

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**Caracterização da cianobactéria *Rhabdoderma lineare*:
Uma abordagem fisiológica, bioquímica e metabólica**

Nicolás Ignacio Valdez

SÃO CARLOS

2022

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Botânica

Título: Caracterização da cianobactéria *Rhabdoderma lineare*: uma abordagem fisiológica, bioquímica e metabólica

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como pré-requisito à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Bolsista: Nicolás Ignacio Valdez

Orientadora: Ana Teresa Lombardi

São Carlos -Setembro/2022

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio incondicional em cada instancia da minha vida, sem o amor e esforço deles nunca teria chego até aqui.

Agradecimentos

Aos meus pais por todo o apoio ao longo da minha carreira.

À Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi pela orientação, pela confiança e pela oportunidade de fazer parte da sua equipe.

À Dra. Jaqueline Carmo da Silva por toda a ajuda e apoio ao longo da realização deste trabalho, mas principalmente pela sua amizade.

À Dra. Camila Manoel Crnkovic pela sua participação neste estudo.

À FAPESP pelo recebimento da Bolsa de Estudos (FAPESP, processo nº 2020/12575-1).

Resumo

Cyanobacteria é um grupo de organismos unicelulares, procariotos e fotossintetizantes. Possui uma enorme diversidade morfológica, fisiológica e metabólica e isto permite a aplicação destes organismos em diversas áreas. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a biomassa da cianobactéria *Rhabdoderma lineare* (3083) em relação a seu crescimento, fisiologia fotossintética, composição bioquímica, metabolitos secundários e toxicidade, avaliando seu potencial biotecnológico e possíveis aplicações comerciais. Para avaliação do crescimento foram testados 3 fotobiorreatores com caminhos óticos diferentes, sendo eles, Erlenmeyer, biorreator cilíndrico e frasco de cultura de tecido, no entanto, a utilização da intensidade de luz ótima durante os cultivos acabou gerando rendimentos similares nos 3 reatores. Posteriormente, realizaram-se cultivos em biorreatores cilíndricos onde determinou-se o rendimento de biomassa seca ($0,538 \pm 0,085 \text{ mg.mL}^{-1}$) e a taxa de crescimento ($0,50 \text{ d}^{-1}$). A análise por meio da fluorescência de pulso de amplitude modulada (PAM), levou à determinação dos seguintes parâmetros fotossintéticos: rendimento quântico máximo ($0,20 \pm 0,01$) e efetivo ($0,18 \pm 0,004$), irradiância saturante ($250 \mu\text{mol fótons m}^2 \text{ s}^{-1}$), taxa de transporte de elétrons máxima ($70 \mu\text{mol e}^- \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) e eficiência de absorção de luz ($0,27 \pm 0,009 \text{ m}^2/\text{mg Chl a}$), e a partir destes calculou-se a taxa teórica de fixação de CO_2 ($0,075 \pm 0,008 \text{ g C/mg Chl a . dia}$). Para a composição bioquímica de *R. lineare* obteve-se o conteúdo total de proteínas ($109,202 \pm 0,00135 \mu\text{g/mL}$), lipídios ($6,47 \pm 1,29 \text{ \%DW}$), carboidratos ($42,440 \pm 3,202 \mu\text{g/mL}$), clorofila a ($7,96 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$), carotenoides ($1,79 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$) e ficocianina ($11,201 \pm 3,734 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Extratos realizados a partir da biomassa demonstraram atividade antioxidante de 25% em DPPH, e nenhum efeito tóxico contra *Artemia salina*. Já a análise metabolômica desvendou a presença de glicerolipídeos, glicolipídeos e catabólitos defitilados de clorofila, mas não identificou toxinas nem compostos pertencentes ao metabolismo secundário. Quando comparada com as principais espécies de microalgas atualmente comercializadas para suplementação alimentar, *R. lineare* se destaca por apresentar um conteúdo superior de proteínas, conteúdos semelhantes dos demais compostos e uma aparente baixa toxicidade, evidenciando uma potencial aplicação para a espécie.

Palavras chave: fotossíntese, toxicidade, metabolômica, biomoléculas, fisiologia

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma das etapas laboratoriais 1 e 2, e determinações em cada uma delas.

Figura 2. Parâmetros de crescimento da cianobactéria *Rhabdoderma lineare*. **a)** Ln da concentração da clorofila *a in vivo* (mg L^{-1}) em função dos dias de cultivo; **b)** taxa de crescimento em função dos biorreatores utilizados; **c)** Biomassa seca (mg mL^{-1}) em função dos biorreatores utilizados; **d)** rendimento quântico máximo em função dos dias de cultivo. Barras brancas: biomassa seca inicial; barras pretas: biomassa seca final. Símbolos: círculo fechado: cultivos em Erlenmeyer; triângulo fechado: Frasco de cultura de tecido; quadrado fechado: biorreator cilíndrico. FCT= Frasco de cultura de tecido.

Figura 3. Parâmetros de crescimento da cianobactéria *Rhabdoderma lineare*. **a)** Ln da concentração da clorofila *a in vivo* (mg/L); **b)** biomassa seca (mg/mL) em função dos dias de cultivo.

Figura 4. Parâmetros fotossintéticos de *Rhabdoderma lineare*. **a)** Rendimento quântico máximo (Φ_M) em função dos dias de cultivo; **b)** Curva rápida de luz (RLC) em 72 h de cultivo representado como taxa relativa de transporte de elétrons (rETR, $\mu\text{mol elétrons m}^2 \text{s}^{-1}$) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR $\mu\text{mol ftons m}^2 \text{s}^{-1}$).

Figura 5: **a:** Rede molecular obtida para *Rhabdoderma lineare*. **b:** cluster apresentando resultados consistentes com a classe dos glicerolipídios. **c:** cluster apresentando resultados consistentes com a classe dos glicolipídeos. **d:** cluster apresentando resultados consistentes com catabolitos defetilados de clorofila identificados como Feoforbideo A e Metil-feoforbideo A.

Lista de tabelas

Tabela 1. Parâmetros fotossintéticos de *Rhabdoderma lineare* em 72 h de cultivo. Símbolos: Φ_{max} : rendimento quântico máximo; Φ_{efetivo} : rendimento quântico efetivo; E_k : irradiância saturante; ETRmax: taxa de transporte de elétrons máxima; P_b : taxa teórica de fixação de CO_2 .

Tabela 2. Composição bioquímica de *Rhabdoderma lineare* em 72 h, fase exponencial de crescimento sob condições ideais de cultivo.

Tabela 3. Tabela comparativa da composição bioquímica de *Rhabdoderma lineare* (este estudo), *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella salina*, com valores apresentados em % de biomassa seca. P=Proteínas, C=Carboidratos, L=Lipídios.

Tabela 4. Resultados do teste de toxicidade aguda de extratos de *R. lineare* contra *Artemia salina*

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

| | |
|---|--|
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CH ₃ CN | Acetonitrilo |
| H ₂ O | Água |
| K ₂ Cr ₂ O ₇ | Dicromato de potássio |
| α | Eficiência de absorção de luz |
| Φ_M | Rendimento quântico fotossintético máximo |
| Φ'_M | Rendimento quântico fotossintético efetivo |
| BG-11 | Blue Green Medium |
| Chl <i>a</i> | Clorofila <i>a</i> |
| DCM | Diclorometano |
| DDA | Data dependent analysis |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPH | 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl |
| DW | Peso seco |
| Ek | Irradiância saturante |
| ETR _{max} | Taxa de transporte de elétrons máxima |
| rETR | Taxa relativa de transferência eletrônica |
| FBR | Fotobioreator |
| FCT | Frasco de cultura de tecido |
| F _M | Fluorescência máxima |
| F ₀ | Fluorescência mínima |
| GNPS | Global Natural Product Social Molecular Networking |
| HRMS | Espectrometria de massa de alta resolução |
| LC ₅₀ | Concentração letal 50% |
| MeOH | Metanol |
| MS | Espectrometria de massa |
| N ₂ | Nitrogênio molecular |
| NRPS | Peptídeo Sintetase Não Ribossomal |
| PAM | Fluorescência de amplitude modulada |
| PAR | Radiação fotossinteticamente ativa |
| Pb | Taxa teórica de fixação de CO ₂ |
| PKS | Policetídeo Sintase |
| PSII | Fotosistema II |
| Q _A | Plastoquinona <i>a</i> |
| RLC | Curva rápida de luz |
| UPLC | Cromatografia líquida de ultra performance |

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Objetivos..... | 3 |
| 3. Material e métodos | 4 |
| 3.1. Condições de cultivos | 4 |
| 3.2. Etapa 1: Determinação do biorreator mais adequado para o cultivo de <i>Rhabdoderma lineare</i> | 5 |
| 3.3. Etapa 2: Estudo da fisiologia e composição bioquímica da biomassa | 6 |
| 4. Resultados e discussão | 11 |
| 4.1. Etapa 1: Determinação do biorreator mais adequado para o cultivo de <i>Rhabdoderma lineare</i> | 11 |
| 4.2. Etapa 2: Estudo da fisiologia e composição bioquímica de <i>Rhabdoderma lineare</i> | 13 |
| 4.2.1. Crescimento e parâmetros fotossintéticos | 13 |
| 4.2.2 Determinação bioquímica | 18 |
| 5. Conclusão..... | 25 |
| 6. Referências..... | 26 |

1. Introdução

Cyanobacteria formam um grupo de organismos dos mais abundantes e fundamentais para o funcionamento da biosfera, uma vez que cumprem um papel importante em diversos ciclos biogeoquímicos. Dentre eles, podemos elencar a participação na produção primária de biomassa, no suprimento global de oxigênio e na fixação biológica de carbono e nitrogênio (Kumari & Rai, 2020). Sendo organismos fotoautotróficos, são capazes de fixar o CO₂ atmosférico, utilizando energia luminosa para convertê-lo em energia química e biomassa.

São organismos unicelulares, procariotos e uma das formas de vida mais primitivas presentes no planeta (Singh et al. 2005). Podem ser de vida livre, formar colônias ou filamentos, sendo os últimos capazes de produzir células diferenciadas, tais como heterocistos especializados na fixação de nitrogênio e esporos resistentes ao clima, os acinetos (Singh et al. 2005). Exibem uma enorme diversidade morfológica, fisiológica e metabólica, podendo colonizar uma ampla gama de habitats, mas predominam nos ambientes aquáticos (Kumari & Rai, 2020). Por serem organismos unicelulares ou multicelulares simples, apresentam taxas de crescimento e de fixação de CO₂ maiores que das plantas terrestres e aquáticas, tornando-os eficientes no processo de bio-mitigação de CO₂ (Wang et al, 2008). Nesse quesito, agrega-se a vantagem de não dispenderem energia com a produção de caules ou outras estruturas, como ocorre nos vegetais vasculares.

Cianobacterias são capazes de modular sua composição de pigmentos para aperfeiçoar a captação de luz protegendo a célula de danos oxidativos (Gupta et al. 2013). Estes pigmentos, onde se incluem a ficocianina, os carotenoides e diversos compostos fenólicos, podem ser aplicados na indústria alimentícia e cosmética como corantes naturais (Priyadarshani & Rath, 2012; Gupta et al, 2013) e carregam ainda o potencial antioxidante, de grande interesse à indústria. A capacidade antioxidante traz diversos benefícios à saúde, como a

prevenção de doenças cardiovasculares, Alzheimer e alguns tipos de câncer, possuindo efeitos hepatoprotetores e anti-inflamatórios (Goiris et al, 2012). Acrescenta-se que muitos dos produtos previamente mencionados não são possíveis de serem produzidos por vias sintéticas devido à sua complexidade, evidenciando a importância das pesquisas relacionadas ao metabolismo das cianobactérias e suas potenciais aplicações na indústria.

Várias cianobactérias produzem metabólitos com efeitos tóxicos para a saúde humana e ambiental, conhecidos por cianotoxinas. Portanto, conhecer o potencial tóxico e/ou não tóxico de uma cepa de cianobactéria é fundamental antes de qualquer proposição para seu uso, qualquer que seja ele. A garantia de sucesso dos processos biotecnológicos relacionados às cianobactérias depende certamente da escolha da espécie e das condições de cultivo. Conhecer a fisiologia de novas espécies é uma meta condizente com a busca por novos compostos e suas aplicações e, definir condições de cultivo que possam potencializar a síntese dos compostos satisfaz os interesses da biotecnologia e do mercado. De acordo com Pulz & Gross (2004) para atingir esses objetivos, é necessário ter conhecimento da fisiologia, ecologia e taxonomia dos organismos envolvidos.

Este estudo trouxe como novidade investigar uma cepa de cianobactéria brasileira ainda pouco explorada (*Rhabdoderma lineare*) visando compreender sua fisiologia e composição bioquímica com potencial biotecnológico para possíveis aplicações comerciais. Com base nos resultados promissores que obtivemos quanto à produção de proteínas e biomassa seca, analisamos também o potencial tóxico e metabólica da cianobactérias. Esses resultados mostraram ausência de qualquer potencial tóxico nas condições cultivadas e, por isso, finalizamos o estudo sugerindo aplicação da cepa no setor alimentício, como fonte de proteínas.

2. Objetivos

Investigar *Rhabdoderma lineare*, uma cianobactéria ainda pouco explorada, caracterizando a sua fisiologia, composição bioquímica, toxicidade e metabolitos secundários, de modo a considerar seu potencial biotecnológico para possíveis aplicações comerciais.

3. Material e métodos

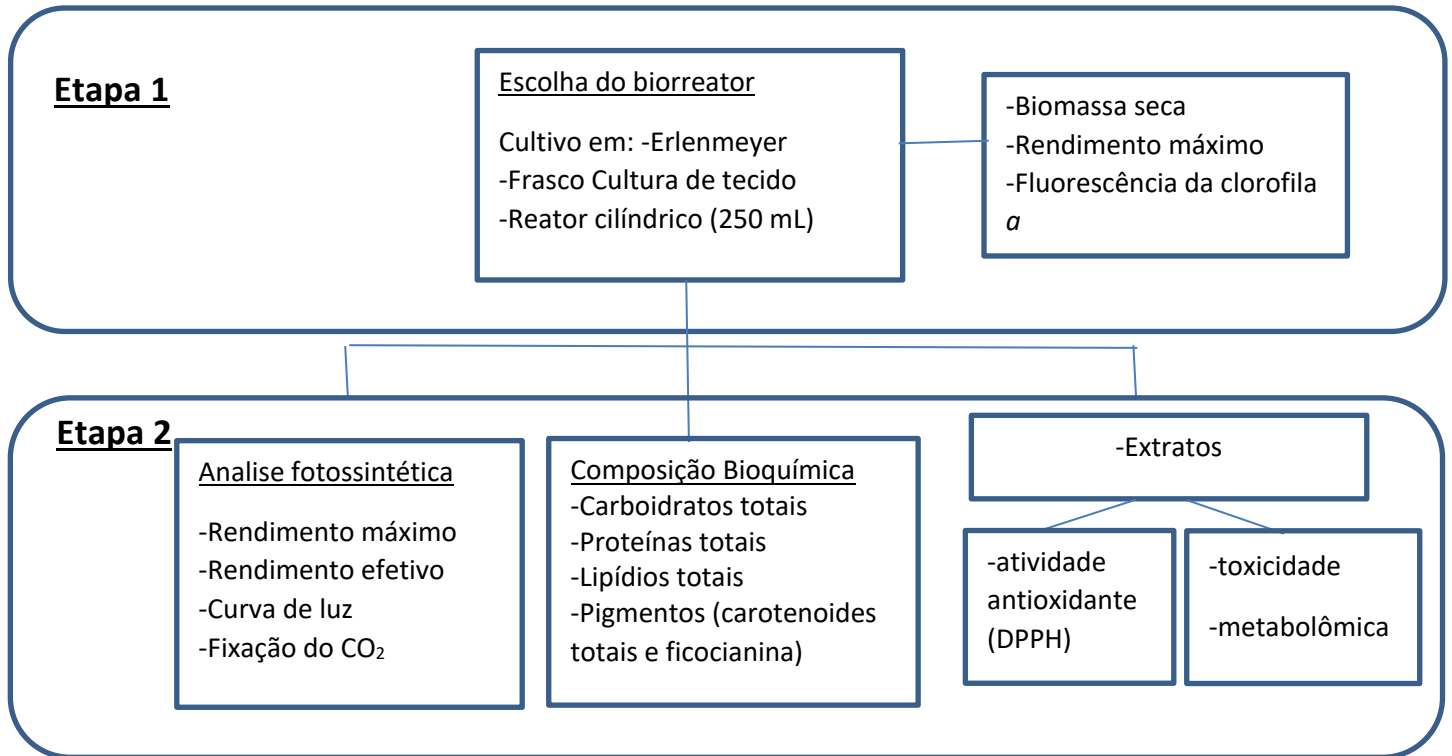


Figura 1. Fluxograma das etapas laboratoriais 1 e 2, e determinações em cada uma delas.

3.1. Condições de cultivos

A cepa de cianobactéria *Rhabdoderma lineare* (3083) foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Célia Leite Sant'anna, responsável pela coleção de culturas de algas, cianobactérias e fungos do Instituto de Botânica de SP e foi mantida em meio BG-11 sob condições controladas de temperatura, luminosidade ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo 12:12h (ciclo claro:escuro).

Com a finalidade de determinar a intensidade luminosa de cultivo adequada para a cepa, foi realizado um cultivo no qual as células foram mantidas em $130 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Na fase exponencial uma alíquota de 3 mL foi

coletada para realização da curva rápida de luz (RLC), usando a técnica de fluorescência de amplitude modulada (PAM). Após tratamento matemático da RLC, a irradiância saturante (E_k) foi calculada e resultou em $250 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Com base no valor de E_k , ficou estabelecida a intensidade luminosa que seria utilizada durante os experimentos.

Para melhor desenvolvimento deste projeto, o mesmo foi dividido em duas etapas, como mostrado a seguir.

3..2. Etapa 1: Determinação do biorreator mais adequado para o cultivo de *Rhabdoderma lineare*

Para escolha do reator mais adequado foram realizados 3 cultivos simult\u00e2neos em 3 fotobiorreatores (FBR) com diferentes caminhos \u00f3ticos contendo 250 mL de meio BG-11 esterilizado (autoclave 121°C , 20 min). O pH inicial foi ajustado em 7,0 e os 3 modelos de FBR foram: Erlenmeyer (500 mL capacidade), biorreator cil\u00edndrico (250 mL capacidade) e frasco de cultura de tecido (250 mL capacidade). As culturas foram constantemente agitadas mediante o borbulhamento de ar mantidos por um per\u00edodo de sete dias sob condi\u00e7\u00f5es controladas de temperatura ($24^\circ\text{C} \pm 1$), luminosidade ($200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$), e fotoper\u00edodo 12:12 h (ciclo claro:escuro). Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

O monitoramento do crescimento populacional foi realizado mediante a retirada di\u00e1ria de amostras, as quais foram analisadas para biomassa seca, fluoresc\u00eancia da clorofila *a in vivo* e fotoss\u00edntese (PhytoPAM II), que se deu por meio da determina\u00e7\u00e3o do rendimento qu\u00e2ntico fotossint\u00e9tico m\u00e1ximo.

Para determina\u00e7\u00e3o da biomassa seca uma al\u00edquota de 3 mL foi filtrada em filtros de acetato de celulose, previamente mantidos em estufa a 40°C para permanecerem secos. Ap\u00f3s filtra\u00e7\u00e3o da cultura, os filtros foram secos a 40°C por 24 h e a massa aferida em balan\u00e7a anal\u00edtica (Mettler Toledo – capacidade

10^{-6} g). A fluorescência da clorofila *a in vivo* foi determinada em fluorímetro (Turner Designs, USA).

A taxa de crescimento foi determinada por meio de regressão linear da clorofila *a in vivo* na fase exponencial de crescimento. Para tanto plotamos o Ln da concentração do pigmento em função do tempo experimental (dias) e a parte linear foi ajustada por regressão. O coeficiente angular da equação da reta após o ajuste representa a taxa de crescimento específica. Todos os cálculos matemáticos e plotagem dos dados foram realizados no software Igor Pro (Wavemetrics, EUA).

O rendimento quântico fotossintético foi mensurado no fluorímetro de amplitude de pulso modulada (PhytoPam-II, Walz, Alemanha). As amostras foram aclimatadas no escuro por 15 min obtendo-se a oxidação completa do fotossistema II (PSII). Esse parâmetro resulta da diferença entre a fluorescência máxima e mínima dividida pela fluorescência máxima, como mostrado na equação (1).

$$\Phi_M = F_M - F_0 / F_M \quad (1)$$

3..3. Etapa 2: Estudo da fisiologia e composição bioquímica da biomassa

Em função dos resultados da etapa 1, o biorreator selecionado foi o biorreator cilíndrico. Com o intuito de obter uma quantidade maior de biomassa para ser utilizada nas próximas análises, foram utilizados biorreatores de 1L contendo 800 mL de meio, sob aeração. Além disso, o pH foi controlado por adição de CO₂ (15% v/v) em mistura com argônio, o qual era ativado automaticamente quando a cultura atingia um pH de 8,2 e desativado ao atingir pH 7,8. O inóculo inicial foi de 300 RFU, equivalente a 0,030 mg L⁻¹ de clorofila *a in vivo*. As culturas foram mantidas sob condições controladas de temperatura (24 °C ±1), luminosidade (200 μmol fótons m² s⁻¹), e fotoperíodo 12:12 h (ciclo claro:escuro). Todos os cultivos foram realizados em triplicata e foram finalizados após 7 dias.

Diariamente foram analisados os parâmetros de crescimento (biomassa seca, fluorescência da clorofila *a*) e o rendimento quântico máximo seguindo os mesmos protocolos realizados na Etapa 1.

Durante o último dia da fase exponencial foram retiradas amostras para a determinação dos parâmetros fotossintéticos (rendimento quântico efetivo e curva rápida de luz), da composição bioquímica (proteínas, carboidratos e lipídios totais) e dos pigmentos (clorofila *a* e carotenoides totais).

a) Determinação dos parâmetros fotossintéticos na fase exponencial.

Durante a fase exponencial, o rendimento efetivo (Φ'_M) foi estimado por meio das equações descritas em Juneau et al. (2002). Para tal, as amostras foram adaptadas ao claro por 10 min recebendo pulsos com intensidade luminosa similar à luz de cultivo ($200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$) a cada 20 segundos.

$$\Phi'_M = (F'_M - F'_s)/F'_M \quad (2)$$

A curva rápida de luz (RLC) foi determinada e após o tratamento matemático dos dados, a taxa relativa de transferência de elétrons (rETR) da cadeia fotossintética, eficiência de absorção de luz (α) e a irradiância saturante (E_k) são obtidos. O tratamento matemático dos pontos da RLC foi feito de acordo com Platt et al. (1981).

Todos os parâmetros fotossintéticos foram utilizados para quantificar a fixação teórica do CO_2 seguindo a metodologia descrita em Candido e Lombardi (2020).

b) Determinação bioquímica

Proteínas totais

As proteínas totais foram extraídas de acordo com Slocombe et al. (2013) e determinadas pelo método espectrofotométrico de Lowry (1951). Amostras de

culturas (20 mL) foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi mantido congelado até o momento da análise; o conteúdo de proteínas foi determinado em função de uma curva de calibração feita com albumina.

Lipídios totais

Os lipídios totais foram determinados por gravimetria e, para tanto, 50 mL de cultura foram filtrados em filtros de fibra de vidro previamente muflados a 400 °C por 8 h. Os filtros foram mantidos em frascos de vidro contendo 2 mL de clorofórmio e em freezer (- 81 °C) até o momento da análise. A extração de lipídios foi realizada usando o método de Folch modificado de acordo com Parrish (1999). A % de lipídios na amostra foi determinada em uma alíquota de 400 µL do extrato, que foi evaporado em um cadinho de alumínio previamente muflado e pesado em balança microanalítica (Mettler Toledo; 1 µg precisão), após o processo de secagem da amostra, o cadinho foi novamente pesado. A diferença corresponde ao lipídio presente no extrato.

Carboidratos

Os carboidratos totais foram quantificados de acordo com Albalasmeh et al. (2013), método espectrofotométrico e tem a glicose como padrão. Para tanto, amostras de 30 mL, referentes à fase exponencial da cultura, foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* digerido com ácido sulfúrico.

Ficocianina

A análise de ficocianina seguiu o protocolo espectrofotométrico descrito por Yéprémian et al. (2016). Dez mL de amostras foram centrifugadas e o *pellet* foi digerido com tampão salino por 16 h.

Clorofila a e carotenoides totais

A concentração de clorofila *a* e os carotenoides totais seguiram a metodologia descrita em Wellburn (1994). Três mL de amostras foram filtradas em filtros de acetato de celulose que posteriormente foram dissolvidos em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) à temperatura ambiente e analisados por espectrofotometria.

Atividade antioxidante

Para determinação da atividade antioxidante, foram confeccionados extratos utilizando biomassa oriunda da fase estacionária de crescimento. Cinquenta mg de biomassa liofilizada foram extraídos com 1,0 mL de etanol 70%. A solução foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min. A extração foi repetida por 3 vezes e os sobrenadantes foram combinados. A atividade antioxidante foi determinada seguindo a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995).

Extrato para teste de toxicidade e análise metabolômica

Extratos para análise de toxicidade e de metabolitos secundários foram feitos a partir de biomassa liofilizada oriunda da fase estacionária de crescimento. Para tal, 150 mg da biomassa foram extraídos utilizando DCM:MeOH na proporção 2:1 durante 16h. Posteriormente, o extrato foi filtrado em filtro de papel e o solvente foi seco utilizando nitrogênio ultrapuro. Nesta pesquisa, as análises relacionadas à metabolômica e toxicidade foram feitas em colaboração com a Profa. Dra. Camila Crnkovic, da Universidade de São Paulo.

Teste de toxicidade aguda contra *Artemia salina*

Cistos do microcrustáceo *Artemia salina* foram eclodidos em água de mar artificial com aeração e iluminação constantes durante 24h a 25 °C. Os extratos secos foram preparados em DMSO por diluição seriada (amostra inicial: 1 mg ou 2 mg; concentrações obtidas: 100 mg/mL, 50 mg/mL, 10mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,1mg/mL e 0,01 mg/mL). Em cada poço de placas de 96 poços, foram

adicionados 99 µL de solução de mar artificial contendo 10 a 20 náupilos de *A. salina* e 1 µL da amostra ou solução controle (concentração final da amostra: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL; concentração final do controle negativo: 1%; concentração final do controle positivo: 200 µg/mL). As placas foram incubadas a 25 °C na ausência de luz durante 20 a 23h. A mortalidade foi calculada por meio da razão de náupilos mortos pelo total de náupilos no respectivo poço.

Análise Metabolômica

Extratos foram solubilizados em metanol para as análises de metabolômica baseada em espectrometria de massas (MS). Devido à presença de lipídeos e pigmentos que podem danificar colunas cromatográficas, os extratos foram submetidos a procedimento de *cleanup* com cartuchos C₁₈ antes das análises por UPLC-HRMS/MS (cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas de alta resolução em tandem). Análises por UPLC-HRMS/MS foram desenvolvidas em um sistema Waters Acquity UPLC H-class acoplado a um espectrômetro de massas Waters Xevo G2-XS QToF com ionização por eletrospray. Separação por UPLC foi desenvolvida a 0,5 mL/min através de uma coluna Kinetex C₁₈ (2,1 × 50 mm × 1,7 µm, Phenomenex) mantida a 40 °C. As fases móveis utilizadas foram H₂O (A) e CH₃CN (B), ambas acidificadas com ácido fórmico a 0,1%. O gradiente utilizado consistiu em: 10-100% B por 7 minutos, 100% por 1 min, 100-10% B por 0,1 min e 10% B por 1,9 min. As análises por HRMS/MS foram realizadas em modo positivo e negativo, utilizando aquisição por DDA (*data dependent analysis*) com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar de 1,2 kV, voltagem do cone de 30 eV, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, vazão de N₂ no cone de 50 L/h, vazão do gás de dessolvatação de 750 L/h, intervalo de detecção de 100 a 2000 Da, tempo de scan de 0,2s, energia de colisão em rampa de 15-30 eV (limite inferior de massa) e 60-80 eV (limite superior de massa), os três íons mais intensos em cada espectro de MS1 foram

selecionados para fragmentação MS/MS. Para a calibração interna, utilizou-se leucina-encefalina a 20 µg/mL infundida pela sonda de *lockmass* a 10 µL/min. Após a análise por UPLC-HRMS/MS os dados obtidos foram convertidos e pre-processados utilizando os programas MSConvert e MZMine respectivamente para a posterior obtenção de redes moleculares utilizando a plataforma GNPS, as quais foram visualizadas no programa Cyanoscape.

4. Resultados e discussão

4.1. Etapa 1: Determinação do biorreator mais adequado para o cultivo de *Rhabdoderma lineare*

Na **Figura 2** estão representados os parâmetros de crescimento que foram levados em consideração para a escolha do biorreator: Ln da concentração de clorofila *a* (mg.L⁻¹), taxa de crescimento (d⁻¹), biomassa seca (mg.mL⁻¹) e rendimento quântico fotossintético máximo.

No Erlenmeyer foi obtida a concentração máxima de clorofila *a* de 0,157 ± 0,007 mg.L⁻¹ (Fig. 2a), taxa de crescimento de 0,46 ± 0,008 d⁻¹ (Fig. 2b), e 0,228 ± 0,013 mg.mL⁻¹ de biomassa seca (Fig. 2c). O rendimento fotossintético máximo manteve-se entre 0,14 e 0,23 (Fig. 2d). No frasco de cultura de tecido obteve-se uma concentração de clorofila *a* de 0,195 ± 0,046 mg.L⁻¹ (Fig. 2a), taxa de crescimento de 0,5 ± 0,035 d⁻¹ (Fig. 2b), 0,231 ± 0,028 mg.mL⁻¹ de biomassa seca (Fig. 2c) e o rendimento máximo manteve-se entre 0,12 e 0,24 (Fig. 2d). Por último, no biorreator cilíndrico obteve-se concentração de clorofila *a* de 0,197 ± 0,046 mg.L⁻¹ (Fig. 2a), taxa de crescimento de 0,5 ± 0,014 d⁻¹ (Fig. 2b), 0,232 ± 0,017 mg.mL⁻¹ de biomassa seca (Fig. 2c) e o rendimento fotossintético máximo manteve-se entre 0,13 e 0,22 (Fig. 2d). Os resultados não apresentaram diferença estatística em função dos reatores utilizados (p>0.05).

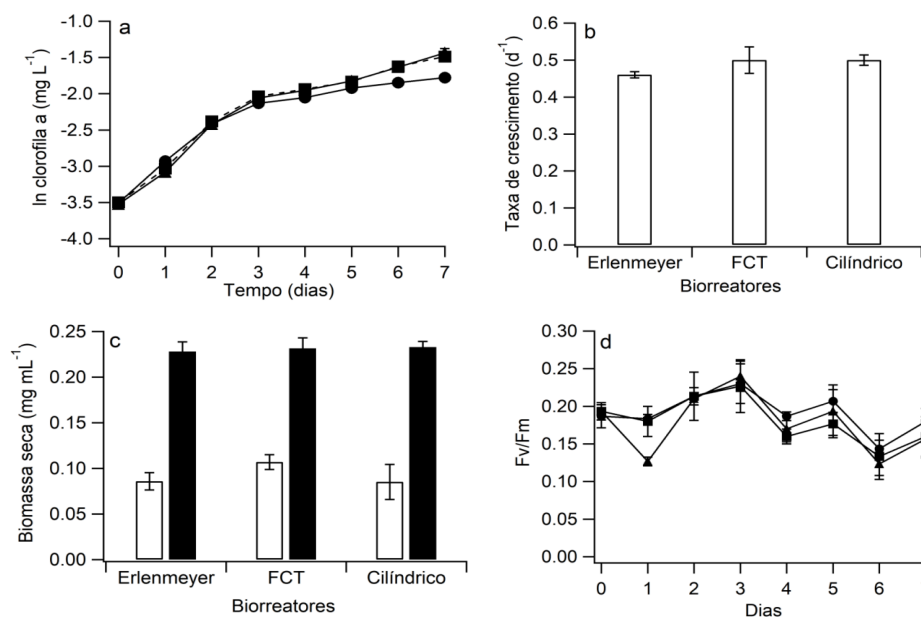


Figura 2. Parâmetros de crescimento da cianobactéria *Rhabdoderma lineare*. **a)** Ln da concentração da clorofila *a in vivo* (mg L⁻¹) em função dos dias de cultivo; **b)** taxa de crescimento em função dos biorreatores utilizados; **c)** Biomassa seca (mg mL⁻¹) em função dos biorreatores utilizados; **d)** rendimento quântico máximo em função dos dias de cultivo. Barras brancas: biomassa seca inicial; barras pretas: biomassa seca final. Símbolos: círculo fechado: cultivos em Erlenmeyer; triângulo fechado: Frasco de cultura de tecido; quadrado fechado: biorreator cilíndrico. FCT= Frasco de cultura de tecido.

A similaridade dos resultados observados em função dos diferentes sistemas de cultivos podem estar relacionados com a intensidade de luz. Cada sistema utilizado teve a luz ajustada em função do valor de E_k (luz ótima de cultivo), garantindo luz ótima a todos os sistemas de cultivo, suportando assim crescimento celular e rendimento de biomassa similar em todos eles. González-Camejo et al. (2019) observaram que quando *Chlorella* e *Scenedesmus* foram cultivadas com a mesma intensidade luminosa porém, variando o fotoperíodo (12:12; 24:0; 8:16 h) não houve diferença significativa nos rendimentos de biomassa seca e concentração de clorofila *a*. Segundo os autores, o desempenho das microalgas depende da luz recebida pelas microalgas, e menos do regime de iluminação ou da hora do dia em que essa energia é recebida. Diante dos nossos resultados, podemos inferir que o formato do

biorreator não tem influência na dinâmica de crescimento celular, desde que haja o fornecimento adequado de luz.

De acordo com Nwoba et al. (2019), o fornecimento de regime de iluminação adequado pode otimizar a capacidade fotossintética e levar ao maior rendimento de biomassa. Contudo, apesar da luz ser um fator de crescimento importante para os organismos fotossintéticos, a literatura atribui à produção de biomassa desses organismos a utilização de sistema de cultivo apropriado (Carvalho et al. 2011). Como não observamos diferença no rendimento de biomassa seca entre os sistemas de cultivo utilizados, o biorreator cilíndrico por apresentar vantagens como baixo risco de fotoinibição, boa aeração e distribuição de nutrientes (López et al. (2006), Chang et al. (2016), Lopez-Rosales et al. (2016)) foi selecionado para os experimentos da Etapa 2.

4.2. Etapa 2: Estudo da fisiologia e composição bioquímica de *Rhabdoderma lineare*

4.2.1. Crescimento e parâmetros fotossintéticos

Na **Figura 3** estão representados os parâmetros de crescimento de *R. lineare* em função dos dias de cultivo. Para o conteúdo de clorofila *a in vivo* foi obtida uma concentração final de $0,832 \pm 0,042$ mg mL⁻¹(Fig. 3a), e o rendimento de biomassa seca foi de $0,538 \pm 0,085$ mg mL⁻¹ (Fig. 3b). A taxa de crescimento foi de $0,50$ d⁻¹.

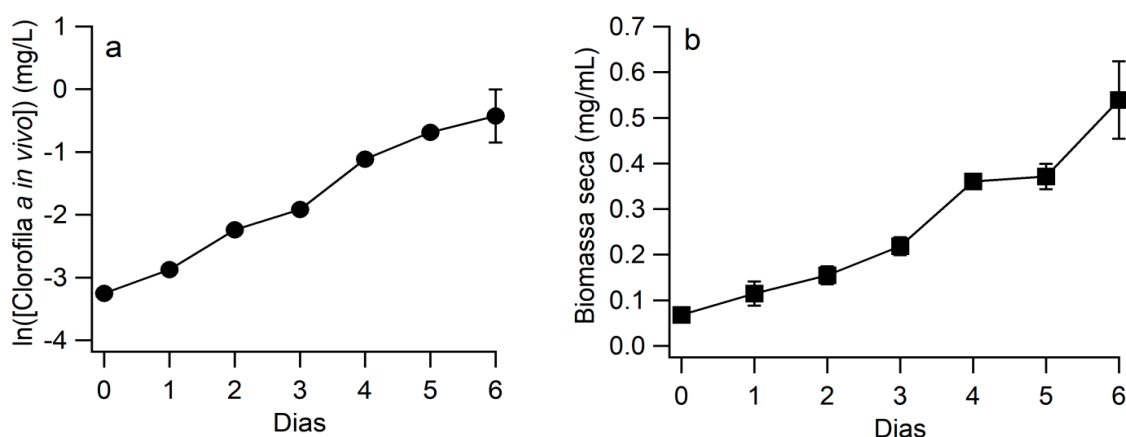


Figura 3. Parâmetros de crescimento da cianobactéria *Rhabdoderma lineare*. **a)** Ln da concentração da clorofila *a in vivo* (mg/L); **b)** biomassa seca (mg/mL) em função dos dias de cultivo.

O resultado referente à taxa de crescimento de *Rhabdoderma lineare* ($0,50 \text{ d}^{-1}$) mostrou-se superior às taxas de crescimento de outras espécies de cianobactérias como reportado por Khazi et al. (2018). Taxas de crescimento de 0,25 para *Phormidium* sp, 0,26 para *Pseudoscillatoria* sp. e 0,30 para *Arthrospira platensis* foram obtidas pelos autores em culturas fotoautotróficas das espécies. Yamamoto e Tsukada (2009) mostram variação na taxa de crescimento para três espécies de *Microcystis*: *M.aeruginosa* (0,21 a 0,32), *M. viridis* (0,24 a 0,46) e *M. wesenbergii* (0,25 a 0,46). A maior taxa de crescimento observada neste estudo pode estar relacionada à intensidade de luz de cultivo, Tsujimura (2003) cultivou *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis wesenbergii* em 40 e 180 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e observou um aumento na taxa de crescimento de 0,49 para 0,56 e de 0,24 para 0,55 respectivamente, com o aumento na intensidade luminosa.

O rendimento de biomassa seca observado para *Rhabdoderma lineare* é maior ou similar ao descrito na literatura para as cianobactérias cultivadas em diversos reatores. Yadav et al. (2021) cultivou *Phormidium* sp. e *Oscillatoria* sp. por 6 dias em fotobiorreatores de 250 mL e 1000 mL e obtiveram $0,2 \text{ g L}^{-1}$ para as ambas. Moreno et al. (2003) obteve cerca de $0,3 \text{ g L}^{-1}$ quando cultivou *Anabaena* sp. ATCC 33047 em regime semi-contínuo em biorreator tipo *raceway* por 8 dias. O maior rendimento de biomassa seca observado neste trabalho,

pode estar relacionado ao controle de pH da cultura por meio da inserção de CO₂. Sabe-se que o pH das culturas de microalgas aumenta gradualmente durante o dia devido à absorção de carbono inorgânico e do nitrato pelas microalgas. Um pH mais alto altera a especiação de CO₂ na água e pode limitar a disponibilidade desse gás, reduzindo assim o crescimento celular (Qiu et al. 2017). Com a adição do CO₂ ao sistema, o pH retorna ao valor desejado e o equilíbrio entre as espécies do carbono inorgânico é restabelecido (De Paula et al. 2013). Além disso, o carbono inorgânico dissolvido é geralmente o fator limitante para o crescimento, já que a taxa de assimilação de carbono inorgânico pelas algas é maior do que a taxa de difusão de CO₂ do ar para a água, mesmo quando aeração vigorosa é usada. Sendo assim, o aumento das concentrações totais de CO₂ dissolvido no cultivo pode aumentar significativamente a produtividade da biomassa (Ge et al. 2011).

Na **Figura 4** são mostrados o rendimento quântico máximo em função do tempo experimental e a curva rápida de luz (RLC). O rendimento quântico máximo (Fig. 4a) manteve-se entre 0,20 e 0,32 ao longo do cultivo, enquanto a RLC (Fig 4b) mostra que a cianobactéria *R. lineare* apresentou ETR relativa máxima próximo de 70 $\mu\text{mol e}^- \text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

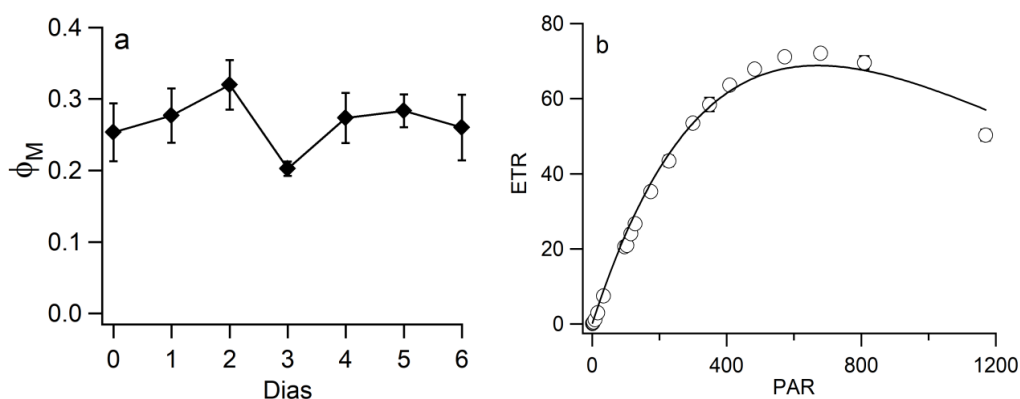


Figura 4. Parâmetros fotossintéticos de *Rhabdorderma lineare*. a) Rendimento quântico máximo (Φ_M) em função dos dias de cultivo; b) Curva rápida de luz (RLC) em 72 h de cultivo representado como taxa relativa de transporte de elétrons (rETR, $\mu\text{mol elétrons m}^2 \text{s}^{-1}$) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR $\mu\text{mol fons m}^2 \text{s}^{-1}$).

Na **Tabela 1** encontram-se listados os parâmetros fotossintéticos obtidos ao final da fase exponencial.

Tabela 1. Parâmetros fotossintéticos de *Rhabdoderma lineare* em 72 h de cultivo. Símbolos: Φ_{\max} : rendimento quântico máximo ; Φ_{efetivo} : rendimento quântico efetivo; E_k : irradiância saturante; ETR_{\max} : taxa de transporte de elétrons máxima; P_b : taxa teórica de fixação de CO_2 .

| Parâmetros | |
|---|-------------------|
| E_k ($\mu\text{mol photons m}^2 \text{ s}^{-1}$) | $250 \pm 9,41$ |
| Φ_{\max} | $0,20 \pm 0,010$ |
| Φ_{efetivo} | $0,18 \pm 0,004$ |
| α ($\text{m}^2/\text{mg Chl } a$) | $0,27 \pm 0,009$ |
| ETR_{\max} ($\text{umol e}^-/\text{mg Chl } a \cdot \text{s}^{-1}$) | $70 \pm 0,530$ |
| P_b ($\text{g C}/\text{mg Chl } a \cdot \text{dia}^{-1}$) | $0,075 \pm 0,008$ |

Em geral, os valores dos rendimentos quânticos fotossintéticos em cianobactérias são mais baixos em comparação às algas verdes. Por exemplo, onde os valores para culturas saudáveis de cianobactérias são geralmente na faixa de 0,2–0,5 (Raateoja et al. 2004; Suggett et al. 2009), as algas verdes apresentam valores próximos de 0,7 – 0,8 (Silva et al. 2018). Os menores valores em cianobactérias são atribuídos à saturação incompleta de PSII (Raateoja et al. 2004). Isso ocorre, pois as vias respiratórias se cruzam com o fluxo de elétrons fotossintético nas mesmas membranas tilacóides e ambos os fluxos de elétrons compartilham o pool de plastoquinona. Por meio das ações moderadoras das enzimas desidrogenases respiratórias para entrada de elétrons e das oxidases terminais para o fluxo de elétrons (do pool de plastoquinona), a cadeia de transporte de elétrons fotossintética e o Q_A do PSII não se tornam totalmente oxidados no escuro (Schuurmans et al. 2014). Isso resulta em rendimento quântico menor em comparação com situações onde há completa oxidação, como nas algas verdes.

Curvas rápidas de luz (RLC) são comumente usadas para medir e descrever a aclimação do aparato fotossintético às variações ambientais, que podem ou não estar relacionadas com a intensidade luminosa (Platt et al., 1980; Harrison and Platt, 1986). Os resultados relacionados à RLC mostraram que as células de *R. lineare* podem ser cultivadas em intensidade luminosa de 250 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^2 \text{ s}^{-1}$, valor calculado do Ek. Segundo Sakshaug et al. (1997), a irradiância está continuamente flutuando, o que promove a aclimação das células durante o cultivo, conseqüentemente, o Ek está constantemente mudando e raramente corresponde à irradiância instantânea. Contudo, a n observância de fotoinibição para *R. lineare*  um sinal que as células estavam bem aclimatadas às condições de cultivo.

A inclinação inicial, α , da RLC representa a eficiência celular de captura da luz (Marshall; Geider; Flynn, 2000). O valor observado para *R. lineare* está de acordo com o que foi observado para *Microcystis aeruginosa* por Zhang et al. (2011).

Em relação à taxa de transporte de elétrons relativa máxima (ETRmax), observamos que o valor de 70 $\mu\text{mol elétrons m}^2 \text{ s}^{-1}$, obtido para *R. lineare* está de acordo com o que tem sido descrito na literatura para cianobactérias em geral. Wu et al. (2012) após variar a concentração de fosfato no meio, observaram que para *Cylindrospermopsis raciborskii* a ETRmax variou de 60 a 123 $\mu\text{mol elétrons m}^2 \text{ s}^{-1}$. A ETRmax está relacionada à capacidade máxima fotossintética e está fortemente associado com a atividade de assimilação de carbono durante o processo fotossintético (Wang et al. 2010). Mediante alteração da fotossíntese haverá alterações nesse valor, que pode ser limitada tanto pela atividade da cadeia de transporte de elétrons como pelas enzimas do ciclo de Calvin (Behrenfeld et al., 2004; Serdio et al., 2006).

A taxa de fixação teórica de CO₂ para *R. lineare* foi de 0,073 (g C [mg chl_a]⁻¹ d⁻¹), similar  obtida para a cianobactéria *Trichodesmium* sob borbulhamento de CO₂ nos cultivos (Hutchins et al. 2007), que foi de 0,072 (g C [mg chl_a]⁻¹ d⁻¹). A taxa de fixação de CO₂ está relacionada diretamente  eficiência da utilização da luz (alfa – obtido a partir da inclinação da RLC) e densidade celular, além do

tipo de fotobiorreator e concentração de dióxido de carbono, que podem ser condições limitantes influenciadoras da fotossíntese e que inibem a biofixação de dióxido de carbono (Cheng et al. 2006).

4.2.2 Determinação bioquímica

A composição bioquímica obtida para *Rhabdoderma lineare* encontra-se representada na **Tabela 2**.

Tabela 2. Composição bioquímica de *Rhabdoderma lineare* em 72 h, fase exponencial de crescimento sob condições ideais de cultivo.

| Parâmetros | |
|---|---------------------|
| Proteínas totais ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 109,202 \pm 0,001 |
| Lipídios totais (%DW) | 6,471 \pm 1,294 |
| Carboidratos totais ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 42,440 \pm 3,202 |
| Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 7,962 \pm 1,059 |
| Carotenoides totais ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 1,793 \pm 0,303 |
| Ficocianina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 11,201 \pm 3,734 |
| Atividade antioxidante DPPH (%) | 25 \pm 0,000 |

Cianobactérias e microalgas vêm sendo usadas para diversas finalidades, sendo a mais comum como fonte de alimento (Gantar & Svirčev, 2008). Na atualidade, a maior parte do comércio de microalgas (~75%) se baseia na produção de biomassa para consumo humano ou como suplemento alimentar na criação de animais. Para tal fim, as espécies mais utilizadas são *Spirulina*, *Chlorella* e *Dunaliella* pelo seu alto conteúdo nutricional e pelos benefícios que estes nutrientes trazem à saúde (Spalore et al, 2006; Parmar et al, 2010; Priyadarshani & Rath, 2012).

Na **Tabela 3** apresentamos a composição bioquímica em porcentagem do peso seco (%DW) presentes em *Rhabdoderma lineare*, *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella salina*. Observa-se que *R. lineare* supera amplamente as outras 3 espécies com 86,45% da biomassa seca como proteínas. Sabe-se que a concentração de proteínas é influenciada pela presença de nutrientes, tais como potássio e nitrogênio, como também pela fase de crescimento e a qualidade da luz (Gantar & Svirčev, 2008). O alto conteúdo de proteínas em microalgas em relação a outros alimentos comumente consumidos como carne (43% DW), arroz (8% DW) e soja (37% DW) é uma das principais razões para considerar as algas uma fonte alternativa de proteínas (Spalore et al, 2006; Koyande et al, 2019). Considerando seu conteúdo proteico, *Rhabdoderma lineare* se destaca em relação às microalgas, vegetais terrestres e proteína animal.

Em relação aos carboidratos e lipídeos totais, a *R. lineare* é comparável às principais espécies comerciais com 19,29 e 6,47% da biomassa seca, respectivamente. Tem sido proposto que os carboidratos produzidos por microalgas possam ser utilizados na produção de bioetanol e, como nos demais parâmetros bioquímicos, certas condições de estresse durante o cultivo podem aumentar o conteúdo dos mesmos (Priyadarshani & Rath, 2012; Markou et al, 2013). Cianobactérias, como *R. lineare*, não apresentam a parede celular composta de polissacarídeos, por exemplo celulose, que costuma estar presente em microalgas eucarióticas, tal qual as Chlorophyta. Isso torna as cianobactérias mais fáceis de serem digeridas (Gantar & Svirčev, 2008). A porcentagem de lipídios na biomassa seca de *R. lineare* está dentro do esperado para cianobactérias (Koyande et al, 2019). A síntese de lipídios depende de diversos fatores, tais como a composição do meio de cultivo, taxa de aeração, temperatura, ciclo claro/escuro e intensidade da luz, e o acúmulo acontece principalmente sob condições de estresse (Ravindran et al, 2016). Em nosso experimento, as condições de cultivo foram ideais e por isso esperamos, de fato, baixo valor porcentual dessa molécula.

Quanto aos carotenoides totais (0,33% DW), *R. lineare* apresentou concentrações semelhantes à *Spirulina sp* e *Chlorella sp*, porém é amplamente superada por *Dunalliella* (10% DW), cuja capacidade de acúmulo de carotenoides é bastante documentada (Koyande et al, 2019). Por último, o valor de ficocianina obtido para *R. lineare* (2,07% DW) é superado por *Spirulina* (14% DW), também conhecida por sua capacidade de acúmulo deste pigmento (Eriksen, 2016). Estes pigmentos apresentam uma variedade de aplicações já que possui atividade antioxidante, antimutagênica, estimula o crescimento de tecidos e pode ser utilizado como corante natural (Hosikian; Lim; Danquah; 2010; Koyande et al, 2019).

A atividade antioxidante de *R. lineare* foi de 25%, e está dentro do esperado para cianobactérias como reportado por Jerez-Martel et al (2017). Os autores mostram atividades de 27,89% para *Nostoc sp.*, 14,59% para *Phormidiochaete sp.*, 13,02% para *Nodularia spumigena* e 7,65% para *Leptolyngbya protospira*. Antioxidantes naturais trazem diversos benefícios à saúde já que auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares, Alzheimer e certos tipos de câncer. Neste contexto microalgas se apresentam como uma fonte promissora destes compostos (Goiris et al, 2012). Portanto, quando comparada com as principais espécies de cianobactérias atualmente comercializadas (Tabela 3), *Rhabdoderma lineare* possui potencial para ser utilizada como suplemento alimentar por apresentar um conteúdo superior de proteínas e quantidades semelhantes dos demais compostos.

Tabela 3. Tabela comparativa da composição bioquímica de *Rhabdoderma lineare* (este estudo), *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella salina* com valores apresentados em % de biomassa seca. P=Proteínas, C=Carboidratos, L=Lipídios.

| Espécie | P | C | L | Carotenoides | Ficocianina | Referência |
|----------------------------|-------|-------|-------|--------------|-------------|-------------|
| <i>Rhabdoderma lineare</i> | 86,5 | 19,3 | 6,5 | 0,33 | 2,1 | Este estudo |
| <i>Spirulina platensis</i> | 46-63 | 8-14 | 4-9 | 0.37 | 14 | 1, 2, 4 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 51-58 | 12-17 | 14-22 | 0,19 | - | 1, 3 |
| <i>Dunaliella salina</i> | 49-57 | 4-32 | 6-8 | 10 | - | 1, 5 |

¹Koyande et al, 2019; ²Jerez-Martel et al, 2017; ³Patias et al, 2017; ⁴Ali & Saleh, 2012; ⁵Prieto et al. 2011

Ensaio de Toxicidade

Em relação à toxicidade da cepa, os extratos de *R. lineare* inócuos, sem toxicidade aguda contra *A. salina* nas concentrações testadas, como representado na **Tabela 4**. Apresentou LC₅₀ acima de 1000 µg mL⁻¹.

O bioensaio de *Artemia* é uma ferramenta simples, de baixo custo, confiável e comumente usada para a análise preliminar de atividade toxicológica e farmacológica. *Artemia salina* é um organismo que cresce em águas marinhas e salobras, e cultivável em grandes faixas de salinidade. Este ensaio também foi sugerido para avaliar a toxicidade de extratos de plantas e como um método de triagem preliminar rápido para cianobactérias tóxicas (Lopes et al., 2010). Embora este teste não descarte por completo possíveis efeitos tóxicos à saúde humana (Hisem et al, 2011), os resultados indicam a ausência de cianotoxinas, neuro e hepatotóxicas, às quais *A.salina* é susceptível (Kiviranta et al, 1991).

Diferente ao que foi observado para *R. lineare* em relação à toxicidade do extrato, Martins et al. (2007), destacaram que os extratos brutos de *Synechococcus* sp. e *Synechocystis* sp. mostrou 100% de mortalidade em *Artemia salina* após 24 h de exposição. Bhaskar et al. (2004) observaram que extratos de *Oscillatoria formosa* BDU 40261 e 91041 exibiram mortalidade larval com valor LC₅₀ de 114,2 e 144,6 µg.mL⁻¹.

Tabela 4. Resultados do teste de toxicidade aguda de extratos de *R. lineare* contra *Artemia salina*.

| Extrato | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Mortalidade \pm DP | LC ₅₀ |
|---|-----------------------------------|----------------------|------------------------|
| <i>R. lineare</i> | 1000 | 0,00 \pm 0,000 | >1000 $\mu\text{g/mL}$ |
| | 500 | 0,00 \pm 0,000 | |
| | 100 | 0,02 \pm 0,030 | |
| | 50 | 0,00 \pm 0,000 | |
| | 10 | 0,00 \pm 0,000 | |
| | 1 | 0,22 \pm 0,257 | |
| | 0.1 | 0,14 \pm 0,067 | |
| | Controle negativo (DMSO) | 0,03 \pm 0,054 | |
| Controle branco (agua destilada) | 0,01 \pm 0,029 | | |
| Controle positivo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) | 0,93 \pm 0,113 | | |

Análise Metabolômica

A análise de metabolitos secundários se baseia na construção de redes moleculares. Estas são representações gráficas de similaridade espectral. Os espectros obtidos a partir da análise metabolômica são comparados com bases de dados de espectros conhecidos permitindo a anotação de compostos, a identificação de moléculas análogas e a visualização de famílias espectrais.

A rede molecular obtida para *Rhabdoderma lineare* a partir dos dados de MS/MS é composta por 451 nodos e 25 famílias espectrais (**Figura 5a**). No entanto, a anotação utilizando as bases de dados disponíveis na plataforma GNPS não levou à identificação de metabolitos conhecidos. Posteriormente foi utilizada uma base de dados *in house* contendo espectros de microcistinas, spumigininas, aeruginosinas, shinorina, ciclofanos, lipopeptídeos, tolitoxina e glicolipídio, esta foi semeada na rede molecular em busca de associações espectrais, porém nenhuma similaridade foi observada na forma de espectros de consenso, nem cluster, o que indica que provavelmente a amostra não contém esses metabolitos.

Por último, foi realizada uma desreplcação manual assistida pelo *software* SIRIUS e a ferramenta CANOPUS que levou à identificação da classe

química de 3 dos 25 clusters presentes na rede molecular. O maior cluster da rede apresentou resultados consistentes com a classe dos glicerolipídeos (**Figura 5b**) e um segundo cluster com a classe dos glicolipídeos (**Figura 5c**), porém, com os dados presentes não foi possível atribuir uma única fórmula aos compostos.

Um terceiro cluster apresentou resultados consistentes com catabólitos defitilados de clorofila (**Figura 5d**), através da comparação do espectro experimental com dados da literatura foi possível identificar um dos nodos como sendo o feoforbídeo A e por propagação de anotação o outro nodo foi identificado preliminarmente como metil feoforbideo A.

O feoforbideo A surge da degradação da clorofila *a* e é de especial interesse no tratamento contra o câncer, já que apresenta atividade antiproliferativa contra diversas linhagens celulares, também pode ser utilizado na terapia fotodinâmica como molécula fotossensibilizadora que, junto com a aplicação de luz, gera espécies reativas de oxigênio que causam danos às células cancerígenas e vasos associados. Além disso, o feoforbideo A e compostos derivados têm sido associados com atividades antivirais, anti-inflamatórias, antioxidante, imunoestimulante e antiparasítica (Saide, Lauritano & Ianora 2020). Destaca-se que as 3 classes químicas identificadas neste estudo pertencem ao metabolismo primário, e não foram identificadas toxinas ou metabolitos que possam ser classificados como pertencentes ao metabolismo secundário.

Crnkovic et al. (2017) realizou um estudo do impacto das condições de cultivo no perfil metabolômico de cianobactérias de água doce com as amostras colhidas após 6 semanas de cultivo. Os autores mostraram diferenças nos perfis metabolômicos de espécies cultivadas em diferentes concentrações de fosfato e nitrato demonstrando a influência que o meio tem na produção de metabolitos secundários. Mohanty et al (2022) realizou um estudo do perfil metabolômico de 2 espécies de cianobactérias cultivadas em diferentes temperaturas e intensidades de luz, obtendo as ao início do experimento, em 16, 20 e 24 dias de cultivo e as maiores diferenças no perfil metabolômico foram

vistas após 24 dias. No presente estudo as amostras foram obtidas no sétimo dia de cultivo, somente 3 dias após o início da fase estacionária. Os metabólitos secundários são normalmente produzidos mediante algum estresse, situação que *R. lineare* não experimentou durante o cultivo e 3 dias de fase estacionária pode não ter sido suficiente para o acúmulo dos metabólitos secundários.

Não obstante, é sabido que cianobactérias produzem uma ampla gama de metabolitos secundários, que oferecem uma vantagem adaptativa para sobreviver nos diversos ambientes em que são encontradas. Tais metabólitos podem apresentar atividades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, anticancer, anti-HIV, contra o envelhecimento, entre outras (Verma et al, 2022). Mesmo com todo esse potencial para a indústria farmacêutica e biotecnológica, o conhecimento disponível em relação ao metabolismo secundário de cianobactérias ainda é limitado. Calteau et al. (2014) analisou as vias NRPS (Peptídeo Sintetase Não Ribossomal) e PKS (Poliketídeo Sintase) de cianobactérias para a produção de compostos bioativos e, a partir de 89 genomas, foi possível identificar 452 clusters desses genes sendo que 80% dos mesmos não puderam ser atribuídos a nenhum composto conhecido.

Neste estudo, foi possível identificar 2 dos 451 nodos da rede molecular, através do processo de desreplicação manual, e nenhum utilizando a base de dados do GNPS. Isto evidencia a necessidade de maiores estudos no grupo das cianobactérias, que se constituem em potencial fonte de produtos ainda a ser explorada. Por outro lado, os resultados também mostraram a ausência de toxinas conhecidas, o que corrobora os resultados de toxicidade aguda nos testes com *A. salina*.

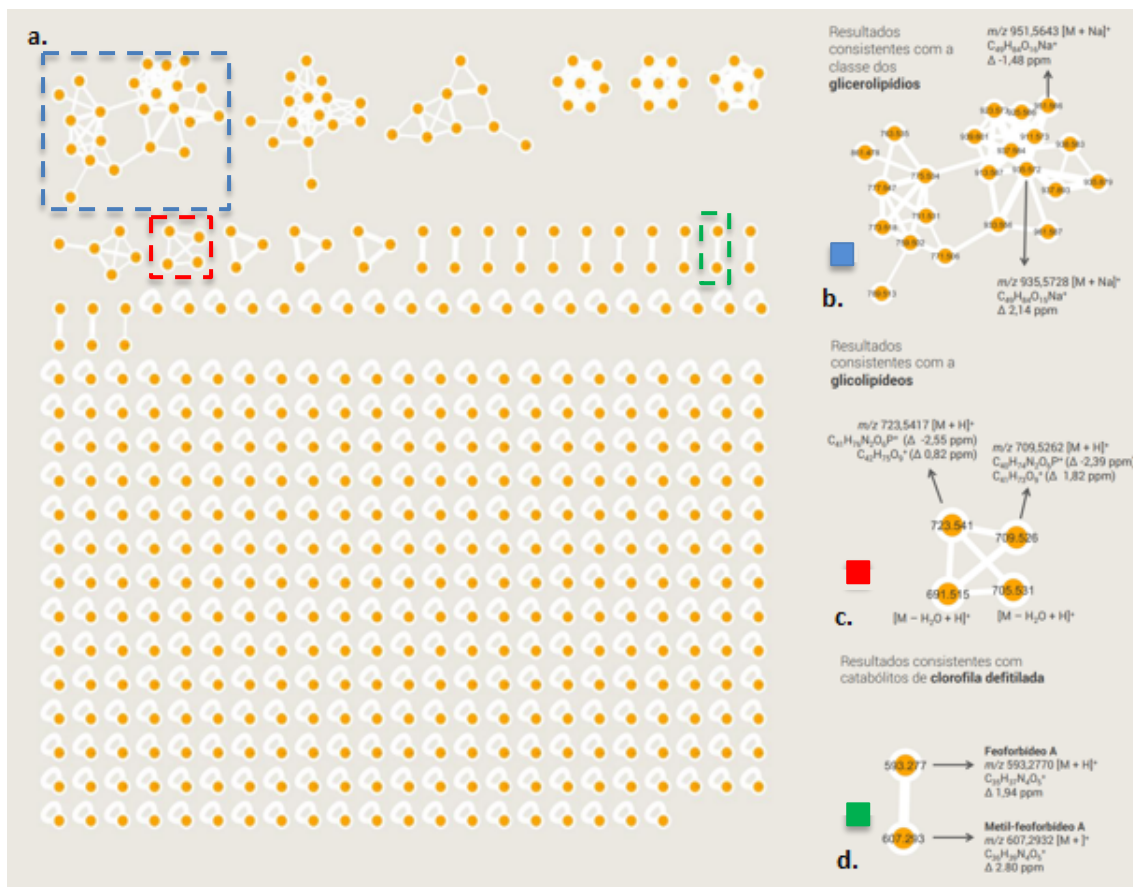


Figura 5: a: Rede molecular obtida para *Rhabdoderma lineare*. b: cluster apresentando resultados consistentes com a classe dos glicerolipídios (azul). c: cluster apresentando resultados consistentes com a classe dos glicolipídios (vermelho) d: cluster apresentando resultados consistentes com catabólitos defitilados de clorofila identificados como Feoforbideo A e Metil-feoforbideo A (verde).

5. Conclusão

Neste trabalho foram analisados o crescimento, a capacidade fotossintética e a composição bioquímica da cianobactéria *Rhabdoderma lineare*. Preliminarmente analisou-se diferentes modelos de reatores e o crescimento populacional e rendimento de biomassa foram similares em qualquer um dos reatores testados, demonstrando que sob condições ideais, o desenvolvimento da cultura independe do formato do fotobiorreator.

Rhabdoderma lineare mostra ser uma espécie altamente promissora para aplicações biotecnológicas, principalmente como fonte alternativa de proteína de origem vegetal.

A cepa, cultivada em fotobiorreator tubular sob condições controladas de intensidade luminosa, pH e CO₂, apresentou taxa de crescimento de 0,50 d⁻¹, e ao final do cultivo (7 dias), o rendimento de biomassa seca foi 0,54 mg mL⁻¹. Análise fotossintética mostrou rendimento quântico máximo variando de 0,20 a 0,30, enquanto o rendimento quântico efetivo foi 0,18. A irradiância saturante (E_k) ficou em 250 μmol fótons m² s⁻¹ e a fixação teórica de CO₂ foi 0,075 g C/ mg Chl a d⁻¹.

Em relação à composição bioquímica, foi observado que *Rhabdoderma lineare* apresenta altíssimo conteúdo proteico, superando outras cianobactérias atualmente comercializadas. O conteúdo de proteínas totais foi 109 μg/mL, carboidratos 42 μg.mL⁻¹ e, lipídios 6,47% DW. A concentração de pigmentos foi 1,89 μg/mL de clorofila *a*, 0,57 μg/mL de carotenoides totais e 11 μg/mL de ficocianina. *Rhabdoderma lineare* apresentou atividade antioxidante de 25% e nenhum efeito tóxico contra *Artemia salina*. A análise metabolômica gerou uma rede molecular de 451 nodos e 25 famílias espectrais, e não identificamos toxinas e nem metabolitos pertencentes ao metabolismo secundário.

6. Referências

- ALBALASMEH, Ammar A.; BERHE, Asmeret Asefaw; GHEZZEHEI, Teamrat A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate polymers*, v. 97, n. 2, p. 253-261, 2013.
- ALI, Shabana Kouser; SALEH, Arabi Mohammed. Spirulina-an overview. *International journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*, 2012, vol. 4, no 3, p. 9-15.
- BHASKAR, A. S. B. et al. Toxicity assessment of Indian marine cyanobacterial strains. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 72, n. 4, p. 680-685, 2004.
- BEHRENFELD, Michael J. et al. IN SEARCH OF A PHYSIOLOGICAL BASIS FOR COVARIATIONS IN LIGHT-LIMITED AND LIGHT-SATURATED PHOTOSYNTHESIS 1. *Journal of Phycology*, v. 40, n. 1, p. 4-25, 2004.
- BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

- CALTEAU, Alexandra, et al. Phylum-wide comparative genomics unravel the diversity of secondary metabolism in Cyanobacteria. *BMC genomics*, 2014, vol. 15, no 1, p. 1-14.
- CANDIDO, Camila; LOMBARDI, Ana Teresa. *Mixotrophy in green microalgae grown on an organic and nutrient rich waste*. *World J Microbiol Biotechnology*, vol. 36, no 2, p.20, 2020.
- CARVALHO, Ana P., et al. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, vol. 89, no 5, p. 1275-1288.
- CHANG, Hai-Xing, et al. An annular photobioreactor with ion-exchange-membrane for non-touch microalgae cultivation with wastewater. *Bioresource technology*, 2016, vol. 219, p. 668-676.
- CHENG, Lihua, et al. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and purification technology*, 2006, vol. 50, no 3, p. 324-329.
- CRNKOVIC, Camila M.; MAY, Daniel S.; ORJALA, Jimmy. The impact of culture conditions on growth and metabolomic profiles of freshwater cyanobacteria. *Journal of applied phycology*, v. 30, n. 1, p. 375-384, 2018.
- DE PAULA SILVA, Pedro H. et al. Enhanced production of green tide algal biomass through additional carbon supply. **PLoS one**, v. 8, n. 12, p. e81164, 2013.
- ELISABETH, Bermejo; RAYEN, Filali; BEHNAM, Taidi. Microalgae culture quality indicators: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021, vol. 41, no 4, p. 457-473.
- ERIKSEN, Niels Thomas. Research trends in the dominating microalgal pigments, β -carotene, astaxanthin, and phycocyanin used in feed, in foods, and in health applications. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2016, vol. 6, no 3, p. 507.
- GANTAR, Miroslav; SVIRČEV, Zorica. Microalgae and cyanobacteria: food for thought 1. *Journal of phycology*, 2008, vol. 44, no 2, p. 260-268.
- GE, Yaming; LIU, Junzhi; TIAN, Guangming. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. *Bioresource Technology*, 2011, vol. 102, no 1, p. 130-134.
- GOIRIS, Koen, et al. *Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content*. *Journal of applied phycology*, vol. 24, no 6, p. 1477-1486, 2012.
- GONG, Mengyue; BASSI, Amarjeet. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology advances*, 2016, vol. 34, no 8, p. 1396-1412.
- GONZALEZ-CAMEJO, Josue et al. Effect of light intensity, light duration and photoperiods in the performance of an outdoor photobioreactor for urban wastewater treatment. **Algal Research**, v. 40, p. 101511, 2019.
- GUPTA, Vishal, et al. *New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—prospects and challenges*. *Algal research*, vol. 2, no 2, p. 79-97, 2013.
- HARRISON, W. G.; PLATT, T. Photosynthesis-irradiance relationships in polar and temperate phytoplankton populations. **Polar biology**, v. 5, n. 3, p. 153-164, 1986.
- HISEM, Daniel, et al. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon*, 2011, vol. 57, no 1, p. 76-83.
- HOSIKIAN, Aris, et al. Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International journal of chemical engineering*, 2010, vol. 2010.
- HUTCHINS, D. A. et al. CO₂ control of *Trichodesmium* N₂ fixation, photosynthesis, growth rates, and elemental ratios: Implications for past, present, and future ocean biogeochemistry. **Limnology and oceanography**, v. 52, n. 4, p. 1293-1304, 2007.
- JEREZ-MARTEL, Idaira, et al. Phenolic profile and antioxidant activity of crude extracts from microalgae and cyanobacteria strains. *Journal of Food Quality*, 2017, vol. 2017.
- JUNEAU, P.; EL BERDEY, A.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 42, n. 2, p. 155-164, 2002.
- KHAZI, Mahammed Ilyas; DEMIREL, Zeliha; DALAY, Meltem Conk. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. *Journal of applied phycology*, 2018, vol. 30, no 3, p. 1513-1523.
- KIVIRANTA, J., et al. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environmental toxicology and water quality*, 1991, vol. 6, no 4, p. 423-436.

- KOYANDE, Apurav Krishna, et al. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*, 2019, vol. 8, no 1, p. 16-24.
- KUMARI, Nidhi; RAI, Lal Chand. *Cyanobacterial diversity: molecular insights under multifarious environmental conditions*. In: *Advances in Cyanobacterial Biology*. Academic Press. p. 17-33, 2020.
- LOPES, Viviana R., et al. Primary screening of the bioactivity of brackishwater cyanobacteria: Toxicity of crude extracts to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. *Marine drugs*, 2010, vol. 8, no 3, p. 471-482.
- LÓPEZ, MC García-Malea, et al. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *Journal of biotechnology*, 2006, vol. 123, no 3, p. 329-342.
- LÓPEZ-ROSALES, L., et al. Pilot-scale bubble column photobioreactor culture of a marine dinoflagellate microalga illuminated with light emission diodes. *Bioresource technology*, 2016, vol. 216, p. 845-855.
- LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MARKOU, Giorgos, et al. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *Energies*, 2013, vol. 6, no 8, p. 3937-3950.
- MARTINS, Rosário et al. Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine *Synechocystis* and *Synechococcus* cyanobacterial strains in marine invertebrates. *Toxicon*, v. 50, n. 6, p. 791-799, 2007.
- MARSHALL, Helen L.; GEIDER, Richard J.; FLYNN, Kevin J. A mechanistic model of photoinhibition. **The New Phytologist**, v. 145, n. 2, p. 347-359, 2000.
- MORENO, José et al. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047. **Biomolecular engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 191-197, 2003.
- NWOBA, Emeka G. et al. Light management technologies for increasing algal photobioreactor efficiency. **Algal research**, v. 39, p. 101433, 2019.
- PARMAR, Asha, et al. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresource technology*, 2011, vol. 102, no 22, p. 10163-10172.
- PARRISH, Christopher C. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: **Lipids in freshwater ecosystems**. Springer, New York, NY, 1999. p. 4-20.
- PATIAS, Luciana D., et al. Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxy radical scavenger capacity. *Food research international*, 2017, vol. 100, p. 260-266.
- PLATT, T. G. C. L.; GALLEGOS, C. L.; HARRISON, W. Glen. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. 1981.
- PRIETO, Ana; CAÑAVATE, J. Pedro; GARCÍA-GONZÁLEZ, Mercedes. Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *Journal of biotechnology*, 2011, vol. 151, no 2, p. 180-185.
- PRIYADARSHANI, Indira; RATH, Biswajit. *Commercial and industrial applications of microalgae—A review*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, vol. 3, no 4, p. 89-100, 2012.
- PULZ, Otto; GROSS, Wolfgang. *Valuable products from biotechnology of microalgae*. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 65, no 6, p. 635-648, 2004.
- QIU, Renhe et al. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Algal research**, v. 28, p. 192-199, 2017.
- RAATEOJA, Mika; SEPPÄLÄ, Jukka; YLÖSTALO, Pasi. Fast repetition rate fluorometry is not applicable to studies of filamentous cyanobacteria from the Baltic Sea. **Limnology and Oceanography**, v. 49, n. 4, p. 1006-1012, 2004.
- RAVINDRAN, Balasubramani, et al. Microalgae potential and multiple roles—current progress and future prospects—an overview. *Sustainability*, 2016, vol. 8, no 12, p. 1215.
- SAKSHAUG, Egil et al. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n. 11, p. 1637-1670, 1997.
- SCHUURMANS, R. Milou et al. The redox potential of the plastoquinone pool of the cyanobacterium *Synechocystis* species strain PCC 6803 is under strict homeostatic control. **Plant physiology**, v. 165, n. 1, p. 463-475, 2014.

- SAIDE, Assunta; LAURITANO, Chiara; IANORA, Adrianna. Pheophorbide a: State of the Art. *Marine Drugs*, 2020, vol. 18, no 5, p. 257.
- SERÓDIO, João et al. Rapid light-response curves of chlorophyll fluorescence in microalgae: relationship to steady-state light curves and non-photochemical quenching in benthic diatom-dominated assemblages. **Photosynthesis research**, v. 90, n. 1, p. 29-43, 2006.
- SILVA, Jaqueline Carmo; ECHEVESTE, Pedro; LOMBARDI, Ana Teresa. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 161, p. 57-63, 2018.
- SINGH, Sawraj; KATE, Bhushan N.; BANERJEE, U. C. *Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview*. *Critical Rev Biotechnol*, 25: 73-95, 2005.
- SINGH, Sawraj; KATE, Bhushan N.; BANERJEE, U. C. *Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview*. *Critical reviews in biotechnology*, vol. 25, no 3, p. 73-95, 2005.
- SLOCOMBE, Stephen P., et al. *A rapid and general method for measurement of protein in microalgal biomass*. *Bioresource technology*, vol. 129, p. 51-57, 2013.
- SPOLAORE, Pauline, et al. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2006, vol. 101, no 2, p. 87-96.
- SUGGETT, David J. et al. Interpretation of fast repetition rate (FRR) fluorescence: signatures of phytoplankton community structure versus physiological state. **Marine Ecology Progress Series**, v. 376, p. 1-19, 2009.
- TSUJIMURA, SHIGEO Application of the frequency of dividing cells technique to estimate the in situ growth rate of Microcystis (Cyanobacteria) *Freshwater Biology* (2003) 48, 2009–2024
- VERMA, Shaloo, et al. Cyanobacterial secondary metabolites towards improved commercial significance through multiomics approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, vol. 38, no 6, p. 1-22.
- WANG, Bei, et al. *CO₂ bio-mitigation using microalgae*. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 79, no 5, p. 707-718, 2008.
- WANG, Zhicong et al. Mechanism of photosynthetic response in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 to low inorganic phosphorus. **Harmful Algae**, v. 9, n. 6, p. 613-619, 2010.
- WELLBURN, Alan R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of plant physiology**, vol. 144, no 3, p. 307-313, 1994.
- WIJFFELS, René H.; KRUSE, Olaf; HELLINGWERF, Klaas J. *Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae*. **Current opinion in biotechnology**, vol. 24, no 3, p. 405-413, 2013.
- WU, Zhongxing et al. Physiological regulation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in response to inorganic phosphorus limitation. **Harmful Algae**, v. 15, p. 53-58, 2012.
- YADAV, Geetanjali et al. Lipid content, biomass density, fatty acid as selection markers for evaluating the suitability of four fast growing cyanobacterial strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 325, p. 124654, 2021.
- YAMAMOTO, Yoshimasa; NAKAHARA, Hiroyuki. Competitive dominance of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in nutrient-rich culture conditions with special reference to dissolved inorganic carbon uptake. *Phycological Research*, 2005, vol. 53, no 3, p. 201-208.
- YAMAMOTO, Yoshimasa; TSUKADA, Hajime. MEASUREMENT OF IN SITU SPECIFIC GROWTH RATES OF MICROCYSTIS (CYANOBACTERIA) FROM THE FREQUENCY OF DIVIDING CELLS 1. *Journal of Phycology*, 2009, vol. 45, no 5, p. 1003-1009.
- YÉPRÉMIAN, Claude, et al. *Phycocyanin Extraction and Determination*. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, p. 335-338, 2016.
- ZAHRA, Zahra et al. Cyanobacteria: Review of current potentials and applications. **Environments**, v. 7, n. 2, p. 13, 2020.
- ZHANG, Min et al. THE ACCLIMATIVE CHANGES IN PHOTOCHEMISTRY AFTER COLONY FORMATION OF THE CYANOBACTERIA *MICROCYSTIS AERUGINOSA* 1. **Journal of Phycology**, v. 47, n. 3, p. 524-532, 2011.