

***Anabaena cylindrica* – Revisão de conhecimentos**

Luís Salvador do Amaral Lage

2024

***Anabaena cylindrica* – Revisão de conhecimentos**

Luis Salvador do Amaral Lage

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia de Recursos
Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Teresa Margarida
Lopes da Silva Mouga, coorientação das Doutoradas Clélia Paulete Correia Neves
Afonso e Bárbara Ferreira Chagas

2024

Título: *Anabaena cylindrica* - Revisão de conhecimentos

Copyright © Luís Salvador do Amaral Lage

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

Instituto Politécnico de Leiria

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho de projeto através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Abstract

Climate change has been unbalancing ecosystems all over the world, with the global temperature increase being one of most highlighted, which has affected both terrestrial and marine life. As water temperatures rises, blooms of photosynthetic microorganisms have become more common, with cyanobacteria being one of the main culprits. Cyanobacteria of the genus *Anabaena* sp. are filamentous multicellular photosynthetic prokaryotes that exhibit strategies for fixing atmospheric nitrogen through the presence of specialized cells, called heterocysts, which allow them to survive in various environments through symbioses with other living beings, the ability to develop akinetes, which are specialized resistance cells, in the event of situations unfavorable to their survival and also the production of toxins, which could have devastating impacts, against both the ecosystem and human health. Cyanobacteria have been identified as a source of interesting compounds such as exopolysaccharides and pigments, mainly in the form of phycobiliproteins, both of which are desired by the cosmetics, food and pharmaceutical industries. The aim of this work is to present the current state of knowledge on cyanobacteria, with a special focus on the species *Anabaena cylindrica*, covering topics such as the active compounds produced, especially exopolysaccharides and phycobiliproteins, cultivation and biomass collection methodologies and purification processes.

Keywords: Cyanobacteria, *Anabaena* sp., Phycobiliproteins, Exopolysaccharides

Resumo

As alterações climáticas têm vindo a desequilibrar ecossistemas por todo o mundo, com foco especial ao aumento global de temperatura, que tem afetado tanto a vida terrestre como a vida marinha. Com o aumento da temperatura da água, tem se observado com mais frequência o aparecimento de “blooms” de microrganismos fotossintéticos, sendo as cianobactérias, um dos principais responsáveis, por estes fenómenos. As cianobactérias do género *Anabaena* sp. são procariontes fotossintéticos multicelulares filamentosos, que exibem estratégias de fixação do azoto atmosférico, através da presença de células especializadas, denominadas de heterocistos, que lhes permitem sobreviver em vários ambientes, bem como a capacidade de desenvolver acinetos, que são células especializadas de resistência, quando as condições são desfavoráveis ao seu crescimento. Produzem também toxinas, que podem ter impactos devastadores para o ecossistema e para a saúde humana. As cianobactérias têm vindo a ser identificadas como fonte de compostos de interesse como os exopolissacáridos e pigmentos, maioritariamente sobre a forma de ficobiliproteínas, ambos são desejados para as indústrias de cosmética, alimentação e farmacêutica. Neste trabalho pretende-se expor que conhecimentos há atualmente sobre cianobactérias, com especial atenção para a espécie *Anabaena cylindrica*, abordando temas como, os compostos ativos produzidos, destacando-se os exopolissacáridos e as ficobiliproteínas, as metodologias de cultivo e de recolha de biomassa e os processos de purificação.

Palavras-chave: Cianobactérias, *Anabaena* sp., Ficobiliproteínas, Exopolissacáridos

Conteúdo

Abstract	iii
Resumo	iv
1.1. Índice de Figuras	vi
1.2. Índice de Tabelas	vii
1.3. Abreviaturas	viii
1.Revisão de literatura	1
1.1 Introdução.....	1
2.Objetivos.....	3
3.Cianobactérias	3
3.1 Aplicações	7
3.2 Ficobiliproteínas	9
3.3 Exopolissacáridos	10
3.4 Cultivo de cianobactérias.....	12
3.5 Processos de extração e de purificação de metabolitos	14
4. <i>Anabaena</i>	16
4.1 <i>Anabaena cylindrica</i>	19
5. Conclusão	22
6. Bibliografia.....	24

Índice de Figuras

Figura 1) Artigos publicados sobre o género <i>Anabaena</i> sp. segundo o motor de busca Pubmed, usando a palavra-chave <i>Anabaena</i> sp., no dia 14/09/2024	2
Figura 2) Representação do ciclo de vida das cianobactérias a partir de um acinetó (Hense & Beckmann, 2006).....	5
Figura 3) Representação de um heterocisto e o processo de fixação do azoto (Mandhata et al., 2023)	6
Figura 4) Resumo de uma biorefinaria de microalgas (Nitsos et al. 2020).....	7
Figura 5) Resumo do potencial das cianobactérias em diferentes áreas (Zahra et al. 2020).....	8
Figura 6) Representação de um ficobilissoma e os seus constituintes (Pagels et al. 2019)	9
Figura 7) Aplicações das ficobiliproteínas (Li et al. 2019).....	10
Figura 8) Aglomerados de <i>Anabaena</i> sp.	11
Figura 9) Diagrama de processos para extração e secagem de microalgas (Barros et al. 2015)	15
Figura 10) <i>Anabaena</i> sp. com acinetos destacados a vermelho e com heterocisto a amarelo	17
Figura 11) <i>Anabaena cylindrica</i>	19
Figura 12) Taxa de crescimento de <i>Anabaena cylindrica</i> . obtida utilizando 21 balões de 250 mL cada um inoculado com 40 mL (20% do volume total de 200 mL) de <i>Anabaena cylindrica</i> e 160 mL de meio BG-11, em crescimento sob luz fluorescente branca fria e à temperatura de $19\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 21 dias, onde a cada 3 dias se removeram 3 balões para amostragem. A recolha de biomassa foi feita através de filtração a vácuo (Vacubrand, ME2C NT), utilizando filtros de fibra de vidro (VWR, 47 mm de diâmetro; $1,2\ \mu\text{m}$ de malhagem). Deixou-se secar à temperatura ambiente, para eliminar o excesso de água (18h) e mediu-se o peso húmido numa balança analítica (Sartorius, TE 1245), de seguida cada amostra foi deixada a secar durante 24 horas na estufa a 60°C (Binder, FD 115) para obter o peso seco.	21

Índice de Tabelas

Tabela I) Composição química de EPS em cianobactérias (Kumar et al. 2018).....	12
Tabela II) Compostos produzidos por <i>Anabaena cylindrica</i> e respectivas bioatividades	22

Abreviaturas

- HABs (Harmful Algal Blooms);
- EPS (Exopolissacáridos);
- CO₂ (Dióxido de carbono).

1.Revisão de literatura

1.1 Introdução

A biotecnologia de recursos marinhos emerge como uma fronteira promissora na busca por soluções sustentáveis para os desafios globais contemporâneos. O vasto e pouco explorado ecossistema marinho abriga uma diversidade biológica imensa, com organismos que possuem características únicas, adaptadas a condições extremas pressão, temperatura e salinidade. Entre esses organismos, as cianobactérias marinhas, como a *Anabaena* sp., destacam-se pelas suas capacidades fotossintéticas e de fixação de azoto, oferecendo um enorme potencial para aplicações biotecnológicas.

Por seu lado, as alterações climáticas, têm vindo a provocar um aumento global da temperatura, sendo uma fonte de stress ambiental, estando a afetar muitos habitats e fatores bióticos e abióticos como uma incidência de espécies invasoras, que tornam os ecossistemas imprevisíveis (Vitousek et al. 2002; Walther et al. 2009).

Nos últimos anos, a proliferação excessiva de cianobactérias, frequentemente resultando em florescimentos, tem despertado preocupações ambientais e de saúde pública. Estes florescimentos são frequentemente associados à eutrofização de massas de água, um processo impulsionado por atividades antropogénicas como descargas de esgoto não tratado e o uso excessivo de fertilizantes agrícolas. As cianotoxinas, substâncias tóxicas produzidas por algumas espécies de cianobactérias durante os florescimentos, podem causar uma variedade de efeitos adversos em seres humanos e animais, incluindo problemas hepáticos, neurológicos e gastrointestinais e destabilizando o funcionamento normal dos ecossistemas locais.

Estes são predominantes em sistemas de reduzida circulação de água tais como lagos, onde a maioria dos fenómenos de eutrofização é provocada por cianobactérias, (Paerl & Huisman, 2009; Chorus & Bartram, 1999; Mandhata et al. 2023) o que inclui espécies do género *Anabaena*. A este fenómeno também se dá o nome de HABs (*Harmful Algal Blooms*), durante estes ocorre um aumento da turbidez da água, que por sua vez suprime o estabelecimento e crescimento de macrófitos aquáticos, provocando assim vários efeitos negativos na cadeia alimentar do habitat. *Blooms* mais densos podem

ainda causar situações de anoxia, durante os períodos noturnos, o que pode levar à morte de peixes (Paerl & Huis-man, 2009).

Recentemente, estudos filogenéticos revelaram que espécies, que se pensavam restritas às zonas tropicais e subtropicais, atualmente são mais frequentes em zonas temperadas. Espécies como *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena* sp. têm vindo a ser observadas na Europa e na América do Norte (Moisander et al. 2012; Soares et al. 2009; Hong et al. 2006).

Para melhor preparação contra os potenciais perigos das cianobactérias é necessário perceber as suas propriedades básicas, o seu comportamento no habitat natural e que condições ambientais podem ajudar no seu crescimento (Chorus & Bartram, 1999).

Avanços conceptuais durante o século XX, permitiram perceber a descontinuidade entre procariotas e eucariotas, diferenciando a organização celular. As anteriormente chamadas de “algas azuis-verdes” constituem um dos maiores grupos dos procariotas, incluindo-se no reino Eubactéria (Sneath, 1992).

O interesse por este género de cianobactéria começou nos anos 60, tendo vindo a aumentar gradualmente ao longo dos anos (Fig.1), existindo mais de 4100 artigos publicados, segundo o *Pubmed*.

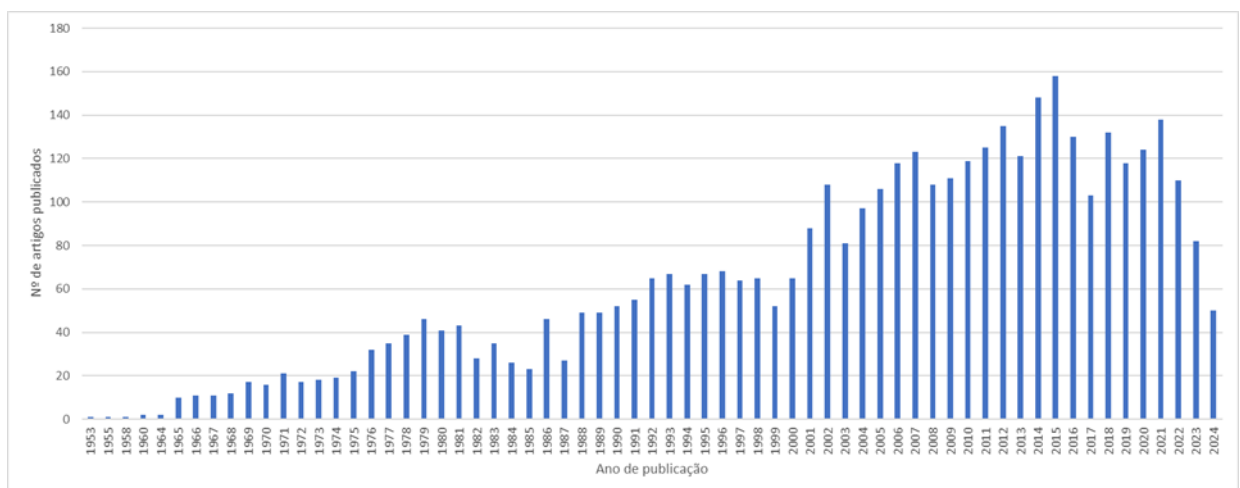


Figura 1) Artigos publicados sobre o género *Anabaena* sp. segundo o motor de busca *Pubmed*, usando a palavra-chave *Anabaena* sp., no dia 14/09/2024

2. Objetivos

Este trabalho visa fazer uma revisão bibliográfica sobre a espécie *Anabaena cylindrica* e as aplicações biotecnológicas a ele associadas.

3. Cianobactérias

As cianobactérias são microrganismos procariotas fotossintéticos muito diversificados pertencentes ao filo Cyanobacteria, podendo apresentar-se de forma unicelular ou multicelular, cocóide ou filamentosa ramificada ou não, demonstrando também uma maior eficiência fotossintética comparativamente às plantas terrestres (Mandhata, et al. 2023; Tiwari, et al. 2019). Podem ser encontradas em quase todos os tipos de ambientes iluminados, todas sintetizam clorofila *a*, a maioria produz pigmentos da família das ficobilinas, como a ficocianina, a ficoeritrina e a aloficocianina, a primeira das quais lhes dá um tom azulado quando em concentrações suficientes, noutros casos o pigmento acessório ficoeritrina é predominante e dá um tom cor-de-rosa (Whitton & Potts, 2012).

Os habitats mais prominentes das cianobactérias são ambientes pantanosos e marinhos, sobrevivendo em condições de água doce, salobra ou salgada, fria ou temperada, mais raramente em água quente. As cianobactérias marinhas crescem ao longo da costa como comunidade bentónica nas zonas intertidais (Humm & Wicks, 1980), e as espécies de água doce tendem a colonizar lagos, ao longo da coluna de água ou nos fundos, e até mesmo em regiões de água salobra, como estuários, pois muitas espécies são halotolerantes (Reed et al. 1984).

As cianobactérias são frequentemente os primeiros seres vivos a colonizar áreas secas de rocha e solo, graças a adaptações como seja a presença de pigmentos capazes de absorver elevados níveis de radiação ultravioleta o que lhes permite sobreviver em ambientes terrestres expostos (Whitton, 1992), nomeadamente cinzas vulcânicas e desertos (Dor & Danin, 1996). Ao longo do tempo, as cianobactérias evoluíram para ocupar uma ampla variedade de habitats, até mesmo ambientes extremos como fontes termais e regiões polares. A diversidade de habitats das cianobactérias é acompanhada por uma variedade de estratégias adaptativas, incluindo a capacidade de realizar fotossíntese oxigénica e anoxigénica, formação de esporos resistentes (acinetos), a fixação de azoto e a produção de substância mucilaginosas (Cohen et al. 1986; Abed et al. 2009). Nos ecossistemas aquáticos, elas são componentes chave da comunidade

fitoplantónica, contribuindo significativamente para a produtividade primária e para os ciclos biogeoquímicos dos nutrientes.

Na fotossíntese oxigénica, o dador de eletrões é a água e há a libertação de oxigénio como subproduto, na fotossíntese anoxigénica, o dador de eletrões é o sulfeto de hidrogénio e liberta-se enxofre como subproduto, isto permite-lhes sobreviver em ambientes onde a concentração de enxofre é elevada, pois este funciona como um inibidor da cadeia transportadora de eletrões em processos de fotossíntese oxigénica, reagindo com as enzimas citocromo c oxidase, nomeadamente ligando-se aos átomos de ferro que são o centro destes complexos proteicos e essenciais para realizarem a sua função de catalisadores de reações “redox” e de transportadores de eletrões (Kushkevych et al. 2021; Dordević et al. 2020).

A formação de esporos resistentes denominados acinetos, apenas ocorrem em cianobactérias nas ordens Nostocales e Stigonematales, por exemplo *Dolichosporum* e *Aphanizomenon*, pertencentes à primeira, e *Hapalosiphon* e *Stigonema*, pertencentes à segunda ordem. Os acinetos são células diferenciadas, apresentando-se como células maiores, com um aspeto granuloso, uma parede celular mais espessa e com multicamadas, que possuem uma grande reserva de nutrientes, nomeadamente amido cianofíceo e outros hidratos de carbono. Estas células também variam na sua composição de pigmentos, nos acinetos de *Anabaena cylindrica*, por exemplo, há uma ausência de ficocianina, substituição de clorofila por feofitina, um decréscimo de β -caroteno e um aumento de xantofilas (Sarma, 2013; Kaplan-Levy, et al. 2010). Limitações na intensidade luminosa ou de azoto, são os fatores que contribuem para a formação dos acinetos. Estes sendo mais densos do que a água, afundam e podem sobreviver por várias décadas, cerca de 65 até 130 vezes mais do que as células vegetativas, chegando a sobreviver por 64 anos (Adams & Duggan, 1999; Sutherland, et al. 1979; Yamamoto, 1995; Hense & Beckmann, 2006; Livingstone & Jaworski, 1980). Os acinetos germinam quando os níveis de nutrientes atingem um determinado valor e em temperaturas elevadas, sabendo-se que a sua suspensão na coluna de água pode acelerar este processo, formando os florescimentos ou *blooms* característicos das cianobactérias (Fig.2) (Hense & Beckmann, 2006; Adams & Duggan, 1999; Verspagen, et al. 2004; Barbiero, 1993).

A sua formação está ligada a diferentes fatores ambientais e estes variam consoante a espécie, fatores como: a concentração de fósforo na água, alterações na razão entre diferentes pigmentos intracelulares, temperatura da água, um aumento na razão entre a presença de carbono e azoto no ambiente e alterações na intensidade luminosa, são

apenas alguns exemplos que levam ao desenvolvimento de células de resistência em cianobactérias (Cohen et al. 1986; Park et al. 2024).

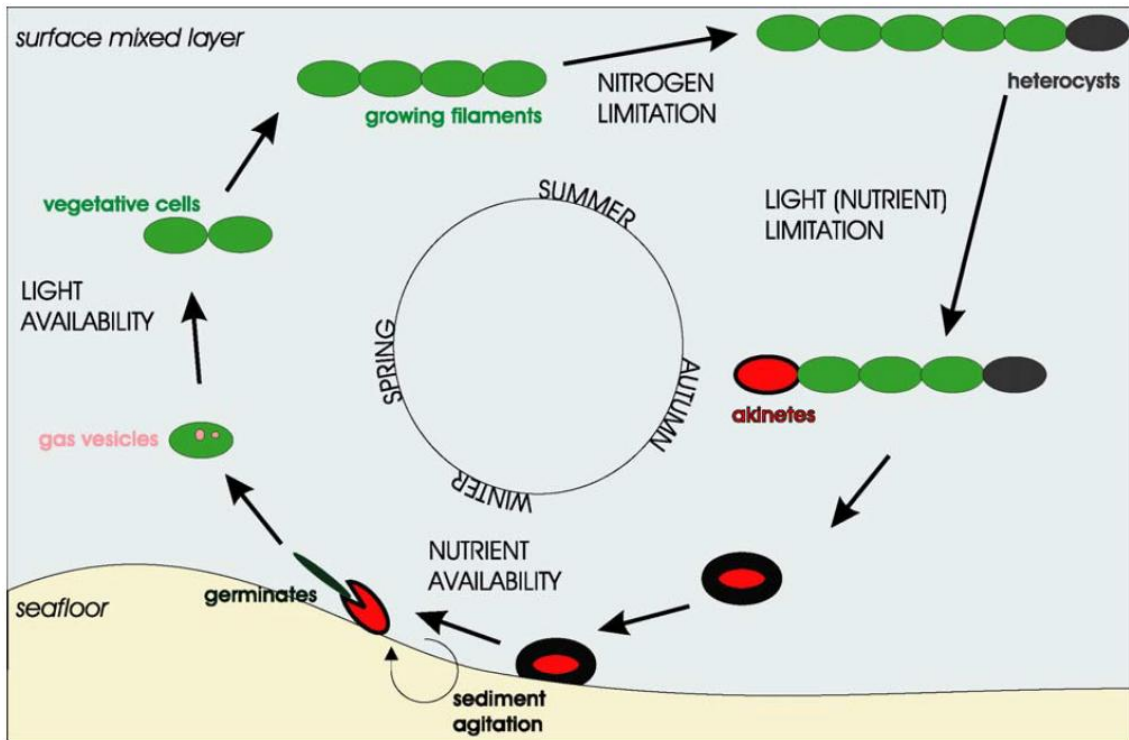


Figura 2) Representação do ciclo de vida das cianobactérias a partir de um acineto (Hense & Beckmann, 2006)

Temperaturas elevadas estimulam diretamente o crescimento de cianobactérias, uma vez que estas têm uma temperatura ótima de crescimento superior quando comparadas com outros organismos fotossintéticos (Tilman & Kiesling, 1984). Também apresentam outras características que as tornam competitivas, tais como, regulação de flutuação através de vesículas gasosas, tolerância a ambientes de pouca luminosidade e uma forte capacidade de obtenção de fósforo, sendo a última atípica para fixadores de azoto (Isvánovics et al. 2000; Smith, 1983). Demonstram a capacidade de regular a sua concentração de pigmentos consoante as condições de luz, num processo denominado de fotomorfogénese ou aclimatização cromática, com isto são capazes de se adaptar a vários ambientes com diferentes parâmetros de radiação, sem perder eficácia fotossintética (Li et al., 2019).

Algumas cianobactérias desenvolveram células especializadas para a captação de azoto atmosférico denominados heterocistos (Fig.3) (Abed et al. 2009; Capone et al. 2005).

Os heterocistos estão englobados ao longo dos tricomas. Durante o processo de diferenciação ocorre uma mudança drástica na morfologia dos tilacoides e como tal,

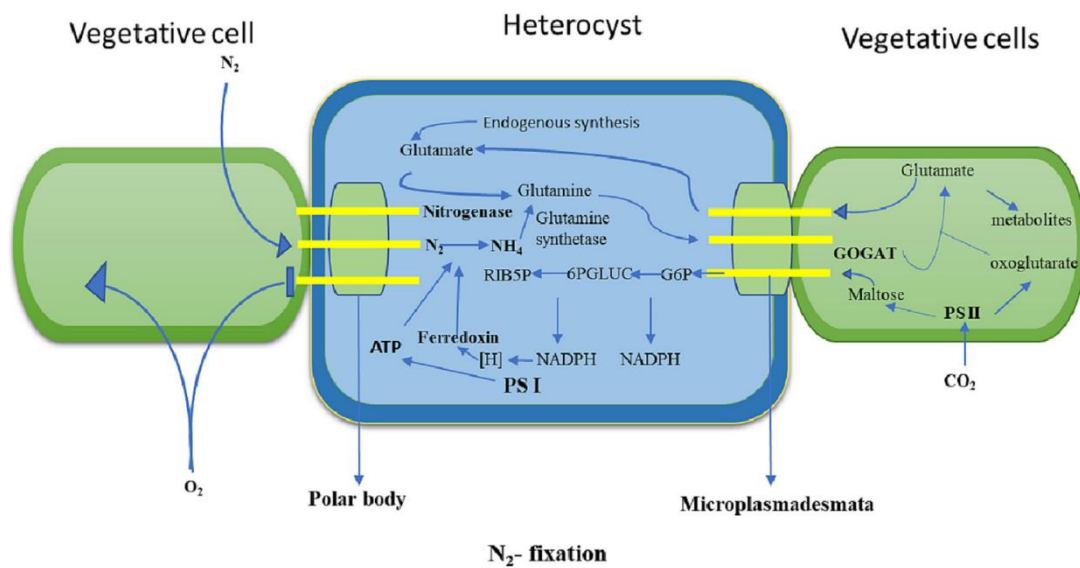


Figura 3) Representação de um heterocisto e o processo de fixação do azoto (Mandhata et al., 2023)

perdem capacidade de realizar a fotossíntese, pelo que têm que depender de outras células para o seu sustento (Golden & Yoon, 2003). São células de parede espessa com um ou dois nódulos polares, localizados só num lado ou em lados opostos da célula, consoante seja o heterocisto terminal ou intercalar, respetivamente (Whitton & Potts, 2012). No entanto, nem todas as cianobactérias precisam de heterocistos. Algumas desenvolveram estratégias fisiológicas para a fixação de azoto atmosférico em casos de boa oxigenação, nas células vegetativas. Dentro destas células a fixação de azoto ocorre em situação anaeróbica, pois a enzima nitrogenase, responsável pela conversão de azoto atmosférico em amónia, é sensível à presença de oxigénio. As paredes espessas dos heterocistos previnem a entrada de oxigénio atmosférico e a degradação do fotossistema II durante o processo de diferenciação, previne a produção de oxigénio através da fotossíntese. No entanto, nem todas as cianobactérias precisam de heterocistos, algumas desenvolveram estratégias fisiológicas para a fixação de azoto atmosférico em casos de boa oxigenação. Graças a esta característica, as cianobactérias tornaram-se nos maiores fixadores de azoto nos oceanos e um fator chave para um desenvolvimento de relações simbióticas com outras microalgas, plantas e até animais (Díez et al. 2008; Whitton & Potts, 2012). Adicionalmente, relações com fungos, briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas, são alguns exemplos (Rai, 1990).

Outra característica que as torna altamente competitivas em vários ambientes é a produção de toxinas, nomeadamente hepatotoxinas e neurotoxinas. As hepatotoxinas têm como base heptapeptídeos tóxicos, também chamados de microcistinas. Estas podem apresentar várias estruturas químicas, apresentando diferenças como a

desmetilação e a substituição de aminoácidos “L”. As nodularinas também fazem parte das hepatotoxinas, apresentando uma estrutura pentapeptídica. Estas toxinas têm uma ação inibitória sobre as fosfatases proteicas presentes no fígado, causando a redução das células que controlam a circulação de sangue no fígado, podendo levar ao desenvolvimento de hemorragias (Sinovan, 1996).

As neurotoxinas, podem-se dividir em anatoxinas-a e as suas variantes anatoxinas-a(s). As anatoxinas-a atuam como bloqueadores na transmissão neuromuscular, causando paralisia respiratória. Estas ligam-se aos recetores nicotínicos-acetilcolina das células nervosas, pois têm uma maior afinidade por estes recetores do que a própria acetilcolina (Carmichael et al. 1979). As anatoxinas-a(s) têm um efeito de anticolinesterase irreversível, o que causa a tensão muscular perpétua, pois não ocorre a degradação da acetilcolina nos recetores (Mahmood et al. 1988).

3.1 Aplicações

Além de sua importância ecológica, as cianobactérias têm atraído crescente interesse devido ao seu potencial biotecnológico em diversas áreas, incluindo bioenergia, agricultura, medicina e meio ambiente.

Tem-se tornado cada vez mais atrativa a produção de microalgas e de cianobactérias com o intuito de uma produção com zero desperdício, por serem consumidoras de dióxido de carbono, sendo a sua remoção da atmosfera algo desejável do ponto de vista ambiental, para além de existir custos reduzidos na sua obtenção (Nitsos et al. 2020). Adicionando também o facto de que diferentes espécies podem produzir diferentes

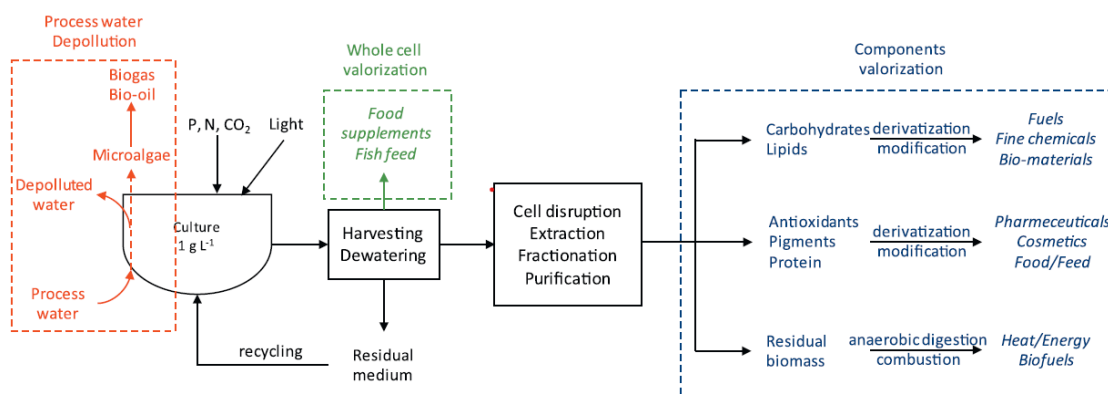


Figura 4) Resumo de uma biorefinaria de microalgas (Nitsos et al. 2020)

compostos de interesse e podendo a mesma espécie providenciar uma variedade de tais metabolitos para outras indústrias, desde lípidos para biocombustíveis até pigmentos para a área da cosmética (Fig.4 e 5).

No campo da medicina, as cianobactérias são uma fonte rica de substâncias bioativas com potencial terapêutico. Compostos isolados como policetídeos, amidos, alcaloides, ácidos gordos, indol e lipopéptidos, apresentando diferentes atividades biológicas como a antibacteriana, antifúngica, antialgal, antiprotozoária, antiviral anti-inflamatória e antitumoral (Zhang et al. 2024; Abed et al. 2009; Dahms et al. 2006; Shimizu, 2003) (Fig.5).

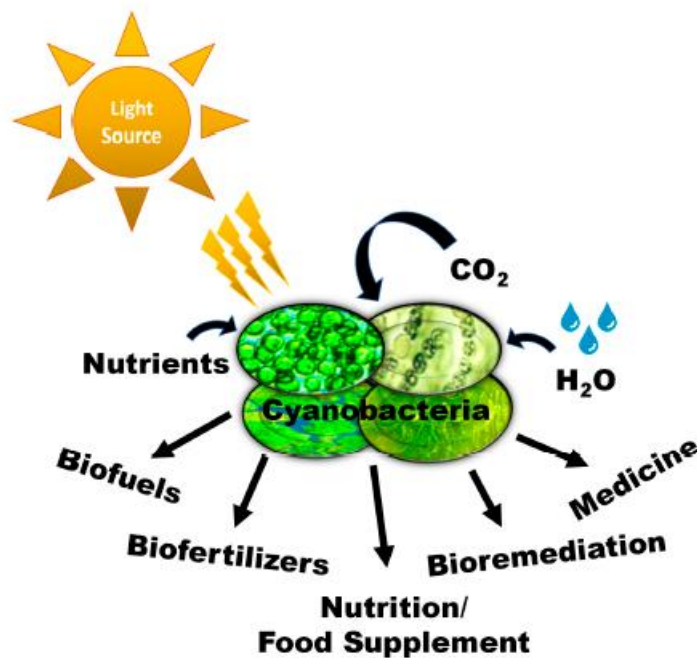


Figura 5) Resumo do potencial das cianobactérias em diferentes áreas (Zahra et al. 2020)

São fonte de metabolitos primários, tais como vitaminas, enzimas e pigmentos onde se destacam os carotenoides e as ficobiliproteínas, dois dos pigmentos mais importantes e mais utilizados pelas bioindústrias, por apresentar vários benefícios tanto para a saúde humana ou animal (quando utilizados como suplementos de ração), podendo também ser utilizados como agentes de coloração desses alimentos (Zahra et al. 2020). Também produzem metabolitos secundários, que ao invés dos mencionados anteriormente, estes não são essenciais para a sobrevivência e para o crescimento das cianobactérias, tendo como exemplo as biotoxinas, estas são produzidas por espécies de microalgas de modo

a protegerem-se de outras microalgas que competem pelo mesmo espaço. Estas toxinas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de pesticidas de origem biológica, por exemplo (Mandhata et al. 2023; Voloshko et al. 2008).

3.2 Ficobiliproteínas

Os principais recetores de luz nas cianobactérias e nas algas vermelhas, são os grandes complexos proteicos conhecidos como ficobiliproteínas, as quais se organizam em ficobilissomas. Estes podem ser divididos em 3 tipos morfológicos: hemielipsoidal, demidiscoidal e em “bundle shaped” (Li et al. 2019).

Todos os ficobilissomas (Fig.6) são constituídos pelo um grupo hidrofílico de ficobiliproteínas e um grupo hidrofóbico de péptidos. As ficobiliproteínas são um grupo macromolecular de proteínas em forma de disco ligados a ficobilinas (Li et al. 2019; Liu, 2016; Apt et al. 1995), que absorvem radiação em regiões do espectro onde a clorofila a tem uma reduzida absorção (MacColl, 1998).

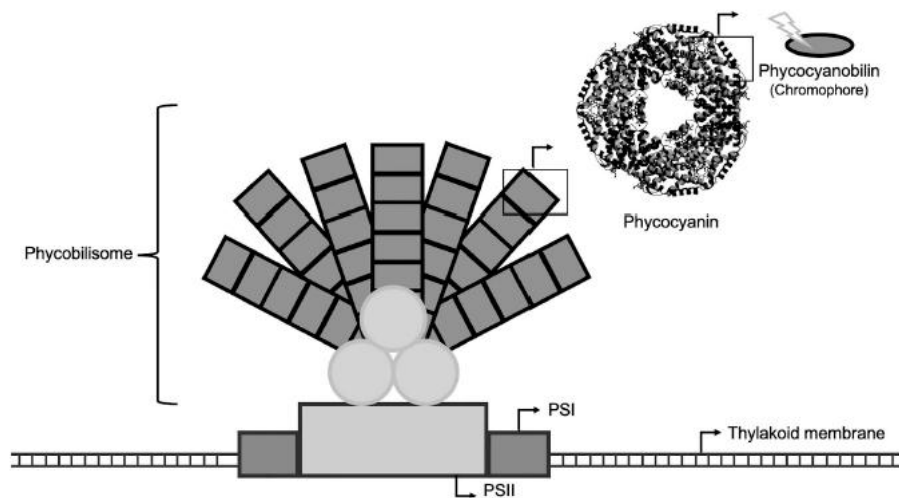


Figura 6) Representação de um ficobilissoma e os seus constituintes (Pagels et al.2019)

Nas cianobactérias estes complexos podem constituir até 50% do conteúdo proteico celular, podendo ser divididas em 3 grupos: aloficocianina, emitindo uma cor vermelha e absorção máxima entre 650 e 660 nm; a ficocianina, que emite uma cor azul, com o seu pico de absorção entre 610 e 625 nm; a ficoeritrina, manifesta uma cor vermelha e absorção máxima entre os 490 e 570 nm. A ficocianina é a ficobiliproteína mais abundante em cianobactérias (Bryant et al. 1979; Wildman & Bowen, 1974; Pagels et al. 2019).

As propriedades de absorção das ficobiliproteínas deve-se à presença de uma cadeia linear de tetrapirrol a que se dá o nome de ficobilina, a esta estrutura ligam-se as subunidades proteicas, como a ficocianina, através do aminoácido cisteína com um grupo de tioéter (Li et al. 2019).

As ficobiliproteínas têm numerosas aplicações. Para além de servirem para pigmentação de comidas e produtos cosméticos, também podem ter capacidades antivirais, anti-tumorais, antioxidante, anti-inflamatório e fortalecimento do sistema imunitário (Fig.7).

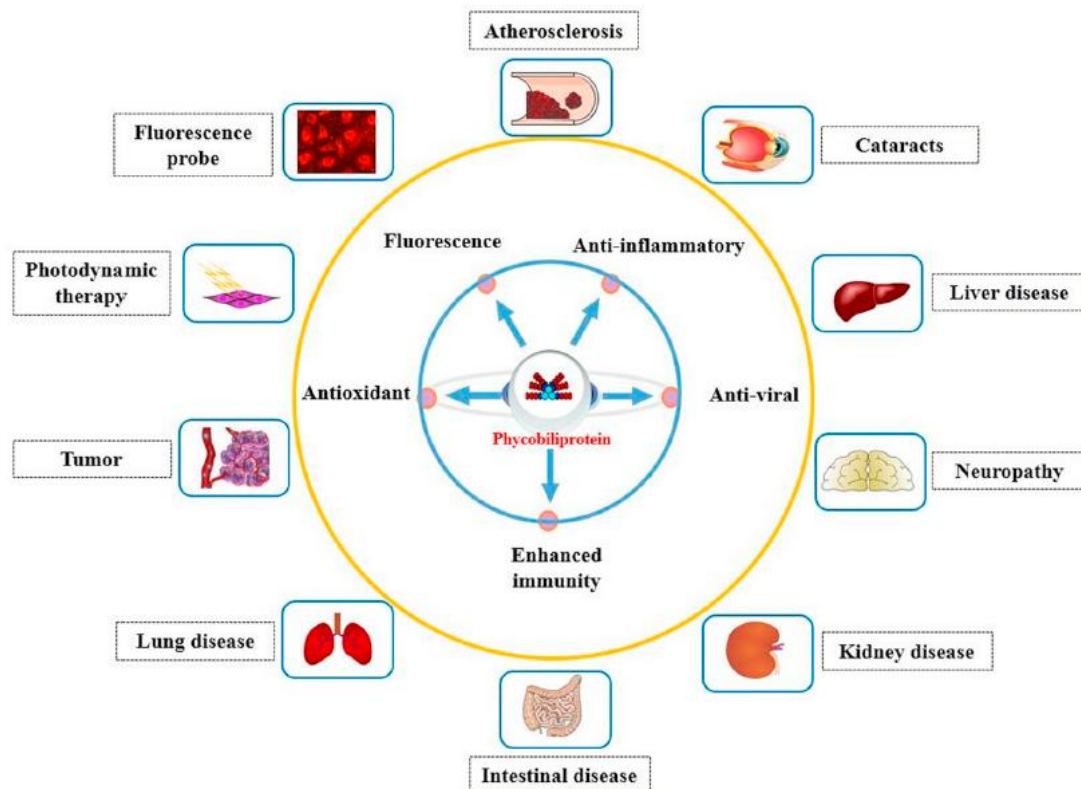


Figura 7) Aplicações das ficobiliproteínas (Li et al. 2019)

3.3 Exopolissacáridos

Os polissacáridos estão presentes em todos os organismos, exibindo uma grande variedade de estruturas bioquímicas, com diferentes combinações de ligações glicosídicas, entre 40 e 50 monossacáridos diferentes, incluindo também muitos açúcares complexos (Dellatre et al., 2016).

As funções fisiológicas de polissacáridos microbianos são muito diversas e dependem da sua estrutura e arquitetura. Desempenham o importante papel no desenvolvimento de flocos (Fig.8) e biofilmes, servindo de reservas energéticas para muitos tipos de células, sendo que se denominam de exopolissacáridos (EPS) (Dellatre et al., 2016).

Exopolissacáridos provenientes de cianobactérias demonstram ter propriedades químicas mais diversas comparando com os de origem microbiana (Tiwari et al., 2019). Foram primeiramente utilizados pela indústria devido às propriedades reológicas como agentes espessantes e gelificantes (Kraan, 2012). Estes polissacáridos já são utilizados como aditivos em comida, estabilizadores de solo, biorremediadores e mais recentemente como retentores de umidade e as suas capacidades antioxidantes nas indústrias da cosmética e farmacêutica (Kumar et al., 2018; Sharma et al., 2008; Tiwari et al., 2019; Zhao et al. 2013)

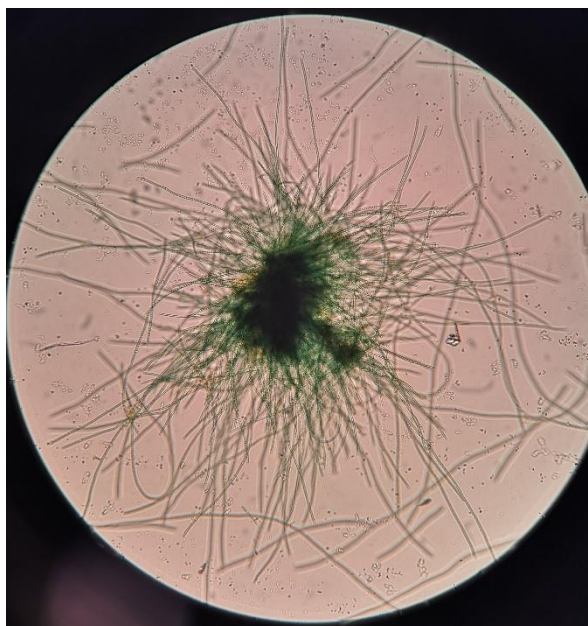


Figura 8) Aglomerados de *Anabaena* sp.

A composição química dos exopolissacáridos é variada consoante a espécie em causa, podendo ser uma combinação de vários açúcares como a glucose, galactose, ramnose, xilose, fucose, arabinose e manose. A glucose é o açúcar que se observa com mais frequência e que preenche em maior parte a composição dos EPS (Tabela I).

Tabela 1) Composição química de EPS em cianobactérias (Kumar et al.2018)

Organism	Polysaccharides (sugar composition)	Other	Reference
<i>Chroococcus minutus</i> SAG B 41.79	Glc (+), Man, Xyl, Ara, 4MS	AA	2
<i>Gloeothece</i> PCC 6501	Gal (+), Glc, Man, Rha, Xyl, 1MS	UA, AA	52
<i>Calothrix parietina</i>	Gal, Glc (+), Man, Rha, Ara, Xyl, Fuc, 2 MS	UA, AA, As	53
<i>Fischerella</i> PCC 7414	Gal, Glc (+), Man, Xyl, Fuc, 1MS	UA, AA, As, sulphate	54
<i>Anabaena cylindrical</i>	Gal, Glc (+), Man, Xyl, Fuc		55
<i>Nostoc</i> IARI 221	Gal, Glc (+), Man, Rha, Xyl, Ara	UA	56
<i>Microcystis flos-aquae</i> C3-40	Gal, Glc, Man, Rha, Xyl	UA (+)	57
<i>Phormidium foveolarum</i> MEU, C52	Gal, Glc (+), Man, Ara±, Fuc, Rha, Xyl, Rib±	UA, AS±, sulphate	58
<i>Phormidium ectocarpi</i> N 182, K5, ME3, C86 PCC 7375	Gal, Glc (+), Man, Rha, Xyl, Fuc	UA, AS±, sulphate	58
<i>Phormidium minutum</i> D5, NBS, RT6	Gal, Glc (+), Man, Rha, Xyl, Ara, Fuc	UA, AS±, sulphate	58
<i>Phormidium</i> sp. PNG 91, 90-14/1,CCAP 1464/3, CCAP1464/4	Gal, Glc (+), Man, Rha, Xyl, Ara±, Fuc±, Rib±	UA, sulphate	58
<i>Oscillatoria amphibian</i> PCC 7105	Gal, Glc (+), Man, Rha, Xyl, Fuc	UA, sulphate	58
<i>Oscillatoria corallinae</i> CJ 1	Gal, Glc (+), Man, Rha, Xyl, Fuc	UA, sulphate	58
<i>Lyngbacon fervoides</i> S 9 g	Gal, Glc (+), Man, Rha, Xyl, Ara, Fuc	UA, AS	58
<i>Cyanothece</i> 16Som2	Gal, Glc (+), Man, Xyl, Fuc, Rha	UA	3
<i>Cyanothece</i> CA3	Glc, Man, Ara (+), Fuc, Rha	UA	3
<i>Cyanothece</i> CE9	Gal, Glc (+) Man, Fuc, Rha	UA	3
<i>Cyanothece</i> ET2	Gal, Glc, Man Ara (+), Fuc, Rha	UA	3
<i>Cyanothece</i> IR20	Gal, Glc, Man, Rib, Fuc, Rha (+)	UA	3
<i>Mastigocladus laminosus</i>	Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc		59
<i>Microcoleus vaginatus</i>	Ara, Rha, Fuc, Xyl, Man (+), Gal, Glc	UA, MS	60
<i>Nostoc</i> sp.	Rha, Xyl, Man, Gal, Glc (+)	MS, AA	60
<i>Phormidium tenue</i>	Ara (+), Rha, Man, Gal, Glc	UA	60
<i>Scytonema javanicum</i>	Ara, Rha, Xyl, Man, Gal, Glc (+)		60
<i>Phormidium tenue</i>	Ara (+), Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc	AA	21
<i>Plectonema battersii</i> strain GF	Ara, Fuc Xyl Glc (+) Gal Man	UA, sulphate	61
<i>Chroococcus submarines</i> strain BM	Rha, Fuc, Xyl (+), Glc, Gal, Man	UA, sulphate	61
<i>Rhabdoderma rubrum</i> strain CH	Fuc, Xyl (+), Glc, Gal, Man	UA, sulphate	61
<i>Johannesbaptistia pellucida</i> strain GC	Ara, Rha, Fuc, Xyl, Glc, Gal, Man	UA, sulphate	61
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	Rib, Xyl, Glc (+)	AA	40
<i>Oscillaria</i> sp.	Rib, Xyl, Glc (+)	AA	40
<i>Nostoc carneum</i>	Xyl, Man (+)	AA	40
<i>Nostoc insulare</i> 54.79	Glc	UA, MS, AA	62
<i>Arthrospira platensis</i>	Ara, Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc	UA, AA	63
<i>Nostoc commune</i>	Xyl, Man, Gal, Glc (+)	AA	64
<i>Nostoc verrucosum</i>	Xyl, Man (+), Glc (+)	UA	64
<i>Arthrospira platensis</i> strain MMG-9	Fruc, Fucose, Gal, Glc (+), Man, Rha, Rib, Xyl	UA	65
<i>Microcoleus vaginatus</i>	Rha, Xyl, Man, Gal, Glc (+)	AA	66
<i>Nostoc carneum</i>	Xyl (+), Glc	UA, sulphate	67

A composição dos EPS depende de fatores como temperatura, intensidade da luz, concentração de sulfato, fosfato, potássio, iões metálicos e até a idade do microrganismo afeta a sua constituição.

Tendo em conta à sua composição química, os exopolissacáridos podem ser divididos em 2 grupos: homopolissacáridos e heteropolissacáridos. Denominam-se homopolissacáridos quando são compostos por apenas um tipo de monossacárido, sintetizado a partir de sacarose. Designam-se heteropolissacáridos, quando têm na sua composição vários açúcares de elevada massa molecular (Kumar et al. 2018).

3.4 Cultivo de cianobactérias

O cultivo de microalgas pode ser realizado em sistemas abertos e em sistemas fechados, conhecidos por fotobioreatores. Sistemas abertos podem ainda ser divididos

em naturais, quando utilizando massas de água naturais, ou artificiais, quando se trata de tanques artificiais. Este último tipo de sistemas é mais económico, na sua construção e manutenção e também permite explorar condições específicas de crescimento e a inoculação com maior concentração de inóculo (Singh & Sharma, 2012; Ugwu et al., 2008). Um fotobioreator pode ser descrito como um dispositivo fechado e iluminado, para a produção de culturas. São mais caros na sua construção, mas possuem vantagens como minimizar contaminações, maior retenção de CO₂ e maior controlo nas condições de crescimentos (Kumar et al. 2011).

O método mais comum para o cultivo de *Anabaena* sp. é através de sistema “Batch”, onde se coloca um volume conhecido de inóculo da microalga de interesse num sistema fechado. Neste método de crescimento não se realiza a adição ou remoção do conteúdo do reator e deste modo a concentração celular vai crescendo até esgotar os nutrientes inicialmente colocados (Richmond, 2004; Watanabe, 2005). Os sistemas de cultura “Batch” apresentam um padrão de crescimento característico, podendo-se destacar diferentes fases de crescimento consoante a tendência de crescimento (Barsanti & Gualtieri, 2014).

O crescimento dos organismos fotossintéticos, sejam cianobactérias, microalgas, macroalgas ou plantas carece de macronutrientes e de micronutrientes. As cianobactérias necessitam de 4 macronutrientes, o carbono, o azoto, o fósforo e o potássio, tal como de micronutrientes, como a sílica, cálcio e sódio, entre outros, sendo que os últimos não limitam substancialmente o crescimento (Knud-Hansen et al. 1998). Outro fator limitante é a troca de gases, visto que em grandes concentrações de biomassa, a escassez de carbono torna-se numa limitação ao crescimento, tal como o oxigénio produzido por fotossíntese, podendo atingir níveis inibitórios ao crescimento, caso não sejam controlados (Christenson & Sims, 2011; Carvalho et al. 2006).

Mesmo que a falta de carbono seja um fator limitante, a atmosfera é uma fonte quase infinita, mesmo sendo de transferência lenta, como tal o azoto e fósforo tendem a ser os parâmetros mais preocupantes. A razão entre azoto e fósforo deve ser de 16 mol para 1 mol, respetivamente, estes valores foram estimados realizando a média da presença destes dois nutrientes em várias espécies, que varia entre 8 até 45 mol (Klausmeier et al. 2004; Redfield et al. 1963).

Por vezes, realiza-se a desnutrição intencional das microalgas para aumentar o valor económico da biomassa, não só porque reduz diretamente os custos, pois há uma redução nos nutrientes inseridos no meio, mas também ao induzir stress na cultura esta

pode produzir mais subprodutos de interesse, de modo a tentar contrariar esse stress, no entanto, estas ações provocam também uma redução na taxa de crescimento (Christenson & Sims, 2011), e dependente da espécie, este stress induzido pode trazer um maior valor comercial acrescido ou se não compensa a baixa concentração de biomassa.

Dependendo das características da cultura de interesse, pode ser difícil evitar contaminações, sendo necessário aumentar o controlo do ambiente de crescimento, o que por sua vez aumenta os custos de produção. Outro fator a ter em conta é a disponibilidade de espaço, quer seja terrestre e/ou marinho. Um espaço maior terá maiores custos de manutenção e de controlo ambiental da cultura e pode também ser um risco para a contaminação da cultura de interesse (Christenson & Sims, 2011).

O maior desafio não se encontra produção de microalgas, mas sim na sua extração e nos processos de “downstream” para a obtenção de bioprodutos de interesse (Uduman et al 2010).

3.5 Processos de extração e de purificação de metabolitos

Um processo de recolha de biomassa para ser eficaz, deve permitir a recuperação de uma maior concentração, sendo ao mesmo tempo um processo de custo moderado (Barros et al., 2015; Danquah et al., 2009). A primeira fase de recolha é, geralmente a mais cara, contribuindo para cerca de 20 a 30% do custo total de produção (Gudin & Therpenier, 1986), e é também a que vai influenciar todas as fases seguintes, tendo sempre em conta o produto final desejado quando se escolhe a metodologia, para tal é importante considerar fatores como humidade, concentrações de sal, danificação celular e outras características específicas de cada espécie (Molina et al., 2003).

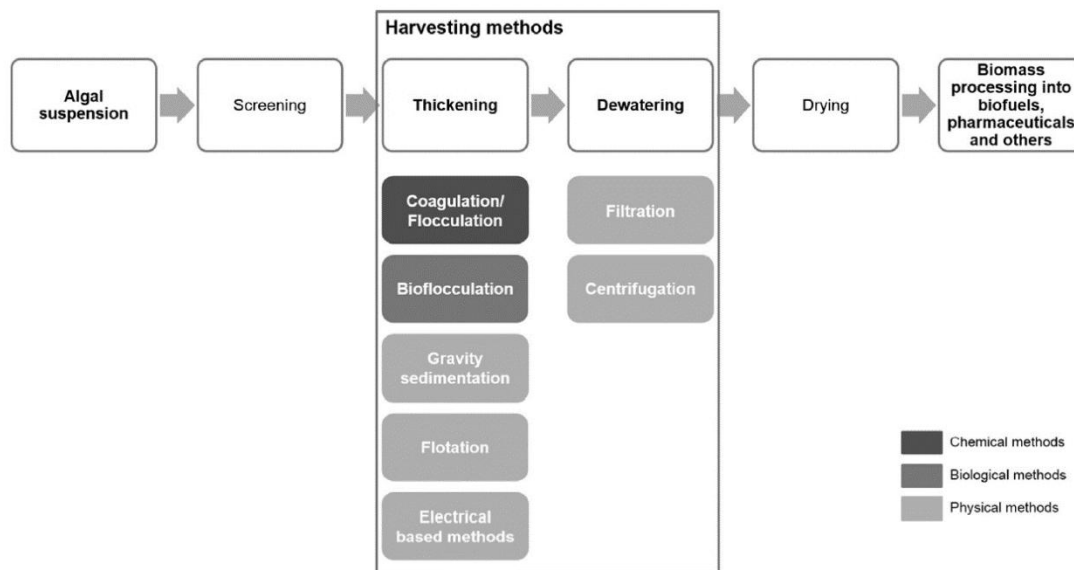


Figura 9) Diagrama de processos para extração e secagem de microalgas (Barros et al. 2015)

Atualmente os processos de recolha de biomassa podem ser mecânicos, químicos, biológicos ou elétricos (Fig.9) e ainda é possível combinar diferentes métodos, de modo a reduzir custos. Os métodos mecânicos são os mais utilizados por serem mais fiáveis, no entanto, por vezes é necessária uma fase prévia de espessamento ou coagulação para a aumentar a eficácia da extração (Schlesinger et al., 2012; Christenson & Ronald, 2011; Grima et al., 2003).

A filtração tende a ser a menos utilizada, por ser um processo lento e dispendioso. A filtração por vácuo ou por pressão tem vindo a ser favorecida para a recuperação de microalgas de grandes dimensões, a centrifugação é o método mais utilizado dos processos físicos pela sua capacidade de processar grandes volumes, a uma velocidade relativamente alta e por manter a biomassa intacta e bem separada do meio, como tal utiliza-se esta metodologia para a obtenção de produtos de maior valor. Por outro lado, utiliza-se o processo de sedimentação gravitacional, por vezes assistido por floculação, quando o interesse é a extração de produtos de baixo valor, tal como restos de biomassa (Grima et al., 2003).

Após a recolha das microalgas, é necessário tornar os seus conteúdos mais acessíveis, para tal é necessário provocar uma ruptura da parede celular utilizando métodos físicos, químicos, enzimáticos e conjunções destes, obtendo-se assim diferentes extratos brutos. Os métodos físicos, como ultrassons e “Bead milling” tendem a ser mais utilizados pela sua eficácia e por manterem os conteúdos celulares inalterados e

intactos, sendo este um fator limitante nos processos de químicos que têm de ser escolhidos e ajustados consoante o produto que se pretende obter (Barros et al. 2015; Nitsos et al. 2020). Esta fase deve ocorrer de forma rápida, evitando o risco de degradação de certos produtos devido à exposição a temperatura ambiente. Para minimizar estas perdas pode-se realizar a secagem prévia da biomassa, existindo vários métodos de secagem, sendo a liofilização o mais utilizada em laboratório, mas demasiado dispendioso para utilizações a escalas de produção superiores, pelo que a secagem por “spray” é o método favorecido, por permitir um maior rendimento aquando da extração de produtos elevado valor, com a exceção de pigmentos aos quais aparenta contribuir para a sua deterioração (Grima et al., 2003).

De seguida procura-se extrair e purificar os metabolitos de interesse, utilizando-se diferentes solventes para a remoção de diferentes compostos, devido a diferentes afinidades, sendo o mais utilizado o etanol para a extração de ácidos gordos e de pigmentos (Belarbi et al. 2000), também se utiliza tampões aquosos para a obtenção de ficobiliproteínas, mas nestes casos não se pode realizar a secagem prévia da biomassa (Bermejo et al., 2001). Após a extração dos compostos recorre-se a métodos de cromatografia para os separar em melhor detalhe, podendo-se aplicar cromatografias de fase reversa e de gel de sílica, muitas utilizadas para a purificação de ácidos gordos e de pigmentos como a astaxantina (Medina et al., 1995; Giménez et al., 1998), as proteínas são normalmente purificadas através de cromatografia de troca iónica (Bermejo et al., 2001).

4. *Anabaena*

O género *Anabaena* sp. é um táxon de cianobactérias filamentosas não ramificadas, que desenvolvem heterocistos para fixação de azoto atmosférico. Conhecem-se aproximadamente 142 espécies, sendo que 80 se encontram em ambientes de água doce (Zapomělová et al. 2009; Mandhata et al. 2023).

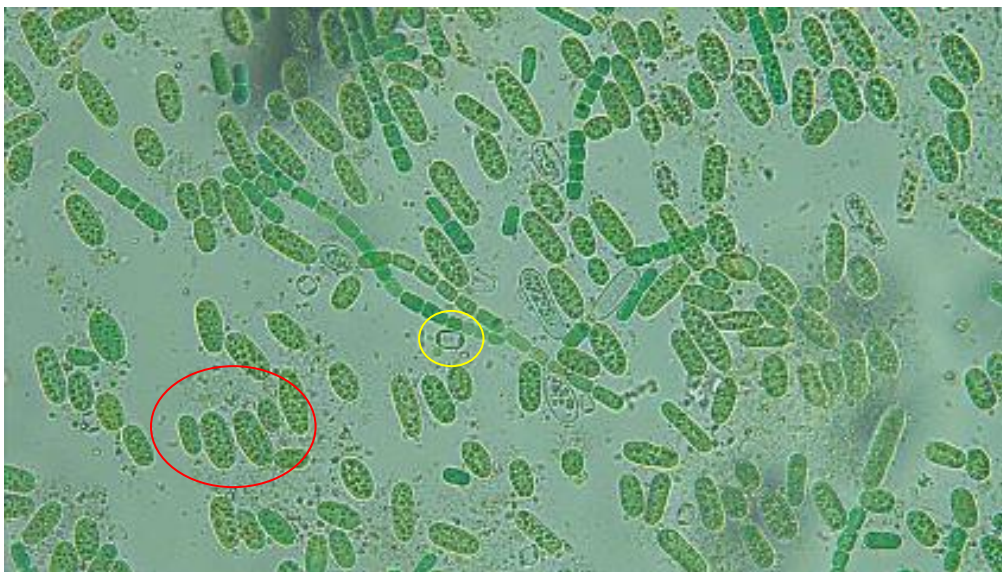


Figura 10) *Anabaena* sp. com acinetos destacados a vermelho e com heterocisto a amarelo

Pode apresentar tricomas direitos, curvos ou em espiral, as células podem ser cilíndricas, elípticas ou esféricas, com larguras entre 2 μm até 20 μm . Os heterocistos terminais ou intercalares possuem uma forma cilíndrica ou esférica, salvo algumas exceções, onde certas espécies apresentam heterocistos com uma forma cônica ou oval (Mandhata et al., 2023). Os acinetos são células esféricas, ovais ou cilíndricas, podendo estar separados entre si ou em alinhamento e intercalados, podendo-se desenvolver perto dos heterocistos ou ligeiramente afastados.

Este género, tal como o resto das cianobactérias, também produz uma grande variedade de compostos de interesse comercial: Proteínas, Alcaloides, Micosporinas, Enzimas, Fenóis e Polissacáridos.

As principais proteínas presentes neste género são a C-ficocianina e as ficobiliproteínas, que podem servir para a coloração e suplementação alimentar (Kaur et al., 2019; Nath et al., 2021) e também têm capacidades antibacterianas, antioxidantes e anticancerígenas (Osman et al. 2015; Shanab et al., 2012).

Os alcaloides são compostos orgânicos, cuja estrutura química contém um centro heterocíclico com um átomo de azoto, podem ter propriedades tóxicas, podendo atuar como inibidores de enzimas (Matsunaga et al., 1989; Voloshko et al., 2008), antibacterianos (Bruno et al., 1994), anticancerígenos, antioxidantes (Shanab et al., 2012) e antifúngicos (Shishido et al., 2015), sendo que comparando com as restantes cianobactérias, o género *Anabaena* produz a maioria destes alcaloides (Rantala-Ylinen et al., 2011).

As micosporinas (Mycosporine-like amino acids), têm ação direta na proteção contra radiação ultravioleta, podendo absorver radiação entre 310 e 362 nm e podem combater o stress oxidativo provocado pela mesma, conhecem-se 30 compostos da família das micosporinas em que todos possuem um grupo central de 4-deoxygadusol. A shinorina é um exemplo de uma micosporina que é utilizada como ingrediente para o desenvolvimento de protetores solares e que pode ser extraída a partir de cianobactérias, como *Anabaena* sp. (Yang et al., 2018).

Os fenóis são metabolitos secundários cuja função é a proteção contra fatores bióticos e abióticos stressantes como tal, apresentam capacidades antifúngicas (Gupta et al. 2012), antioxidantes e anticancerígenas (Shanab et al., 2012) e podem melhorar as atividades biocatalisadoras (Mays et al., 2020). Apresentando-se como flavonoides, lenhina e taninos, que têm a função de proteger a célula contra fatores de stress bióticos e abióticos, tal como a reparação de dano causado pela radiação ultravioleta (Mandhata et al. 2023)

As enzimas produzidas pelo género *Anabaena*, nomeadamente a quitosanase e a fenilalanina amónia-liase, apresentam capacidade antifúngica e de catalisador (Gupta et al., 2012; Mays et al., 2020).

Os polissacáridos produzidos por *Anabaena* dividem-se em exopolissacáridos, com potenciais para aditivos de rações (Nath et al., 2021), como agentes indutores de floculação (Khangembam et al., 2016) e com capacidade antioxidante (Tiwari et al., 2019). Por outro lado, produzem tetrassacáridos e ciclodextrinas com potencial anticancerígeno (Thammana et al. 2006).

4.1 *Anabaena cylindrica*

Anabaena cylindrica Lemmermann 1896 é uma cianobactéria filamentosa (Fig.11) conhecida pela sua capacidade de realizar fotossíntese e fixação de azoto, desempenhando um papel ecológico vital em diversos ecossistemas aquáticos e terrestres. Este organismo procarionte é composto por longas cadeias de células, chamadas tricomas, que incluem heterocistos especializados na fixação de azoto, permitindo a sobrevivência em ambientes pobres em nutrientes.

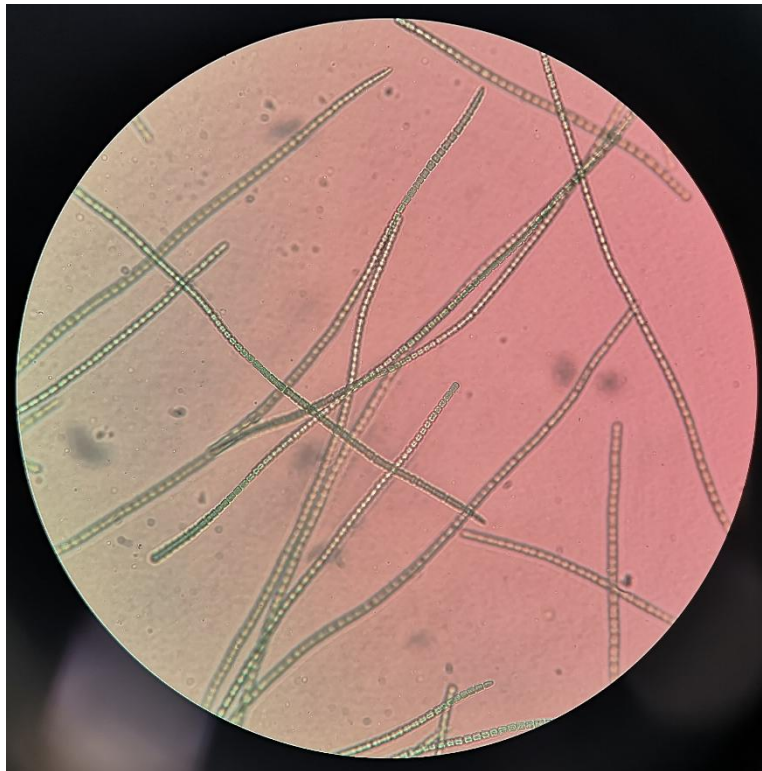


Figura 11) *Anabaena cylindrica*

Muitos fatores abióticos podem influenciar o crescimento e os metabolismos de *Anabaena cylindrica*, fatores como temperatura, pH, luminosidade, nutrientes, interações entre diferentes espécies podem provocar alterações a nível do crescimento, da fotossíntese, da pigmentação, do metabolismo do azoto, da morfologia e da produção de polissacáridos extracelulares (Gao et al., 2007; Moreno et al., 1998; Ohmori, 1989).

Fatores bióticos, ou seja, a presença de outros microrganismos no ecossistema, também influenciam a taxa de crescimento de *Anabaena cylindrica*, através de competição pelos mesmos recursos num espaço limitado. Quanto mais

microrganismos estiverem presentes, menos recursos estarão disponíveis para serem utilizados e o efeito sobre a taxa de crescimento será maior (Meng et al., 2021).

Mesmo em casos de competição, os fatores abióticos são um fator decisivo, para determinar qual a espécie cuja taxa de crescimento fica mais inibida ou acrescida, por exemplo se o pH for ideal para o desenvolvimento de *Anabaena cylindrica*, estes estarão mais aptos a competir pelos mesmos recursos e o seu crescimento será maior que os restantes microrganismos no seu ambiente (Ohmori, 1989).

Em cultivo, a taxa de crescimento de *Anabaena cylindrica* é principal indicador onde se podem observar estas alterações, pelo que variações na curva de crescimento normal (Fig.12) pode também indicar alterações nos processos metabólicos (Meng et al., 2021; Moreno et al., 1998).

A produção de exopolissacáridos são exemplos destes metabolitos, pois em situações de stress, como a exposição a níveis elevados de radiação, estes compostos fornecem proteção ao microrganismo, portanto quando as condições de crescimento são desfavoráveis, o aumento da produção de exopolissacáridos funciona como um indicador.

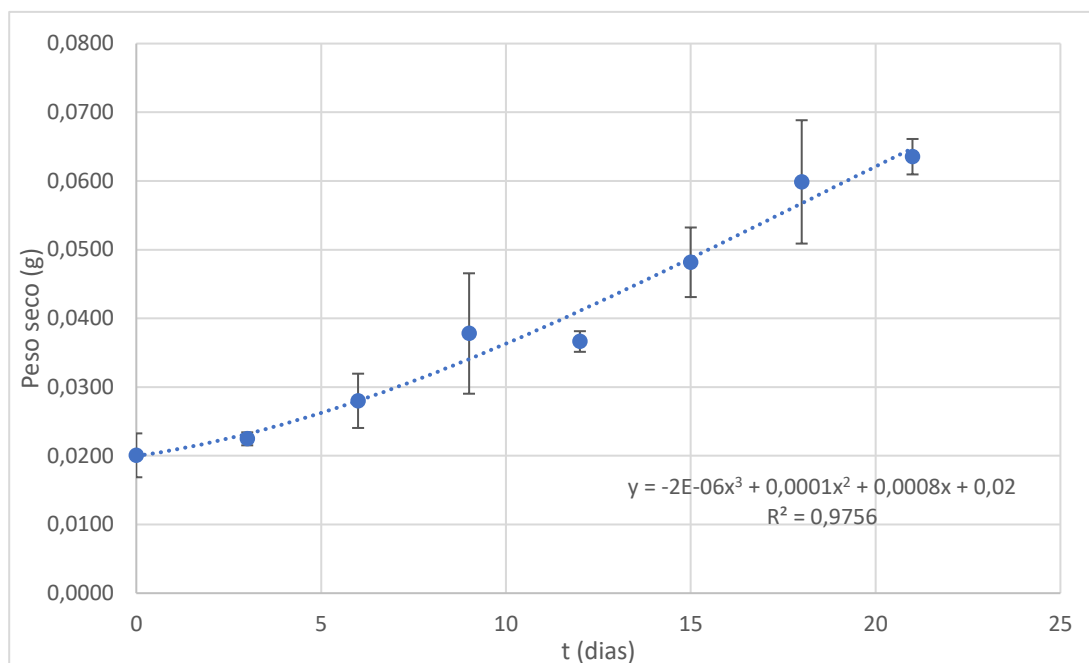


Figura 12) Taxa de crescimento de *Anabaena cylindrica*, obtida utilizando 21 balões de 250 mL cada um inoculado com 40 mL (20% do volume total de 200 mL) de *Anabaena cylindrica* e 160 mL de meio BG-11, em crescimento sob luz fluorescente branca fria e à temperatura de $19\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 21 dias, onde a cada 3 dias se removeram 3 balões para amostragem. A recolha de biomassa foi feita através de filtração a vácuo (Vacuubrand, ME2C NT), utilizando filtros de fibra de vidro (VWR, 47 mm de diâmetro; $1,2\ \mu\text{m}$ de malhagem). Deixou-se secar à temperatura ambiente, para eliminar o excesso de água (18h) e mediu-se o peso húmido numa balança analítica (Sartorius, TE 1245), de seguida cada amostra foi deixada a secar durante 24 horas na estufa a 60°C (Binder, FD 115) para obter o peso seco.

Os compostos produzidos por *Anabaena cylindrica* são vários e abrangem várias áreas de interesse para o ser humano (Tab.II). A produção de citoficina e de Balticidinas A-D, é de grande interesse para o campo da saúde, pois combatem a presença de fungos no muco das vias respiratórias, os quais podendo causar infeções e inflamações nestas vias (Shishido et al. 2015; Bui et al. 2014)

O glutamato é um componente chave para o metabolismo celular, através de ácido glutâmico, e para o sistema nervoso, como neurotransmissor. Apesar de ser produzido naturalmente pelo ser humano, a sua função de ativação neural, tem utilidade para o controlo da neurotoxicidade cerebral, que causa doenças como Alzheimer. Também tem a importante função de remoção de azoto residual no corpo humano através da enzima glutamato desidrogenase (Thomas et al. 1977).

O β -caroteno é um dos pigmentos acessórios produzido por esta espécie e o seu consumo é vital para o bem-estar do ser humano, pois é uma peça essencial para a síntese da vitamina A. Esta por sua vez ajuda na prevenção do cancro dos pulmões, por exemplo (Nandagopal et al. 2021)

O conteúdo vitamínico desta espécie é de interesse elevado, pois os suplementos de vitaminas já são muito explorados na indústria farmacêutica, com destaque para a vitamina C, que é essencial para o sistema imunitário do ser humano e para os processos antioxidantes no mesmo. A sua carência pode provocar doenças como escorbuto, em casos mais extremos. As vitaminas B2, B5 e B6, também produzidas por *Anabaena cylindrica*, são fundamentais para a síntese de hemácias. Tal como a vitamina C, estas não são produzidas pelo ser humano e como tal, têm que ser ingeridas regularmente provenientes de fontes animais ou vegetais. Uma deficiência destas vitaminas pode causar dermatites, o que leva à hipersensibilidade ao sol, podendo resultar em problemas mais graves como o desenvolvimento de cancro da pele (Aronson et al. 1977).

A C-ficocianina é a ficobilina principais desta espécie e muito cobiçada tanto na área de processamento de bens alimentares, devido à sua cor azul intensa, como na área da saúde, pois consegue prevenir o crescimento celular, sendo útil para o combate ao cancro (Basha et al. 2008). Também protege o fígado (Vediraja et al. 1998) contra o efeito de hepatotoxinas e apresenta capacidade antioxidante, tendo uma maior ação contra radicais de peróxido (Romay et al. 1998).

Tabela II) Compostos produzidos por Anabaena cylindrica e respetivas bioatividades

Composto	Bioatividade	Referências
Citoficina	Atividade antifúngica	Shishido et al. 2015
Balticidinas A-D	Atividade antifúngica	Bui et al. 2014
Glutamato	Regular o metabolismo celular; Neurotransmissor	Thomas et al. 1977
B-caroteno	Provitamina A	Nandagopal et al. 2021
Vitaminas B2, B5, B6	Essenciais para síntese de glóbulos vermelhos	Aronson et al. 1977
Vitamina C	Antioxidante, Fortalecimento do sistema imunitário	
C-Ficocianina	Antioxidante, Anticancerígena, Proteção contra a hepatotoxicidade	Sintra et al. 2021; Romay et al. 1998; Basha et al. 2008; Vediraja et al. 1998

5. Conclusão

No final deste trabalho pode-se concluir que as cianobactérias são um grupo complexo com vários compostos de interesse já explorados ou por explorar, adicionando ao interesse o facto de muitas espécies serem responsáveis pelo aparecimento de HABs, tendo vindo a ser mais frequentes com o aquecimento global e cujas consequências são desastrosas para muitos ecossistemas. O género *Anabaena* sp. destaca-se por serem dos poucos seres vivos com estratégias para se adaptar aos mais variados fatores abióticos e bióticos, com destaque para os heterocistos, células especializadas em fixar azoto atmosférico, tornando-se espécies competitivas em qualquer habitat, podendo até colonizar ambientes terrestres, graças aos seus pigmentos acessórios, como a ficocianina, e à produção de exopolissacáridos, por permitir uma maior resistência à radiação solar. A presença destes compostos tal como a sua concentração dentro dos microrganismos depende das suas condições de crescimento, por exemplo uma maior exposição a radiação solar induz uma maior produção de exopolissacáridos e de ficobiliproteínas, no cultivo de *Anabaena cylindrica*, pode-se ajustar as suas condições de crescimento consoante o metabolito de interesse. Todos estes compostos já são utilizados em áreas como a cosmética, estando presentes em protetores solares, na alimentação como agentes colorantes e até como suplementos para o fortalecimento do sistema imunitário desenvolvidos pela indústria farmacêutica.

6. Bibliografia

- Aaronson, S., Dhawale, S. W., Patni, N. J., DeAngelis, B., Frank, O., Baker, H. 1977. The cell content and secretion of water-soluble vitamins by several freshwater algae. *Archives of Microbiology*, 112, pp. 57–59;
- Abed, R. M. M., Dobretsov, S., Sudesh, K. 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*. 106. pp. 1-12;
- Adams, D. G., Duggan, P. S. 1999. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. Tansley Review No. 107. *New Phytologist*. 144. pp. 3–33;
- Apt, K. E., Collier, J. L., Grossman, A. R., 1995. Evolution of the phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology*. 248, 79–96;
- Barbiero, R. P. 1993. A contribution to the life history of the planktonic cyanophyte *Gloeotricha echinulata*. *Archiv für Hydrobiologie*, 127, pp. 87–100.
- Barros, A. I, Gonçalves, A. L., Simões, M., Pires, J. C. M. 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 41. pp. 1489-1500;
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press;
- Belarbi, H., Molina, E., Chisti, Y. 2000. A process for high and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, pp. 516–529;
- Bermejo, R., Talavera, E. M., Alvarez-Pez J. M. 2001. Chromatographic purification and characterization of b-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Semipreparative HPLC separation and characterization of its subunits. *Journal of Chromatography A*, 917, pp. 135– 145;
- Bruno, M., Barbini, D. A., Pierdominici, E., Serse, A. P., Ioppolo, A. 1994. Anatoxin-a and a previously unknown toxin in *Anabaena planctonica* from blooms found in Lake Mulargia (Italy). *Toxicon*, 32, pp. 369–373;
- Bryant, D. A., Guglielmi, G., de Marsac, N., Castets, A. M., Cohen-Bazire, G., 1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes, a model. *Archives of Microbiology*, 123, pp. 113–127;
- Bui, T. H., Wray, V., Nimtz, M., Fossen, T., Preisitsch, M., Schröder, G., Wende, K., Heiden, S. E., Mundt, S. 2014. Balticidins A-D, antifungal hassallidin-like

- lipopeptides from the Baltic Sea cyanobacterium *Anabaena cylindrica* Bio33. *Journal of Natural Products*, 77, pp. 1287-1296;
- Carmichael, W. W., Biggs, D. F., Peterson, M. A. 1979. Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Toxicon*, 17(3), pp. 229-236;
 - Carvalho, A., Meireles, L., Malcata, F. 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*, 22, pp. 1490–1506;
 - Capone, D. G., Burns, J. A., Montoya, J. P., Subramaniam, A., Manaffey, C., Gunderson, T., Michaels, A. F., Carpenter, E. J. 2005. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical cycles*, Vol. 19, GB2024;
 - Christenson, L. & Ronald, S. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*. 29. pp. 686–702;
 - Chorus, I. & Bartram, J. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management. *E & FN Spon, London and New York*;
 - Cohen, Y., Jørgensen, B. B., Revsbech, N. P., Poplawski, R. 1986. Adaptation to Hydrogen Sulfide of Oxygenic and Anoxygenic Photosynthesis among Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 51, No. 2, pp. 398-407;
 - Dahms, H., Ying, X., Pfeiffer, C. 2006. Antifouling potential of cyanobacteria: a mini-review. *Biofouling*, 22(5), pp.317-327;
 - Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Michaud, P. 2016. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 34, pp. 1159-1179;
 - Díez, B., Bergman, B., El-Shehawy. 2008. Marine diazotrophic cyanobacteria: Out of the blue. *Plant Biotechnology*. 25. pp. 221-225;
 - Dor, I. & Danin, A. 1996 Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel. *Archiv für Hydrobiologie, Supplement*. 117, *Algological Studies*, 83, 197-206
 - Dordević, D., Jančíková, S., Vítězová, M., Kushkevych, I. 2020. Hydrogen Sulfide Toxicity in the Gut Environment: Meta-Analysis of Sulfate-Reducing and Lactic

- Acid Bacteria in Inflammatory Processes. *Journal of Advanced Research*, 27, pp. 55-69;
- Giménez G. A., González, I. M. J., Medina, R. A., Grima, M. E., Salas, G. S., Cerdán, E. L. 1998. Downstream processing and purification of eicosapentaenoic (20:5n-3) and arachidonic acids (20:4n-6) from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Bioseparation*, 7, pp. 89– 99;
 - Grima, E. M., Belarbi, E. H., Fernández, F. G. A., Medina, A. R., Chisti, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*. 20. pp. 491–51;
 - Golden, J. W. & Yoon, H. 2003. Heterocyst development in *Anabaena*. *Current opinion in Microbiology*, 6, pp. 557-563;
 - Gupta, V., Prasanna, R., Srivastava, A. K., Sharma, J. 2012. Purification and characterization of a novel antifungal endo-type chitosanase from *Anabaena fertilissima*. *Annals of Microbiology*, 62 (3), pp. 1089–1098;
 - Hense, I. & Beckmann, A. 2006. Towards a model of cyanobacteria life cycle—effects of growing and resting stages on bloom formation of N₂-fixing species. *Ecological Modelling*, 195, pp. 205-218;
 - Hong, Y., Steinman, A., Biddanda, B., Rediske R., Fahnenstiel, G. 2006. Occurrence of the toxin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Mona and Muskegon Lakes, Michigan. *Journal of Great Lakes Research*, 32, pp. 645–652;
 - Humm, H.J. & Wicks, S.R. 1980 Introduction and Guide to the Marine Bluegreen Algae. John Wiley & Sons, New York, pp. 194;
 - Isvánovics, V., Shafik, H. M., Présing, M., Juhos, S. 2000. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biology*, 43, pp. 257–275;
 - Klausmeier, C. A., Litchman, E., Daufresne, T., Levin, S. A. 2004. Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature*, 429 pp.171–174;
 - Kaplan-Levy, R. N., Hadas O., Summers, M. L., Rücker, J., Sukenik, A. 2010. Akinetes: Dormant Cells of Cyanobacteria. *Topics in Current Genetics*, 2, pp. 5-27;
 - Kaur, S., Khattar, J. I. S., Singh, Y., Singh, D. P., Ahluwalia, A. S. 2019. Extraction, purification and characterisation of Phycocyanin from *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5: as a natural and food grade stable pigment, *Journal of Applied Phycology*, 31, pp.1685–1696;

- Knud-Hansen, C. F., McElwee, K., Baker, J., Clair, D. 1998. Pond fertilization: ecological approach and practical application. *Pond Dynamics/Aquaculture Collaborative Research Support Program, Oregon State University*;
- Kraan, S., 2012. Algal polysaccharides, novel applications and outlook. Edited by Chang, C. F. Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. *InTech*, Croatia, pp. 489–532;
- Kumar, D., Kaštánek, P., Adhikary, S. P. 2018. Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application. *Current Science*, Vol. 115, NO. 2, pp. 234-241;
- Kumar, K., Dasgupta C. N., Nayak B., Lindblad P., Das D. 2011. Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresour Technol*, 102, pp. 4945–4953;
- Kushkevych, I., Bosáková, V., Vítězová, M., Rittmann, S. K. -M. R. 2021. Anoxygenic Photosynthesis in Photolithotrophic Sulfur Bacteria and Their Role in Detoxication of Hydrogen Sulfide. *Antioxidants*, 10, 829;
- Li, W., Su, H., Pu, Y., Chen, J., Liu, L., Liu, Q., Qin, S. 2019. Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects. *Biotechnology Advances*. 37, pp. 340-353;
- Liu, L. N. 2016. Distribution and dynamics of electron transport complexes in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1857, pp. 256-265;
- Livingstone, D. & Jaworski, G. H. M. 1980. The viability of akinetes of blue-green algae recovered from the sediments of Rostherne Mere. *British Phycological Journal*, 15 (4), pp. 357-364;
- MacColl, R., 1998. Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, 124, pp. 311–334;
- Mahmood, N. A., Carmichael, W. W., Pfahler, D. 1988. Anticholinesterase poisonings in dogs from a cyanobacterial (blue-green algae) bloom dominated by *Anabaena flos-aquae*. *American Journal of Veterinary Research*, 49, pp. 500-503.
- Mandhata, C. P., Bishoyi, A. K., Sahoo, C. R., Maharana, S., Padhy, R. N. 2023. Insight to biotechnological utility of phytochemicals from cyanobacterium *Anabaena* sp.: An overview. *Fitoterapia*. 169, 105594;
- Matsunaga, S., Moore, R. E., Niemczura, W. P., Carmichael, W. W. 1989. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *Journal of the American Chemical Society*, 111, pp. 8021–8023;

- Mays, Z. J., Mohan, K., Trivedi, V. D., Chappell, T. C., Nair, N. U. 2020. Directed evolution of *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia-lyase (PAL) identifies mutants with enhanced activities. *Chemical Communications*, 56, pp. 5255–5258;
- Medina, A. R., A. Giménez G., Camacho F. G., Pérez, J. A. S., Grima E. M., Gómez, A. C. 1995. Concentration and Purification of Stearidonic, Eicosapentaenoic, and Docosahexaenoic Acids from Cod Liver Oil and the Marine Microalga *Isochrysis galbana*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72 (5), pp. 575-583;
- Meng, S. L, Chen, X., Wang, J., Fan, L. M., Qiu, L. P., Zheng, Y., Chen, J. Z., Xu, P. 2021. Interaction Effects of Temperature, Light, Nutrients, and pH on Growth and Competition of *Chlorella vulgaris* and *Anabaena* sp. Strain PCC. *Frontiers in Environmental Science*, 9, Art. 690191;
- Moisander, P. H., Cheshire, L. A., Braddy, J., Calandrino, E. S., Hoffman, M., Piehler, M. F., Paerl, H. W. 2012. Facultative diazotrophy increases *Cylindrospermopsis raciborskii* competitiveness under fluctuating nitrogen availability. *FEMS Microbiology Ecology* 79, pp. 800–811;
- Nandagopal, P., Steven, A. N., Chan, L. -W., Rahmat, Z., Jamaluddin, H., Noh, N. I. M. 2021. Bioactive Metabolites Produced by Cyanobacteria for Growth Adaptation and Their Pharmacological Properties. *Biology*, 10, 1061;
- Nath, P. C., Tiwari, O. N., Devi, I., Bandyopadhyay, T. K., Bhunia, B. 2021. Biochemical and morphological fingerprints of isolated *Anabaena* sp.: a precious feedstock for food additives. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11, pp. 2723–2733;
- Ohmori, M. 1989. cAMP in *Anabaena* cylindrical Rapid Changes in Cellular Levels in Response to Changes in Extracellular Environments. *Plant and Cell Physiology*, 30(6), pp. 911-914;
- Osman, S. M., Salama, A., Ghany, A. A. 2015. Antibacterial activity and mechanism of action of phycocyanin extracted from an Egyptian strain of *Anabaena oryzae* SOS13, *Zagazig Journal of Agricultural Biochemistry and its Application*, 42, pp. 309–321;
- Paerl, H. W. & Huisman, J. 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1, pp. 27–37;

- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoo, A., Vasconcelos, V. 2019. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 37, pp. 422-443;
- Rai, A. N. (1990) CRC Handbook of Symbiotic Cyanobacteria. *CRC Press, Boca Raton*, (p. 253);
- Rantala-Ylisen, A., Känä, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K., Gugger, M., Sivonen, K. 2011. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers, *Applied Environmental Microbiology*, 77, pp. 7271–7278;
- Redfield, A. C., Ketchum, B. H., Richards, F. A. (1963) The Influence of Organisms on the Composition of the Sea Water. In: Hill, M. N., Ed., *The Sea*, Vol. 2, *Interscience Publishers*, New York, 26-77;
- Reed, R. H., Chudek, J. A., Foster, R. and Stewart, W. D. P. 1984 Osmotic adjustment in cyanobacteria. *Archiv für Microbiologie*, 138, pp. 333-337;
- Richmond, A. (2004). Biological Principles of Mass Cultivation. In Handbook Of Microalgal Culture: Biotechnology And Applied Phycology. *Blackwell Science Ltd*. Oxford (p. 102);
- Rippka, R., Deruelle, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y. 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111, pp. 1-61;
- Romay, C., Armesto, J., Ramirez, D., González, R., Ledon, N., García, I. 1998. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. *Inflammation Research*. 47 (1), pp. 36–41;
- Sarma, T. A. 2013. Handbook of cyanobacteria. *CRC Press Taylor & Francis Group*, 3, pp. 142-143;
- Schlesinger A., Eisenstadt D., Bar-Gil A., Carmely H., Einbinder S., Gressel J. 2012. Inexpensive non-toxic flocculation of micro algae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. *Biotechnology Advances*. 30, pp. 1023–1030;
- Shanab, S. M., Mostafa, S. S., Shalaby, E. A., Mahmoud, G. I. 2012 Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, pp. 608–615;
- Sharma M., Kaushik, A., Somvir, Bala, K., Kamra, A. 2008. Sequestration of chromium by exopolysaccharides of *Nostoc* and *Gloeocapsa* from dilute aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 157, pp. 315-318;

- Shimizu, Y. 2003. Microalgal metabolites. *Current Opinion in Microbiology*, 6, pp. 236-243;
- Shishido, T., Humisto, A., Jokela, J., Liu, L., Wahlsten, M., Tamrakar, A., Fewer, D., Permi, P., Andreote, A., Fiore, M., Sivonen, K. 2015. Antifungal compounds from cyanobacteria. *Marine Drugs*. 13, pp. 2124–2140;
- Singh, R. N., Sharma, S. 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, pp. 2347-2353;
- Sintra, T. E., Bagagem, S. S., Ahsaie, F. G., Fernandes, A., Martins, M., Macário, I. P. E., Pereira, J. L., Gonçalves, F. J. M., Pazukib, G., Coutinho, J. A. P., Ventura, S. P. M. 2021. Sequential recovery of C-phycoerythrin and chlorophylls from *Anabaena cylindrica*. *Separation and Purification Technology*, 225, 117538;
- Sivonen, K. 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, 35(6), pp. 12-24;
- Smith, V. H. 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favour dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science*, 221, pp. 669–671;
- Sneath, P. H. A. 1992. International Code of Nomenclature of Bacteria, 1990 Revision. *American Society for Microbiology*, Washington, D. C.;
- Soares, M. C. S., Rocha, M. I. de A., Marinho, M. M., Azevedo, S. M. F. O., Branco, C. W. C., Huszar, V. L. M. 2009. Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. *Aquatic Microbial Ecology*, 57, pp. 137–149;
- Sutherland, J. M., Herdman, M., Stewart, W. D. P. 1979. Akinetes of the cyanobacterium *Nostoc pcc 7524*: macromolecular composition, structure and control of differentiation. *Journal of General and Applied Microbiology*. 115, pp. 273–287;
- Thammana, S., Suzuki, H., Lobkovsky, E., Clardy, J., Shimizu, Y. 2006. Isolation and structure assignment of an iminotetrasaccharide from a cultured filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. *Journal of Natural Products*, 69, pp. 365–368;
- Thomas, J., Meeks, J. C., Wolk, C. P., Shaffer, P. W., Austin, S. M., Chien, W. -S. 1977. Formation of Glutamine from [13N]ammonia, [13N]dinitrogen, and [14C]glutamate by Heterocysts Isolated from *Anabaena cylindrica*. *Journal of Bacteriology*, 129, N°3, pp. 1545-1555;
- Tiwari, O. N., Mondal, A., Bhunia, B., Bandyopadhyay, T. K., Jaladi P., Oinam G., Indrama, T. 2019. Purification, characterization and biotechnological potential of

- new exopolysaccharide polymers produced by cyanobacterium *Anabaena* sp. CCC 745. *Polymer*, 178, 121695;
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde G. M., Hoadley A. 2010. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2, 012701;
 - Ugwu, C. U., Aoyagi, H., Uchiyama, H. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour Technol*, 99, pp.4021–4028;
 - Vadiraja, B. B., Gaikwad, N. W., Madyastha, K. M. 1998. Hepatoprotective Effect of C-Phycocyanin: Protection for Carbon Tetrachloride and R-(+)-Pulegone-Mediated Hepatotoxicity in Rats. *Biochemichal and Biophysical Research Communications*, 249, Issue 2, pp. 428-431;
 - Verspagen, J. M. H., Snelder, E. O. F. M., Visser, P. M., Huisman, J., Ibelings, B. W., Mur, L. R. 2004. Recruitment of benthic *Microcystis* Cyanophyceae to the water column: internal buoyancy changes or resuspension? *Journal of Phycology*, 40 (2), pp. 260–270;
 - Vitousek, P. M., S. Hättenschwiler, L. O., Allison, S. 2002. Nitrogen and nature. *Ambio*, 31, pp. 97–101;
 - Voloshko, L., Kopecky, J., Safronova, T., Pljusich, A., Titova, N., Hrouzek, P., Drabkova, V. 2008. Toxins and other bioactive compounds produced by cyanobacteria in Lake Ladoga. *Estonian Journal of Ecology*, 57(2), pp.100-110;
 - Walther, G. R., Roques A., Hulme, P. E., Sykes, M. T., Pyšek, P., Kühn I., Zobel, M. 2009. Alien species in a warmer world: risks and opportunities. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, pp. 686–693;
 - Watanabe, M. M. 2005. Freshwater Culture Media. In R. Anderson (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (1st ed., pp. 13–20). Elsevier Inc;
 - Whitton, B. A. 1992 Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. Edited by N. H. Mann and N. G. Carr. *Photosynthetic Prokaryotes*. Plenum Press, New York, pp. 1-51;
 - Wildman, R. B., Bowen, C. C., 1974. Phycobilisomes in blue green algae. *Journal of Bacteriology*, 117, pp. 866–881;
 - Yamamoto, Y. 1995. Effect of desiccation on the germination of akinetes of *Anabaena cylindrical*. *Plant & Cell Physiology*, 16, pp. 749–752;
 - Yang, G., Cozad, M. A., Holland, D. A., Zhang, Y., Luesch, H., Ding, Y. 2018 Photosynthetic production of sunscreen shinorine using an engineered cyanobacterium, *ACS Synthetic Biology*, 7, pp. 664–671;

- Zahra, Z., Choo, D. H., Lee, H., Parveen, A. 2020. Cyanobacteria: Review of Current Potentials and Applications. *Environments*, 9, 13;
- Zapomělová, E., Jezberová, J., Hrouzek, P., Hisem, D., Řeháková, K., & Komárková, J. 2009. Polyphasic Characterization of Three Strains of *Anabaena Reniformis* and *Aphanizomenon Aphanizomenoides* (Cyanobacteria) and Their Reclassification to *Sphaerospermum* Gen. Nov. (Incl. *Anabaena Kisseleviana*). *Journal of Phycology*, 45(6), pp. 1363–1373;
- Zhang, T., Liu, D., Zhang, Y., Chen, L., Zhang, W., Sun, T. 2024. Biomedical engineering utilizing living photosynthetic cyanobacteria and microalgae: Current status and future prospects. *Materials Today Bio*, 27, 101154;
- Zhao, L., Fan, F., Wang, P., Jiang, X. 2013. Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity. *Applied Microbiology Biotechnology*. 97, pp. 2841–2850.