



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



PROSPECÇÃO DE MICROALGAS BRASILEIRAS: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA,
METABÓLITOS ESPECIALIZADOS E BIOATIVIDADE

Renata Porto Sampaio

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de doutora em biotecnologia do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Coorientadora: Prof.^a Dra. Camila Manoel Crnkovic

Bolsista CAPES/DS - Processo número 88887.623859/2021-00

SÃO CARLOS

2024

RENATA PORTO SAMPAIO

PROSPECÇÃO DE MICROALGAS BRASILEIRAS: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, METABÓLITOS ESPECIALIZADOS E BIOATIVIDADE

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos - SP, Brasil.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Camila Manoel Crnkovic

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo - SP, Brasil

BANCA EXAMINADORA

Dr. Samuel Cavalcante do Amaral

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Dr. Fernanda Rios Jacinavicius

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Dra. Rhuana Valdetário Médice

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Dr. Cecilia Veronica Nunez

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

SÃO CARLOS

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou Qualificação de Doutorado da candidata Renata Porto Sampaio, realizada em 12/12/2024:

Dr. Samuel Cavalcante do Amaral
Universidade Federal de São Carlos

Dra. Fernanda Rios Jacinavicius
Universidade de São Paulo

Dra. Rhuana Valdetário Médice
Universidade de São Paulo

Dr. Cecilia Veronica Nunez
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof.^a Dra. Camila Manoel Crnkovic
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza
Universidade Federal de São Carlos

Sampaio, Renata Porto. Prospecção de Microalgas Brasileiras: caracterização bioquímica, metabólitos especializados e bioatividade. Tese de doutorado - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – UFSCar, São Carlos, 2024.

RESUMO

Microalgas, formam um grupo heterogêneo e polifilético de microrganismos fotossintetizantes que têm recebido atenção crescente por serem fonte de produtos naturais de interesse comercial, sejam eles do metabolismo primário ou secundário. Muitos desses metabólitos são exclusivos das microalgas. Essa diversidade química ofertada pelas microalgas é um nicho de oportunidade para a busca de moléculas promissoras, principalmente quando diversas atividades biológicas, como ação antibacteriana e anticancerígena, já foram descritas e o grupo ainda foi pouco explorado. Dessa forma, essa pesquisa buscou caracterizar a composição de metabólitos primários e secundários de quatro microalgas brasileiras, *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp, *Sorastrum bengalicum* e *Chlorolobion braunii*. *A. arcuatus* se destacou pela produção de lipídeos, que representam $39,59\% \pm 5,72\%$ de peso seco. A espécie *C. braunii* se destacou em relação quantidade de proteínas por volume de cultivo, 1,93 mg/L. Enquanto *S. bengalicum* e *Radiococcus* sp apresentam as maiores porcentagem de carboidratos, com $2,3 \pm 0,5$ e $2,0 \pm 1,0$ mg/L, respectivamente. Essa última também apresentou o maior teor de carotenoides totais. Em relação à análise de produção de metabolitos secundários, foram realizadas análises metabolômicas de extratos algas em diferentes fases de crescimento através da espectrometria de massas, empregando UPLC-HRMS/MS. A espécie *A. arcuatus* apresentou o maior número de metabólitos distintos na fase exponencial de crescimento. A espécie *S. bengalicum* apresentou a maior distinção de metabolitos entre as fases exponencial e estacionaria de crescimento. E a espécie *C. braunii* apresentou a maior semelhança. Os nossos dados sugerem que a fase de crescimento, entre as fases de crescimento comparadas, influencia o número e as *features* presentes em cada espécie, sendo um fator relevante na descoberta de moléculas inéditas. A desreplcação guiada por atividade antimicrobiana indicou possíveis *features* que podem ser compostos de interesse, e com uma análise técnica adicional, podem levar a fórmulas químicas potencialmente inéditas.

Palavras-chave: *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp., *Sorastrum bengalicum*, *Chlorolobion braunii*, atividade antimicrobiana, espectrometria de massas, metabolômica.

Sampaio, Renata Porto. Prospection of Brazilian Microalgae: biochemical characterization, specialized metabolites, and bioactivity. PhD Thesis (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2024.

ABSTRACT

Microalgae, form a heterogeneous and polyphyletic group of photosynthetic microorganisms. Their primary and secondary metabolites have brought attention to this group as a source of natural products of commercial interest. Many metabolites are unique to microalgae. This chemical diversity offered by microalgae is a niche of opportunity for searching promising molecules, especially when several biological activities, such as antibacterial and anticancer action, have already been described and the group has been barely explored. Thus, this research sought to characterize the composition of primary and secondary metabolites of four microalgae, *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp, *Sorastrum bengalicum* and *Chlorolobion braunii*. *A. arcuatus* was noteworthy to produce lipids, which represent $39.59\% \pm 5.72\%$ of its dry weight. The species *C. braunii* was noted in relation of proteins amount per culture volume, 0.00193 mg/mL. While *S. bengalicum* and *Radiococcus* sp had the highest percentage of carbohydrates, $2,3 \pm 0,5$ and $2,0 \pm 1,0$ $\mu\text{g/mL}$, respectively. The latter also had the highest content of total carotenoids. Regarding the analysis of secondary metabolite production, metabolomic analyses of algal extracts obtained in different growth phases were performed using mass spectrometry, employing UPLC-HRMS/MS. The species *A. arcuatus* showed the highest number of distinct metabolites in the exponential growth phase. The species *S. bengalicum* showed the greatest distinction of metabolites between exponential and stationary phases of growth. And the species *C. braunii* showed the greatest similarity. Our data suggest that the growth phase, among the compared growth phases, influences both the number and *features* themselves present in each species, representing a relevant factor in the discovery of novel molecules. Antimicrobial activity-guided dereplication identified potential *features* that may be compounds of interest, and with further technical analysis, they may lead to the identification of potentially novel chemical formulas.

Keywords: *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp., *Sorastrum bengalicum*, *Chlorolobion braunii*, antimicrobial activity, mass spectrometry, metabolomics

AGRADECIMENTOS

Ninguém trilha nenhum caminho sozinho, e eu não poderia ser mais grata aos que me acompanharam e apoiaram nessa jornada.

Gostaria de agradecer primeiro a minha tia, Paula Bernadete Bruno, que desde que me conheço por gente me guiou e mostrou o poder e a importância da educação. Sem a qual eu não seria a pessoa que eu sou hoje, e a qual me inspira em todos os dias da minha vida. Sinto sua falta.

A minha família, que sempre esteve presente nos momentos mais difíceis. Ao meu pai que sempre me apoiou em qualquer decisão profissional que tivesse e ao meu irmão que sempre me apoiou tanto emocionalmente como fisicamente. Um agradecimento muito especial a quem me deu a vida, e que para sempre vou me lembrar através de um amor transbordante.

Aos meus colegas do laboratório que foram tão importantes. Especialmente a Amanda e Jaewon, gratidão por terem me ajudado a me encontrar e a ser uma pessoa melhor e entregar um trabalho melhor. Obrigada a todo o pessoal do querido LabAzul! Vocês são uma família, linda e acolhedora. Obrigada Maria, Luiza, Sara, Vitória, Yuri, Léos, Francisco, Márcio, Rhuana, João e mais todos os queridos. Obrigada Jaqueline por ter me ensinado os primeiros passos com microalgas, Leo e Lucas.

Gostaria de agradecer a FAPESP pelo financiamento ao projeto “Bioprospecção, caracterização e otimização de microalgas brasileiras para a biofixação de CO₂ e produção de biomoléculas de importância comercial” (Processo FAPESP 2018/07988-5) obtido pela professora Ana Teresa Lombardi, e a mesma por ter me dado a oportunidade de iniciar nessa área de pesquisa. E ao professor Clóvis por ter me adotado e guiado nessa jornada.

A Thaís Garcia da Silva, uma pesquisadora excelente na área, e quem sempre esteve disposta a me orientar em novos conhecimentos. Sua participação foi fundamental em várias etapas desse trabalho.

Camila Manoel Crnkovic, meus sinceros agradecimentos, além de me proporcionar a chance de aprender um mundo novo na metabolômica, você também me ensinou muito sobre ponderações e uma forma de trabalhar muito mais eficiente. Obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Bolsista CAPES/DS - Processo número 88887.623859/2021-00

*“A academia não é o paraíso, mas o aprendizado, é um lugar onde o paraíso pode ser criado.
[...] continua sendo ambiente de possibilidades.”*

Bell Hooks

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Rede bibliométrica das 570 palavras que tiveram pelo menos 100 ocorrências.....26
- Figura 2 - Rede bibliométrica das 570 palavras que tiveram pelo menos 100 ocorrências, relacionada ao ano da publicação.27
- Figura 3 - Rede bibliométrica com as palavras chaves obtidas com a combinação dos termos “cyanobacteria” e “natural products”, e termos correlatos.28
- Figura 4 - Rede bibliométrica com as palavras chaves obtidas com a combinação dos termos “microalgae” e “natural products”, e termos correlatos.28
-
- Figura 1.1 – Microalgas utilizadas nesse capítulo da pesquisa. Da esquerda para a direita *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp., *Sorastrum bengalicum* e *Chlorolobion braunii*. Fonte: A autora, aumento entre 100 e 400.34
- Figura 1.2 - Manutenção das culturas em meio WC com ciclo de claro escuro de 12:12 horas, a 25 ± 1°C. Fonte: A autora.37
- Figura 1. 3 – Destaque, microscopias do cultivo da espécie *S. bengalicum*, com ênfase para a formação de cenóbios. As imagens A, C e D mostram um aumento de 200x e a imagem B um aumento de 400x. Fonte: A autora.....43
- Figura 1.4 - Biomassa das espécies estudadas nesse capítulo, depois de serem mantidas a 40 °C por 48 horas. Fonte: A autora.46
-
- Figura 2. 1 - Filtração da amostra CCMA-UFSCar 89 com auxílio de um funil com lã de vidro. Fonte: A autora.62
- Figura 2. 2 – Rotaevaporador ika rv 10 control. Fonte: A autora.....62
- Figura 2. 3 – Rede molecular para a cepa CCMA-UFSCar 24, *Ankistrodesmus arcuatus*, com destaque para as *features* (nodos) que foram encontradas na fase exponencial (verde claro) e na fase estacionária (verde escuro).....68
- Figura 2. 4 – Diagramas de Venn representando o número de *features* (nodos) encontrado das fases exponencial e estacionária das espécies *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp., *Sorastrum bengalicum* e *Chlorolobion braunii*.71
- Figura 2. 5 – Rede molecular analisada com o *MolNetEnhancer* para a cepa CCMA-UFSCar 24, *Ankistrodesmus arcuatus*, com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro), compostos organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lipídios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho). ...72
- Figura 2. 6 – Rede molecular dos extratos das cepas *A. arcuatus*, *Radiococcus* sp., *S. bengalicum*, e *C. braunii* analisadas com o *MolNetEnhancer*, com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro),

compostos organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lipídios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho).	79
Figura 2. 7 – Rede molecular obtidas através de metadados, com destaque para as <i>features</i> (nodos) que foram encontradas para cada extrato de microalga na fase exponencial (exp. - cores claras) e na fase estacionária (est. - cores escuras), conforme a legenda.....	80
Figura 2. 8 - Diagrama de Euler com destaque para as cepas e o número de nodos que são compartilhados ou exclusivos para cada uma delas. ‘XS’ inclui tanto os metabólitos obtidos na fase exponencial, como na fase estacionária de crescimento.	81
Figura 2. 9 - Diagrama de Venn, separando as quatro espécies de microalgas e suas duas fases de crescimento em 8 grupos distintos. Relembrando que os códigos para cada microalga são: CCMA-UFSCar 24 - <i>A. arcuatus</i> , CCMA-UFSCar 283 - <i>Radiococcus</i> sp., CCMA-UFSCar 556 – <i>S. bengalicum</i> e CCMA-UFSCar 702 <i>C. braunii</i> . E ‘x’ representa amostras da fase exponencial de crescimento, e ‘s, a fase estacionária.	82
Figura 2. 10 – Rede molecular com destaque para os 128 nodos que são compostos por espectros consenso obtidos exclusivamente de amostras da espécie <i>Radiococcus</i> sp na fase estacionária de crescimento. Os clusters destacados foram escolhidos para desreplicação.....	83
Figura 2. 11 – Cluster com <i>features</i> anotadas como Feoforbídeo <i>a</i>	84
Figura 2. 12 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 593,2707.....	85
Figura 2. 13 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 607,29.....	86
Figura 2. 14 – <i>Match</i> da biblioteca de espectros do GNPS com o composto que foi detectado na <i>Feature</i> 119654, de massa acurada 593,2551.....	87
Figura 2. 15 - <i>Match</i> da biblioteca de espectros do GNPS com o composto que foi detectado na <i>Feature</i> 119726, de massa acurada 607,2921.....	88
Figura 2. 16 – Degradação da clorofila <i>a</i> em Feoforbídeo <i>a</i> . Adaptado de SAIDE; LAURITANO; IANORA, 2020.....	89
Figura 2. 17 – Clusters selecionados para desreplicação com base nas <i>features</i> provenientes majoritariamente de espectros da <i>Radiococcus</i> sp.	89
Figura 2. 18 – Cluster A. Os nodos exibem os valores de <i>m/z</i> para cada <i>feature</i> , as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ). Nodos não anotados foram considerados iguais aos anotados.	92
Figura 2. 19 – Cluster B. Os nodos exibem os valores de <i>m/z</i> para cada <i>feature</i> , as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ).	93
Figura 2. 20- Clusters selecionados para desreplicação devido a exclusividade química da cepa de <i>A. arcuatus</i> na fase exponencial de crescimento.	96
Figura 2. 21 – Cluster A. Os nodos exibem os valores de <i>m/z</i> para cada <i>feature</i> , as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ).	98
Figura 2. 22 – Cluster B. Os nodos exibem os valores de <i>m/z</i> para cada <i>feature</i> , as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ).	99
Figura 2. 23 - Cluster inicialmente reconhecido como canabinol.	99

Figura 2. 24 – Anotação automática do GNPS.....	100
Figura 2. 25 – Espectro considerado correspondente para a <i>Feature</i> 64019.....	100
Figura 2. 26 – Espectro considerado correspondente para a <i>Feature</i> 72492.....	101
Figura A. 1 – Rede bibliométrica das 1070 palavras que tiveram pelo menos 50 ocorrências...114	
Figura A. 2 – Rede bibliométrica das 1070 palavras que tiveram pelo menos 50 ocorrências, relacionada ao ano em que foram utilizadas.....	115
Figura A. 3 – Rede molecular para a cepa CCMA-UFSCar 24, <i>Ankistrodesmus arcuatus</i> , com destaque para as <i>features</i> (nodos) que foram encontrados na fase exponencial (verde claro) e na fase estacionária (verde escuro).....	116
Figura A. 4 – Rede molecular analisada com o <i>MolNetEnhancer</i> para a cepa CCMA-UFSCar 24, <i>Ankistrodesmus arcuatus</i> , com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro), compostos organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lipídios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho). .	117
Figura A. 5. – Rede Cytoscape para a cepa CCMA-UFSCar 283, <i>Radiococcus</i> sp., com destaque para os nodos que foram encontrados na fase exponencial (verde claro) e na fase estacionária (verde escuro).	118
Figura A. 6 – Rede molecular analisada com o <i>MolNetEnhancer</i> para a cepa CCMA-UFSCar 283, <i>Radiococcus</i> sp., com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro), compostos organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lipídios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho).....	119
Figura A. 7 – Rede Cytoscape para a cepa CCMA-UFSCar 556, <i>Sorastrum bengalicum</i> , com destaque para os nodos que foram encontrados na fase exponencial (verde claro) e na fase estacionária (verde escuro).	120
Figura A. 8 – Rede molecular analisada com o <i>MolNetEnhancer</i> para a cepa CCMA-UFSCar 556, <i>Sorastrum bengalicum</i> , com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro), compostos organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lipídios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho). .	121
Figura A. 9 – Rede Cytoscape para a cepa CCMA-UFSCar 702, <i>Chlorolobion braunii</i> , com destaque para os nodos que foram encontrados na fase exponencial (verde claro) e na fase estacionária (verde escuro).	122
Figura A. 10 – Rede molecular analisada com o <i>MolNetEnhancer</i> para a cepa CCMA-UFSCar 702, <i>Chlorolobion braunii</i> , com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro), compostos	

organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lipídios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho). .	123
Figura A. 11 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 411,3255 da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	124
Figura A. 12 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> 117203 de <i>m/z</i> 413,3414 da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	125
Figura A. 13 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 425,0226 da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	126
Figura A. 14 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da <i>feature</i> analisada do cluster A, da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	127
Figura A. 15 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 375,3046 da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	128
Figura A. 16 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da <i>feature</i> analisada do cluster B.	129
Figura A. 17 - Espectro de MS2 da <i>feature</i> 119561, cluster C, da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	129
Figura A. 18- Espectro de MS2 da <i>feature</i> 119561, cluster C, da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	130
Figura A. 19 – <i>Match</i> da <i>feature</i> 119561 com a biblioteca do GNPS, da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	130
Figura A. 20 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 570,4521, da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	131
Figura A. 21 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 570,4521 da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária. Em (c) também é possível observar o MS2 da <i>feature</i> de <i>m/z</i> 570,4487.	132
Figura A. 22 – Espectros de fragmentação MS2 para as <i>features</i> 119561 e 119562 de <i>m/z</i> 570,4521 e <i>m/z</i> 570,4487 da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	133
Figura A. 23 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da <i>feature</i> 119561	134
Figura A. 24 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 550,431, da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	135
Figura A. 25 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 712,481, da linhagem <i>Radiococcus</i> sp. na fase estacionária.	136
Figura A. 26 - – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da <i>feature</i> analisada do cluster D.	137
Figura A. 27 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 450,1879, obtido da linhagem <i>A. arcuatus</i> na fase exponencial.	138
Figura A. 28 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 542,3080, da linhagem <i>A. arcuatus</i> na fase exponencial.	139
Figura A. 29 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 542,3085, da linhagem <i>A. arcuatus</i> na fase exponencial.	140

Figura A. 30 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da <i>feature</i> 119386	141
Figura A. 31 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 544,2574.....	142
Figura A. 32 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 559,3134.....	143
Figura A. 33 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da <i>feature</i> 119561	144
Figura A. 34 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 263,1637.....	145
Figura A. 35 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a <i>feature</i> de <i>m/z</i> 277,1796.....	146
Figura A. 36 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da <i>feature</i> 64019.	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Espécies de microalgas, valores de irradiância saturante (E_k) e respectiva taxa de crescimento.....	42
Tabela 2. 1 - Espécies de microalgas, identificação da cepa na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da UFSCar.	61
Tabela 2. 2 – Número de nodos encontrados na rede molecular para cada espécie.....	69
Tabela 2. 3 - Número de features encontrados para cada superclasse de moléculas. ‘x’ representa nodos encontrados na fase exponencial, ‘s’ nodos encontrados na fase estacionária e ‘xs’ nodos encontrados em ambas as fases.	73
Tabela 2. 4 – Anotação do Cluster contendo feoforbídeo <i>a</i>	88
Tabela 2. 5 – Clusters desreplicados devido a atividade biológica.	90
Tabela 2. 6 – Clusters desreplicados devido a exclusividade química para a cepa de <i>A. arcuatus</i> na fase exponencial de crescimento.	97
Tabela 2. 7 – Tetrahydrocannabinol.....	101

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico TreeMap extraído do <i>Web of Science</i> , ao se buscar pelo termo “Microalgae” em novembro de 2024. Os 11 países com maior número de publicações são, em ordem decrescente: República popular da China, Estados Unidos, Índia, Espanha, França, Brail, Austrália, Coréia do Sul, Alemanha, Itália e Japão.	22
Gráfico 2 – Número de publicações por ano na plataforma do Web Of Science com o termo “ <i>Microalgae</i> ”.....	24
Gráfico 3 – Gráfico TreeMap das categorias nos quais os artigos sobre microalgas estão distribuídos.	25
Gráfico 1.1 - Parâmetros de crescimento em função do \ln da fluorescência que representa a clorofila <i>a in vivo</i> ($\mu\text{g/mL}$). Losango - <i>A. arcuatus</i> ; círculo fechado - <i>Radiococcus</i> sp; círculo vazado - <i>S. bengalicum</i> ; e, elipse - <i>C. braunii</i> . As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 replicatas. O gráfico de barras representa as taxas de crescimento (d^{-1}) de cada espécie na fase exponencial de crescimento. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.	43
Gráfico 1.2 - Gráfico de linhas: Parâmetros de crescimento das microalgas em relação ao \ln do número de células: Losango - <i>A. arcuatus</i> ; círculo fechado - <i>Radiococcus</i> sp; e, elipse - <i>C. braunii</i> . As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.	44
Gráfico 1.3 - Resultados obtidos da biomassa seca para as espécies estudadas. As barras representam a média da biomassa seca obtida entre as triplicatas. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.	45
Gráfico 1.4 - Resultados obtidos para a quantidade de proteínas totais para cada espécie estudada nesse capítulo. As barras com preenchimento sólido representam a quantidade de proteínas totais em g/L, e as barras com preenchimento de linhas laterais representam a porcentagem de proteínas totais em relação a biomassa seca de cada espécie. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.	47
Gráfico 1.5 - Resultados obtidos para a quantidade de lipídios totais para cada espécie estudada nesse capítulo. As barras com preenchimento sólido representam a quantidade de lipídios totais em g/L, e as barras com preenchimento de linhas laterais representam a porcentagem de lipídios totais em relação a biomassa seca de cada espécie. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.	49
Gráfico 1.6 - Resultados obtidos para a quantidade de carboidratos totais para cada espécie estudada nesse capítulo. As barras com preenchimento sólido representam a quantidade de carboidratos totais em g/L, e as barras com preenchimento de linhas laterais representam a porcentagem de carboidratos totais em relação a biomassa seca de cada espécie. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.....	50
Gráfico 1.7 - Resultados obtidos para a quantidade de pigmentos totais para cada espécie estudada nesse capítulo. Ca, se refere a clorofila <i>a</i> , Cb se refere a clorofila <i>b</i> e CT se refere a carotenoides totais. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.....	51

Gráfico 1.8 - Resultados obtidos para a quantidade de pigmentos em relação a biomassa seca para cada espécie estudada nesse capítulo. Ca, se refere a clorofila *a*, Cb se refere a clorofila *b* e CT se refere a carotenoides totais. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas. .52

Gráfico 2. 1 – Representação do número de *nodos* atribuído a cada superclasse química para cada espécie e a fase de crescimento que foi encontrada. ‘*x*’ representa *nodos* encontrados na fase exponencial, ‘*s*’ *nodos* encontrados na fase estacionária e ‘*xs*’ *nodos* encontrados em ambas as fases. ‘Sem correspondência’ são *nodos* que não tiveram match químico, e análogos.....74

Gráfico 2. 2 – Gráficos da atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos das cepas *A. arcuatus*, *Radiococcus* sp., *S. bengalicum*, e *C. braunii* frente as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. CE representa o controle de esterilidade (apenas o meio de cultivo); CC - controle de crescimento (meio de cultivo mais bactéria); CA - controle com antibiótico; EXP - amostras de microalga na fase exponencial; EST – amostras na fase estacionária; 50 - 50 µg de extrato; 500 - 500 µg de extrato e, R1, R2 e R3 as triplicatas biológicas.78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca - clorofila *a*

Cb - clorofila *b*

CT - Carotenoides totais

ESI - *eletrospray ionization*

HPLC - *high-performance liquid chromatography*

HRMS - *high-resolution mass spectrometry*

HPLC-ESI-HRMS - *high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry with eletrospray ionization*

LC - *liquid chromatography*

LC-MS - *liquid chromatography – mass spectrometry*

MS - *mass spectrometry*

MS/MS - *mass spectrometry/mass spectrometry, espectrometria de massas em tandem*

MeOH – metanol

NMR - *Nuclear Magnetic Resonance Nuclear*

UPLC - *Ultra High-Performance Liquid Chromatography*

GNPS - *Global Natural Product Social Molecular Networking*

SUMÁRIO

SUMÁRIO	17
INTRODUÇÃO	19
JUSTIFICATIVA	30
OBJETIVOS	31
CAPÍTULO 1	32
INTRODUÇÃO	32
ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE QUATRO CEPAS DE MICROALGAS	34
Material e Métodos	36
Culturas	36
Composição Bioquímica	38
Biomassa seca	38
Proteínas totais	39
Lipídios totais	39
Carboidratos Totais	40
Clorofila <i>a</i> , Clorofila <i>b</i> e Carotenoides	40
Resultados e discussão.....	42
Culturas	42
Composição Bioquímica	44
Biomassa seca	45
Proteínas totais	46
Lipídios totais	47
Carboidratos totais	49
Clorofila <i>a</i> , Clorofila <i>b</i> e Carotenoides	51
Conclusões	53
CAPÍTULO 2	54
INTRODUÇÃO	54
Material e métodos.....	60
Culturas	60
Extratos	61
Espectrometria de Massas	63
Redes moleculares e metabolômica	63
Ensaio da Atividade antimicrobiana.....	65
INVESTIGAÇÃO DOS METABÓLITOS - METABOLÔMICA COMPARATIVA	66
Objetivo.....	66
Resultados e Discussão	67
Culturas e extratos	67
Redes moleculares e metabolômica	67

INVESTIGAÇÃO DOS METABÓLITOS - DESREPLICAÇÃO GUIADA POR ATIVIDADE BIOLÓGICA	76
Objetivo.....	76
Resultado e Discussão.....	77
Ensaio da Atividade antimicrobiana.....	77
Redes moleculares e metabolômica	79
Desreplcação e anotação	82
INVESTIGAÇÃO DOS METABÓLITOS – POTENCIAIS COMPOSTOS DE INTERESSE	95
Objetivos	95
Resultado e Discussão.....	96
Espectrometria de massas e metabolômica	96
Conclusões	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXO I.....	114
ANEXO II.....	116
CEPA 24 - <i>ANKISTRODESMUS ARCUATUS</i>	116
CEPA 283 - <i>RADIOCOCCUS SP.</i>	118
CEPA 556 - <i>SORASTRUM BENGALICUM</i>	120
CEPA 702 - <i>CHLOROLOBION BRAUNII</i>	122
CROMATOGRAMAS E ESPECTROGRAMAS E RESULTADOS DO SIRIUS	124
ATIVIDADE MICROBIANA – DEMAIS RESULTADOS	148

INTRODUÇÃO

O termo microalgas se refere a um grupo de microrganismos aquáticos ou terrestres capazes de realizar fotossíntese. Não é um termo que define um grupo taxonômico próprio, mas engloba um conjunto extremamente diversificado de organismos microscópicos capazes de reduzir CO₂ e produzir O₂ por meio da fotossíntese (HACHICHA et al., 2022; LAKATOS; STRIETH, 2017; NORICI; GEROTTO, 2021).

Esse grupo filogeneticamente heterogêneo contém organismos eucariotos, com distintas cores (pigmentos), morfologias e habitats naturais (BILAL et al., 2017; KHAN; SHIN; KIM, 2018). Sobre a taxonomia desse grupo, há um consenso de que qualquer organismo que contenha clorofila *a*, desprovido de raiz, caule, folhas e flores, possa ser considerado uma alga, e que, caso, esse organismo seja fitoplâncton eucariótico microscópico unicelular, é considerado uma microalga (HACHICHA et al., 2022). O número de espécies de microalgas é incerto, mas há informações de que existam cerca 200.000 a 800.000 espécies, e destas, apenas 35.000 tinham sido descritas na literatura até 2003, e um número ainda menor tinha sido aproveitado para benefício humano (ODJADJARE et al., 2017; OLAIZOLA, 2003). Até o nosso conhecimento, não existe até o presente momento uma estimativa da biodiversidade de microalgas no Brasil, apenas alusões a biodiversidade do país e, conseqüentemente, de cianobactérias e microalgas que compõe uma parte significativa dessa biodiversidade (OLIVEIRA et al., 2020).

Em concordância com sua enorme diversidade filogenética, os diferentes processos evolutivos, adaptações fisiológicas e a pressões ambientais específicas, as microalgas apresentam uma ampla gama de diversidade metabólica (NORICI; GEROTTO, 2021). Essa rica diversidade química, espelhada da diversidade filogenética, ainda não foi totalmente investigada (BOROWITZKA, 2013; LAURITANO et al., 2019; SATHASIVAM et al., 2019). Assim, esse grupo se torna extremamente atrativo para a bioprospecção e para a exploração comercial de uma variedade de biomoléculas (BOROWITZKA, 2013), pois essa diversidade metabólica das microalgas é uma fonte potencial de compostos com aplicações em diversas indústrias.

Tal diversidade química de biomoléculas é resultado de vias metabólicas diferenciadas presentes nas microalgas, sendo essas de água doce, marinhas ou terrestres. De forma didática, podemos separar essas biomoléculas em dois grandes grupos: metabólicos primários e metabólitos secundários (ALMEIDA, 2017; BARKIA; SAARI; MANNING, 2019; DARIENKO et al., 2015).

Todos os compostos essenciais para a manutenção da espécie, relacionados aos processos químicos que devem ocorrer diariamente para o desenvolvimento, sobrevivência e reprodução do organismo, são considerados metabólitos primários, e podem incluir carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, dentre outros compostos como os pigmentos (ALMEIDA, 2017; BARKIA; SAARI; MANNING, 2019).

As microalgas também são capazes de adaptar sua composição bioquímica em resposta aos fatores ambientais. Essas respostas são desencadeadas por fatores relacionados à defesa, sobrevivência, competição e/ou comunicação, e geram produtos naturais, os quais podem ser classificados como metabólitos secundários (com função desconhecida) ou metabólitos especializados (com função conhecida) (ALMEIDA, 2017; BILAL et al., 2017). Esses metabólitos têm uma ação especializada, ou seja, têm uma função biológica. Essa função biológica por sua vez pode ser inspirar o desenvolvimento de um produto biotecnológico de interesse, como é o caso da dolastatina 10, produzida por cianobactérias e que inspirou o desenvolvimento da brentuximab vedotina que é um conjugado anticorpo-fármaco utilizado para o tratamento de linfoma ((CCATES), 2019; SENTER; SIEVERS, 2012).

A distinção de um composto entre primário ou secundário não se baseia apenas em sua estrutura química, mas também em sua função biológica e distribuição entre organismos. Independente dessa classificação, atividades biológicas apresentadas por biomoléculas isoladas e/ou por extratos das microalgas provêm tanto de metabólitos primários como secundários (ALMEIDA, 2017; BILAL et al., 2017; MAGHEMBE et al., 2020) e representam um conjunto de moléculas potenciais pouco estudado (LAURITANO et al., 2019).

Esses compostos produzidos por microalgas podem ter aplicações biotecnológicas em diversas indústrias, tais como indústrias farmacêutica, cosmeceutica, nutracêutica e alimentícia (BILAL et al., 2017; KHAN; SHIN; KIM, 2018; OLAIZOLA, 2003). Além da possibilidade de se aproveitar microalgas para o tratamento de águas residuais e produção de biocombustíveis (MISHRA et al., 2019). Todavia, o que destaca as microalgas em relação a aplicações biotecnológicas são os compostos de alto valor agregado que produzem (BOROWITZKA, 2013).

Dentre os extratos de microalgas que já são empregados na indústria alimentícia e podemos destacar a biomassa dos gêneros *Chlorella* e *Dunaliella* (PULZ; GROSS, 2004). Porém outras espécies vêm sendo gradualmente incorporadas ao consumo humano na forma de suplementos alimentares e nutracêuticos, os quais têm potencial terapêutico quando ingeridos, e que podem ser obtidos a partir das biomoléculas isoladas. Uma das vantagens de diversas espécies serem

consideradas adequadas para consumo é que elas possuem o status de GRAS (Geralmente Reconhecida como Segura), status que numa perspectiva industrial, reduz os custos a jusante de purificação de compostos específicos, sejam de proteínas, óleos, flavonoides, terpenos, ou outros metabólitos (BILAL et al., 2017; GARCÍA; DE VICENTE; GALÁN, 2017). Muitas microalgas podem apresentar, além da relevância nutricional, compostos bioativos com maior valor biológico e econômico associados (SKJÅNES; REBOURS; LINDBLAD, 2013).

Na indústria cosmética, extratos de microalgas ou componentes bioativos isolados são usados em produtos como cremes anti-sinais, regeneradores, anti-irritantes, protetores solares, entre outros, já que seus componentes apresentam atividades como antienvelhecimento, proteção ao estresse oxidativo, de fotoproteção e de estímulo à proliferação celular (BILAL et al., 2017; KIM, 2015; STOLZ; OBERMAYER, 2005). Os carotenoides, que fazem parte da pigmentação das microalgas, têm ganhado atenção devido ao seu papel fisiológico e ação como antioxidantes. Duas microalgas Chlorophytas, *Haematococcus pluvialis* e *Dunaliella salina* são conhecidas produtoras de carotenoides que já possuem aplicação mercadológica (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011; JIANG; KEMPINSKI; CHAPPELL, 2016; KIM, 2015).

Na indústria farmacêutica, existem compostos bioativos extraídos de microalgas com propriedades tais como antibacteriana, antiviral, anticancerígena, antialgal, antioxidante e anti-inflamatórias (SAEED et al., 2021). A atividade antibacteriana já foi descrita na literatura para diversos grupos: Chlorophyta (ex: *Chlamydomonas reinhardtii* e *Dunaliella primolecta*), Rhodophyta (ex: *Porphyridium aeruginum* e *Rhodella reticulata*), Bacillariophyceae (ex: *Asterionella glacialis* e *Skeletonema costatum*) (FALAISE et al., 2016). Atividades antifúngicas contra *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, foram obtidas a partir de extratos orgânicos de *Chlorococcum humicola*, uma Chlorophyta. De acordo com a literatura, a produção de compostos anti-fúngicos apresenta, para a cepa produtora, a função de protegê-las de fungos parasitários, como um produto do metabolismo secundário dessas microalgas (VESTOLA et al., 2014), e também um metabólito especializado.

Apesar do potencial de compostos de algumas microalgas já ter sido demonstrado, o número de compostos disponíveis no mercado é escasso. É provável que isso seja devido ao curto período de tempo de investigação no que concerne microalgas e produtos farmacológicos, o que é agravado dos tempo requerido entre a pesquisa básica e a disponibilização das drogas no mercado, o que varia em média de 10 à 15 anos, sendo ainda, um processo de alto custo (MARTÍNEZ ANDRADE et al., 2018).

Como já foi citado, as aplicações biotecnológicas apresentadas por microalgas, provêm de tanto de metabólitos primários como especializados (BILAL et al., 2017) e, a alta diversidade das microalgas aliada à sua capacidade de adaptação a distintas condições do ambiente contribui para a diversidade bioquímica que pode ser representar produtos naturais promissores (BOROWITZKA, 2013).

Metabólitos secundários bioativos das microalgas são considerados moléculas de alto valor, e são de interesse para a descoberta de novos fármacos. (BARKIA; SAARI; MANNING, 2019; LAURITANO et al., 2019). Entretanto, são escassos estudos mais abrangentes sobre os metabólitos especializados produzidos pelas microalgas. E mais escassos são os estudos das microalgas brasileiras. O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade do mundo segundo o Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima do Brasil (BIODIVERSIDADE E BIOMAS, 2024), porém ocupa a sétima posição dentre os países em relação ao número de artigos publicados e indexados na plataforma *Web of Science Core Collection* em relação a microalgas, como podemos observar no Gráfico 1.

Esse trabalho se insere a partir do conhecimento de que metabólitos secundários de microalgas tem um alto valor agregado e que existem poucas pesquisas sobre microalgas brasileiras.

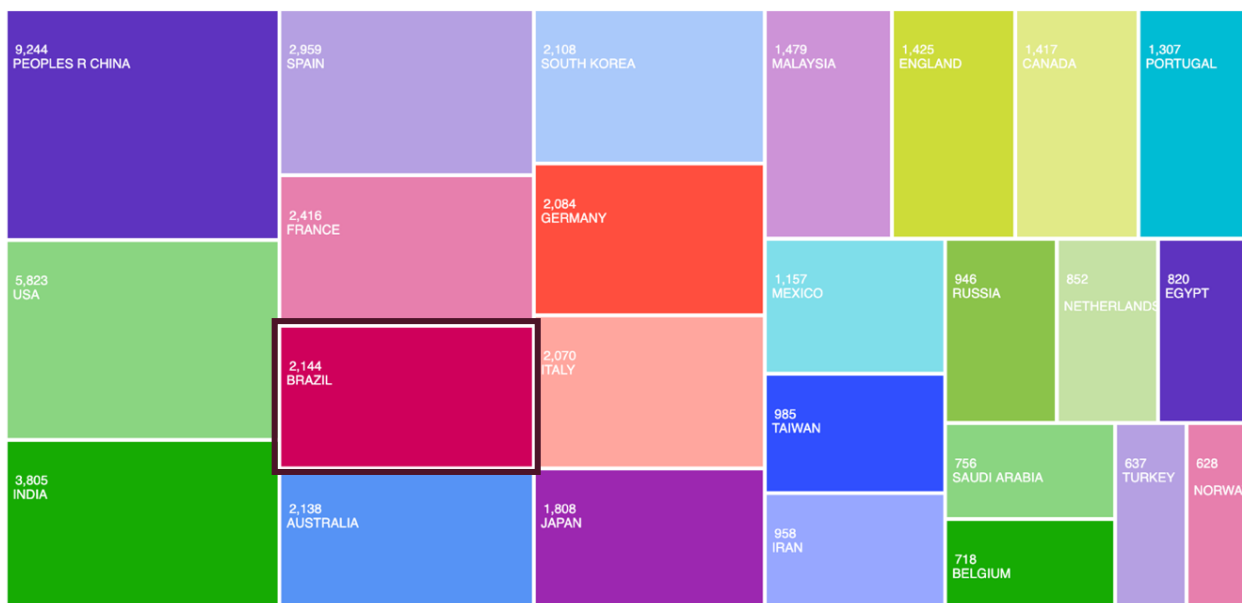


Gráfico 1 - Gráfico TreeMap extraído do *Web of Science*, ao se buscar pelo termo “Microalgae” em novembro de 2024. Os 11 países com maior número de publicações são, em ordem decrescente: República popular da China, Estados Unidos, Índia, Espanha, França, Brasil, Austrália, Coréia do Sul, Alemanha, Itália e Japão.

Metabólitos podem ser estudados de uma forma mais abrangente e sistemática através da metabolômica, que é uma técnica *ômica* para investigação, qualitativa e quantitativa, das pequenas moléculas que são produzidas sob condições específicas (NELSON, 2013). Atualmente, estudos metabolômicos já foram utilizados para estudar o uso de microalgas em águas residuais e para quantificar e identificar metabólitos secundários que podem ser utilizados para alimentação, na indústria farmacêutica e para a saúde pública (MISHRA et al., 2019).

Dentre as técnicas analíticas mais utilizadas para estudos metabolômicos, a espectrometria de massas (EM ou MS) se destaca pela alta sensibilidade (picogramas) e a capacidade de distinguir um maior número de compostos em extratos biológicos complexos, principalmente quando acoplada a uma técnica de separação, como a cromatografia líquida (CL ou LC) ou gasosa (CG ou GC). É possível, através da sensibilidade da EM, detectar diferenças entre espécies, e também entre cepas de microalgas (DJUKOVIC et al., 2019). Análises comparativas do perfil metabolômico do cultivo de cianobactérias em diferentes meios, com concentrações diferentes de nitrato e fosfato, indicaram as melhores condições para se prospectar metabólitos secundários, assim como relataram um potencial novo metabólito em uma das condições testadas (CRNKOVIC; MAY; ORJALA, 2018).

A abordagem metabolômica baseada em EM é versátil e encontra aplicação também no processo de desreplcação de metabólitos. A desreplcação consiste na diferenciação de produtos naturais que são inéditos e de interesse, daqueles que não são de interesse e/ou que já são conhecidos. Os métodos de desreplcação baseados em CL-EM e CL-EM/EM geram informações estruturais que podem ser comparadas a informações de banco de dados (LANG et al., 2008; NOTHIAS et al., 2020). Com isso, evita-se a redescoberta de compostos e a identificação mais rápida de compostos de interesse. Identificando-se a estrutura química de um composto também é possível inferir sobre as possíveis ações biológicas que determinada molécula possa ter e, com isso, realizar experimentos direcionados para essa ação específica, poupando tempo de pesquisa (COVINGTON; MCLEAN; BACHMANN, 2017; CRNKOVIC; DÖRR, 2020; DJUKOVIC; RAFTERY; GOWDA, 2019; KRUG; MÜLLER, 2014).

Por ser uma técnica de alto rendimento, a CL-EM permite que milhares de compostos sejam analisados com alta precisão em curto período. Essa busca aprofundada da diversidade biológica e química é muito produtiva quando as fontes de metabólitos secundários são organismos de taxa menos estudados (KRUG; MÜLLER, 2014; SALEM et al., 2020). E como microalgas são pouco estudadas, são consideradas uma boa fonte para estudos de metabolômica baseada em espectrometria de massas.

Dentre os estudos que já foram realizados para esses microrganismos e visando aprofundar o entendimento sobre esse campo de pesquisa, foi realizada uma análise bibliométrica que buscou pelo termo “*microalgae*” na plataforma *Web of Science Core Collection*, em 14 de setembro de 2024, e resultou em 44.771 artigos indexados que citam microalgas, seja no título, resumo, ou nas palavras-chave. Analisando o número de artigos por ano, podemos notar um aumento significativo na quantidade de artigos publicados nos últimos cinco anos, conforme mostrado no Gráfico 2. Sendo o máximo de artigos publicados em 2022, num total de 4.374 naquele ano.

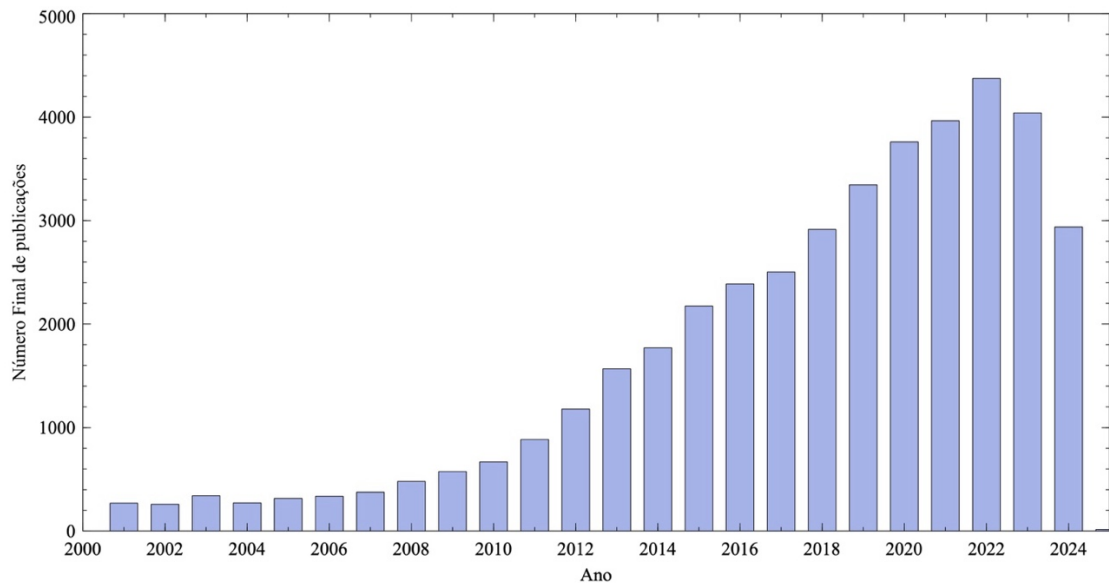


Gráfico 2 – Número de publicações por ano na plataforma do Web Of Science com o termo “*Microalgae*”.

Em relação as categorias desses artigos, a maior parte deles está dentro da categoria ‘*Biotecnologia e Microbiologia aplicada*’, seguida das áreas de ‘*Combustíveis para energia*’ e ‘*Ciências ambientais*’, como podemos observar no Gráfico 3.

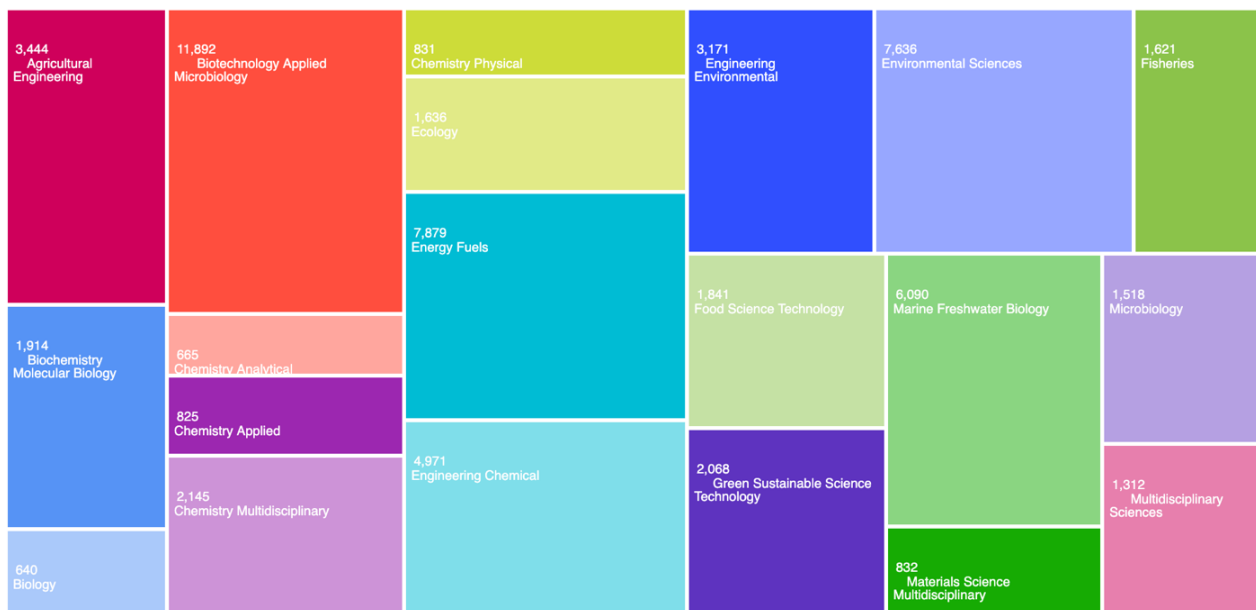


Gráfico 3 – Gráfico *TreeMap* das categorias nos quais os artigos sobre microalgas estão distribuídos.

Para melhor entender o progresso das investigações sobre microalgas, foi construída uma rede bibliométrica realizando um mapeamento da ciência relacionada a microalgas. Extraindo os dados dos 44.771 artigos publicados no *Web Of Science* até o presente momento, selecionamos as palavras chaves que tiveram pelo menos 50 ocorrências. Nessas condições, das 82.647 palavras chave, 1.070 atingiram 50 ocorrências e aparecem na rede, gerando as redes das Figura A. 1 e Figura A. 2, no Anexo I, através do software VozViewer (VAN ECK; WALTMAN, 2010).

Para facilitar a visualização, também foram criadas as redes das Figura 1 e Figura 2, selecionando as palavras-chave com mais de 100 ocorrências, reduzindo a rede para 570 palavras, o que nos permite observar com mais facilidade os termos que aparecerem com mais frequência a partir de 2020, e que incluem os termos ‘bioatividade’ e ‘antibióticos’, por exemplo.

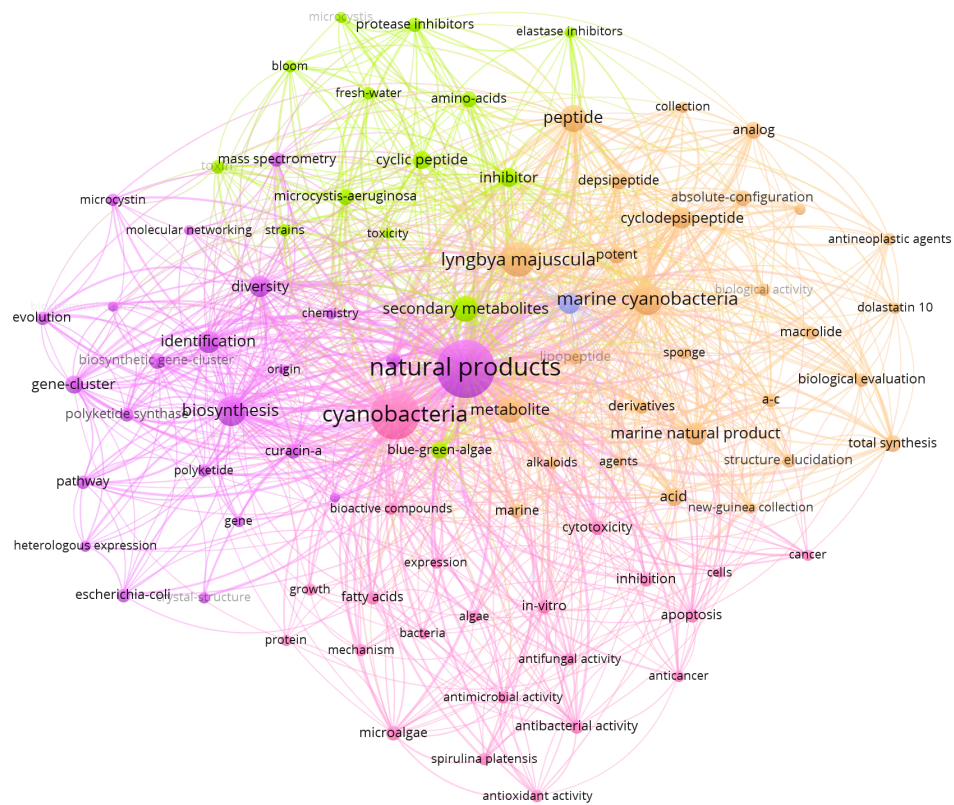


Figura 3 - Rede bibliométrica com as palavras chaves obtidas com a combinação dos termos “cyanobacteria” e “natural products”, e termos correlatos.



Figura 4 - Rede bibliométrica com as palavras chaves obtidas com a combinação dos termos “microalgae” e “natural products”, e termos correlatos.

Buscando aprofundar o conhecimento referente aos metabólitos de espécies de microalgas brasileiras, esse projeto foi supervisionado pelo professor Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza. Parte do desenvolvimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Algas, de supervisão da Prof.^a Dr. Ana Teresa Lombardi, onde foram realizados os cultivos das cepas, e estudada a produção dos metabólitos primários de quatro dessas cepas. Cultivos adicionais e bioensaios foram realizados sob supervisão do professor Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia. A análise metabolômica dos extratos foi realizada no Laboratório coordenado pela Prof.^a Dra. Camila Manoel Crnkovic do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da FCF-USP (São Paulo).

JUSTIFICATIVA

As microalgas representam um recurso pouco explorado e sua diversidade pode ser fonte de uma rica e vasta gama de biomoléculas a serem descobertas. Tanto os metabólitos primários (como lipídios, proteínas e carboidratos) como os secundários, ou especializados, provindos das microalgas vêm sendo utilizados em prol da qualidade de vida humana, com destaque para indústrias farmacêutica (LUESCH et al., 2001; SENTER; SIEVERS, 2012), alimentícia, (ex.: *Arthrospira* (BARKIA; SAARI; MANNING, 2019)), nutracêutica (YANG et al., 2020) e cosmecêutica (SPECIALCHEM, 2020; STOLZ; OBERMAYER, 2005). Na busca por compostos bioativos inéditos, os metabólitos especializados representam moléculas promissoras, pois nas microalgas possuem funções de defesa, sobrevivência, competição e proteção e/ou comunicação química (BILAL et al., 2017; MAGHEMBE et al., 2020), e que podem ter funções biológicas de interesse para uso humano.

O estudo da fisiologia de microalgas brasileiras, voltado à busca por produtos naturais distinguindo os potenciais usos da biomassa algal traz uma grande contribuição ao conhecimento de nossa biodiversidade e amplia o leque de conhecimento para novas propostas de aplicações dessa biomassa. A abordagem metabolômica baseada em espectrometria de massas para a busca por novos produtos naturais tem sido cada vez mais utilizada, tanto pela capacidade de analisar compostos, como por ser capaz de diferenciá-los. Além disso, conhecendo-se a estrutura química de determinado composto é possível inferir sobre possíveis ações biológicas, como antibacteriana ou anticancerígena (COVINGTON; MCLEAN; BACHMANN, 2017; CRNKOVIC; DÖRR, 2020; DJUKOVIC; RAFTERY; GOWDA, 2019; KRUG; MÜLLER, 2014; LANG et al., 2008).

Até o nosso presente conhecimento, as microalgas desse trabalho ainda não tiveram seus metabólitos secundários investigados, o que representa uma vantagem significativa. Essas cepas inexploradas podem conter metabólitos bioativos únicos e potencialmente valiosos, ampliando as possibilidades de descobertas inovadoras e aplicações biotecnológicas. O estudo de microalgas ainda não abordadas na literatura poderá revelar novas oportunidades e contribuir para a diversificação dos produtos derivados desses organismos. Este projeto representa um nicho de oportunidades de identificação de cepas de microalgas promissoras na produção de metabólitos bioativos novos e inexplorados, sejam eles primários ou secundários, com importantes aplicações no campo da biotecnologia.

OBJETIVOS

Este projeto de pesquisa tem como objetivo geral prospectar microalgas brasileiras em relação à composição bioquímica dos metabólitos primários e metabólitos secundários, e avaliar possíveis atividades antimicrobianas dos extratos dessas microalgas.

Para atingirmos o objetivo geral, dividimos a pesquisa em 2 partes, cada uma constituindo um capítulo da tese de doutorado:

Capítulo 1: Estudo da cinética de crescimento e composição bioquímica em quatro cepas de microalgas em fase exponencial de crescimento.

Culturas

Composição bioquímica

Biomassa seca

Proteínas totais

Lipídios totais

Carboidratos totais

Clorofila *a* e *b* carotenoides

Capítulo 2: Investigação dos metabólitos secundários das microalgas através de:

- (1) metabolômica comparativa entre diferentes fases de crescimento e entre microalgas,
- (2) desreplicação guiada por bioatividade e,
- (3) desreplicação guiada por exclusividade química.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Microalgas são responsáveis por quase metade do carbono fixado através da fotossíntese e são a base da maioria das cadeias alimentares marinhas e de outros ambientes aquáticos. O aquecimento global e ações antropológicas podem afetar comunidades do fitoplâncton e entender esses efeitos é parte crucial para a preservação dos mesmos. As Chlorophytas são o grupo mais comum e diverso de microalgas, e podem ser um recurso precioso para estudar corpos d'água e ecossistemas. Além desse papel ecológico importante, as microalgas vêm aumentando sua importância na biotecnologia (CELEWICZ; KOZAK; KUCZYŃSKA-KIPPEN, 2022; MICHAEL A. BOROWITZKA; BEARDALL; RAVEN, 2016).

Microalgas também tem aplicações comerciais variadas como já foi discutido anteriormente, podendo ser utilizadas como alimento, humano e animal e de psicultura, como produtoras de pigmentos, e até mesmo para produção de biocombustíveis, além de produtos de alto valor agregado como fármacos (BARKIA; SAARI; MANNING, 2019; MICHAEL A. BOROWITZKA; BEARDALL; RAVEN, 2016).

Para podermos empregar essas qualidades das microalgas é importante aumentar a compreensão da fisiologia das mesmas. Nesse trabalho aprofundamos os conhecimentos em relação as quatro espécies de microalgas, discutidas a seguir.

A espécie *Ankistrodesmus arcuatus* foi descrita em 1940 por Korshikov e pertence ao filo Chlorophyta, da classe Chlorophyceae e família Selenastraceae. É uma microalga comumente encontrada em água doce, é um táxon provavelmente cosmopolita que pode ser encontrado em diversos estados do Brasil (Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, São Paulo, Tocantins e Paraná) e países (Índia, Vietnã, Polônia) e também em corpos d'água eutrofizados (DELAZARI-BARROSO; SANT'ANNA; SENNA, 2007; DUNG et al., 2016; GUIRY; GUIRY, 2023; HÄLLFORS, 2004; RAMOS et al., 2012; REDDY, 2021). As células são solitárias, de forma arcuada ou semi-circular, com extremidades pontiagudas. Possuem um único cloroplasto parietal, sem pirenídes. As dimensões celulares variam de 30 a 45 (até 56) µm de comprimento e 1,5 a 3,7 µm de diâmetro, com distância entre as extremidades de 23,9 a 27,9 µm. (DELAZARI-BARROSO; SANT'ANNA; SENNA, 2007; RAMOS et al., 2012).

Radiococcus sp. é um gênero de microalgas do filo Chlorophyta, da classe Chlorophyceae e da família Radiococcaceae, que inclui diversas espécies encontradas em água doce e ambientes terrestres distribuídas por todo o globo. Essa família compreende microalgas coloniais mucilaginosas da ordem Chlorococcales. Possuem uma morfologia distintiva, com células geralmente esféricas ou elipsoides (regular ou irregular), de parede lisa, sem divisão celular vegetativa, e dispostas em uma mucilagem de espessura e consistência variável (ALVES; GAMA; DE NOGUEIRA, 2014; GUIRY; GUIRY, 2023; ZHANG et al., 2018).

Descrita por Philipose em 1952, *Sorastrum bengalicum*, é uma microalga do filo Chlorophyta, da classe Chlorophyceae e da família Hydrodictyaceae. É uma espécie de água doce, que já foi encontrada na Amazônia colombiana. É uma espécie cuja morfologia muda ao longo das fases da vida e que apresenta a formação de cenóbios. Os cenóbios observados por ECHENIQUE, NÚÑEZ-AVELLANEDA e DUQUE na Amazonia Colombiana eram pequenos, com aproximadamente 8 células globosas, que apresentavam duas pequenas projeções subcilíndricas na parte externa da parede celular; possuíam cloroplasto parietal e as dimensões celulares variam de 6,5 a 12 µm de comprimento e 8,5 a 13 µm de diâmetro (ECHENIQUE; NÚÑEZ-AVELLANEDA; DUQUE, 2013; GUIRY; GUIRY, 2023; KOMÁREK; FOTT, 1985). É uma espécie com poucos artigos publicados, até o presente momento, não há nenhum artigo indexado no *Web of Science* que cite essa espécie.

Outra Chlorophyta, estudada nesse trabalho, foi a espécie *Chlorolobion braunii*, da ordem Sphaeropleales e família Selenastraceae. É uma espécie de água doce, que também pode ser encontrada em reservatórios eutróficos, descrita inicialmente por Kützing. Pode ser encontrada em diversos países como Brasil, Grã-Bretanha, Taiwan e Coreia. São células com formato de fuso, ligeiramente assimétricas. Quando jovens são células mais curtas e pontiagudas, e na fase adulta, são mais arredondadas e com a extremidade truncada. O cloroplasto possui um pirenoide e o comprimento varia de 7 a 12 µm, e a largura de 3,2 a 4 µm (GARCIA et al., 2022; GUIRY; GUIRY, 2023; SHIN et al., 2018).

ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE QUATRO CEPAS DE MICROALGAS

O principal objetivo desse capítulo foi analisar a cinética de crescimento de quatro microalgas eucarióticas e analisar os metabólitos primários (proteínas, carboidratos, lipídios, clorofila e carotenoides). Esses cultivos também forneceram biomassa das microalgas em duas fases de crescimento, exponencial e estacionária, para produção dos extratos utilizados no capítulo subsequente.

As quatro microalgas selecionadas: *Ankistrodesmus arcuatus* Korshikov (CCMA-UFSCar 24), *Radiococcus* sp. Schmidle (CCMA-UFSCar 283), *Sorastrum bengalicum* Philipose (CCMA-UFSCar 556) e *Chlorolobion braunii* (Nägeli) Komárek (CCMA-UFSCar 702) foram selecionadas da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos, CCMA-UFSCar, (Departamento de Botânica), que agrega cerca de 555 cepas. As microalgas estudadas nesse capítulo podem ser observadas na Figura 1.1.

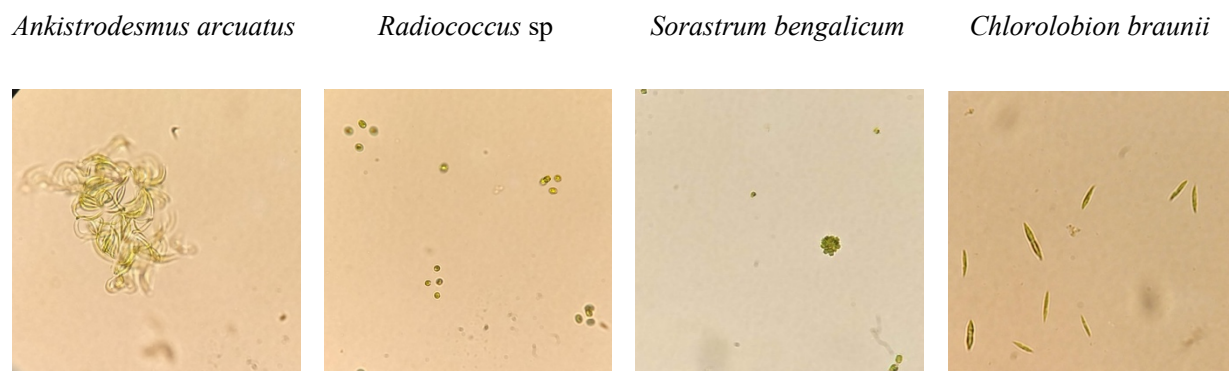


Figura 1.1 – Microalgas utilizadas nesse capítulo da pesquisa. Da esquerda para a direita *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp., *Sorastrum bengalicum* e *Chlorolobion braunii*. Fonte: A autora, aumento entre 100 e 400.

Essas quatro cepas são da classe Chlorophyceae e ordem Sphaeropleales. *A. arcuatus* e *C. braunii* são da família Selenastraceae, enquanto a espécie de *Radiococcus* sp. da família Radiococcaceae, e, a *S. bengalicum* é da família Hydrodictyceae.

Ankistrodesmus arcuatus (CCMA-UFSCar 24), foi isolada do reservatório do Broa, na cidade de Itirapina, no estado de São Paulo (Brasil - 22°12'20.6"S 47°52'37.6"W) em 1979. Essa microalga pode ser colonial ou livre, e apresenta células fusiformes e isopolares (DA SILVA et al., 2017).

Radiococcus sp. (CCMA-UFSCar 283) foi coletada em abril de 2011, na Lagoa Mata do Engenho, em São João Batista do Glória, Minas Gerais (Brasil - 20°31,345'S 46°30,972'W).

Sorastrum bengalicum (CCMA-UFSCar 556) foi obtida no Parque Ecológico, em Cravinhos, São Paulo (Brasil - 21°20,18'S 47°44,273'W). É uma espécie descrita anteriormente - *Sorastrum bengalicum* Philipose, apresenta cenóbios.

Chlorolobion braunii (CCMA-UFSCar 702), é uma microalga de água doce também, e foi isolada em Cubatão (Brasil - 23°53'55.7" S 46°27'52.9" W).

O estudo da fisiologia, a composição de biomoléculas primárias e produção dos extratos orgânicos foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Algas (UFSCar), de responsabilidade da Prof.^a Dr. Ana Teresa Lombardi, e amparado pelo projeto temático “Bioprospecção, caracterização e otimização de microalgas brasileiras para a biofixação de CO₂ e produção de biomoléculas de importância comercial” (Processo FAPESP 2018/07988-5). Esses extratos orgânicos foram preservados (-80 °C) no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia até o momento da realização da análise de bioatividade.

MATERIAL E MÉTODOS

CULTURAS

As cepas *Ankistrodesmus arcuatus* (CCMA-UFSCar 24), *Radiococcus* sp. (CCMA-UFSCar 283), *Sorastrum bengalicum* (CCMA-UFSCar 556) e *Chlorobion braunii* (CCMA-UFSCar 702) foram cultivadas no mesmo meio de cultura no qual são mantidas na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da UFSCar. Os cultivos foram realizados no meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972), composto por: 85,01 g/L NaNO₃; 36,76 g/L CaCl₂·2H₂O; 36,97 g/L MgSO₄·7H₂O; 12,60 g/L NaHCO₃; 28,42 g/L Na₂SiO₃·9H₂O; 8,71 g/L K₂HPO₄; solução de metais traço (1,70·10⁻⁵ M Na₂EDTA·2H₂O; 1,70·10⁻⁵ M FeCl₃·6H₂O; 4,01·10⁻⁸ M CuSO₄·5H₂O; 7,65·10⁻⁸ M ZnSO₄·7H₂O; 4,20·10⁻⁸ M CoCl₂·6H₂O; 9,10·10⁻⁷ M MnCl₂·4H₂O, 2,48·10⁻⁸ M Na₂MoO₄·2H₂O e 1,62·10⁻⁵ M H₃BO₃) e solução de vitaminas (2,96·10⁻⁷ M tiamina - vitamina B1, 2,05·10⁻⁹ M biotina – vitamina H, e 3,69·10⁻¹⁰ M cianocobalamina - vitamina B12), com opção de solução tampão (ANDERSEN, 2005).

Os cultivos foram realizados em escala laboratorial com ciclo claro-escuro de 12:12 horas e temperatura de 25 ± 1 °C (Figura 1.2) A intensidade de luz dos cultivos foi determinada através de curvas rápidas de luz (RLC) realizadas no equipamento Phyto-PAM (Heinz-Walz, Alemanha). Esse valor é obtido através de um experimento no qual é emitida radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em pulsos a cada 20 segundos, de intensidades crescentes, iniciando no 0 e atingindo 1728 μmol de fótons·m⁻²·s⁻¹ sobre a alíquota do cultivo das microalgas. As RLC foram ajustadas matematicamente de acordo com Platt; Gallegos; Harrison (1980), gerando dois valores importantes: o valor da inclinação inicial das curvas (α), no qual a luz é o fator limitante da fotossíntese e, a taxa máxima (relativa) de transporte de elétrons (ETR_{máx}). A divisão de ETR_{máx} por α fornece o valor da irradiância saturante (E_k). Essas curvas fornecem, portanto, o valor de intensidade luminosa no qual há saturação da fotossíntese, ou seja, o valor máximo de intensidade luminosa que a microalga consegue absorver. A intensidade luminosa saturante (E_k) determinada para cada espécie foi utilizada para os cultivos subsequentes.



Figura 1.2 - Manutenção das culturas em meio WC com ciclo de claro escuro de 12:12 horas, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Fonte: A autora.

Todo manuseio das culturas foi realizado em condições estéreis, preservando assim os cultivos unialgais e axênicos. Os cultivos foram realizados em triplicada em frascos Erlenmeyer de 3 ou 5 L, sem aeração.

As células foram inoculadas para uma concentração de aproximadamente 10^5 células/ mL na fase exponencial de crescimento, previamente estabelecida, e verificando indiretamente o estado fisiológico delas por meio da capacidade de realizar fotossíntese medindo a fluorescência com Phyto-PAM (Walz, Alemanha). O volume do cultivo foi de 1200 mL, sendo esse volume particionado em: 10 mL para analisar carotenoides, 20 mL proteínas totais, 30 mL carboidratos totais, 100 mL lipídios totais, 250 mL para extrato da fase exponencial e 250 mL para extrato da fase estacionária. O restante do volume foi utilizado para as amostragens diárias que foram realizadas para acompanhar as fases de crescimento dessas microalgas.

Os cultivos foram monitorados diariamente através do rendimento quântico máximo (E_k) aferido pelo PhytoPAM, após as amostras ficarem no escuro por 15 minutos. Essa medida permite verificar a capacidade de realizar fotossíntese e realizar comparações sobre o estado fisiológico das microalgas.

Para verificar o crescimento desses mesmos cultivos, foram utilizadas técnicas de quantificação que incluíram medidas da densidade ótica, fluorescência (clorofila *a in vivo*) e contagem no microscópio. Os valores da densidade ótica foram mensurados em espectrofotômetro no comprimento de 684 nm e 570 nm, o primeiro é o comprimento de onda de absorção da clorofila *a*, e o segundo de absorção de possíveis contaminantes microbianos ou outros materiais particulados. A fluorescência *in vivo* da clorofila *a* foi quantificada utilizando um fluorímetro (Turner Designs Trilogy, EUA). As microalgas verdes que eram possíveis de serem

contadas microscopicamente, foram colocadas em uma câmara de contagem Fuchs-Rosenthal espelhada e contadas sob microscópio óptico.

A taxa específica de crescimento (μ) foi calculada a partir da curva de crescimento, plotada a partir do logaritmo natural da densidade celular (fluorescência *in vivo* da clorofila *a*) em função do tempo (dias). A taxa é obtida através regressão linear da fase exponencial do crescimento e corresponde ao coeficiente angular da equação da reta obtida. As curvas rápidas de luz foram realizadas utilizando-se o software *IgorPro* 6.0.5 (*WaveMetrics*, EUA) e o tratamento estatístico foi realizado no programa *OriginPro* (*OriginLab*, EUA).

COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA

A determinação da composição bioquímica dos metabólitos primários, aqui definidos como proteínas, carboidratos, lipídios e pigmentos – incluindo clorofila *a*, clorofila *b*, e carotenoides - foi realizada durante a fase exponencial de crescimento das culturas.

Para essas determinações a biomassa algal foi separada do meio líquido por meio de centrifugação, 4 °C, (*Thermo Scientific*, EUA) em 4400 rpm durante 10 minutos. Para carboidratos, lipídios e proteínas, as células foram mantidas em freezer -20 °C até as análises por no máximo 60 dias. E a amostra para determinação da biomassa seca foi utilizada no mesmo dia.

BIOMASSA SECA

Biomassa seca foi determinada na metade da fase exponencial de crescimento com a finalidade de obter uma relação entre a quantificação das biomoléculas primárias e a massa das microalgas cultivadas. Para tanto, 10 mL do cultivo foram filtrados em um filtro de acetato de celulose (0,22 μ m) previamente seco à 100 °C durante 1 h e pesado. Os filtros contendo as biomassas, foram então mantidos a 40 °C por 48 horas até a massa estabilizar e ser mensurada. As biomassas foram deixadas 10 minutos em um dessecador, antes de serem pesados. Em ambas as medidas, foi utilizada uma balança analítica com precisão 0,1 μ g (*Mettler Toledo*, Suíça). A biomassa seca foi calculada através da diferença do filtro com e sem o filtrado do cultivo. A

temperatura de 40 °C foi definida com base em informação da literatura de que lipídios voláteis são perdidos acima deste valor (Lombardi e Wangersky 1992).

PROTEÍNAS TOTAIS

Proteínas totais foram determinadas pelo protocolo espectrofotométrico descrito em Slocombe *et al.* (2013) modificado. A biomassa coleta a partir de 20 mL de cultivo foi descongelada e ao *pellet* foi adicionado de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) e o mesmo foi incubado por 15 minutos a 90 °C. Depois da incubação, quando a amostra atingiu a temperatura ambiente foi adicionada 250 µL de água destilada, e após homogeneização, a solução foi centrifugada e o sobrenadante descartado. Ao *pellet* foi acrescido de 500 µL da solução Lowry D e incubado por 60 minutos a 80 °C. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação e 50 µL do sobrenadante foi coletado para a quantificação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (EPOCH, EUA) a 600 nm de comprimento de onda. Os dados adquiridos foram comparados a uma curva padrão da albumina sérica bovina, realizada no mesmo, para obter a concentração proteica em mg/mL

LIPÍDIOS TOTAIS

Lipídios totais foram quantificados a partir de 100 mL do cultivo e segundo a metodologia descrita por Parrish (1999) e republicada em 2021. A partir do descongelamento todos os materiais que entraram em contato com a amostra foram previamente calcinados em mufla a 400 °C durante 8 horas, e antes do uso foram lavados 3 vezes com metanol e 3 vezes com clorofórmio. O volume analisado foi filtrado em filtro de fibra de vidro de poros de 0,7 µm. Em seguida o filtro foi colocado em um frasco de Teflon[®] contendo 4 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol e macerado utilizando bastão de vidro. Em seguida a amostra foi colocado no sonicador durante 5 minutos, sob resfriamento, e posteriormente centrifugada a 3000 rpm, 0 °C por 5 minutos. Utilizando uma pipeta Pasteur o sobrenadante foi reservado, e a biomassa precipitada submetida ao processo de extração mais 2 vezes, adicionando 4 mL de clorofórmio. Os extratos finais foram reunidos e posteriormente concentrados até 1 mL utilizando um evaporador rotativo (IKA, China). Uma

alíquota de 400 µL do extrato foi então seca em um cadinho de alumínio de peso conhecido, e o cálculo percentual de lipídios foi obtido através da equação 1.1 e 1.2 (PARRISH; WELLS, 2021).

$$\text{Peso do extrato de lípideos} = \frac{(\text{volume extrato concentrado}) \cdot (\text{peso do cadinho})}{\text{Volume adicionado no cadinho}} \quad (1.1)$$

$$\% \text{ lípideos} = \frac{(\text{Peso do extrato de lípideos}) \cdot 100}{\text{Biomassa seca do volume filtrado}} \quad (1.2)$$

CARBOIDRATOS TOTAIS

Carboidratos foram determinados pelo método colorimétrico descrito por Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (2013), que tem como fundamento a reação da amostra com ácido sulfúrico. Aos 30 mL do cultivo centrifugados e reservados para essa análise, foi adicionado 1 mL do sobrenadante. Em temperatura ambiente, essa biomassa foi transferida para tubos de ensaio de vidro. Foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico concentrado e misturados no vórtex por 30 segundos. Os tubos de ensaio foram então colocados no gelo protegidos da luz até atingirem temperatura ambiente e a medida ser realizada no espectrofotômetro Nanocolor UV/VIS (Macherey-Nagel, EUA). Foi utilizado o comprimento de onda de 315 nm e quantidade de carboidratos foi determinada a partir curva padrão da glicose produzida no mesmo dia, em triplicata.

CLOROFILA *a*, CLOROFILA *b* E CAROTENOIDES

A concentração dos pigmentos clorofila *a* (C_a), clorofila *b* (C_b) e carotenoides totais (CT) foram determinados de acordo com Wellburn (1994). Para tanto, amostras de 10 mL obtidas na metade da fase exponencial de crescimento foram filtradas em filtros de acetato de celulose (0,22 µm diâmetro de poro). Aos filtros foram adicionados 3 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). Após 10 minutos de extração protegida da luz as amostras foram medidas em espectrofotômetro Nanocolor UV/VIS (Macherey-Nagel, EUA) em comprimentos de onda pré-determinados. As concentrações foram calculadas seguindo as equações descritas por Jeffrey e Humphrey (1975).

$$C_a = 12,47 \cdot A_{665} - 3,62 \cdot A_{649} \quad (2.1)$$

$$C_b = 25,06 \cdot A_{649} - 6,50A_{665} \quad (2.2)$$

$$CT = \frac{(1000 \cdot A_{480} - 1,29C_a - 53,78 \cdot C_b)}{220} \quad (2.3)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CULTURAS

Utilizando amostras de cultivos na fase exponencial de crescimento, previamente estabelecida, foram realizados os experimentos para verificar a quantidade de luz saturante para cada uma dessas cepas, a partir das curvas rápidas de luz. Cada espécie de microalga foi, a partir de então, cultivada na intensidade de luz na qual há saturação da fotossíntese. A intensidade luminosa saturante (E_k) calculada para cada uma pode ser observada na Tabela 1.1

Tabela 1.1 - Espécies de microalgas, valores de irradiância saturante (E_k) e respectiva taxa de crescimento

Espécie	Irradiância saturante ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Taxa de crescimento m\u00e1xima (μ) \pm desvio padr\u00e3o
<i>Ankistrodesmus arcuatus</i>	170	0,52 \pm 0,02
<i>Radiococcus</i> sp	240	0,92 \pm 0,18
<i>Sorastrum bengalicum</i>	230	0,65 \pm 0,03
<i>Chlorolobion braunii</i>	250	0,79 \pm 0,01

Os par\u00e2metros de crescimento foram obtidos a partir da fluoresc\u00eancia clorofila *a in vivo*, e plotados a partir do \ln desse valor e do tempo de cultivo em horas, como pode ser observado no **Error! Reference source not found.**

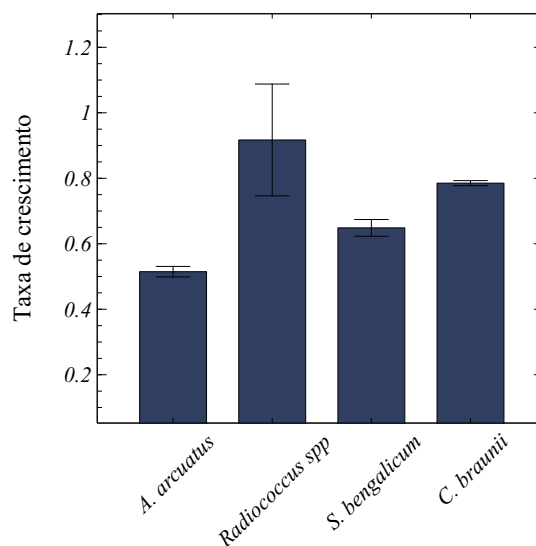
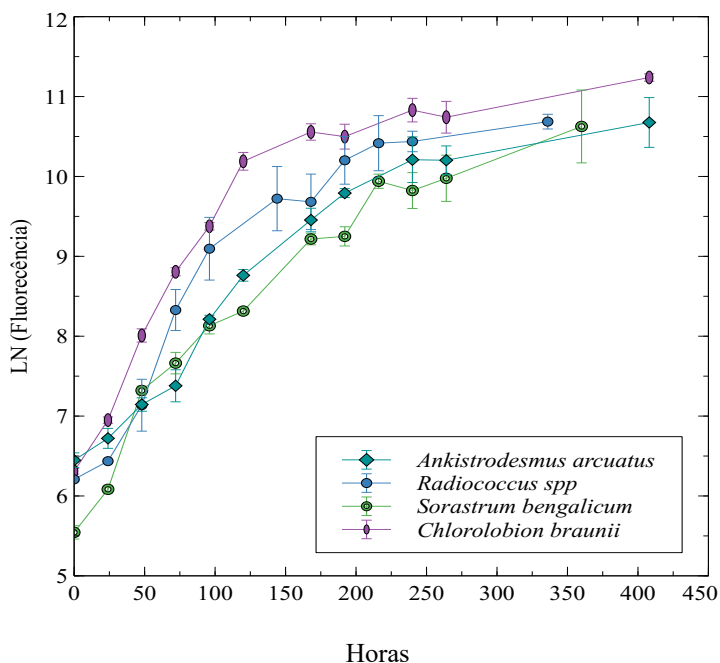


Gráfico 1.1 - Parâmetros de crescimento em função do \ln da fluorescência que representa a clorofila *a in vivo* ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Losango - *A. arcuatus*; círculo fechado - *Radiococcus* sp; círculo vazado - *S. bengalicum*; e, elipse - *C. braunii*. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 replicatas. O gráfico de barras representa as taxas de crescimento (d^{-1}) de cada espécie na fase exponencial de crescimento. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.

A curva de crescimento obtida a partir do número de células pode ser observada no Gráfico 1.2. A espécie *S. bengalicum* forma cenóbios durante suas fases de crescimento, conforme podemos observar nos recortes destacados na Figura 1. 3, por essa razão não foi possível realizar sua curva de crescimento através da contagem do número de células.

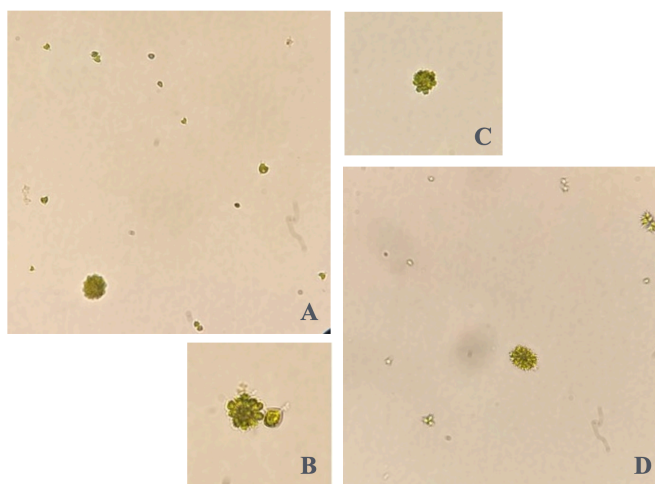


Figura 1. 3 – Destaque, microscopias do cultivo da espécie *S. bengalicum*, com ênfase para a formação de cenóbios. As imagens A, C e D mostram um aumento de 200x e a imagem B um aumento de 400x. Fonte: A autora.

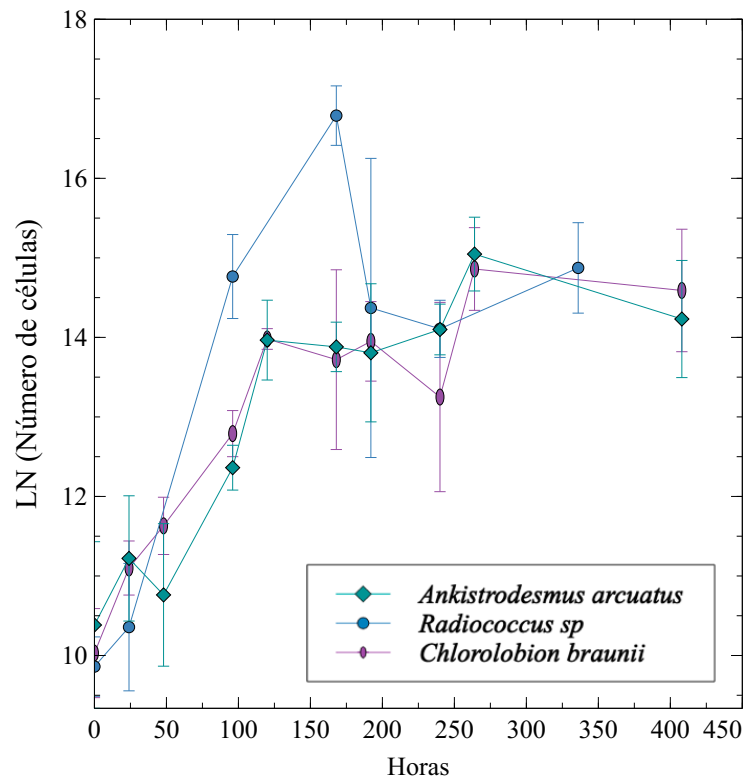


Gráfico 1.2 - Gráfico de linhas: Parâmetros de crescimento das microalgas em relação ao \ln do número de células: Losango - *A. arcuatus*; círculo fechado - *Radiococcus sp*; e, elipse - *C. braunii*. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.

Esses resultados mostram que essas espécies de microalgas chegam à densidade celulares relativamente próximas, porém suas taxas de crescimento são diferentes. A espécie *A. arcuatus* apresentou a menor taxa de crescimento, de $0,52 \pm 0,02$, seguida da espécie *S. bengalicum* com $0,65 \pm 0,03$, da espécie *C. braunii* com $0,79 \pm 0,01$ e a microalga *Radiococcus sp* com a maior taxa de crescimento de $0,92 \pm 0,18$. As taxas de crescimento obtidas podem ser comparadas as taxas obtidas para a espécie *Chlorella vulgaris*, um organismo modelo de estudo para microalgas, cujas taxas de crescimento chegam a $0,84 \text{ (d}^{-1}\text{)}$ (CHIA; LOMBARDI; MELAO, 2013) e $0,99 \text{ (d}^{-1}\text{)}$ em meio suplementado (HO et al., 2013).

COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA

A composição bioquímica foi estudada no meio da fase exponencial dos cultivos das microalgas. Quando são inoculadas 1×10^5 células, em fase exponencial, por mL de meio WC, a

metade da fase exponencial ocorre no terceiro dia para as espécies *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus sp.* e *Chlorolobion braunii*, e; no quarto dia para a espécie *Sorastrum bengalicum*.

BIOMASSA SECA

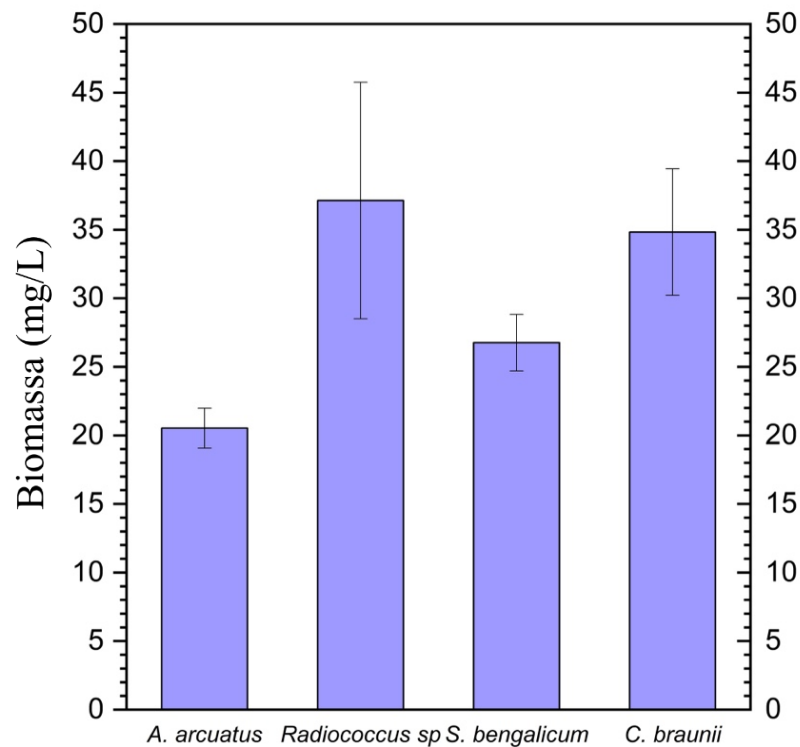


Gráfico 1.3 - Resultados obtidos da biomassa seca para as espécies estudadas. As barras representam a média da biomassa seca obtida entre as triplicatas. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.

A biomassa seca (Figura 1.4) foi aferida e os resultados podem ser observados no Gráfico 1.3, que já inclui os valores do desvio padrão encontrado entre as triplicatas de cada espécie. A espécie *Radiococcus sp* apresentou a maior média de biomassa seca por litro de cultivo, que foi de 37 mg por litro. Enquanto a espécie *A. arcuatus* apresentou a menor, 20 mg/L. *S. bengalicum* e *C. braunii*, apresentaram, respectivamente, 27 mg/L, e, 35 mg/L de biomassa seca.

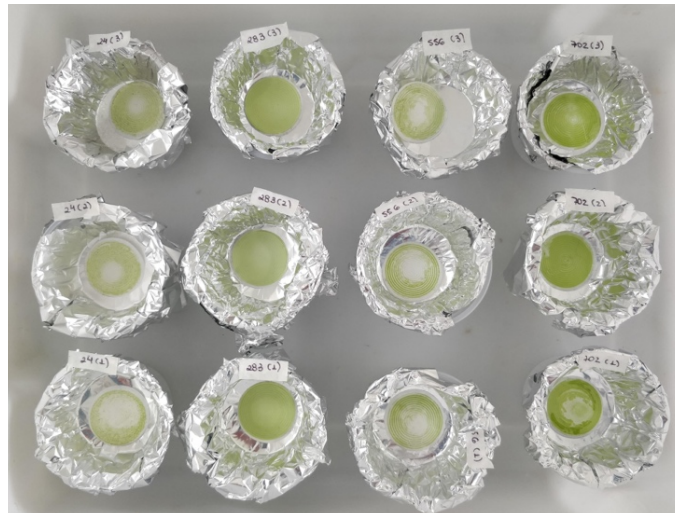


Figura 1.4 - Biomassa das espécies estudadas nesse capítulo, depois de serem mantidas a 40 °C por 48 horas. Fonte: A autora.

As análises subsequentes de porcentagem de proteínas, carboidratos, lipídios e pigmentos foi feita em relação a esses valores de biomassa.

PROTEÍNAS TOTAIS

A quantidade de proteínas totais obtidas para cada espécie foi plotada no Gráfico 1.4, que também apresenta, na barra preenchida com linhas diagonais, a quantidade de proteínas de cada espécie em relação a biomassa seca.

A espécie *C. braunii* apresentou a maior quantidade de proteínas por volume de cultivo, com 1,93 µg/mL, seguindo da espécie *Radiococcus* sp com 1,66 µg/mL. As microalgas *S. bengalicum* e *A. arcuatus* apresentaram 1,06 µg/mL e 1,23 µg/mL, respectivamente.

A porcentagem de proteínas em relação à biomassa seca foi próxima para todas as espécies desse estudo, variando de 3,9% a 6,0% da biomassa seca. *Radiococcus* sp apresentou $4,6 \pm 1,18$ % de proteínas, outras microalgas do mesmo gênero chegam a valores mais altos, como *Radiococcus nimbatus*, que apresentou $21,01 \pm 7$ % da biomassa seca composta por proteínas (SANTHAKUMARAN; KOOKAL; RAY, 2018), então existe a possibilidade de que em outras condições de cultivo, essa cepa possa aumentar sua porcentagem de proteínas.

A espécie *C. braunii* é composta por $5,5 \pm 0,6$ % de proteínas nas condições testadas. Matsudo descreveu que essa mesma cepa acumulou até $13,90 \pm 0,27$ % de proteína no seu peso

seco. Pequenas diferenças podem ocorrer também devido a amostragens em diferentes fases de crescimento (MATSUDO et al., 2021).

E as microalgas *S. bengalicum* e *A. arcuatus* apresentaram $3,9 \pm 1,2$ % e $6,0 \pm 0,9$ %, respectivamente, de proteínas em relação ao peso seco.

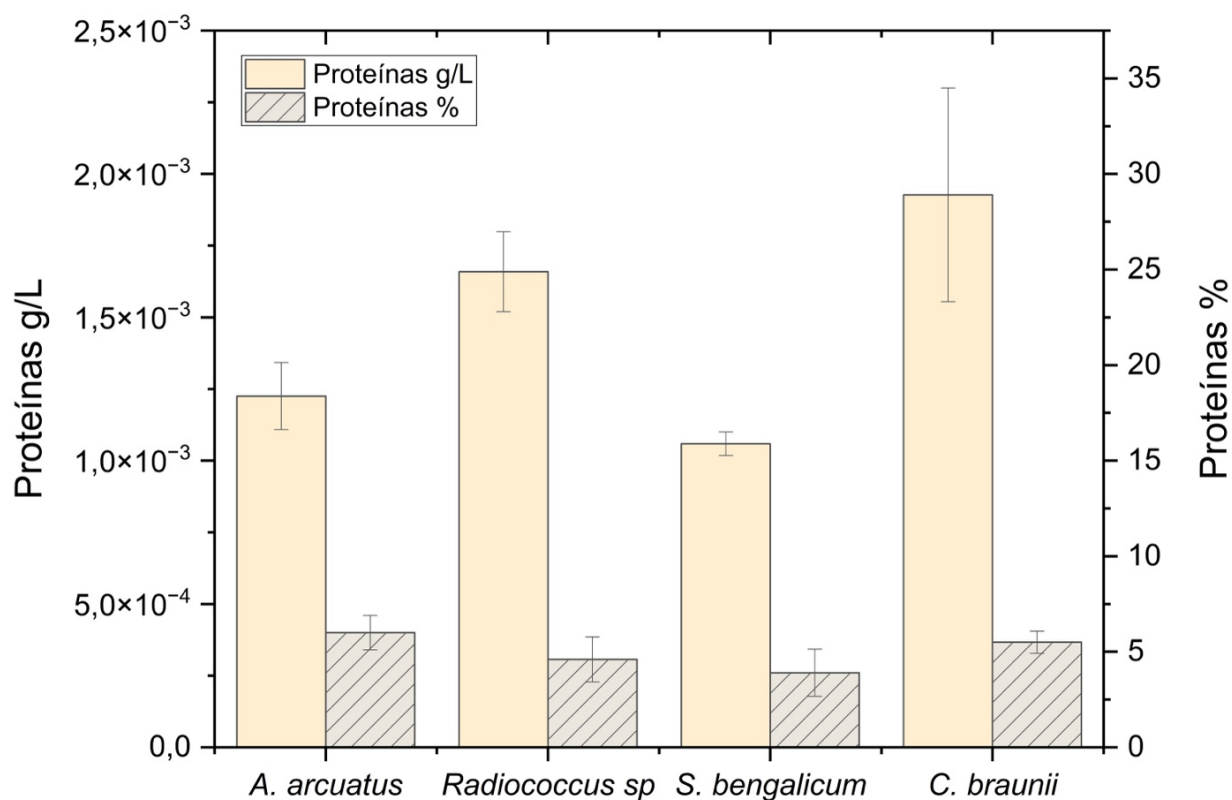


Gráfico 1.4 - Resultados obtidos para a quantidade de proteínas totais para cada espécie estudada nesse capítulo. As barras com preenchimento sólido representam a quantidade de proteínas totais em g/L, e as barras com preenchimento de linhas laterais representam a porcentagem de proteínas totais em relação a biomassa seca de cada espécie. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.

LIPÍDIOS TOTAIS

Microalgas podem conter de 1-70% de conteúdo lipídico em relação à sua biomassa seca. Mas é possível induzir algumas espécies a produzir até 90 % de lipídios por biomassa seca (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Mata e colaboradores, descreveram para *Ankistrodesmus sp* uma porcentagem de 24 – 31% em relação ao peso seco (MATA; MARTINS;

CAETANO, 2010). Nessa pesquisa, a espécie *Ankistrodesmus arcuatus* chegou a $39,59\% \pm 5,72\%$ de lipídios em relação ao peso seco, como podemos observar no Gráfico 1.5.

A espécie *A. arcuatus* se destacou também em relação a quantidade de lipídios produzidas por volume de cultivo, produzindo $8,1 \pm 0,1$ mg/L. As espécies *S. bengalicum* e *C. braunii* também apresentaram uma quantidade significativa de lipídios por volume, chegando a aproximadamente $\frac{3}{4}$ do produzido por *A. arcuatus*, com $6,0 \pm 0,1$ mg/L e $6,0 \pm 0,7$ mg/L, respectivamente. Valores que correspondem a $20,89\% \pm 0,51\%$ do peso seco da espécie *S. bengalicum*, e $16,16\% \pm 2,34\%$ da *C. braunii*.

Um estudo realizado por Matsudo, apresentou uma porcentagem para a espécie *C. braunii* de $30,10\% \pm 1,86\%$, sendo que pequenas diferenças podem ser devido ao meio de cultivo e diferentes intensidades de luz (esses outros autores utilizaram meio BOLD com borbulhamento de ar e \intensidade de luz de $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), que podem gerar essa adaptação diferencial das microalgas em relação ao meio, ou ao solvente de recuperação diferente; esta pesquisa utilizou clorofórmio:metanol (2:1, v/v), mas Matsudo utilizou éter de petróleo (MATSUDO et al., 2021).

A espécie *Radiococcus* sp que apresentou a menor porcentagem de lipídios por peso seco, e a menor quantidade de lipídios totais, apresentando $11,58\% \pm 5,66\%$ por peso seco e $0,004 \pm 0,002$ mg/L de lipídeos totais.

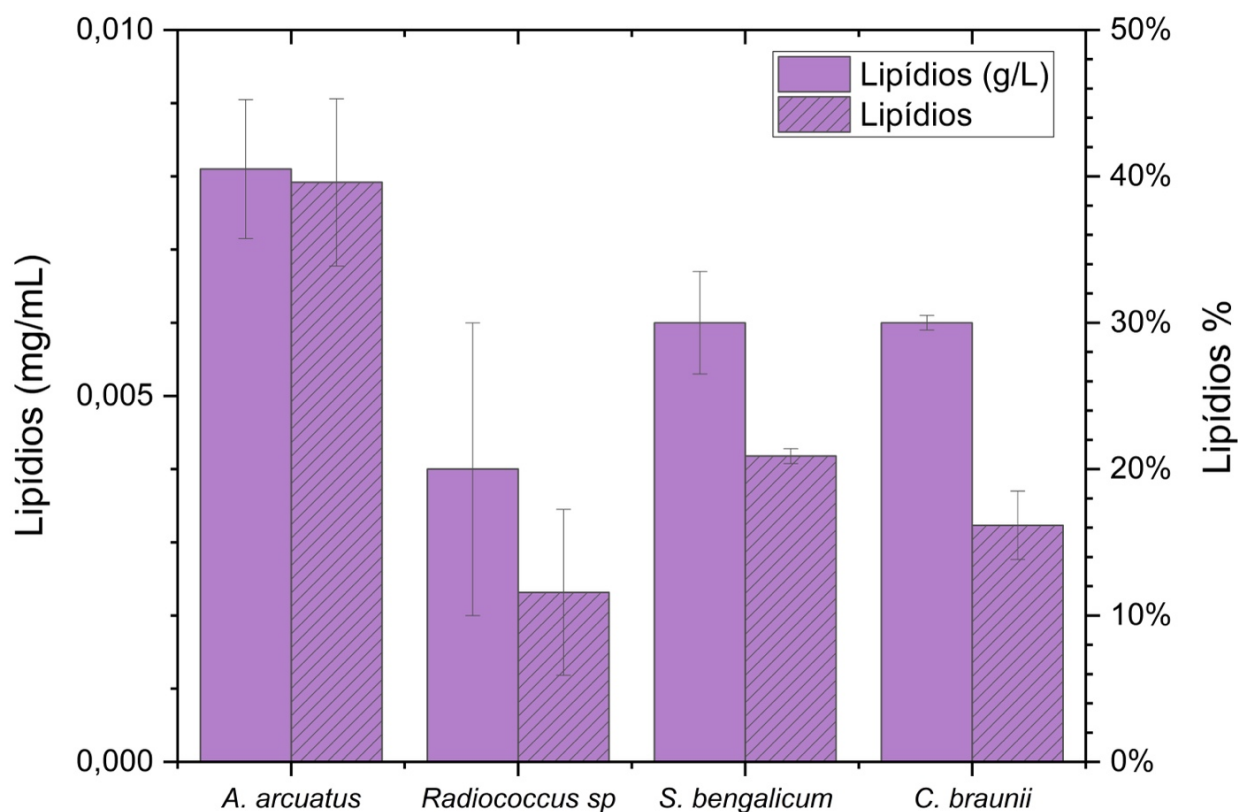


Gráfico 1.5 - Resultados obtidos para a quantidade de lipídios totais para cada espécie estudada nesse capítulo. As barras com preenchimento sólido representam a quantidade de lipídios totais em g/L, e as barras com preenchimento de linhas laterais representam a porcentagem de lipídios totais em relação a biomassa seca de cada espécie. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.

CARBOIDRATOS TOTAIS

Após determinar a quantidade de carboidratos, os resultados foram plotados no Gráfico 1.6. Em relação a quantidade por volume total, a espécie *S. bengalicum* que se destacou nas quantidades totais por volume de cultivo produzindo $0,0023 \pm 0,0005$ g/L, que representam $20,76\% \pm 11,67\%$ da biomassa seca dessa espécie.

Radiococcus sp foi a segunda maior produtora de carboidratos por volume, produzindo $2,0 \pm 1,0$ $\mu\text{g/mL}$, que correspondem a $5,18\% \pm 1,69\%$ do peso seco. As espécies *A. arcuatus* e *C. braunii* tiveram as menores quantidades de carboidratos, $1,5 \pm 0,1$ $\mu\text{g/mL}$ e $1,3 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, que equivalem a $7,17\% \pm 0,82\%$ e $8,16\% \pm 1,58\%$ da biomassa seca.

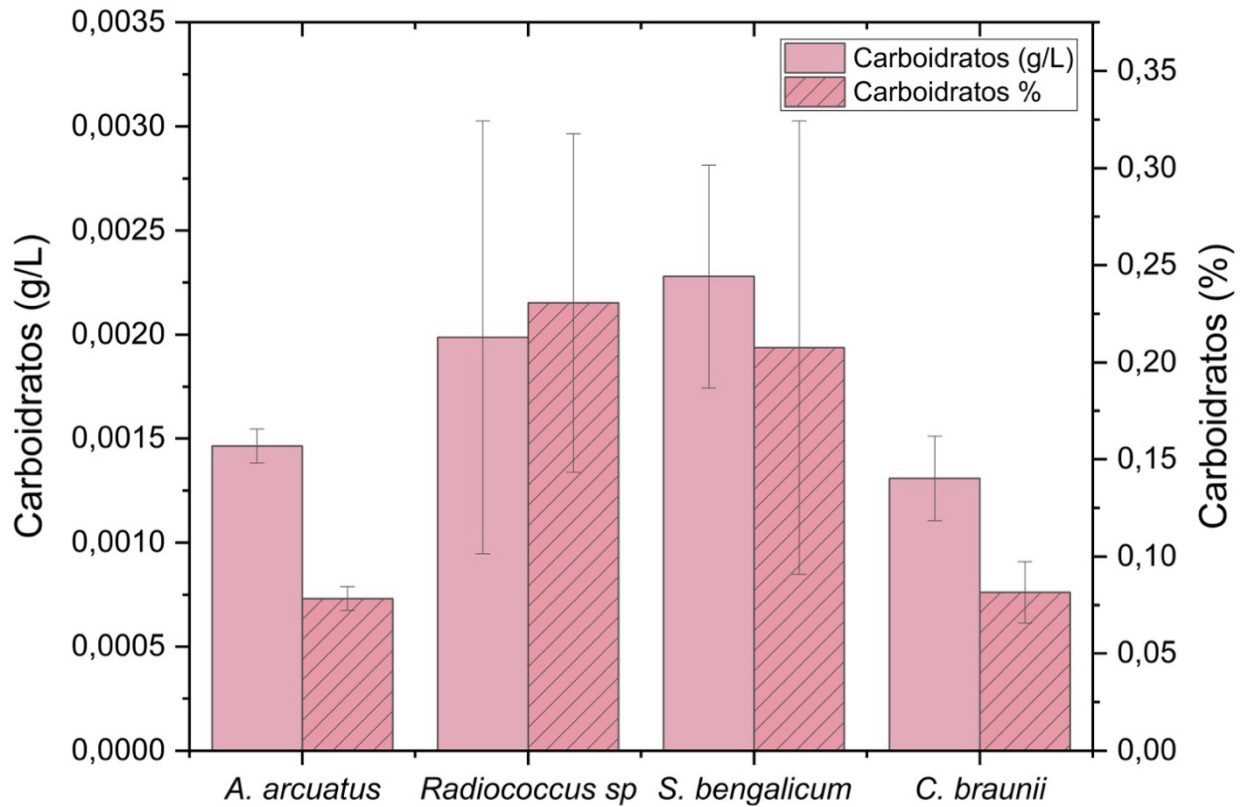


Gráfico 1.6 - Resultados obtidos para a quantidade de carboidratos totais para cada espécie estudada nesse capítulo. As barras com preenchimento sólido representam a quantidade de carboidratos totais em g/L, e as barras com preenchimento de linhas laterais representam a porcentagem de carboidratos totais em relação a biomassa seca de cada espécie. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.

Essas porcentagens de carboidratos estão próximas a variação de 12,16 % a 18,16 % obtida para duas cepas de *Chlorella vulgaris* estudadas por Ho e colaboradores, e cujos valores obtidos por litro de cultivo foram de 23,26 e 28,71mg por litro por dia. Essas mesmas cepas chegaram a 54,13 % e 48,59 % de carboidratos quando cultivados em meios escassos de nitrogênio, portanto, é possível que outros meios de cultivo, estimulem a produção de quantidades superiores de carboidratos pelas microalgas aqui estudadas (HO et al., 2013).

As quantidades de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais, foram calculadas baseadas nos valores obtidos no espectrofotômetro aplicados nas equações 2.1, 2.2 e 2.3. Esses resultados foram plotados em µg/L no Gráfico 1.7 e em porcentagem no Gráfico 1.8.

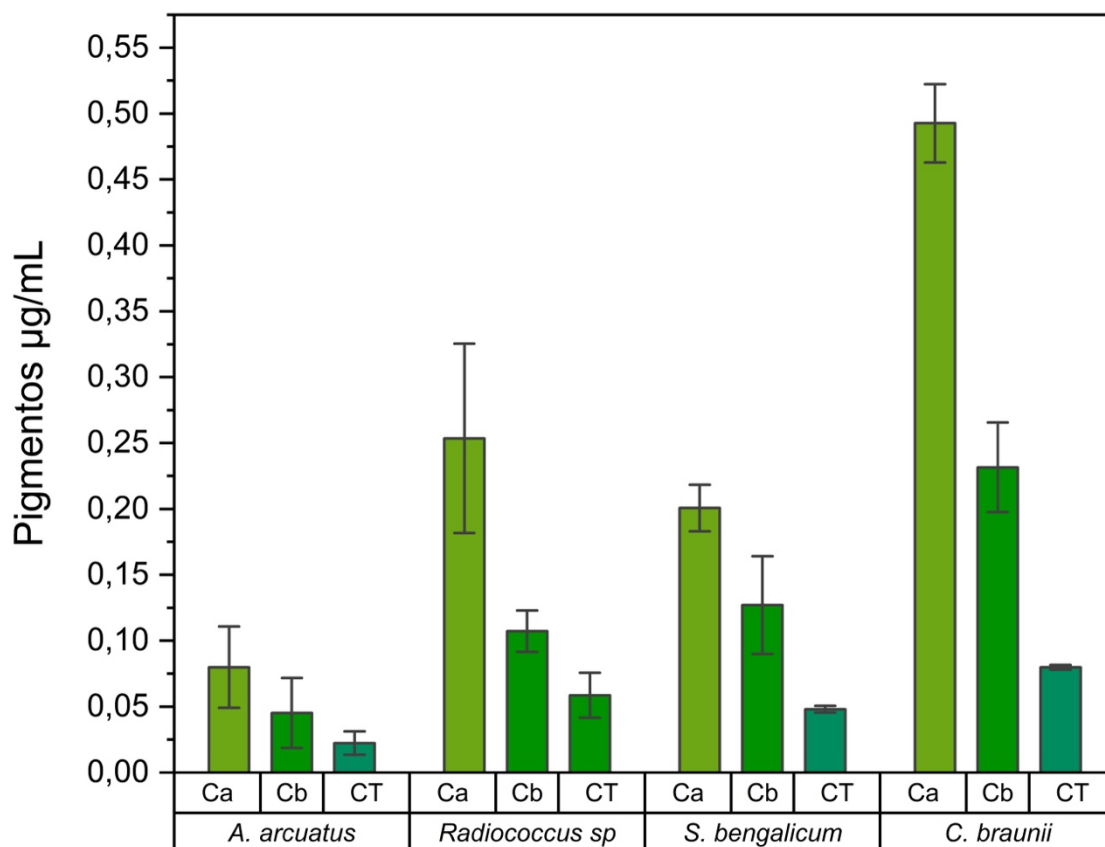


Gráfico 1.7 - Resultados obtidos para a quantidade de pigmentos totais para cada espécie estudada nesse capítulo. Ca, se refere a clorofila *a*, Cb se refere a clorofila *b* e CT se refere a carotenoides totais. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.

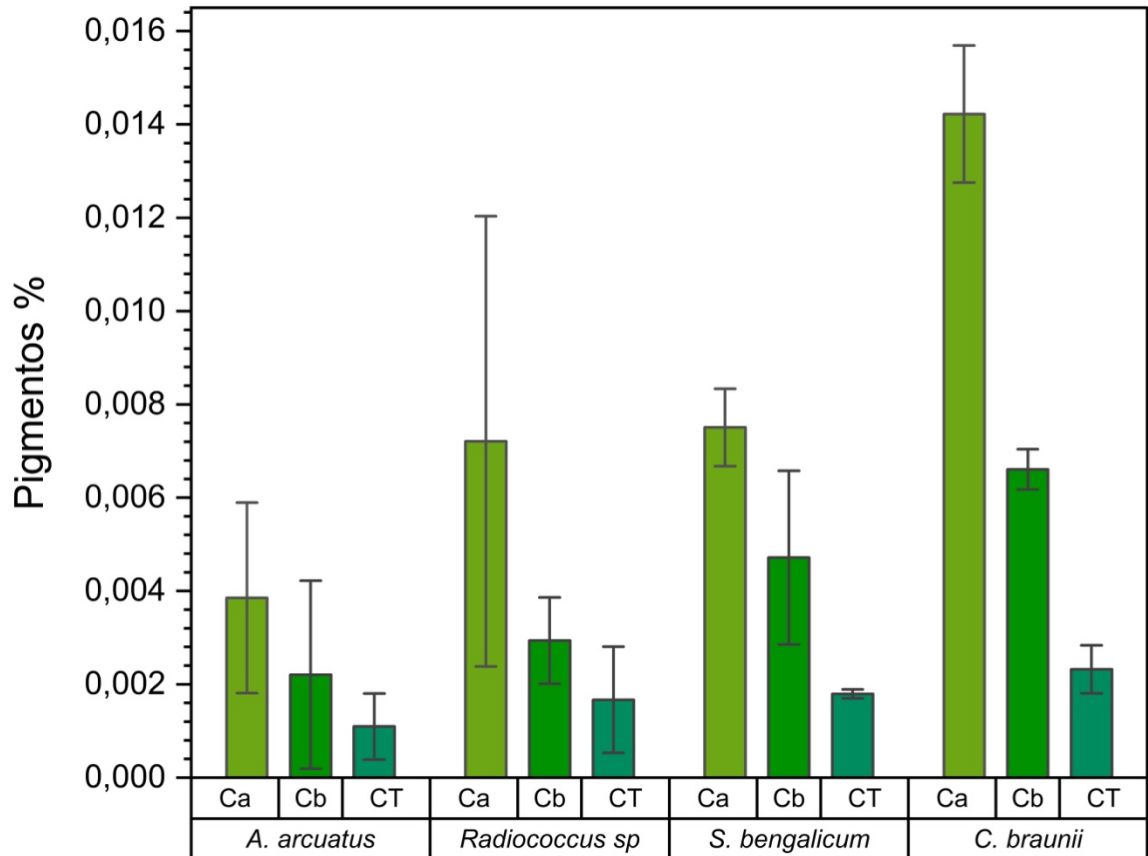


Gráfico 1.8 - Resultados obtidos para a quantidade de pigmentos em relação a biomassa seca para cada espécie estudada nesse capítulo. Ca, se refere a clorofila *a*, Cb se refere a clorofila *b* e CT se refere a carotenoides totais. As barras de erro representam o desvio padrão entre as 3 réplicas.

Valores de pigmentos estão dentro dos descritos em outros estudos de microalgas clorofitas. Geider e La Roche, indicaram que a quantidade tanto de clorofila *a* como de carotenoides estão entre 0,2 e 5 % do peso seco das microalgas, dados que corroboram com os dados obtidos nesse trabalho e que podem ser observados no Gráfico 1.8 (GEIDER; LA ROCHE, 2002). Esses resultados também estão dentro da faixa obtida por Macías-Sánchez Sánchez para carotenoides e clorofilas (clorofitas). E próximo dos resultados obtidos por Rinawati e colaboradores, 2020, para crescimento exponencial de *Chlorella vulgaris* (RINAWATI; SARI; PURSETYO, 2020).

CONCLUSÕES

Todas as cepas apresentaram uma taxa de crescimento, em meio WC e sob intensidades de luz específicas, dentro do esperado para outras microalgas clorofitas.

As microalgas *Radiococcus* sp e *Chlorolobion braunii* apresentam a maior biomassa por litro de cultivo.

A espécie *C. braunii* se destacou em relação quantidade de proteínas por volume de cultivo (1,93 µg/mL), mesmo com as proteínas representando apenas $5,5 \pm 0,6$ % da biomassa seca.

A espécie *Ankistrodesmus arcuatus* teve mais notoriedade em relação a porcentagem de lipídios, produzindo $0,0081 \pm 0,0001$ mg/mL que representam quase metade do peso seco das células ($39,59 \% \pm 5,72 \%$).

S. bengalicum e *Radiococcus* sp apresentam as maiores porcentagem de carboidratos, com $20,76 \pm 11,67\%$ e $5,18 \pm 1,69 \%$, respectivamente, numa produção de $0,0023 \pm 0,0005$ e $0,0020 \pm 0,0010$ g/L.

Chlorolobion braunii e *Radiococcus* sp. tiveram as maiores porcentagens de clorofilas *a* e *b*, mas *Radiococcus* sp produziu o maior teor de carotenoides totais.

Nossos dados corroboram com outros dados da literatura em que diferentes condições de cultivo, alteraram as concentrações dos metabolitos primários.

CAPÍTULO 2

INTRODUÇÃO

Produtos naturais (PN) são metabólitos secundários produzidos por plantas e microrganismos e, uma das maiores fontes de inspiração de novos fármacos para a medicina moderna (NEWMAN; CRAGG, 2020). Essas moléculas são o resultado de milhões de anos de evolução de organismos terrestres e marinhos adaptando-se a diversos fatores bióticos e abióticos, refinando compostos para serem biologicamente ativos e interagirem da melhor forma possível com seus alvos moleculares (CLARDY; WALSH, 2004; DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015; GAO et al., 2020).

Existem registros do uso de produtos naturais para a saúde humana há mais de 4900 anos no Egito e mais de 4600 anos na Mesopotâmia. Essa utilização histórica foi se desenvolvendo, dando origem às práticas de medicina tradicional. Essas práticas, por sua vez, serviram de base para estudos clínicos, farmacológicos e químicos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012), os quais consolidaram os produtos naturais como uma fonte essencial para o desenvolvimento de novos fármacos (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015).

Cerca de 60% dos fármacos aprovados e comercializados até 2019 tem origem ou inspiração em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020; SHINDE; BANERJEE; MANDHARE, 2019). Porém mesmo com toda essa relevância, houve um declínio da ênfase em produtos naturais a partir de 1980, com o foco da indústria farmacêutica direcionado para a triagem de bibliotecas de química combinatória. Algumas questões como a compatibilidade da pesquisa de produtos naturais com técnicas de alto rendimento, *high-throughput screening* (HTS), a produção desses compostos pela indústria farmacêutica, propriedade intelectual, re-isolamento de produtos conhecidos, foram motivos que pareceram justificáveis na época para essa migração do interesse para bibliotecas químicas (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; LI; VEDERAS, 2011; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

As bibliotecas de química combinatória, porém, mostraram um rendimento insatisfatório para prover candidatos para a indústria farmacêutica. Essa insatisfação atrelada com desenvolvimentos tecnológicos que permitem novas formas de se explorar produtos naturais, acabaram trazendo um retorno gradual da busca por novos fármacos para os produtos naturais, que pode ser notado a partir de 2003 (CRAGG; NEWMAN, 2013; KRUG; MÜLLER, 2014). Segundo

Newman e Craigg, 2020, o distanciamento das bibliotecas químicas persiste. E quando empregadas, as bibliotecas químicas focalizam, predominantemente, naquelas que contêm estruturas químicas similares as encontradas em produtos naturais.

Produtos naturais têm a vantagem sobre produtos sintéticos por sua relevância biológica, ou seja, pela sua probabilidade de interagir com alvos moleculares. As bibliotecas químicas, por exemplo, não possuem 83% das estruturas de anéis presentes nos produtos naturais (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; HERT et al., 2009). Além disso, é conhecido que a diversidade desse “espaço químico” com relevância biológica é mais importante que o tamanho da biblioteca. Outras características que os produtos naturais apresentam são a ampla variedade de farmacóforos e sua configuração estereoquímica, que aumentam a expectativa de resultados positivos para atividades biológicas de interesse (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Esse interesse renovado pelos produtos naturais só aconteceu também devido a avanços tecnológicos. Alguns avanços tecnológicos permitiram inclusive a resoluções de alguns problemas anteriores como o re-isolamento de moléculas já conhecidas, através da *desreplicação* das moléculas em fases mais preliminares do estudo, como descreveremos mais adiante (CRAGG; NEWMAN, 2013; KRUG; MÜLLER, 2014).

Dentre as técnicas que se tornaram essenciais nessa descoberta por produtos naturais de interesse está a metabolômica. Como descrito por Harvey, Edrada-Ebel e Quinn, 2015, a metabolômica é uma análise extensiva, quantitativa e/ou qualitativa dos metabólitos contidos ou produzidos em um organismo, tecido ou célula em um determinado período de tempo e sob determinadas condições.

Para analisar esses metabólitos e identificar os compostos orgânicos, são utilizadas técnicas espectrométricas e espectroscópicas, cujas informações podem ser utilizadas de forma sinérgica para se obter a estrutura química de determinado composto. Dentre essas técnicas temos a espectrometria de massas (EM ou MS, *mass spectrometry*), espectroscopia no infravermelho (IV ou IR, *infra-red*) e ressonância magnética nuclear (RMN ou NMR, *nuclear magnetic resonance*). São técnicas em que, essencialmente, uma molécula é perturbada através dessas energias, e a resposta é gravada em espectros (CRNKOVIC; SILVA; AMORIM, 2023; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

A espectroscopia de RMN é uma técnica que provê informações detalhadas sobre a estrutura das moléculas, o arranjo de seus átomos e alguns dados sobre sua estereoquímica. É uma técnica que pode ser usada para análises qualitativas e quantitativas, além de ser não destrutiva,

permitindo que as amostras em solução permaneçam intactas depois das análises (KEELER, 2006). A espectroscopia no infravermelho por outro lado, é particularmente útil para identificar grupos funcionais em compostos orgânicos e não orgânicos, gerando resultados rápidos e análise *high-throughput* de um grande número de amostras sólidas líquidas ou gasosas (MEIER, 2003; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Porém, quando estamos buscando novos compostos bioativos a partir de misturas complexas de extratos biológicos, a espectrometria de massas apresenta algumas vantagens em relação às espectroscopias de RMN e IV, principalmente quando está acoplada a técnicas de cromatografia.

A espectrometria de massas é uma técnica que se destaca pela alta sensibilidade, pela resolução (em equipamentos específicos), por permitir análises de misturas complexas e pela sua versatilidade. Embora as amostras sejam destruídas nas análises, devido a sensibilidade da MS é possível detectar compostos que estão em baixas concentrações na amostra, em picogramas ou nanogramas. A espectrometria de massas de alta resolução traz vantagens à identificação de compostos, pois analisando a massa acurada e padrões isotópicos, é possível calcular fórmulas moleculares de compostos. A espectrometria de massas é altamente eficaz na análise de misturas complexas de compostos, como extratos biológicas, onde vários compostos estão presentes em concentrações diferentes (GROSS, 2017; KORFMACHER, 2013; SHIPKOVA; REILY, 2013; SREERAJ GOPI et al., 2016).

A espectrometria de massas (MS/MS, EM/EM, ou MS²) é uma das técnicas de análise de espectrometria e que ocorre de forma sequencial, ela pode ser utilizada para identificar compostos utilizando informações sobre os fragmentos gerados e seus respectivos espectros de fragmentação. Na MS/MS, íons parentais selecionados são fragmentados gerando informações de relação massa carga, m/z , tanto dos íons moleculares, como dos fragmentos gerados por esses íons parentais. Essas informações sobre as fragmentações geram informações que auxiliam na compreensão de como os átomos estão ligados entre si (LOPES; DA SILVA, 2018; SAWADA et al., 2009), facilitando assim a análise de substâncias complexas, como metabólitos e produtos naturais. Esses espectros obtidos, tanto para o íon parental, MS1, como para os fragmentos, MS2, podem então ser comparados com bibliotecas de espectros, como a biblioteca do GNPS. Os espectros também podem ser analisados com auxílio de alguns programas e plataformas, como é o caso do SIRIUS. Outra vantagem é que a MS pode ser aplicada para diversas moléculas, sejam elas macromoléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos, ou metabólitos pequenos. (GROSS, 2017; KORFMACHER, 2013; SHIPKOVA; REILY, 2013; SREERAJ GOPI et al., 2016).

Citam-se, no entanto, algumas desvantagens da técnica de MS, como a destruição da amostra e a não obtenção de informações detalhadas sobre a estereoquímica dos compostos. Porém, é possível determinar quais átomos a compõem e quais as possíveis estruturas químicas dessas moléculas. Permitindo assim, verificar em estágios iniciais da pesquisa, se são compostos inéditos ou não. Então, mesmo que a espectrometria de massas tenha algumas desvantagens, as suas qualidades fazem com que ainda seja um importante método para a metabolômica (GROSS, 2017; KORFMACHER, 2013; SHIPKOVA; REILY, 2013; SREERAJ GOPI et al., 2016)..

Devido à complexidade desses extratos biológicos, é necessário separar os metabólitos previamente à aquisição dos dados de espectrometria de massas. Essa separação é ainda mais importante quando estamos considerando a quantificação de metabólitos, para minimizar os efeitos da supressão de íons associada à ionização por eletrospray (ESI), que é a técnica de ionização mais comumente usada em LC-MS (CORTESE et al., 2020; MÜLLER et al., 2002).

Essa combinação de separação cromatográfica com a análise por MS, é chamada de hifenada. Isso traz diversas vantagens, porque o número de informações adquiridas é maior e de maior qualidade. Quando utilizamos técnicas de separação acopladas à MS, como a cromatografia líquida (LC, *liquid chromatography*), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High-performance liquid chromatography*) ou gasosa (GC), a distinção entre moléculas de um extrato biológico complexo é facilitada, pois as moléculas injetadas no espectrômetro são previamente separadas na cromatografia, e é possível ter acesso ao tempo de retenção dessas moléculas através do cromatograma, que também oferece mais informações analíticas (DJUKOVIC; RAFTERY; GOWDA, 2019; GAUDÊNCIO et al., 2023; SHIPKOVA; REILY, 2013).

Depois da separação das moléculas por uma cromatografia, é realizada a análise por espectrometria de massas. Após um composto ser ionizado, direcionam-se esses íons para o analisador de massa. Os compostos com diferentes razões de massa-carga (m/z) são então separados no analisador devido a diferentes respostas que têm ao campo eletromagnético a que são expostos. Esses compostos são direcionados até chegar em um detector, que gera como resultado um espectro, cujo eixo x representa a m/z dos íons e o eixo y sendo as abundâncias relativas. Quando análise por espectrometria de massas sequencial, podemos obter também a razão massa-carga dos fragmentos que são obtidos quando o íon molecular se fragmenta (MA, 2022; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Nessa técnica, um procedimento complementar de fragmentação dos íons moleculares é realizada, dessa forma, além da massa acurada do íon molecular, é possível obter o padrão de fragmentação desse íon e inferir com mais embasamento sobre a estrutura desses compostos (MA, 2022).

Para aumentar a resolução dos dados adquiridos, as técnicas utilizadas podem ser a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução: UPLC-HRMS (*ultra high-performance liquid chromatography - electrospray ionization - high-resolution mass spectrometry*) (KRUG; MÜLLER, 2014; SALEM et al., 2020; SREERAJ GOPI et al., 2016). Com espectrômetros de massa de alta resolução, a massa acurada do íon molecular pode ser medida, e podemos designar uma fórmula molecular com alta confiança para esse íon (MA, 2022).

Resumindo, a espectrometria de massas é uma técnica que permite adquirir diversas informações que são críticas para a anotação de compostos. A alta resolução permite que seja determinada com precisão a massa acurada e padrão isotrópico dos compostos, com os quais é possível calcular a fórmula molecular. E caso, esteja sendo realizada uma espectroscopia em tandem, é possível inferir sobre as classes químicas desses compostos e até mesmo conjecturar a estrutura planar dos compostos, pois também são geradas informações sobre os fragmentos que são formados pela fragmentação desses compostos. A comparação dos espectros gerados com bancos de dados também contribui para a identificação desses compostos. A possibilidade de acoplar técnicas de separação permite a análise e distinção entre compostos de extratos complexos em apenas uma análise. Justifica-se, assim, o amplo uso da MS para estudos metabolômicos (DJUKOVIC; RAFTERY; GOWDA, 2019; SHIPKOVA; REILY, 2013).

O avanço dos programas computacionais que auxiliam nas análises dos espectros de massas obtidos e o desenvolvimento de bases de dados robustas são importantes para a metabolômica, pois permitem que os a análise mais eficiente dos dados espectrais. (DJUKOVIC; RAFTERY; GOWDA, 2019).

As redes moleculares se tornaram uma ferramenta bioinformática relevante nesse processo. As redes moleculares analisam os dados obtidos experimentalmente comparando espectros obtidos uns com os outros, pontuando a similaridade entre eles. Essa comparação também é feita entre os dados experimentais com bibliotecas de espectros de compostos já conhecidos. O resultado dessas análises comparativas pode ser visualizado em softwares específicos, em que espectros são representados por nodos e a indicação de similaridade como linhas que conectam esses nodos. Trata-se de uma forma gráfica para enxergar o espaço químico que está presente nos experimentos realizados. Essa visualização facilita a compreensão dos compostos que são relacionados e famílias espectrais, mesmo que esses espectros não correspondam a nenhum composto conhecido (NOTHIAS et al., 2020).

O GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) é uma plataforma que permite a geração dessas redes moleculares baseadas em dados de MS/MS. Existe ainda a possibilidade de incluir às redes moleculares metadados que podem facilitar as análises (ERNST et al., 2019; NOTHIAS et al., 2020).

Outra análise que pode ser feita na plataforma do GNPS é a análise de possíveis grupos químicos aos quais os nodos das redes moleculares podem pertencer. Através do *MolNetEnhancer*, é realizada uma classificação automatizada através do *ClassyFire*, aprimorando dessa forma os dados obtidos pela espectrometria de massas. O *MolNetEnhancer* permite uma visão abrangente, facilitando a anotação e a descoberta da diversidade estrutural dentro de famílias moleculares. Essa integração permite uma exploração mais precisa e eficiente do metaboloma (ERNST et al., 2019).

Outro ponto que podemos destacar, é que a maior parte de novos fármacos e compostos de interesse biotecnológico descobertos, está diretamente associada a produtos naturais. A descoberta de novos produtos naturais de interesse é custosa e demanda tempo. Para encurtar o tempo de descobrimento de novas moléculas, é possível identificar nas fases mais iniciais da pesquisa os compostos já conhecidos, e assim se evitar o estudo e elucidação de compostos previamente conhecidos. Esse processo de desrepliação tem como objetivo final aumentar a eficiência dos projetos para descoberta de fármacos, seja combinando diferentes áreas do conhecimento ou criando maneiras totalmente inovadoras de avançar neste campo. Uma das maneiras de se realizar a desrepliação, é por exemplo, comparar espectros de massa (GAUDÊNCIO et al., 2023; GAUDÊNCIO; PEREIRA, 2015).

Uma variante mais específica da desrepliação, é a desrepliação guiada por atividade. Nesse processo, a desrepliação não é realizada apenas pela comparação das propriedades químicas das moléculas, mas também por sua possível atividade biológica. Os compostos, ou extratos, são inicialmente testados quanto a sua atividade terapêutica ou biológica, e aqueles que demonstram atividade são analisados mais profundamente para garantir que não se tratam de substâncias já conhecidas, utilizando ferramentas de desrepliação e informações de bancos de dados. Isso acelera o processo de descoberta ao direcionar a pesquisa para compostos com potencial farmacológico e evitar a análise de substâncias já descritas sem interesse terapêutico (GAUDÊNCIO et al., 2023; GAUDÊNCIO; PEREIRA, 2015).

Uma vantagem se se utilizar a desrepliação guiada por atividade é a priorização de compostos que tem de fato, determinada atividade biológica, e assim, acelerar significativamente a descoberta de novos compostos bioativos.

Com base nas informações disponíveis e considerando que, em 2003, a taxa de redescoberta de compostos bioativos em cianobactérias foi inferior a 5% devido à escassez de estudos sobre o tema (OLAIZOLA, 2003), buscamos focar em espécies de microalgas ainda não exploradas. A espécie *Ankistrodesmus arcuatus* possui um artigo publicado na plataforma Web of Science; *Radiococcus* sp. possui dois artigos; *Chlorolobion braunii* foi abordada em sete artigos, e *Sorastrum bengalicum* não possui publicações registradas.

MATERIAL E MÉTODOS

CULTURAS

As cepas de microalgas foram cultivadas nos meios em que são mantidas nas coleções de cultura das quais foram obtidas. A composição dos meios BG-11 está descrita no Manual para cultivo de cianobactérias (JACINAVICIUS et al., 2012).

As cepas e os meios de cultivo estão descritos na Tabela 2. 1, assim como a coleção da qual foram retiradas. As microalgas verdes foram cedidas da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos, CCMA-UFSCar (Departamento de Botânica), código CCMA-UFSCar.

Todos os cultivos foram realizados em escala laboratorial, com volumes entre 1,2 e 2,0 L, com ciclo claro-escuro de 12:12 horas e temperatura de 25 ± 1 °C. A intensidade de luz dos cultivos para as microalgas verdes foi determinada através de curvas rápidas de luz (RLC) realizadas no equipamento Phyto-PAM (Heinz-Walz, Alemanha), cuja descrição já foi realizada no capítulo anterior; os valores específicos estão presentes na Tabela 2. 1.

As quatro cepas estudadas no capítulo anterior foram analisadas em dois momentos do cultivo celular: fase exponencial e fase estacionária. A partir de cultivos prévios, foi determinado o meio da fase exponencial de crescimento, assim como o início da fase estacionária. A partir de um inóculo de 5×10^5 células, as cepas *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp. e *Chlorolobion braunii* atingiram o meio da exponencial com 3 dias, e a espécie *Sorastrum bengalicum* com 4 dias. As amostras foram então tratadas da mesma maneira que as demais.

Tabela 2. 1 - Espécies de microalgas, identificação da cepa na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da UFSCar.

Espécie	Código na Coleção de Microalgas	Meio de Cultivo	Irradiância do cultivo ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
Esp\u00e9cies cultivadas e coletadas na fase exponencial e na fase estacion\u00e1ria			
<i>Ankistrodesmus arcuatus</i>	CCMA-UFSCar 24	WC	170
<i>Radiococcus</i> sp (com mucilagem)	CCMA-UFSCar 283	WC	240
<i>Sorastrum bengalicum</i>	CCMA-UFSCar 556	WC	230
<i>Chlorolobion braunii</i>	CCMA-UFSCar 702	WC	270

EXTRATOS

Os extratos foram feitos em metanol (MeOH), marca J. T. Barker com grau de pureza para cromatografia e espectrometria. As amostras liofilizadas foram submersas em MeOH durante a noite. No dia subsequente, o sobrenadante foi separado e armazenado a 2-8 °C, enquanto a biomassa restante passou por um novo processo de extra\u00e7\u00e3o *overnight* com o mesmo solvente. O extrato obtido nos dois dias foi ent\u00e3o filtrado com o aux\u00edlio de um funil de vidro e l\u00e3 de vidro (Figura 2. 1). Todos os materiais de vidro que entraram em contato com a amostra foram previamente calcinados em mufla a 400 °C durante 8 horas, e enxaguados com metanol 3 vezes antes do uso.



Figura 2. 1 - Filtração da amostra CCMA-UFSCar 89 com auxílio de um funil com lã de vidro.
Fonte: A autora.

O extrato filtrado foi então seco parcialmente em um rotaevaporador, marca IKA RV 10 control (Figura 2. 2), e parcialmente numa centrífuga concentradora a vácuo *SpeedVac* (Thermo Scientific, USA). As amostras secas foram congeladas até o momento da análise por massas.



Figura 2. 2 – Rotaevaporador ika rv 10 control. Fonte: A autora.

A análise de massas foi realizada em um sistema UPLC-HRMS/MS – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução sequencial, e as amostras foram randomizadas, O equipamento utilizado foi espectrômetro Q-TOF Maxis 3G, da *Bruker Daltonics*.

Foram utilizadas colunas C18 (50 mm de comprimento por 2,1 mm de diâmetro, tamanho de 1,7 μm e poros de 100 Å) e foi realizada a cromatografia em fase reversa. Foi utilizada uma pré-coluna. Como fase móvel, foi utilizada água grau LC-MS acidificada com 0,1 % de ácido fórmico e acetonitrila e um gradiente de 10-100% de B por 7 minutos, mantendo 1 min com 100 % B, e depois reduzindo para 10% B em 0,1 min. e mantendo essa concentração por 1,9 minutos.

Os espectros de MS e MS/MS foram obtidos em modo positivo, dependente dos dados. Os três íons mais intensos obtidos no MS1 foram selecionados para MS2. Foi utilizada uma energia de dissociação induzida por colisão (CID) de 60 V ou 70 V. Os parâmetros configurados no equipamento foram: nebulizador, 3 Bar; gás seco 9 L/min; temperatura seca 200°C; deslocamento final da placa 500 V e capilar 3500 V. A variação de detecção variou de 150-2000 Da para o espectro de MS1; e 50-2000 Da para o espectro de MS2.

REDES MOLECULARES E METABOLÔMICA

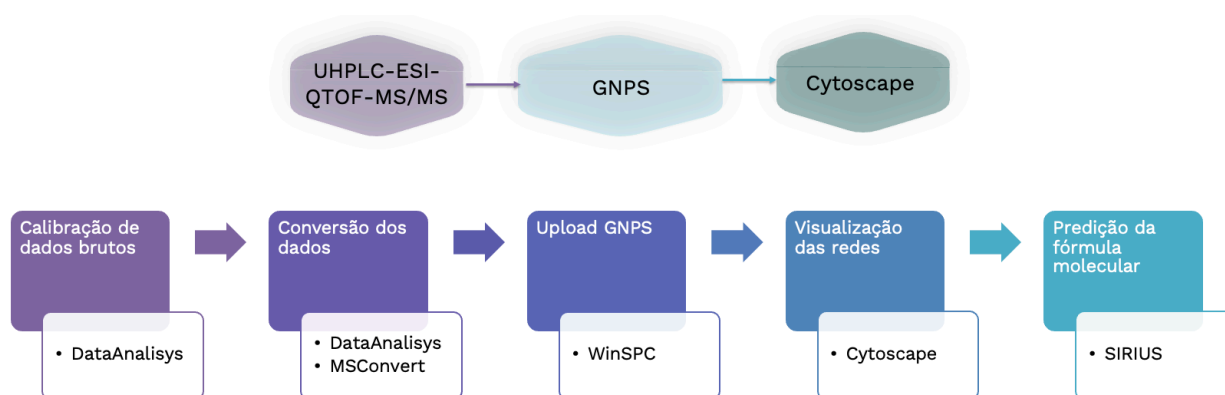


Figura 2. 3 - Fluxograma das etapas para as análises metabolômicas.

Para realizar a análise metabolômica, os arquivos originais obtidos do espectrômetro foram analisados no software *DataAnalysis* da Bruker. E seguiram o fluxograma conforme a Figura 2. 3.

Para montar redes moleculares os arquivos obtidos da UPLC-HRMS/MS foram convertidos para o formato mzXML, utilizando o programa Proteowizard MSconvert (CHAMBERS et al., 2012). Foi escolhido o formato de saída mzXML, precisão de codificação 32 bits, arquivo sem compressão e foi adicionado o filtro *Peak Picking* com o algoritmo Vendor. Para realizar o *upload* dos arquivos para o GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*), foi utilizado o programa *FireZilla Pro*.

As redes moleculares foram feitas pela plataforma GNPS, utilizando pipeline para redes moleculares clássicas. Os espectros das amostras em triplicata foram adicionados no grupo G1, e o branco foi adicionado no G6 para ser subtraído antes da formação da rede; a tolerância para a massa do íon precursor (*precursor ion mass tolerance*) e para a massa o íon fragmento (*fragment ion mass tolerance*) foram de 0,02 Da; a pontuação mínima de cosseno (*minimum cosine score*) foi de 0,7; o mínimo de íons de fragmentos combinados (*minimum matched fragment ions*) foi de 6; e, foi realizada a busca por análogos (*search Analogs: enable*). Os parâmetros que não foram citados, não foram alterados.

As redes moleculares obtidas foram observadas através do programa *Cytoscape*. Para verificar os possíveis grupos químicos dos metabólitos, foi utilizada uma ferramenta complementar do GNPS, chamada de *MolNetEnhancer*.

As redes foram feitas para as cepas *A. arcuatus*, *radiococcus* sp., *S. bengalicum* e *C. braunii*, em separado e juntas. As redes exclusivas de cada cepa permitiram uma comparação entre os metabólitos das diferentes fases de crescimento. E as redes feitas com as quatro cepas juntas, permitiram identificar nodos exclusivos das cepas e a relação de clusters com a espécie/gênero e fase de crescimento. Para montar as redes com as quatro cepas, foi adicionado um arquivo de metadados com as informações adicionais desejadas.

Para a desreplicação de possíveis metabólitos de interesse, foi utilizado o programa SIRIUS®. Esse software auxilia na desreplicação de metabólitos a partir dos dados de espectrometria de massas de alta resolução, integrando demais plataformas que permitem comparação com espectros de fragmentação e semelhança estrutural com possíveis classes químicas (DÜHRKOP et al., 2019). A plataforma ChemCalc® foi utilizada para calcular o cálculo do erro de massas entre a massa molecular observada e a massa molecular teórica proposta (PATINY; BOREL, 2013).

Para realizar um ensaio da atividade antimicrobiana, os extratos metanólicos obtidos a partir das microalgas, na fase exponencial e na fase estacionária, foram ressuspensos em DMSO 3,3% e utilizados em duas concentrações - 50 µg e 500 µg - contra duas bactérias diferentes.

Foram utilizadas as bactérias: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. A partir de colônias isoladas de placas de Petri, cada uma dessas cepas foi inoculada em caldo Müller-Hilton e cresceram até a fase *log*. Cada uma dessas cepas, foi então diluída até 1×10^6 UFC/mL.

Em placas de 96 poços, as suspensões bacterianas foram adicionadas para a concentração final do inóculo de 5×10^5 UFC/mL, de acordo com as diretrizes do *Clinical and laboratory standards institute*, 2024 para o ensaio de susceptibilidade antimicrobiana. Cada uma das cepas, foi exposta a 3,3 µL de extrato algal, ressuspensado em DMSO 3,3 % em uma concentração final de 50 µg/mL e 500 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado 3,3 µL de DMSO 100%, e, como controle positivo, foi utilizado 3,3 µL de antibiótico, imipenem combinado com cilastatina. Cada condição foi testada em triplicata.

O crescimento dessas bactérias foi obtido subtraindo-se a absorbância do tempo de 0 horas da absorbância obtida no tempo de 24 horas. Os valores obtidos para cada uma das condições em triplicata foram normalizados com o controle de crescimento. O controle negativo, CC, foi feito com o meio de cultivo, a bactéria testada e 3,3 µL de DMSO 100%, com o intuito de verificar alguma influência do DMSO no crescimento da bactéria. O controle positivo, CA, foi obtido com o meio de cultivo, a bateria testada e com 3,3 µL da combinação dos antibióticos imipenem e cilastatina. E por fim, o controle de esterilidade, CE, foi obtido apenas com o meio de crescimento, para verificar que a placa estava livre de contaminantes, garantindo assim que o cultivo desejado estava livre da interferência de outros microrganismos. As placas de 96 poços tiveram a absorbância lida a 600 nm em um leitor de microplacas Biotek Synergy HT (*Marshall Scientific*, Estados Unidos).

O crescimento dessas bactérias foi analisado comparando o crescimento entre 0 e 24 horas. O percentual de inibição de crescimento foi calculado em comparação com o controle negativo de cada placa.

INVESTIGAÇÃO DOS METABÓLITOS - METABOLÔMICA COMPARATIVA

OBJETIVO

Com o intuito de investigar os metabólitos secundários e compreender a diversidade das classes de compostos químicos presentes nas microalgas, além de verificar se há variações nas classes em função das fases de crescimento, essa sessão se propôs a:

- 1) a) cultivar linhagens de microalgas brasileiras; b) coletar, liofilizar e extrair a biomassa; c) analisar extratos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução em tandem (LC- MS/MS) para estudo metabolômico.
- 2) Realizar uma análise metabolômica comparativa entre diferentes fases de crescimento de 4 microalgas - *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp., *Sorastrum bengalicum* e *Chlorolobion braunii* - buscando compreender se existem variações de possíveis metabólitos secundários relacionadas ao seu ciclo de vida, e quais as possíveis classes químicas das *features* encontradas e como elas se distribuem em relação a fase de crescimento.
- 3) Realizar uma análise metabolômica comparativa entre as quatro linhagens microalgas; comparando a diversidade e quantidade de *features* encontradas em cada linhagem e suas respectivas fases de crescimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CULTURAS E EXTRATOS

As espécies *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp., *Sorastrum bengalicum* e *Chlorolobion braunii*, descritas na Tabela 2. 1, foram analisadas por espectrometria de massas, tanto na fase exponencial com na estacionária.

Ankistrodesmus arcuatus produziu em torno de 80 mg de biomassa por litro de cultura, *Radiococcus* sp. possuiu a maior variabilidade em relação ao extrato obtivo, variando entre 16 mg e 64 mg por litro, *Sorastrum bengalicum* entre 16 mg e 124 mg, e, *Chlorolobion braunii*, entre 6 e 106 mg por litro.

REDES MOLECULARES E METABOLÔMICA

As redes moleculares foram construídas separadamente para cada cepa estudada por espectrometria de massas, e os espectros das fases exponencial e estacionária foram agrupados de forma a serem discernidos nas análises posteriores. Dessa forma, pelo programa *Cytoscape* foi possível visualizar quando *features* (nodos) possuíam espectros obtidos das amostras da fase exponencial, estacionária, ou de ambas as fases.

As redes moleculares de todas as cepas podem ser encontradas no Anexo desse documento. Para exemplificar: a rede obtida para a espécie *A. arcuatus* está representada na Figura 2. 4. Essa rede, especificamente, foi obtida alterando os filtros de uma rede obtida através do *MolNetEnhancer* para que ambas pudessem ser sobrepostas para facilitar a comparação.

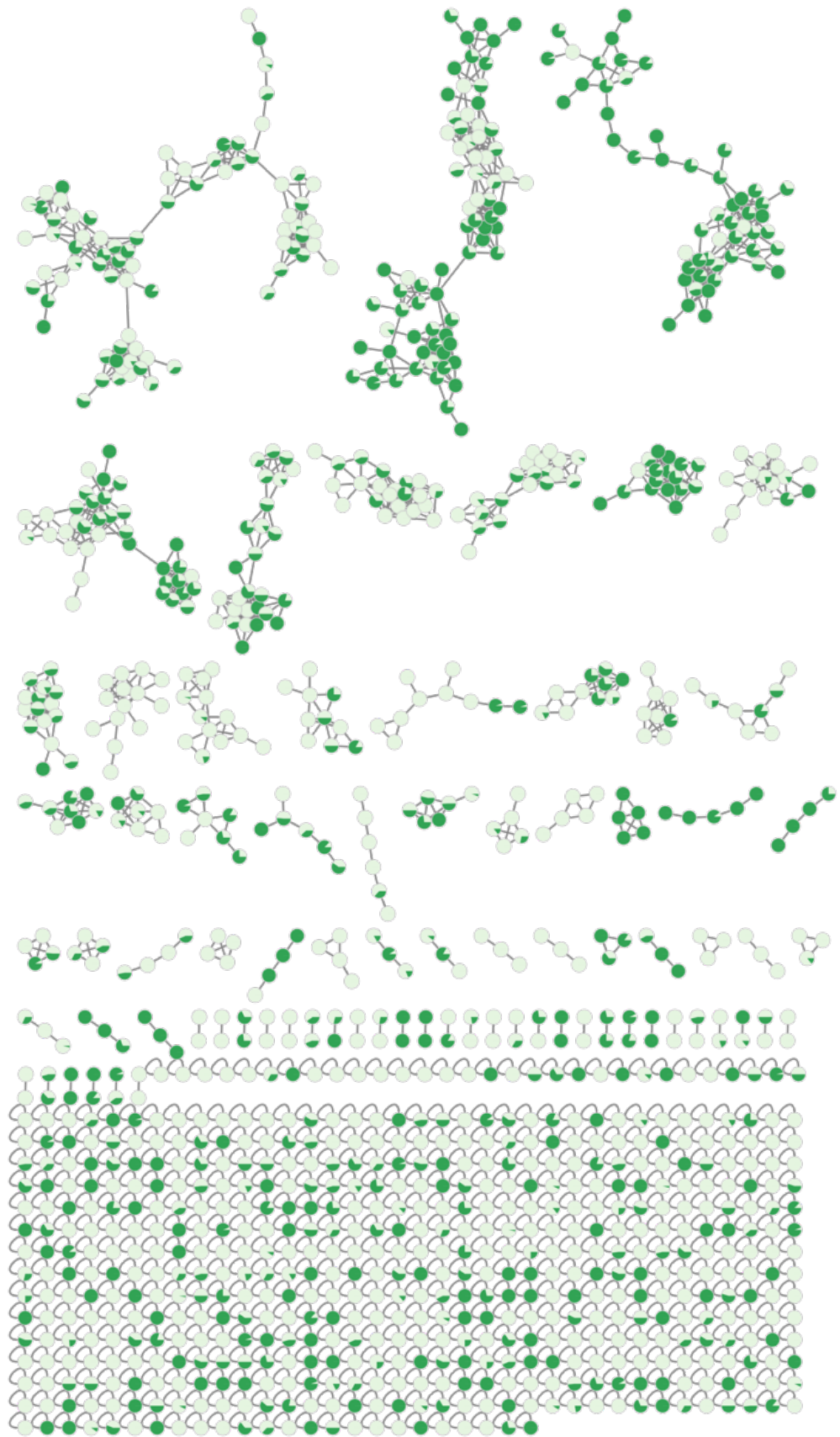


Figura 2. 4 – Rede molecular para a cepa CCMA-UFSCar 24, *Anikistrodesmus arcuatus*, com destaque para as *features* (nodos) que foram encontradas na fase exponencial (verde claro) e na fase estacionária (verde escuro).

Na Tabela 2. 2, podem ser observados os números de *features* (nodos) encontrados para cada espécie que são exclusivos de uma fase de crescimento, exponencial ou estacionária, ou que estavam presentes nos dois momentos do cultivo, assim como o número total de nodos. Lembrando que cada nodo representa um espectro de consenso, ou seja, uma *feature* que engloba espectros considerados praticamente idênticos.

A espécie *A. arcuatus* apresentou a maior número de *features*, apresentando 1177 nodos na rede molecular. Quase 50 % desses metabólitos foram exclusivos da fase exponencial, e apenas 17,33% foram metabólitos exclusivos da fase estacionária. A cepa *Radiococcus* sp. apresentou um número próximo de nodos totais, 1126, porém a maior parte desses *features* (46,18%) foram encontrados nas duas fases de crescimento. *C. braunii* apresentou resultados semelhantes, com a maior parte dos *features* (50,80%) sendo compartilhados entre as duas fases de crescimento.

Em contraste com *C. braunii*, *S. bengalicum* apresentou 1085 nodos totais, e foi a cepa com a maior diferenciação entre os metabólitos apresentados em cada fase de crescimento: 35,39% foram metabólitos exclusivos para a fase exponencial e 36,59% foram metabólitos exclusivos da fase estacionária.

Tabela 2. 2 – Número de nodos encontrados na rede molecular para cada espécie

Cepa	Nodos somente na fase exponencial	Nodos interseção fase exponencial e estacionária	Nodos somente na fase estacionária	Nodos totais
<i>A. arcuatus</i>	550 48,73 %	423 39,84 %	204 17,33 %	1177 100 %
<i>Radiococcus</i> sp.	295 26,20 %	520 46,18 %	311 27,62 %	1126 100 %
<i>S. bengalicum</i>	384 35,39 %	304 28,01 %	397 36,59 %	1085 100 %
<i>C. braunii</i>	255 27,16 %	477 50,80 %	207 22,04 %	939 100 %

Os diagramas de Venn da Figura 2. 5 facilitam a visualização das diferentes porcentagens de nodos encontrados em cada fase de crescimento, e entre as cepas, uma vez que os tamanhos estão proporcionais.

A. arcuatus apresenta o maior número, e proporção de nodos na fase exponencial, e tem o menor número de nodos na fase estacionaria de crescimento. É uma cepa cuja diversidade de *features* é menor na fase estacionaria de crescimento.

Para averiguar quais as possíveis classes químicas relativas aos nodos que compuseram as redes moleculares de cada espécie, foi utilizado o *MolNetEnhancer* dentro da própria plataforma do GNPS. A rede obtida para a espécie *A. arcuatus* pode ser observada na Figura 2. 6, para as demais espécies, as redes se encontram no Anexo I.

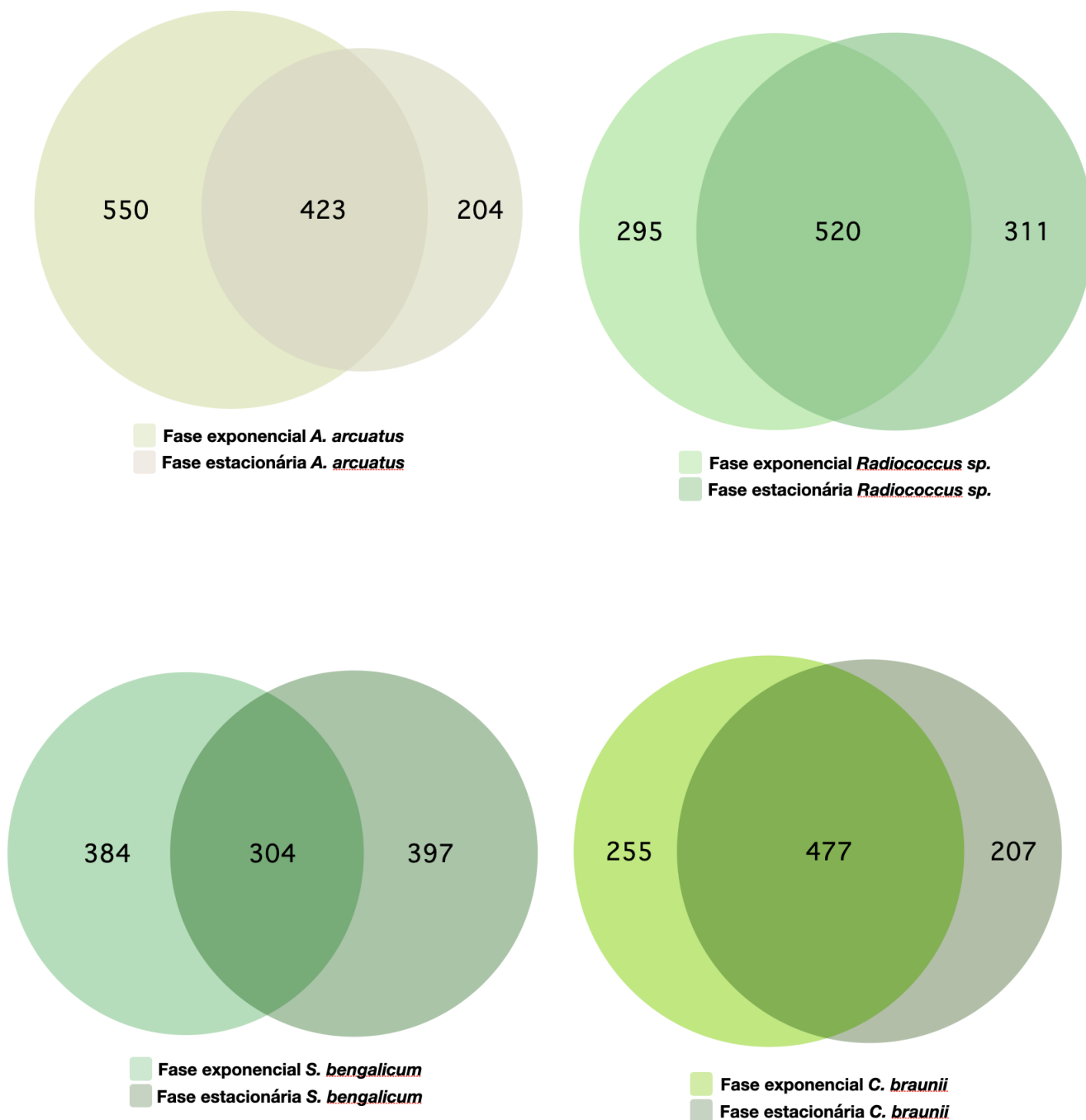


Figura 2. 5 – Diagramas de Venn representando o número de *features* (nodos) encontrado das fases exponencial e estacionária das espécies *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus sp.*, *Sorastrum bengalicum* e *Chlorolobion braunii*.

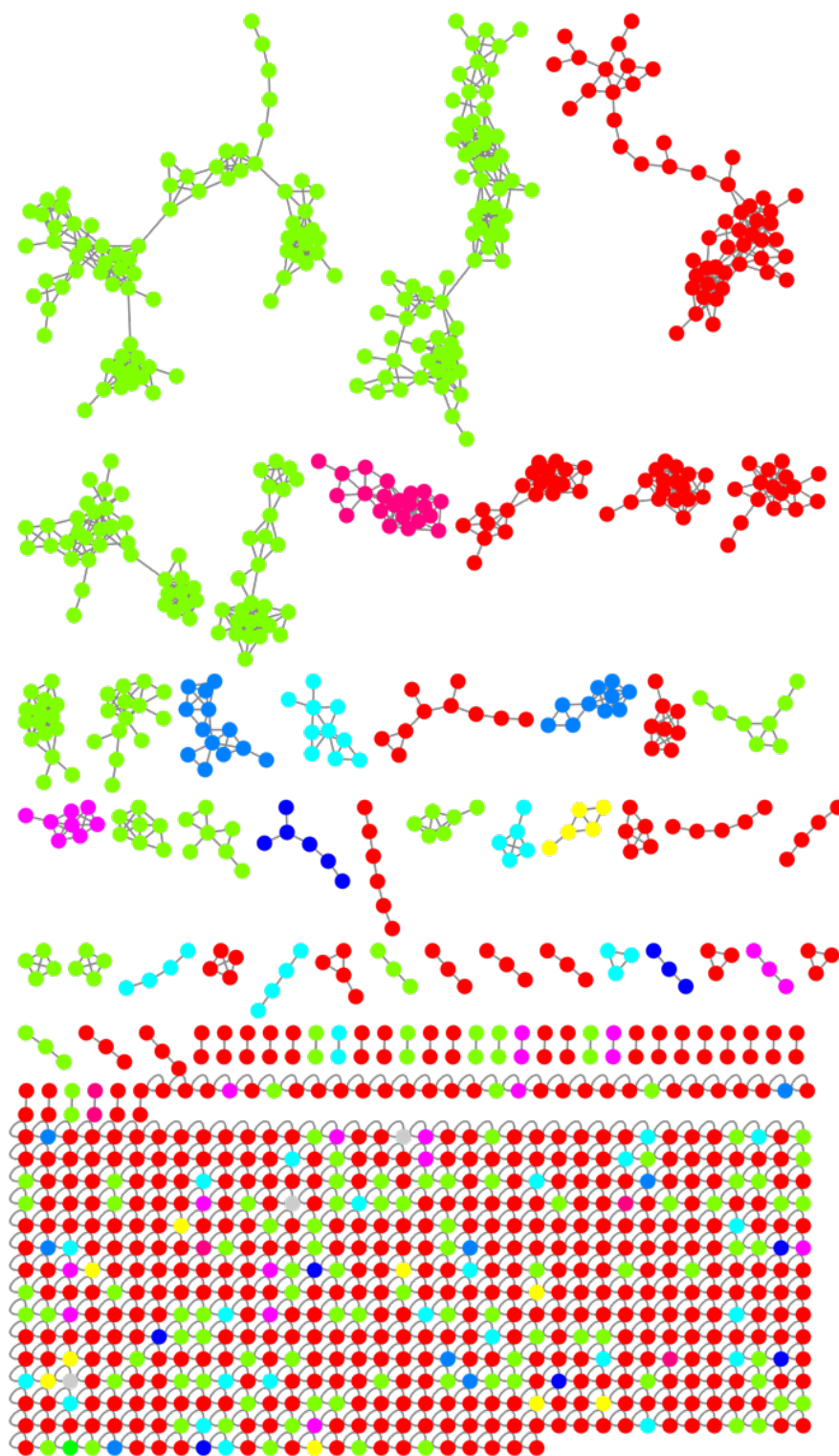


Figura 2. 6 – Rede molecular analisada com o *MolNetEnhancer* para a cepa CCMA-UFSCar 24, *Ankistrodesmus arcuatus*, com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro), compostos organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lipídios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho).

As *features* de cada cepa foram quantificadas para cada superclasse química e podem ser observados na Tabela 2. 3 e no Gráfico 2. 1.

Tabela 2. 3 - Número de *features* encontrados para cada superclasse de moléculas. 'x' representa nodos encontrados na fase exponencial, 's' nodos encontrados na fase estacionária e 'xs' nodos encontrados em ambas as fases.

Superclasse	24xs	24x	24s	283xs	283x	283s	556xs	556x	556s	702xs	702x	702s
Benzenóides	20	17	6	13	7	9	13	9	6	14	9	10
Lignanais e relacionados	37	30	24	85	58	72	36	13	25	44	38	31
Lipídios e semelhantes	440	363	271	438	326	360	438	291	319	436	355	319
Nucleosídeos e outros	6	5	1	7	7	1	6	6	-	1	1	1
Compostos orgânicos 1,3-dipolares	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácidos orgânicos e derivados	137	122	88	111	90	93	98	64	69	102	83	77
Compostos orgânicos de nitrogênio	19	17	7	16	9	10	12	9	5	9	4	5
Compostos orgânicos de oxigênio	15	7	10	11	5	9	11	7	6	11	8	5
Compostos Organoheterocíclicos	29	19	19	26	15	23	30	15	23	27	21	19
Fenilpropanóides e policetídeos	34	33	10	34	31	27	23	22	10	24	23	11
Sem correspondência	654	496	311	580	392	346	637	377	351	506	352	314

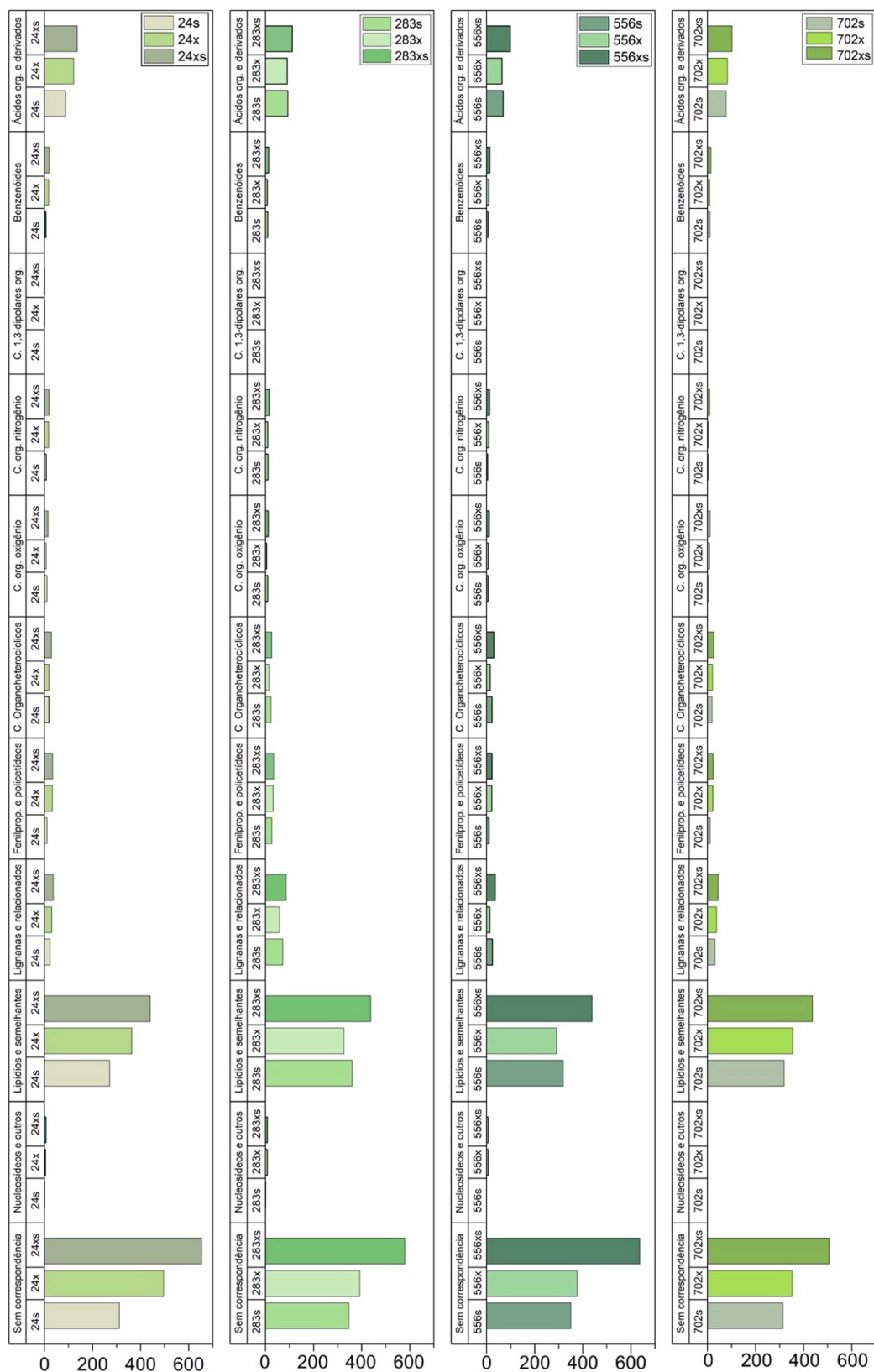


Gráfico 2. 1 – Representação do número de *nodos* atribuído a cada superclasse química para cada espécie e a fase de crescimento que foi encontrada. ‘x’ representa nodos encontrados na fase exponencial, ‘s’ nodos encontrados na fase estacionária e ‘xs’ nodos encontrados em ambas as fases. ‘Sem correspondência’ são nodos que não tiveram match químico, e análogos.

A cepa de *Radiococcus* sp., possui um número maior de *features* de todas as classes químicas na fase estacionária de crescimento. O oposto pode ser observado para a cepa *A. arcuatus*, na qual, o número de *features* é maior na fase exponencial de crescimento, apenas “Compostos orgânicos de oxigênio” tiveram um número maior de *features* na fase estacionária. A cepa *S. bengalicum* em uma variação bem distribuída das quantidades de *features* de cada classe entre as duas fases de crescimento, enquanto a cepa *C. braunii* tem um número maior de *features* de diferentes classes químicas na fase exponencial. Esses dados sugerem que a busca de compostos de diferentes classes químicas depende muito da fase de crescimento, sendo muito única de cada cepa.

Uma semelhança entre todas as cepas, é que a classe química de “Lipídios e semelhantes” foi a que teve o maior número de *features*. Quando comparando todas as classes químicas classificadas ainda temos, para todas as cepas, pelo menos 1,44 vezes mais *features* reconhecidas como “Lipídios e semelhantes” do que as demais classes químicas. *S. bengalicum* possui 1,91 vezes mais *features* reconhecidas como lipídios. Esses dados destacam essas microalgas como potenciais fontes de possíveis nutraceuticos, e como possíveis fontes de biocombustíveis.

Outro ponto que pode ser destacado é que cada cepa apresenta uma distribuição única. A classe de “Lignanas e relacionados”, por exemplo, varia significativamente entre as cepas. *A. arcuatus*, possui destaque pela quantidade de *features* reconhecidas como “Ácidos orgânicos e derivados” e por ser a única a apresentar *features* reconhecidas como “Compostos orgânicos 1,3-dipolares”. *Radiococcus* sp., por sua vez tem uma quantidade maior de *features* classificadas como “Lignanas e relacionados”. A cepa *C. braunii* é que possuiu o menor número de *features* sem correspondência.

Esses dados nos permitem entender que embora existam certos padrões em relação as classes químicas possivelmente encontradas em microalgas, existem muitas características que são linhagem específicas, e que ambas as fases devem ser consideradas para descobertas de novas moléculas quando olhamos para a diversidade de *features* encontradas. As diferentes *features* encontradas em diferentes fases de crescimento, e de diferentes classes químicas, refletem a variações de estruturas químicas encontradas em diferentes fases do crescimento e linhagens.

INVESTIGAÇÃO DOS METABÓLITOS - DESREPLICAÇÃO GUIADA POR ATIVIDADE
BIOLÓGICA

OBJETIVO

Sabendo que uma das formas de se buscar compostos bioativos, é realizar uma desreplcação guiada por atividade, nessa pesquisa objetivamos:

- 1) Utilizar o extrato obtivo a partir do cultivo de quatro microalgas brasileiras - *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp., *Sorastrum bengalicum* e *Chlorolobion braunii*, nas fases exponenciais e estacionárias de crescimento - e analisados por LC-MS/MS para estudo metabolômico guiado por bioatividade.
- 2) Realizar estudos de inibição de crescimento de microrganismos na presença dos extratos dessas microalgas.
- 3) Analisar e verificar a correlação de possíveis atividades biológicas com a linhagem e/ou fases de crescimento.

Esse trabalho foi realizado em colaboração com o aluno de doutorado Francisco Henrique Santana da Silva que guiaram a investigação dos metabólitos secundários produzidos por essas microalgas.

RESULTADO E DISCUSSÃO

ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os extratos obtidos em duas fases de crescimento, exponencial (EXP) e estacionária (EST) das microalgas *A. arcuatus*, *Radiococcus* sp., *S. bengalicum*, e *C. braunii*, foram testados para verificar atividade antimicrobiana, em duas concentrações distintas (50 µg e 500 µg), nas bactérias: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Os resultados podem ser observados no Gráfico 2. 2. A cepa *Radiococcus* sp. se destacou em relação a atividade antimicrobiana. O extrato dessa cepa na fase estacionária de crescimento e na concentração de 500 µg inibiu o crescimento da *P. aeruginosa* e *S. aureus* em praticamente 100%. Alguma bioatividade também foi detectada contra *S. bengalicum*, porém os resultados foram menos expressivos, e portanto, o extrato dessa microalga não foi o foco dos estudos de desreplicação dessa sessão.

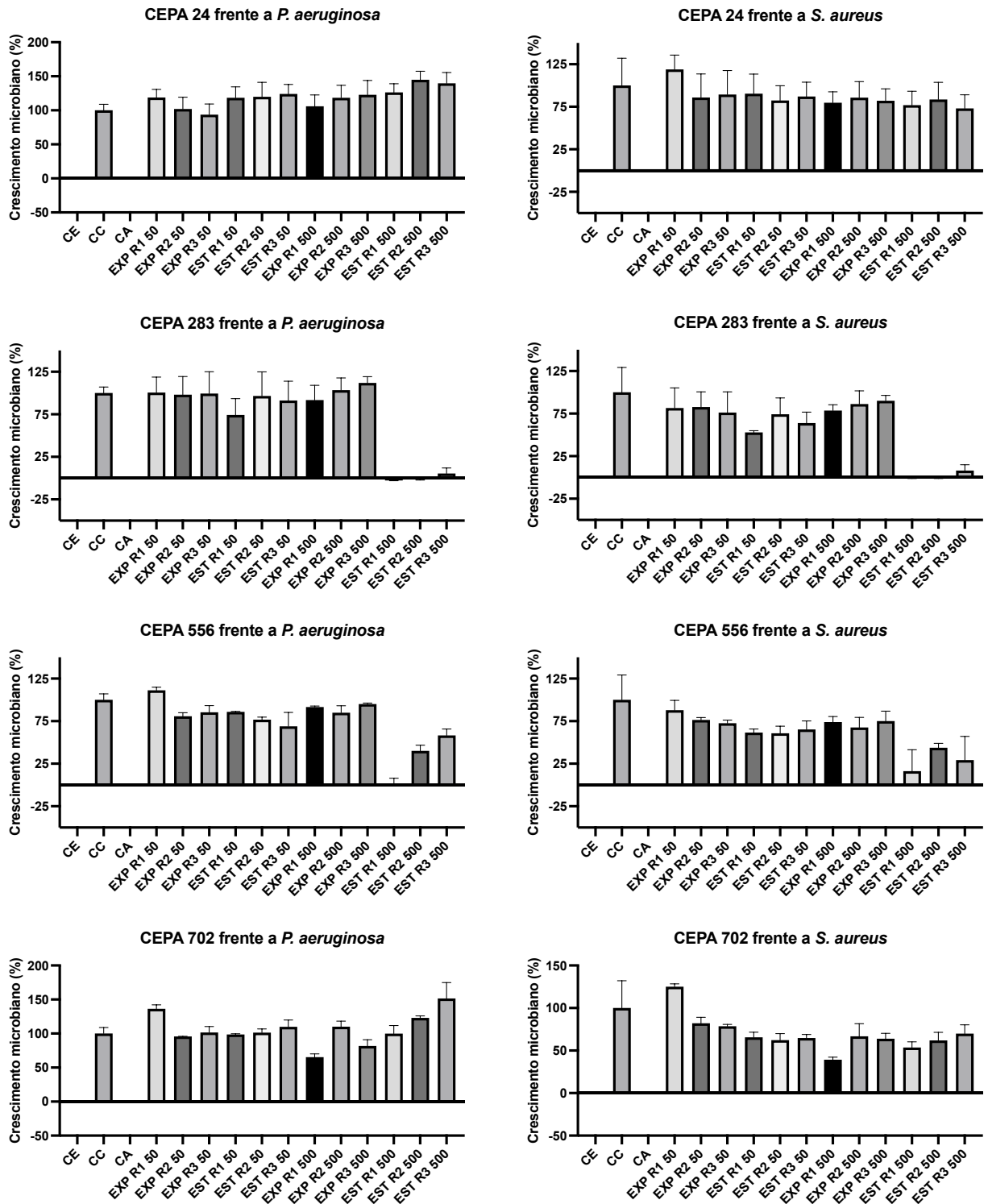


Gráfico 2. 2 – Gráficos da atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos das cepas *A. arcuatus* (cepa 24), *Radiococcus* sp. (cepa 283), *S. bengalicum* (cepa 556), e *C. braunii* (cepa 702) frente as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. CE representa o controle de esterilidade (apenas o meio de cultivo); CC - controle de crescimento (meio de cultivo, bactéria e DMSO); CA - controle com antibiótico; EXP - amostras de microalga na fase exponencial; EST – amostras na fase estacionária; 50 - 50 µg de extrato; 500 - 500 µg de extrato e, R1, R2 e R3 as triplicatas biológicas.

A rede molecular combinando as quatro cepas de microalgas aqui estudadas, com as possíveis classes químicas que foram identificadas, pode ser observada na Figura 2. 7. Os dados apresentados na Tabela 2. 3 também estão representados de forma indireta nesta figura. Podemos observar com mais facilidade que 43% das *features* não foram possíveis de serem classificadas dentre as classes químicas (vermelho). É possível notar também a presença significativa de lipídeos, em verde claro, e; de ácidos orgânicos e derivados, em azul claro.

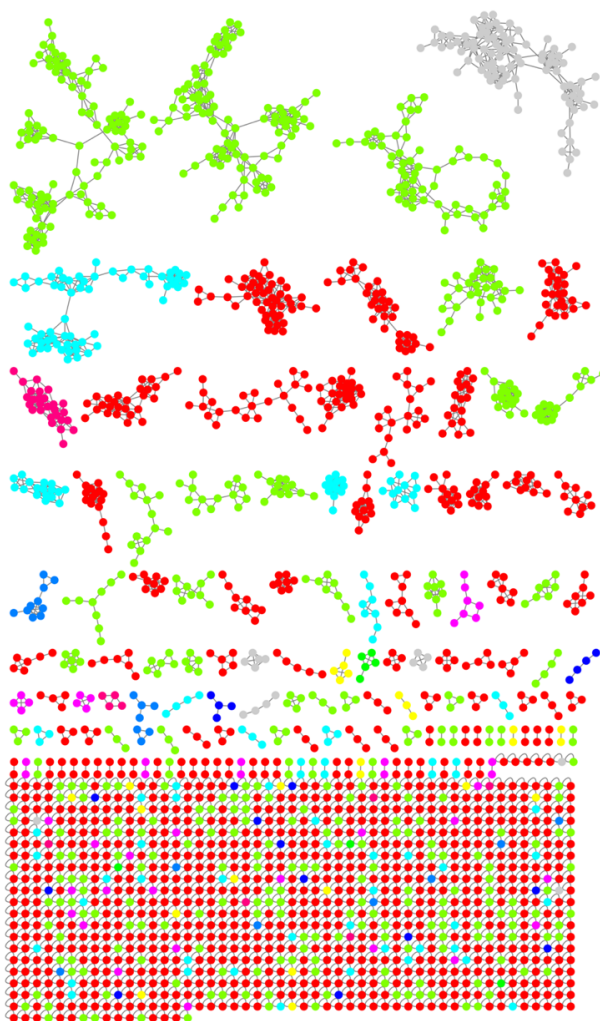


Figura 2. 7 – Rede molecular dos extratos das cepas *A. arcuatus*, *Radiococcus* sp., *S. bengalicum*, e *C. braunii* analisadas com o *MolNetEnhancer*, com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro), compostos organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lipídios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho).

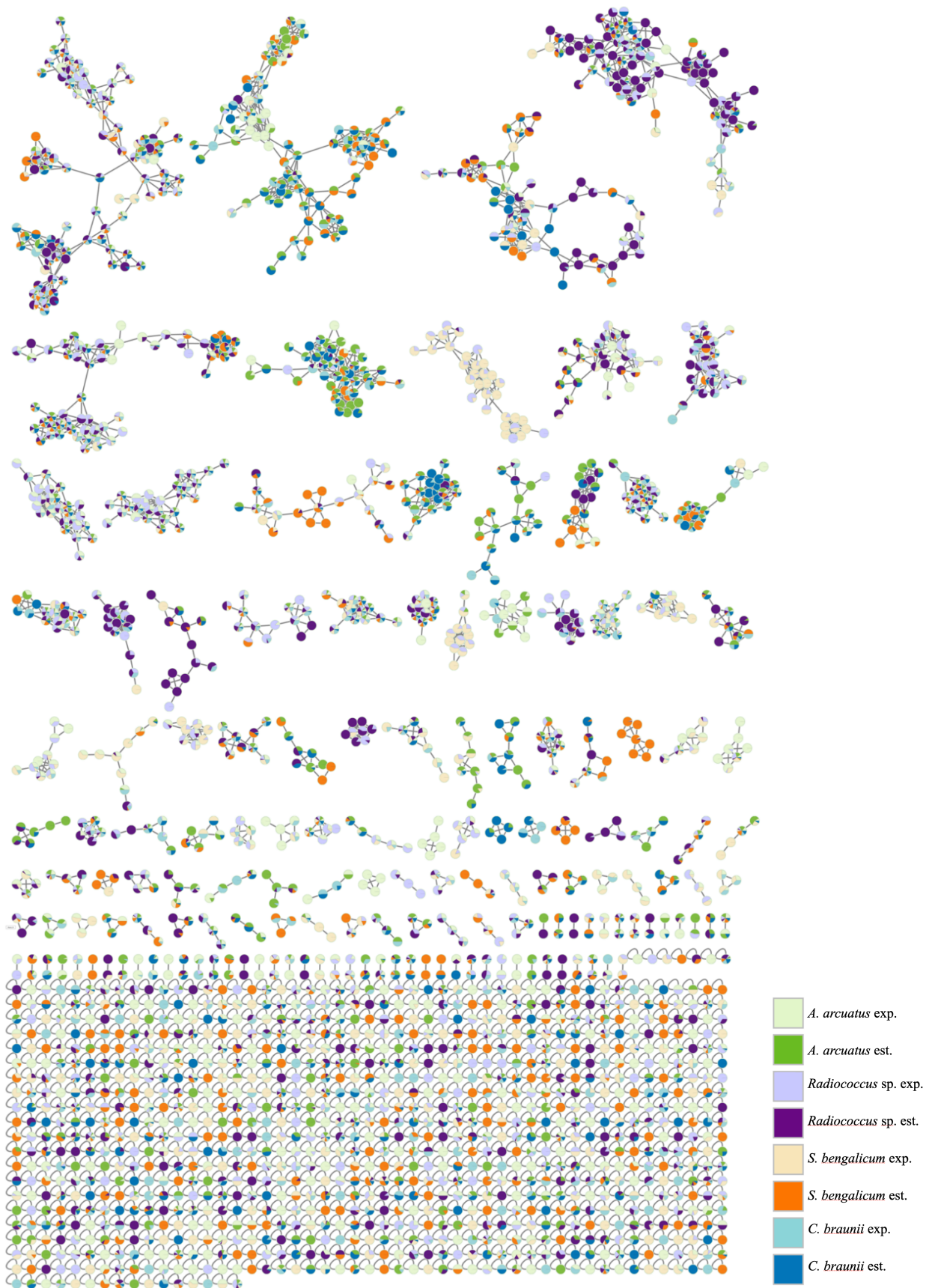


Figura 2. 8 – Rede molecular obtidas através de metadados, com destaque para as *features* (nodos) que foram encontradas para cada extrato de microalga na fase exponencial (exp. - cores claras) e na fase estacionária (est. - cores escuras), conforme a legenda.

A mesma rede mostrada na Figura 2. 7, foi recolorida na Figura 2. 8 para facilitar a observação das cepas e fases de crescimento que contribuíram com espectros consenso para a formação de cada nodo da rede molecular. A partir dessa rede molecular e do resultado da atividade antimicrobiana, que foram selecionados os clusters para desreplicação de possíveis metabolitos de interesse.

A partir dos dados dessa rede molecular que também foi possível extrair os dados do Diagrama de Euler da Figura 2. 9. A partir desse diagrama, podemos observar que 517 nodos representam espectros encontrados nas quatro cepas. Que as cepas *A. arcuatus*, *Radiococcus* sp. e *S. bengalicum* possuem número totais de nodos exclusivos muito próximos, 228, 229 e 227 respectivamente. E que *C. braunii* possui o menor número de nodos exclusivos (125).

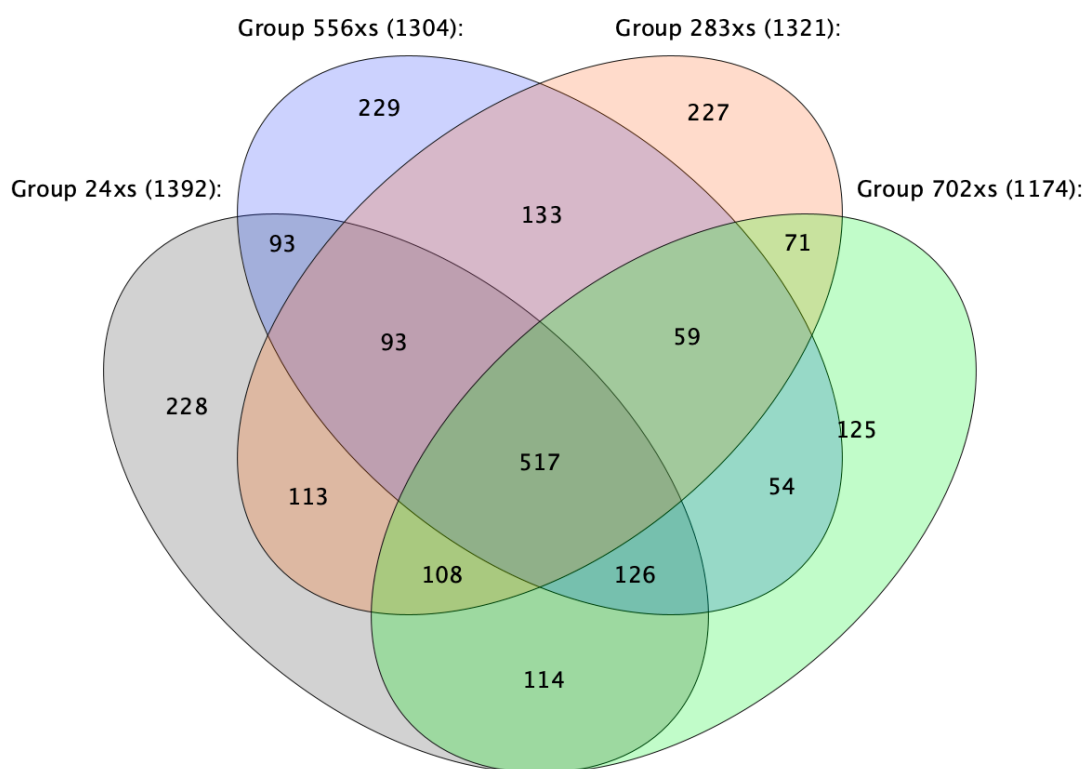


Figura 2. 9 - Diagrama de Euler com destaque para as cepas e o número de nodos que são compartilhados ou exclusivos para cada uma delas. 'XS' inclui tanto os metabólitos obtidos na fase exponencial, como na fase estacionária de crescimento. *A. arcuatus*, está representado pela cor cinza, *S. bengalicum* pela por roxa, *Radiococcus* sp. pela cor laranja e *C. braunii* pela cor verde.

A atividade antimicrobiana observada para a cepa de *Radiococcus* sp. pode ser devido a metabólitos exclusivos da mesma. Em um diagrama de Venn, poderíamos identificar os possíveis nodos de interesse como pode ser observado na Figura 2. 10. Esses mesmos 128 nodos exclusivos da *Radiococcus* sp, estão representados em azul na rede molecular da Figura 2. 11.

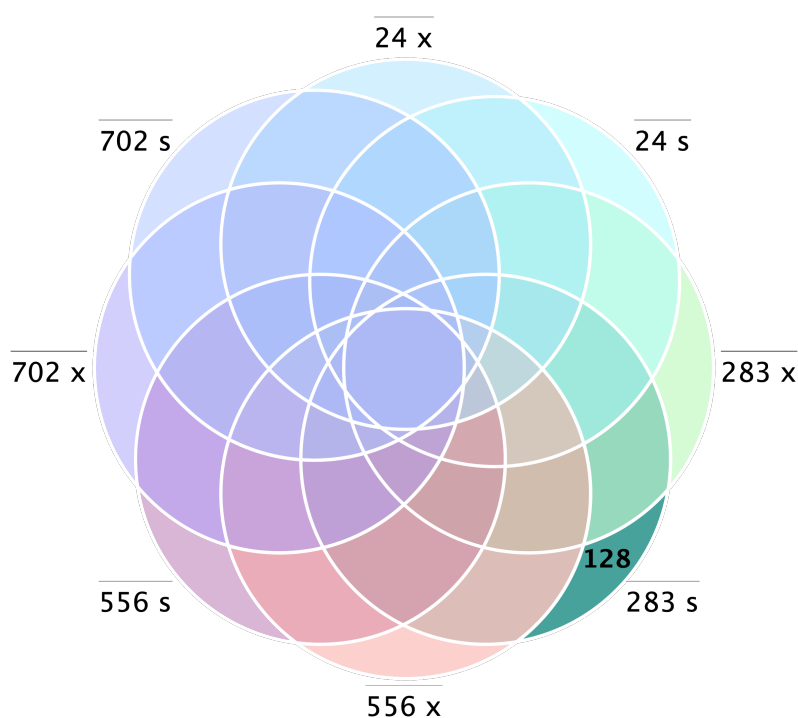


Figura 2. 10 - Diagrama de Venn, separando as quatro espécies de microalgas e suas duas fases de crescimento em 8 grupos distintos. Relembrando que os códigos para cada microalga são: CCMA-UFSCar 24 - *A. arcuatus*, CCMA-UFSCar 283 - *Radiococcus* sp., CCMA-UFSCar 556 - *S. bengalicum* e CCMA-UFSCar 702 *C. braunii*. E 'x' representa amostras da fase exponencial de crescimento, e 's', a fase estacionária.

Destacados na Figura 2. 11, podem ser observados os cluster escolhidos para desreplcação nesse trabalho. Esses clusters foram priorizados por possuírem *features* com espectros consenso detectados exclusivamente da cepa de *Radiococcus* sp. na fase estacionária de crescimento.

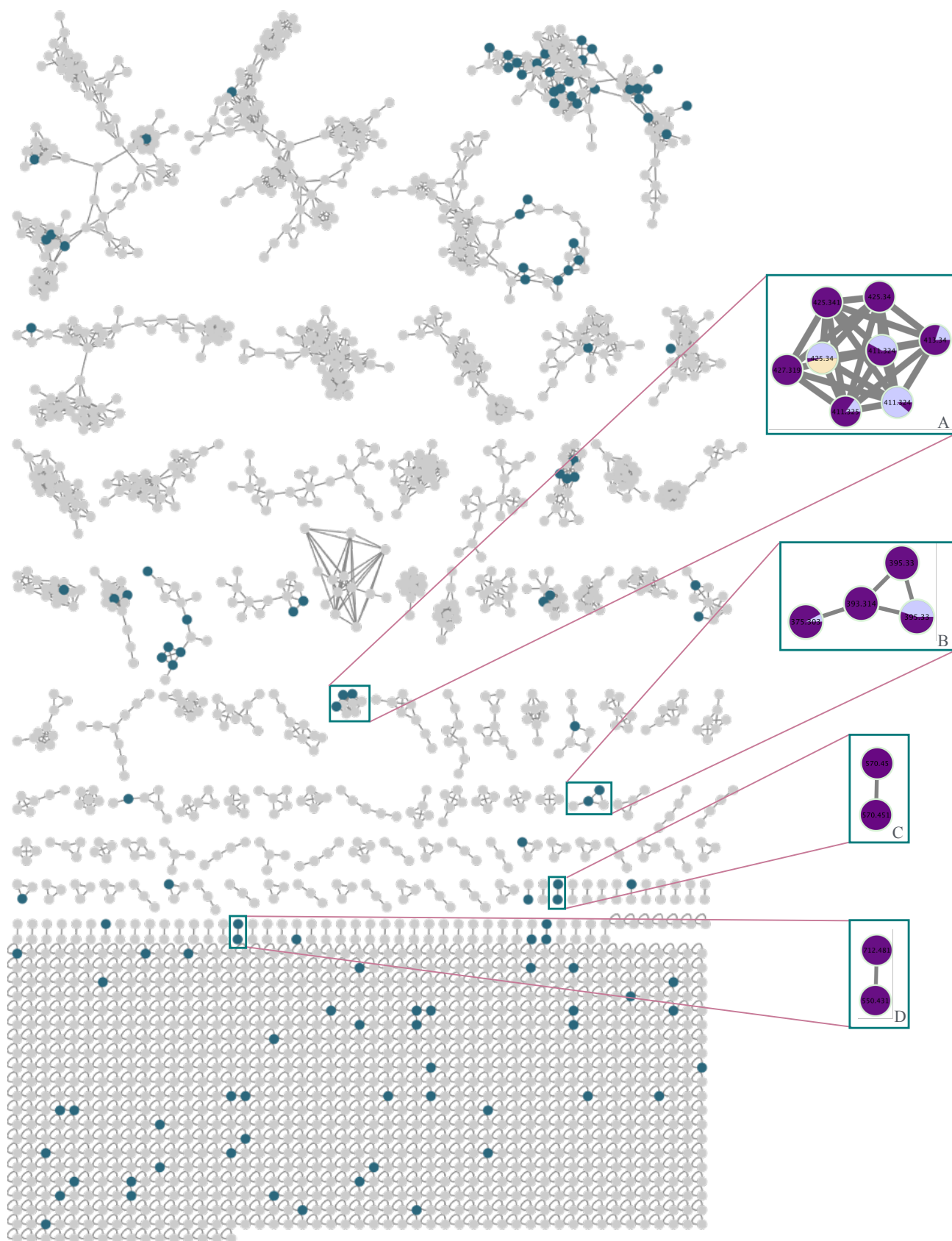


Figura 2. 11 – Rede molecular com destaque para os 128 nodos que são compostos por espectros consenso obtidos exclusivamente de amostras da espécie *Radiococcus* sp na fase estacionária de crescimento. Os clusters destacados foram escolhidos para desreplicação.

Após a seleção dos clusters e *features* de interesse, utilizamos a anotação do GNPS, as plataformas SIRIUS[®] e ChemCalc[®], para propor possíveis fórmulas moleculares e uma busca nas plataformas PubChem[®], Chemspider[®], [®], NPAtlas[®] e Dictionary of Natural Products[®] para desreplicação..

Para exemplificar o processo, iremos utilizar o composto Feoforbídeo *a*. Esse composto é derivado da degradação da clorofila *a*. Nesse processo, a molécula clorofila *a*. é oxidada e o átomo de magnésio é removido resultando no Feoforbídeo *a*, que pode ser detectado na espectrometria de massas. Sua fórmula molecular é C₃₅H₃₆N₄O₅, e sua massa monoisotópica 592,26857.

O GNPS reconheceu o Feoforbídeo *a* no cluster da Figura 2. 12. Essas *features* foram observadas em todas as espécies estudadas nesse trabalho.



Figura 2. 12 – Cluster com *features* anotadas como Feoforbídeo *a*.

A partir dessa anotação, é buscada a massa acurada nos dados brutos, e em seguida e comparado o padrão de fragmentação com o correspondente na biblioteca do GNPS, e comprovado com comparação da literatura que de fato, essa molécula corresponde ao Feoforbídeo *a*.

Na Figura 2. 13, é apresentado o cromatograma contendo os íons de *m/z* 593,3, os quais representam o íon molecular formado por uma molécula neutra (M) e um átomo de hidrogênio (H), resultando no íon positivo [M+H]⁺. Na mesma figura, são também exibidos o espectro de massas MS1 e o espectro de fragmentação MS2. No MS1, é possível observar a massa acurada dessa molécula, enquanto no MS2, é apresentado o padrão de fragmentação da molécula. Essas mesmas informações podem ser observadas na Figura 2. 14, em relação a feature de *m/z* 607,29.

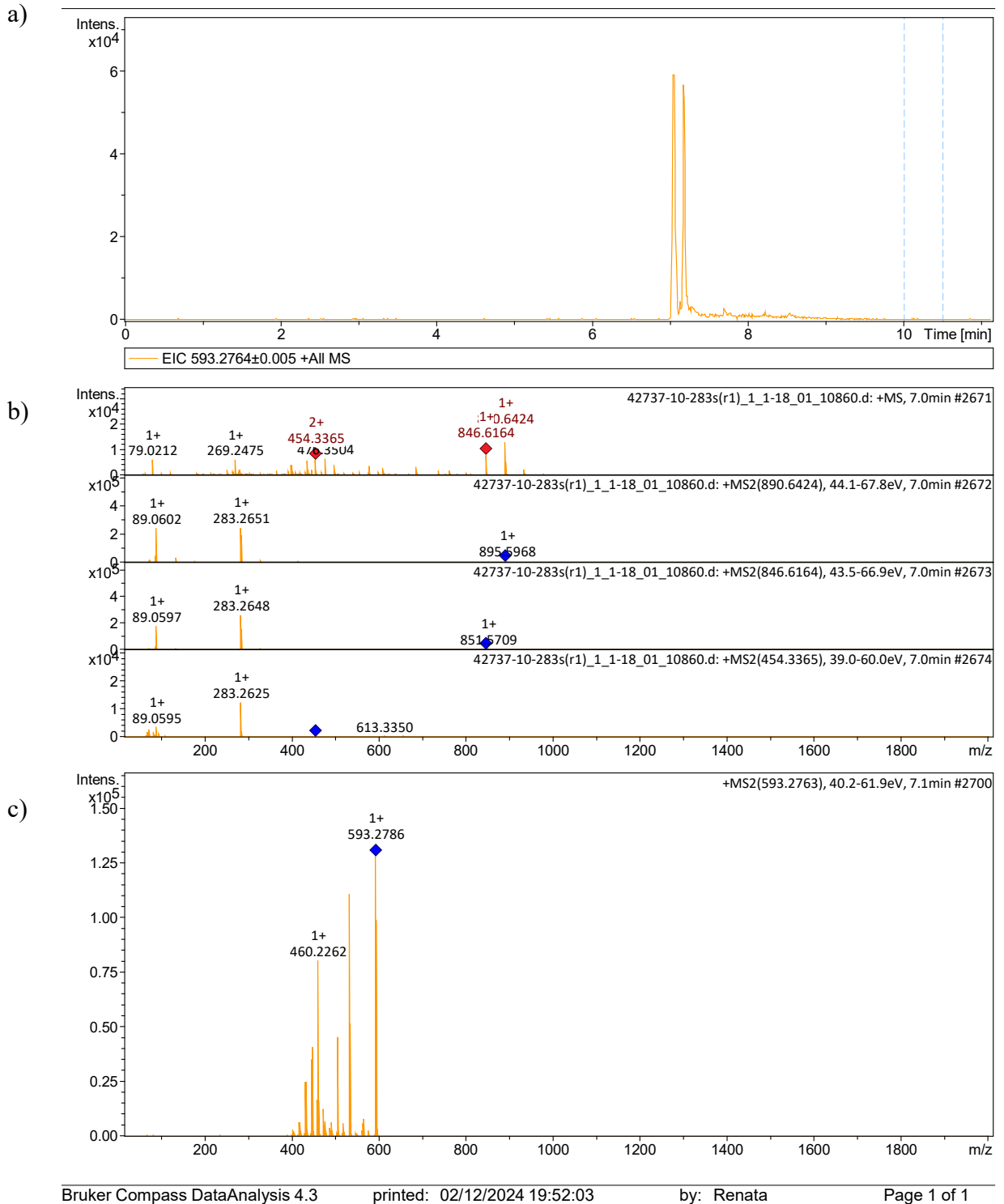


Figura 2. 13 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 593,2707.

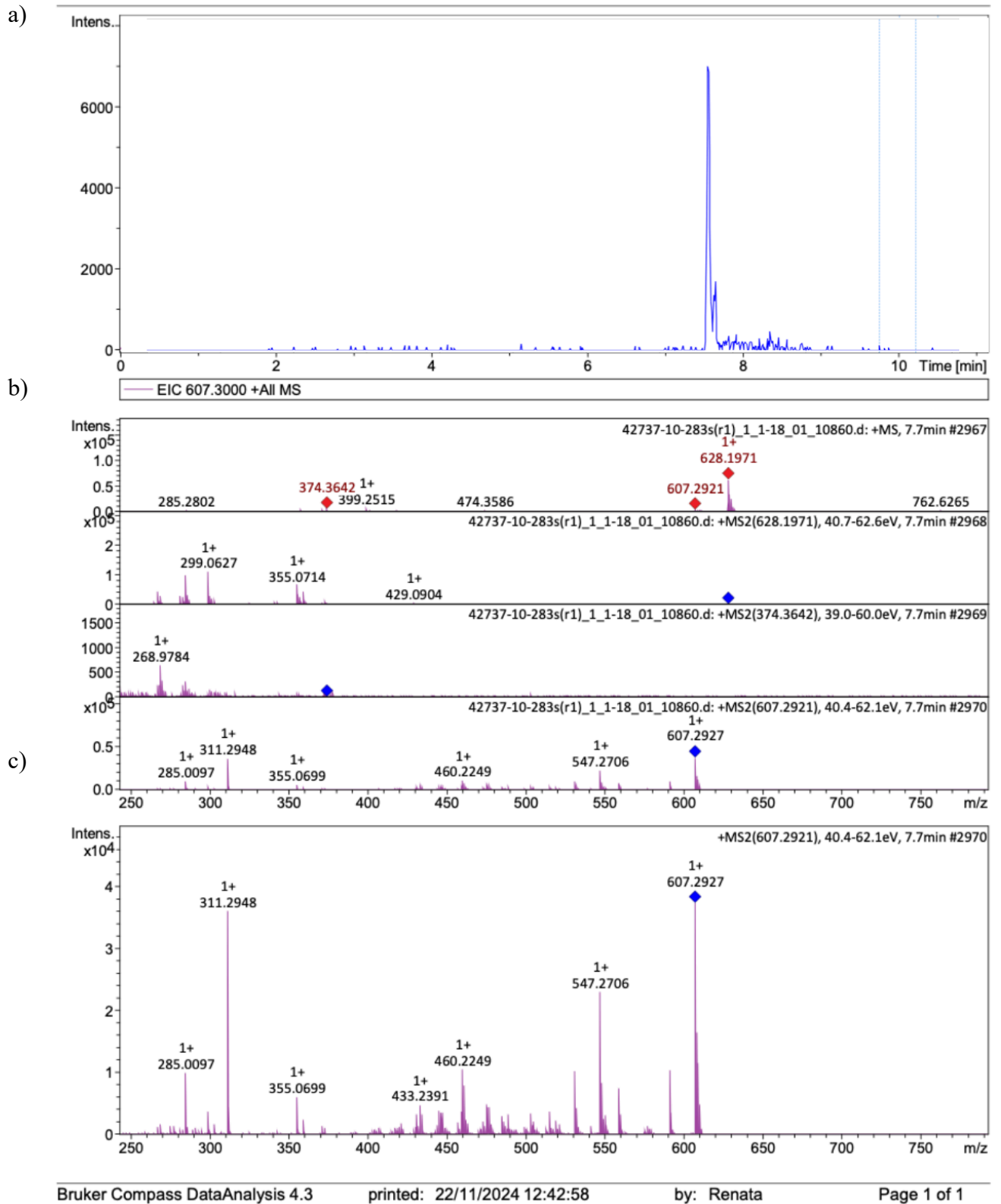


Figura 2. 14 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 607,29.

Caso, um dos compostos não tivesse *match* na biblioteca, uma outra forma que as redes moleculares nos permitem de determinar fórmulas químicas é através da propagação da anotação. No caso Feoforbídeo *a*, por exemplo, cuja m/z é 593, temos uma diferença exata de 14,0141, com a relação m/z 607 do outro nodo do cluster. A ferramenta *ChemCalc* indica que a diferença representa um CH₂ ou um N entre as duas moléculas. Verificando o erro de massa e sabendo que a fórmula química do feoforbídeo *a* é C₃₅H₃₆N₄O₅, podemos sugerir a fórmula da outra *feature* é C₃₆H₃₈N₄O₅. E ao buscarmos em bases de dados, pode comprovar que essa fórmula é consistente com o Metil feoforbídeo *a*, que é um derivado da clorofila *a*.

Como esses compostos já são conhecidos, podemos comparar o espectro obtido como o *match* obtido na biblioteca do GNPS (Figura 2. 15 e Figura 2. 16). A correspondência espectral automática GNPS foi feita com o composto “CCMSLIB00010128702 4.Phaeophorbide a”.

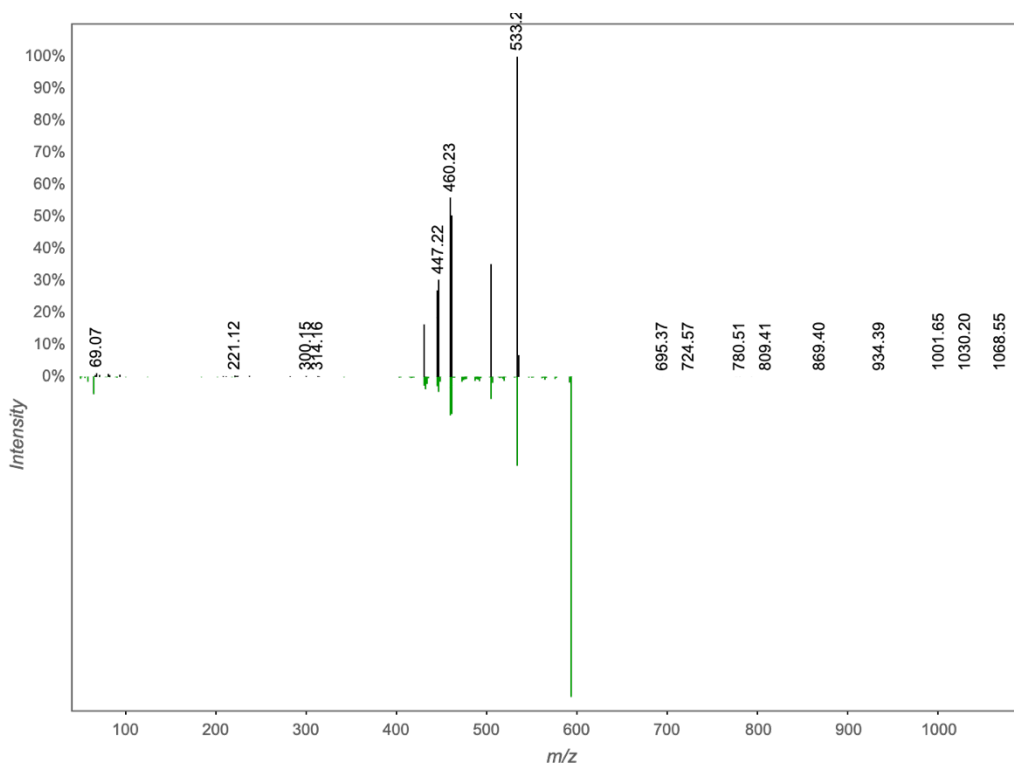


Figura 2. 15 – *Match* da biblioteca de espectros do GNPS com o composto que foi detectado na *Feature* 119654, de m/z 593,2551.

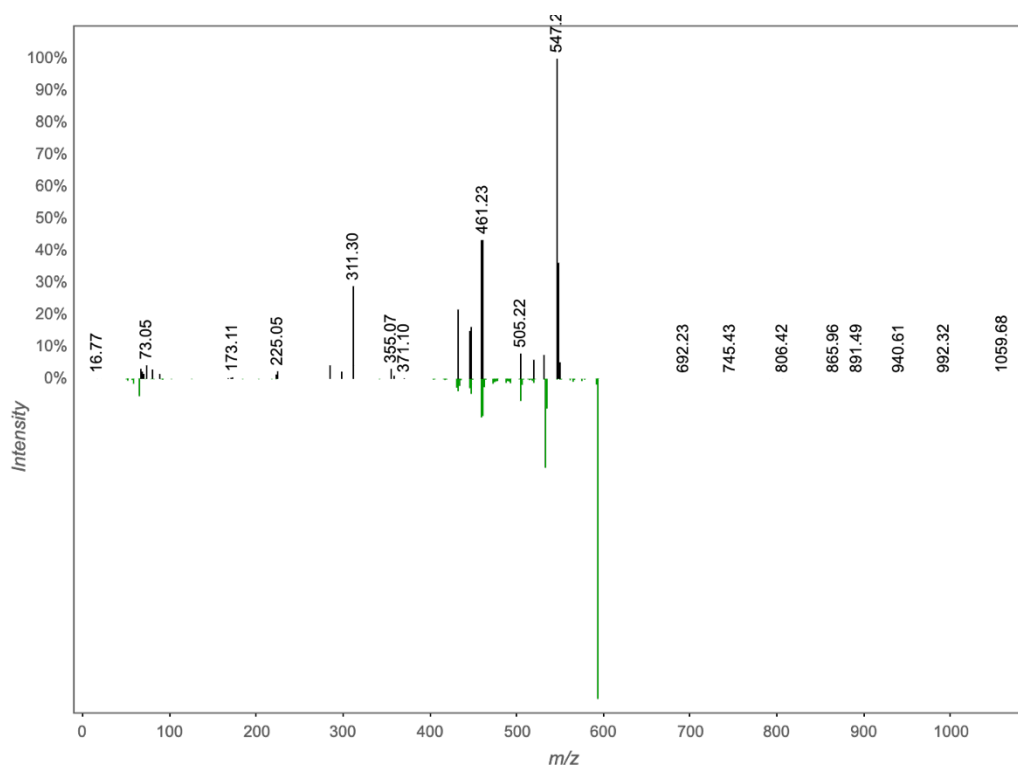


Figura 2. 16 - *Match* da biblioteca de espectros do GNPS com o composto que foi detectado na *Feature* 119726, de m/z 607,2921.

Caso esse composto não tivesse um *match* na biblioteca de espectros, poderia ser utilizado o software SIRIUS para realizar a predição da fórmula química. O SIRIUS requer os espectros MS1 e MS dessa determinada *feature*.

Temos para o cluster do feoforbídeo *a*, a anotação resumida na Tabela 2. 4.

Tabela 2. 4 – Anotação do Cluster contendo feoforbídeo *a*.

<i>Feature</i>	Tempo de retenção (min)	Massa acurada	Surperclasse	Fórmula	Adutos	Erro de massa	Anotação
<i>Feature</i> 119654	7,07	593,2707	Compostos organoheterocíclicos	$C_{35}H_{36}N_4O_5$	$[M+H]^+$	3,72	feoforbídeo <i>a</i>
<i>Feature</i> 119726	7,69	607,2921	Compostos organoheterocíclicos	$C_{36}H_{38}N_4O_5$	$[M+H]^+$	1,07	metil feoforbídeo <i>a</i>

A estrutura química do composto anotado, feoforbídeo *a*, pode ser observada na Figura 2.

17.

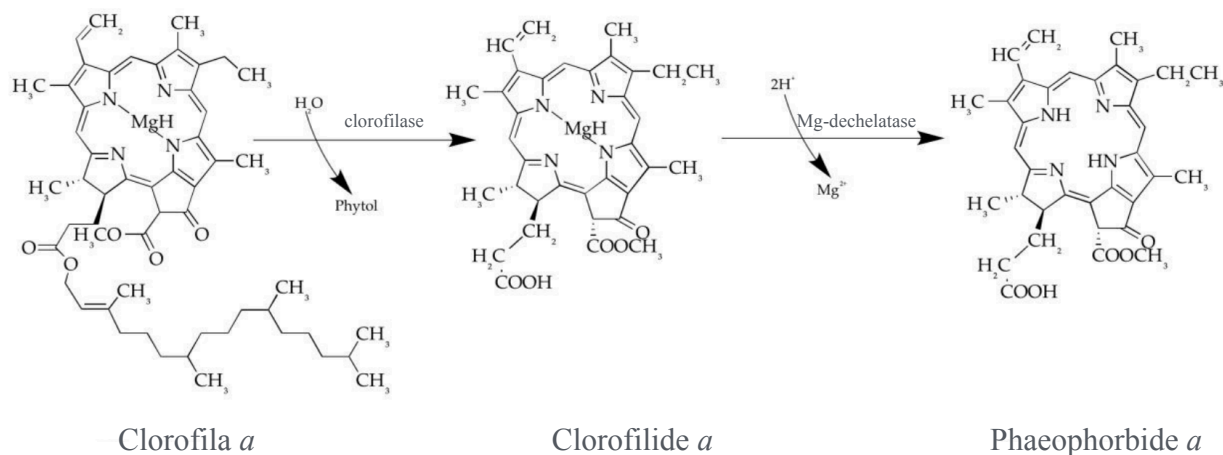


Figura 2. 17 – Degradação da clorofila *a* em feoforbídeo *a*. Adaptado de SAIDE; LAURITANO; IANORA, 2020.

Um processo semelhante ao que foi mostrado para o feoforbídeo *a* e o metil feoforbídeo *a*, foi realizado para cada um dos quatro clusters escolhidos devido a prevalência de *features* compostas majoritariamente por espectros obtidos da *Radiococcus* sp. na fase estacionária. Foi buscada a relação *m/z* de cada *feature*, seu tempo de retenção no cromatograma, se tiveram anotação automática pelo GNPS, e em seguida, analisado o perfil isotópico, o valor de massa acurado e o perfil de fragmentação gerados pelas análises de espectrometria para cada uma das *features* escolhidas de cada cluster.

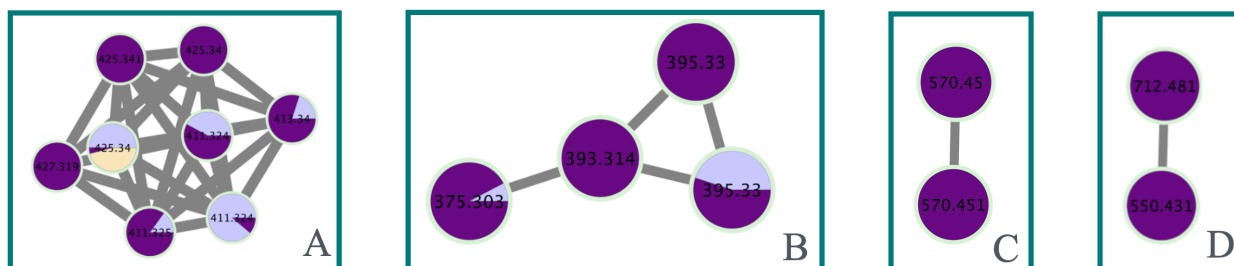


Figura 2. 18 – Clusters selecionados para desreplicação com base nas *features* provenientes majoritariamente de espectros da *Radiococcus* sp.

Tabela 2. 5 – Clusters desreplcados devido a atividade biológica.

Cluster A	<i>m/z</i>	Surperclasse	Subclasse	Classe do produto natural	Tempo de retenção	Erro de massa	Fórmula química proposta
<i>Feature</i> 117191	411,3255	Lipídeos e semelhantes	Diterpenóides	Meroterpenoide de quinona fenólica	7,24 min	-0,63 ppm	C ₂₈ H ₄₂ O ₂
<i>Feature</i> 117203	413,3414	Lipídeos e semelhantes	Diterpenóides	Meroterpenoide de quinona fenólica	7,46 min	-0,75 ppm	C ₂₈ H ₄₄ O ₂
<i>Feature</i> 117882	425,0226	Lipídeos e semelhantes	Diterpenóides	Meroterpenoide de quinona fenólica	7,56 min	-	-
<i>Feature</i> 117902	427,3190	Lipídeos e semelhantes	Diterpenóides	Meroterpenoide de quinona fenólica	6,73 min	-3,90 ppm	C ₂₈ H ₄₂ O ₃
Cluster B	<i>m/z</i>	Surperclasse	Subclasse	Classe do produto natural	Tempo de retenção	Erro de massa	Fórmula química proposta
<i>Feature</i> 106957	375,3046	Lipídeos e semelhantes	Triterpenoides	Vitamina D2 e derivados	6,89 min	-0,08 ppm	C ₂₈ H ₄₀ O
<i>Feature</i> 112437	393,3154	Lipídeos e semelhantes	Triterpenoides	Vitamina D2 e derivados	7,72 min	0,53 ppm	C ₂₈ H ₄₂ O ₂
<i>Feature</i> 112544	395,3328	Lipídeos e semelhantes	Triterpenoides	Vitamina D2 e derivados	7,22 min	4,95 ppm	C ₂₈ H ₄₄ O ₂
Cluster C	Massa acurada	Surperclasse	Subclasse	Classe do produto natural	Tempo de retenção	Erro de massa	Fórmula química proposta
<i>Feature</i> 119561	570,4521	Lipídeos e semelhantes	Ácido linoleico e derivados	Diacilglicerol	8,34 min	0,72 ppm	C ₃₄ H ₅₆ O ₄
<i>Feature</i> 119562	570,4487	Lipídeos e semelhantes	Ácido linoleico e derivados	Diacilglicerol	8,33 min	-0,25 ppm	C ₃₄ H ₅₆ O ₄
Cluster D	Massa acurada	Surperclasse	Subclasse	Classe do produto natural	Tempo de retenção	Erro de massa	Fórmula química proposta
<i>Feature</i> 119437	550,4435	-	-	-	6,59 min	-	-
<i>Feature</i> 120225	712,5011	-	-	-	5,93 min	-	-

O cluster A, escolhido para desreplicação, contém os nodos de m/z aproximada de 411, 413, 425 e 427, que tiveram tempos de retenção de 7,56 min, 6,89 min, 7,46 min e 6,73 min, respectivamente, as três *features* de menor massa foram anotadas automaticamente pelo GNPS como valactamina E putativa. Porém, ao compararmos os espectros obtidos com o a biblioteca do GNPS e com a literatura é possível observar que não se trata do mesmo composto. A ferramenta do GNPS, *MolNetEnhancer*, também não permitiu identificar a classe química dessas *features*.

A partir do tempo de retenção foi verificado o cromatograma de cada uma dessas *features*, que pode ser observado no item 'a' das Figura A. 11 a Figura A. 13. Sabendo o pico de eluição da das moléculas dessas *features*, foi possível verificar qual a massa acurada dos compostos eluido nos tempos de retenção especificados, como pode ser observado no espectrograma MS1 do item 'b' dessas mesmas figuras. E por último pode ser visualizado o espectro de fragmentação, MS2, desses compostos no item 'c'. Com essas informações é possível identificar qual o *scan* de cada espectro de fragmentação e utilizar o programa SIRIUS para a previsão de possíveis fórmulas químicas (Figura A. 14). A ferramenta CANOPUS classificou-as como moléculas da classe dos diterpenóides. E a fórmula molecular com a maior pontuação para a *feature* 117191 (49,99%) foi a fórmula $C_{28}H_{42}O_2$. Buscando no NP Atlas, a fórmula teve correspondentes em diversos compostos fúngicos, e no PubChem com compostos encontrados em plantas como *Amaranthus hybridus*, *Pisum sativum*, entre outros. Porém não foi possível encontrar nenhum composto de microalgas com essa fórmula molecular.

A *feature* 117882, de m/z 425, que faz parte desse cluster não foi possível de ser anotada com auxílio da ferramenta SIRIUS, nem pela anotação automática do GNPS. Com os dados desse experimento (Figura A. 13), não foi possível determinar o aduto, o que, nesse caso, impossibilitou a predição de uma fórmula química com confiabilidade.

Ainda sim, partir desses resultados, e do analisado para a *feature* 117203 (Figura A. 12), podemos sugerir a propagação da anotação para o cluster mostrada na Figura 2. 24.

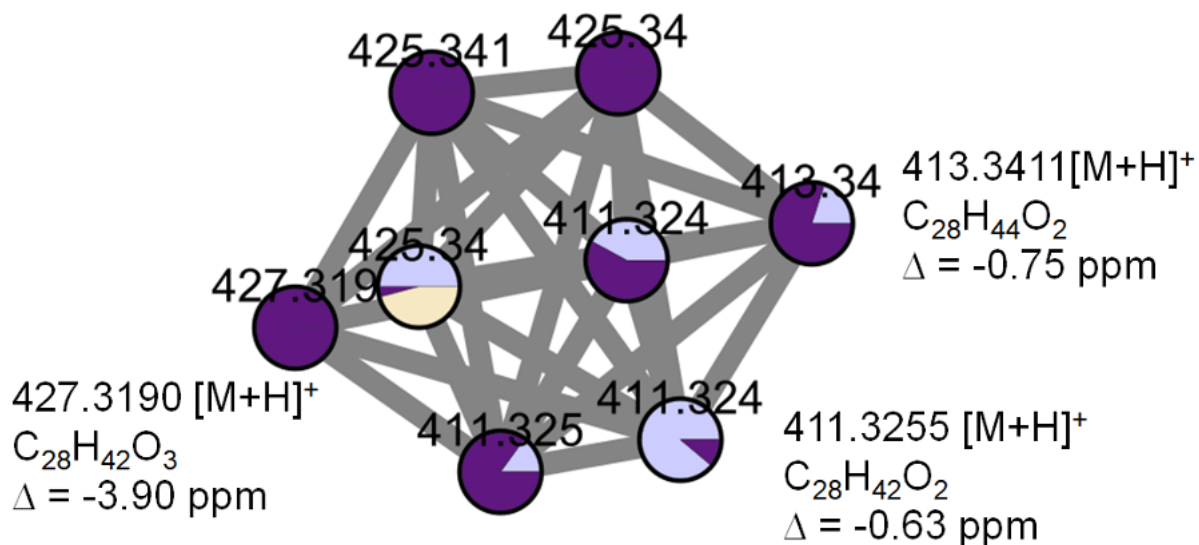


Figura 2. 19 – Cluster A. Os nodos exibem os valores de m/z para cada *feature*, as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ). Nodos não anotados foram considerados iguais aos anotados.

O cluster B, não possui nenhuma anotação automática pelo GNPS. A desrepleição utilizando o software SIRIUS (Figura A. 16) com base nos dados da *feature* 106957 (Figura A. 15) sugeriu um composto lipídico, da classe de lipídeo prenólicos, da subclasse triterpenoides. Como um produto natural esse composto foi incluso dentro da superclasse de esteroides e da subclasse vitamina D2 e derivados.

Microalgas possuem vitamina D2 e D3. A via metabólica da vitamina D em microalgas ainda não foi totalmente elucidada nesses microrganismos, mas é provável que aconteça através da exposição de provitaminas a luz solar. A diversidade do grupo de microalgas, e a grande variabilidade no conteúdo de esteróis, e a diferenças que podem ser esperadas entre espécies e localizações geográficas dificulta o esclarecimento dessa via metabólica (JÄPELT; JAKOBSEN, 2013). Mas já foi provado o papel dessas vitaminas como fotoprotetores. Num estudo realizado por ELIASON et al., 2024, foi comprovado que a microalga *Emiliania huxleyi* produz vitamina D2 e vitamina D3 em resposta a luz UV, e que a presença de vitamina D aumenta a performance fotossintética, enquanto reduz espécies reativas de oxigênio.

Considerando então que a *feature* 106957, de m/z 375,3046, é um composto semelhante à vitamina D2, podemos sugerir as fórmulas moleculares observadas na Figura 2. 20 e na Tabela 2.

5.

Considerando que a principal função da vitamina D em vertebrados é a manutenção da homeostase do cálcio e que há uma crescente conscientização sobre a sua importância para a saúde ideal, com sua insuficiência associada a um aumento no risco de hipertensão, doenças autoimunes, diabetes e câncer, torna-se particularmente relevante o fato de que as microalgas possam representar uma fonte potencial dessa vitamina, especialmente tendo em vista que poucas fontes alimentares contêm naturalmente essa substância (JÄPELT; JAKOBSEN, 2013).

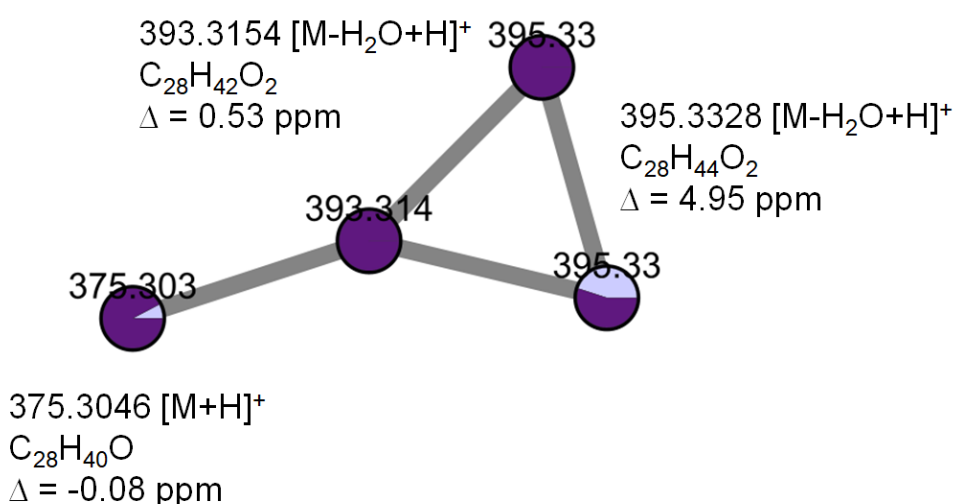


Figura 2. 20 – Cluster B. Os nodos exibem os valores de m/z para cada *feature*, as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ).

As *features* do cluster C foram anotadas automaticamente pelo GNPS como: composto orgânico, lipídios e semelhantes, lipídios prenólicos, triterpenoides, compostos heterocíclicos alifáticos e de fórmula química $C_{30}H_{46}O_3$. No entanto, ao realizar a análise do espectro de correspondência (*match*), foi possível observar que o composto identificado não corresponde àquele indicado inicialmente. Utilizando os dados dos espectros representados na Figura A. 20, a ferramenta SIRIUS[®] apoia a anotação de lipídeos para a *feature* 119561, porém sugeriu que se trata de um ácido linoleico e derivados, de fórmula química $C_{34}H_{56}O_4$ (Figura A. 23). Considerando que se tratam de lipídios, é compreensível que esses dados apresentem desafios adicionais para análise nas ferramentas utilizadas.

Analisando os dados das *features* 119561 e 119562 (Figura A. 20 e Figura A. 21), podemos notar que elas são eluidas no mesmo pico da cromatografia, mas que possuem no espectro de fragmentação algumas diferenças, os espectros de fragmentação foram ampliados na Figura A. 22.

O cluster D, escolhido para desreplicação, contém os nodos de m/z 550,431 e 712,481 tiveram um tempo de retenção de 6,59 min e 5,93 min, respectivamente, nenhum desses nodos foi anotado automaticamente pelo GNPS. A partir do tempo de retenção foi verificado o cromatograma de cada uma dessas *features*, o espectrograma MS1 e MS2, como o observado nas Figura A. 24 e Figura A. 25. Com essas informações utilizamos o programa SIRIUS para a previsão de possíveis fórmulas químicas, porém essas informações não foram suficientes para que o programa gerasse fórmulas consistentes (Figura A. 26).

Embora não tenha sido possível, sugerir fórmulas químicas para essas *features*, podemos afirmar que a *feature* 120225, é um composto glicosilado. Isso é possível porque a diferença entre as massas exatas dessas duas *features* é de m/z 162,0378, um valor referente à perda neutra de um resíduo de glicose ($C_6H_{12}O_6$), indicando que essa diferença é atribuída à perda de uma glicose nos processos de fragmentação, indicando que se trata portanto de composto glicosilado, como, por exemplo, glicolipídios ou glicoproteínas. Microalgas também são produtoras de glicoconjugados, moléculas de baixo peso molecular, como glicerol e esfingoglicolipídios, entre outros. Essas moléculas são essenciais para comunicação intra e extracelular, tendo influência em importante funções biológicas, como fluidez e permeabilidade das membranas, estímulo a apoptose e defesa contra predadores (DUBEY et al., 2023; STONIK; STONIK, 2023). Por essa razão, essas *features* são potenciais compostos de interesses.

INVESTIGAÇÃO DOS METABÓLITOS – POTENCIAIS COMPOSTOS DE INTERESSE

OBJETIVOS

Buscando desreplicar também *features* de potenciais compostos de interesse devido à exclusividade do cluster em relação ao extrato da cepa no qual foi detectado, e em relação à identificação automática do GNPS, objetivamos:

- 1) Utilizar o extrato obtido a partir do cultivo de quatro microalgas brasileiras - *Ankistrodesmus arcuatus*, *Radiococcus* sp., *Sorastrum bengalicum* e *Chlorolobion braunii*, nas fases exponenciais e estacionárias de crescimento - e analisados por LC-MS/MS para estudo metabolômico guiado por:
 - a. exclusividade química
 - b. anotação automática do GNPS

RESULTADO E DISCUSSÃO

ESPECTROMETRIA DE MASSAS E METABOLÔMICA

A partir da análise da rede molecular obtida com as 4 cepas de microalgas, e buscando compostos inéditos, foram selecionados 2 clusters para desreplicação devido à exclusividade química - Figura 2. 21.

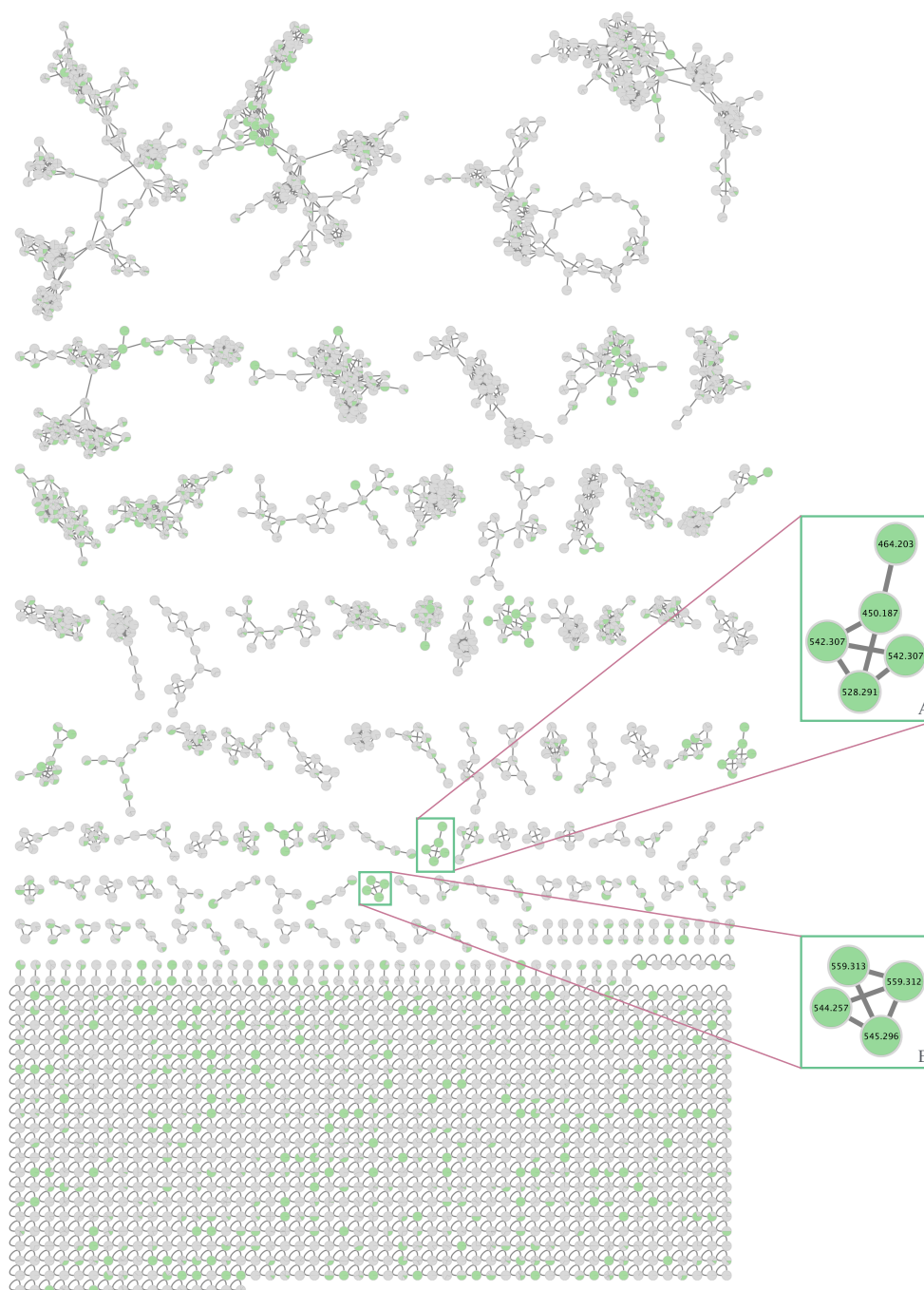


Figura 2. 21- Clusters selecionados para desreplicação devido a exclusividade química da cepa de *A. arcuatus* na fase exponencial de crescimento.

Os clusters A e B, que foram escolhidos por serem formados a partir de espectros obtidos da cepa *A. arcuatus*. Essa linhagem foi a que apresentou a maior quantidade de *features* exclusivas (Figura 2. 5) em uma determinada fase de crescimento, nesse caso, na fase exponencial de crescimento.

Esses clusters foram analisados da mesma forma descrita anteriormente e os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 2. 6.

Tabela 2. 6 – Clusters desreplcados devido a exclusividade química para a cepa de *A. arcuatus* na fase exponencial de crescimento.

Cluster A	<i>m/z</i>	Surperclasse	Subclasse	Classe do produto natural	Tempo de retenção	Erro de massa	Fórmula química proposta
<i>Feature</i> 118310	450,1879	-	-	-	2,63 min	-	-
<i>Feature</i> 118513	464,2029	Benzeno e derivados substituídos	Ésteres do ácido benzoico	Alcaloide	3,10 min	0,34 ppm	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₈
<i>Feature</i> 119386	542,3080	Benzeno e derivados substituídos	Ésteres do ácido benzoico	Alcaloide	3,32 min (3,10 - 3,71)	-	C ₂₅ H ₃₉ N ₃ O ₈
<i>Feature</i> 119387	542,3080	Benzeno e derivados substituídos	Ésteres do ácido benzoico	Alcaloide	3,10 min	1,46 ppm	C ₂₅ H ₃₉ N ₃ O ₈
<i>Feature</i> 119264	528,2910	Benzeno e derivados substituídos	Ésteres do ácido benzoico	Alcaloide	2,84 min	-1,06 ppm	C ₂₅ H ₃₉ N ₃ O ₈
Cluster B	Massa acurada	Surperclasse	Subclasse	Classe do produto natural	Tempo de retenção	Erro de massa	Fórmula química proposta
<i>Feature</i> 119394	544,2544	Ácido carboxílico e derivados	Aminoácidos, peptídeos. e análogos		3,67 min	0,35 ppm	C ₃₀ H ₃₉ N ₃ O ₄
<i>Feature</i> 119396	545,2962	Ácido carboxílico e derivado	Aminoácidos, peptídeos. e análogos		3,85 min	-4,68 ppm	C ₂₈ H ₄₆ N ₂ O ₆
<i>Feature</i> 119506	559,3134	Ácido carboxílico e derivado	Aminoácidos, peptídeos. e análogos		3,84 min	1,06 ppm	C ₂₉ H ₄₈ N ₂ O ₆
<i>Feature</i> 119507	559,3134	Ácido carboxílico e derivado	Aminoácidos, peptídeos. e análogos		3,40 min	-1,79 ppm	C ₂₉ H ₄₈ N ₂ O ₆

Em relação ao cluster A, todos os nodos tiveram a mesma anotação automática em relação a classe química: benzenóides. Porém as correspondências espectrais do GNPS em relação as moléculas não são correspondências exatas. Aprofundando a análise dos cromatogramas e espectrogramas (Figura A. 27 a Figura A. 29), constatamos que a *feature* 118310 é na realidade um artefato da análise, e que não representa de fato um espectro consenso obtido a partir da fragmentação de um metabolito algal (não existe um pico no cromatograma relativo a esse suposto composto na Figura A. 27). Com base nos dados das demais *features*, utilizamos o *software* SIRIUS, o qual corroborou com identificação dos espectros desse clusters, como provenientes de benzenóides Figura A. 30. Os dados gerados nesta análise não possibilitaram a identificação de adutos, dificultando a confirmação das fórmulas químicas sugeridas. No entanto, a anotação proposta pelo SIRIUS e sua propagação estão representadas na Figura 2. 1.

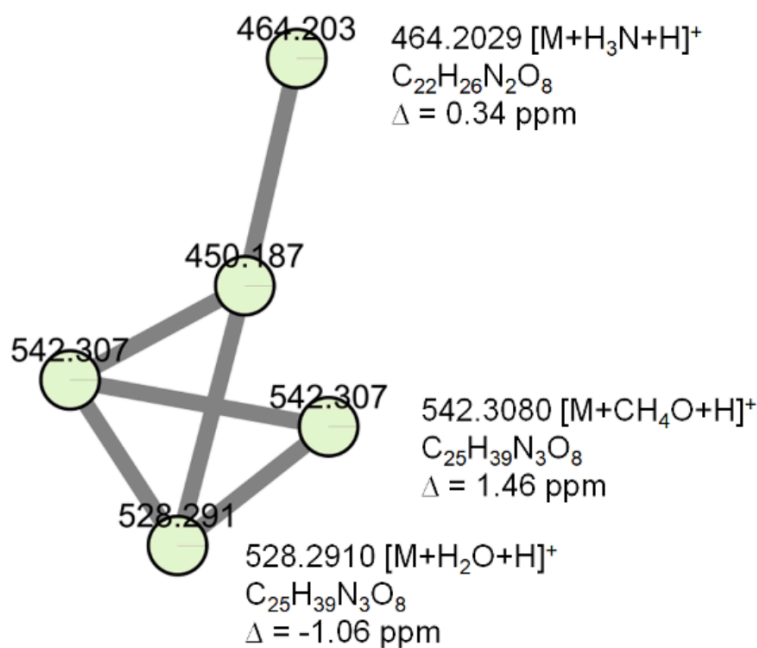


Figura 2. 22 – Cluster A. Os nodos exibem os valores de m/z para cada *feature*, as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ).

Para o cluster B, os cromatogramas e espectros dos nodos de m/z 544 e 559, podem ser observados nas Figura A. 31 Figura A. 32. O GNPS anotou, através da ferramenta do MolNetEnhancer, as *features* desse cluster como Esteroides e derivados. E em relação a *matches* espectrais, apenas um nodo teve um *match*, e o composto sugerido é encontrado apenas em mamíferos. Isso indica que provavelmente a identificação da classe química desse cluster é a

indicada pelo SIRIUS, de que esses compostos são parte da classe “Ácido carboxílico e derivados”, e subclasse “Aminoácidos, peptídeos. e análogos” (Figura A. 33).

A propagação da anotação desse cluster pode ser observada na Figura 2. 23:

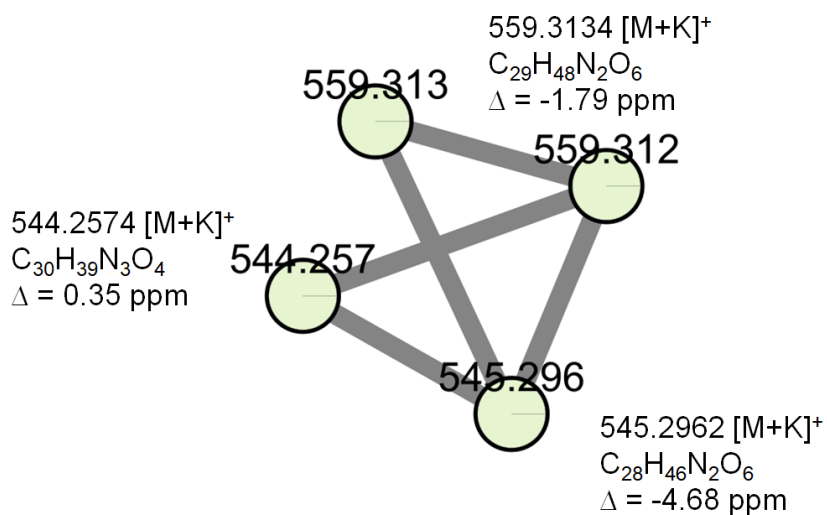


Figura 2. 23 – Cluster B. Os nodos exibem os valores de *m/z* para cada *feature*, as anotações das fórmulas moleculares propostas e o erro de massa calculado (Δ).

Além dos clusters, acima discutidos, também escolhemos por desreplicar, o cluster da Figura 2. 24, pois o GNPS fez a anotação automática de uma das *features* como um canabinol.

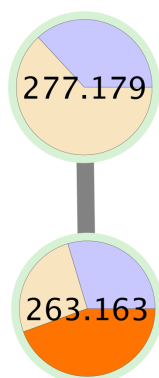


Figura 2. 24 - Cluster inicialmente reconhecido como canabinol.

Na Figura 2. 25, podemos observar a anotação automática do GNPS, e nas Figura 2. 26 e Figura 2. 27, o espectro que foi considerado *match* pelo GNPS. E na Tabela 2. 7, o resumo das informações dessas *features*.

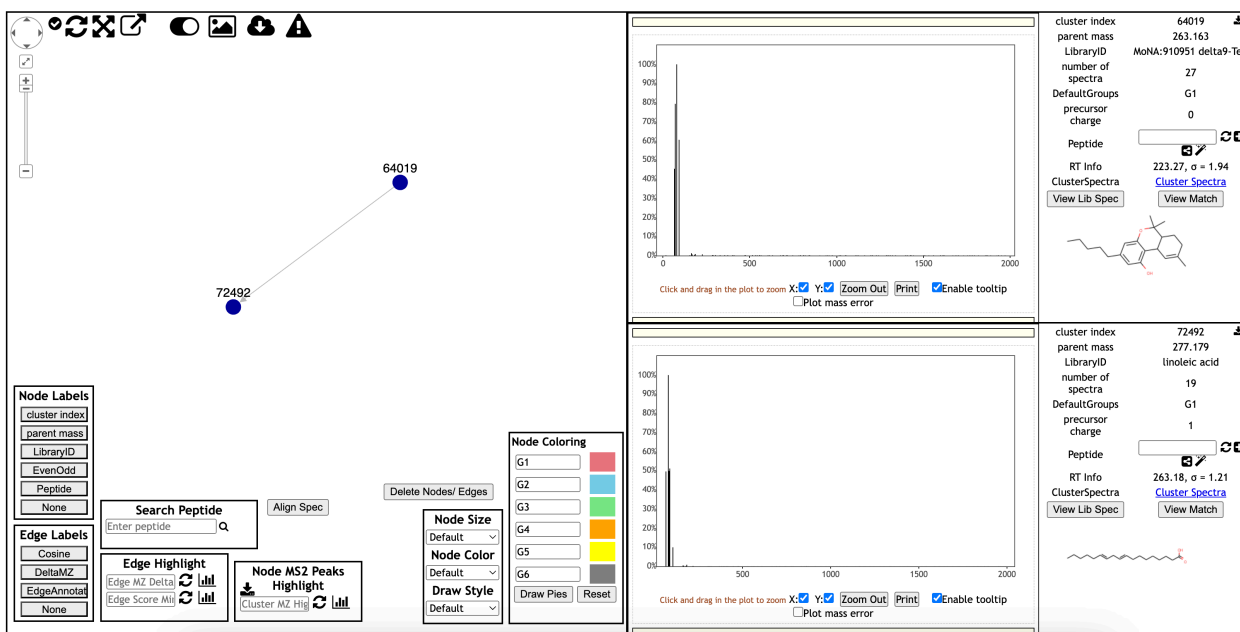


Figura 2. 25 – Anotação automática do GNPS.

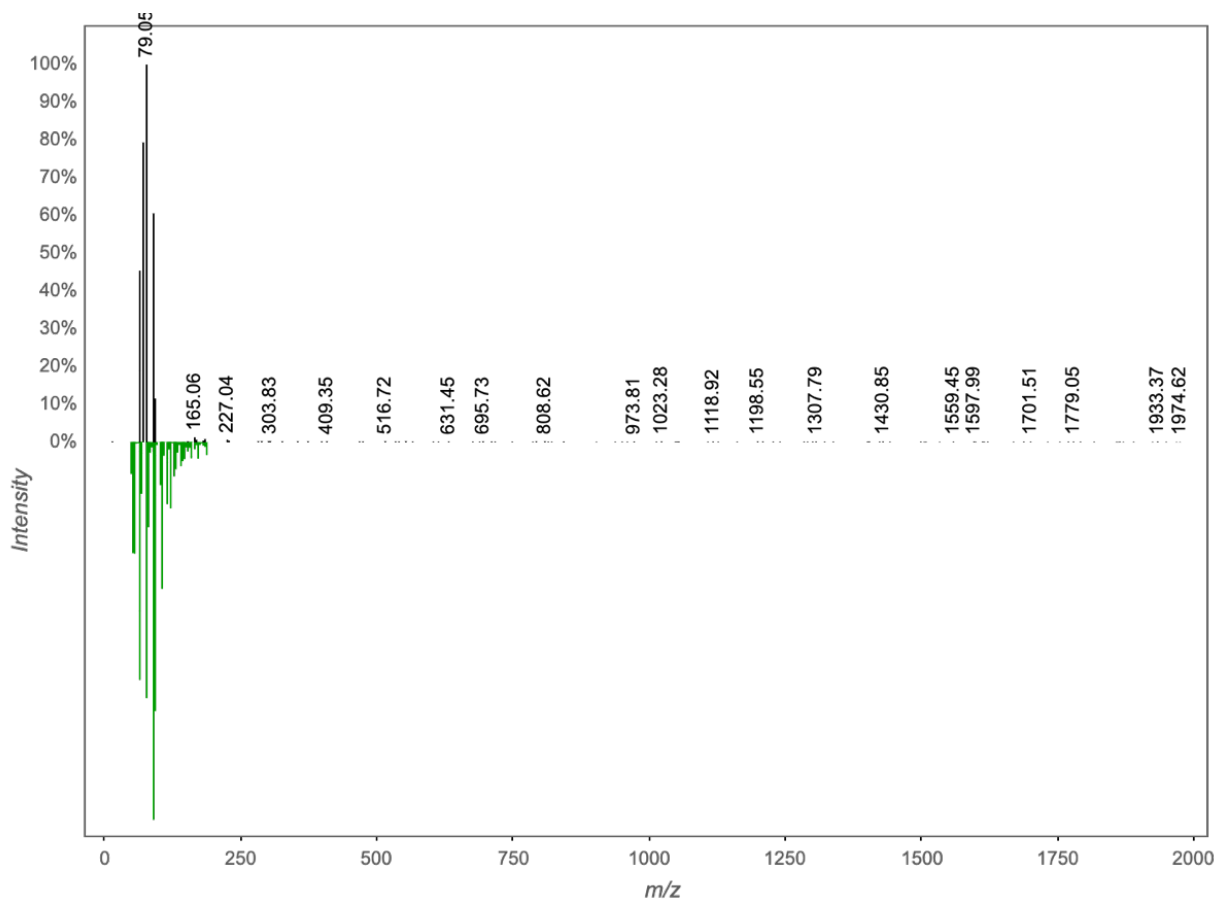


Figura 2. 26 – Espectro considerado correspondente para a *Feature* 64019.

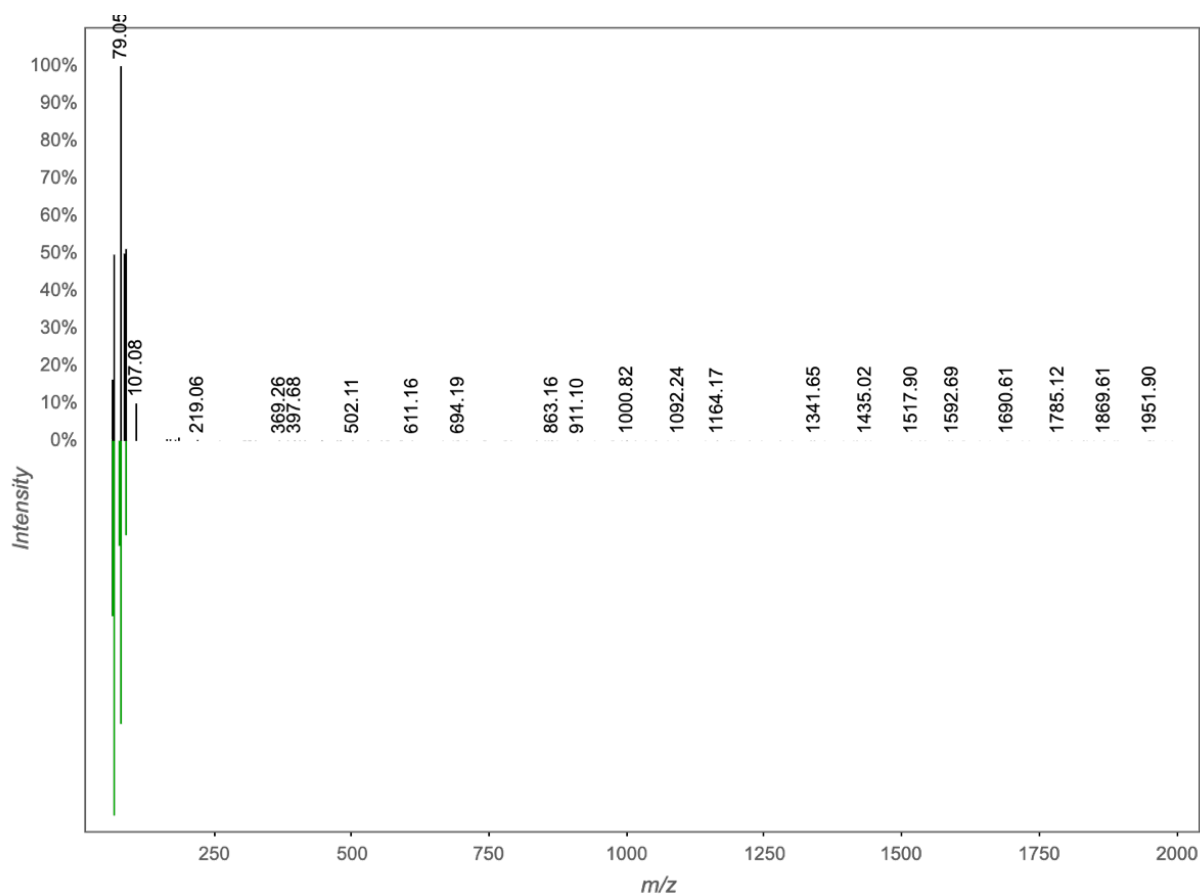


Figura 2. 27 – Espectro considerado correspondente para a *Feature 72492*.

Tabela 2. 7 – Tetrahydrocannabinol

	Massa acurada	Surperclasse	Classe do produto natural	Tempo de retenção	Erro de massa	Fórmula química proposta
<i>Feature 64019</i>	263.1637	Lipídeos e semelhantes	Ácidos graxos-	4,39 min	5.28 ppm	C ₁₄ H ₂₄ O ₃
<i>Feature 72492</i>	277,1796	Lipídeos e semelhantes	Ácidos graxos-	4,62 min	-	-

Ao comparar esses espectros podemos notar que a correspondência da *feature 72492*, com um ácido linoleico, é significativamente maior que a que a correspondência com a *feature 64019*, que foi considerada um delta9-tetrahydrocannabinol. Comparando com espectros de massas desse canabinol na literatura, podemos notar também que os picos característicos de fragmentação não estão presentes, indicando que na realidade de trata de outro composto lipídico, anotado corretamente pelo SIRIUS (Figura A. 36).

CONCLUSÕES

A espécie *A. arcuatus* apresentou o maior número de *features* diferentes na fase exponencial de crescimento.

A espécie *S. bengalicum* apresentou a maior distinção de metabolitos entre as fases exponencial e estacionaria de crescimento, enquanto a *C. braunii* apresentou a maior semelhança.

As quatro linhagens apresentaram o maior número de *features* reconhecidas como parte da classe química “Lipídios e semelhantes”. Destacando a importante as microalgas como possíveis nutracêuticos ou fontes de biocombustíveis.

Os nossos dados indicam que, para a descoberta de novas moléculas, a fase de crescimento exerce influência sobre o número de *features* para cada espécie.

A desreplicação guiada por atividade indicou possíveis *features* que podem ser compostos de interesse, e com uma análise técnica adicional, podem levar a fórmulas químicas inéditas.

Como resultados desse bioprospecção a cepa que apresentou a maior potência para ter metabolitos com atividades antimicrobianas foi a *Radiococcus* sp.

A. arcuatus possui os metabolitos mais distintos, e pode ter atividades ainda não testadas e descritas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (CCATES), C. C. do S. **Programa de apoio ao desenvolvimento institucional do SUS - Brentuximabe vedotina**. Belo horizonte.
- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013.
- ALMEIDA, D. F. L. dos S. **Estudo das Vias Metabólicas das Plantas na Síntese de Pigmentos Naturais**. 2017. Universidade Fernando Pessoa, [s. l.], 2017.
- ALVES, F. R. R.; GAMA, W. A.; DE NOGUEIRA, I. S. Planktonic Radiococcaceae Fott ex Komárek of the Tigres Lake system, Britânia, Goiás State, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 519–530, 2014.
- ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. [s.l.] : Elsevier Academic Press, 2005.
- BARKIA, I.; SAARI, N.; MANNING, S. R. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. **Marine Drugs**, [s. l.], p. 1–29, 2019.
- BILAL, M.; RASHEED, T.; AHMED, I.; IQBAL, H. M. N. High-value compounds from microalgae with industrial exploitability - A review. **Frontiers in Bioscience - Scholar**, [s. l.], v. 9, p. 319–342, 2017.
- Biodiversidade e Biomas**. 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade-e-biomas>>.
- BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 743–756, 2013.
- CELEWICZ, S.; KOZAK, A.; KUCZYŃSKA-KIPPEN, N. Chlorophytes response to habitat complexity and human disturbance in the catchment of small and shallow aquatic systems. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–13, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-17093-3>>
- CHAMBERS, M. C.; MACLEAN, B.; BURKE, R.; AMODEI, D.; RUDERMAN, D. L.; NEUMANN, S.; GATTO, L.; FISCHER, B.; PRATT, B.; EGERTSON, A.; HOFF, K.; KESSNER, D.; TASMAN, N.; SHULMAN, N.; B, D. L. T.; MALLICK, P. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **nature biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 10, 2012.
- CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELAO, M. D. G. G. Growth and biochemical composition

of *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 85, n. 4, p. 1427–1438, 2013.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, [s. l.], v. 432, n. 7019, p. 829–837, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 34. ed. [s.l: s.n.].

CORTESE, M.; GIGLIOBIANCO, M. R.; MAGNONI, F.; CENSI, R.; MARTINO, P. Di. Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. **Molecules**, [s. l.], v. 25, p. 3047, 2020.

COVINGTON, B. C.; MCLEAN, J. A.; BACHMANN, B. O. Comparative mass spectrometry-based metabolomics strategies for the investigation of microbial secondary metabolites. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 6–24, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C6NP00048G>>

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>>

CRNKOVIC, C. M.; DÖRR, F. Espectrometria de massas aplicada à análise de metabólitos naturais - instrumentação analítica e metabolômica. In: “SEMINÁRIOS LIVRES DA COMISSÃO DE PESQUISA” 2020, São Paulo. **Anais...** São Paulo

CRNKOVIC, C. M.; MAY, D. S.; ORJALA, J. The impact of culture conditions on growth and metabolomic profiles of freshwater cyanobacteria. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 375–384, 2018.

CRNKOVIC, C. M.; SILVA, F. H. S.; AMORIM, H. M. M. Prospecção de metabólitos secundários bioativos. In: FIAMONCINI, J.; DEMARQUE, D. P.; CRNKOVIC, C. M. (Eds.). **Fitoquímicos em alimentos, fármacos e medicamentos**. Santana de PArnaíba: Manole, 2023. p. 238–261.

DA SILVA, T. G.; BOCK, C.; SANT’ANNA, C. L.; BAGATINI, I. L.; WODNIOK, S.; VIEIRA, A. A. H. Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): RbcL, 18s rDNA and ITS–2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. **Fottea**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–19, 2017.

DARIENKO, T.; GUSTAVS, L.; EGGERT, A.; WOLF, W.; PRÖSCHOLD, T. Evaluating the species boundaries of green microalgae (Coccomyxa, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1–31, 2015.

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 299–315, 2015.

DELAZARI-BARROSO, A.; SANT'ANNA, C. L.; SENNA, P. A. C. Phytoplankton from Duas Bocas Reservoir, Espírito Santo State, Brazil (except diatoms). **Hoehnea**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 211–229, 2007.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 303–336, 2012.

DJUKOVIC, D.; RAFTERY, D.; GOWDA, N. Chapter 16 - Mass spectrometry and NMR spectroscopy based quantitative metabolomics. In: **Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery**. 2. ed. Seattle: Elsevier Inc., 2019. p. 289–311.

DUBEY, K. K.; KUMAR, A.; BALDIA, A.; RAJPUT, D.; KATERIYA, S.; SINGH, R.; NIKITA; TANDON, R.; MISHRA, Y. K. Biomanufacturing of glycosylated antibodies: Challenges, solutions, and future prospects. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 69, n. September, p. 108267, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108267>>

DÜHRKOP, K.; FLEISCHAUER, M.; LUDWIG, M.; AKSENOV, A. A.; MELNIK, A. V.; MEUSEL, M.; DORRESTEIN, P. C.; ROUSU, J.; BÖCKER, S. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. **Nature Methods**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 299–302, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>>

DUMONTET, C.; REICHERT, J. M.; SENTER, P. D.; LAMBERT, J. M.; BECK, A. Antibody–drug conjugates come of age in oncology. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], 2023.

DUNG, N. T.; HUNG, V. D.; LIEN, N. T.; HA, L. T.; DAU, P. T. The Composition of Algae , Cyanobacteria and the Application in Water Quality Assessment in Truc Bach Lake , Hanoi. **VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technolog**, [s. l.], v. 32, n. 1S, p. 26–32, 2016.

ECHENIQUE, R. O.; NÚÑEZ-AVELLANEDA, M.; DUQUE, S. R. Chlorococcales de la Amazonia Colombiana. II. **Bol. Soc. Argent. Bot.**, [s. l.], v. 48, n. 1997, p. 407–420, 2013.

ELIASON, O.; MALITSKY, S.; PANIZEL, I.; FELDMESSER, E.; PORAT, Z.; SPERFELD, M.; SEGEV, E. The photo-protective role of vitamin D in the microalga *Emiliana huxleyi*. **iScience**,

[s. l.], v. 27, n. 6, p. 109884, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109884>>

ERNST, M.; KANG, K. Bin; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; NOTHIAS, L. F.; WANDY, J.; CHEN, C.; WANG, M.; ROGERS, S.; MEDEMA, M. H.; DORRESTEIN, P. C.; VAN DER HOOFT, J. J. J. Molnetenhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. **Metabolites**, [s. l.], v. 9, n. 7, 2019.

FALAISE, C.; FRANÇOIS, C.; TRAVERS, M.; MORGA, B.; HAURE, J.; TREMBLAY, R.; TURCOTTE, F.; PASETTO, P.; GASTINEAU, R.; HARDIVILLIER, Y.; LEIGNEL, V.; MOUGET, J. Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Microalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 14, n. 159, p. 1–27, 2016.

GAO, Y. L.; WANG, Y. J.; CHUNG, H. H.; CHEN, K. C.; SHEN, T. L.; HSU, C. C. Molecular networking as a dereplication strategy for monitoring metabolites of natural product treated cancer cells. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 34, n. S1, p. 0–3, 2020.

GARCÍA, J. L.; DE VICENTE, M.; GALÁN, B. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1017–1024, 2017.

GARCIA, T. S.; BOCK, C.; BAGATINI, I. L.; ARCHANJO, N. C. P.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Hidden diversity in Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): Molecular phylogeny revealed a nannoplanktonic species, with the description of *Viridiparva madeirensis* gen. et sp. nov. **Algal Research**, [s. l.], v. 68, n. August, 2022.

GAUDÊNCIO, S. P.; BAYRAM, E.; BILELA, L. L.; CUETO, M.; DÍAZ-MARRERO, A. R.; HAZNEDAROGLU, B. Z.; JIMENEZ, C.; MANDALAKIS, M.; PEREIRA, F.; REYES, F.; TASDEMIR, D. Advanced Methods for Natural Products Discovery: Bioactivity Screening, Dereplication, Metabolomics Profiling, Genomic Sequencing, Databases and Informatic Tools, and Structure Elucidation. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 21, n. 308, 2023.

GAUDÊNCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: Racing to speed up the natural products discovery process. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 779–810, 2015.

GEIDER, R. J.; LA ROCHE, J. Redfield revisited: Variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. **European Journal of Phycology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 1–17, 2002.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry - A textbook**. Third edit ed. [s.l: s.n.].

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of high added-value compounds-a brief review of recent work. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 597–613, 2011.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. **Yellow-Green Algae With Chlorophyllide C1,2**, 1972.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **AlgaeBase**. 2023.

HACHICHA, R.; ELLEUCH, F.; HLIMA, H. Ben; DUBESSAY, P.; DE BAYNAST, H.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; ABDELKAFI, S.; MICHAUD, P.; FENDRI, I. Biomolecules from Microalgae and Cyanobacteria: Applications and Market Survey. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], v. 12, n. 4, 2022.

HÄLLFORS, G. **Checklist of Baltic Sea Phytoplankton Species**. [s.l: s.n.].

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HERT, J.; IRWIN, J. J.; LAGGNER, C.; KEISER, M. J.; SHOICHET, B. K. Quantifying Biogenic Bias in Screening Libraries. **Nat Chem Biol.**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 479–483, 2009.

HO, S. H.; HUANG, S. W.; CHEN, C. Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. S. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 135, p. 157–165, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100>>

JACINAVICIUS, F. R.; GAMA JÚNIOR, W. A.; AZEVEDO, M. T. de P.; SANT'ANNA, C. L. **Manual para cultivo de cianobactérias**. [s.l: s.n.]. v. 1

JÄPELT, R. B.; JAKOBSEN, J. Vitamin D in plants: A review of occurrence, analysis, and biosynthesis. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 4, n. MAY, p. 1–20, 2013.

JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, [s. l.], v. 167, n. 2, p. 191–194, 1975. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)>

JIANG, Z.; KEMPINSKI, C.; CHAPPELL, J. Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. **Current Protocols in Plant Biology**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 345–358, 2016.

KEELER, J. **Understanding NMR spectroscopy**. [s.l: s.n.].

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: current status , challenges , and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels , feed , and other

products. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 17, n. 36, p. 1–21, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>>

KIM, S. K. **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances**. [s.l.] : Elsevier, 2015.

KOMÁREK, J.; FOTT, B. Chlorophyceae, Chlorococcales. In : Die Binnengewässer, Bd. XVI, Das Phytoplankton des Süßwassers, 7. Teil, 1. Hälfte, X. **Acta hydrochim. hydrobiol.** **13**, [s. l.], v. 13, n. 1, 1985.

KORFMACHER, W. A. (ED.). **Mass Spectrometry for Drug Discovery and Drug development**. [s.l.] : Wiley, 2013.

KRUG, D.; MÜLLER, R. Secondary metabolomics: The impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 768–783, 2014.

LAKATOS, M.; STRIETH, D. **Terrestrial Microalgae: Novel Concepts for Biotechnology and Applications** *Progress in Botany* Vol. **79**, 2017.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: New methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 71, n. 9, p. 1595–1599, 2008.

LAURITANO, C.; FERRANTE, M. I.; ROGATO, A.; LAURITANO, CHIARA, FERRANTE, MARIA IMMACOLATA 2,* AND ROGATO, ALESSANDRA 2, 3; LAURITANO, C.; FERRANTE, M. I.; ROGATO, A. Marine Natural Products from Microalgae: An -Omics Overview. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 17, n. 269, p. 1–18, 2019. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/marinedrugs>

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: End of era or an endless frontier? **Biomeditsinskaya Khimiya**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 148–160, 2011.

LOPES, N. P.; DA SILVA, R. R. **Mass Spectrometry in Chemical Biology Evolving Applications**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781788010399>>

LUESCH, H.; MOORE, R. E.; PAUL, V. J.; MOOBERRY, S. L.; CORBETT, T. H. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 64, n. 7, p. 907–910, 2001.

MA, X. Recent Advances in Mass Spectrometry-Based Structural Elucidation Techniques. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 19, 2022.

MAGHEMBE, R.; DAMIAN, D.; MAKARANGA, A.; NYANDORO, S. S.; LYANTAGAYE, S. L.; KUSARI, S.; HATTI-KAUL, R. Omics for bioprospecting and drug discovery from bacteria and microalgae. **Antibiotics**, [s. l.], v. 9, n. 5, 2020.

MARTÍNEZ ANDRADE, K. A.; LAURITANO, C.; ROMANO, G.; IANORA, A. Marine microalgae with anti-cancer properties. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 16, n. 5, 2018.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MATSUDO, M. C.; SANT'ANNA, C. L.; PÉREZ-MORA, L. S.; SILVA, R. C. Da; CARVALHO, J. C. Evaluation of green microalgae isolated from central and north coast of Sao Paulo as source of oil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 012–019, 2021.

MEIER, R. Handbook of Vibrational Spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 413–414, 2003.

MICHAEL A. BOROWITZKA; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. **The Physiology of Microalgae**. [s.l: s.n.].

MISHRA, A.; MEDHI, K.; MALAVIYA, P.; THAKUR, I. S. Omics approaches for microalgal applications : Prospects and challenges. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 291, n. July, p. 121890, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121890>>

MÜLLER, C.; SCHÄFER, P.; STÖRTZEL, M.; VOGT, S.; WEINMANN, W. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 773, n. 1, p. 47–52, 2002.

NELSON, C. **Lehninger's principles of biochemistry**. [s.l: s.n.]. v. 53

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs

over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 66, n. 7, p. 1022–1037, 2003.

NORICI, A.; GEROTTO, C. Ecophysiology of algae—a tribute to Mario Giordano (1964–2019). **Phycologia**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 395–396, 2021.

NOTHIAS, L. F. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 905–908, 2020.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology : from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, [s. l.], v. 20, p. 459–466, 2003.

OLIVEIRA, D. T. De; COSTA, A. A. F. Da; COSTA, F. F.; FILHO, G. N. da R.; NASCIMENTO, L. A. S. Do. Advances in the Biotechnological Potential of Brazilian Marine Microalgae and Cyanobacteria. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 2908, p. 1–20, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/12/2908/htm>>

PARRISH, C. C.; WELLS, J. S. Determination of Total Lipid and Lipid Classes in Marine Samples. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], 2021.

PATINY, L.; BOREL, A. ChemCalc: A building block for tomorrow’s chemical infrastructure. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 53, n. 5, p. 1223–1228, 2013.

PLATT, T.; GALLEGOS, C. L.; HARRISON, W. G. Photoinhibition of Photosynthesis in Natural Assemblages of Marine Phytoplankton. **Journal of Marine Research**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 687–701, 1980.

PRINCE, H. M. et al. Brentuximab vedotin or physician’s choice in CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma (ALCANZA): an international, open-label, randomised, phase 3, multicentre trial. **The Lancet**, [s. l.], v. 390, n. 10094, p. 555–566, 2017.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 65, p. 635–648, 2004.

RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. de M.; GÓES NETO, A.; MOURA, C. W. do N. Monoraphidium and Ankistrodesmus (Chlorophyceae, Chlorophyta) from Pantanal dos Marimbus, Chapada Diamantina, Bahia State, Brazil. **Hoehnea**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 421–434, 2012.

REDDY, B. M. R. New records of fresh water algae for Maharashtra state: Investigation from the major rivers of Chandrapur district Article. **NeBIO**, [s. l.], v. 12, n. 2, 2021.

RINAWATI, M.; SARI, L. A.; PURSETYO, K. T. Chlorophyll and carotenoids analysis

spectrophotometer using method on microalgae. In: IOP CONFERENCE SERIES: EARTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCE PAPER 2020, **Anais...** [s.l: s.n.]

SAEED, M. U.; HUSSAIN, N.; SHAHBAZ, A.; HAMEED, T.; IQBAL, H. M. N.; BILAL, M. Bioprospecting microalgae and cyanobacteria for biopharmaceutical applications. **Journal of Basic Microbiology**, [s. l.], n. August 2021, p. 1110–1124, 2021.

SAIDE, A.; LAURITANO, C.; IANORA, A. Pheophorbide A: State of the art. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 1–12, 2020.

SALEM, M. A.; DE SOUZA, L. P.; SERAG, A.; FERNIE, A. R.; FARAG, M. A.; EZZAT, S. M.; ALSEEKH, S. Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. **Metabolites**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–30, 2020.

SANTHAKUMARAN, P.; KOOKAL, S. K.; RAY, J. G. Biomass yield and biochemical profile of fourteen species of fast-growing green algae from eutrophic bloomed freshwaters of Kerala, South India. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 119, n. September, p. 155–165, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.021>>

SATHASIVAM, R.; RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD, E. F. Microalgae metabolites : A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 709–722, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>>

SAWADA, Y.; AKIYAMA, K.; SAKATA, A.; KUWAHARA, A.; OTSUKI, H.; SAKURAI, T.; SAITO, K.; HIRAI, M. Y. Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants. **Plant and Cell Physiology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 37–47, 2009.

SENER, P. D.; SIEVERS, E. L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 631–637, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2289>>

SHIN, H. J.; IM, J. H.; JEONG, H. C.; LEE, O. M. Nine taxa of newly recorded species of chlorophytes (Chlorophyceae and trebouxioephyceae, chlorophyta) in Korea. **Journal of Ecology and Environment**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 277–284, 2018.

SHINDE, P.; BANERJEE, P.; MANDHARE, A. Marine natural products as source of new drugs: a patent review (2015-2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1598972>>

- SHIPKOVA, P.; REILY, M. D. **Mass Spectrometry for Metabolomics**. [s.l: s.n.].
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. Seventh ed ed. Hoboken: Wiley, 2005.
- SINGH, S.; KATE, B. N.; BANECJEE, U. C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 73–95, 2005.
- SKJÅNES, K.; REBOURS, C.; LINDBLAD, P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 172–215, 2013.
- SLOCOMBE, S. P.; ROSS, M.; THOMAS, N.; MCNEILL, S.; STANLEY, M. S. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 129, p. 51–57, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.163>>
- SPECIALCHEM. **Chlorella Vulgaris extract cosmetic ingredient**. 2020. Disponível em: <<https://cosmetics.specialchem.com/inci/chlorella-vulgaris-extract>>. Acesso em: 11 nov. 2020.
- SREERAJ GOPI; THOMAS, S.; AMALRAJ, A.; JUDE, S. **High resolution mass spectrometry and its diverse applications**. [s.l: s.n.].
- STOLZ, P.; OBERMAYER, B. Manufacturing microalgae for skin care. **Cosmetics and toiletries**, [s. l.], v. 120, n. 3, p. 99–106, 2005. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=16605264>>
- STONIK, V. A.; STONIK, I. V. Carbohydrate-Containing Low Molecular Weight Metabolites of Microalgae. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 21, n. 8, 2023.
- VAN ECK, N. J.; WALTMAN, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. **Scientometrics**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 523–538, 2010.
- VESTOLA, J.; SHISHIDO, T. K.; JOKELA, J.; FEWER, D. P.; AITIO, O.; PERMI, P.; WAHLSTEN, M.; WANG, H.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K. Hassallidins, antifungal glycolipopeptides, are widespread among cyanobacteria and are the end-product of a nonribosomal pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 111, n. 18, p. 1909–1917, 2014.
- WELLBURN, A. 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**, [s. l.], v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994. Disponível em:

<[http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)>

WU, L.; SUN, Q.; DESMETH, P.; SUGAWARA, H.; XU, Z.; MCCLUSKEY, K.; SMITH, D.; ALEXANDER, V.; LIMA, N.; OHKUMA, M.; ROBERT, V.; ZHOU, Y.; LI, J.; FAN, G.; INGSRISWANG, S.; OZERSKAYA, S.; MA, J. World data centre for microorganisms: An information infrastructure to explore and utilize preserved microbial strains worldwide. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 45, n. D1, p. D611–D618, 2017.

YANG, Y.; DU, L.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K. Total lipids content, lipid class and fatty acid composition of ten species of microalgae. **Journal of Oleo Science**, [s. l.], v. 69, n. 10, p. 1181–1189, 2020.

ZHANG, Q.; ZHENG, L.; LI, T.; LIU, G.; SONG, L. Morphology and phylogeny of three planktonic radiococcaceae sensu lato species (Sphaeropleales, chlorophyceae) from China, including the description of a new species planktosphaeria hubeiensis sp. nov. **Fottea**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 243–255, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.5507/fot.2018.009>>

ANEXO II

CEPA 24 - *ANKISTRODESMUS ARCUATUS*

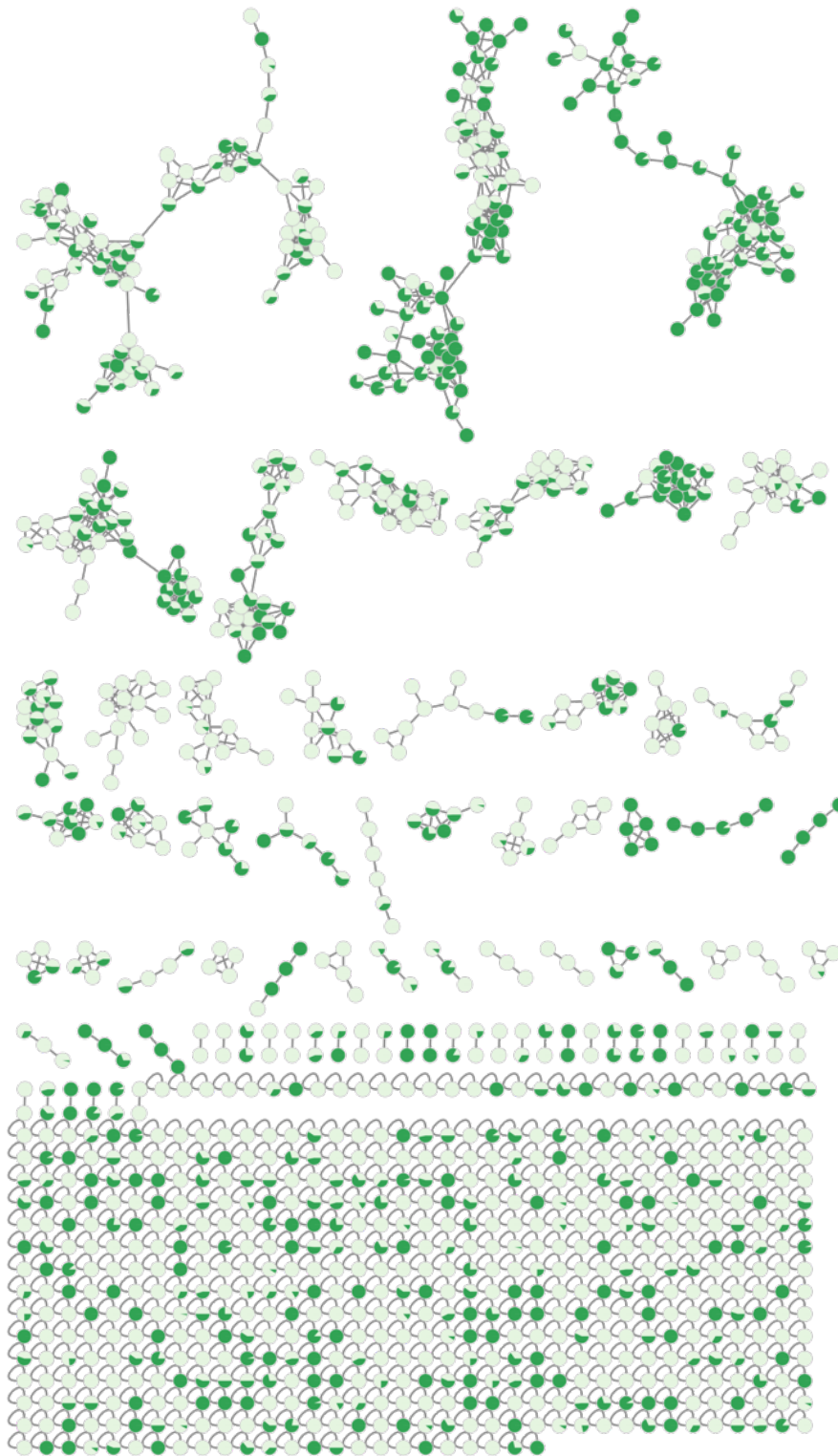


Figura A. 3 – Rede molecular para a cepa CCMA-UFSCar 24, *Ankistrodesmus arcuatus*, com destaque para as *features* (nodos) que foram encontrados na fase exponencial (verde claro) e na fase estacionária (verde escuro).

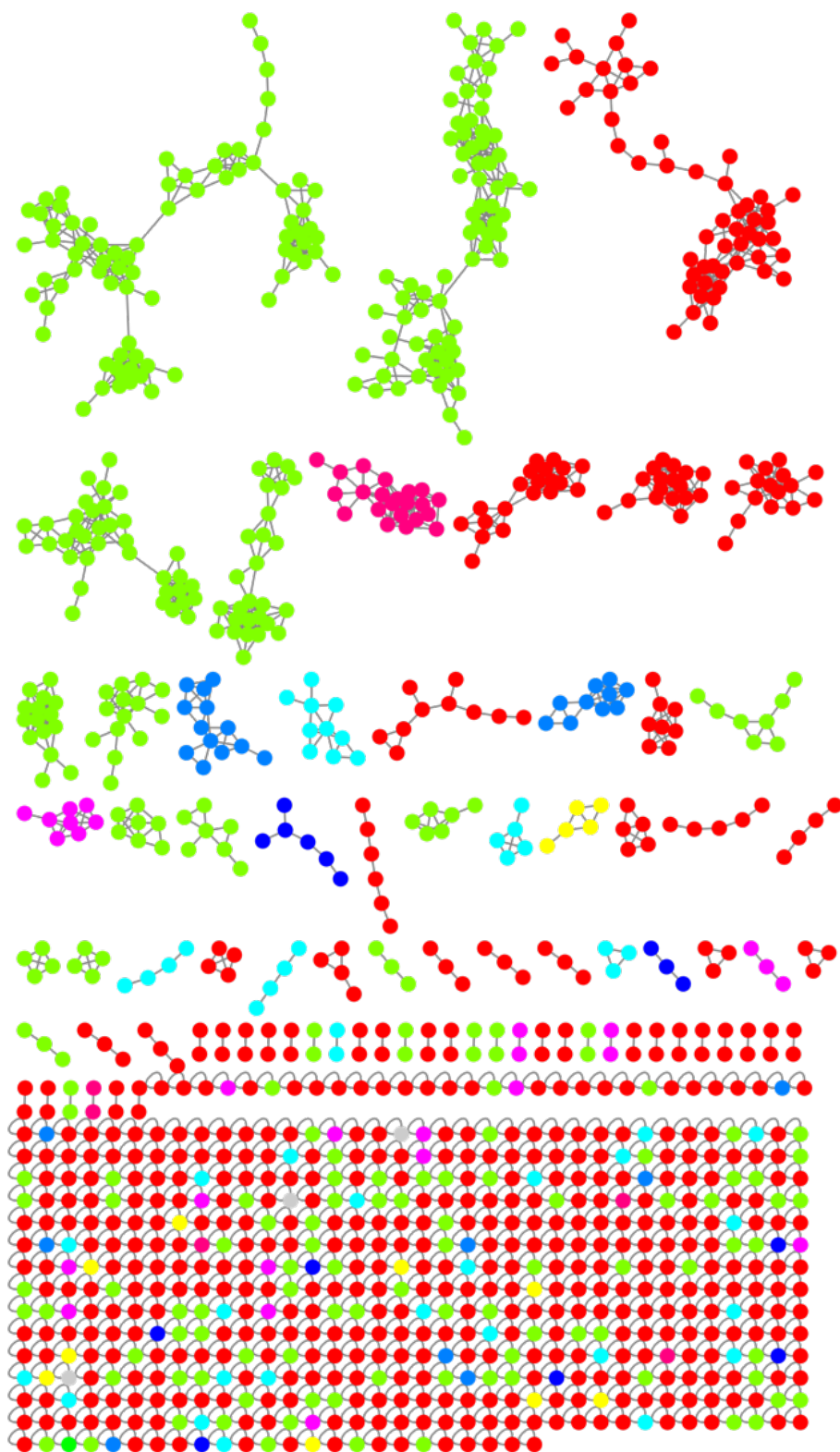


Figura A. 4 – Rede molecular analisada com o *MolNetEnhancer* para a cepa CCMA-UFSCar 24, *Ankistrodesmus arcuatus*, com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro), compostos organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lípidios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho).

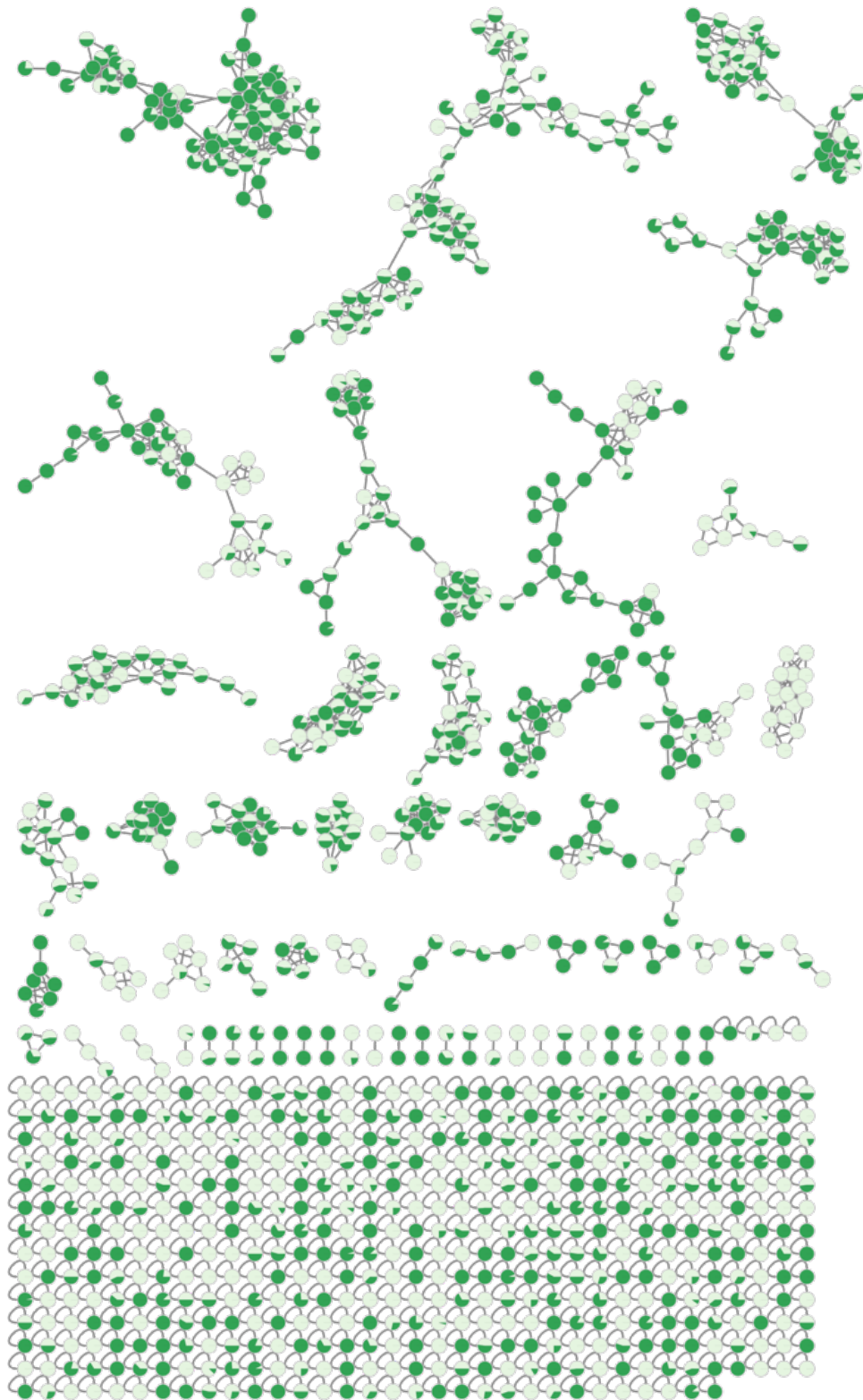


Figura A. 5. – Rede Cytoscape para a cepa CCMA-UFSCar 283, *Radiococcus* sp., com destaque para os nodos que foram encontrados na fase exponencial (verde claro) e na fase estacionária (verde escuro).

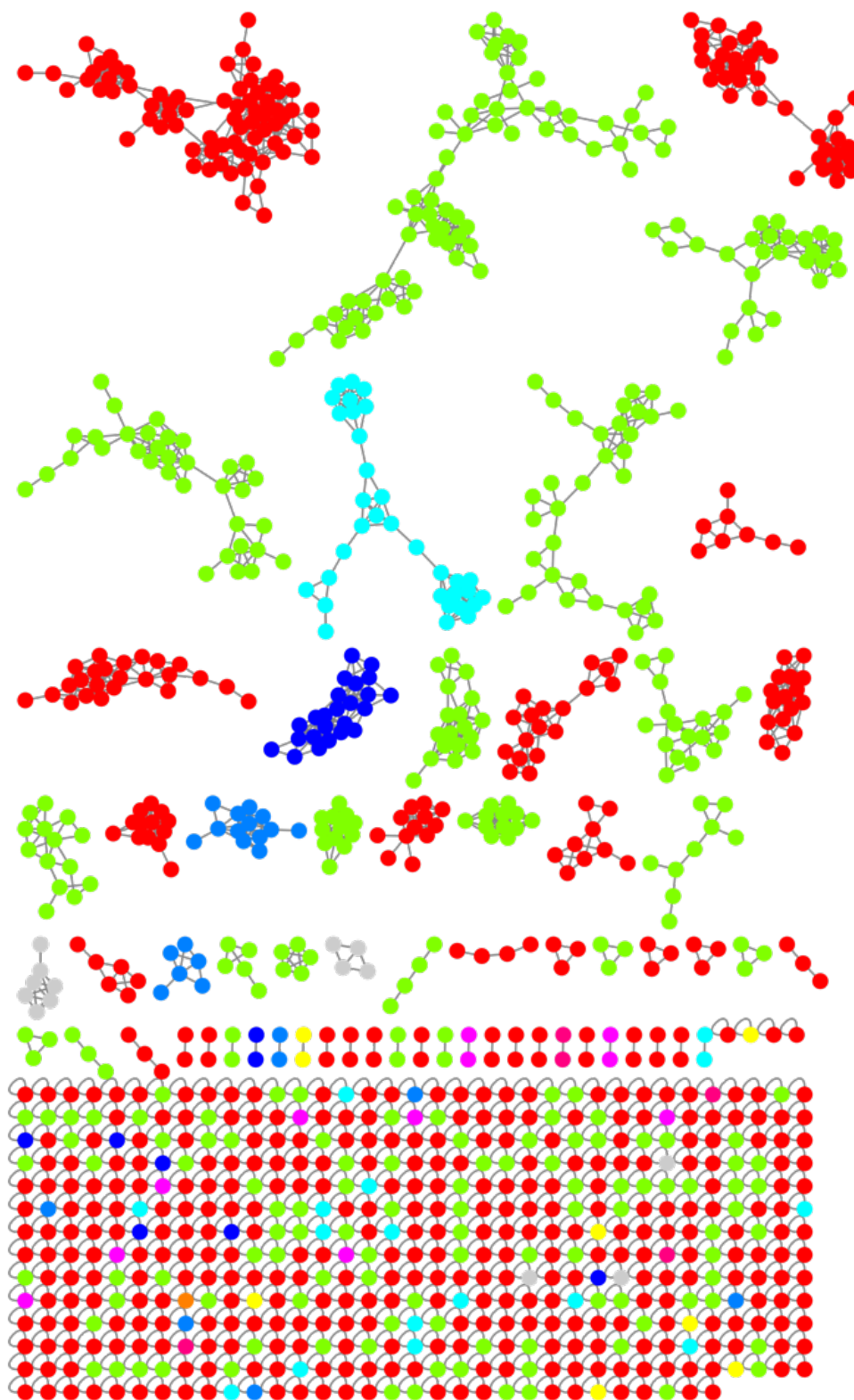


Figura A. 6 – Rede molecular analisada com o *MolNetEnhancer* para a cepa CCMA-UFSCar 283, *Radiococcus* sp., com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro), compostos organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lipídios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho).

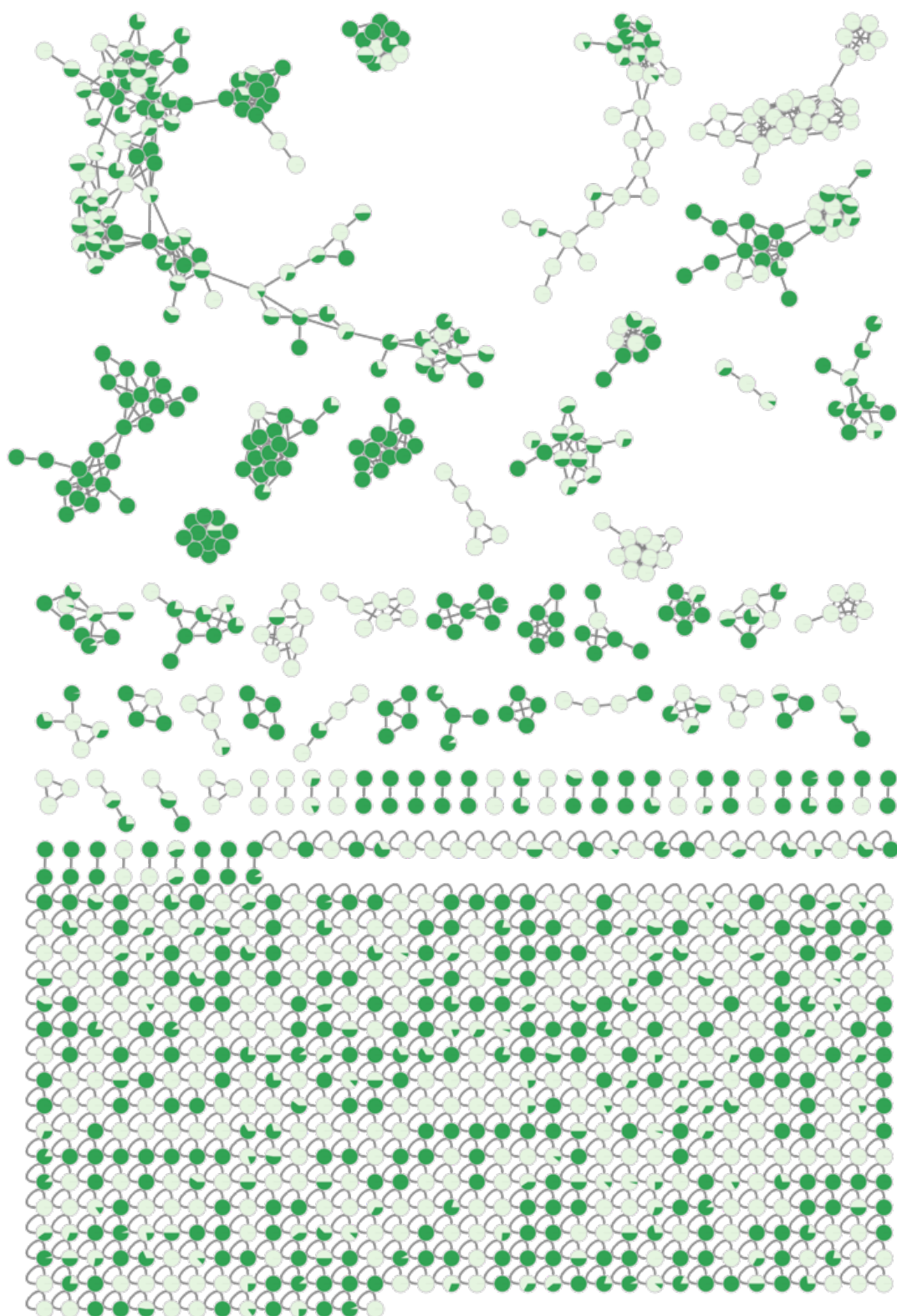


Figura A. 7 – Rede Cytoscape para a cepa CCMA-UFSCar 556, *Sorastrum bengalicum*, com destaque para os nodos que foram encontrados na fase exponencial (verde claro) e na fase estacionária (verde escuro).

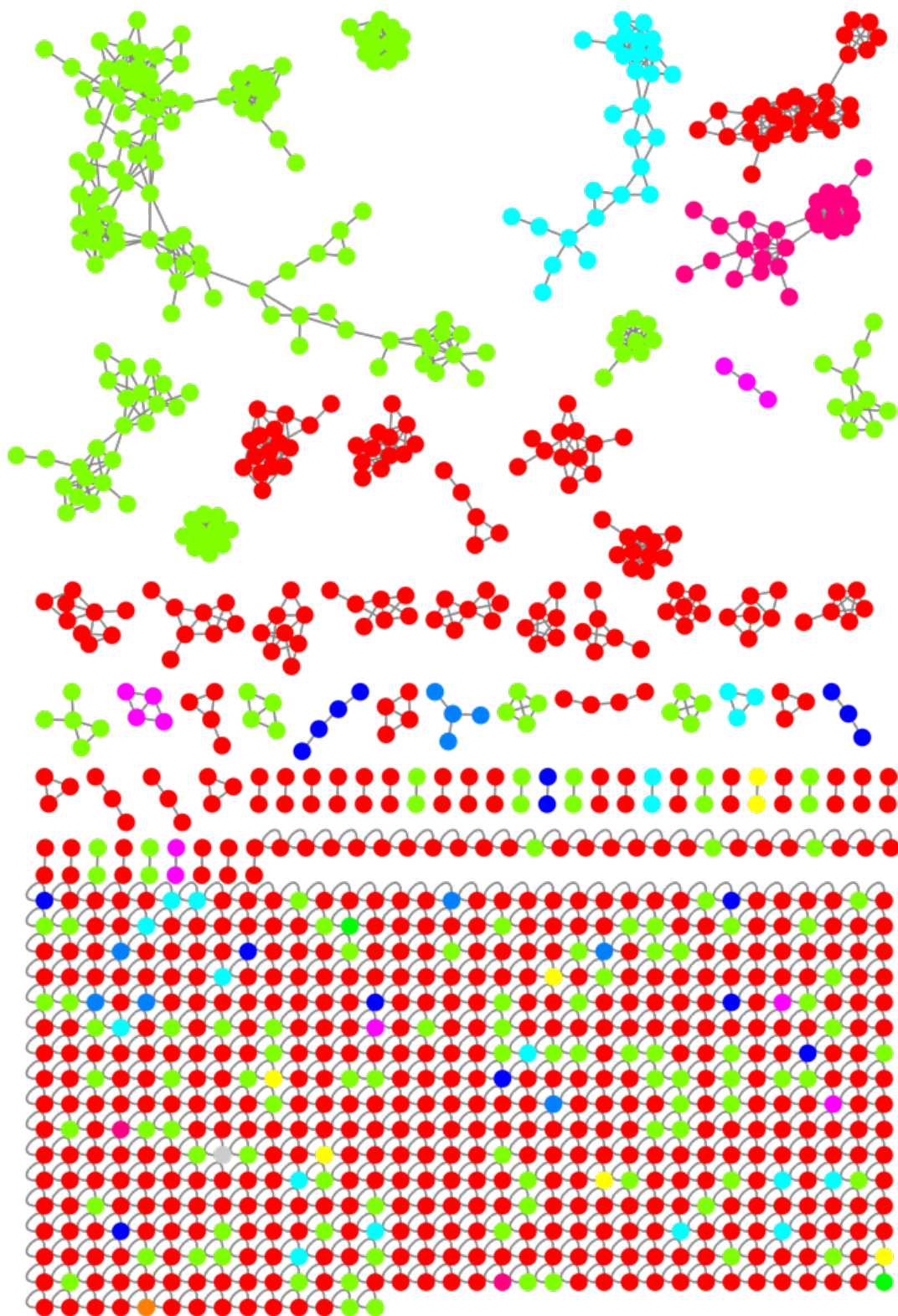


Figura A. 8 – Rede molecular analisada com o *MolNetEnhancer* para a cepa CCMA-UFSCar 556, *Sorastrum bengalicum*, com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro), compostos organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lipídios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho).

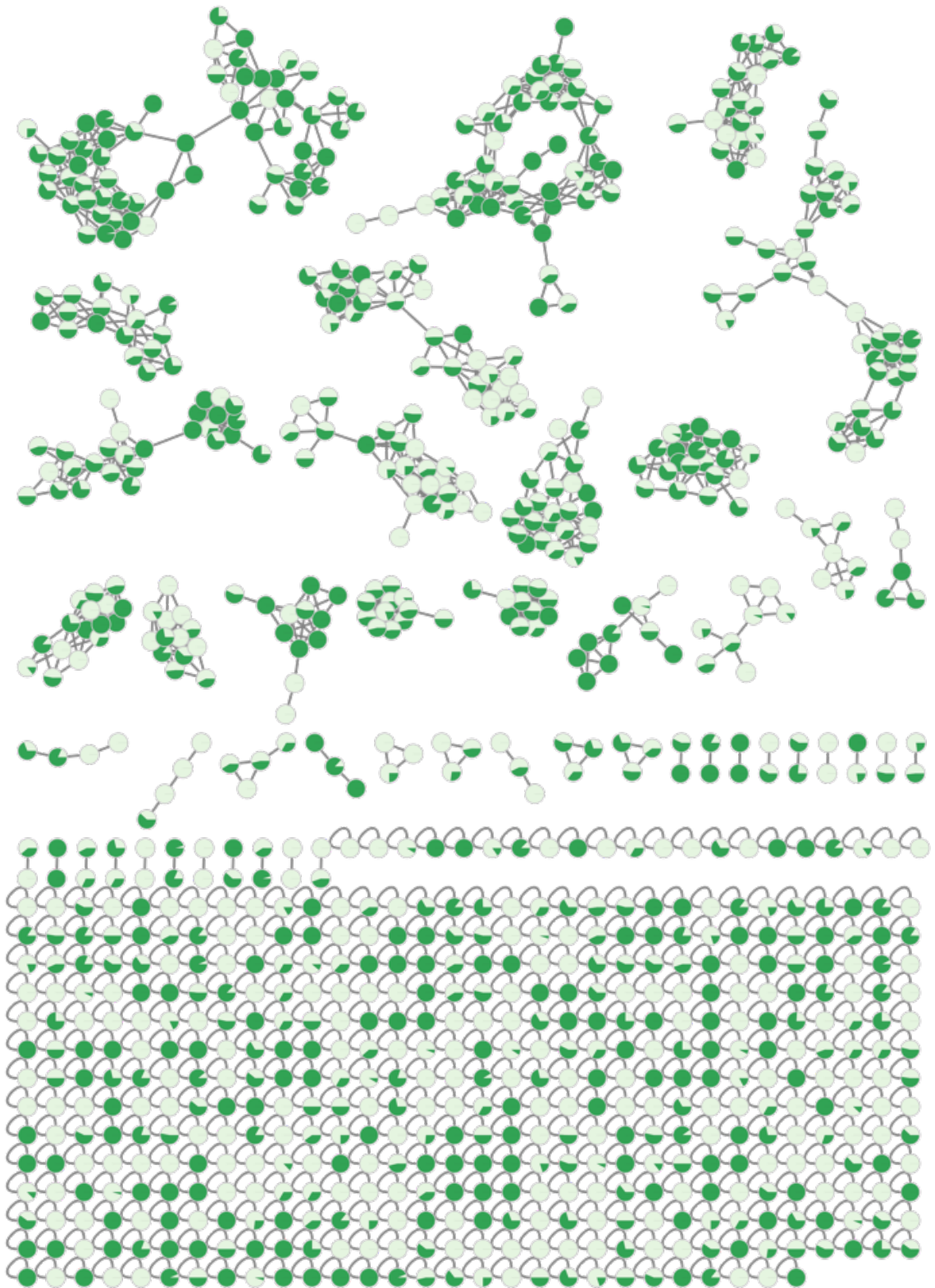


Figura A. 9 – Rede Cytoscape para a cepa CCMA-UFSCar 702, *Chlorolobion braunii*, com destaque para os nodos que foram encontrados na fase exponencial (verde claro) e na fase estacionária (verde escuro).

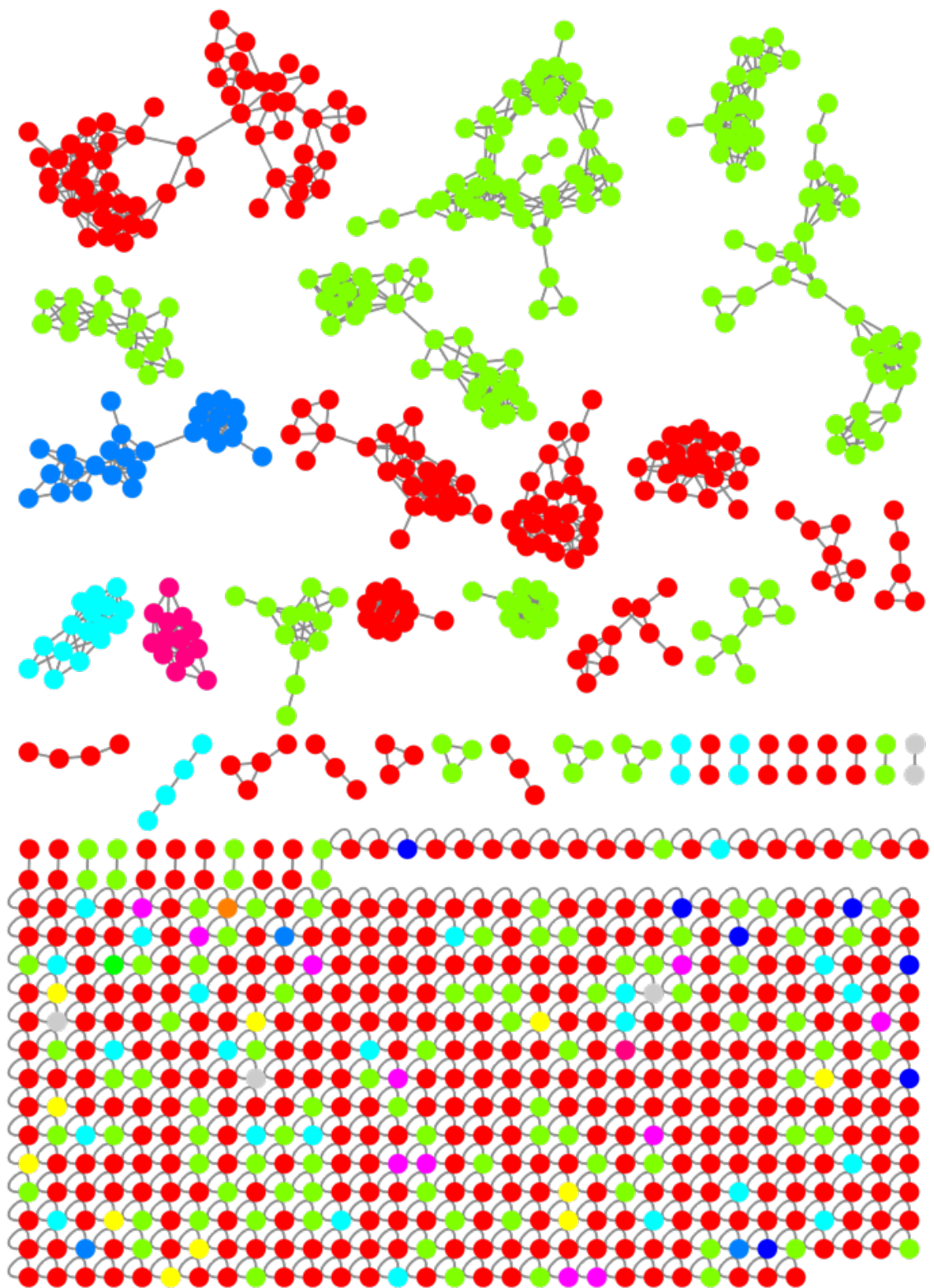
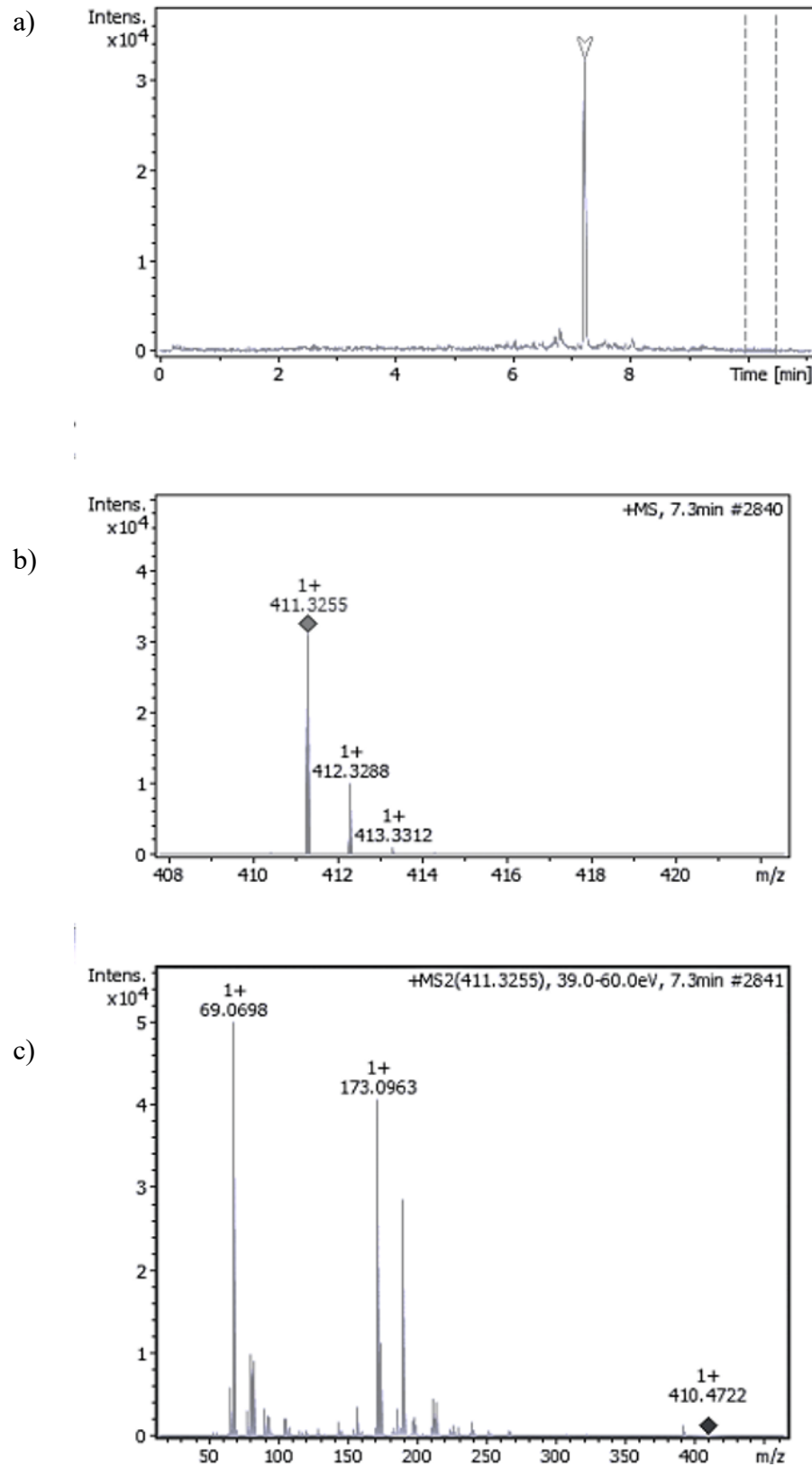


Figura A. 10 – Rede molecular analisada com o *MolNetEnhancer* para a cepa CCMA-UFSCar 702, *Chlorolobion braunii*, com destaque para as superclasses de moléculas: ácidos orgânicos e derivados (azul claro), alcaloides e derivados (laranja), benzenóides (amarelo), compostos orgânicos de nitrogênio (azul), compostos orgânicos de oxigênio (azul escuro), compostos organohalógenos (roxo), compostos organoheterocíclicos (rosa), fenilpropanóides e policetídeos (rosa escuro), lignanas e relacionados (rosa claro), lipídios e semelhantes (verde claro), nucleosídeos e outros (verde), organometalóide (cinza) e ‘sem correspondência’ (vermelho).

CROMATOGRAMAS E ESPECTROGRAMAS E RESULTADOS DO SIRIUS



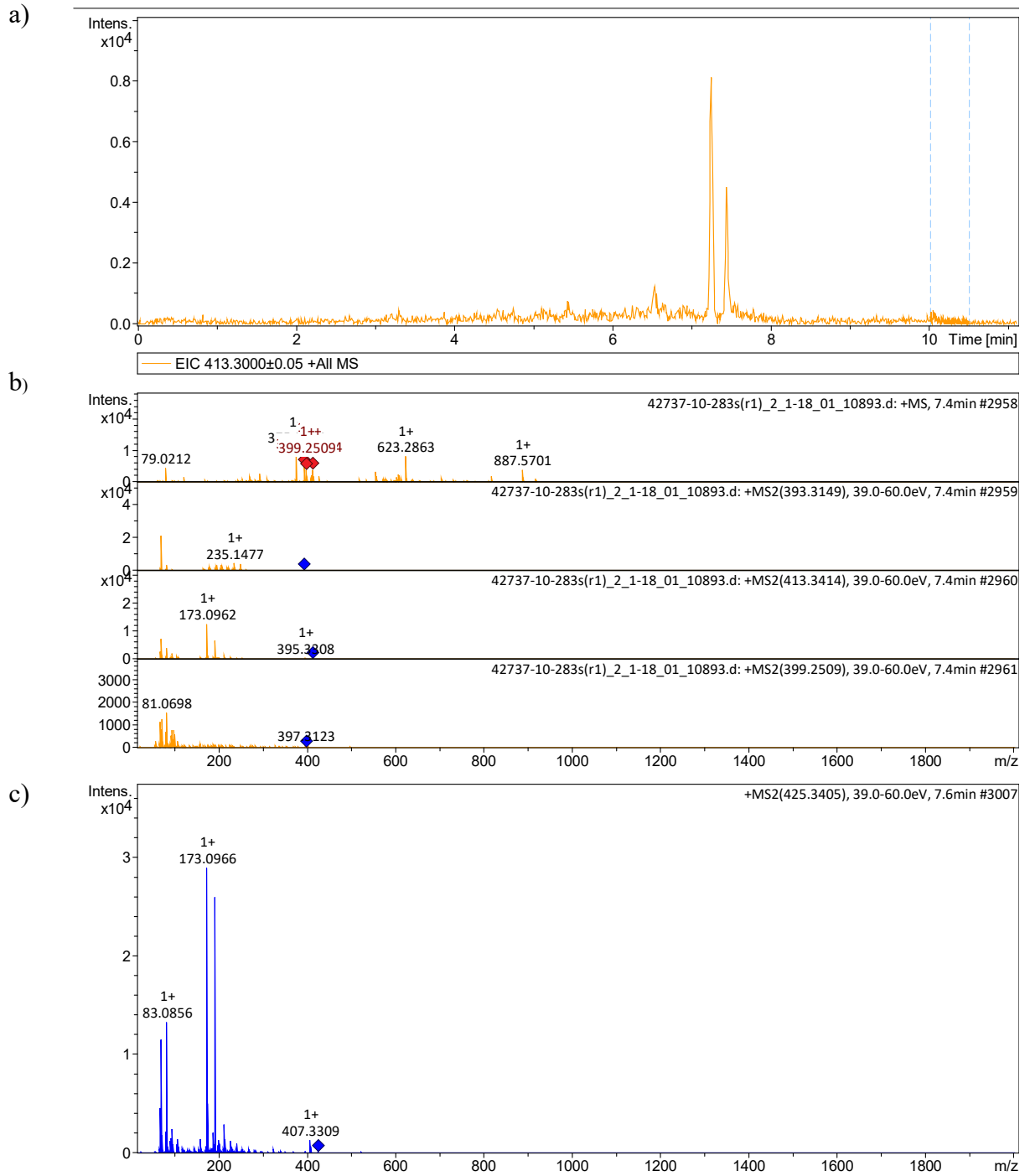


Figura A. 12 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* 117203 de *m/z* 413,3414 da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária.

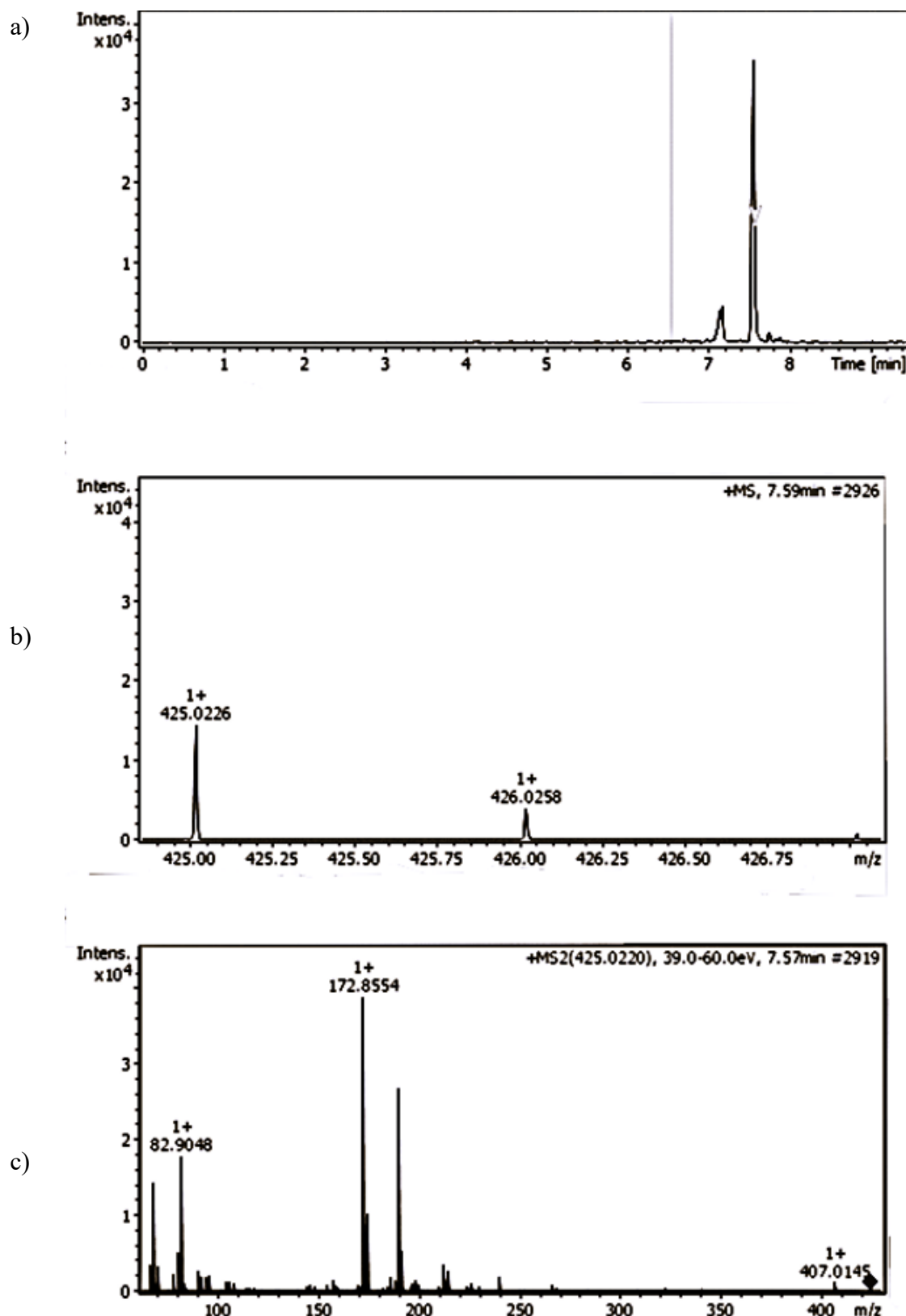


Figura A. 13 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 425,0226 da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária.

1	$C_{28}H_{42}O_2 + H^+$	2	$C_{28}H_{44}O_3 - H_2O + H^+$	3	$C_{28}H_{40}O + H_2O + H^+$	4	$C_{26}H_{44}$
SIRIUS	49,998%	CSI	-77.810	SIRIUS	49,998%	CSI	-113.892
SIRIUS	0,004%	CSI	-139.513	SIRIUS	0,004%	CSI	-139.513
SIRIUS	0,004%	CSI	-139.513	SIRIUS	0,004%	CSI	-139.513

Main Classes

Subclass ⇒ Class ⇒ Superclass ⇒ Kingdom

Diterpenoids ⇒ Prenol lipids ⇒ Lipids and lipid-like molecules ⇒ Organic compounds

Description

This compound belongs to the class Diterpenoids, which describes terpene compounds formed by four isoprene units.

Alternative Classes

alternative alternative alternative alternative

1-benzopyrans 1-hydroxy-2-unsubstituted benzenoids Cyclic ketones Oxacyclic compounds

alternative alternative

Hydrocarbon derivatives Quinone and hydroquinone lipids

Natural Product Classes

class Superclass Pathway

Prenyl quinone meroterpenoids Meroterpenoids Terpenoids

Figura A. 14 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da *feature* analisada do cluster A, da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária.

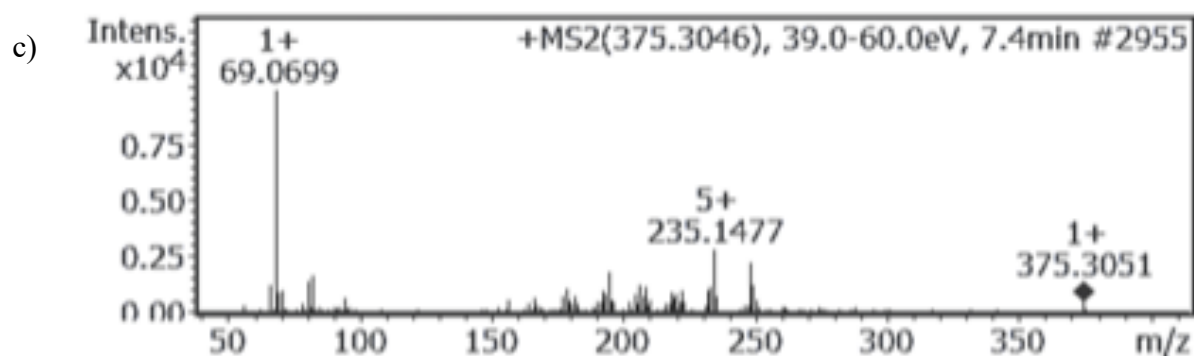
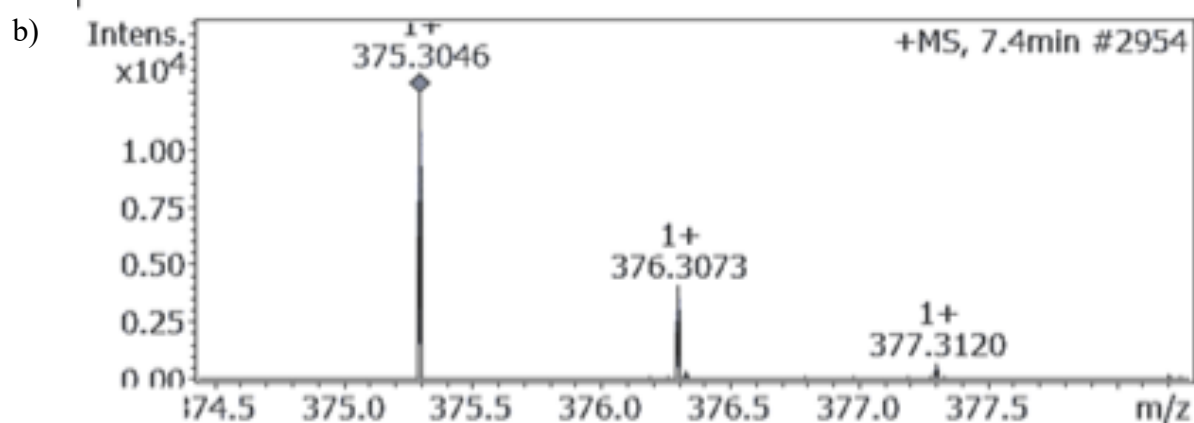
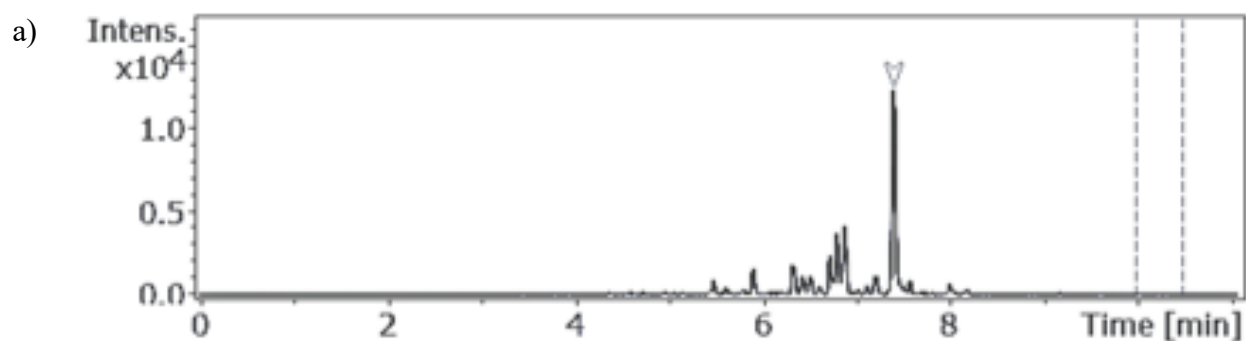


Figura A. 15 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 375,3046 da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária.

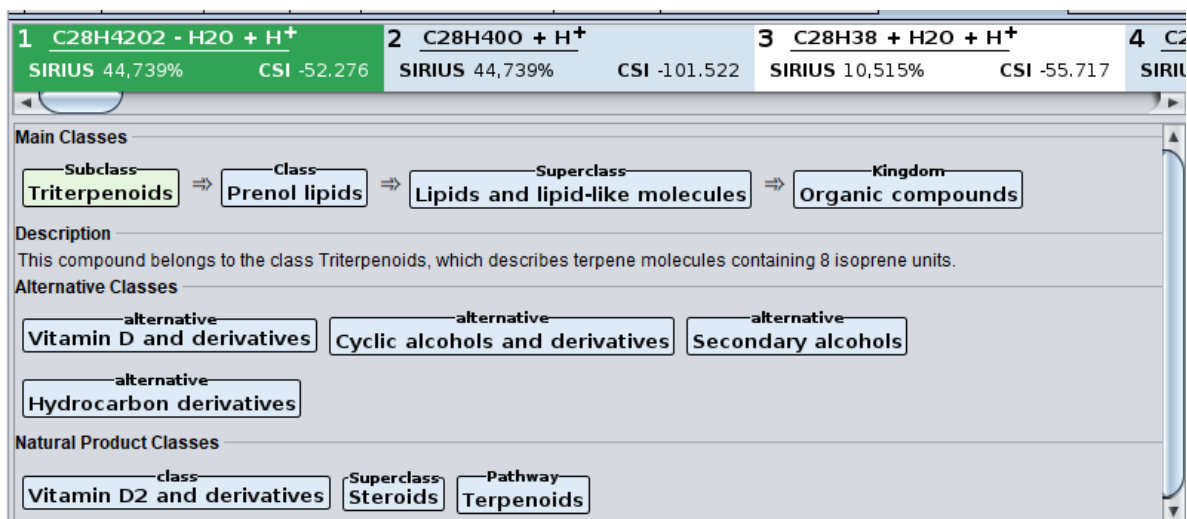


Figura A. 16 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da *feature* analisada do cluster B.

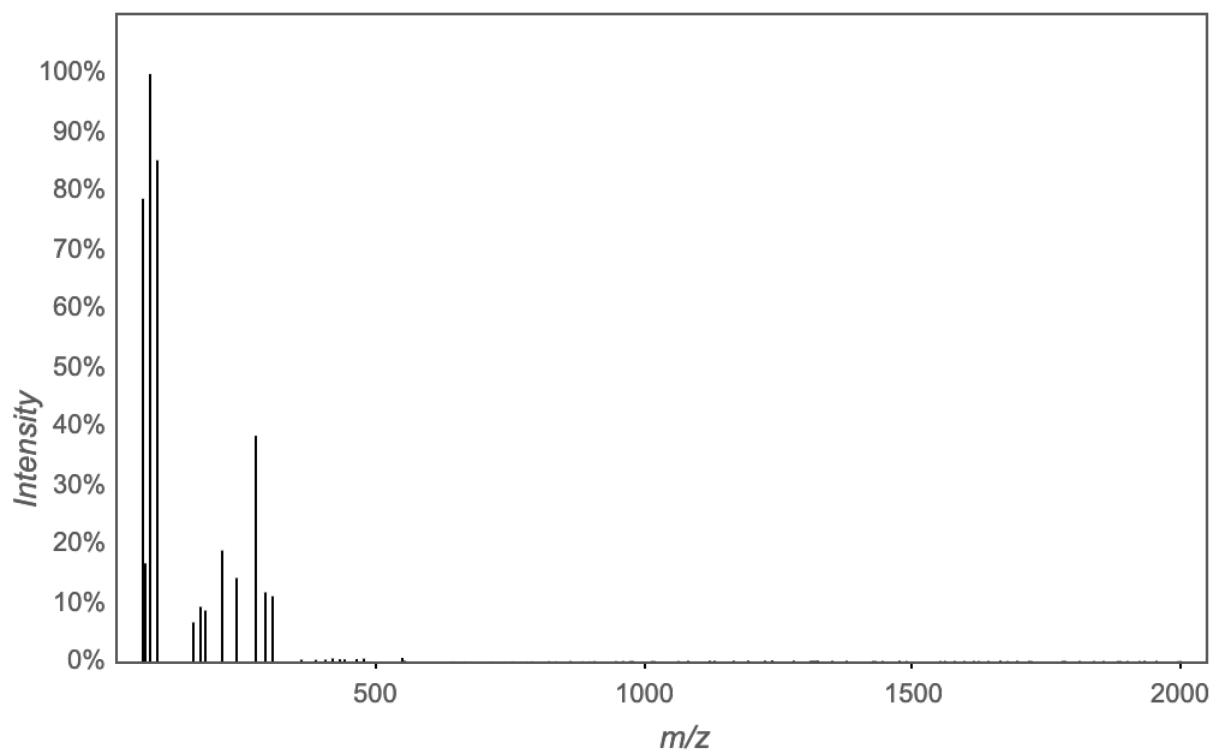


Figura A. 17 - Espectro de MS2 da *feature*119561, cluster C, da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária.

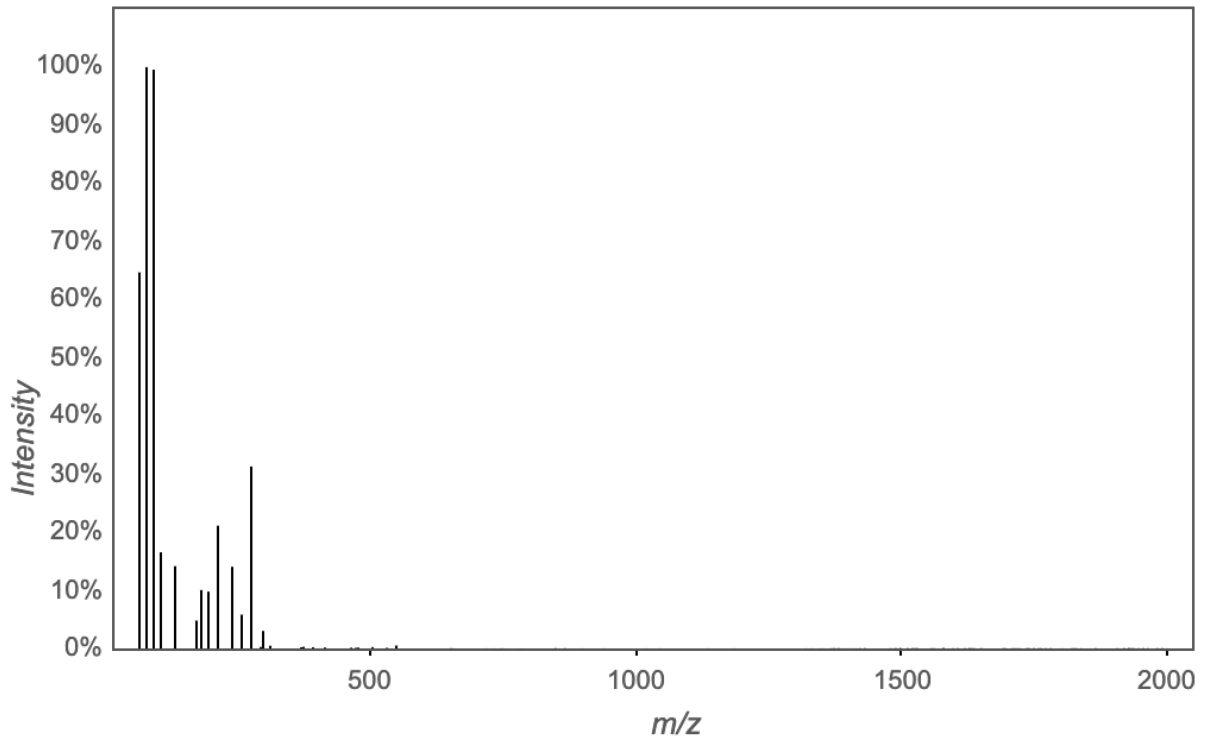


Figura A. 18- Espectro de MS2 da *feature*119561, cluster C, da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária.

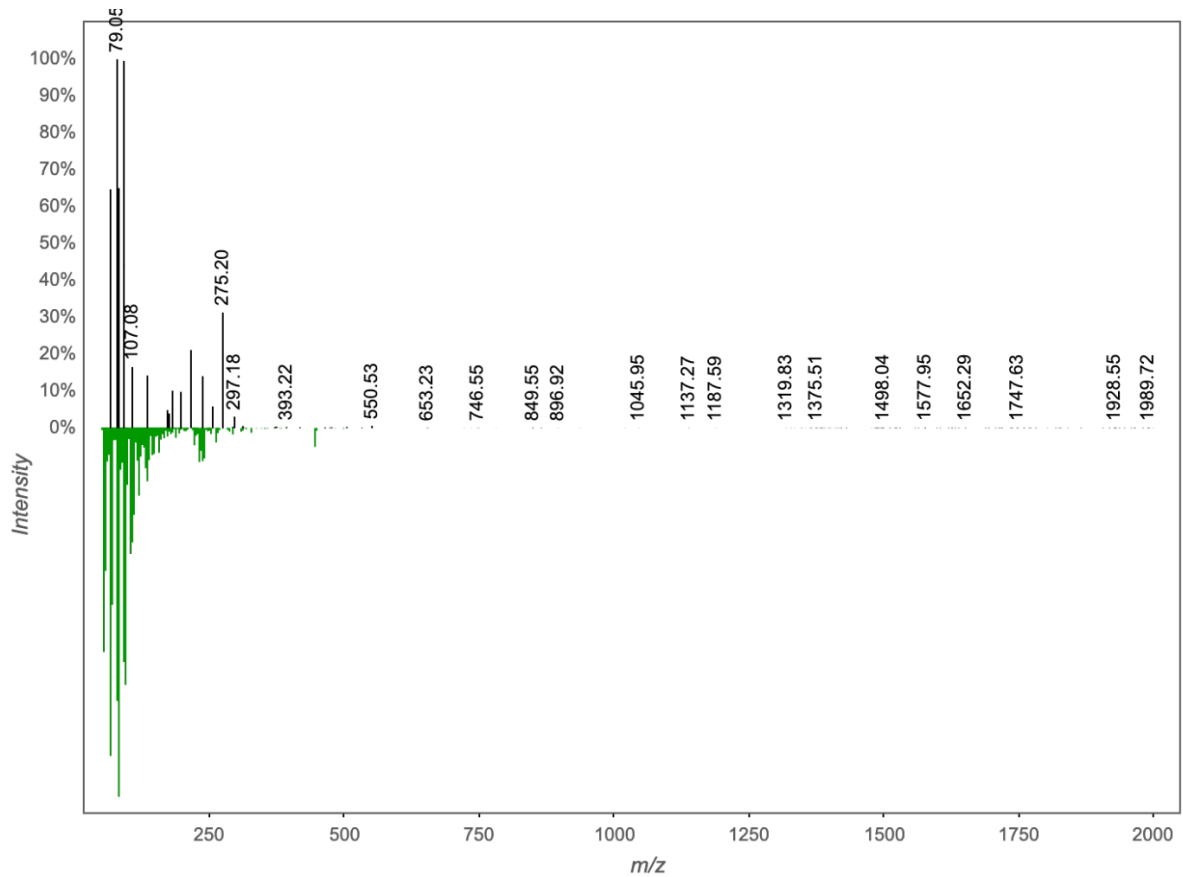


Figura A. 19 – *Match* da *feature* 119561 com a biblioteca do GNPS, da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária.

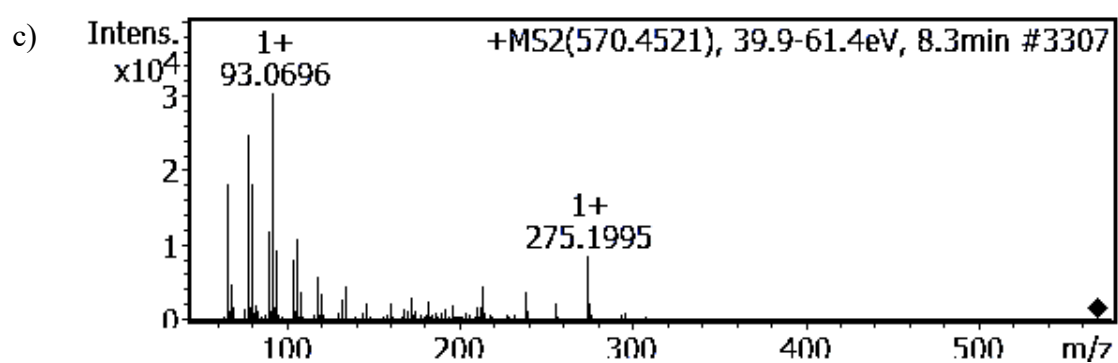
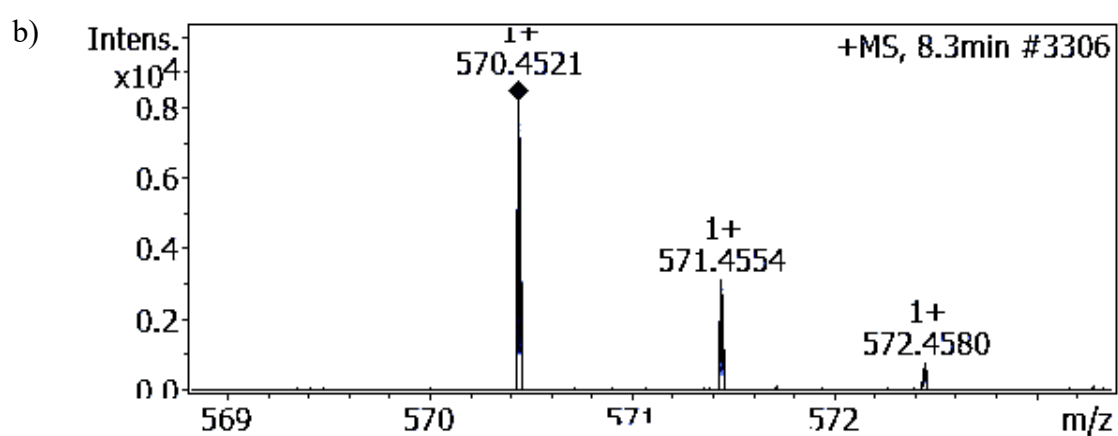
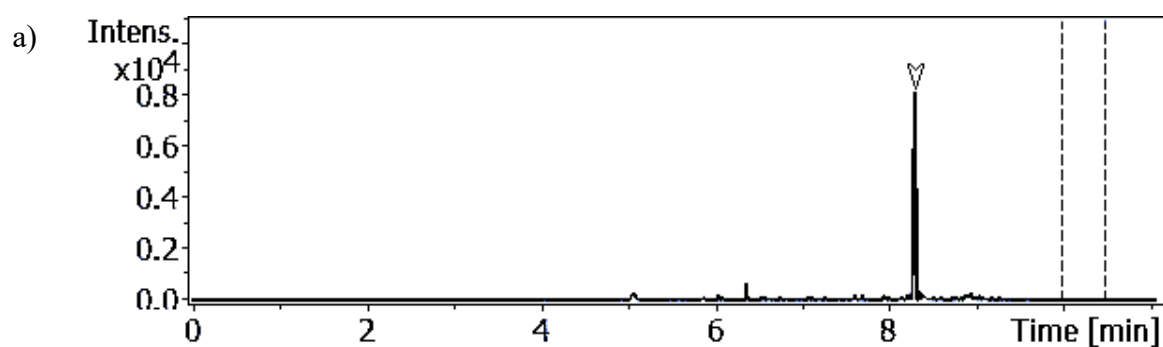


Figura A. 20 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 570,4521, da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária.

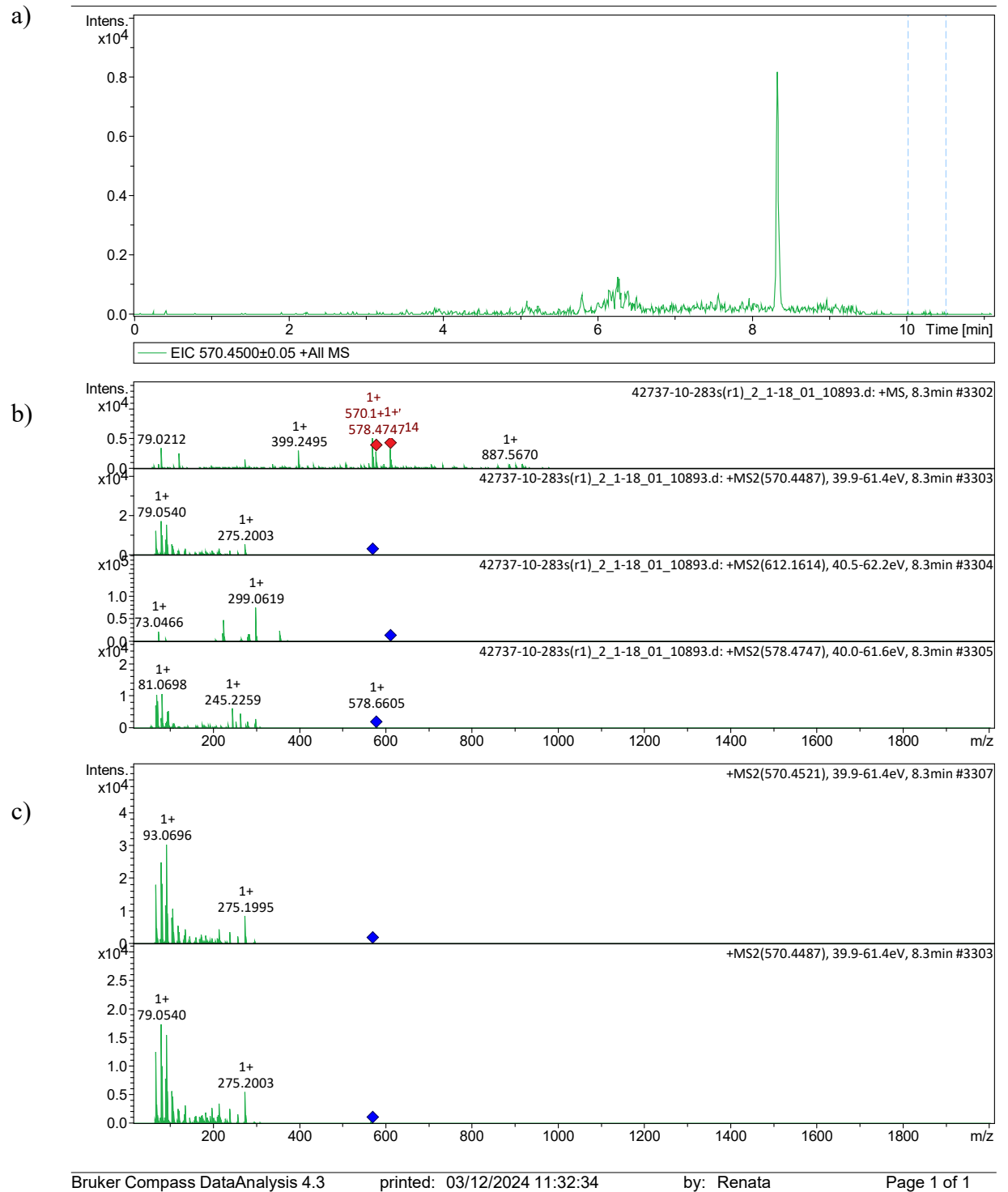


Figura A. 21 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 570,4521 da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária. Em (c) também é possível observar o MS2 da *feature* de m/z 570,4487.

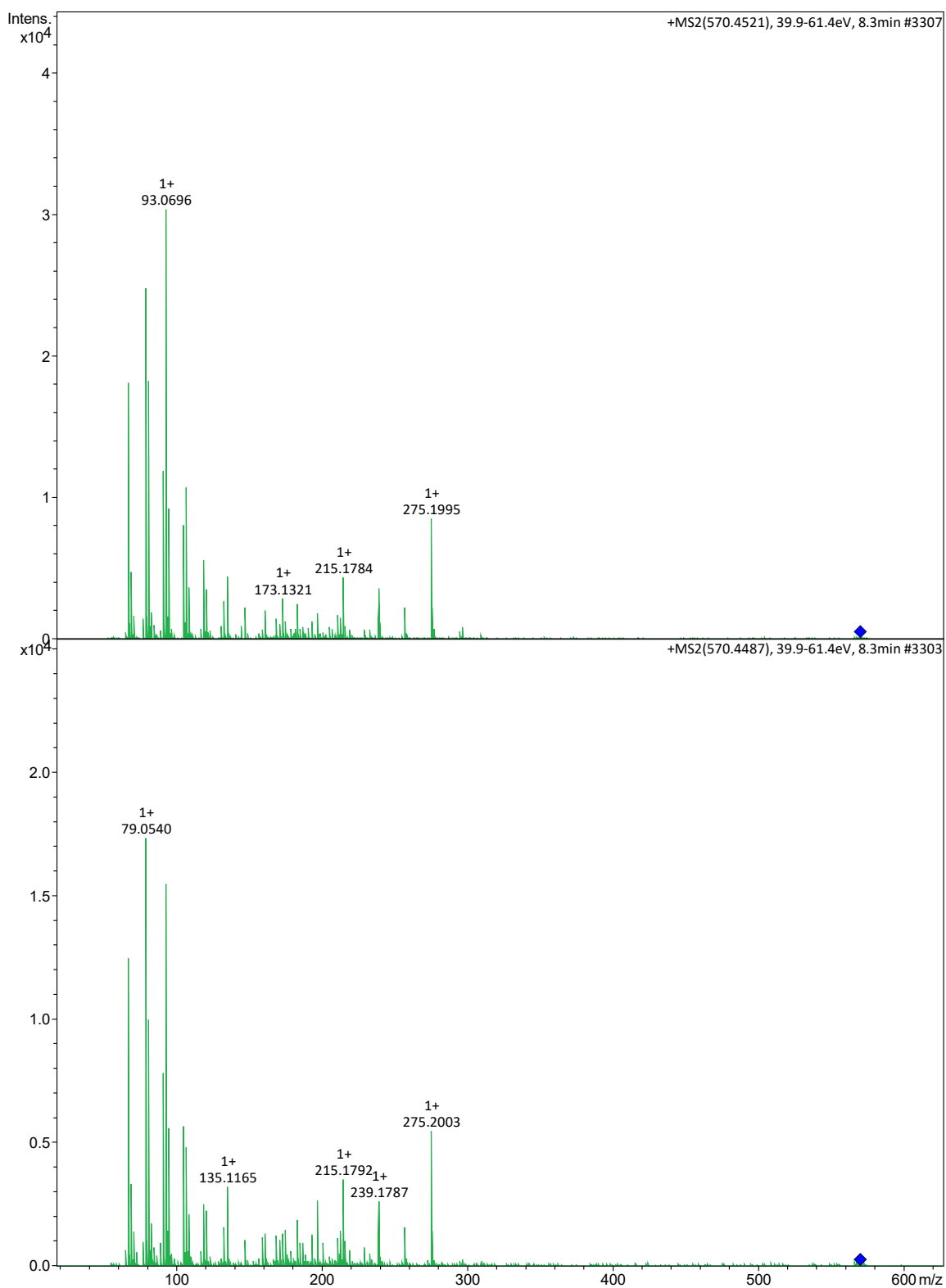


Figura A. 22 – Espectros de fragmentação MS2 para as *features* 119561 e 119562 de m/z 570,4521 e m/z 570,4487 da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária.

1	$C_{34}H_{56}O_4 + C_2H_3N + H^+$	2	$C_{36}H_{56}O_4 + H_3N + H^+$	3	$C_{36}H_{61}NO_5 - H_2O + H^+$	4	$C_{36}H_{61}NO_5 - H_2O + H^+$
	SIRIUS 12,336% CSI -134.727		SIRIUS 12,336% CSI -132.540		SIRIUS 12,336% CSI -450.380		SIRIUS 12,336% CSI -450.380

Main Classes

Subclass: Lineolic acids and derivatives ⇒ Class: Fatty Acyls ⇒ Superclass: Lipids and lipid-like molecules ⇒

Kingdom: Organic compounds

Description

This compound belongs to the class Lineolic acids and derivatives, which describes derivatives of lineolic acid. Lineolic acid is a polyunsaturated omega-6 18 carbon long fatty acid, with two CC double bonds at the 9- and 12-positions.

Alternative Classes

alternative: Diacylglycerols, Fatty acid esters, Dicarboxylic acids and derivatives, Fatty acids and conjugates

alternative: Carboxylic acid esters, Carboxylic acids, Carbonyl compounds, Hydrocarbon derivatives

alternative: Organic oxides

Natural Product Classes

class: Diacylglycerols, Superclass: Fatty esters, Pathway: Fatty acids

Figura A. 23 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da *feature* 119561 analisada do cluster C, da linhagem *Radiococcus* sp., na fase estacionária.

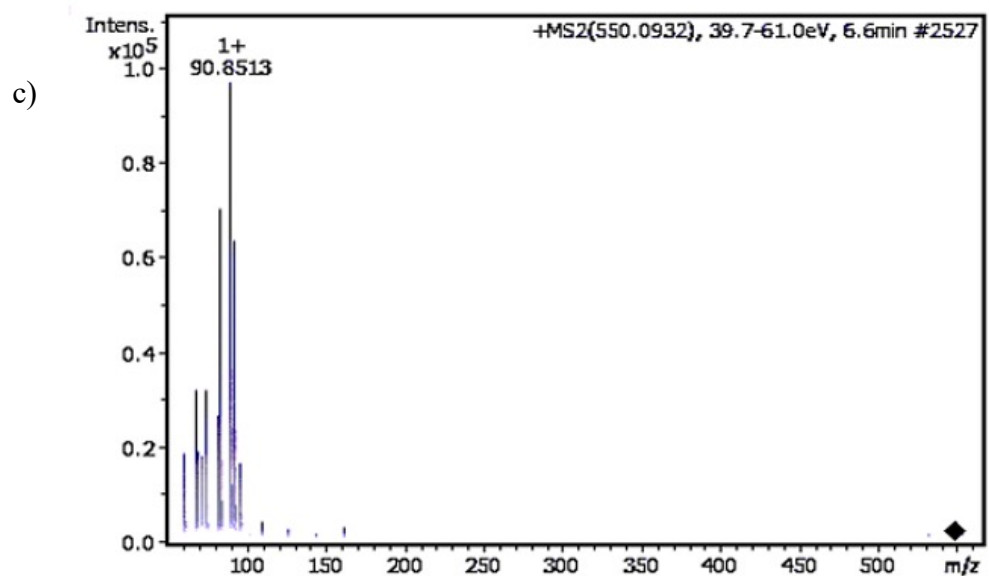
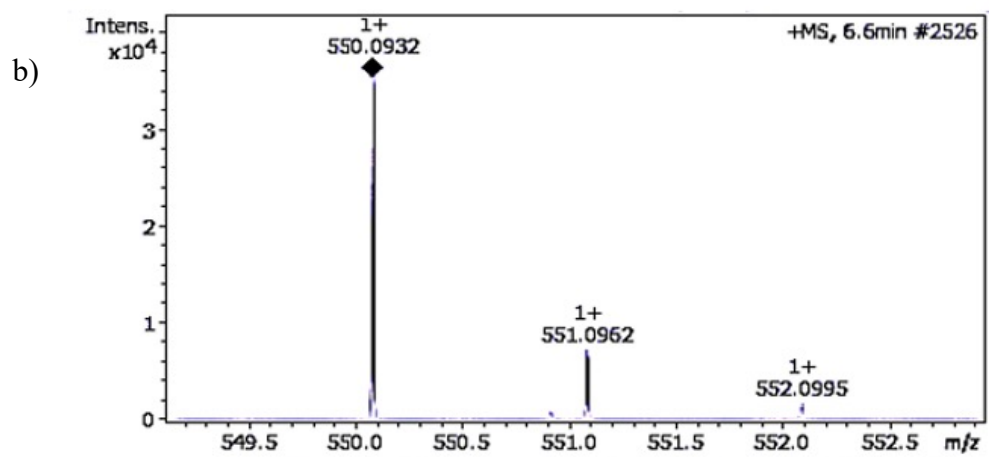
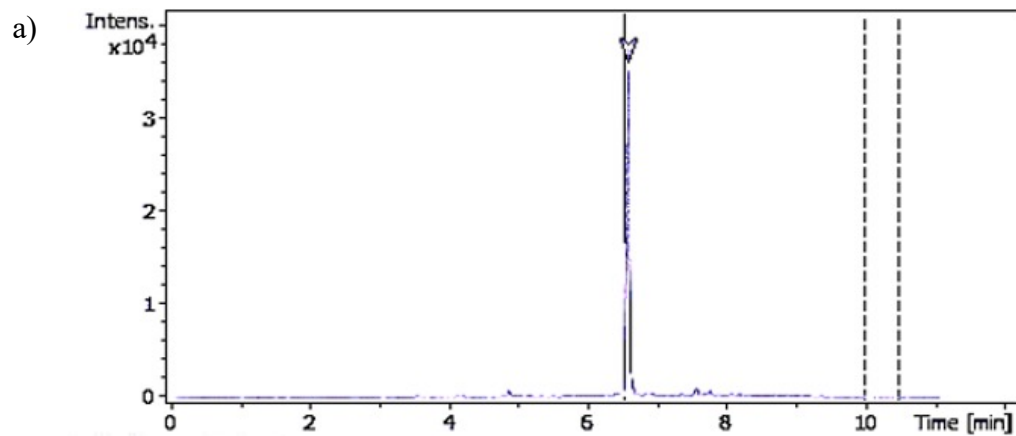


Figura A. 24 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 550,431, da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária.

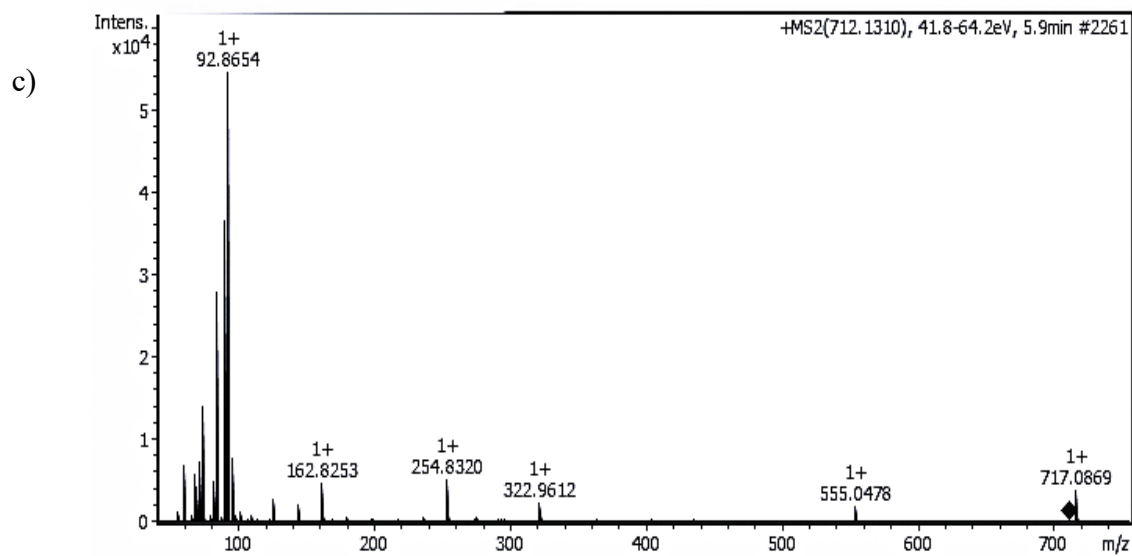
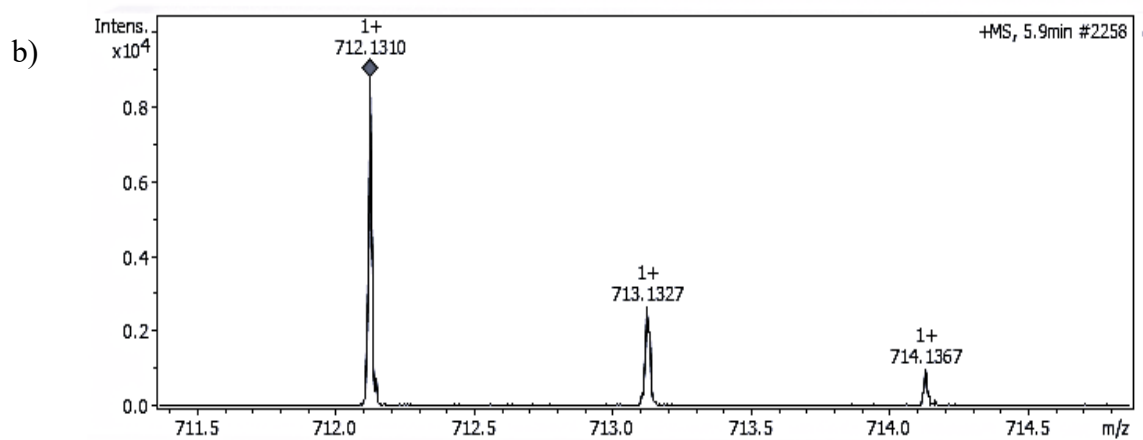
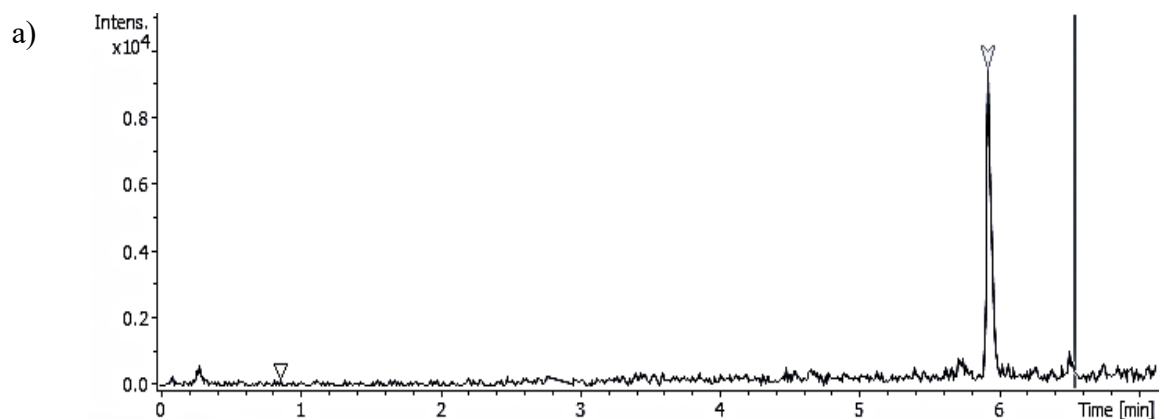


Figura A. 25 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 712,481, da linhagem *Radiococcus* sp. na fase estacionária.

Filter	Hit enter to search	LC-MS	Formulas	Spectra	Trees	Predicted Fingerprint	Structures	Substructure Annotation	Compound Classes				
c1_550_MS1_MS2550.0932		Rank	Molecular Formula	Adduct	Zodiac Score	Sirius Score	Isotope Score	Tree Score	Explained P...	Total Explai...	Median Mas...	Median Abs...	Lipid Class
Ionization [M + 7] ⁺		1	C29H15N3O9	[M + H] ⁺	N/A	9.091%	0,000	1,000	0/0	0,000%	NaN	NaN	None
Precursor 550,09 Da		2	C18H15N8O12	[M + H] ⁺	N/A	9.091%	0,000	1,000	0/0	0,000%	NaN	NaN	None
RT N/A		3	C27H19N8O12	[M + H] ⁺	N/A	9.091%	0,000	1,000	0/0	0,000%	NaN	NaN	None
Confidence		4	C22H19N3O14	[M + H] ⁺	N/A	9.091%	0,000	1,000	0/0	0,000%	NaN	NaN	None
c1_712_MS1_MS2712.1310		5	C21H17N7O10	[M + Na] ⁺	N/A	9.091%	0,000	1,000	0/0	0,000%	NaN	NaN	None
Ionization [M + 7] ⁺		6	C23H15N7O10	[M + H] ⁺	N/A	9.091%	0,000	1,000	0/0	0,000%	NaN	NaN	None
Precursor 712,13 Da		7	C24H17N8O5	[M + K] ⁺	N/A	9.091%	0,000	1,000	0/0	0,000%	NaN	NaN	None
RT N/A		8	C25H21N8O12	[M + Na] ⁺	N/A	9.091%	0,000	1,000	0/0	0,000%	NaN	NaN	None
Confidence		9	C26H17N5O8	[M + Na] ⁺	N/A	9.091%	0,000	1,000	0/0	0,000%	NaN	NaN	None
		10	C17H19N5O16	[M + H] ⁺	N/A	9.091%	0,000	1,000	0/0	0,000%	NaN	NaN	None
		11	C16H23N8O20	[M + H] ⁺	N/A	9.091%	0,000	1,000	0/0	0,000%	NaN	NaN	None

Figura A. 26 - – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da *feature* analisada do cluster D.

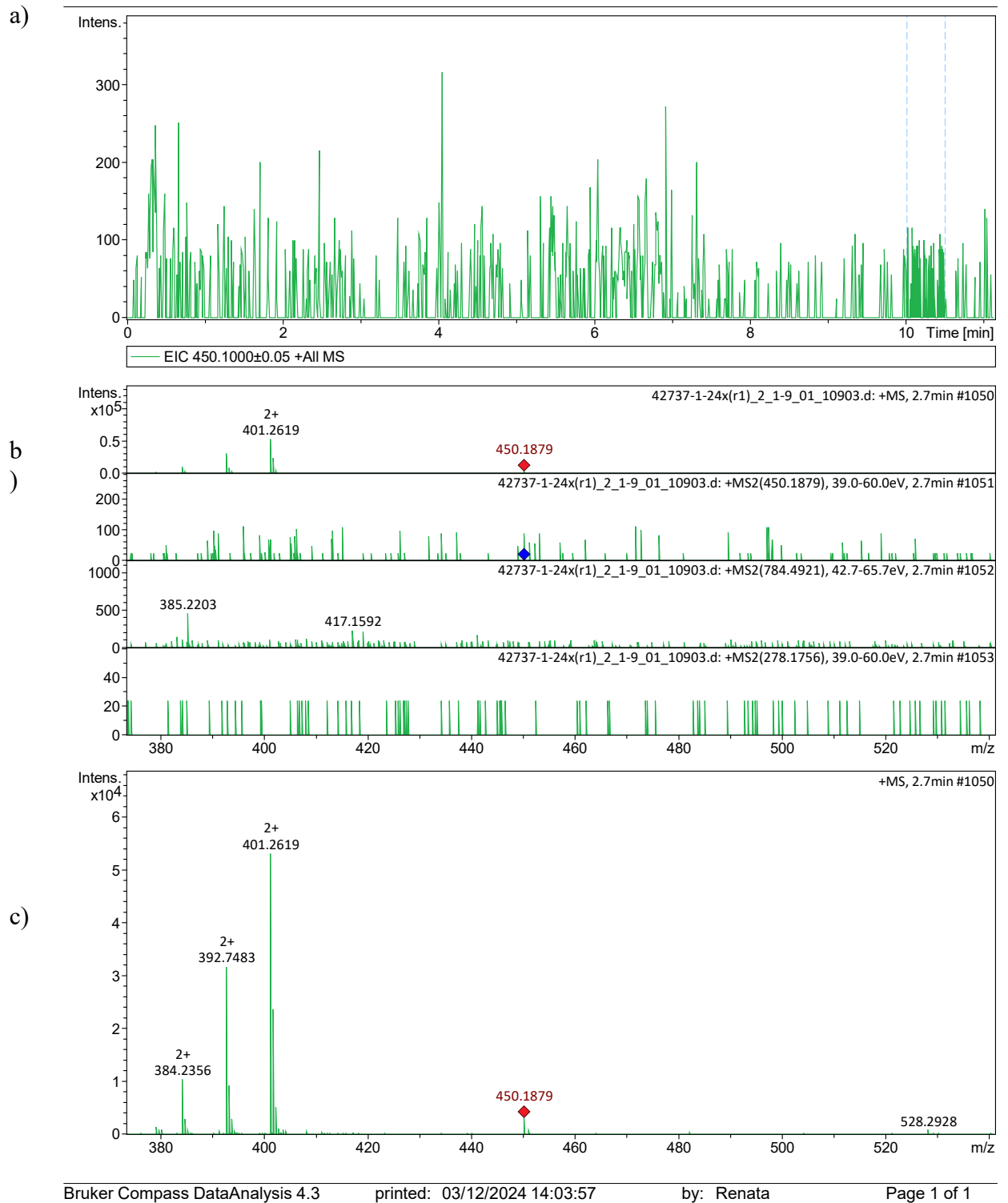


Figura A. 27 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 450,1879, obtido da linhagem *A. arcuatus* na fase exponencial.

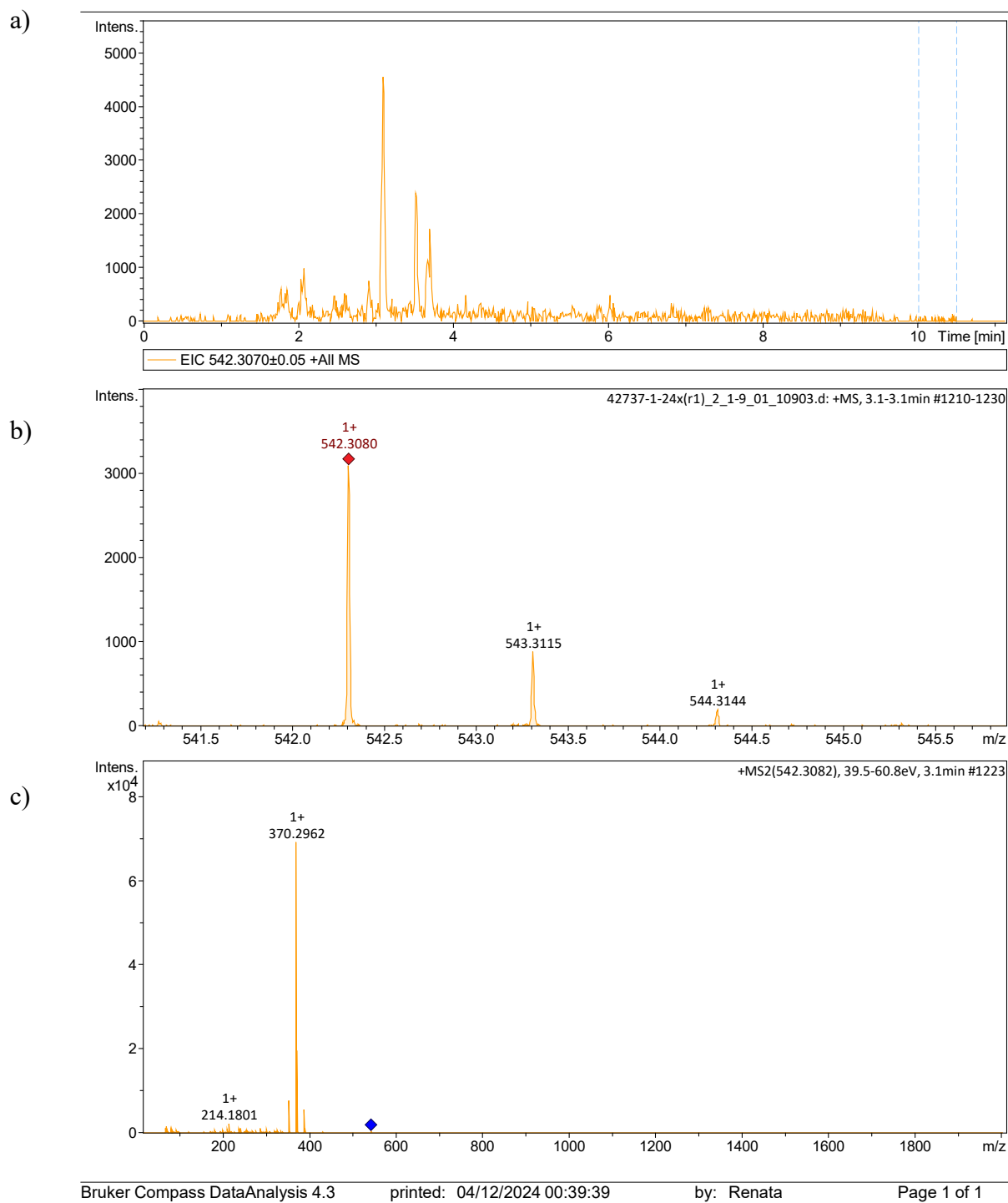


Figura A. 28 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 542,3080, da linhagem *A. arcuatus* na fase exponencial.

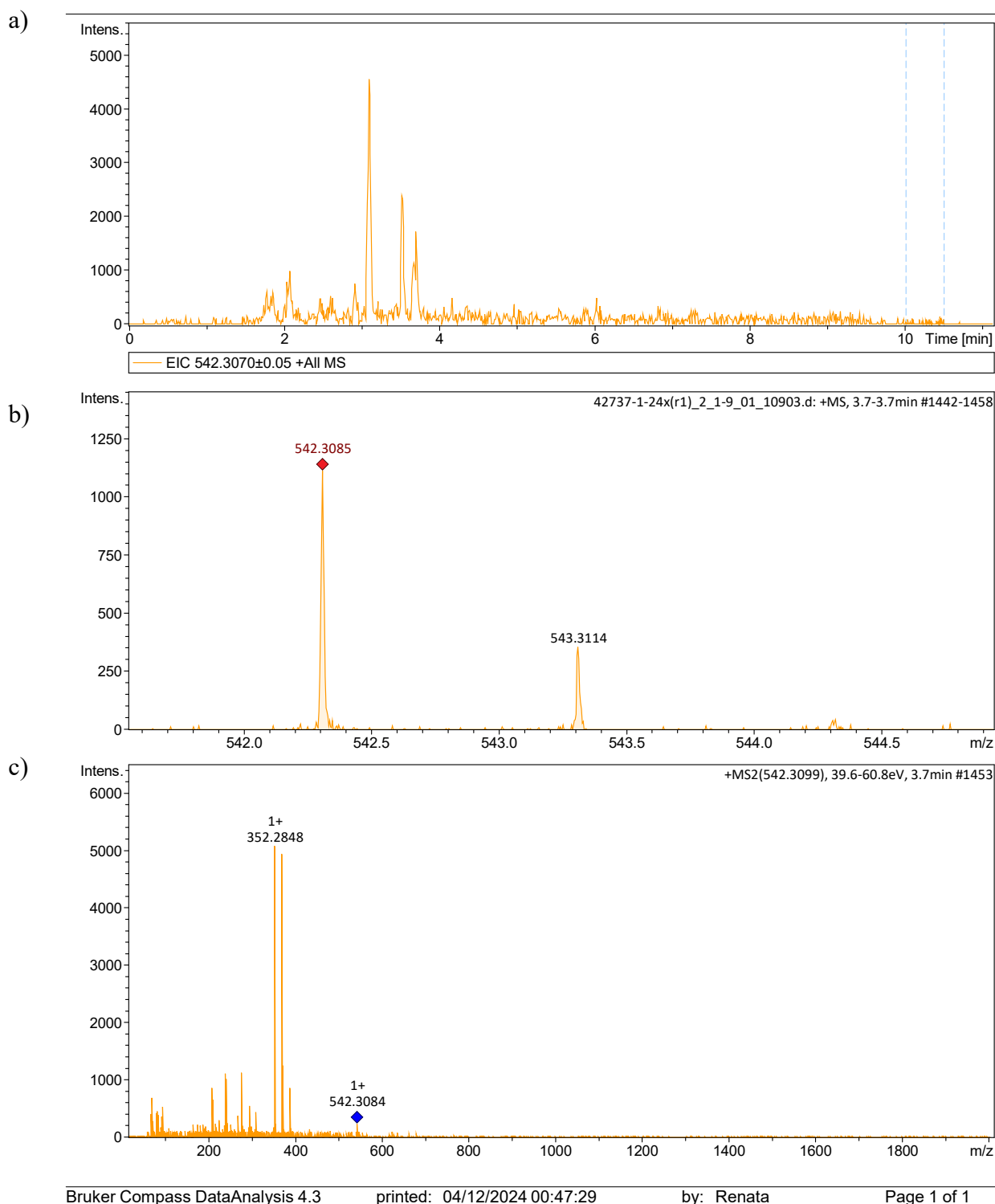


Figura A. 29 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 542,3085, da linhagem *A. arcuatus* na fase exponencial.

6	$C_{19}H_{21}N_3O_7 + C_3H_8O + H^+$	7	$C_{22}H_{26}N_2O_8 + H_3N + H^+$	8	$C_{21}H_{22}N_6O_4 + C_2H_3N + H^+$	9	$C_{20}H_{17}N_3O_7 + H^+$
	SIRIUS 7,786% CSI -228.717		SIRIUS 7,786% CSI -325.772		SIRIUS 3,606% CSI -241.222		SIRIUS 3,606% CSI -241.222

Main Classes

Level 5: **Benzoic acid esters** ⇒ Subclass: **Benzoic acids and derivatives** ⇒ Class: **Benzene and substituted derivatives** ⇒
 Superclass: **Benzenoids** ⇒ Kingdom: **Organic compounds**

Description
 This compound belongs to the class Benzoic acid esters, which describes ester derivatives of benzoic acid.

Alternative Classes

alternative: **Hydroxybenzoic acid derivatives**, **Anilides**, **Indoles**, **Benzoyl derivatives**, **Alkyl aryl ethers**, **Phenols**
 alternative: **Pyrroles**, **Secondary carboxylic acid amides**, **Heteroaromatic compounds**, **Carboxylic acid esters**
 alternative: **Azacyclic compounds**, **Monocarboxylic acids and derivatives**, **Alcohols and polyols**
 alternative: **Organonitrogen compounds**, **Hydrocarbon derivatives**, **Organic oxides**, **Organopnictogen compounds**

Natural Product Classes

Pathway: **Alkaloids**

Figura A. 30 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da *feature* 119386 analisada do cluster A.

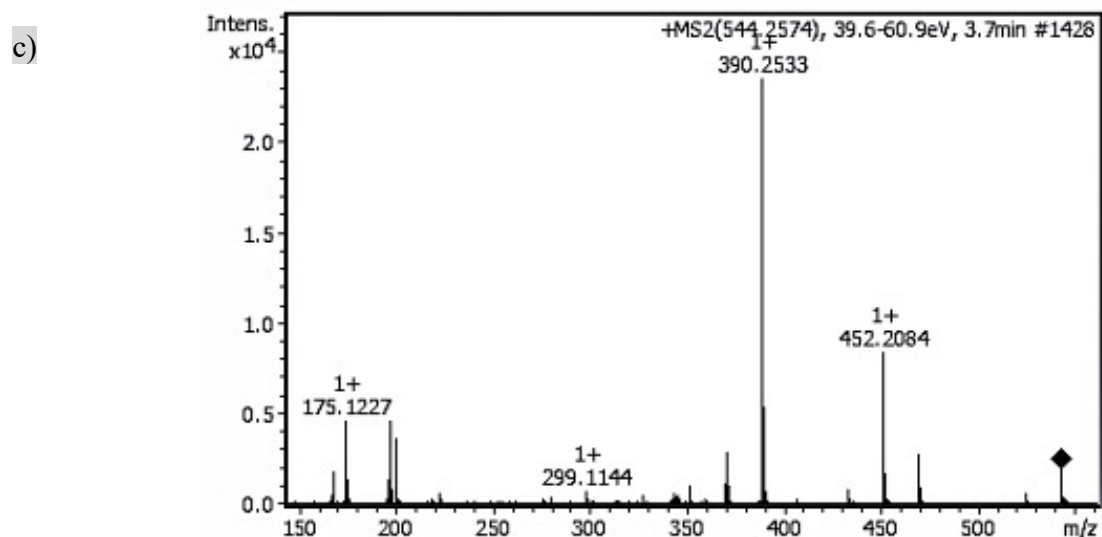
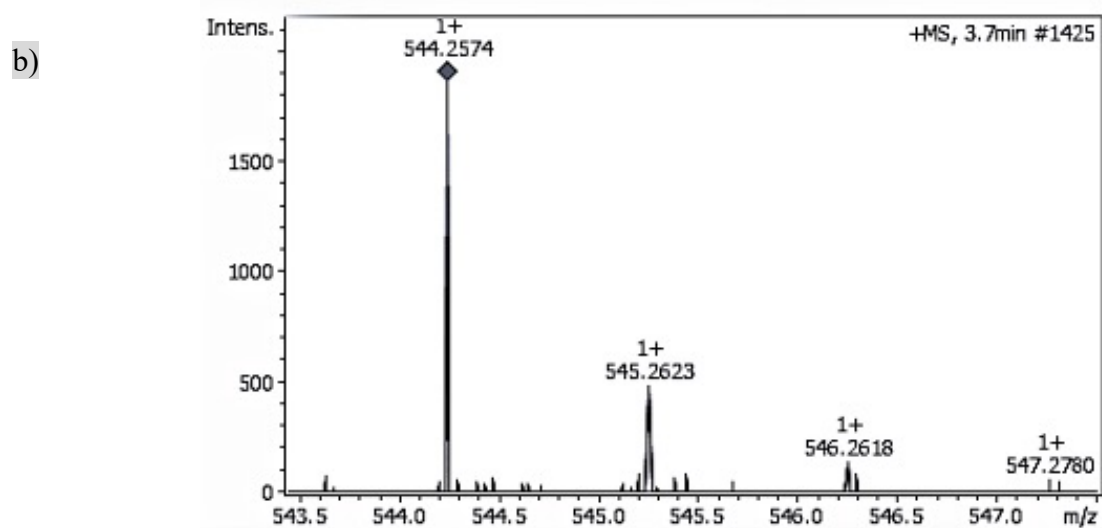
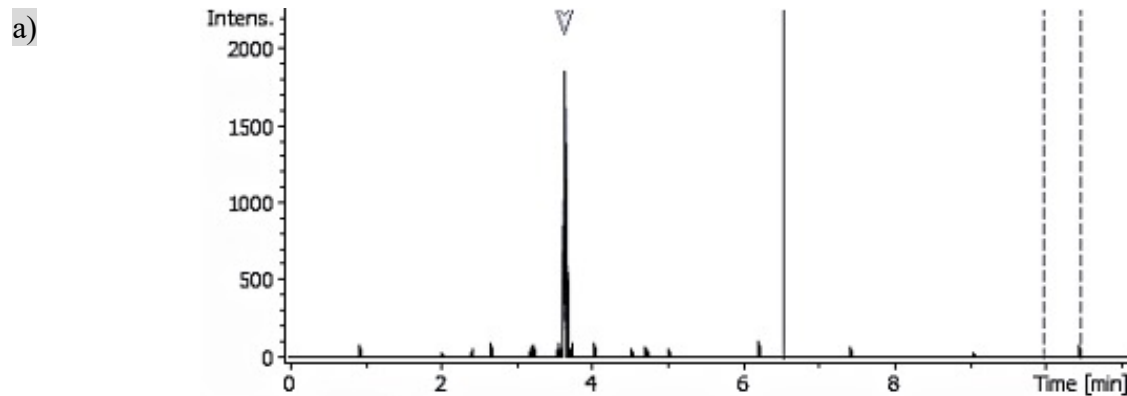


Figura A. 31 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 544,2574.

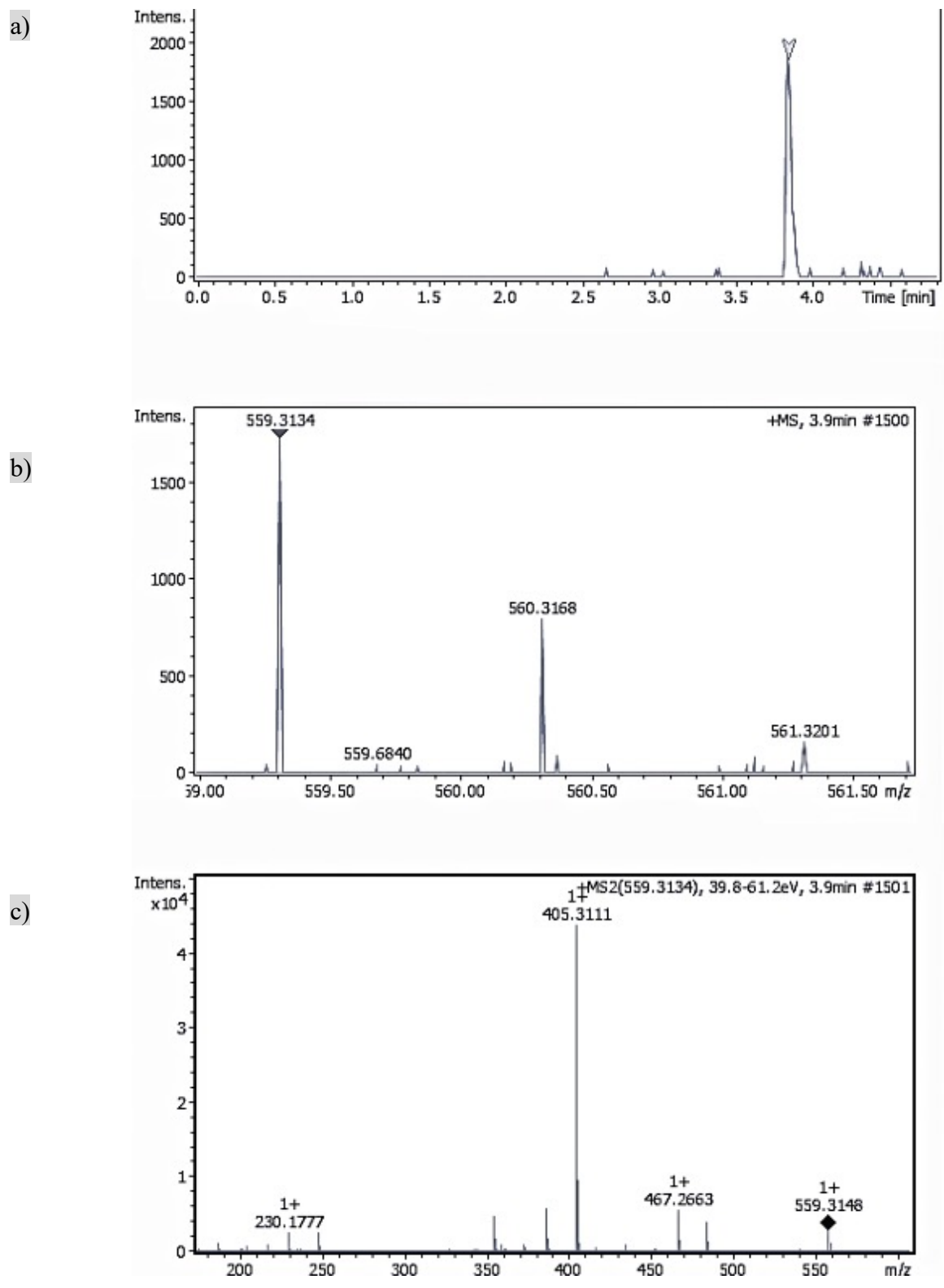


Figura A. 32 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 559,3134.

1	$C_{30}H_{39}N_{3}O_4 + K^+$	2	$C_{28}H_{36}N_{3}O_5P + H_2O + H^+$	3	$C_{28}H_{35}N_2O_6P + H_3N + H^+$	4	$C_{28}H_{40}N_2O_6P + H_3N + H^+$
SIRIUS	52,951%	CSI	-222,467	SIRIUS	5,890%	CSI	-436,066
		SIRIUS	5,890%	CSI	-459,304	SIRIUS	5,890%

Main Classes

Level 5: **Amino acids and derivatives** ⇒ Subclass: **Amino acids, peptides, and analogues** ⇒ Class: **Carboxylic acids and derivatives**

Description
 This compound belongs to the class Amino acids and derivatives, which describes organic compounds containing an amine group, a carboxylic acid group, and a hydroxyl group.

Alternative Classes

alternative: **Benzenoids**, **Pyridines and derivatives**, **Heteroaromatic compounds**, **Carboxylic acid esters**, **Carboxylic acids**

alternative: **Amines**, **Carbonyl compounds**, **Hydrocarbon derivatives**, **Organic oxides**, **Organopnictogen compounds**

Natural Product Classes

Figura A. 33 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da *feature* 119561 analisada do cluster B.

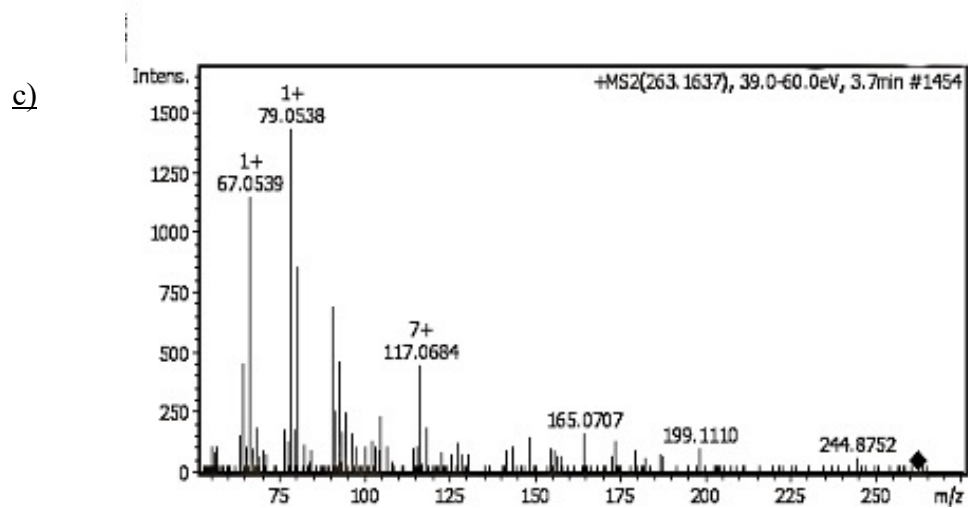
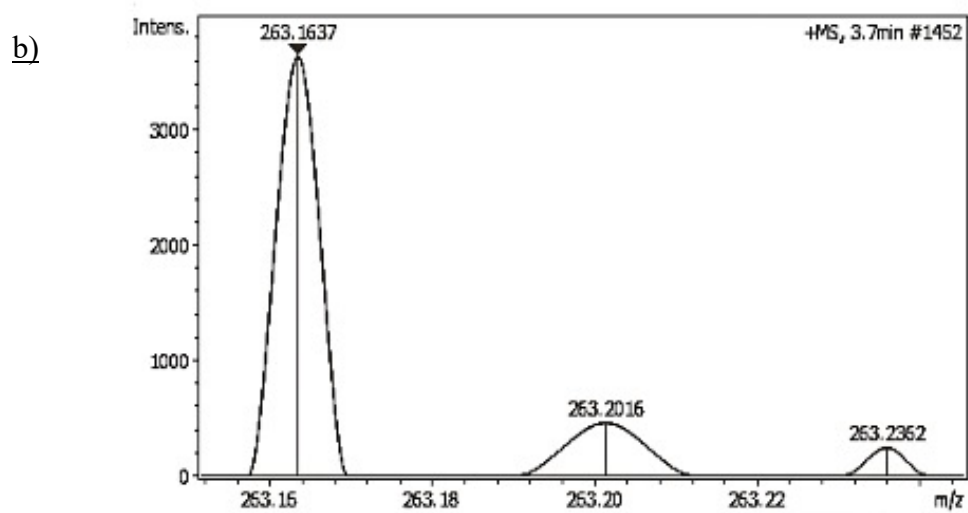
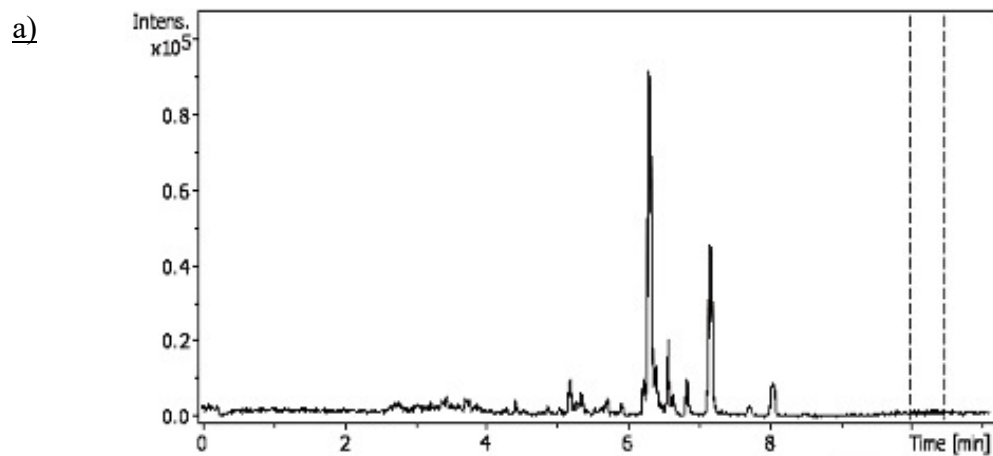


Figura A. 34 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 263,1637.

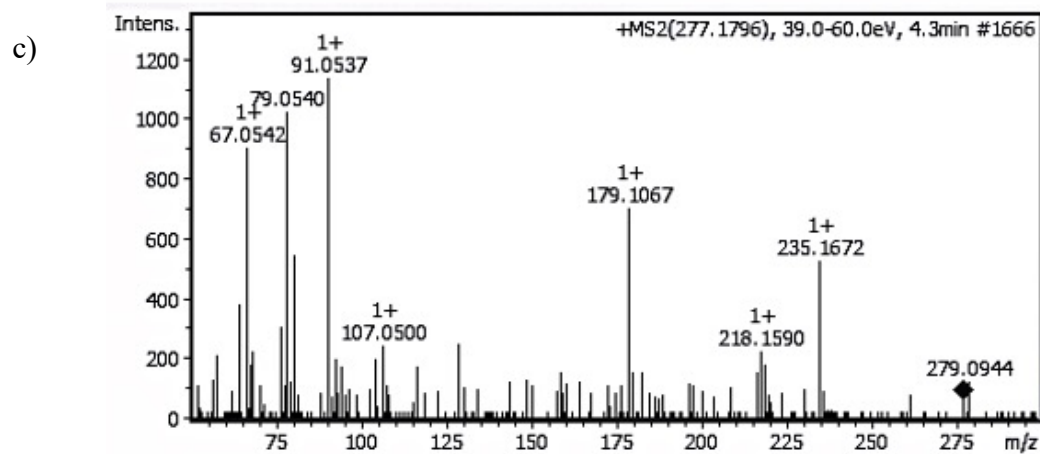
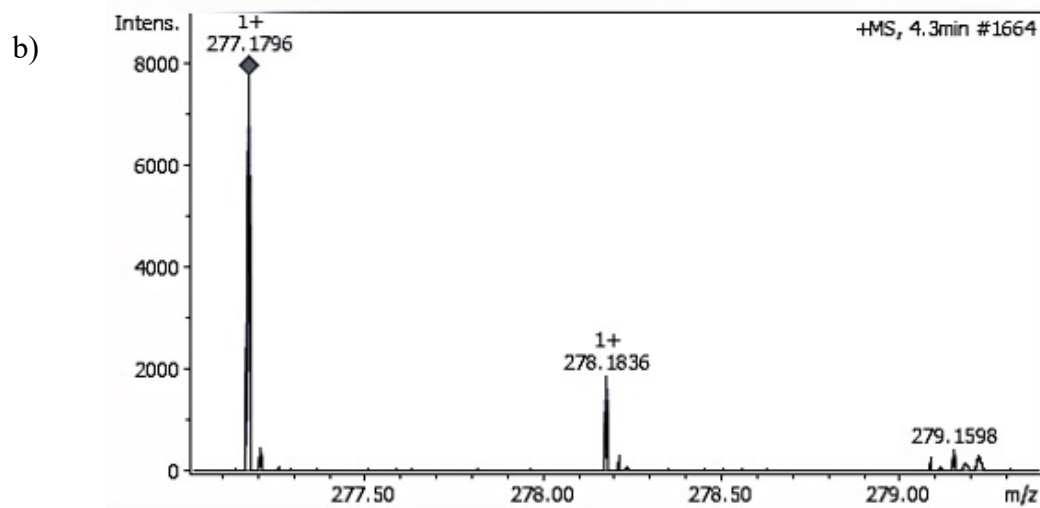
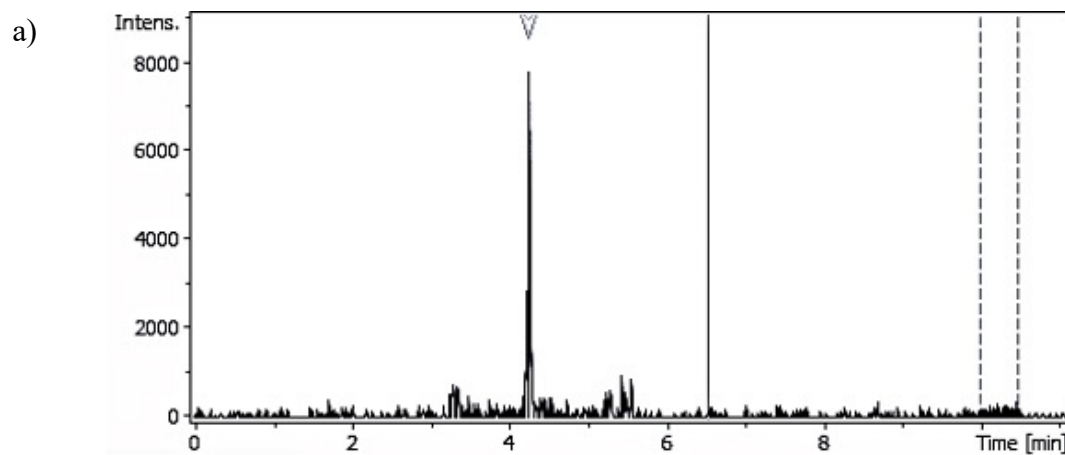


Figura A. 35 – a) Cromatograma e espectros de fragmentação MS1 (b) e MS2 (c) para a *feature* de m/z 277,1796.

1	$C_{14}H_{24}O_3 + Na^+$	2	$C_{16}H_{24}O_4 - H_2O + H^+$	3	$C_{16}H_{22}O_3 + H^+$	4	$C_{14}H_{22}N$
SIRIUS	85,141%	CSI	-70,955	SIRIUS	7,429%	CSI	-75,517
		SIRIUS	7,429%	CSI	-107,018	SIRIUS	0,000

Main Classes

Superclass: **Lipids and lipid-like molecules** ⇒ Kingdom: **Organic compounds**

Description
 This compound belongs to the class Lipids and lipid-like molecules, which describes fatty acids and their derivatives, and substances related biosynthetically or functionally to these compounds.

Alternative Classes

alternative: **Carboxylic acids and derivatives**, **Carbonyl compounds**, **Hydrocarbon derivatives**, **Organic oxides**

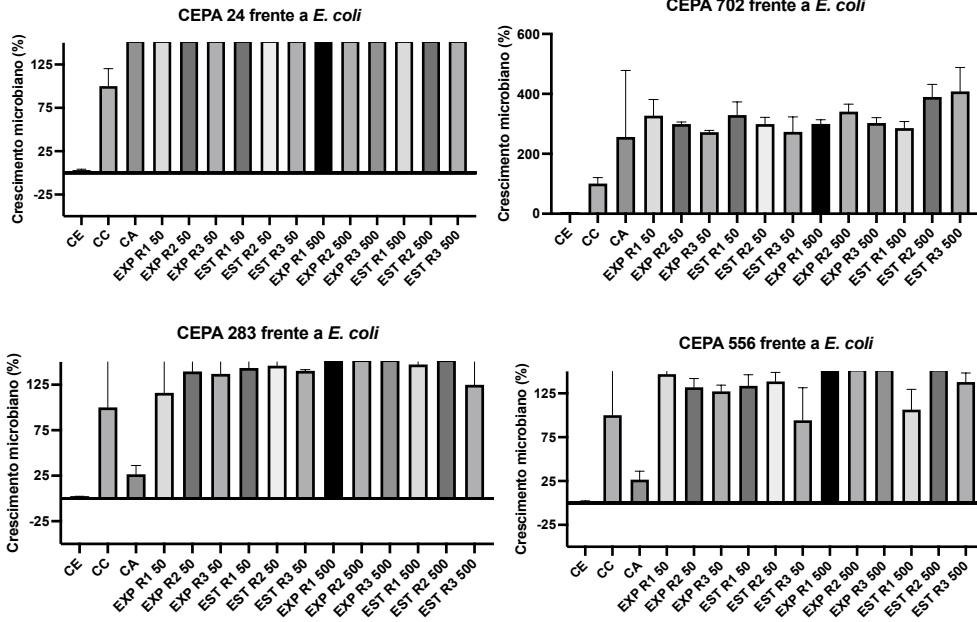
Natural Product Classes

Pathway: **Fatty acids**

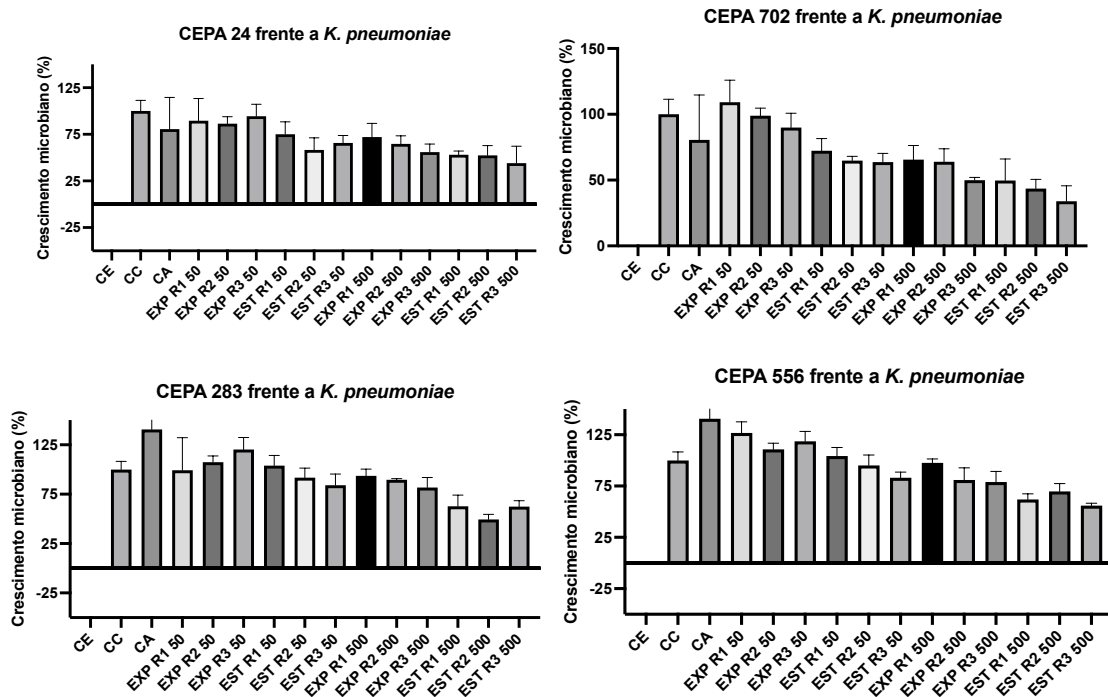
Figura A. 36 – Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da *feature* 64019.

ATIVIDADE MICROBIANA – DEMAIS RESULTADOS

E. coli



K. pneumoniae



S. marcescens

