrix prolifica</i> NIVA-CYA 98 <i>Planktothrix prolifica</i> NIVA-CYA 406 <i>Planktothrix prolifica</i> NIVA-CYA 540 <i>Planktothrix rubescens</i> NIVA-CYA 407 <i>Planktothrix mougeotii</i> NIVA-CYA 56/3 <i>Planktothrix mougeotii</i> NIVA-CYA 405 <i>Planktothrix agardhii</i> NIVA-CYA 34 <i>Planktothrix agardhii</i> NIVA-CYA 15 | |
| | C | <i>Planktothrix rubescens</i> NIVA-CYA 407 <i>Planktothrix mougeotii</i> NIVA-CYA 56/3 | |
| | F | <i>Planktothrix prolifica</i> NIVA-CYA 98 <i>Planktothrix prolifica</i> NIVA-CYA 406 <i>Planktothrix prolifica</i> NIVA-CYA 540 <i>Planktothrix rubescens</i> NIVA-CYA 407 <i>Planktothrix mougeotii</i> NIVA-CYA 56/3 <i>Planktothrix mougeotii</i> NIVA-CYA 405 <i>Planktothrix agardhii</i> NIVA-CYA 34 | |
| | A, B e E | <i>Dolichospermum flos-aquae</i> | Natumi & Janssen, 2020 |
| | B | <i>Oscillatoria agardhii</i> NIES-204 | Shin <i>et al.</i> , 1996 |
| | E e F | <i>Oscillatoria agardhii</i> NIES 204 | Shin <i>et al.</i> , 1997 |
| | F | <i>Planktothrix rubescens</i> NIES-610 | Sano <i>et al.</i> , 2001 |
| | G | <i>Planktothrix agardhii</i> HUB 011 | Erhard <i>et al.</i> , 1999 |
| | I e J | <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> NIES-81 | Murakami <i>et al.</i> , 2000 |
| | B e F | <i>Microcystis aeruginosa</i> HUB 063 | Erhard <i>et al.</i> , 1999 |
| | G e H | <i>Oscillatoria agardhii</i> NIES-595 | Itou <i>et al.</i> , 1999 |
| Micropeptinas | K139 | <i>Microcystis aeruginosa</i> K-139 | Nishizawa <i>et al.</i> , 2007 |
| | 90 | <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-90 | Nishizawa <i>et al.</i> , 2011 |
| | S70-A/-B | <i>Microcystis viridis</i> S-70 | |
| | NIES103 | <i>Microcystis viridis</i> NIES-103 | |
| | MM978 | <i>Microcystis</i> sp. | Piato & Graebin, 2020 |
| MZ859 | <i>Microcystis</i> sp. | | |
| Microviridinas | A | <i>Microcystis viridis</i> NIES-102 | Ishitsuka <i>et al.</i> , 1990 |
| | B e C | <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES- 298 | Okino <i>et al.</i> , 1995 |
| | D, E e F | <i>Oscillatoria agardhii</i> NIES-204 | Shin <i>et al.</i> , 1996 |
| | G e H | <i>Nostoc minutum</i> NIES-26 | |
| | K | <i>Planktothrix agardhii</i> CYA126/8 | Philmus <i>et al.</i> , 2008 |
| | I | <i>Planktothrix agardhii</i> strain 2 e 18 | Fujii <i>et al.</i> , 2000 |
| | J | <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOC CBS | Rohrlack <i>et al.</i> , 2003 |
| L | <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843 | Ziemert <i>et al.</i> , 2010 | |

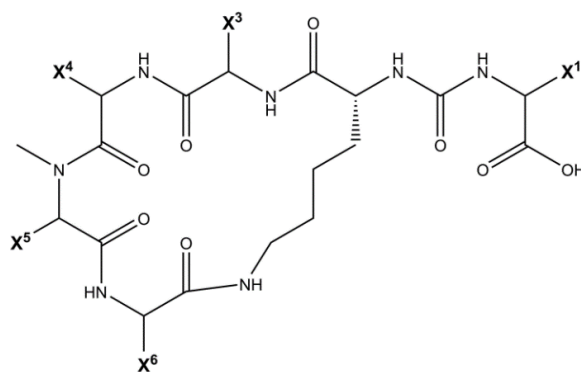


Figura 3. Estrutura química geral das anabaenopeptinas. Esta classe divide-se em anabaenopeptinas de A-J e T, sendo “X” referente a diferentes aminoácidos nas respectivas posições (Monteiro *et al.*, 2021).

As primeiras Aps descritas foram a Ap A e Ap B por Harada *et al.*, 1995. Desde então foram descobertos outros análogos, sendo atualmente conhecidas variantes de Ap A - J e Ap T. Para além dos vários análogos de Ap, também já foi descrito o BGC com os genes *aptA1*, *aptA2* e *aptA-E* (Figura 4), que codificam péptidos não ribossomais (NRPs, *Nonribosomal Peptides*) envolvidos na produção de Ap (Monteiro *et al.*, 2021).

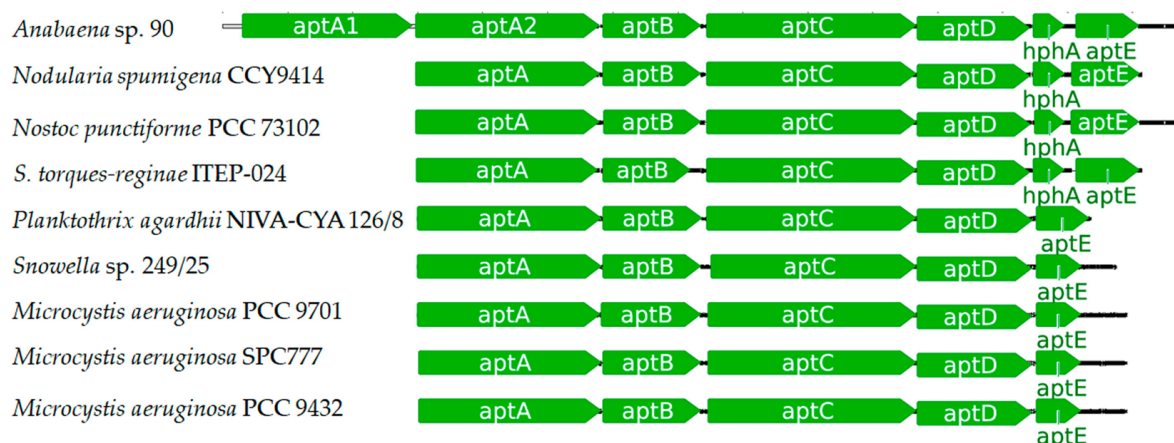


Figura 4. Esquema estrutural da organização do BGC de Ap em diferentes estirpes produtoras (Monteiro *et al.*, 2021).

As Aps têm demonstrado atividade inibitória sobre diversas proteases, conferindo-lhes a capacidade de bloquear a ação de enzimas como a Proteína Fosfatase 1, Proteína Fosfatase 2A, Carboxipeptidase A (CPA), proteases de serina humana, leucina aminopeptidase, tripsina e trombina (Janssen, 2019). Destacam-se, em particular, as variantes Ap B, Ap C e Ap F (Figura 5), que têm demonstrado eficácia na inibição da Carboxipeptidase U (CPU) ou TAFIa (Monteiro *et al.*, 2021). A CPU é responsável pela ação anticoagulante (Willemse *et al.*, 2009), em contraste a CPA secretada pelas células acinares do pâncreas (Siekevitz & Palade, 1958), está presente em organismos desde peixes até aos humanos (Quiocho &

Lipscomb, 1971) e desempenha um papel fundamental na digestão de proteínas. O seu modo de ação está associado à quebra de proteínas, removendo os aminoácidos da extremidade C-terminal das cadeias polipeptídicas durante o processo de digestão (Auld & Vallee, 1987), libertando aminoácidos (Vendrell & Avilés, 1999; Vendrell *et al.*, 2000). A inibição da CPA está associada a distúrbios digestivos, resultando numa digestão incompleta. Embora a CPA e a CPU apresentem uma estrutura com mais de 40% de identidade (Vendrell *et al.*, 2000), diferem significativamente nas atividades que desempenham. Neste contexto, a inibição de CPA por cianobactérias pode ter implicações promissoras para a síntese de fármacos.

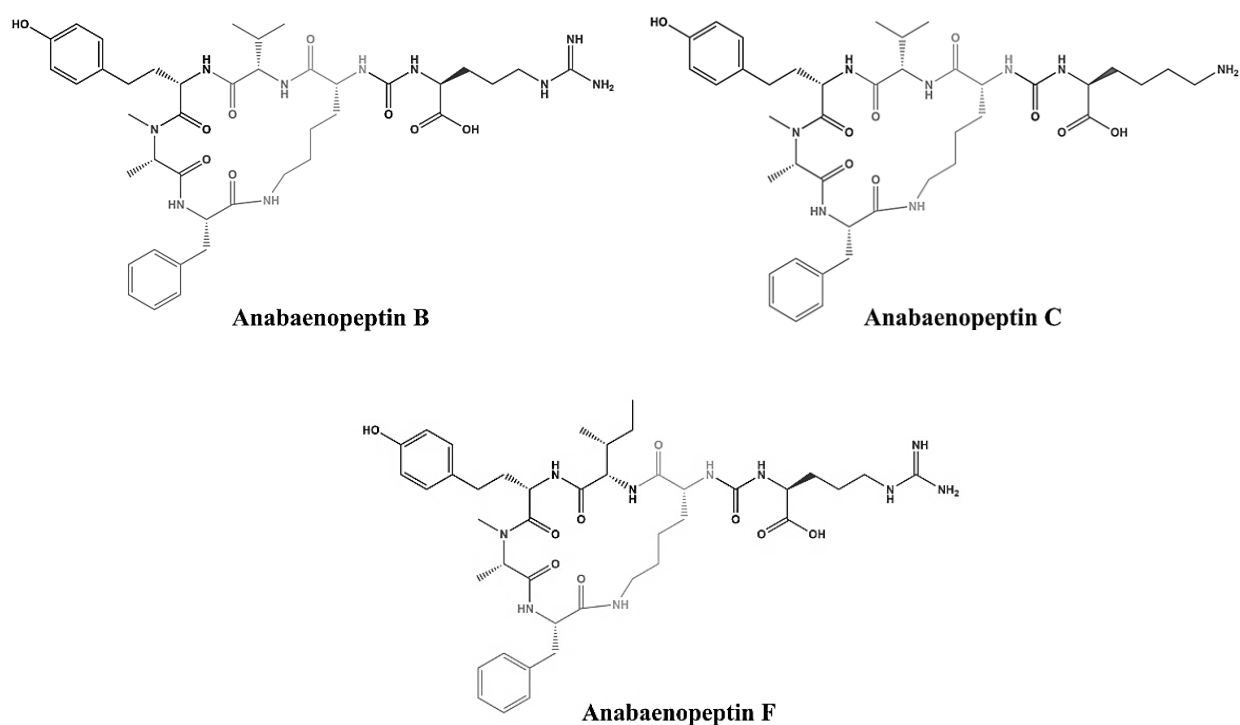


Figura 5. Estrutura química das anabaenopeptinas com atividade antitrombótica: Ap B (Harada *et al.*, 1995), Ap C (Rouhiainen *et al.*, 2010) e Ap F (Shin *et al.*, 1997) (adaptado de: Monteiro *et al.*, 2021).

1.3.2. Microviridinas

As Mvs correspondem a um dos maiores oligopeptídeos sintetizados por cianobactérias (Amaral *et al.*, 2021). A primeira variante das Mvs identificadas foi a Mv A, descrita por Ishitsuka *et al.*, (1990) a partir de *Microcystis viridis* (NIES-102), isolada de um *bloom* no Lago Kasumigaura (Japão). Desde então, foram identificadas diversas variantes de Mvs, como Mv A - L, Mv N3 - N9, Mv O, Mv 1777 e Mv1709 (Amaral *et al.*, 2021).

Quanto à sua estrutura, as Mvs são uma família de tri- e tetradecapeptídeos N-acetilados que se ligam por meio dos grupos ω -carboxi de resíduos de glutamato ou aspartato, formando ligações amida e éster com lisina, serina e treonina em posições específicas. Essas

ligações, comuns em péptidos sintetizados pela via não ribossômica (NRPs), são geralmente associadas a esse mecanismo (Philmus *et al.*, 2008).

Atualmente, pode-se encontrar variantes deste composto nos seguintes géneros de cianobactérias: *Microcystis*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Chryseobacterium*, *Anabaena* e *Nodularia* (Tabela 1; Philmus *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2017; Amaral *et al.*, 2021).

A biossíntese de Mvs está associada à presença de genes como *mdnA-F* e *mdnH* em conjunto com outras proteínas. Como pode-se observar na Figura 6, já foi estudado o BGC responsável pela síntese deste composto em estirpes de *Microcystis* e *Planktothrix* (Ziemert *et al.*, 2008; Philmus *et al.*, 2008).

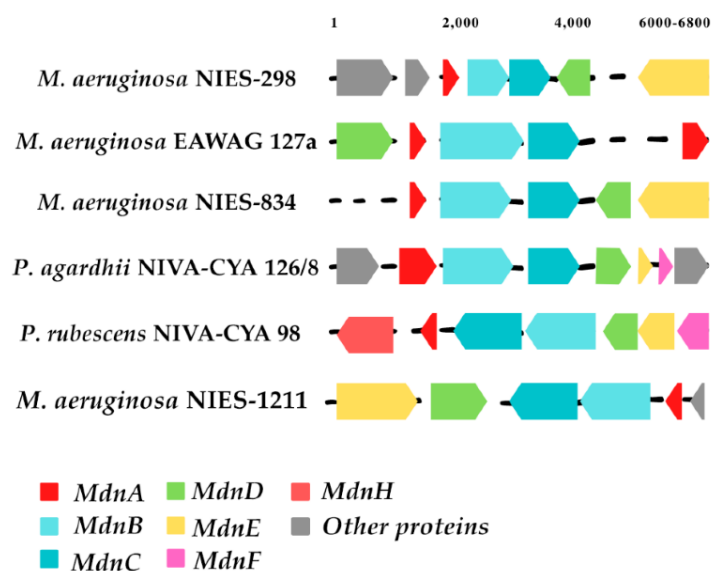


Figura 6. Esquema do BGC de Mv em diferentes estirpes de *Microcystis* e *Planktothrix* (Amaral *et al.*, 2021).

Conforme mencionado anteriormente, as Mvs são inibidoras de diversas serino-proteases. Além disto, podem ser utilizadas como aditivo alimentar (Amaral *et al.*, 2021) e no controlo biológico, uma vez que a inibição de proteases, como a quimotripsina, tem sido utilizada como pesticida biológico. A Mv 1777, por exemplo, foi relatada devido à sua ação contra *Thamnocephalus platyurus* (Sieber *et al.*, 2020). Além disso, possuem um papel fundamental para a saúde, pois, a inibição de quimotripsinas, sintetizadas pelas células acinares do pâncreas (Letko *et al.*, 1989), constituem um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas específicas em proteínas durante o processo digestivo (Kårlund *et al.*, 2021). Elas são particularmente eficazes na ação sobre ligações formadas pelos grupos acil de aminoácidos que possuem cadeias laterais aromáticas ou determinadas cadeias laterais alifáticas (Bender *et al.*, 1973).

As Mvs também têm a capacidade de inibir a tirosinase (Ishitsuka *et al.*, 1990), uma enzima essencial para a produção de melanina (Körner & Pawelek, 1982), o pigmento

responsável pela cor da pele, cabelo e olhos (Tse *et al.*, 1976), amplamente distribuída em microrganismos, animais e plantas (Matoba *et al.*, 2006). Ativada pela radiação UV (Pillaiyar *et al.*, 2017), a tirosinase é essencial para a produção de melanina, a melanogênese, estando a ausência desta enzima relacionada com a redução da síntese deste pigmento (hipopigmentação) (Solano *et al.*, 2006). Esta síntese ocorre em células especializadas, os melanócitos (Snyman *et al.*, 2024). Várias patologias e condições estão relacionadas com estas células, como vitiligo e albinismo (Yamaguchi & Hearing, 2014; Solano *et al.*, 2006), sendo os melanomas malignos um dos tipos de cancro de pele mais severos, associados à transformação e crescimento anormal destas células (Schadendorf & Hauschild, 2014; Guo *et al.*, 2021). Contudo, estão a ser desenvolvidos estudos que se concentram na inibição da melanogênese para a prevenção da metástase dos melanomas (Saud *et al.*, 2022).

Para além desta ação anticancerígena, a inibição da tirosinase pode ser útil na síntese de cosméticos (Zolghadri *et al.*, 2023), uma vez que com a exposição excessiva ao sol, surgem manchas na pele devido à hiperpigmentação (Thawabteh *et al.*, 2023). Apesar de não apresentarem nenhum efeito clínico, estas manchas podem causar algum transtorno, pelo que a utilização de produtos com esta atividade seriam uma mais-valia na sua remoção (Nesterov, 2008). Por outro lado, é necessário ter em consideração que a melanina desempenha um papel crucial na proteção da pele contra a radiação UV (Maddodi & Setaluri, 2008). Assim, em situações de hipopigmentação, onde as células da pele ficam expostas a esta radiação, pode haver um aumento no risco de desenvolvimento de melanomas (Logesh, 2023).

À semelhança das Aps, as Mvs, mais especificamente a Mv B (Figura 7), também apresentam atividade anticoagulante.

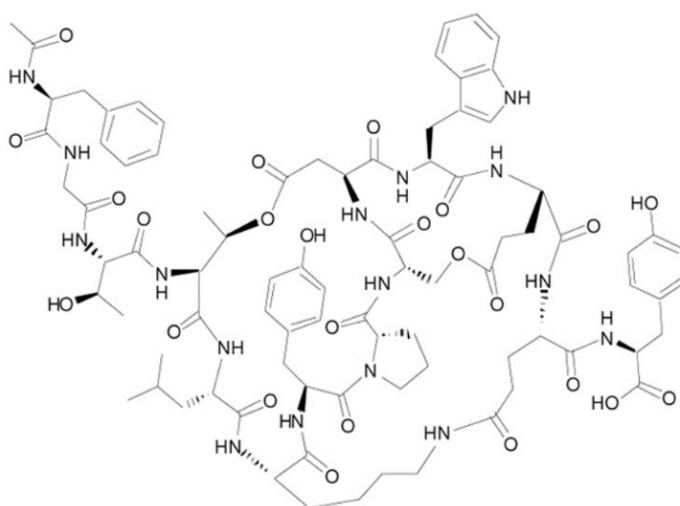


Figura 7. Estrutura química da microviridina B (Ziemert *et al.*, 2010).

1.3.3. Micropeptina K139

Os depsipeptídeos de cianobactérias designados como cianopeptolinas são péptidos cíclicos, nos quais uma ligação amida é substituída por uma ligação éster, constituindo a maioria dos péptidos de cianobactérias (Nishizawa *et al.*, 2011). A classe das cianopeptolinas, que inclui as subclasses anabaenopeptilídeo e micropeptina, foi identificada em formas variadas compostas por seis a nove aminoácidos L, incluindo o resíduo 3-amino-6-hidroxi-2-piperidona (Weckesser *et al.*, 1996).

As Mps foram isoladas pela primeira vez em *Microcystis aeruginosa* por Okino *et al.* (1993), sendo este o único género descrito como produtor deste composto (Harada, 2004; Nishizawa *et al.*, 2011).

Mais recentemente, Nishizawa *et al.* (2011) descreveram os genes de síntese das Mps em duas espécies de cianobactérias (Figura 8), abrangendo quatro estirpes diferentes, sendo estas *Microcystis cf. wesenbergii* N-C 172/5 e *M. aeruginosa* K-139, NIES-843 e PCC 7806.

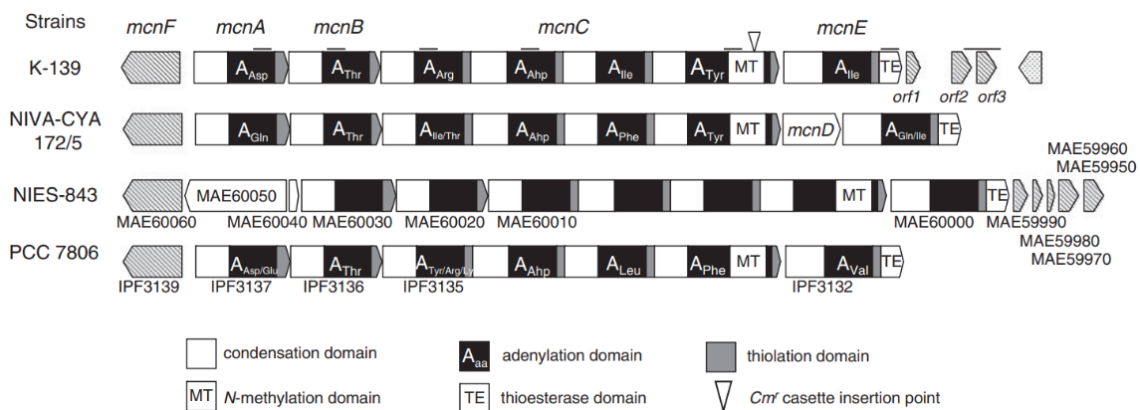


Figura 8. Organização do BGC de micropeptinas, *mcnA-mcnE* (Nishizawa *et al.*, 2011).

Os depsipeptídeos de cianobactérias inibem a tripsina e a quimotripsina (Nishizawa *et al.*, 2011). A Mp K139 (Figura 9) (Anas *et al.*, 2017), a Mp MM978 e a Mp MZ859 (Figura 10) também estão descritas na bibliografia com atividade anticoagulante (Piato & Graebin, 2020).

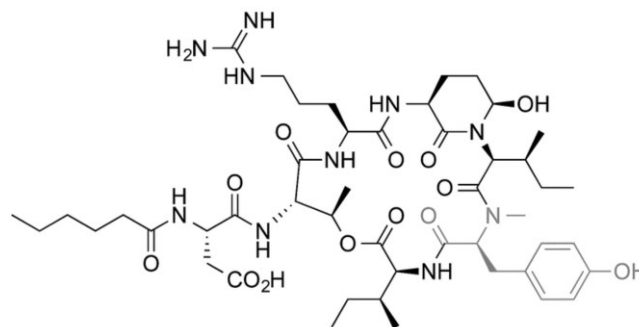


Figura 9. Estrutura química da micropeptina K139 (Labby *et al.*, 2015).

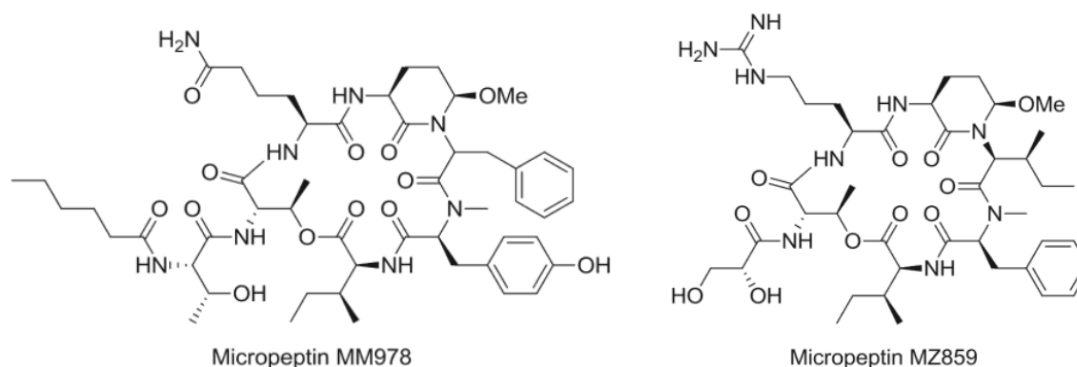


Figura 10. Estrutura química das micropeptinas MM978 e MZ859 (Piato & Graebin, 2020).

1.4 Hemostasia e cascata de coagulação

A hemostasia consiste numa série de mecanismos que ocorrem no interior dos vasos sanguíneos com o objetivo de prevenir e interromper a perda de sangue, por meio da formação de coágulos, e também na destruição destes, evitando trombos (McMichael, 2012).

Quando ocorrem lesões nas paredes dos vasos sanguíneos, devido à exposição do colagénio e das miofibrilas, e do fator tecidual libertado, sucedem-se quatro fases hemostáticas (Abshire & Jobe, 2009; Minors, 2007). A primeira, designada por alguns autores como hemostasia primária, é marcada por uma ação vascular. Nesta fase, as células endoteliais promovem a vasoconstrição da parede do vaso lesionado e secretam proteínas vasoconstritoras como a renina, a endotelina e o fator ativador plaquetário, resultando na diminuição do tamanho do vaso, e, conseqüentemente, na diminuição do tamanho da lesão e do fluxo sanguíneo (Minors, 2007). Simultaneamente, ocorre a homeostasia secundária, onde as plaquetas são ativadas, deslocando-se até ao local afetado, alterando o seu formato e agregando-se umas às outras, graças a glicoproteínas. Além disto, as plaquetas aderem ao endotélio vascular graças ao fator de Von Willebrand, presente nos vasos, que atua como uma ponte de ligação, resultando na formação de um tampão plaquetário temporário (Davie *et al.*, 1991; Girma *et al.*, 1987). Posto isto, é desencadeado um conjunto de processos de ativação em cascata de proteínas responsáveis pela coagulação, sendo o resultado a fibrina, responsável por reforçar o tampão plaquetário, tornando-o mais estável e robusto (Davie *et al.*, 1991). A ativação dos fatores de coagulação ocorre por duas vias distintas, determinadas pela origem da lesão, que convergem no fator X para dar início a uma via comum: a via intrínseca e a via extrínseca (Figura 11).

A via intrínseca é ativada pela exposição de superfícies eletronegativas, como o colagénio ao sangue, resultando na ativação do Fator XII (Fator de Hageman) que inicia a cascata. Posteriormente, o Fator XIIa é responsável por ativar o Fator XI, que, por sua vez, ativa o fator IX. Este Fator IXa, juntamente com o Fator VIIIa ativa o Fator X, dando início à via comum (Figura 11).

Contudo, em situações mais severas, associadas a lesões teciduais, a via extrínseca é ativada pela libertação de lipoproteínas, especificamente o fator tecidual (Minors, 2007).

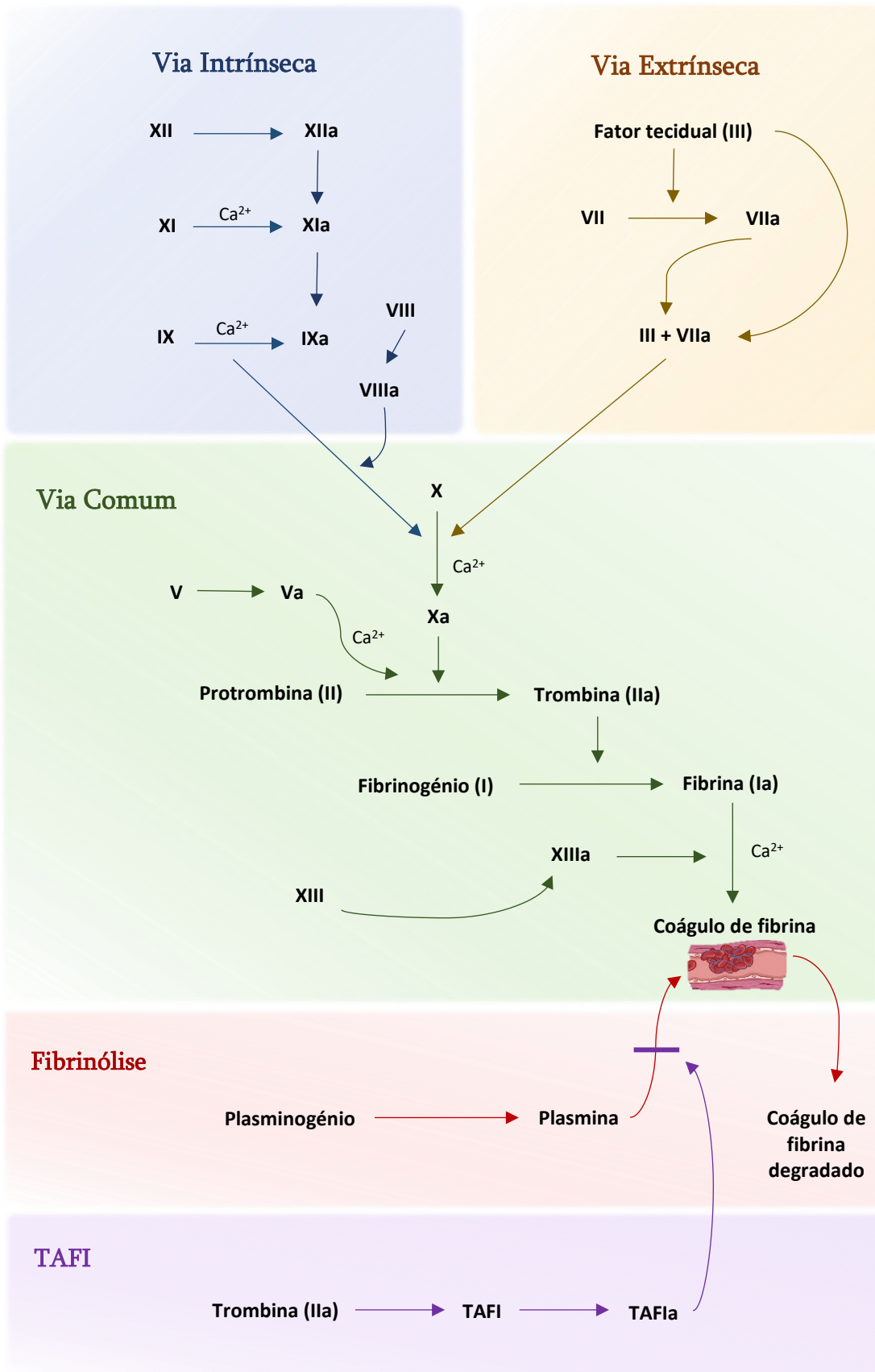


Figura 11. Representação simplificada da via intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação, e fibrinólise com e sem a ação da TAFIa (adaptada de Miranda-Vilela, 2012 & SANG Medicine Ltd., 2022).

Este fator apresenta uma alta afinidade pelo fator VII que circula no sangue (Broze, 1982), com o qual é responsável por ativar o Fator X, terminando também na via comum.

A via comum, como já havia sido mencionada anteriormente, inicia-se com a ativação do Fator X. O Fator Xa, juntamente com o Fator Va, é responsável por converter a Protrombina, o precursor inativo da trombina, em Trombina. Esta enzima cliva duas cadeias polipeptídicas da molécula de fibrinogénio (uma glicoproteína que circula no sangue), para formar o monómero de fibrina, que se polimeriza e forma uma rede de filamentos, responsáveis por estabilizar os coágulos sanguíneos. Além disso, a trombina exibe um *feedback* positivo, pois ativa os fatores V, VIII e o fator XI (Minors, 2007). Concentrações elevadas de trombina levam a redes de fibrina densas resistentes à fibrinólise (Alkarithi *et al.*, 2021).

Ao longo de todas as vias (Figura 11) observa-se a presença de Ca^{2+} , fundamental para a promoção ou aceleração de todas as reações, à exceção da primeira etapa da via intrínseca (Fator XII), independente de cálcio (McMichael, 2012).

Após a restauração do epitélio lesionado, inicia-se a última etapa da hemostasia: a fibrinólise. Este processo é mediado pela plasmina, o produto da ativação do plasminogénio (Minors, 2007). A plasmina surge na sequência da libertação de um ativador de plasminogénio, graças à elevada concentração de trombina, responsável por degradar a fibrina e, conseqüentemente, o coágulo (Boon, 1993). Para regular a formação e destruição dos coágulos, o fígado sintetiza uma enzima crucial para a fibrinólise que circula no sangue no seu estado inativo, a TAFI, também conhecida como Procarboxipeptidase U (Sillen & Declerck 2021; Halland *et al.*, 2015). A TAFI é ativada pela trombina ou pelo complexo trombina-trombomodulina, convertendo-se numa potente enzima antifibrinolítica, também designada como CPU ou Carboxipeptidase B2 (Willemse *et al.*, 2009). Esta enzima ao clivar as argininas e lisinas C-terminais na fibrina parcialmente degradada, inibe a ativação do plasminogénio, o que resulta na inibição da fibrinólise e, conseqüentemente, promove o desenvolvimento de trombos (Figura 11) (Sakharov *et al.*, 1997; Walker & Bajzar, 2004). A inibição da TAFI também promove a degradação do coágulo e tem um efeito antitrombótico (Schreuder *et al.*, 2016; Monteiro *et al.*, 2021), sendo, portanto, vantajosa no tratamento de patologias.

1.4.1 Patologias associadas a distúrbios da cascata

Por vezes, verificam-se anomalias ao nível da cascata de coagulação que comprometem a hemostasia. Situações como a deficiência de antitrombina (AT), das proteínas C (proteínas anticoagulantes naturais que circulam no sangue na sua forma inativa, Griffin *et al.*, 2007) ou das proteínas S (glicoproteínas anticoagulantes que atuam como cofator da proteína C ativada, Walker, 1984), assim como altas concentrações do fator VIII, são alguns dos

responsáveis por alterar a cascata, resultando em trombos venosos (Rosendaal, 1999). Além desses fatores, outros riscos associados ao desenvolvimento de coágulos incluem sexo feminino, idade, etnia negra, histórico familiar de tromboembolia, tabagismo, obesidade, quimioterapia, cirurgias, etc. (Wang & Carrier, 2023; Elyamany *et al.*, 2014).

Como o fígado é responsável pela síntese da maioria dos fatores e inibidores da cascata de coagulação, doenças hepáticas estão fortemente associadas ao risco de trombose (Amitrano *et al.*, 2002; McMichael, 2012).

A trombose é atualmente reconhecida como uma das principais causas de morte no mundo, associada a condições como acidente vascular cerebral (AVC) e tromboembolismo venoso (TEV) (Bentounes *et al.*, 2023). O TEV inclui tanto a trombose venosa profunda quanto a embolia pulmonar (Heit, 2015). A trombose, caracterizada como uma doença de origem multicausal (Rosendaal, 1999), está associada a diversas patologias, destacando-se o cancro. Elyamany *et al.* (2014) observaram que pacientes oncológicos têm maior propensão ao desenvolvimento de trombose, devido ao seu estado de hipercoagulabilidade causado pelas células tumorais. Além disso, a formação de trombos pode influenciar tanto a progressão quanto o prognóstico do cancro. Fora do contexto oncológico, a trombose também está ligada a doenças inflamatórias (Tichelaar *et al.*, 2012), como as doenças inflamatórias intestinais, que elevam o risco de formação de coágulos (Giannotta *et al.*, 2015).

Há autores que afirmam que um coágulo e um trombo não são sinónimos. Após a observação de cortes histológicos de cada um, verifica-se que o coágulo apresenta uma estrutura uniforme, enquanto o trombo aparenta ser composto por dois tipos de material: uma aglutinação de plaquetas e hemácias, assim como alguns leucócitos nas duas regiões. A partir de métodos de coloração especiais, pode-se observar ainda a presença de fibrina a envolver todas estas estruturas. Em contraste, nos coágulos observa-se apenas uma estrutura coralina de hemácias com algumas plaquetas mantidas numa rede fraca de fibrina (Poole & French, 1961). Embora haja autores que afirmem que estas duas estruturas não são sinónimas, para os propósitos deste trabalho, o coágulo e o trombo serão considerados como sinónimos. Esta abordagem visa simplificar a discussão e focar na compreensão geral dos processos da coagulação e da trombose.

Os trombos são responsáveis por obstruir os vasos sanguíneos (trombose venosa) ou as artérias (trombose arterial), o que resulta num fluxo de sangue e oxigénio inadequado a uma parte específica do organismo. Ocorrem comumente em diversos órgãos: no cérebro, resultam em doenças cerebrovasculares; no coração, causam doenças cardíacas isquémicas; nos pulmões, originam embolias pulmonares; no abdómen, provocam isquemia mesentérica; e, em extremidades como braços e pernas, causam trombose venosa profunda ou doença arterial periférica (Figura 12) (Olivera *et al.*, 2021). Em situações mais severas, esta obstrução poderá resultar na morte celular ou na necrose dos tecidos envolvidos, graças

à má oxigenação ou à escassa nutrição dos mesmos (Hosoda & Orikasa, 2022; Markwell *et al.*, 2022).

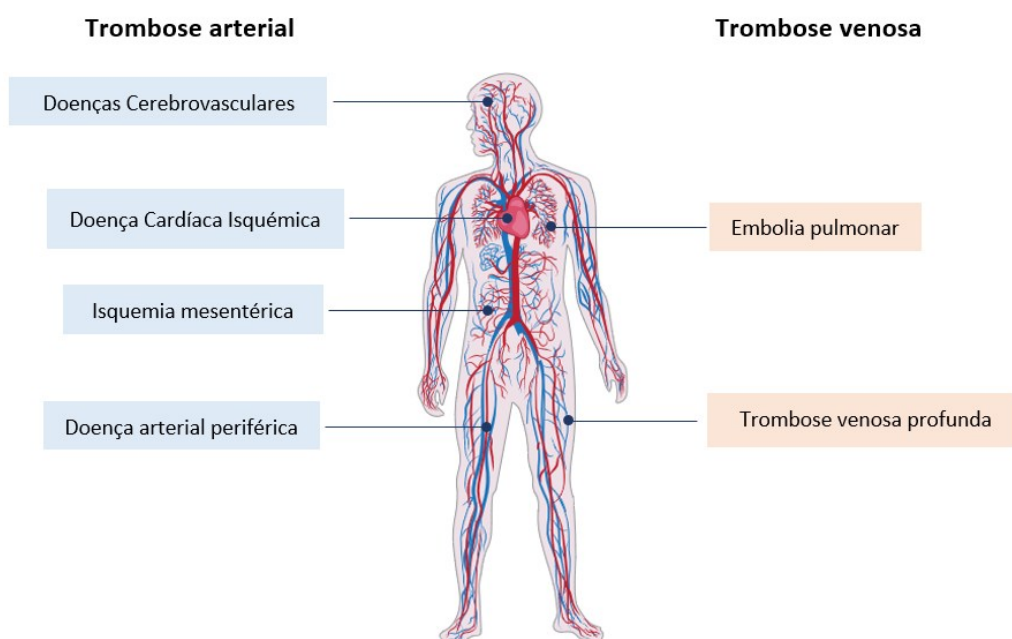


Figura 12. As patologias mais comuns associadas a trombozes de origem arterial e venosa (adaptado de: Olivera *et al.*, 2021).

O tratamento padrão para trombozes geralmente envolve o uso de trombolíticos, anticoagulantes e antiplaquetários, que impedem o crescimento do trombo, embora possam aumentar o risco de sangramentos (Henke *et al.*, 2020). Entre os anticoagulantes naturais, destaca-se a antitrombina (AT), um inibidor de serina protease, que inibe a trombina e ativa o fator X, desempenhando um papel crucial na regulação da coagulação (Roemisch *et al.*, 2002; Levy *et al.*, 2016; Iba *et al.*, 2021). A AT recombinante, desenvolvida para fins terapêuticos, possui propriedades antitrombóticas, anti-inflamatórias e citoprotetoras. A sua ação antitrombótica ocorre através da ativação da proteína C, um anticoagulante fisiológico que, ao se ligar à trombina, neutraliza a promoção da coagulação (Loghmani & Conway, 2018; Ito *et al.*, 2019).

Outro anticoagulante amplamente utilizado é a heparina, extraída principalmente de suínos (Beurskens *et al.*, 2020). A heparina atua inibindo tanto o fator Xa quanto a trombina, sendo um dos agentes mais frequentemente utilizados na terapia anticoagulante, facilitando a interação entre a AT e a trombina ou o fator Xa (Björk & Lindahl, 1982; Beurskens *et al.*, 2020).

As cianopeptolinas (Gademann *et al.*, 2010) e aeruginosinas (Namikoshi & Rinehart, 1996; Ersmark *et al.*, 2008) são outros compostos com atividade anticoagulante produzidos por cianobactérias, que também desempenham um papel importante na inibição de

proteases, e, conseqüentemente na coagulação sanguínea. Estes compostos, juntamente com as Ap, Mv e Mp, contribuem para a diversidade do metabolismo secundário das cianobactérias, com bioatividades que interferem nos processos hemostáticos.

As Aps possuem uma ação antitrombótica devido à sua capacidade de inibir a TAFIa (Monteiro *et al.*, 2021), pois, promovem a fibrinólise resultando na destruição dos coágulos (Halland *et al.*, 2015; Schreuder *et al.*, 2016). Como mencionado anteriormente, a TAFIa é essencial para a hemostasia, contudo, em situações de desregulação, pode contribuir para o desenvolvimento de patologias, e.g. doença cardíaca isquêmica ou isquemia mesentérica (Sillen & Declerck, 2021; Olivera *et al.*, 2021).

Em relação às Mvs, num ensaio desenvolvido por Anas *et al.* (2017), verificou-se que a Mv B possui uma atividade antitrombótica, porém, atua de um modo distinto das Aps, sendo capaz de inibir a ação da trombina. Esta inibição impede a conversão do fibrinogênio em fibrina, e, conseqüentemente, a formação do coágulo, tornando-se assim, num bom aliado ao combate a patologias relacionadas com a formação de coágulos (Lee & Ansell, 2011).

As Mps, nomeadamente a Mp K139, inibem o fator VIIa e a trombina (Anas *et al.*, 2017), ambas etapas essenciais para a formação do coágulo. O fator VIIa inicia a via extrínseca, sendo, conseqüentemente, responsável pela ativação da trombina, enquanto a trombina está diretamente envolvida na conversão do fibrinogênio em fibrina (Mackman, 2009; Goldsack *et al.*, 1998). As Mp MM978 e Mp MZ859 também são referidas na literatura como compostos anticoagulantes devido à inibição de trombina (Piato & Graebin, 2020).

2. Material e Métodos

2.1 Análise filogenética e seleção das estirpes

Após uma pesquisa bibliográfica a propósito dos géneros capazes de produzir o composto Aps, selecionou-se algumas estirpes de cianobactérias depositadas no Banco de Algas e Cianobactérias dos Açores (BACA).

Para uma escolha mais criteriosa das espécies a utilizar fez-se a análise filogenética de sequências da região do 16S rRNA, de estirpes do BACA, previamente depositadas no NCBI (Anexo I). Para tal, utilizaram-se vários *softwares*: o *Mega v11.0.13* (Tamura *et al.*, 2021) para acoplar e clivar as sequências; o *MAFFT v7.520* (Katoh & Standley, 2013) para o alinhamento das sequências de diferentes estirpes; o *IQTREE v1.6.4* (*web server*, CIBIV, Áustria, Trifinopoulos *et al.*, 2016) para inferir distâncias filogenéticas e calcular a máxima verossimilhança; o *FigTree v1.4.4* (Rambaut, 2007) para editar a árvore filogenética; e o *Inkscape v.1.3.2* (<https://inkscape.org/pt/>) para edição gráfica da árvore.

Tendo em conta os taxa descritos na literatura como produtores de Aps (Rohrlack & Utkilen, 2007; Monteiro *et al.*, 2021) e com base na análise filogenética (Anexo I), foram selecionadas 50 estirpes de cianobactérias pertencentes aos géneros *Kamptonema*, *Nostoc*, *Leptolyngbya*, entre outros (Tabela 2). Estas estirpes foram submetidas a uma abordagem OMIC, que incluiu a extração de DNA seguida de análise genómica (sequenciação por *Illumina*), com recurso a *softwares* indicados para a procura de compostos de interesse (*Gene Mining*), além de análises metabolómicas por HR-ESI-LC-MS/MS e rede molecular, e um ensaio de bioatividade trombótica.

Tabela 2. Estirpes de cianobactérias do BACA usadas neste estudo, indicando-se o local e o habitat de onde foram isoladas.

| Amostra | Espécie | Ilha | Local de isolamento | Habitat |
|----------|---|-------------|--|-----------|
| BACA0006 | <i>Phayaothrix</i> sp. | São Miguel | Lagoa das Empadadas Norte | Água doce |
| BACA0007 | <i>Kamptonema</i> sp. | São Miguel | Lagoas das Empadadas Sul | Água doce |
| BACA0025 | Aphanizomenonaceae | Pico | Lagoa Rosada | Água doce |
| BACA0028 | <i>Azorothrix ramosa</i> | São Miguel | Lagoa Rasa das Sete Cidades | Água doce |
| BACA0031 | Aphanizomenonaceae | Pico | Lagoa do Caiado | Água doce |
| BACA0035 | <i>Aliinostoc</i> sp. | São Miguel | Lagoa das Furnas | Água doce |
| BACA0054 | <i>Stenomitos</i> sp. | Pico | Lagoa do Peixinho | Água doce |
| BACA0056 | <i>Tolypothrix</i> cf. <i>helicophila</i> | Pico | Lagoa Rosada | Água doce |
| BACA0057 | <i>Pseudoaliinostoc</i> sp. | São Miguel | Lagoa do Canário | Água doce |
| BACA0060 | <i>Dulcicalothrix</i> sp. | São Miguel | Lagoa das Furnas | Água doce |
| BACA0066 | <i>Azorothrix ramosa</i> | São Miguel | Lagoa do Congro | Água doce |
| BACA0075 | <i>Cyanobium</i> sp. | São Miguel | Lagoa das Furnas | Água doce |
| BACA0089 | <i>Neowestiellopsis persica</i> | Santa Maria | Maia, Vila do Porto | Salobra |
| BACA0106 | <i>Tychonema</i> sp. | São Miguel | Lago artificial, Parque privado Furnas | Água doce |
| BACA0109 | Aphanizomenonaceae | Pico | Lagoa do Paúl | Água doce |
| BACA0110 | Microchaetaceae | São Miguel | Poça da Tia Silvina | Termal |
| BACA0111 | <i>Microchaete bulbosa</i> | São Miguel | Nascente Água de Prata | Termal |

| Tabela 2. Continuação. | | | | |
|------------------------|------------------------------------|-------------|-----------------------------|-----------|
| BACA0112 | <i>Leptolyngbya gelatinosa</i> | São Miguel | Nascente Água do Rego | Termal |
| BACA0121 | <i>Mastigocladus laminosus</i> | São Miguel | Nascente Água do Rego | Termal |
| BACA0127 | <i>Desertifilum tharense</i> | São Miguel | Nascente das Quenturas | Termal |
| BACA0135 | <i>Hapalosiphon</i> sp. | São Miguel | Poça "Meditação" - D. Beja | Termal |
| BACA0141 | <i>Tumidithrix elongata</i> | Pico | Lagoa do Paúl | Água doce |
| BACA0143 | <i>Mastigocladus laminosus</i> | São Miguel | Nascente da Água de Prata | Termal |
| BACA0223 | <i>Cyanobium</i> sp. | São Miguel | - | Água doce |
| BACA0275 | <i>Cyanobium</i> sp. | São Miguel | Lagoa das Furnas | Água doce |
| BACA0344 | <i>Dulcicalothrix</i> sp. | São Miguel | Tanque, Parque Urbano | Água doce |
| BACA0348 | <i>Salileptolyngbya</i> sp. | São Jorge | Lagoa da Fajã dos Cubres | Salobra |
| BACA0399 | <i>Cyanobium</i> sp. | Flores | Afluente da Lagoa Funda | Água doce |
| BACA0429 | <i>Nostoc</i> sp. | São Miguel | Lagoas das Empadadas Sul | Água doce |
| BACA0444 | <i>Pseudocalidococcus azoricus</i> | Flores | Lagoa Comprida | Água doce |
| BACA0449 | <i>Scytonematopsis</i> sp. | São Miguel | Lagoa Rasa da Serra Devassa | Água doce |
| BACA0455 | <i>Kamptonema</i> sp. | São Miguel | Lagoa das Empadadas Sul | Água doce |
| BACA0515 | <i>Tolypothrix</i> sp. | Flores | Caminho da Poça do Ferreiro | Terrestre |
| BACA0570 | <i>Tychonema</i> sp. | Corvo | - | Água doce |
| BACA0574 | Microcoleaceae | Flores | Lagoa Rasa | Terrestre |
| BACA0575 | <i>Tychonema</i> sp. | Corvo | Lagoa do Caldeirão | Terrestre |
| BACA0589 | <i>Chalicoglea</i> sp. | Flores | Miradouro | Terrestre |
| BACA0599 | <i>Kamptonema</i> sp. | Faial | Caldeira do Cabeço Gordo | Água doce |
| BACA0618 | <i>Stenomitos</i> sp. | Terceira | Furna do Enxofre | Terrestre |
| BACA0619 | <i>Kovackia atmophytica</i> | Terceira | Furna do Enxofre | Terrestre |
| BACA0637 | <i>Leptothoe</i> sp. | São Miguel | Ribeira Quente | Marinha |
| BACA0639 | <i>Romeriopsis navalis</i> | São Miguel | Ribeira Quente | Marinha |
| BACA0643 | <i>Kamptonema</i> sp. | Faial | Miradouro do Cabouco | Terrestre |
| BACA0649 | <i>Kamptonema</i> sp. | Pico | Furna Frei Matias | Terrestre |
| BACA0671 | <i>Kamptonema</i> sp. | Santa Maria | Poço da Pedreira | Água doce |
| BACA0694 | <i>Kamptonema</i> sp. | Santa Maria | Ribeira do Maloás | Água doce |
| BACA0731 | <i>Radiculonema aquaticum</i> | Santa Maria | Ribeira do Salto | Água doce |
| BACA0751 | <i>Purpureonostoc</i> sp. | São Jorge | Lagoa da Fajã dos Cubres | Salobra |
| BACA0778 | <i>Leptolyngbya</i> sp. | São Miguel | Nascente Água do Caldeirão | Termal |
| BACA0800 | <i>Ciimarium</i> sp. | São Jorge | Lagoa da Fajã dos Cubres | Terrestre |

2.2 Produção de biomassa

Para a análise genómica e metabolómica foi necessário produzir biomassa das culturas selecionadas. Para a extração de DNA, as estirpes foram colocadas a crescer em 100 mL de meios de manutenção das culturas depositadas no BACA, entre eles os meios BG-11, BG-11(N) e Wharis. Para a análise metabólica inicialmente em 250 mL e ao fim de duas semanas em 1 L com arejamento. As culturas foram colocadas a crescer em condições de temperatura e fotoperíodo fixos, tal como descrito por Cordeiro *et al.* (2021). Somente as estirpes que apresentaram BGCs de metabolitos de interesse na análise genómica foram produzidas à escala de 1 L. Para a extração de DNA, a biomassa foi recolhida por centrifugação (Z446K HERMLE Labortechnik GmbH, Alemanha) durante 10 min, a 10.000 *g* e a 4 °C. As amostras foram limpas com água destilada (durante três ciclos de centrifugação) para remoção de contaminantes presentes no meio, e, no caso das estirpes marinhas, remoção do sal. Para a análise metabolómica, a biomassa foi também centrifugada (mesmas condições). Em ambos

os casos, a biomassa foi posteriormente congelada, liofilizada e guardada a -20 °C, conforme descrito por Cordeiro *et al.* (2021).

2.3 Análise Genômica

2.3.1 Extração e quantificação de DNA

Para a extração de DNA usou-se a biomassa seca das estirpes selecionadas, resultante da produção em 100 mL, e o kit comercial *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, EUA). Foram necessárias alterações ao protocolo fornecido pelo fabricante (Anexo II), tendo em conta as peculiaridades das cianobactérias (e.g. mucilagens e exopolissacáridos) e os requisitos para sequenciação por *Illumina* definidos pela empresa NovoGene (Cambridge, UK), para a qualidade do DNA a sequenciar (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros de qualidade do DNA genômico das cianobactérias para sequenciação por *Illumina*, fornecidos pela empresa NovoGene (Cambridge, Reino Unido).

| Serviço | Tipo de amostra | Quantidade (Qubit®) | Pureza | |
|---------------------------------|-----------------|---------------------|---------|-----------|
| | | | 260/230 | 260/280 |
| <i>Illumina</i> NovaSeq 6000 | DNA genômico | ≥ 200 ng | > 1 | 1,8 – 2,0 |

Para um resultado mais promissor, na etapa de lise celular, adicionou-se a cada amostra 200 µL de esferas de vidro 0.5 mm (QUIAGEN, Alemanha), as quais foram submetidas ao *TissueLyser II* (QIAGEN, Alemanha), dois ciclos de 30s a 30 Hz. Posto isto, a *pellet* foi ressuspendida em 300 µL de *Digestion Buffer* até cobrir as esferas e a amostra. Dado que o *Digestion Buffer* fornecido no kit é limitado, em algumas ocasiões utilizou-se CTAB com o tampão TE, e as amostras foram novamente submetidas ao *TissueLyser II*. De seguida, acrescentou-se Proteinase K e Lisozima (50 mg/mL).

A quantificação e verificação da qualidade do DNA extraído foi avaliada por espectrofotometria, com o *MULTISCAN SkyHigh* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e a placa *µDrop™ Duo Plate* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Além disso, foi também analisada em eletroforese em gel de agarose (0,5%), a 100 V, corado com *SYBR® Safe gel stain* (Invitrogen, EUA). A observação dos géis foi efetuada com recurso ao transiluminador *omniDOC Gel Documentation System* (Cleaver Scientific, Reino Unido).

2.3.2 Sequenciação, assemblagem dos genomas e pesquisa de BGCs

Para sequenciação dos genomas, as amostras de DNA foram enviadas para a NovoGene (Cambridge, Reino Unido), tendo sido sequenciadas por *Illumina (NovaSeq™ X Plus,*

Illumina, EUA). Foi utilizada uma *pipeline* em *Python* para a construção dos genomas, que atua sequencialmente, na seguinte ordem: 1) *FastQC* (Sena Brandine & Smith, 2019) para controle de qualidade; 2) *FastP* (Chen, 2023) para remoção de sequências com baixa qualidade e adaptadores; 3) *SPADES v4.0.0* (Nurk *et al.*, 2017) para alinhamento de sequências e montagem de *bins*, utilizando a opção de metagenômica; 4) *minimap2* (Li, 2018, 2021) para indexação e pré-processamento para *software* de *binning*; 5) *CONCOCT v1.1.0* (Alneberg *et al.*, 2014) para o agrupamento de sequências do mesmo genoma e 6) *BUSCO 5.7.1* (Manni *et al.*, 2021) com seleção da linha de evolução *cyanobacteria_Odb10*, para seleção do genoma correspondente à estirpe de cianobactéria. Para verificar a qualidade dos genomas obtidos (percentagem de finalização e contaminação) usaram-se os seguintes *softwares*, *CheckM v1.2.2* (Parks *et al.*, 2015), *BUSCO v5.7.1* e *CheckM2 v1.0.2* (Chklovski *et al.*, 2023). Para a anotação dos genomas utilizou-se o *Bakta v1.9.4* com a base de dados v5.1 (Schwengers *et al.*, 2021).

Para a pesquisa de BGCs de metabolitos secundários, utilizou-se os *softwares* *AntiSMASH v7.1.0* (Blin *et al.*, 2023) e *Blast2GO v6.0* (Götz *et al.*, 2008). Para o *Blast2GO v6.0*, criou-se três bases de dados para cada um dos compostos em estudo, anabaenopeptinas, microviridinas A-E, e micropeptina K139, de acordo com a informação presente no NCBI (Anexo III). De seguida, recorreu-se ao *Clinker-CAGECAT 1.0* (Gilchrist & Chooi, 2021) para comparar os BGCs dos compostos em estudo com os dados disponíveis no NCBI.

2.4 Análise Metabolómica

2.4.1 Extração de metabolitos secundários

Além das amostras selecionadas na análise genómica, estirpes com BGCs de metabolitos de interesse para a atividade anticoagulante, foram também selecionadas duas estirpes (*Mastigocladus laminosus* BACA0121 e *Hapalosiphon* sp. BACA0135) como controlos negativos (sem BGCs de interesse).

Para a extração dos metabolitos, pesou-se 100 mg de biomassa seca e adicionou-se 20 mL de metanol a 100%, colocou-se a extrair num banho de ultrassons *Elmasonic S30* (Elma Schmidbauer GmbH, Alemanha) por 10 minutos, a 60 Hz. Após os ultrassons, as amostras foram decantadas. Este processo foi repetido três vezes e as amostras decantadas foram acopladas. Em seguida, os extratos foram filtrados a vácuo com um filtro de 1,2 µm (*Glass microfibrres filter 693* (VWR®, França)).

Os extratos foram posteriormente evaporados a 45 °C, usando um evaporador rotativo (*BUCHI R-100*, Thermo Fisher Scientific, EUA). Por fim, os extratos foram transferidos para frascos de 10 mL, e o volume residual foi deixado a secar na *Hotte*. Para garantir que

os extratos estivessem completamente secos, estes foram colocados no liofilizador (*FreeZone 2,5L* Labconco, EUA), cerca de 24 horas. As amostras foram guardadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a análise por HR-ESI-LC-MS/MS, ressuspendeu-se 1 mg do extrato seco em 1 mL de 100% Metanol LC/MS grade (Chem-lab NV, Bélgica). As amostras foram sujeitas a um banho de ultrassons (*Elmasonic S30*, Elma Schmidbauer GmbH, Alemanha) até estarem homogeneizadas. De seguida, foram filtrados 0,2 mL de cada extrato preparado para frascos de âmbar (SureSTART™, Thermo Scientific, Alemanha), tendo sido deixadas no interior da *Hotte* a secar. Após 24 horas, os frascos foram colocados no liofilizador (*FreeZone 2,5L* Labconco, EUA) para garantir que ficassem completamente secos. Em seguida, foram cuidadosamente fechados e guardados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até envio para análise por HR-ESI-LC-MS/MS.

2.4.2 HR-ESI-LC-MS/MS

Para a análise por HR-ESI-LC-MS/MS foram contratados dois serviços, o Centro de materiais (CEMUP) da Universidade do Porto e o Centro de ciências do mar (CCMAR) da Universidade do Algarve, tendo as amostras sido divididas entre estes (Tabela 4).

Na Universidade do Porto, os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta resolução acoplada com ionização por *electrospray* e espectrofotometria de massa em tandem (HR-ESI-LC-MS/MS) no sistema *Q Exactive Focus Orbitrap* (Thermo Fisher, EUA) no modo positivo, como descrito por Ferreira *et al.* (2021).

Quanto aos dados tratados no CCMAR, a separação por cromatografia foi realizada no sistema *Ultimate 3000 UHPLC* (Thermo Scientific, EUA), com a coluna *Accucore RP-18* (2,1 x 100 mm, 2,6 μm Thermo Scientific, EUA). A fase móvel foi composta por água (A) e Acetonitril (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. O gradiente (em v/v %) começou com 100% de A por 2 minutos. Em seguida, B aumentou linearmente para 30% em 13 minutos, depois para 100% em 16 minutos, sendo mantido em 100% por mais 4 minutos. A fase móvel retornou a 100% de A em 1 minuto, sendo mantida em 100% de A por 4 minutos. A taxa de fluxo foi de 0,3 mL/min. O volume de injeção foi de 5 μL . A análise de massas foi realizada em um espectrómetro de massas *Orbitrap Elite* (Thermo Scientific, EUA) com uma fonte de ionização por *electrospray* aquecido (HESI-II). A aquisição de dados foi feita com os seguintes parâmetros: voltagem de *spray* de 3,7 kV (polaridade positiva) e de 4,0 kV (polaridade negativa); gás de arrastamento com 30 unidades arbitrárias; gás auxiliar com 20 unidades arbitrárias; temperatura do aquecedor a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$; temperatura do capilar a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ e nível de fator de retenção (RF) das lentes-S a 64,9%. O intervalo de varrimento foi de 100-1500 m/z. A aquisição foi realizada no modo dependente de dados, usando ativação por dissociação induzida por colisão (CID) e exclusão dinâmica. Os perfis de LC-MS foram

analisados usando os softwares *Xcalibur 4.1* (Abu-Izneid *et al.*, 2023) e *Compound Discoverer 3.3* (Cooper & Yang, 2024).

Tabela 4. Modo de distribuição das amostras em estudo para cromatografia.

| CEMUP | CCMAR |
|----------|----------|
| BACA0007 | BACA0031 |
| BACA0025 | BACA0035 |
| BACA0057 | BACA0056 |
| BACA0060 | BACA0106 |
| BACA0066 | BACA0121 |
| BACA0089 | BACA0135 |
| BACA0111 | BACA0344 |
| BACA0449 | BACA0429 |
| BACA0515 | BACA0574 |
| BACA0589 | - |
| BACA0751 | - |

A partir do *domoDiscovery* (*CyanoMetDB v0.2.0*) procedeu-se à identificação de compostos provenientes dos dois centros (Luz, *et al.* 2024b).

2.4.3 Rede molecular

Utilizando os dados de MS2, foi realizada uma rede molecular seguindo as condições descrita por Luz *et al.* (2024b). Brevemente, os dados brutos foram convertidos para o formato *mgf* com recurso ao *MSConvert* (Chambers *et al.*, 2012). A rede molecular foi construída usando o *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS) em condições padrão, à exceção da tolerância da massa de ião precursor e ião de fragmentação que foram definidos para 0.02 Da (Wang *et al.*, 2016). As identificações dos compostos foram feitas contra bases de dados públicas de compostos puros de referência. De modo a enriquecer a identificação de grupos de compostos usou-se o *MolDiscovery* (Cao *et al.*, 2021) e a base de dados de compostos do *CyanoMetDB v0.2.0* (Jones *et al.*, 2021). A rede molecular final foi visualizada usando o *Cytoscape v3.10.2* (Shannon *et al.*, 2003) e a figura final foi construída com recurso ao *InkScape v1.2.2*.

2.5 Bioatividade trombótica

Para avaliar a atividade trombótica dos extratos das estirpes estudadas usou-se o Kit *TAFI Activity Assay* (ImmBioMed GmbH, Alemanha). Cada amostra foi preparada numa concentração de 4,2 mg/mL, utilizando metanol a 100% como solvente, as soluções preparadas foram submetidas a um banho de ultrassons (*Elmasonic S30*, Elma Schmidbauer

GmbH, Alemanha) para assegurar a sua homogeneidade. Seguiu-se o protocolo fornecido pelo fabricante (Anexo IV).

Além da preparação das amostras, preparou-se uma solução salina de NaCl a 0,9%, e todos os restantes reagentes, conforme indicado pelo fabricante (Anexo IV). Todas as amostras, calibradores e controlos foram analisados em triplicados numa microplaca de 96 poços, lidos a 405 nm de 6 em 6 segundos durante 5 minutos, com o *MULTISCAN SkyHigh* (Thermo Fisher Scientific, EUA), a uma temperatura ambiente de 30,6 °C.

Com recurso ao programa *GraphPad Prism v10* (<https://www.graphpad.com/>) utilizando os resultados da absorvância obtidos nas três repetições para cada amostra, calibradores e controlo, efetuou-se uma curva cinética enzimática usando o modelo de Michaelis-Menten. Posto isto, verificou-se se as diferenças entre as amostras, calibradores, e controlo positivo com o controlo negativo (D1) eram significativas a partir do One-way ANOVA, seguido do teste Kruskal–Wallis conforme o procedimento de aumento linear em duas fases de Benjamini, Krieger e Yekutieli (Kim, 2017). As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas com $p < 0.05$. A análise estatística foi feita para os triplicados, usando para cada triplicado de cada amostra a diferença entre o valor de absorvância máxima e o valor de absorvância mínimo, evitando assim erros associados à absorvância dos pigmentos naturais (e.g. clorofilas) das cianobactérias.

3. Resultados

3.1 Análise genômica

Graças à qualidade das amostras enviadas para sequenciação (Anexo V), obtiveram-se genomas de alta qualidade das 50 estirpes, variando entre os 96,74 e 100% de completude e 0,00 - 3,26% de contaminação (Tabela 5). Com base nestes valores, pode-se afirmar que os genomas obtidos são confiáveis para as análises posteriores.

Tabela 5. Análise da qualidade dos genomas ensamblados, através do *CheckM v1.2.3*.

| Amostra | Tamanho (bp) | Nº Contigs | N50 | GC % | Completo | Contaminação |
|----------|--------------|------------|---------|--------|----------|--------------|
| BACA0006 | 6 449 654 | 71 | 239 895 | 41,00% | 99,64 | 0,14 |
| BACA0007 | 6 977 240 | 202 | 58 599 | 43,43% | 99,18 | 1,09 |
| BACA0025 | 7 701 332 | 513 | 21 014 | 39,99% | 96,74 | 0,82 |
| BACA0028 | 6 540 316 | 161 | 75 259 | 41,08% | 100,00 | 1,36 |
| BACA0031 | 7 826 133 | 513 | 23 461 | 40,03% | 98,91 | 0,82 |
| BACA0035 | 7 228 642 | 178 | 73 345 | 40,80% | 99,18 | 0,27 |
| BACA0054 | 7 525 771 | 66 | 221 151 | 51,24% | 99,46 | 1,90 |
| BACA0056 | 7 229 192 | 211 | 55 177 | 41,85% | 99,91 | 1,09 |
| BACA0057 | 7 796 044 | 141 | 151 420 | 40,53% | 99,14 | 0,82 |
| BACA0060 | 10 833 754 | 384 | 51 617 | 38,88% | 99,05 | 2,40 |
| BACA0066 | 6 516 483 | 150 | 76 345 | 41,10% | 99,73 | 0,54 |
| BACA0075 | 3 054 084 | 47 | 93 251 | 69,90% | 99,73 | 0,27 |
| BACA0089 | 6 924 162 | 250 | 44 305 | 40,13% | 98,37 | 3,26 |
| BACA0106 | 6 554 340 | 216 | 45 829 | 45,73% | 98,14 | 0,27 |
| BACA0109 | 7 804 462 | 523 | 22 126 | 40,04% | 98,37 | 0,54 |
| BACA0110 | 6 728 760 | 205 | 60 634 | 42,39% | 99,64 | 0,36 |
| BACA0111 | 5 920 453 | 52 | 173 146 | 41,54% | 100,00 | 0,00 |
| BACA0112 | 6 760 847 | 41 | 405 728 | 50,63% | 99,09 | 2,99 |
| BACA0121 | 6 933 588 | 278 | 41 968 | 41,26% | 99,46 | 0,77 |
| BACA0127 | 6 320 079 | 59 | 247 393 | 48,54% | 98,91 | 0,82 |
| BACA0135 | 7 391 447 | 181 | 75 753 | 40,11% | 99,73 | 1,36 |
| BACA0141 | 5 508 488 | 229 | 41 369 | 45,33% | 99,32 | 0,82 |
| BACA0143 | 6 874 537 | 284 | 43 258 | 41,24% | 99,46 | 1,04 |
| BACA0223 | 3 104 437 | 12 | 607 940 | 68,52% | 99,73 | 0,27 |
| BACA0275 | 3 379 944 | 32 | 333 143 | 68,68% | 99,18 | 0,00 |
| BACA0344 | 12 505 019 | 204 | 108 217 | 38,93% | 99,32 | 1,13 |
| BACA0348 | 5 979 057 | 36 | 334 671 | 54,52% | 98,82 | 0,77 |
| BACA0399 | 3 034 204 | 57 | 107 504 | 70,14% | 100,00 | 0,00 |
| BACA0429 | 6 650 984 | 179 | 69 021 | 40,59% | 99,73 | 1,36 |
| BACA0444 | 3 463 985 | 34 | 125 609 | 48,70% | 100,00 | 0,14 |
| BACA0449 | 9 292 173 | 173 | 97 843 | 38,75% | 99,73 | 0,68 |
| BACA0455 | 6 273 701 | 109 | 91 387 | 43,07% | 100,00 | 1,22 |
| BACA0515 | 7 526 867 | 245 | 54 944 | 41,57% | 99,73 | 0,27 |
| BACA0570 | 6 590 884 | 218 | 50 048 | 44,39% | 99,09 | 1,09 |
| BACA0574 | 6 977 140 | 393 | 28 833 | 47,49% | 99,18 | 1,72 |
| BACA0575 | 6 595 889 | 224 | 51 023 | 44,39% | 99,09 | 0,27 |
| BACA0589 | 5 098 666 | 135 | 95 583 | 39,34% | 99,37 | 0,82 |
| BACA0599 | 6 221 311 | 100 | 92 931 | 43,06% | 100,00 | 0,41 |
| BACA0618 | 6 935 211 | 204 | 59 364 | 51,23% | 98,91 | 1,09 |

| Tabela 5. Continuação. | | | | | | |
|------------------------|-----------|-----|---------|--------|--------|------|
| BACA0619 | 7 657 032 | 169 | 85 509 | 50,51% | 99,37 | 2,17 |
| BACA0637 | 6 853 059 | 172 | 81 085 | 47,49% | 99,46 | 0,82 |
| BACA0639 | 6 145 175 | 66 | 180 182 | 50,74% | 99,73 | 0,27 |
| BACA0643 | 6 229 922 | 96 | 99 740 | 43,06% | 100,00 | 0,41 |
| BACA0649 | 7 251 474 | 431 | 26 629 | 43,54% | 99,28 | 0,82 |
| BACA0671 | 7 194 657 | 182 | 62 741 | 43,32% | 99,73 | 0,27 |
| BACA0694 | 6 916 620 | 177 | 64 247 | 43,48% | 100,00 | 0,41 |
| BACA0731 | 7 823 321 | 138 | 85 116 | 45,91% | 99,23 | 0,95 |
| BACA0751 | 6 399 040 | 114 | 112 599 | 41,04% | 99,73 | 1,09 |
| BACA0778 | 5 886 542 | 30 | 310 517 | 53,48% | 99,46 | 1,09 |
| BACA0800 | 2 663 539 | 22 | 451 337 | 68,66% | 100,00 | 0,41 |

Após anotação dos genomas usou-se o *AntiSMASH v7.1.0* para identificação dos BGCs dos compostos que poderiam ser potencialmente produzidos pelas estirpes em estudo. Entre eles, verificou-se a identificação de BGCs de compostos com atividades antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoárias, anticancerígenas, além de potencial de proteção contra radiação UV, produção de sideróforos (terpenos responsáveis pelo odor de terra) e inibidores de proteases com atividade anticoagulante. No entanto, dos resultados obtidos, consideraram-se apenas semelhanças entre os BGCs superiores a 70% (Tabela 6).

Tabela 6. Bioatividades de compostos produzidos pelos BGCs identificados nas estirpes de cianobactérias em estudo.

| Atividade | Composto | Amostra | Referências |
|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|--|
| Antibacteriana | <i>Ambiguine</i> | BACA0089 | Mayer <i>et al.</i> , 2011; Swain <i>et al.</i> , 2017 |
| | <i>Rhizomide</i> | BACA0054 | Gavriilidou <i>et al.</i> , 2021 |
| | | BACA0057 | |
| | | BACA0618 | |
| <i>Tenuocyclamide</i> | BACA0671 | Swain <i>et al.</i> , 2017 | |
| Anticancerígena | <i>Trunkamide</i> | BACA0515 | Martins & Vasconcelos, 2015 |
| | <i>Nostocyclopeptide A2</i> | BACA0025 | Fidor <i>et al.</i> , 2019 |
| | | BACA0031 | |
| | | BACA0109 | |
| Anticoagulante | Microviridina | BACA0028* | Amaral <i>et al.</i> , 2021 |
| | | BACA0057 | |
| | | BACA0060* | |
| | | BACA0066* | |
| | | BACA0089 | |
| | | BACA0109* | |
| | | BACA0344* | |
| | | BACA0429* | |
| | | BACA0449* | |
| | BACA0751 | | |
| | Micropeptina | BACA0106* | Piato & Graebin, 2020 |
| | | BACA0344* | |
| | Anabaenopeptina | BACA0007* | Monteiro <i>et al.</i> , 2021 |
| | | BACA0025 | |
| | | BACA0031 | |
| BACA0057* | | | |
| BACA0109 | | | |
| <i>Cyanopeptolin</i> | BACA0056 | Namikoshi & Rinehart, 1996 | |

| Tabela 6. Continuação. | | | |
|---|-----------------------|-----------|---|
| Antioxidante e redução de ferro | <i>Schizokinen</i> | BACA0035 | Chuljerm <i>et al.</i> , 2020 |
| | | BACA0057 | |
| | | BACA0112 | |
| | | BACA0751 | |
| Antiprotozoários | <i>Kolossin</i> | BACA0649 | Parihar <i>et al.</i> , 2022 |
| | | BACA0751 | |
| Antitoxinas | <i>Nostopeptolide</i> | BACA0057 | Fidor <i>et al.</i> , 2019 |
| | | BACA0089 | |
| Antibacteriana, Antituberculose e Anticancerígena | <i>Icosalide A/B</i> | BACA0121 | Shantharaj <i>et al.</i> , 2021; Dangi <i>et al.</i> , 2023 |
| | | BACA0143 | |
| Anti-adenovírus | Landornamida | BACA0455 | Bösch <i>et al.</i> , 2020 |
| | | BACA0599 | |
| | | BACA0643 | |
| | | BACA0671 | |
| Hepatotóxica | Microcistina | BACA0089 | Mankiewicz-Boczek <i>et al.</i> , 2015 |
| Citotóxica | <i>Patellin 6</i> | BACA0515 | Carroll <i>et al.</i> , 1996 |
| Inibidor de tirosinase | Microviridina | BACA0028* | Amaral <i>et al.</i> , 2021 |
| | | BACA0057 | |
| | | BACA0060* | |
| | | BACA0066* | |
| | | BACA0089 | |
| | | BACA0109* | |
| | | BACA0344* | |
| | | BACA0429* | |
| Controlo biológico | Microviridina | BACA0028* | Amaral <i>et al.</i> , 2021 |
| | | BACA0057 | |
| | | BACA0060* | |
| | | BACA0066* | |
| | | BACA0089 | |
| | | BACA0109* | |
| | | BACA0344* | |
| | | BACA0429* | |
| Conversão de angiotensina inibida | Microginina | BACA0056 | Namikoshi & Rinehart, 1996 |
| | | BACA0056 | |
| Apossematismo | Geosmina | BACA0007 | Zaroubi <i>et al.</i> , 2022 |
| | | BACA0056 | |
| | | BACA0135 | |
| | | BACA0570 | |
| | | BACA0575 | |
| | | BACA0649 | |
| BACA0751 | | | |

*BGCs com similaridade abaixo de 70%.

Ao compilar os resultados obtidos a partir dos *softwares AntiSMASH v7.1.0* e *Blast2GO v6.0* foi possível constatar que das 50 estirpes submetidas ao ensaio, apenas 20 aparentam

ser potencialmente produtoras dos compostos alvo, pela presença de genes responsáveis pela síntese dos mesmos (Tabela 7).

Tabela 7. Identificação das estirpes portadoras de BGCs de compostos com atividade antitrombótica de acordo com o *AntiSMASH v7.1.0* e o *Blast2GO v6.0*.

| Amostra | Espécie | Anabaenopeptinas | Micropeptina K139 | Microviridinas |
|-----------|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| BACA0007 | <i>Kamptonema</i> sp. | X ^{a, b} | - | - |
| BACA0025 | Aphanizomenonaceae | X ^{a, b} | X ^b | X ^b |
| BACA0028 | <i>Azorothrix ramosa</i> | - | - | X ^{a, b} |
| BACA0031 | Aphanizomenonaceae | X ^{a, b} | X ^b | X ^{a, b} |
| BACA0035 | <i>Aliinostoc</i> sp. | X ^b | X ^b | X ^b |
| BACA0056 | <i>Tolypothrix</i> cf. <i>helicophila</i> | X ^b | X ^b | - |
| BACA0057 | <i>Pseudoaliinostoc</i> sp. | X ^b | X ^b | X ^{a, b} |
| BACA0060 | <i>Dulcicalothrix</i> sp. | - | - | X ^{a, b} |
| BACA0066 | <i>Azorothrix ramosa</i> | - | - | X ^{a, b} |
| BACA0089 | <i>Neowestiellopsis persica</i> | X ^b | X ^b | X ^{a, b} |
| BACA0106 | <i>Tychonema</i> sp. | - | X ^{a, b} | X ^b |
| BACA0109 | Aphanizomenonaceae | X ^{a, b} | X ^b | X ^{a, b} |
| BACA0111 | <i>Microchaete bulbosa</i> | - | - | X ^b |
| BACA0121* | <i>Mastigocladus laminosus</i> | - | - | - |
| BACA0135* | <i>Hapalosiphon</i> sp. | - | - | - |
| BACA0344 | <i>Dulcicalothrix</i> sp. | X ^{a, b} | X ^b | X ^b |
| BACA0429 | <i>Nostoc</i> sp. | - | X ^b | X ^{a, b} |
| BACA0449 | <i>Scytonematopsis</i> sp. | - | - | X ^{a, b} |
| BACA0515 | <i>Tolypothrix</i> sp. | X ^b | - | - |
| BACA0574 | Microcoleaceae | - | X ^b | - |
| BACA0589 | <i>Chalicoglea</i> sp. | X ^b | - | - |
| BACA0751 | <i>Purpureonostoc</i> sp. | X ^b | X ^b | X ^{a, b} |

X, indica a estirpe com BGC do composto identificado; (*), refere-se aos controlos negativos; resultados identificados no (a) *AntiSMASH v7.1.0* e (b) *Blast2GO v6.0*.

Das 20 estirpes que apresentaram resultados promissores para a síntese de compostos com atividade anticoagulante, pela identificação de BGCs, pode-se identificar dois grupos com semelhanças filogenéticas (Figura 13). O primeiro, inclui as estirpes BACA0028 e BACA0066, ambas identificadas como *Azorothrix ramosa*, e no segundo, as estirpes, Aphanizomenonaceae BACA0025, Aphanizomenonaceae BACA0031 e Aphanizomenonaceae BACA0109. Assim, dada a semelhança entre estas, não se considerou necessário proceder ao estudo de todas as amostras para a análise metabólica, tendo sido selecionadas para as restantes etapas do ensaio somente as estirpes BACA0031 e BACA0066.

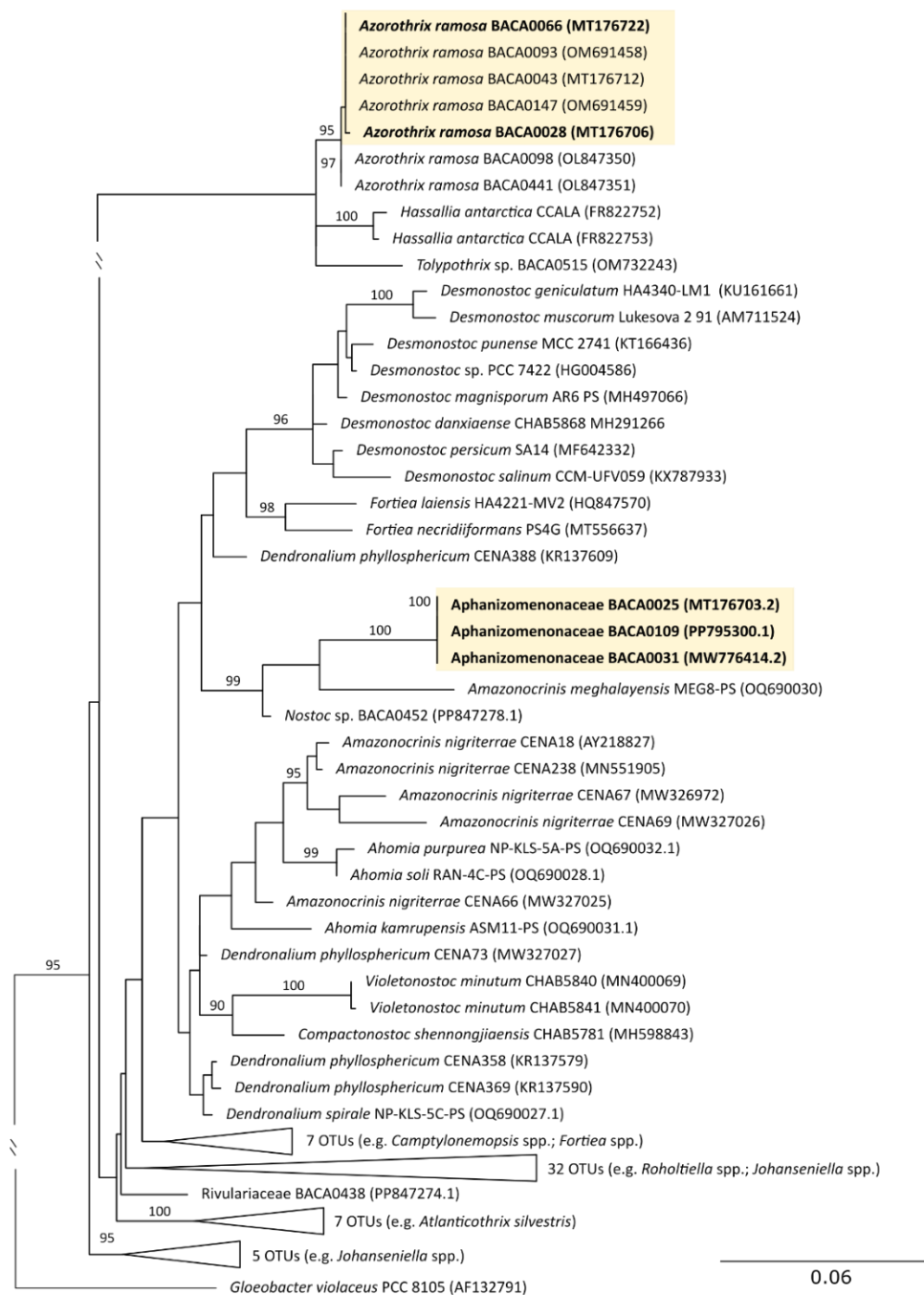


Figura 13. Árvore filogenética parcial da região do 16S rRNA (Anexo I - 1062 OTUs, 1393bp) com as estirpes que apresentam elevadas semelhanças entre si (sinalizadas a amarelo). Os valores da máxima verossimilhança encontram-se apresentados à frente dos *nodes* (>95%).

Ainda na análise genómica, comparou-se o grupo das estirpes potencialmente produtoras de compostos com atividade anticoagulante, segundo os dados obtidos no *AntiSMASH*, com algumas estirpes mencionadas na bibliografia. A partir deste processo, pode-se constatar que para as Aps, apenas as estirpes Aphanizomenonaceae BACA0025, BACA0031 e BACA0109 e *Dulcicalothrix* sp. BACA0344, apresentaram genes do BGC *apt*, o que indica que sejam potenciais produtoras de Aps (Figura 14).

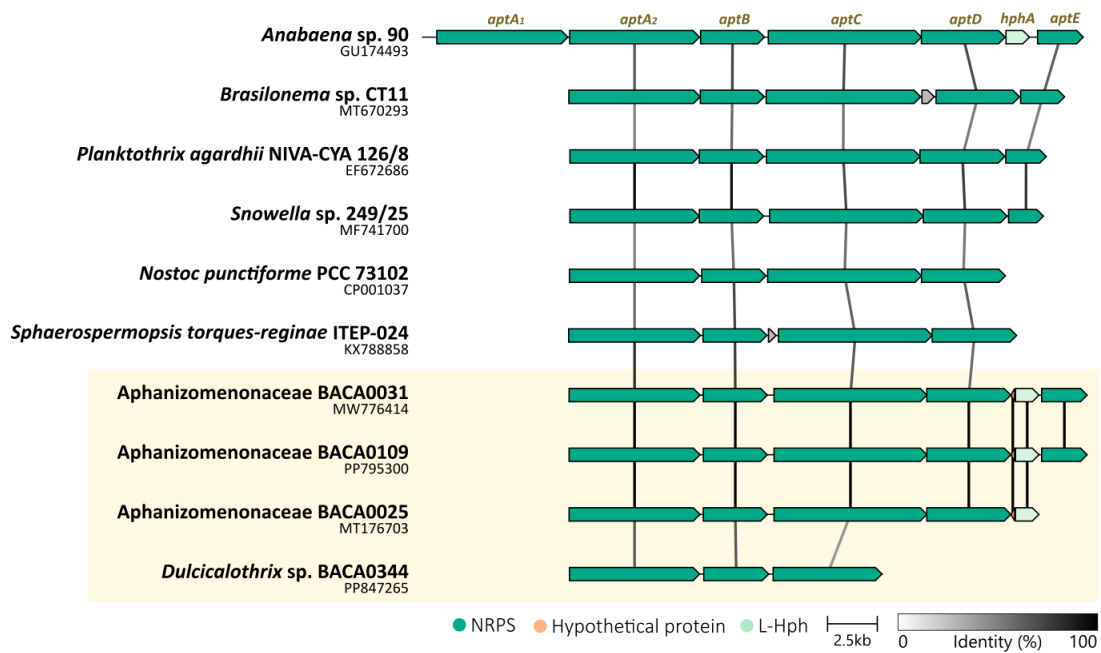


Figura 14. Comparação do BGC de anabaenopeptinas de BACA0025, BACA0031, BACA0109 e BACA0344, com outras estirpes portadores dos genes *apt*, publicadas no NCBI.

Relativamente às Mvs, na mesma análise, verificou-se que de todas as amostras que apresentaram resultados positivos no *AntiSMASH* (Tabela 6), apenas as estirpes *Pseudoaliinostoc* sp. BACA0057, *Neowestiellopsis persica* BACA0089 e *Purpureonostoc* sp. BACA0751, são portadoras de genes do BGC *mdn* (Figura 15).

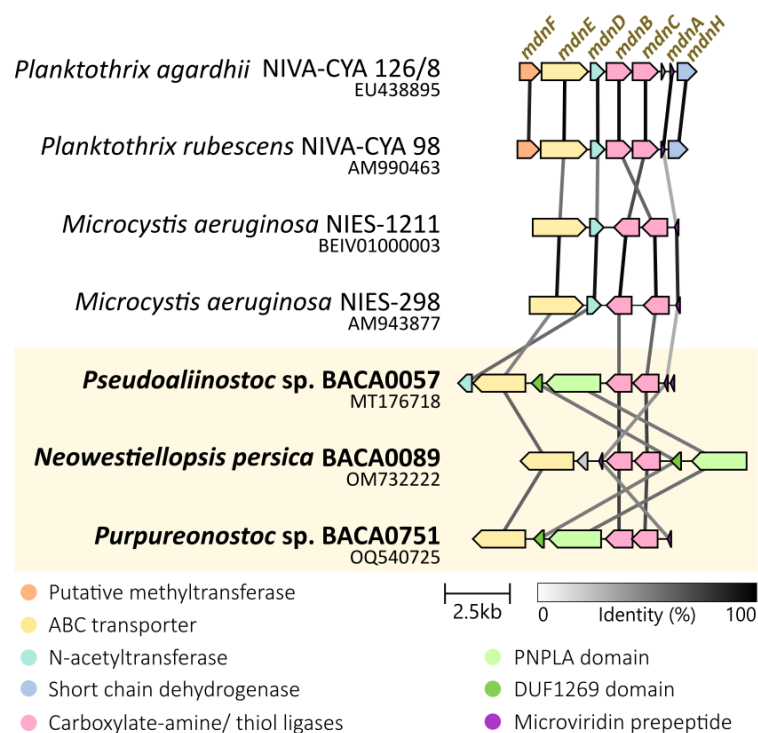


Figura 15. Comparação do BGC de microviridinas de BACA0057, BACA0089, BACA0751, com outras estirpes portadores dos genes *mdn* disponíveis no NCBI.

Quanto às Mps, a estirpe *Tychonema* sp. BACA0106 foi a única a apresentar resultados positivos no *AntiSMASH*, contudo, ao comparar os genes desta estirpe com as sequências disponíveis no NCBI não se verificou semelhanças significativas entre os genes.

3.2 Bioatividade enzimática

Após a realização da atividade enzimática, foi possível constatar que das 18 amostras em estudo nenhuma apresentou uma atividade análoga de TAFI relativamente aos controlos e às diluições do calibrador fornecido pelo fabricante do kit (Anexos V e VI). Ao observar a Tabela 8, pode-se constatar que não se verificou diferenças significativas entre os valores de absorvância das amostras face ao controlo negativo, ao contrário dos calibradores e controlos positivos.

Tabela 8. Resultados da análise One-way ANOVA, seguido do teste Kruskal–Wallis. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas com $p < 0.05$. Comparação entre os calibradores, controlos e amostras com o controlo negativo (D1).

| Calibradores, Controlos e Amostras | Mean rank diff, | q value | p value |
|---------------------------------------|-----------------|---------|---------|
| D2 | 45,00 | 0,04 | 0,008 |
| D3 | 48,00 | 0,03 | 0,005 |
| D4 | 52,00 | 0,02 | 0,002 |
| C1 | 41,00 | 0,07 | 0,02 |
| C2 | 53,00 | 0,02 | 0,002 |
| BACA0007 | 7,500 | 0,77 | 0,66 |
| BACA0031 | 15,83 | 0,61 | 0,35 |
| BACA0035 | 32,67 | 0,20 | 0,06 |
| BACA0056 | 13,67 | 0,64 | 0,42 |
| BACA0060 | 15,17 | 0,61 | 0,37 |
| BACA0066 | 3,333 | 0,87 | 0,85 |
| BACA0089 | 11,67 | 0,69 | 0,49 |
| BACA0106 | 27,00 | 0,34 | 0,11 |
| BACA0111 | 2,667 | 0,87 | 0,88 |
| BACA0121 | 20,00 | 0,56 | 0,24 |
| BACA0135 | 26,00 | 0,34 | 0,13 |
| BACA0344 | 15,00 | 0,61 | 0,38 |
| BACA0429 | -1,833 | 0,87 | 0,91 |
| BACA0449 | -0,5000 | 0,89 | 0,98 |
| BACA0515 | 9,667 | 0,71 | 0,57 |
| BACA0574 | 10,17 | 0,71 | 0,55 |
| BACA0589 | 4,167 | 0,87 | 0,81 |
| BACA0751 | 16,83 | 0,61 | 0,32 |

D1- 100% água *milli-Q*; D2- 30% do calibrador; D3- 70% do calibrador; D4- 100% do calibrador; C1- Controlo 1 (22.1; 21.2 - 22.9%) e C2- Controlo 2 (78.6; 73.5 - 83.6%).

3.3 Identificação de metabolitos secundários

De entre os resultados obtidos do HR-ESI-LC-MS/MS executado no CEMUP, a estirpe *Aphanizomenonaceae* BACA0025 foi confirmada como produtora de Ap T ((M+H⁺) 866,5076 *m/z*). A massa do ião precursor da Ap T identificado neste trabalho (Figura 16) assemelha-se ao valor de referência de 866,5028 *m/z* descrito por Kodani *et al.* (1999).

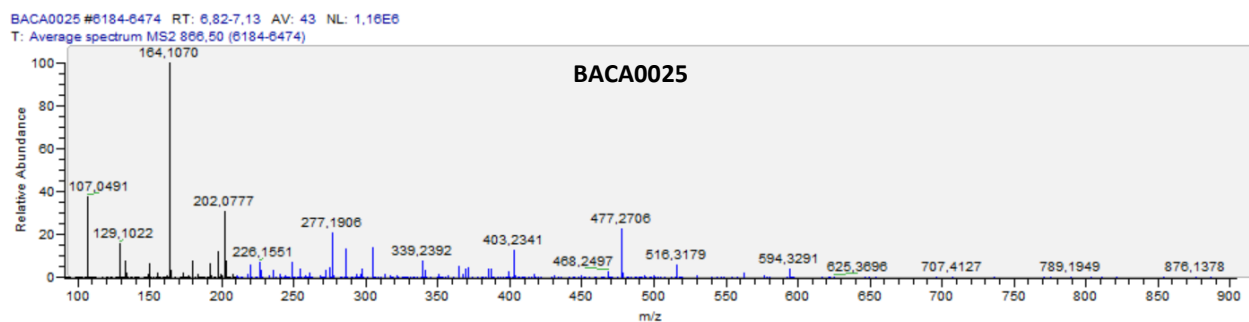


Figura 16. Cromatograma (MS2) da amostra *Aphanizomenonaceae* BACA0025 com resultado positivo para Ap T ((M+H⁺) 866,5076 *m/z*).

Além desta, para *Pseudoaliinostoc* sp. BACA0057 e *Purpureonostoc* sp. BACA0751 identificou-se massas na HR-ESI-LC-MS/MS idênticas à Mp 1120 ((M+H⁺) 1120,5991 *m/z*) (Figura 17). A Mp 1120, já descrita por Isaacs *et al.* (2014), apresenta um ião precursor de massa 1120,7 *m/z* e três iões de fragmentação com 538,4 *m/z*, 206,2 *m/z* e 136,1 *m/z*.

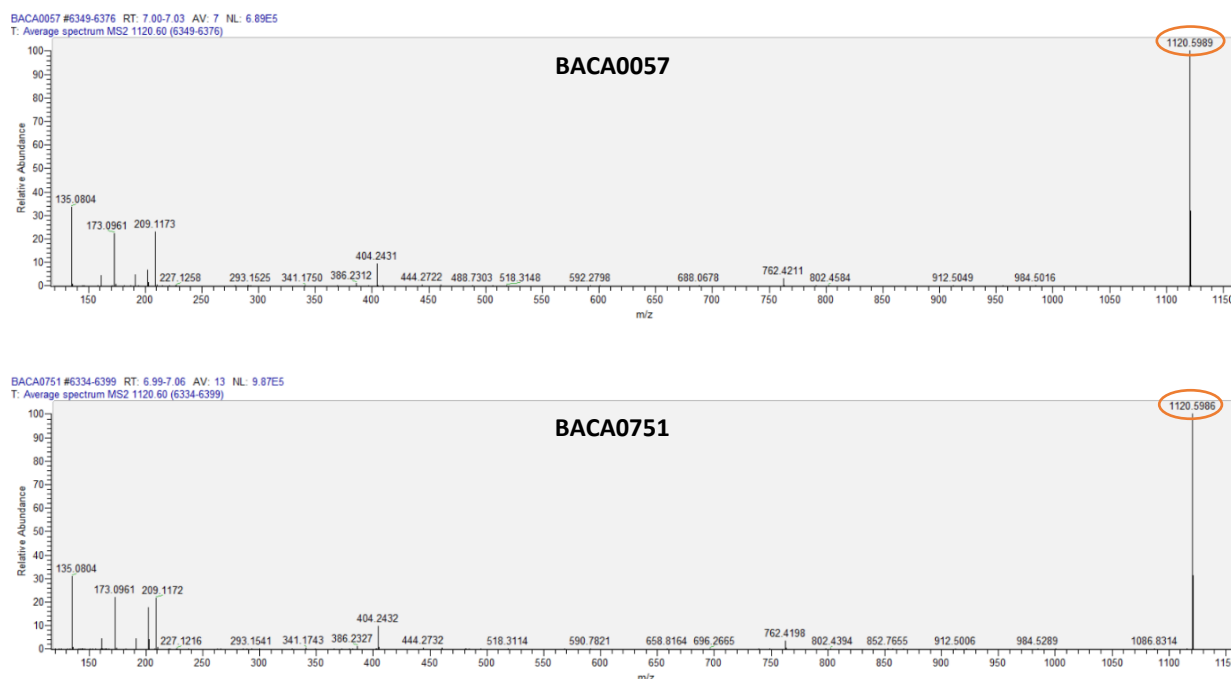


Figura 17. Cromatogramas (MS2) das amostras *Pseudoaliinostoc* sp. BACA0057 e *Purpureonostoc* sp. BACA0751 com resultado positivo para a Mp 1120. A laranja encontra-se destacado o ião precursor (Isaacs *et al.*, 2014).

Quanto às amostras analisadas no CCMAR, apenas a *Tolypothrix cf. helicophila* BACA0056 apresentou uma massa idêntica a Mv A ((M+H⁺) 1729,7169 *m/z*), semelhante ao descrito na literatura ((M+H⁺) 1729,7169 *m/z*) (Ishitsuka *et al.*, 1990). Na corrida de HR-ESI-LC-MS/MS, como o intervalo de varrimento foi de 100-1500 *m/z*, dos compostos em questão, apenas a Ap T (866,5076 *m/z*) e a Mp 1120 ((M+H⁺) 1120,5991 *m/z*) se encontravam neste intervalo.

3.4. Rede molecular

Na análise molecular foi possível constatar semelhanças entre os compostos produzidos por algumas das amostras em estudo e compostos previamente descritos, nomeadamente, a microcistina LF/ MC-LR/ HtyR, a Ap T e a vacarina (Vc). Na Figura 18, estão identificados os *nodes* de microcistina, Ap T e Vc, sendo os restantes *nodes* referentes a massas não identificadas. Para esta análise pode-se considerar que a microcistina é produzida pela *Neowestiellopsis persica* BACA0089, a Vc pela Aphanizomenonaceae BACA0031 e Aphanizomenonaceae BACA0025, e a Ap T pela Aphanizomenonaceae BACA0025. Quanto às Mp e Mv, dado que estas eram *nodes* únicos, e como não ficaram agrupados, não foram representados na imagem.

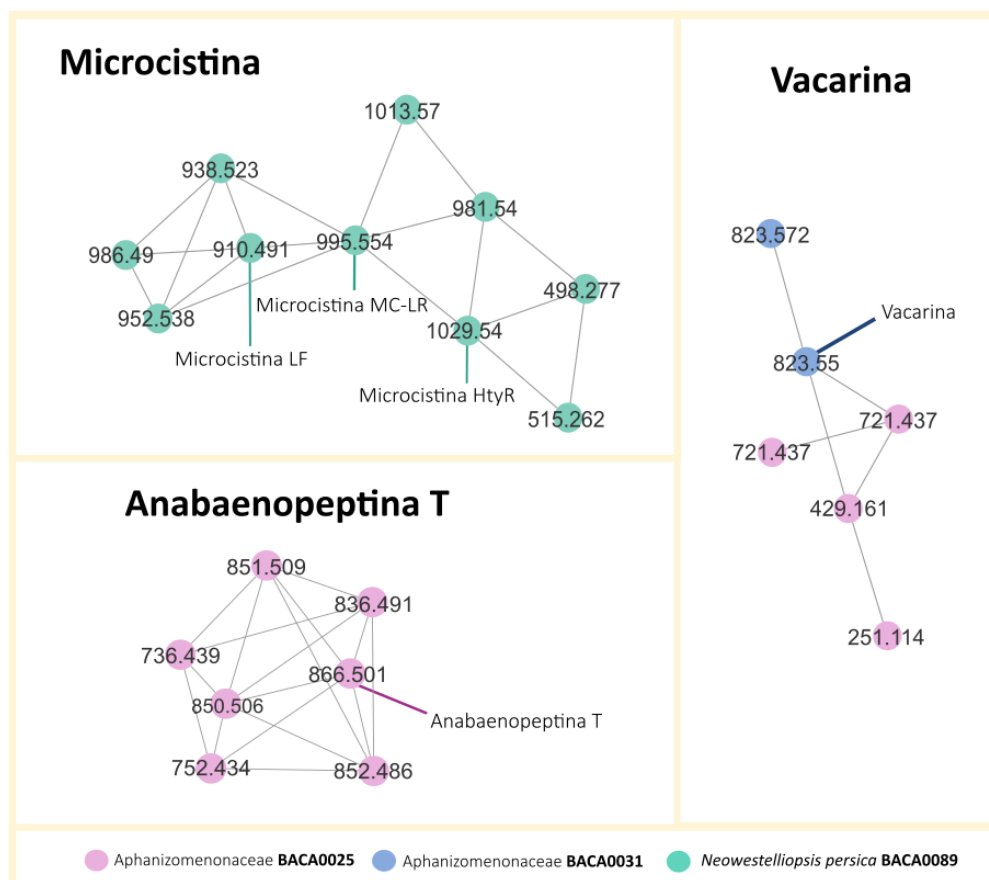


Figura 18. Clusters de anabaenopeptina T, microcistina e vacarina encontrados nas estirpes BACA0025, BACA0031 e BACA0089.

Assim, após as diferentes análises efetuadas, pode-se considerar que as estirpes que são potencialmente produtoras de anabaenopeptinas, microviridinas e micropeptinas encontram-se identificadas na Tabela 9, juntamente com os respetivos habitats de onde foram isoladas.

Tabela 9. Estirpes de cianobactérias com potencial de produção de compostos com bioatividades relevantes para a saúde e respetivos locais de colheita.

| Estirpe | Espécie | Composto sintetizado | Ilha | Local de isolamento | Habitat |
|----------|------------------------------------|----------------------|-------------|--------------------------|-----------|
| BACA0025 | Aphanizomenonaceae | Ap T / Vc | Pico | Lagoa Rosada | Água doce |
| BACA0031 | Aphanizomenonaceae | Ap / Vc | Pico | Lagoa do Caiado | Água doce |
| BACA0056 | <i>Tolypothrix cf. helicophila</i> | Mv A | Pico | Lagoa Rosada | Água doce |
| BACA0057 | <i>Pseudoaliinostoc</i> sp. | Mp 1120 | São Miguel | Lagoa do Canário | Água doce |
| BACA0089 | <i>Neowestiellopsis persica</i> | Mv | Santa Maria | Maia, Vila do Porto | Salobra |
| BACA0109 | Aphanizomenonaceae | Ap | Pico | Lagoa do Paúl | Água doce |
| BACA0344 | <i>Dulcicalothrix</i> sp. | Ap | São Miguel | Tanque, Parque Urbano | Água doce |
| BACA0751 | <i>Purpureonostoc</i> sp. | Mv/ Mp 1120 | São Jorge | Lagoa da Fajã dos Cubres | Salobra |

4. Discussão

4.1 Compostos com atividade antitrombótica

De acordo com os resultados obtidos no *AntiSMASH* (Tabela 6), constatou-se que os BGCs das estirpes correspondentes aos gêneros *Kamptonema*, *Aliinostoc*, *Pseudoaliinostoc*, *Neowestiellopsis*, *Dulcicalothrix*, *Tolypothrix*, *Chalicoglea* e *Purpureonostoc*, e à família Aphanizomenonaceae apresentaram similaridades com o BGC da Ap. No entanto, segundo a informação disponível na bibliografia, nenhum dos gêneros identificados está descrito como produtor deste composto (Rohrlack & Utkilen, 2007; Monteiro *et al.*, 2021). No que se refere à família Aphanizomenonaceae, embora as estirpes BACA0025, BACA0031 e BACA0109 não tenham sido caracterizadas ao nível de gênero, o gênero *Aphanizomenon*, pertencente a esta família, está descrito como potencial produtor de Ap (Murakami *et al.*, 2000).

Na análise dos BGCs (Figura 14), verificou-se que *Dulcicalothrix* sp. BACA0344 e Aphanizomenonaceae BACA0025, BACA0031 e BACA0109, foram as únicas estirpes a apresentar um BGC de Ap semelhante ao descrito na literatura (Monteiro *et al.*, 2021). Contudo, a BACA0344 apresentou menos semelhanças (apenas três genes) com as sequências de referência (Figura 4).

Devido à similaridade entre as estirpes Aphanizomenonaceae BACA0025, Aphanizomenonaceae BACA0031 e Aphanizomenonaceae BACA0109 (Figura 13), selecionou-se apenas a BACA0031, contudo, dada a semelhança entre os genes do BGC considerou-se importante testar outra amostra deste mesmo grupo, tendo sido testada a Aphanizomenonaceae BACA0025. Visto que o kit da atividade enzimática é limitado, não foi possível proceder ao ensaio enzimático para esta mesma amostra. Contudo, na cromatografia, enquanto na amostra Aphanizomenonaceae BACA0031 não foi possível a identificação dos compostos de interesse, para a Aphanizomenonaceae BACA0025 identificou-se a Ap T ((M+H⁺) 866.5017 *m/z*). Apesar da alta similaridade entre estas estirpes do mesmo taxa (Figura 13), verificam-se diferenças na identificação de metabolitos secundários. Como já foi identificado em outros estudos, além da variação fenotípica observada em cianobactérias, estes microrganismos também apresentam diversidade metabólica, em resposta às alterações das condições do meio (Ji *et al.*, 2020; Mühling *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2013). Este fenómeno reflete-se na síntese de diferentes compostos dentro da mesma espécie, proporcionando uma maior capacidade de adaptação a ambientes com condições variáveis (Dabravolski & Isayenkov, 2022; Amin *et al.*, 2024). Isto confere às cianobactérias uma notável plasticidade e capacidade de adaptação, resultando em variabilidade intraespecífica, o que é corroborado pelos resultados obtidos (Welker & Von,

2006, Gkelis *et al.*, 2019, Willis & Woodhouse, 2020; Halary *et al.*, 2023; Kujawinski *et al.*, 2023, Cordeiro *et al.*, 2024).

Embora as estirpes estudadas não tenham apresentado Ap B, Ap C e Ap F na HR-ESI-LC-MS/MS, identificou-se a Ap T. Apesar deste análogo não exibir atividade anticoagulante, tem atividade inibitória contra a CPA (Kodani *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2000). Além disso, até ao momento, não haviam sido descritos géneros produtores de Ap T, tendo este composto sido inicialmente descrito num *bloom* de cianobactérias no lago Teganuma (Japão) (Kodani *et al.*, 1999).

O BGC de Mvs identificado em *Pseudoaliinostoc* sp. BACA0057, *Neowestiellopsis persica* BACA0089 e *Purpureonostoc* sp. BACA0751 apresentou semelhanças com os de referência (Figura 15, Amaral *et al.*, 2021). Apesar de nenhuma destas amostras ter demonstrado resultados positivos na cromatografia, não podemos excluir a possibilidade de que sejam capazes de sintetizar Mvs. Esta diferença pode estar associada com a inativação dos BGCs. Ou seja, mesmo estando presente nestas amostras, não se expressa devido às condições ambientais em que as estirpes foram analisadas, sendo necessário condições de *stress* para ativar estes genes (Kłodawska *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2022).

No entanto, uma vez que não se encontrou na literatura o BGC de Mvs em *Pseudoaliinostoc*, *Neowestiellopsis* e *Purpureonostoc*, considera-se que este trabalho possa reportar novas informações na distribuição da síntese de Mvs em cianobactérias, apesar de não haver confirmação da sua síntese por HR-ESI-LC-MS/MS.

Apesar dos resultados obtidos na análise genómica, foi na estirpe *Tolypothrix* cf. *helicophila* BACA0056 que foi identificada a Mv A, sendo esta a primeira identificação de Mv no género *Tolypothrix*. Até ao momento, as Mvs só tinham sido identificadas nos géneros *Microcystis* (Ishitsuka *et al.*, 1990; Okino *et al.*, 1995), *Planktothrix* (Fujii *et al.*, 2000; Philmus *et al.*, 2008), *Nostoc* (Shin *et al.*, 1996), *Chryseobacterium* (Ahmed *et al.*, 2017), *Anabaena* (Philmus *et al.*, 2008) e *Nodularia* (Amaral *et al.*, 2021). Este é um resultado inesperado, visto que os resultados de análise genómica (*Blast2GO*) mostraram indicações para a presença de BGCs de Aps ou de Mps, mas não de Mvs. Isto poderá ter acontecido dado que a sequenciação foi realizada pelo método *Illumina*, em que as amostras de DNA são fragmentadas e estes fragmentos são amplificadas, detetados por fluorescência e montados (*assembling*) (Hu *et al.*, 2021; Moti *et al.*, 2022). Devido aos cortes aleatórios na fragmentação é possível que a informação genética referente ao BGC de Mvs tenha sido perdida ou esteja incompleta. Embora a Mv A não possua atividade antitrombótica, encontra-se descrita como inibidora da tirosinase (Amaral *et al.*, 2021). Na bibliografia ainda há pouca informação referente a este composto, estando a identificação deste limitada ao género *Microcystis* (Okino *et al.*, 1993; Harada, 2004; Nishizawa *et al.*, 2011).

Na análise por cromatografia, nas estirpes *Purpureonostoc* sp. BACA0751 e *Pseudoaliinostoc* sp. BACA0057 identificou-se Mp 1120 (1120,5991 m/z). A Mp 1120, Mp

1106 e Mp NMR194 foram descritas por Isaacs *et al.* (2014), com recurso a cromatografia líquida com espetrometria de massa (LC-MS), após terem sido identificados num *bloom* de *Microcystis aeruginosa* no Rio Cape Fear, na Carolina do Norte (EUA). A Mp 1120 foi identificada como sendo, possivelmente, um artefacto da Mp 1106, não sendo produzida naturalmente. Isto deve-se à semelhança entre ambas, sendo a Mp 1120 identificada como o éster metílico da Mp 1106, estando estes análogos relacionados com as Mp 88A - 88F, que apresentam resíduos de arginina em vez de tirosina ou leucina na 5ª posição (Ishida *et al.*, 1998). De momento, não existem estudos sobre a atividade da Mp 1120. No entanto, as Mps 88A - 88F, com exceção da Mp 88B, inibem a quimotripsina, uma proteína digestiva (Ishida *et al.*, 1998; Solovyev *et al.*, 2023).

De acordo com os dados obtidos neste estudo, verificou-se que o potencial de produção de Aps, Mvs e Mps ocorreu predominantemente em estirpes colhidas de habitats de água doce (Tabela 9). Isto deve-se ao facto de que, das 50 estirpes analisadas 28 foram amostradas de ambientes de água doce (Tabela 2). Em relação às estirpes provenientes de habitats marinhos, *Leptothoe* sp. BACA0637 e *Romeriopsis navalis* BACA0639, estas não exibiram a síntese de nenhum dos compostos estudados. Este resultado contrasta com as observações de Nunnery *et al.* (2010), que sugeriam que cianobactérias marinhas têm potencial para sintetizar diversos compostos bioativos. No entanto, esta discrepância pode ser atribuída ao tamanho reduzido da amostragem, uma vez que foram analisadas apenas duas estirpes marinhas, e ao facto do estudo ter-se focado apenas na pesquisa de três compostos, o que impede a formulação de conclusões. Quanto às estirpes oriundas de ambientes terrestres e termais, também não se identificaram BGCs ou compostos com atividade antitrombótica.

Quanto à análise *in silico* da rede molecular, verificou-se a produção de alguns compostos como a microcistina (Figura 18). A presença desta toxina na estirpe *Neowestiellopsis persica* BACA0089 foi utilizada como controlo para validar a veracidade desta análise, uma vez que, entre todas as estirpes analisadas, a espécie *Neowestiellopsis persica* encontra-se identificada como produtora de microcistina (Nowruzzi *et al.*, 2022). Nesta mesma análise, constatou-se que a estirpe Aphanizomenonaceae BACA0025 é putativamente produtora de Ap T, conforme já havia sido observado. Os outros compostos investigados não foram representados devido à presença de apenas um *node*, no entanto verificou-se a produção de Vc por duas estirpes, a Aphanizomenonaceae BACA0025 e Aphanizomenonaceae BACA0031.

De acordo com a literatura disponível, a Vc é um dos principais compostos ativos das sementes de *Vaccaria segetalis* utilizada na medicina tradicional chinesa (Yang *et al.*, 2014), devido às suas diversas atividades com potenciais aplicações na área da saúde. Entre essas atividades, destaca-se a proteção da barreira intestinal e, conseqüentemente, a resistência à insulina, uma vez que ambas estão inter-relacionadas (Lei *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2021). Estudos indicam que este composto melhora a sensibilidade à insulina, tendo mostrando

resultados promissores em ratos, com melhorias ao nível da obesidade e nos valores de hiperglicemia (Jia & Liu, 2022). Além disto, a Vc está associada à promoção da proliferação de células endoteliais, acelerando a angiogénese *in vivo*, o que torna este composto num potencial agente no tratamento contra doenças vasculares (Xie *et al.*, 2015). Também existem estudos que relatam a ação da *Vaccaria segetalis* ao nível da circulação sanguínea e da coagulação, não estando especificado o composto responsável pela atividade (Bing *et al.*, 2024).

Até ao momento, a produção deste composto estava exclusivamente associada à *Vaccaria segetalis* (Yang *et al.*, 2014), não tendo sido encontrado nenhuma referência a outro organismo produtor. Assim, esta é possivelmente uma das primeiras relações entre cianobactérias e a potencial produção deste composto. Além disso, na análise genómica, a ausência deste composto pode ter surgido por razões semelhantes às observadas na estirpe *Tolypothrix cf. helicophila* BACA0056, ou seja, cortes aleatórios na sequência podem ter levado à perda ou à falta de informação genética referente ao BGC de Vc.

4.2 Considerações sobre as ferramentas OMIC

No decorrer deste estudo foram utilizadas diversas abordagens OMIC, com o objetivo de procurar compostos com atividade antitrombótica. Esta abordagem foi anteriormente realizada em cianobactérias, como por exemplo em Verma *et al.* (2022) e Jeong *et al.* (2020).

Inicialmente, para a extração do DNA utilizou-se um protocolo fornecido pelo fabricante. No entanto, foi necessário efetuar algumas otimizações na tentativa de obter resultados mais robustos, visto que se verificou alguma dificuldade na lise celular e extração do DNA genómico. Para tal, utilizaram-se esferas de vidro, que atuam como um agente mecânico no rompimento das paredes e membranas celulares, e um disruptor celular (*TissueLyser*), garantindo maior eficiência na lise celular (Nakaune & Nakano, 2006; Smith *et al.*, 2011). Estes dois métodos em conjunto facilitaram a degradação da parede celular e das bainhas e de exopolissacáridos, e a libertação do conteúdo intracelular para o meio extracelular (Gil-Solsona *et al.*, 2021). Algumas estirpes de cianobactérias possuem exopolissacáridos em diferentes proporções, o que dificulta a lise celular (Drews & Weckesser, 1982). A estes dois métodos, responsáveis pela degradação mecânica, adicionou-se um tampão de digestão para uma ação enzimática (Guerra *et al.*, 2020; Heikrujam *et al.*, 2020).

Para a etapa do *Gene Mining*, à semelhança de outros autores (May *et al.*, 2020; Leão *et al.*, 2021; Lorenzi *et al.*, 2022) recorreu-se ao *AntiSMASH* para identificar BGCs em cada estirpe por comparação às sequências anotadas no banco de dados *MIBiG* (Medema *et al.*, 2015). Contudo, para obter resultados mais robustos, para além da informação

disponibilizada pelo *AntiSMASH*, considerou-se importante confirmar os resultados obtidos com recurso ao *Blast2GO* (Paço *et al.*, 2023; Thatcher *et al.*, 2018), tendo sido criado uma base de dados com informações do NCBI para esse efeito.

Ainda no *AntiSMASH*, foram consideradas todas as amostras com similaridade com os BGCs superiores a 70%, contudo, na tentativa de encontrar mais compostos positivos para a atividade em questão, considerou-se os resultados de compostos com atividade anticoagulante inferiores a este limite estabelecido.

Na atividade enzimática destinada a avaliar a ação de TAFI, utilizou-se um kit exclusivo para uso em investigação. Contudo, apesar de o objetivo da sua utilização ser a deteção de compostos nas estirpes em estudo com uma ação semelhante à TAFI, de modo a determinar se, além de uma ação benéfica para a saúde com atividade anticoagulante, algum composto poderia ter uma ação contrária, não foi identificada nenhuma atividade. Em retrospectiva, acredita-se que de todos os métodos implementados neste projeto, este tenha sido o que apresentou menor relevância.

A HR-ESI-LC-MS/MS é altamente sensível e seletiva para a deteção e identificação de compostos. Por isso, foi essencial a sua utilização, pois, permitiu confirmar a presença de compostos em concentrações muito baixas e identificar análogos, mesmo sem padrões disponíveis (Wu *et al.*, 2012; Luz *et al.* 2024a, 2024b).

A construção de uma rede molecular foi fundamental, pois, a partir de uma análise *in silico* (Nothias *et al.*, 2020), consolidou-se todas as informações obtidas no *Gene Mining* e na identificação por HR-ESI-LC-MS/MS. A análise de uma rede molecular é amplamente utilizada na análise de compostos para a síntese de fármacos (Terstappen & Reggiani, 2001), uma vez que ajuda a mitigar problemas associados a tempo e custo, que afetam as abordagens *in vitro* e *in vivo* (Shaker *et al.*, 2021). Além disso, também já foi aplicado em outras análises de compostos produzidos por cianobactérias (Luz *et al.*, 2024a, 2024b; Niveshika *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2022).

5. Conclusões

5.1 Contributos do trabalho

Este trabalho permitiu constatar que a abordagem utilizada poderá ser implementada em pesquisas futuras, pois, permitiu tirar conclusões a respeito da síntese dos compostos produzidos por cianobactérias. Com isto, as ferramentas OMIC mostraram ser eficazes para o desenvolvimento deste estudo, fornecendo uma abordagem detalhada na procura destes compostos. Cada etapa foi essencial, pois, possibilitou a identificação dos BGCs e a análise dos compostos produzidos, o que foi fundamental para a obtenção de resultados robustos e confiáveis.

Com base na análise genómica, observou-se uma semelhança entre os genes das estirpes Aphanizomenonaceae BACA0025, BACA0031, BACA0109, *Pseudoaliinostoc* sp. BACA0057, *Neowestiellopsis persica* BACA0089, *Purpureonostoc* sp. BACA0751 e *Dulcicalothrix* sp. BACA0344 e os BGCs descritos na literatura, sugerindo que estas estirpes podem ser capazes de produzir Aps.

Apesar de não se ter encontrado compostos com atividade anticoagulante como desejado por HR-ESI-LC-MS/MS, nem inibição significativa de TAFIa nos extratos, este estudo mostrou que as estirpes *Pseudoaliinostoc* sp. BACA0057 e *Purpureonostoc* sp. BACA0751 podem ser putativamente produtoras de Mp 1120, que a estirpe Aphanizomenonaceae BACA0025 é putativamente produtora Ap T e que a *Tolypothrix* cf. *helicophila* BACA0056 mostrou-se como sendo possível produtora de Mv A.

Embora as estirpes selecionadas não exibam aparentemente atividades anticoagulantes verificou-se a produção de compostos com atividade interessante como a Mv A e a Vc. A Mv A é um composto igualmente importante para a saúde, apesar de não ser eficaz no tratamento de trombooses, poderá ser implementada no uso de cosméticos contra a hiperpigmentação (Masum *et al.*, 2019; Briganti *et al.*, 2003) e, dada a atividade da tirosina na melanogénese, possivelmente, no tratamento contra o cancro da pele (Saud *et al.*, 2022). A Vc também possui várias atividades relacionadas com a saúde, ao nível da insulina, de patologias gástricas e na proliferação de células endoteliais (Lei *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2021; Jia & Liu, 2022; Xie *et al.*, 2015). Assim, apesar de não estar diretamente relacionada com a atividade anticoagulante pode de algum modo influenciar indiretamente casos de coagulação (Xie *et al.*, 2015; Bing *et al.*, 2024). Estes resultados novos e inesperados são igualmente importantes para a ciência.

Como já havia sido mencionado, a Ap T foi identificada apenas uma vez por Kodani *et al.* (1999) num *bloom* no lago Teganuma (Japão), não havendo disponível dados referentes ao taxa responsável pela síntese deste composto. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a estirpe Aphanizomenonaceae BACA0025 é putativamente produtora deste

composto. Apesar de esta estirpe não estar classificada quando ao género, o facto de se ter conhecimento de que pertence à família Aphanizomenonaceae é um ponto de partida para desencadear novos estudos que visem aprofundar o conhecimento sobre os géneros produtores deste composto e as suas potenciais atividades. Além disto, ampliou-se o leque de compostos produzidos por esta família, que anteriormente resumia-se apenas às Ap I e J (Murakami *et al.*, 2000).

As estirpes *Purpureonostoc* sp. BACA0751 e *Pseudoaliinostoc* sp. BACA0057 aparentam ter capacidade de produzir Mp 1120, que, até então, estava limitada ao género *Microcystis* (Okino *et al.*, 1993; Harada, 2004; Nishizawa *et al.*, 2011). Embora estas estirpes não tenham apresentado resultados positivos na cromatografia em relação às Mvs, o seu *cluster* biossintético apresentou semelhanças com os de referência, o que sugere que possam ser potenciais produtoras de Mv, assim como de Mp.

O resultado da estirpe *Tolypothrix* cf. *helicophila* BACA0056 também foi inesperado, uma vez que o género *Tolypothrix* não se encontra descrito na bibliografia como produtor de Mv. O mesmo se aplica à Vc, identificada nas estirpes Aphanizomenonaceae BACA0025 e Aphanizomenonaceae BACA0031, pois não se esperava o surgimento deste composto. Além disso, como mencionado anteriormente, não foram encontrados estudos que indicassem a produção de Vc por cianobactérias ou outro organismo, exceto pela *Vaccaria segetalis*, sendo estes dados relevantes para fortalecer o conhecimento a respeito destes microrganismos e dos seus compostos.

5.2 Perspetivas futuras

Inicialmente, o estudo consistia na pesquisa de estirpes produtoras de Aps e na sua atividade antitrombótica. Contudo, após a análise dos resultados obtidos no *AntiSMASH*, verificou-se a produção de outros compostos com atividade anticoagulante, tendo sido relevante a sua incorporação neste trabalho. Esta alteração explica a razão pela qual não foram selecionadas estirpes referentes a outros géneros produtores de Mvs e Mps, como *Anabaena*, *Nodularia* e *Microcystis*, aquando da seleção das estirpes. Assim, em futuras pesquisas seria interessante confirmar se as estirpes pertencentes a estes géneros produzem Mvs e/ou Mps.

Verificaram-se algumas discrepâncias obtidas entre os dados da análise genómica e da análise metabolómica. Esta diferença poderá estar relacionada com a inativação dos BGCs, isto é, mesmo estando presente, ele pode não estar a ser expresso devido às condições ambientais em que a estirpe foi analisada, sendo necessárias outras condições (e.g. *stress*) para ativar estes genes (Kłodawska *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2022). Deste modo, seria interessante um estudo no qual se efetuasse alterações ao nível das condições de produção

para verificar se alguma condição é responsável por induzir a síntese dos compostos de interesse.

Um dos fatores que também poderá implicar o enviesamento dos resultados é o facto da extração dos compostos ter sido feita apenas da biomassa das estirpes, tendo sido descartado o meio onde estas se encontravam. O exometaboloma, consiste no conjunto de metabolitos secundários excretados que passam a estar no meio de produção (Wienhausen, *et al.*, 2017). Uma vez que neste trabalho se analisou apenas a biomassa, alguns compostos poderão ter sido eliminados no processamento da biomassa, não tendo sido avaliados. Assim, no futuro seria relevante fazer a pesquisa dos compostos não apenas na biomassa, como também no exometaboloma.

Considerando a diversidade taxonómica das estirpes presentes na coleção do BACA poderá ainda existir muitos compostos por identificar nestas estirpes, podendo estes estarem associados a diversas aplicabilidades na saúde pública. Assim, é essencial continuar esta procura na tentativa de aumentar o conhecimento a respeito destes microrganismos e da atividade dos seus compostos. Deste modo, está-se a contribuir para o aumento do leque de metabolitos secundários com atividades revelantes para a síntese de fármacos.

6. Bibliografia

- Abshire, T. C., & Jobe, S. M. (2009). Overview of the Coagulation System. In *Transfusion Medicine and Hemostasis* (pp. 431-438). Academic Press.
- Abu-Izneid, T., Abbas, M., Watson, D. G., Shah, Y., Shah, S. I., & Khuda, F. (2023). Estimation of dihydroartemisinin in human plasma using a highly sensitive LTQ Orbitrap mass spectrometer with Xcalibur software. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1157604.
- Aceña, J., Stampachiachiere, S., Pérez, S., & Barceló, D. (2015). Advances in liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry for quantitative and qualitative environmental analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407, 6289-6299.
- Adams, D. G., Carr, N. G., & Wilcox, M. (1981). The developmental biology of heterocyst and akinete formation in cyanobacteria. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 9(1), 45-100.
- Adams, D. G., Duggan, P. S. (1999). Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.* 144:3–33.
- Ahmadjian, V. (1965). Lichens. *Annual Reviews in Microbiology*, 19(1), 1-20.
- Ahmed, M. N., Reyna-Gonzalez, E., Schmid, B., Wiebach, V., Süßmuth, R. D., Dittmann, E., & Fewer, D. P. (2017). Phylogenomic analysis of the microviridin biosynthetic pathway coupled with targeted chemo-enzymatic synthesis yields potent protease inhibitors. *ACS chemical biology*, 12(6), 1538-1546.
- Alkarithi, G., Duval, C., Shi, Y., Macrae, F. L., & Ariëns, R. A. (2021). Thrombus structural composition in cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 41(9), 2370-2383.
- Alneberg, J., Bjarnason, B. S., De Bruijn, I., Schirmer, M., Quick, J., Ijaz, U. Z. & Quince, C. (2014). Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature methods*, 11(11), 1144-1146.
- Amaral, S. C., Monteiro, P. R., Neto, J. D. S. P., Serra, G. M., Gonçalves, E. C., Xavier, L. P., & Santos, A. V. (2021). Current knowledge on microviridin from cyanobacteria. *Marine drugs*, 19(1), 17.
- Amaral, S. C., Xavier, L. P., Vasconcelos, V., & Santos, A. V. (2023). Cyanobacteria: a promising source of antifungal metabolites. *Marine Drugs*, 21(6), 359.
- Amin, N., Jaiswal, M., & Kannaujiya, V. K. (2024). Effects of temperature on morphology, physiology, and metabolic profile of diazotrophic cyanobacteria inhabiting diverse habitats. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109186.
- Amitrano, L., Guardascione, M. A., Brancaccio, V., & Balzano, A. (2002). Coagulation disorders in liver disease. In *Seminars in liver disease* (Vol. 22, No. 01, pp. 083-096).

Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, EUA.

- Anas, A. R. J., Mori, A., Tone, M., Naruse, C., Nakajima, A., Asukabe, H. & Harada, K. I. (2017). FVIIa-sTF and thrombin inhibitory activities of compounds isolated from *Microcystis aeruginosa* K-139. *Marine Drugs*, 15(9), 275.
- Auld, D. S., & Vallee, B. (1987). Carboxypeptidase A. In *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 16, pp. 201-255). Elsevier.
- Badger, M. R., & Price, G. D. (2003). CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of experimental botany*, 54(383), 609- 622.
- Bender, M. L., Killheffer, J. V., & Cohen, S. (1973). Chymotrypsin. *CRC critical reviews in biochemistry*, 1(2), 149-199.
- Bentounes, N. K., Melicine, S., Martin, A. C., Smadja, D. M., & Gendron, N. (2023). Development of new anticoagulant in 2023: ePrime time for anti-factor XI and XIa inhibitors. *JMV-Journal de Médecine Vasculaire*.
- Beurskens, D. M., Huckriede, J. P., Schrijver, R., Hemker, H. C., Reutelingsperger, C. P., & Nicolaes, G. A. (2020). The anticoagulant and nonanticoagulant properties of heparin. *Thrombosis and haemostasis*, 120(10), 1371-1383.
- Bing, Y., Sun, Z., Wu, S., Zheng, Y., Xi, Y., Li, W. & Qu, Z. (2024). Discovery and verification of Q-markers for promoting blood circulation and removing stasis of raw and wine-steamed *Vaccaria segetalis* based on pharmacological evaluation combined with chemometrics. *Journal of Ethnopharmacology*, 319, 117120.
- Björk, I., & Lindahl, U. (1982). Mechanism of the anticoagulant action of heparin. *Molecular and cellular biochemistry*, 48, 161-182.
- Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M. & Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic acids research*, 51(W1), W46-W50.
- Boon, G. D. (1993). An overview of hemostasis. *Toxicologic pathology*, 21(2), 170-179.
- Bösch, N. M., Borsa, M., Greczmiel, U., Morinaka, B. I., Gugger, M., Oxenius, A. & Piel, J. (2020). Landornamides: antiviral ornithine-containing ribosomal peptides discovered through genome mining. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(29), 11763-11768.
- Briganti, S., Camera, E., & Picardo, M. (2003). Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment cell research*, 16(2), 101-110.
- Broze, G. J. (1982). Binding of human factor VII and VIIa to monocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 70(3), 526-535.

- Cai, W., Matthew, S., Chen, Q. Y., Paul, V. J., & Luesch, H. (2018). Discovery of new A- and B-type laxaphycins with synergistic anticancer activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *26*(9), 2310-2319.
- Cao, L., Guler, M., Tagirdzhanov, A., Lee, Y. Y., Gurevich, A., & Mohimani, H. (2021). MolDiscovery: Learning mass spectrometry fragmentation of small molecules. *Nature communications*, *12*(1), 3718.
- Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of applied bacteriology*, *72*(6), 445-459.
- Carroll, A. R., Coll, J. C., Bourne, D. J., MacLeod, J. K., Zabriskie, T. M., Ireland, C. M., & Bowden, B. F. (1996). Patellins 1-6 and trunkamide A: Novel cyclic hexa-, hepta- and octa-peptides from colonial ascidians, *Lissoclinum* sp. *Australian journal of chemistry*, *49*(6), 659-667.
- Cepas, V., Gutiérrez-Del-Río, I., López, Y., Redondo-Blanco, S., Gabasa, Y., Iglesias, M. J. & Soto, S. M. (2021). Microalgae and cyanobacteria strains as producers of lipids with antibacterial and antibiofilm activity. *Marine drugs*, *19*(12), 675.
- Chaïb, S., Pistevos, J. C., Bertrand, C., & Bonnard, I. (2021). Allelopathy and allelochemicals from microalgae: An innovative source for bio-herbicidal compounds and biocontrol research. *Algal Research*, *54*, 102213.
- Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S. & Mallick, P. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature biotechnology*, *30*(10), 918-920.
- Chen, S. (2023). Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *Imeta*, *2*(2), e107.
- Chittora, D., Meena, M., Barupal, T., Swapnil, P., & Sharma, K. (2020). Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture. *Biochemistry and biophysics reports*, *22*, 100737.
- Chklovski, A., Parks, D. H., Woodcroft, B. J., & Tyson, G. W. (2023). CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. *Nature Methods*, *20*(8), 1203-1212.
- Chorus, I. & Bartram, J. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. World Health Organization Report, London
- Chorus, I., & Welker, M. (2021). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management (p. 858). Taylor & Francis.
- Chuljerm, H., Deeudom, M., Fucharoen, S., Mazzacuva, F., Hider, R. C., Srichairatanakool, S., & Cilibrizzi, A. (2020). Characterization of two siderophores produced by *Bacillus megaterium*: A preliminary investigation into their potential as therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1864*(10), 129670.

- Ciferri, O. (1983). Spirulina, the edible microorganism. *Microbiological reviews*, 47(4), 551-578.
- Codd, G.A. (1995). Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Sci. Technol.* 32, 149 – 156.
- Cooper, B., & Yang, R. (2024). An assessment of AcquireX and Compound Discoverer software 3.3 for non-targeted metabolomics. *Scientific Reports*, 14(1), 4841.
- Cordeiro, R., Azevedo, J., Luz, R., Vasconcelos, V., Gonçalves, V., & Fonseca, A. (2021). Cyanotoxin Screening in BACA Culture Collection: Identification of New Cylindrospermopsin Producing Cyanobacteria. *Toxins*, 13, 258. <https://doi.org/10.3390/toxins13040258>
- Cordeiro, R., Luz, R., Lage, S., Menezes, C., Dias, E., Flores, C. & Gonçalves, V. (2024). Metabolomic and taxonomic characterization of Haloleptolyngbya lusitanica sp. nov.(Cyanobacteria, Synechococcales). *Phycologia*, 63(2), 225-234.
- Cordeiro, R., Luz, R., Vasconcelos, V., Fonseca, A., & Gonçalves, V. (2020a). A critical review of cyanobacteria distribution and cyanotoxins occurrence in Atlantic Ocean islands. *Cryptogamie, Algologie*, 41(9), 73-89.
- Cordeiro, R., Luz, R., Vasconcelos, V., Gonçalves, V., & Fonseca, A. (2020b). Cyanobacteria phylogenetic studies reveal evidence for polyphyletic genera from thermal and freshwater habitats. *Diversity*, 12(8), 298.
- Costa, E., Amaro, H. M., Melo, T., Guedes, A. C., & Domingues, M. R. (2020). Screening for polar lipids, antioxidant, and anti-inflammatory activities of Gloeotheca sp. lipid extracts pursuing new phytochemicals from cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, 32, 3015-3030.
- Dabravolski, S. A., & Isayenkov, S. V. (2022). Metabolites facilitating adaptation of desert cyanobacteria to extremely arid environments. *Plants*, 11(23), 3225.
- Dangi, A., Pande, B., Agrawal, S., Sarkar, D., Vamkudoth, K. R., & Marelli, U. K. (2023). Total synthesis, structure elucidation and expanded bioactivity of icosalide A: effect of lipophilicity and ester to amide substitution on its bioactivity. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 21(28), 5725-5731.
- Davie, E. W., Fujikawa, K., & Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, 30(43), 10363-10370.
- Díez, B., Bergman, B., El-Shehawy, R. (2008) Marine diazotrophic cyanobacteria: out of the blue. *Plant Biotechnol* 25:221–225.
- Dokulil, M.T. & Teubner, K. (2000). Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438, 1-12.
- Drews, G., & Weckesser, J. (1982). Function, structure and composition of cell walls and external layers. *The biology of cyanobacteria*, 19, 333-359.

- Dubey, S. K., Dubey, J., Mehra, S., Tiwari, P., & Bishwas, A. J. (2011). Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. *African journal of Biotechnology*, *10*(7), 1125-1132.
- El-Naggar, N. E. A., Hussein, M. H., & El-Sawah, A. A. (2017). Bio-fabrication of silver nanoparticles by phycocyanin, characterization, in vitro anticancer activity against breast cancer cell line and in vivo cytotoxicity. *Scientific reports*, *7*(1), 10844.
- Elyamany, G., Alzahrani, A. M., & Bukhary, E. (2014). Cancer-associated thrombosis: an overview. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, *8*, CMO-S18991.
- Erhard, M., von Döhren, H., & Jungblut, P. R. (1999). Rapid identification of the new anabaenopeptin G from *Planktothrix agardhii* HUB 011 using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *13*(5), 337-343.
- Ersmark, K., Del Valle, J. R., & Hanessian, S. (2008). Chemistry and biology of the aeruginosin family of serine protease inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*, *47*(7), 1202-1223.
- Ferreira, L., Morais, J., Preto, M., Silva, R., Urbatzka, R., Vasconcelos, V., & Reis, M. (2021). Uncovering the bioactive potential of a cyanobacterial natural products library aided by untargeted metabolomics. *Marine Drugs*, *19*(11), 633.
- Fidor, A., Konkel, R., & Mazur-Marzec, H. (2019). Bioactive peptides produced by cyanobacteria of the genus *Nostoc*: A review. *Marine drugs*, *17*(10), 561.
- Frazzini, S., Scaglia, E., Dell'Anno, M., Reggi, S., Panseri, S., Giromini, C. & Rossi, L. (2022). Antioxidant and antimicrobial activity of algal and cyanobacterial extracts: An in vitro study. *Antioxidants*, *11*(5), 992.
- Fujii, K., Sivonen, K., Naganawa, E., & Harada, K. I. (2000). Non-toxic peptides from toxic cyanobacteria, *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron*, *56*(5), 725-733.
- Gademann, K., & Portmann, C. (2008). Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. *Current Organic Chemistry*, *12*(4), 326-341.
- Gademann, K., Portmann, C., Blom, J. F., Zeder, M., & Jüttner, F. (2010). Multiple toxin production in the cyanobacterium *Microcystis*: Isolation of the toxic protease inhibitor cyanopeptolin 1020. *Journal of natural products*, *73*(5), 980-984.
- Gavriilidou, A., Mackenzie, T. A., Sánchez, P., Tormo, J. R., Ingham, C., Smidt, H., & Sipkema, D. (2021). Bioactivity screening and gene-trait matching across marine sponge-associated bacteria. *Marine drugs*, *19*(2), 75.
- Giannotta, M., Tapete, G., Emmi, G., Silvestri, E., & Milla, M. (2015). Thrombosis in inflammatory bowel diseases: what's the link?. *Thrombosis Journal*, *13*, 1-9.
- Gilchrist, C. L., & Chooi, Y. H. (2021). Clinker & clustermap. js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics*, *37*(16), 2473-2475.

- Gil-Solsona, R., Rodriguez-Mozaz, S., Díaz-Cruz, M. S., Sunyer-Caldú, A., Luarte, T., Höfer, J. & Gago-Ferrero, P. (2021). A protocol for wide-scope non-target analysis of contaminants in small amounts of biota using bead beating tissue lyser extraction and LC-HRMS. *MethodsX*, *8*, 101193.
- Girma, J. P., Meyer, D., Verweij, C. L., Pannekoek, H., & Sixma, J. J. (1987). Structure-function relationship of human von Willebrand factor. *Blood*, *70*(3), 605-611.
- Gkelis, S., Panou, M., Konstantinou, D., Apostolidis, P., Kasampali, A., Papadimitriou, S. & Arsenakis, M. (2019). Diversity, cyanotoxin production, and bioactivities of cyanobacteria isolated from freshwaters of Greece. *Toxins*, *11*(8), 436.
- Goldsack, N. R., Chambers, R. C., Dabbagh, K., & Laurent, G. J. (1998). Molecules in focus thrombin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *30*(6), 641-646.
- Golubic, S., Sergeev, V. N., & Knoll, A. H. (1995). Mesoproterozoic Archaeoellipsoides: akinetes of heterocystous cyanobacteria. *Lethaia*, *28*(4), 285-298.
- Gómez, P. I., Mayorga, J., Flaig, D., Castro-Varela, P., Jaupi, A., Ulloa, P. A. & Rojas, V. (2023). Looking beyond *Arthrospira*: comparison of antioxidant and anti-inflammatory properties of ten cyanobacteria strains. *Algal Research*, *74*, 103182.
- Gomez-Chiarri, M., Guo, X., Tanguy, A., He, Y., & Proestou, D. (2015). The use of-omic tools in the study of disease processes in marine bivalve mollusks. *Journal of invertebrate pathology*, *131*, 137-154.
- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J. & Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids research*, *36*(10), 3420-3435.
- Griffin, J. H., Fernandez, J. A., Gale, A. J., & Mosnier, L. O. (2007). Activated protein C. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *5*, 73-80.
- Guerra, V., Beule, L., Lehtsaar, E., Liao, H. L., & Karlovsky, P. (2020). Improved protocol for DNA extraction from subsoils using phosphate lysis buffer. *Microorganisms*, *8*(4), 532.
- Guo, W., Wang, H., & Li, C. (2021). Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, *6*(1), 424.
- Halary, S., Duperron, S., Kim Tiam, S., Duval, C., Bernard, C., & Marie, B. (2023). Intra-population genomic diversity of the bloom-forming cyanobacterium, *Aphanizomenon gracile*, at low spatial scale. *ISME communications*, *3*(1), 57.
- Halland, N., Brönstrup, M., Czech, J., Czechtizky, W., Evers, A., Follmann, M. & Kallus, C. (2015). Novel small molecule inhibitors of activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa) from natural product anabaenopeptin. *Journal of Medicinal Chemistry*, *58*(11), 4839-4844.
- Harada, K. I., Fujii, K., Shimada, T., Suzuki, M., Sano, H., Adachi, K., & Carmichael, W. W. (1995). Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds

- from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Tetrahedron letters*, *36*(9), 1511-1514.
- Harada, K. I., Nakano, T., Fujii, K., & Shirai, M. (2004). Comprehensive analysis system using liquid chromatography–mass spectrometry for the biosynthetic study of peptides produced by cyanobacteria. *Journal of Chromatography A*, *1033*(1), 107-113.
- Heikrujam, J., Kishor, R., & Mazumder, P. B. (2020). The chemistry behind plant DNA isolation protocols. *Biochemical analysis tools-Methods for bio-molecules studies*, 131-142.
- Heit, J. A. (2015). Epidemiology of venous thromboembolism. *Nature Reviews Cardiology*, *12*(8), 464-474.
- Henke, P. K., Kahn, S. R., Pannucci, C. J., Secemsky, E. A., Evans, N. S., Khorana, A. A. & American Heart Association Advocacy Coordinating Committee. (2020). Call to action to prevent venous thromboembolism in hospitalized patients: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*, *141*(24), e914-e931.
- Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J. A., & Ibañez, E. (2013). Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *43*, 67-83.
- Hosoda, T., & Orikasa, H. (2022). A fatal case of extensive gastrointestinal necrosis due to portal and mesenteric vein thrombosis in the post-acute phase of COVID-19. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *28*(1), 108-111.
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, *82*(11), 801-811.
- Iba, T., Umemura, Y., Wada, H., & Levy, J. H. (2021). Roles of coagulation abnormalities and microthrombosis in sepsis: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Archives of Medical Research*, *52*(8), 788-797.
- Isaacs, J. D., Strangman, W. K., Barbera, A. E., Mallin, M. A., McIver, M. R., & Wright, J. L. (2014). Microcystins and two new micropeptin cyanopeptides produced by unprecedented *Microcystis aeruginosa* blooms in North Carolina's Cape Fear River. *Harmful Algae*, *31*, 82-86.
- Ishida, K., Matsuda, H., & Murakami, M. (1998). Micropeptins 88-A to 88-F, chymotrypsin inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (NIES-88). *Tetrahedron*, *54*(21), 5545-5556.
- Ishitsuka, M. O., Kusumi, T., Kakisawa, H., Kaya, K., & Watanabe, M. M. (1990). Microviridin. A novel tricyclic depsipeptide from the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis*. *Journal of the American Chemical Society*, *112*(22), 8180-8182.

- Ito, T., Thachil, J., Asakura, H., Levy, J. H., & Iba, T. (2019). Thrombomodulin in disseminated intravascular coagulation and other critical conditions—a multi-faceted anticoagulant protein with therapeutic potential. *Critical Care*, *23*, 1-11.
- Itou, Y., Suzuki, S., Ishida, K., & Murakami, M. (1999). Anabaenopeptins G and H, potent carboxypeptidase A inhibitors from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-595). *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *9*(9), 1243-1246.
- Janssen, E. M. L. (2019). Cyanobacterial peptides beyond microcystins—A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Research*, *151*, 488-499.
- Jeong, Y., Cho, S. H., Lee, H., Choi, H. K., Kim, D. M., Lee, C. G. & Cho, B. K. (2020). Current status and future strategies to increase secondary metabolite production from cyanobacteria. *Microorganisms*, *8*(12), 1849.
- Ji, X., Verspagen, J. M., Van de Waal, D. B., Rost, B., & Huisman, J. (2020). Phenotypic plasticity of carbon fixation stimulates cyanobacterial blooms at elevated CO₂. *Science Advances*, *6*(8), eaax2926.
- Jia, X., & Liu, W. (2022). Vaccarin improves insulin sensitivity and glucose uptake in diet-induced obese mice via activation of GPR120-PI3K/AKT/GLUT4 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *634*, 189-195.
- Jones, M. R., Pinto, E., Torres, M. A., Dörr, F., Mazur-Marzec, H., Szubert, K., ... & Janssen, E. M. L. (2021). CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. *Water Research*, *196*, 117017.
- Kårlund, A., Paukkonen, I., Gómez-Gallego, C., & Kolehmainen, M. (2021, August). Intestinal exposure to food-derived protease inhibitors: digestion physiology-and gut health-related effects. In *Healthcare* (Vol. 9, No. 8, p. 1002). MDPI.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, *30*(4), 772-780.
- Kim, T. K. (2017). Understanding one-way ANOVA using conceptual figures. *Korean journal of anesthesiology*, *70*(1), 22-26.
- Kłodawska, K., Bujas, A., Tuross-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.
- Kodani, S., Suzuki, S., Ishida, K., & Murakami, M. (1999). Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of lake Teganuma (Japan). *FEMS microbiology letters*, *178*(2), 343-348.
- Körner, A., & Pawelek, J. (1982). Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*, *217*(4565), 1163-1165.

- Kujawinski, E. B., Braakman, R., Longnecker, K., Becker, J. W., Chisholm, S. W., Dooley, K., ... & Halloran, K. (2023). Metabolite diversity among representatives of divergent *Prochlorococcus* ecotypes. *Msystems*, *8*(5), e01261-22.
- Kurmayer, R., & Christiansen, G. (2009). The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. *Freshwater reviews*, *2*(1), 31-50
- Labby, K. J., Watsula, S. G., & Garneau-Tsodikova, S. (2015). Interrupted adenylation domains: unique bifunctional enzymes involved in nonribosomal peptide biosynthesis. *Natural product reports*, *32*(5), 641-653.
- Lange, J., Demir, F., Huesgen, P. F., Baumann, U., von Elert, E., & Pichlo, C. (2018). Heterologous expression and characterization of a novel serine protease from *Daphnia magna*: A possible role in susceptibility to toxic cyanobacteria. *Aquatic toxicology*, *205*, 140-147.
- Leão, T., Wang, M., Moss, N., da Silva, R., Sanders, J., Nurk, S. & Gerwick, L. (2021). A multi-omics characterization of the natural product potential of tropical filamentous marine cyanobacteria. *Marine drugs*, *19*(1), 20.
- Lee, C. J., & Ansell, J. E. (2011). Direct thrombin inhibitors. *British journal of clinical pharmacology*, *72*(4), 581-592.
- Lei, Y., Gong, L., Tan, F., Liu, Y., Li, S., Shen, H., ... & Sun, H. (2019). Vaccarin ameliorates insulin resistance and steatosis by activating the AMPK signaling pathway. *European journal of pharmacology*, *851*, 13-24.
- Letko, G., Falkenberg, B., & Wilhelm, W. (1989). Effects of trypsin, chymotrypsin, and uncoupling on survival of isolated acinar cells from rat pancreas. *International journal of pancreatology*, *4*, 431-441.
- Levy, J. H., Sniecinski, R. M., Welsby, I. J., & Levi, M. (2016). Antithrombin: anti-inflammatory properties and clinical applications. *Thrombosis and haemostasis*, *115*(04), 712-728.
- Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, *34*(18), 3094-3100.
- Li, H. (2021). New strategies to improve minimap2 alignment accuracy. *Bioinformatics*, *37*(23), 4572-4574.
- Lima, A. D. M., Siqueira, A. S., Möller, M. L. S., Souza, R. C. D., Cruz, J. N., Lima, A. R. J., & Gonçalves, E. C. (2022). In silico improvement of the cyanobacterial lectin microvirin and mannose interaction. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *40*(3), 1064-1073.
- Logesh, R., Prasad, S. R., Chipurupalli, S., Robinson, N., & Mohankumar, S. K. (2023). Natural tyrosinase enzyme inhibitors: A path from melanin to melanoma and its reported pharmacological activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 188968.

- Loghmani, H., & Conway, E. M. (2018). Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *132*(2), 148-158.
- Lorenzi, A. S., Bonatelli, M. L., Varani, A. M., Quecine, M. C., & Bittencourt-Oliveira, M. D. C. (2022). Draft genome sequence of the cyanobacterium *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* BCCUSP55 from the Brazilian semiarid region reveals potential for anti-cancer applications. *Archives of Microbiology*, *204*, 1-7.
- Luz, R., Cordeiro, R., Gonçalves, V., Vasconcelos, V., & Urbatzka, R. (2024b). Screening of Lipid-Reducing Activity and Cytotoxicity of the Exometabolome from Cyanobacteria. *Marine Drugs*, *22*(9), 412.
- Luz, R., Cordeiro, R., Kaštovský, J., Fonseca, A., Urbatzka, R., Vasconcelos, V., & Gonçalves, V. (2023). Description of *Pseudocalidococcus azoricus* gen. sp. nov. (Thermosynechococaceae, Cyanobacteria), a Rare but Widely Distributed Coccoid Cyanobacteria. *Diversity*, *15*(12), 1157.
- Luz, R., Gonçalves, V., Vasconcelos, V., & Urbatzka, R. (2024a). Metabolite profiling and bioactivity assessment of cyanobacteria from the Azores reveals unique producers of cytotoxic and lipid reducing compounds. *Algal Research*, 103703.
- Mackman, N. (2009). The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesthesia & Analgesia*, *108*(5), 1447-1452.
- Maddodi, N., & Setaluri, V. (2008). Role of UV in cutaneous melanoma. *Photochemistry and photobiology*, *84*(2), 528-536.
- Mankiewicz, J., Tarczynska, M., Walter, Z. & Zalewski, M. (2003) Natural toxins from cyanobacteria. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 45, 9–20.
- Mankiewicz-Boczek, J., Karwaciak, I., Ratajewski, M., Gaęała, I., Jurczak, T., Zalewski, M., & Pułaski, Ł. (2015). Application of cellular biosensors for detection of atypical toxic bioactivity in microcystin-containing cyanobacterial extracts. *Aquatic Toxicology*, *168*, 1-10.
- Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., Simão, F. A., & Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO update: novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes. *Molecular biology and evolution*, *38*(10), 4647-4654.
- Markwell, S. M., Ross, J. L., Olson, C. L., & Brat, D. J. (2022). Necrotic reshaping of the glioma microenvironment drives disease progression. *Acta Neuropathologica*, *143*(3), 291-310.
- Martins, J., & Vasconcelos, V. (2015). Cyanobactins from cyanobacteria: Current genetic and chemical state of knowledge. *Marine Drugs*, *13*(11), 6910-6946.

- Masum, M. N., Yamauchi, K., & Mitsunaga, T. (2019). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources as skin-lightening agents. *Reviews in Agricultural Science*, *7*, 41-58.
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., & Sugiyama, M. (2006). Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(13), 8981-8990.
- May, D. S., Crnkovic, C. M., Krunic, A., Wilson, T. A., Fuchs, J. R., & Orjala, J. E. (2020). ¹⁵N stable isotope labeling and comparative metabolomics facilitates genome mining in cultured cyanobacteria. *ACS chemical biology*, *15*(3), 758-765.
- Mayer, A. M., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G., & Fusetani, N. (2011). Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *153*(2), 191-222.
- McMichael, M. (2012). New models of hemostasis. *Topics in companion animal medicine*, *27*(2), 40-45.
- Medema, M. H., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J. B., Blin, K. & Zhang, C. (2015). Minimum information about a biosynthetic gene cluster. *Nature chemical biology*, *11*(9), 625-631.
- Mehdizadeh Allaf, M., & Peerhossaini, H. (2022). Cyanobacteria: model microorganisms and beyond. *Microorganisms*, *10*(4), 696.
- Minors, D. S. (2007). Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesthesia & intensive care medicine*, *8*(5), 214-216.
- Miranda-Vilela, A. L. (2012). Role of polymorphisms in factor V (FV Leiden), prothrombin, plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and cystathionine β -synthase (CBS) genes as risk factors for thrombophilias. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *12*(10), 997-1006.
- Miyamoto, E., Tanioka, Y., Nakao, T., Barla, F., Inui, H., Fujita, T. & Nakano, Y. (2006). Purification and characterization of a corrinoid-compound in an edible cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* as a nutritional supplementary food. *Journal of agricultural and food chemistry*, *54*(25), 9604-9607.
- Monteiro, P. R., do Amaral, S. C., Siqueira, A. S., Xavier, L. P., & Santos, A. V. (2021). Anabaenopeptins: What we know so far. *Toxins*, *13*(8), 522.
- Moti, T. B., Guyassa, C., Dima, C., & Home, M. R. I. (2022). Illumina sequencing technology review. *image*, *10*(3).

- Mousavian, Z., Safavi, M., Azizmohseni, F., Hadizadeh, M., & Mirdamadi, S. (2022). Characterization, antioxidant and anticoagulant properties of exopolysaccharide from marine microalgae. *AMB Express*, *12*(1), 27.
- Mühling, M., Somerfield, P. J., Harris, N., Belay, A., & Whitton, B. A. (2006). Phenotypic analysis of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains (cyanobacteria). *Phycologia*, *45*(2), 148-157.
- Murakami, M., Suzuki, S., Itou, Y., Kodani, S., & Ishida, K. (2000). New anabaenopeptins, potent carboxypeptidase-A inhibitors from the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of natural products*, *63*(9), 1280-1282.
- Murgasova, R., & Hercules, D. M. (2002). Polymer characterization by combining liquid chromatography with MALDI and ESI mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *373*, 481-489.
- Nakaune, R., & Nakano, M. (2006). Efficient methods for sample processing and cDNA synthesis by RT-PCR for the detection of grapevine viruses and viroids. *Journal of Virological Methods*, *134*(1-2), 244-249.
- Namikoshi, M., & Rinehart, K. L. (1996). Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, *17*, 373-384.
- Nandagopal, P., Steven, A. N., Chan, L. W., Rahmat, Z., Jamaluddin, H., & Mohd Noh, N. I. (2021). Bioactive metabolites produced by cyanobacteria for growth adaptation and their pharmacological properties. *Biology*, *10*(10), 1061.
- Natumi, R., & Janssen, E. M. L. (2020). Cyanopeptide co-production dynamics beyond microcystins and effects of growth stages and nutrient availability. *Environmental science & technology*, *54*(10), 6063-6072.
- Nesterov, A., Zhao, J., & Jia, Q. (2008). Natural tyrosinase inhibitors for skin hyperpigmentation. *Drugs of the Future*, *33*(11), 945-954.
- Nishizawa, A., Arshad, A. B., Nishizawa, T., Asayama, M., Fujii, K., Nakano, T. & Shirai, M. (2007). Cloning and characterization of a new hetero-gene cluster of nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* K-139. *The Journal of general and applied microbiology*, *53*(1), 17-27.
- Nishizawa, T., Ueda, A., Nakano, T., Nishizawa, A., Miura, T., Asayama, M. & Shirai, M. (2011). Characterization of the locus of genes encoding enzymes producing heptadepsipeptide micropeptin in the unicellular cyanobacterium *Microcystis*. *The journal of biochemistry*, *149*(4), 475-485.
- Niveshika, Verma, E., Maurya, S. K., Mishra, R., & Mishra, A. K. (2017). The combined use of in silico, in vitro, and in vivo analyses to assess anti-cancerous potential of a bioactive compound from Cyanobacterium *Nostoc* sp. MGL001. *Frontiers in Pharmacology*, *8*, 873.

- Nothias, L. F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., ... & Dorrestein, P. C. (2020). Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature methods*, *17*(9), 905-908.
- Nowruzi, B., Hutárová, L., Absalón, I. B., & Liu, L. (2022). A new strain of *Neowestiellopsis* (Hapalosiphonaceae): first observation of toxic soil cyanobacteria from agricultural fields in Iran. *BMC microbiology*, *22*(1), 107.
- Nunnery, J. K., Mevers, E., & Gerwick, W. H. (2010). Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, *21*(6), 787-793.
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome research*, *27*(5), 824-834.
- Okino, T., Matsuda, H., Murakami, M., & Yamaguchi, K. (1995). New microviridins, elastase inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*, *51*(39), 10679-10686.
- Okino, T., Murakami, M., Haraguchi, R., Munekata, H., Matsuda, H., & Yamaguchi, K. (1993). Micropeptins A and B, plasmin and trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron letters*, *34*(50), 8131-8134.
- Olivera, P. A., Zuily, S., Kotze, P. G., Regnault, V., Al Awadhi, S., Bossuyt, P. & Peyrin-Biroulet, L. (2021). International consensus on the prevention of venous and arterial thrombotic events in patients with inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *18*(12), 857-873.
- Paço, A., Gonçalves, M. F., da Costa, J. P., Rocha-Santos, T. A., & Alves, A. (2023). Draft Genome Sequence of *Zalerion maritima* ATCC 34329, a (Micro) Plastic-Degrading Marine Fungus. *Microbiology Resource Announcements*, *12*(4), e00017-23.
- Paerl, H. W. (1996). Microscale physiological and ecological studies of aquatic cyanobacteria: macroscale implications. *Microscopy research and technique*, *33*(1), 47-72.
- Parihar, R. D., Dhiman, U., Bhushan, A., Gupta, P. K., & Gupta, P. (2022). Heterorhabdites and *Photorhabdus* symbiosis: A natural mine of bioactive compounds. *Frontiers in microbiology*, *13*, 790339.
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, *25*(7), 1043-1055.
- Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E., & Madamwar, D. (2011). Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresource technology*, *102*(22), 10163-10172.

- Philmus, B., Christiansen, G., Yoshida, W. Y., & Hemscheidt, T. K. (2008). Post-translational modification in microviridin biosynthesis. *ChemBioChem*, *9*(18), 3066-3073.
- Piato, A., & Graebin, C. S. (2020). Natural Products and Semi Synthetic Compounds as Antithrombotics: A Review of the Last Ten Years (2009- 2019). *Frontiers in Cardiovascular Drug Discovery: Volume 5*, *5*, 65-107.
- Pillaiyar, T., Manickam, M., & Jung, S. H. (2017). Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cellular signalling*, *40*, 99-115.
- Poole, J. C. F., & French, J. E. (1961). Thrombosis. *Journal of Atherosclerosis Research*, *1*(4), 251-282.
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae– A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, *3*(4), 89-100.
- Quiocho, F. A., & Lipscomb, W. N. (1971). Carboxypeptidase A: a protein and an enzyme. *Advances in Protein Chemistry*, *25*, 1-78.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ganesan, V., & Carvalho, I. S. (2016). Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. *Critical reviews in microbiology*, *42*(3), 394-405.
- Rambaut, A. (2007) FigTree. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, *111*(1), 1-61.
- Rodríguez-Sifuentes, L., Marszalek, J. E., Hernández-Carbajal, G., & Chuck-Hernández, C. (2021). Importance of downstream processing of natural astaxanthin for pharmaceutical application. *Frontiers in Chemical Engineering*, *2*, 601483.
- Roemisch, J., Gray, E., Hoffmann, J. N., & Wiedermann, C. J. (2002). Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood coagulation & fibrinolysis*, *13*(8), 657-670
- Rohrlack, T., & Utkilen, H. (2007). Effects of nutrient and light availability on production of bioactive anabaenopeptins and microviridin by the cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *Hydrobiologia*, *583*, 231-240.
- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Hansen, P. E., Zhang, W., Czarnecki, O., Henning, M. & Kaebernick, M. (2003). Isolation, characterization, and quantitative analysis of microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. *Journal of Chemical Ecology*, *29*, 1757-1770.
- Rojas, V., Rivas, L., Cárdenas, C., & Guzmán, F. (2020). Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as emerging sources of antibacterial peptides. *Molecules*, *25*(24), 5804.
- Rosendaal, F. R. (1999). Venous thrombosis: a multicausal disease. *The Lancet*, *353*(9159), 1167-1173.

- Rouhiainen, L., Jokela, J., Fewer, D. P., Urmann, M., & Sivonen, K. (2010). Two alternative starter modules for the non-ribosomal biosynthesis of specific anabaenopeptin variants in *Anabaena* (Cyanobacteria). *Chemistry & biology*, *17*(3), 265-273.
- Saad, M. H., El-Fakharany, E. M., Salem, M. S., & Sidkey, N. M. (2022). The use of cyanobacterial metabolites as natural medical and biotechnological tools. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *40*(6), 2828-2850.
- Sakharov, D. V., Plow, E. F., & Rijken, D. C. (1997). On the mechanism of the antifibrinolytic activity of plasma carboxypeptidase B. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(22), 14477-14482.
- SANG Medicine Ltd. (2022) *A PRACTICAL GUIDE TO HAEMOSTASIS: Fibrinolysis*. Available at: https://practical-haemostasis.com/Fibrinolysis/fibrinolysis_introduction.html.
- Sano, T., Usui, T., Ueda, K., Osada, H., & Kaya, K. (2001). Isolation of new protein phosphatase inhibitors from two cyanobacteria species, *Planktothrix* spp. *Journal of natural products*, *64*(8), 1052-1055.
- Sarmah, P., & Rout, J. (2020). Role of algae and cyanobacteria in bioremediation: prospects in polyethylene biodegradation. In *Advances in cyanobacterial biology* (pp. 333-349). Academic Press.
- Saud, A., Sagineedu, S. R., Ng, H. S., Stanslas, J., & Lim, J. C. W. (2022). Melanoma metastasis: What role does melanin play?. *Oncology Reports*, *48*(6), 217.
- Schadendorf, D., & Hauschild, A. (2014). Melanoma—the run of success continues. *Nature reviews Clinical oncology*, *11*(2), 75-76.
- Schreuder, H., Liesum, A., Lönze, P., Stump, H., Hoffmann, H., Schiell, M. & Brönstrup, M. (2016). Isolation, co-crystallization and structure-based characterization of anabaenopeptins as highly potent inhibitors of activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa). *Scientific Reports*, *6*(1), 32958.
- Schwarzenberger, A., Zitt, A., Kroth, P., Mueller, S., & Von Elert, E. (2010). Gene expression and activity of digestive proteases in *Daphnia*: effects of cyanobacterial protease inhibitors. *BMC physiology*, *10*, 1-15.
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial genomics*, *7*(11), 000685.
- Sena Brandine, G., & Smith, A. D. (2019). Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Research*, *8*.
- Shaker, B., Ahmad, S., Lee, J., Jung, C., & Na, D. (2021). In silico methods and tools for drug discovery. *Computers in biology and medicine*, *137*, 104851.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D. & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, *13*(11), 2498-2504.

- Shantharaj, D., Williams, M. A., Potnis, N. S., & Liles, M. R. (2021). Burkholderia gladioli C101 metabolites protect tomato plants against Xanthomonas perforans infection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *128*, 379-390.
- Shevela, D., Pishchalnikov, R. Y., & Eichacker, L. A. (2013). *Oxygenic photosynthesis in cyanobacteria* (pp. 3-40). Boca Raton: CRC Press.
- Shiels, K., Tsoupras, A., Lordan, R., Zabetakis, I., Murray, P., & Saha, S. K. (2022). Anti-inflammatory and antithrombotic properties of polar lipid extracts, rich in unsaturated fatty acids, from the Irish marine cyanobacterium *Spirulina subsalsa*. *Journal of Functional Foods*, *94*, 105124.
- Shin, H. J., Matsuda, H., Murakami, M., & Yamaguchi, K. (1997). Anabaenopeptins E and F, two new cyclic peptides from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-204). *Journal of Natural Products*, *60*(2), 139-141.
- Shin, H. J., Murakami, M., Matsuda, H., & Yamaguchi, K. (1996). Microviridins DF, serine protease inhibitors from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-204). *Tetrahedron*, *52*(24), 8159-8168.
- Shishido, T. K., Humisto, A., Jokela, J., Liu, L., Wahlsten, M., Tamrakar, A. & Sivonen, K. (2015). Antifungal compounds from cyanobacteria. *Marine drugs*, *13*(4), 2124-2140.
- Sieber, S., Grendelmeier, S. M., Harris, L. A., Mitchell, D. A., & Gademann, K. (2020). Microviridin 1777: a toxic chymotrypsin inhibitor discovered by a metabologenomic approach. *Journal of natural products*, *83*(2), 438-446.
- Siekevitz, P., & Palade, G. E. (1958). A cytochemical study on the pancreas of the guinea pig. *J. Biophys. Biochem. Cytol*, *4*, 309-318.
- Sillen, M., & Declerck, P. J. (2021). Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): an updated narrative review. *International journal of molecular sciences*, *22*(7), 3670.
- Smith, B., Li, N., Andersen, A. S., Slotved, H. C., & Krogfelt, K. A. (2011). Optimising bacterial DNA extraction from faecal samples: comparison of three methods. *The Open microbiology journal*, *5*, 14.
- Snyman, M., Walsdorf, R. E., Wix, S. N., & Gill, J. G. (2024). The metabolism of melanin synthesis—From melanocytes to melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*.
- Soares, M. C. S., Lüring, M., & Huszar, V. L. (2013). Growth and temperature-related phenotypic plasticity in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Phycological Research*, *61*(1), 61-67.
- Solano, F., Briganti, S., Picardo, M., & Ghanem, G. (2006). Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment cell research*, *19*(6), 550-571.
- Solovyev, M., Kashinskaya, E., & Gisbert, E. (2023). A meta-analysis for assessing the contributions of trypsin and chymotrypsin as the two major endoproteases in protein

- hydrolysis in fish intestine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *278*, 1113-1122.
- Stal, L. J. (2007). Cyanobacteria: diversity and versatility, clues to life in extreme environments. In *Algae and cyanobacteria in extreme environments* (pp. 659-680). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Strunecký, O., Ivanova, A. P., & Mareš, J. (2023). An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis. *Journal of Phycology*, *59*(1), 12-51.
- Sudhakar, M. P., Kumar, B. R., Mathimani, T., & Arunkumar, K. (2019). A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective. *Journal of Cleaner Production*, *228*, 1320-1333.
- Sun, J. N., Yu, X. Y., Hou, B., Ai, M., Qi, M. T., Ma, X. Y. & Qiu, L. Y. (2021). Vaccarin enhances intestinal barrier function in type 2 diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, *908*, 174375.
- Sun, L., Liu, L. P., Wang, Y. Z., Yang, L., Zhang, C., Yue, M. X. & Wang, L. (2022). Effect of ultrasonication on the metabolome and transcriptome profile changes in the fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Microbiological Research*, *254*, 126916.
- Swain, S. S., Paidesetty, S. K., & Padhy, R. N. (2017). Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *90*, 760-776.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, *38*(7), 3022-3027.
- Teas, J., Hebert, J. R., Fitton, J. H., & Zimba, P. V. (2004). Algae—a poor man's HAART?. *Medical Hypotheses*, *62*(4), 507-510.
- Terstappen, G. C., & Reggiani, A. (2001). In silico research in drug discovery. *Trends in pharmacological sciences*, *22*(1), 23-26.
- Thatcher, L. F., Myers, C. A., O'Sullivan, C. A., & Roper, M. M. (2018). Draft Genome Sequences of *Streptomyces* sp. Strains MH60 and 111WW2. *Genome Announcements*, *6*(18), 10-1128.
- Thawabteh, A. M., Jibreen, A., Karaman, D., Thawabteh, A., & Karaman, R. (2023). Skin pigmentation types, causes and treatment—a review. *Molecules*, *28*(12), 4839.
- Tichelaar, Y. V., Kluin-Nelemans, H. J., & Meijer, K. (2012). Infections and inflammatory diseases as risk factors for venous thrombosis. *Thrombosis and haemostasis*, *107*(05), 827-837.
- Tooming-Klunderud, A., Sogge, H., Rounge, T. B., Nederbragt, A. J., Lagesen, K., Glöckner, G. & Jakobsen, K. S. (2013). From green to red: Horizontal gene transfer of the phycoerythrin gene cluster between *Planktothrix* strains. *Applied and environmental microbiology*, *79*(21), 6803-6812.

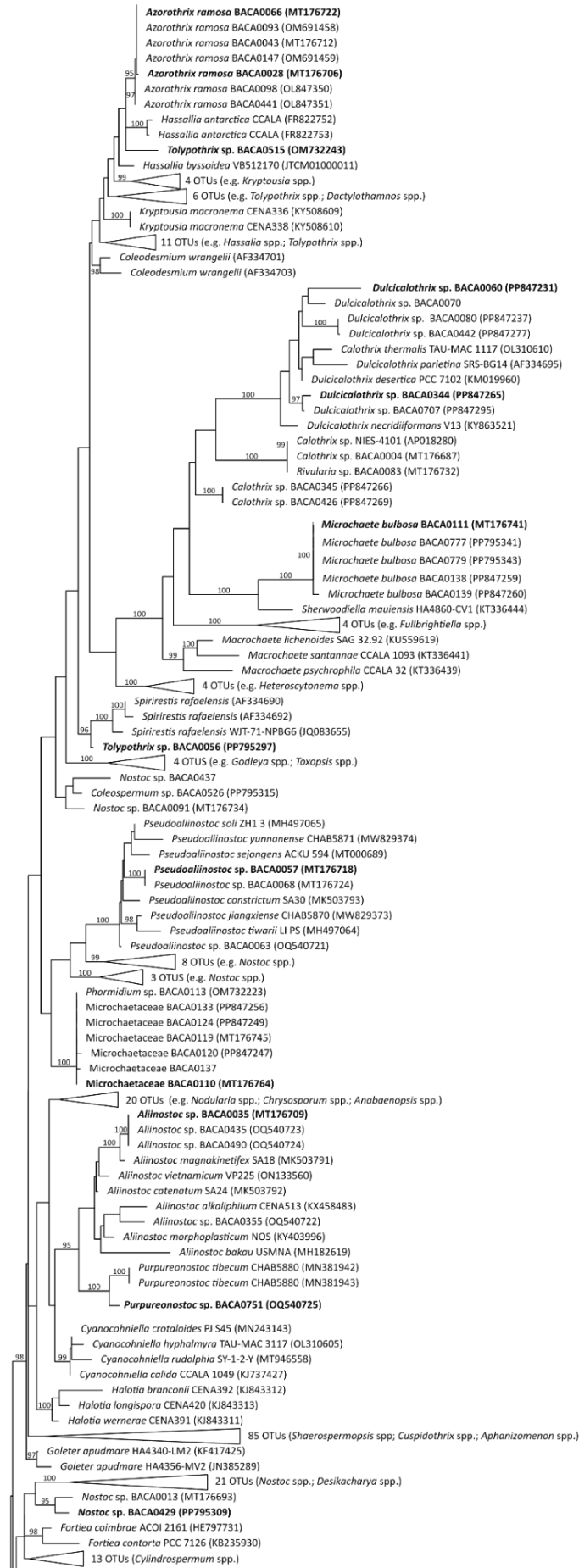
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic acids research*, *44*(W1), W232-W235.
- Tse, D. C., McCreery, R. L., & Adams, R. N. (1976). Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *Journal of medicinal chemistry*, *19*(1), 37-40.
- Udayan, A., Arumugam, M., & Pandey, A. (2017). Nutraceuticals from algae and cyanobacteria. In *Algal green chemistry* (pp. 65-89). Elsevier.
- Van Apeldoorn, M. E., Van Egmond, H. P., Speijers, G. J., & Bakker, G. J. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Molecular nutrition & food research*, *51*(1), 7-60.
- Vendrell, J., & Avilés, F. X. (1999). Carboxypeptidases. *Proteases new perspectives*, 13-34.
- Vendrell, J., Querol, E., & Avilés, F. X. (2000). Metallo-carboxypeptidases and their protein inhibitors: structure, function and biomedical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1477*(1-2), 284-298.
- Verma, S., Thapa, S., Siddiqui, N., & Chakdar, H. (2022). Cyanobacterial secondary metabolites towards improved commercial significance through multiomics approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *38*(6), 100.
- Villa, T. G., Feijoo, L., Sánchez, S., Rama, J. L. R., Sánchez-Pérez, A., de Migel, T., & Sieiro, C. (2021). Effects of Cyanobacterial Metabolites on Other Bacterial Phyla and in the Morphogenesis, Viability, and Biochemistry of Eukaryotes. *Developmental Biology in Prokaryotes and Lower Eukaryotes*, 425-466.
- Vioque, A. (2007). Transformation of cyanobacteria. *Transgenic microalgae as green cell factories*, 12-22.
- Vo, T. S., Ngo, D. H., & Kim, S. K. (2015). Nutritional and pharmaceutical properties of microalgal Spirulina. In *Handbook of marine microalgae* (pp. 299-308). Academic Press.
- Walker, F. J. (1984). Protein S and the regulation of activated protein C. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 10, No. 02, pp. 131-138). Copyright© 1984 by Thieme Medical Publishers, Inc.
- Walker, J. B., & Bajzar, L. (2004). The intrinsic threshold of the fibrinolytic system is modulated by basic carboxypeptidases, but the magnitude of the antifibrinolytic effect of activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor is masked by its instability. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(27), 27896-27904.
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., ... & Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature biotechnology*, *34*(8), 828-837.
- Wang, T. F., & Carrier, M. (2023). Immune checkpoint inhibitors-associated thrombosis: incidence, risk factors and management. *Current Oncology*, *30*(3), 3032-3046.

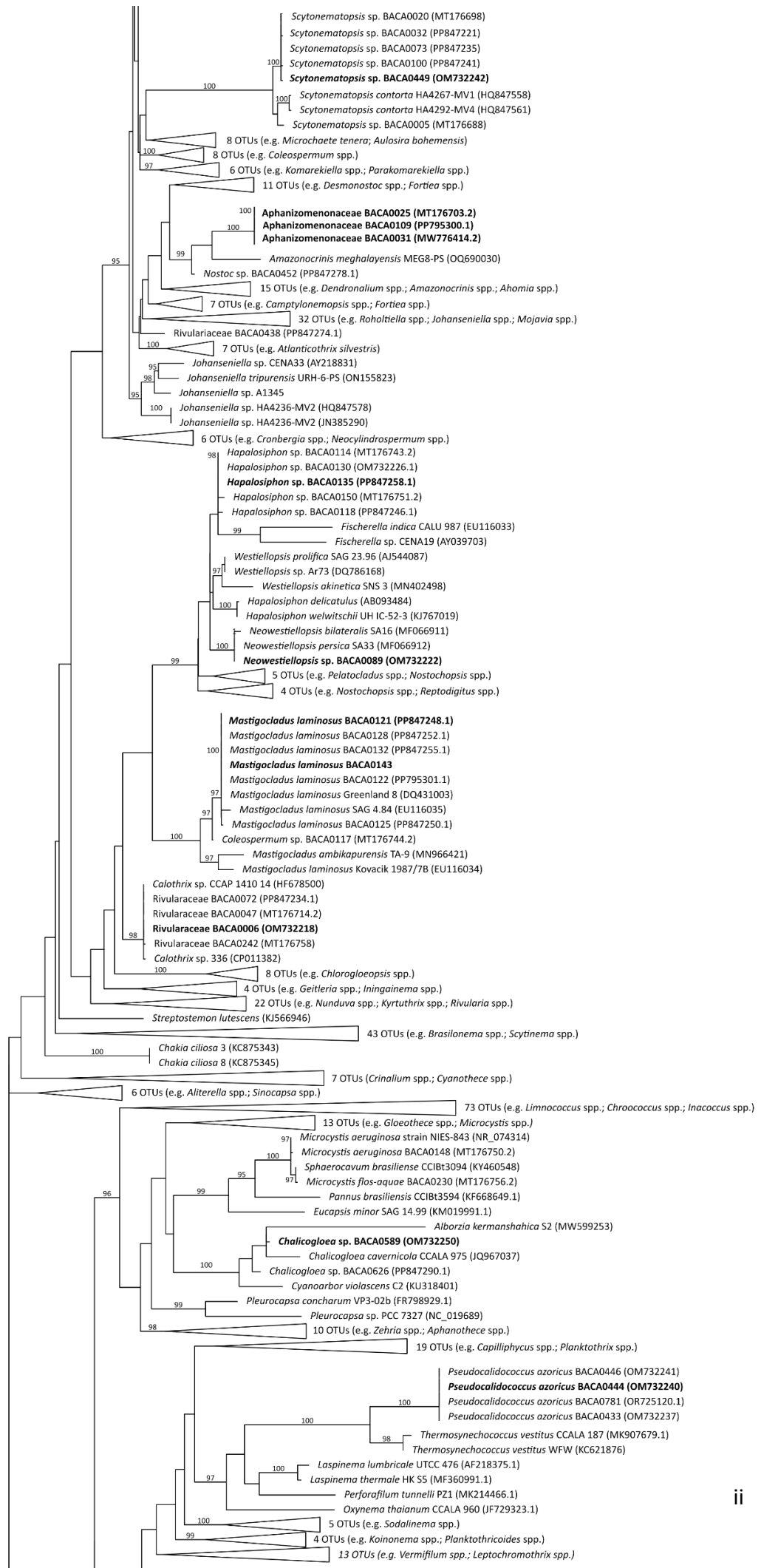
- Weckesser, J., Martin, C., & Jakobi, C. (1996). Cyanopeptolins, depsipeptides from cyanobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, *19*(2), 133-138.
- Welker, M., & Von Döhren, H. (2006). Cyanobacterial peptides—nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS microbiology reviews*, *30*(4), 530-563.
- Whitton, B. A. & Potts, M. (2000). *The Ecology of Cyanobacteria, Their Diversity in Time and Space*. Dordrecht, London, Boston: Kluwer Academic Publishers. 669p.
- Whitton, B. A., & Potts, M. (2012). Introduction to the cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 1-13). Springer, Dordrecht.
- Wienhausen, G., Noriega-Ortega, B. E., Niggemann, J., Dittmar, T., & Simon, M. (2017). The exometabolome of two model strains of the Roseobacter group: a marketplace of microbial metabolites. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1985.
- Willemsse, J. L., Heylen, E., Nesheim, M. E., & Hendriks, D. F. (2009). Carboxypeptidase U (TAF1a): a new drug target for fibrinolytic therapy? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *7*(12), 1962-1971.
- Willis, A., & Woodhouse, J. N. (2020). Defining cyanobacterial species: diversity and description through genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *39*(2), 101-124.
- Wilmotte, A., & Herdman, M. (2001). Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. *978-0-387-98771-2*.
- Wolk, C. P., Ernst, A., & Elhai, J. (1994). Heterocyst metabolism and development. In *The molecular biology of cyanobacteria* (pp. 769-823). Springer, Dordrecht
- Wu, A. H., Gerona, R., Armenian, P., French, D., Petrie, M., & Lynch, K. L. (2012). Role of liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry (LC-HR/MS) in clinical toxicology. *Clinical Toxicology*, *50*(8), 733-742.
- Xie, F., Feng, L., Cai, W., Qiu, Y., Liu, Y., Li, Y. & Qiu, L. (2015). Vaccarin promotes endothelial cell proliferation in association with neovascularization in vitro and in vivo. *Molecular medicine reports*, *12*(1), 1131-1136.
- Yamaguchi, Y., & Hearing, V. J. (2014). Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *4*(5), a017046.
- Yang, G., Zhang, N., Wang, T., Zhang, S., Xu, R., Zhu, Z., & Liu, K. (2014). Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the determination of vaccarin in rat plasma: application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, *28*(12), 1789-1794.
- Zahra, Z., Choo, D. H., Lee, H., & Parveen, A. (2020). Cyanobacteria: Review of current potentials and applications. *Environments*, *7*(2), 13.
- Zaroubi, L., Ozugergin, I., Mastronardi, K., Imfeld, A., Law, C., Gélinas, Y. & Findlay, B. L. (2022). The ubiquitous soil terpene geosmin acts as a warning chemical. *Applied and Environmental Microbiology*, *88*(7), e00093-22.

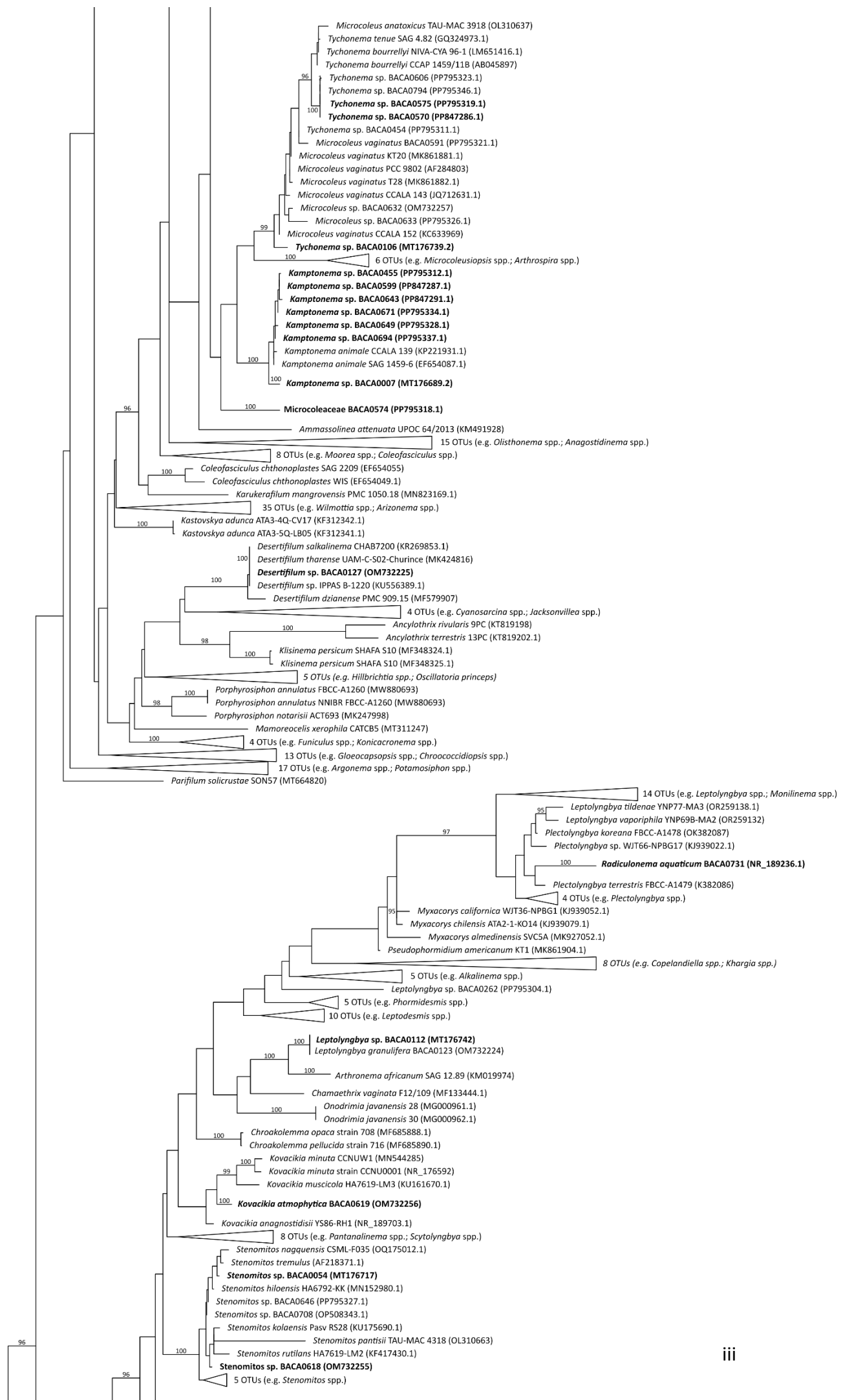
- Zhang, A., Carroll, A. L., & Atsumi, S. (2017). Carbon recycling by cyanobacteria: improving CO₂ fixation through chemical production. *FEMS microbiology letters*, *364*(16), fnx165.
- Ziemert, N., Ishida, K., Liaimer, A., Hertweck, C., & Dittmann, E. (2008). Ribosomal synthesis of tricyclic depsipeptides in bloom-forming cyanobacteria. *Angewandte Chemie*, *120*(40), 7870-7873.
- Ziemert, N., Ishida, K., Weiz, A., Hertweck, C., & Dittmann, E. (2010). Exploiting the natural diversity of microviridin gene clusters for discovery of novel tricyclic depsipeptides. *Applied and environmental microbiology*, *76*(11), 3568-3574.
- Zolghadri, S., Beygi, M., Mohammad, T. F., Alijanianzadeh, M., Pillaiyar, T., Garcia-Molina, P. & Saboury, A. A. (2023). Targeting tyrosinase in hyperpigmentation: Current status, limitations and future promises. *Biochemical pharmacology*, *212*, 115574.

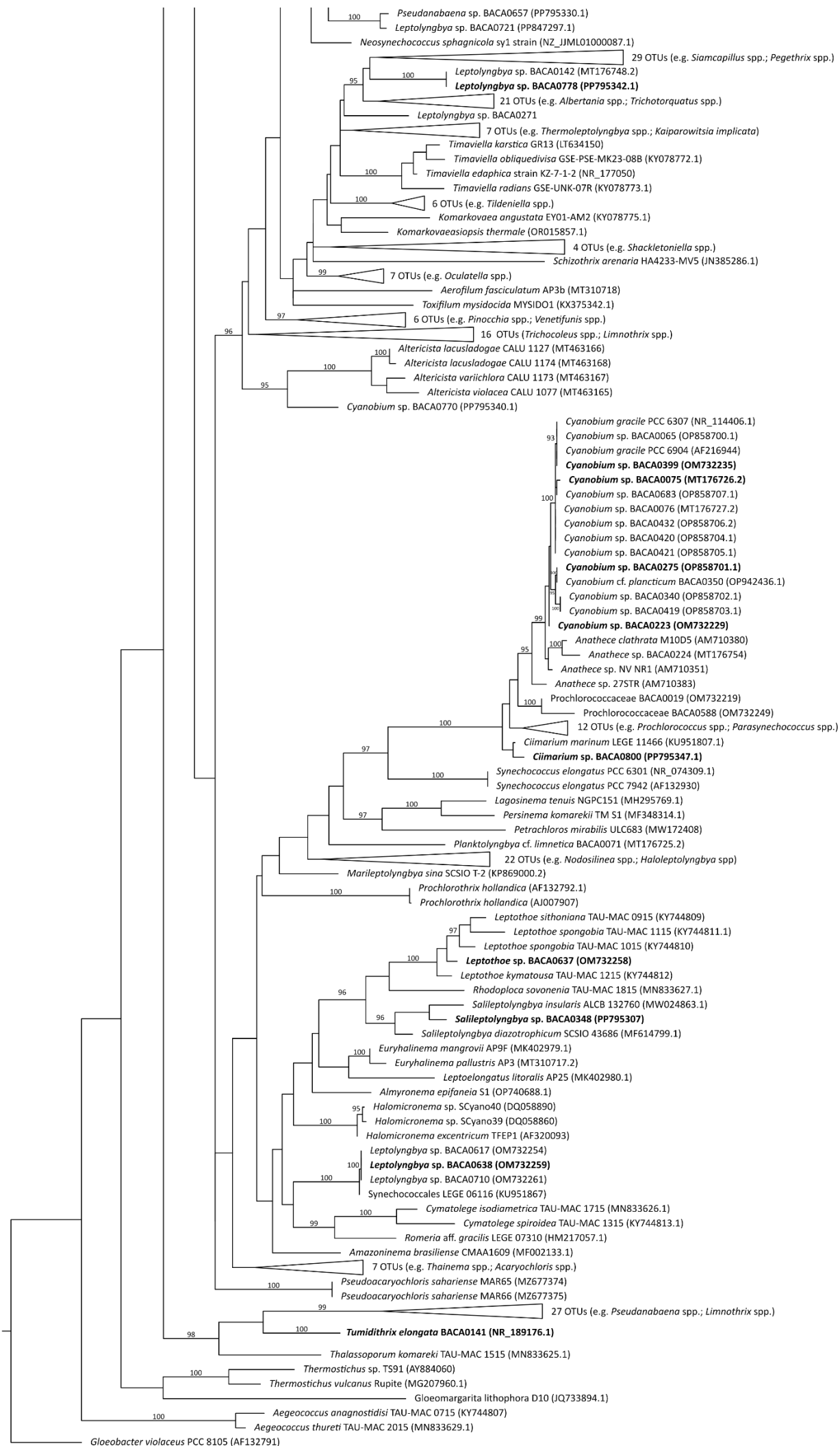
Anexo I

Árvore filogenética da região do 16S rRNA (1062 OTUs, 1393bp). Estão destacadas a negrito as estirpes em estudo. Os valores da máxima verossimilhança encontram-se apresentados à frente dos nós (>95%).









Anexo II

Protocolo de extração de DNA fornecido pelo fabricante.

Purification Procedure Using Spin Columns

Introduction

The purification procedure is designed for purifying genomic DNA using a spin column-based centrifugation procedure in a total time of **10–15 minutes**.

Materials Needed

Components supplied by the user

- Lysates prepared as described on pages 16–21
- Sterile, DNase-free 1.5-mL microcentrifuge tubes for elution
- Microcentrifuge capable of centrifuging $>10,000 \times g$
- Optional: sterile water, pH 7.0–8.5, if you are using water for elution

Components supplied with the Kit

- PureLink® Genomic Wash Buffers 1 and 2
 - PureLink® Genomic Elution Buffer
 - PureLink® Spin Columns in Collection Tubes
 - PureLink® Collection Tubes
-



Follow the recommendations below to obtain the best results:

- Perform all centrifugation steps at room temperature
 - Review **Elution Parameters** on page 13 to determine the suitable elution volume for your requirements
 - Perform a 1 minute incubation step with PureLink® Genomic Elution Buffer
 - Be sure to perform the recommended wash steps to obtain the best results
 - If you are using water for elution, always use sterile water, pH 7.0–8.5
-

Before Starting

Add 96–100% ethanol to PureLink® Genomic Wash Buffer 1 and PureLink® Genomic Wash Buffer 2 according to instructions on each label. Mix well. Mark on the labels that ethanol is added. Store both wash buffers with ethanol at room temperature.

Binding DNA

1. Remove a PureLink® Spin Column in a Collection Tube from the package.
 2. Add the lysate (~640 μ L) prepared with PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and ethanol to the PureLink® Spin Column.
 3. Centrifuge the column at $10,000 \times g$ for 1 minute at room temperature.
Note: If you are processing $>200 \mu$ L starting material such as blood, buccal swabs, or Oragene™ preserved saliva, you need to perform multiple loading of the lysate by transferring any remaining lysate to the same PureLink® Spin Column (above) and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
 4. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink® Collection Tube supplied with the kit.
 5. Proceed to **Washing DNA**, page 24.
-

Purification Procedure Using Spin Columns, Continued

Washing DNA

1. Add 500 μ L Wash Buffer 1 prepared with ethanol (page 23) to the column.
 2. Centrifuge column at room temperature at $10,000 \times g$ for 1 minute.
 3. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink[®] collection tube supplied with the kit.
 4. Add 500 μ L Wash Buffer 2 prepared with ethanol (page 23) to the column.
 5. Centrifuge the column at maximum speed for 3 minutes at room temperature. Discard collection tube.
 6. Proceed to **Eluting DNA**.
-

Eluting DNA

1. Place the spin column in a sterile 1.5-mL microcentrifuge tube.
 2. Add 25–200 μ L of PureLink[®] Genomic Elution Buffer to the column. See **Elution Parameters** (page 13) to choose the suitable elution volume for your needs.
 3. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute at room temperature. *The tube contains purified genomic DNA.*
 4. To recover more DNA, perform a second elution step using the same elution buffer volume as first elution in another sterile, 1.5-mL microcentrifuge tube.
 5. Centrifuge the column at maximum speed for 1.5 minutes at room temperature.
The tube contains purified DNA. Remove and discard the column.
-

Storing DNA

- Store the purified DNA at -20°C or use DNA for the desired downstream application.
 - For long-term storage, store the purified DNA in PureLink[®] Genomic Elution Buffer at -20°C as DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.
 - To avoid repeated freezing and thawing of DNA, store the purified DNA at 4°C for immediate use or aliquot the DNA and store at -20°C for long-term storage.
-

Anexo III

Códigos disponíveis no NCBI utilizados na base de dados do Bast2GO referentes aos compostos em estudo.

| Micropeptin K139 | | | |
|--|--|--|--|
| AB481215.1 | | | |
| Microviridinas | | | |
| GBL09525.1 AM943877.1 GBL09524.1 GBL12969.1 GBL09523.1 GBL12968.1 GBL09520.1 | | GBL12967.1 GBL09519.1 GBL12966.1 AM943878.1 EU438895.1 NC_010628.1 | |
| Anabaenopeptinas | | | |
| GU174493.1 CAC5344904.1 MT670293.1 EF672686.1 ABV79985.1 AQY60702.1 AQY61078.1 AFW93811.1 KOV07829.1 KOV35752.1 | KOV53810.1 AFW93812.1 OXM59343.1 PZG52807.1 QES44573.1 ABV79986.1 AFW93813.1 AQY60703.1 AQY61079.1 ABV79987.1 | AEJ86342.1 AFW93814.1 AQY60704.1 AQY61080.1 AQY61510.1 AQY61511.1 ABV79988.1 AEJ86343.1 AFW93815.1 AQY60705.1 | AQY61081.1 AQY61512.1 AQY61513.1 ABV79989.1 AQY60706.1 AQY61082.1 CP001037.1 |

Anexo IV

Protocolo do ensaio da atividade de TAFI fornecido pelo fabricante.

IMMBIOMED **ImmBioMed GmbH & Co. KG**
 Bergstr. 85, DE-64319 Pfungstadt, Germany
 Phone: +49 6157 9799 685 Fax: +49 6157 86443

TAFI Activity Assay

Product no. ADG871

Storage: 2 – 8 °C For Research Use Only!

PRODUCT INSERT ENGLISH

INTENDED USE

The TAFI Activity assay is a plasma based chromogenic assay for the determination of Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) enzyme activity.

INTRODUCTION

TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) is a proenzyme similar to carboxypeptidase B and is activated to TAFIa by thrombin and probably plasmin [1,2]. Thrombomodulin accelerates TAFI activation about 1250 times. TAFIa is an important inhibitor of fibrinolysis by cleaving C-terminal lysine and arginine residues in the fibrin clot. Thereby the carboxy-terminal plasminogen binding sites in the fibrin clot are degraded, plasminogen activation by t-PA and in consequence fibrinolysis is most effectively inhibited [3,4,5,6]. High levels of TAFIa may be an indication for thrombotic risk [7,8,9,10]. Properties of TAFI:

- Plasma concentration: 4–15 µg/ml
- Molecular weight: 55 kDa (401 aa, glycoprotein containing zinc)
- Conversion to TAFIa: by cleavage at Arg-92 to a 36 kDa peptide
- Mode of action of TAFIa: basic carboxypeptidase, cleaves C-terminal lysine and more specifically arginine residues. Inhibition of fibrinolysis by removal of plasminogen binding sites in the fibrin clot.
- Stability of TAFIa: from several hours at 22 °C to 10 min at 37 °C by conformational instability.

PRINCIPLE OF THE METHOD

The synthetic substrate is a substituted peptide mimetic consisting of an amino-protected L-lysine connected with an L-arginine of which the α-position of the side chain is a sulphur atom. It is degraded selectively and irreversibly by TAFIa producing a thiol derivative. This thiol reacts chemically with the colourless Ellman's reagent (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB) splitting off the yellow coloured 5-mercapto-2-nitro-benzoic acid. The extinction measurable at the wavelength of 405 nm at the end of the enzymatic reaction is directly proportional to the concentration of TAFI activated by thrombin/thrombomodulin.

REAGENTS, PREPARATION AND USE

| Reagent | Content |
|------------|--|
| R1 | Activator 2 vials, lyophilised (to be reconstituted in 4.0 ml of deionized water) |
| R2 | Start Reagent 2 vials; lyophilised (to be reconstituted in 4.0 ml of Diluent R3) |
| R3 | Diluent 2 vials, ready to use (diluent for reconstitution of the Start Reagent R2) |
| CAL | TAFI Calibrator (human plasma) 1 vial, lyophilised (to be reconstituted in 1.0 ml of deionized water) |
| C1 | TAFI Control 1 (human plasma) 1 vial, lyophilised (to be reconstituted in 1.0 ml of deionized water) |
| C2 | TAFI Control 2 (human plasma) 1 vial, lyophilised (to be reconstituted in 1.0 ml of deionized water) |

Incubate reconstituted solutions R1 and R2 in closed vials for 10 min at room temperature and swirl gently before use.

PRECAUTIONS

Each donor unit used in the preparation of human source reagent has been tested for antibodies against HIV Type 1 and 2, Hepatitis C-Virus, Treponema pallidum as well as Hepatitis B surface-antigen and Hepatitis C-genome by PCR. The plasmas were found to be negative on the tested parameters. However, since no test can completely rule out the presence of blood borne diseases these control plasmas have to be handled as potentially infectious material.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

0.9% sodium chloride
 Calibrated pipettes (10–5000 µl)
 Microtiter plates
 Microtiter plate reader or automated or semi-automated coagulation instruments which employ an optical detection channel.

Note: When using automated or semi-automated coagulation analyzers refer always to manufacturer's operator manual.

STORAGE AND STABILITY

The test kit may be used up to the expiry date given on the label when stored unopened at 2–8 °C.
 Stability of the reagents after reconstitution:

| Reagent | Content |
|------------|----------------------------------|
| R1 | –20 °C 6 month |
| | 2–8 °C 4 weeks |
| | 15 °C 48 h (on board) |
| | 20–25 °C 8 h (on board) |
| R2 | –20 °C 6 month |
| | 2–8 °C 4 weeks |
| | 15 °C 48 h (on board) |
| | 20–25 °C 8 h (on board) |
| CAL | –20 °C 6 months |
| | 20–25 °C 8 h (on-board) |
| C1 | –20 °C 6 months |
| | 20–25 °C 8 h (on-board) |
| C2 | –20 °C 6 months |
| | 20–25 °C 8 h (on-board) |

Frozen reagents should be thawed at room temperature and gently mixed before use. Freeze only once.

BLOOD COLLECTION AND SAMPLE PREPARATION

The patient should be at rest for 10 min prior sampling. Collect venous blood carefully in 104 mM sodium citrate (volume ratio 9+1). Gently mix blood and anticoagulant directly after sampling, avoid foam formation. Centrifuge immediately at no less than 2000x g for at least 20 min at room temperature. Take care to avoid contaminations from the platelet layer into plasma when the plasma is separated from the cells. Never use a hemolytic plasma sample.

For storage freeze undiluted plasma rapidly at –70 °C in aliquots. Freeze only once. Avoid repeated freezing and thawing cycles. Thawing should be done rapidly in a 37 °C water bath. For more information see NCCLS document H21-A2 [11].

MANUAL PROCEDURE

Reagents should be prepared as described above. Frozen samples should rapidly be thawed at 37 °C in a standardized way ensuring negligible loss of activity of labile coagulation factors and absence of cryoprecipitate.

Preparation of calibrator

Reconstitute in 1.0 ml of deionized water, incubate in closed vials for 15 min at room temperature and swirl gently before use.

Prepare dilutions of calibrator plasma as follows:

| Dilutions | Calibrator plasma (µl) | Deionized water (µl) |
|------------|------------------------|----------------------|
| Dilution 1 | 0 | 100 |
| Dilution 2 | 30 | 70 |
| Dilution 3 | 70 | 30 |
| Dilution 4 | 100 | 0 |

TAFIa activity of undiluted calibrator plasma is lot specific and given in the attached certificate. Calculate TAFIa activity for each dilution. Either by using a microtiter plate or an automated coagulation analyzer run the test with each calibrator dilution obtained and create a calibration curve by plotting % TAFIa activity values against delta mE per min values obtained in the test.

Preparation of Controls

Reconstitute in 1.0 ml of deionized water, incubate in closed vials for 15 min at room temperature and swirl gently before use. After reconstitution controls are ready to use.

Preparation of plasma samples

Dilute **plasma sample 1:2** (one part plasma and one part of 0.9% sodium chloride).

Only dilute plasma samples. **Do not further dilute** dilutions of calibration plasma, and **do not dilute** controls.

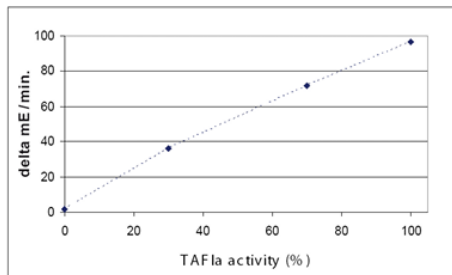
Determination and calculation of TAFI activity:

1. Add 10 μ L of plasma sample, calibrator dilution, or control to a microwell.
2. Add 100 μ L of R1 Activator
3. Incubate the plate for 3 minutes at 37 °C
4. Add 100 μ L R2 Start Reagent

Start kinetic measurement at 405 nm. Monitor the rise in extinction over 5 min. Take the linear part of the curve and calculate the slope per minute ($\Delta E/\text{min}$). Calculate TAFIa activity by using the calibration curve. Use an appropriate curve fit software or calculate directly using the printed curve.

Consider always the dilution factor of the plasma sample.

Example for a typical calibration curve



AUTOMATED PROCEDURE

Adaptation protocols for automated coagulation analyzers are available. Please contact American Diagnostica.

EXPECTED VALUES

The calibrator plasma is a pooled plasma obtained from normal healthy donors. Calibrator and control plasmas were calibrated against the Secondary Coagulation Standard (SSC/ISTH, Lot. 2). TAFIa activity (%) of undiluted calibrator, controls 1 and 2 is lot specific and given in the attached certificate.

Compare calculated % TAFIa activities of controls 1 and 2 with certified values. If values outside these ranges are obtained the test results are not valid.

QUALITY CONTROLS

Calibrator and control plasma should be used for validation of the assay. Ranges of expected TAFI activities are provided with each batch. If values outside the specified range are obtained, a complete check of reagents should be made and the analysis should be repeated. If the problems persist, a complete instrument check should be considered. In case of further issues please contact technical support for assistance.

SELECTIVITY

The substrate is selective for TAFIa. Use of potato tube carboxypeptidase inhibitor (PTCI) shows a selective inhibition of TAFIa (12, 13), that can be measured by TAFI Activity Kit. Carboxypeptidase N may also cleave the substrate used. Without Thrombin/Thrombomodulin activation of TAFI an

activity of 2–4% was found. This negligible activity was probably caused by Carboxypeptidase N activity.

REPRODUCIBILITY

In a series of 36 duplicate determinations on the same day the CV for the microtiter plate assay was below 5%.

In a series of 20 measurements with two lots of reagent on the same day CV for a fully automated coagulation analyzer was below 5% and between two days below 7%.

LIMITATIONS AND INTERFERENCES

Up to now there are no known interferences. Different deficient plasmas (F1, FII, FV, FX, FVIII, Prot. S, Prot. C, ATIII) and factor enriched plasmas (ATIII, TFPI, FVIII, Fibrinogen) were tested. They had no influence on the test outcome. There is also no influence of Lupus anticoagulant antibodies and hemolytic plasma.

The prescribed assay procedure allows the analysis of plasma from anticoagulated patients at heparin levels < 8 U/ml (UFH and LMWH). Please note that the effect of Hirudin anticoagulation is not inhibited by Polybrene.

BIBLIOGRAPHY

1. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. Bajzar L et al., J Biol Chem 1995; 270:14477-84
2. Purification and characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. Hendriks D et al., Biochim Biophys Acta 1990; 1034:86-92
3. Plasma carboxypeptidases as regulators of the plasminogen system. Redlitz A et al., J Clin Invest 1995; 96:2534-8
4. The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. Bajzar L et al., Blood 1996; 88:2093-100
5. On the mechanism of the antifibrinolytic activity of plasma carboxypeptidase B. Sakharov DV et al., J Biol Chem 1997; 272:14477-82
6. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. Wang W et al., J Biol Chem 1998; 273:27176-81
7. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. van Tilburg NH et al., Blood 2000; 95:2855-9
8. Plasma procarboxypeptidase U in men with symptomatic coronary artery disease. Silveira A, et al., Thromb Haemost 2000; 84:364-8
9. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels in patients with coronary artery disease investigated by angiography. Schroeder V, et al., Thromb Haemost 2002; 88:1020-5
10. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen concentration and genotype in relation to myocardial infarction in the north and south of Europe. Juhan-Vague I et al., Atheroscler Thromb Vasc Biol 2002; 22:867-73
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. NCCLS Document H21-A2; vol 11 No 23.
12. The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed plasma is TAFI-dependent. Bajzar L, et al., Blood 1996; 88:2093-100
13. An inhibitor of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor potentiates tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis in a rabbit jugular vein thrombolysis model. Nagashima M, et al., Thromb Res 2000; 98:333-42

ADG871@01032019

Anexo V

Quantidade e pureza do DNA extraído determinada por espectrofotometria.

| Amostra | Concentração (µg/mL) total | Pureza 260/230 | Pureza 260/280 |
|----------|----------------------------|----------------|----------------|
| BACA0006 | 32,5 | 1,63 | 1,78 |
| BACA0007 | 271 | 1,17 | 1,88 |
| BACA0025 | 24,6 | 1,26 | 1,94 |
| BACA0028 | 33,7 | 1,43 | 1,73 |
| BACA0031 | 56,6 | 0,59 | 1,81 |
| BACA0035 | 89,9 | 1,30 | 1,89 |
| BACA0054 | 21,3 | 1,11 | 1,84 |
| BACA0056 | 86,2 | 0,787 | 1,76 |
| BACA0057 | 36,9 | 1,46 | 1,89 |
| BACA0060 | 64,2 | 1,43 | 1,79 |
| BACA0066 | 28,6 | 1,48 | 1,87 |
| BACA0075 | 216 | 1,70 | 1,95 |
| BACA0089 | 26,0 | 1,59 | 1,89 |
| BACA0106 | 60,8 | 1,77 | 1,84 |
| BACA0109 | 100,0 | 1,14 | 1,84 |
| BACA0110 | 26,5 | 1,57 | 1,96 |
| BACA0111 | 38,9 | 1,47 | 1,89 |
| BACA0112 | 48,6 | 1,34 | 1,86 |
| BACA0121 | 64,0 | 1,38 | 1,87 |
| BACA0127 | 75,3 | 1,67 | 1,90 |
| BACA0135 | 27,0 | 1,33 | 2,02 |
| BACA0141 | 177 | 1,93 | 1,91 |
| BACA0143 | 22,7 | 0,887 | 1,82 |
| BACA0223 | 57,0 | 1,25 | 1,90 |
| BACA0275 | 52,9 | 1,27 | 1,91 |
| BACA0344 | 36,1 | 2,53 | 1,85 |
| BACA0348 | 93,5 | 1,12 | 1,84 |
| BACA0399 | 90,5 | 1,17 | 1,87 |
| BACA0429 | 113 | 1,51 | 1,86 |
| BACA0444 | 224,0 | 2,16 | 1,95 |
| BACA0449 | 25,4 | 2,16 | 1,78 |
| BACA0455 | 145,0 | 1,93 | 1,88 |
| BACA0515 | 44,8 | 0,681 | 1,69 |
| BACA0570 | 30,8 | 1,01 | 2,03 |
| BACA0574 | 304 | 0,730 | 1,67 |
| BACA0575 | 34,6 | 1,16 | 1,94 |
| BACA0589 | 44,0 | 2,39 | 1,95 |
| BACA0599 | 76,8 | 1,25 | 1,80 |
| BACA0618 | 125,0 | 2,04 | 1,87 |
| BACA0619 | 152,0 | 1,94 | 1,88 |
| BACA0637 | 26,6 | 1,95 | 1,70 |
| BACA0638 | 112 | 1,02 | 1,81 |
| BACA0643 | 174 | 1,27 | 1,81 |
| BACA0649 | 458 | 0,827 | 1,82 |
| BACA0671 | 312 | 1,82 | 2,03 |
| BACA0694 | 156,0 | 1,83 | 1,84 |
| BACA0731 | 120,0 | 2,12 | 1,94 |
| BACA0751 | 83,8 | 1,75 | 1,94 |
| BACA0762 | 20,6 | 1,33 | 2,14 |
| BACA0778 | 24,9 | 0,945 | 1,76 |
| BACA0800 | 158 | 1,15 | 1,80 |

Anexo VI

Resultado da bioatividade trombótica.

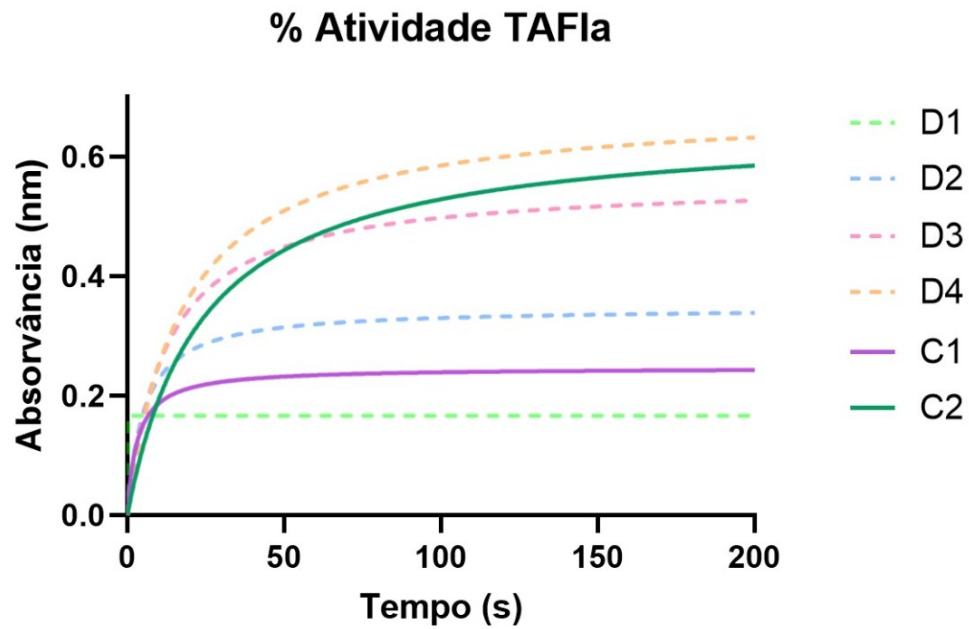


Figura 1. Curva da cinética enzimática, Michaelis-Menten, referente à semelhança das atividades dos compostos das estirpes em estudo com a atividade da TAFIa. **D1**- 100% água *milli-Q*; **D2**- 30% do calibrador; **D3**- 70% do calibrador; **D4**- 100% do calibrador; **C1**- Controlo 1 (22.1; 21.2 - 22.9%) e **C2**- Controlo 2 (78.6; 73.5 - 83.6%).

Anexo VII

Certificado de análise da atividade do calibrador e dos controlos.

IMMBIOMED

Certificate of Analysis

Product Name: TAFI Activity Assay
Product No.: ADG871
Lot: 103a

Certified activity of calibrator

TAFIa activity of undiluted calibrator plasma prepared according to product insert instructions:


| Calibrator | Lot | % TAFIa activity |
|------------|----------|------------------|
| Cal | 140720-C | 99.5 |

Certified activity of controls

TAFIa activity of control plasmas prepared according to product insert instructions:

| Control | Lot | % TAFIa activity |
|---------|----------|--------------------|
| C1 | 140720-1 | 22.1 (21.2 – 22.9) |
| C2 | 140720-2 | 78.6 (73.5 – 83.6) |

Calibrator and Controls measured on bcs® and bcs® XP (Behring Coagulation System)

| | |
|---|------------|
| Signed by | |
|  | 31.03.2023 |
| Production and QA | Date |

ADG871-certificate Cal-C1-C2 ©Lot 103a

ImmBioMed Business Consultants GmbH & Co. KG • Bergstr. 85 • D-64319 Pfungstadt
Tel: +49 (0) 6157 - 9799 685 • email: info@immbiomed.de

UNIVERSIDADE DOS AÇORES
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Rua da Mãe de Deus
9500-321 Ponta Delgada
Açores, Portugal