

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

***Oxilipinas no estudo da biodiversidade de microalgas de água doce***

**Ingritt Caroline Moreira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS.

***Orientador:*** Armando Augusto Henriques Vieira

*São Carlos, Agosto de 2018*



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Ingritt Caroline Moreira, realizada em 24/08/2018:

Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira  
UFSCar

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi  
UFSCar

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho  
UFSCar

Profa. Dra. Cristina Souza Freire Nordi  
UNIFESP

Prof. Dr. Ernani Pinto Junior  
USP

---

# *PENSAMENTO*

Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante.

(Antoine de Saint-Exupéry)

---

## ***AGRADECIMENTOS***

Quero expressar sincero respeito e gratidão ao meu orientador Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira. Agradeço pela oportunidade que me concedeu de fazer parte desta família que conquistei no laboratório de Ficologia da UFSCar, pela paciência em me ensinar e confiança ao abrir as portas desse lugar de estudo. Durante os últimos 12 anos o professor Armando foi uma das principais pessoas que me ensinaram a não ter receio de pensar além do comum e seguir minhas ideias. Obrigada pela oportunidade de me tornar uma ficóloga apaixonada por este mundo microscópico absolutamente maravilhoso!

Aos amigos de laboratório (não um simples local de trabalho, mas sim extensão de nossas casas) por deixarem mais leves e dinâmicos meus dias. Muitas discussões construtivas, “papos cabeça”, momentos de descontração e boas risadas.

À Inessa, obrigada por estar ao meu lado nos momentos de criação e amadurecimento dos artigos, ajudando a organizar as ideias no papel, analisar os dados, discutir e corrigir de forma direta. Mais que isso, você é um exemplo de retidão e perseverança como indivíduo e profissional.

Às queridas Helena, Cilene, Letícia, Thais, Naiara e Rebeca, obrigada pela pronta ajuda em todos os momentos que me socorreram, vocês nem imaginam como foram essenciais nestes nos momentos mais difíceis que passei ao longo desses quatro anos. Mais que isso, obrigada por se preocuparem comigo, pelos bate-papos, cervejinhas e jantas animadas. Obrigada de coração!

Ao Guilherme, Nathan, Marcelo, Fabrício, Chico, e todos os integrantes flutuantes do laboratório de Ficologia, pela parceria e amizade.

Ao Luiz Sartori pela ajuda constante na rotina de laboratório, amizade e companheirismo em todas as horas.

Ao Luisinho, parceiro de coletas de campo, sempre tão animadas e descontraídas.

Aos professores que contribuíram na qualificação deste trabalho, Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi, Profa. Dra. Odete Rocha e o Prof. Dr. Irineu Bianchini Júnior.

Aos professores que constituíram a banca examinadora da defesa deste doutorado, Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi, Profa. Dra. Cristina Souza Freire Nordi, Prof. Dr. Ernani Pinto Júnior, Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e novamente meu orientador, prof. Dr. Armando Vieira.

Aos meus pais (in memoriam), meus exemplos de amor, fé, perseverança, união e humildade, por terem me proporcionado a oportunidade de chegar até aqui, vocês sempre acreditaram em mim.

Ao meu amado Fabrizio, companheiro fiel de todas as horas, maior estimulador de minha criatividade, sem você eu não teria chegado ao fim desta jornada de grandes desafios.

Aos meus irmãos, Yeda e Hilton, por me apoiar sempre, pelo carinho, confiança e incentivo incondicional. Vocês são peça fundamental de meu crescimento e amadurecimento pessoal e profissional!

A minha irmã de coração, Margean por sempre ter um cantinho para me abrigar e comidinha para me alimentar nessas idas e vindas a São Carlos.

A todos os professores do PPGERN, pela oportunidade de aprendizado durante as disciplinas e ao longo dos quatro anos de doutorado. Também agradeço aos colegas da secretaria do PPGERN, principalmente ao João e Roseli, pela ajuda com toda parte burocrática e esclarecimentos sobre os assuntos formais relacionados a pós-graduação.

A Universidade Federal de São Carlos e Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais pela infraestrutura e formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de doutorado e auxílio complementar concedido que tornou possível o desenvolvimento dessa pesquisa, assim como a participação em congressos nacionais e internacionais.

Enfim, a todos aqueles envolvidos direta ou indiretamente nesta jornada de aprendizados, desafios e conquistas, o meu muito obrigada!!!

---

## **RESUMO**

Esta pesquisa tem como foco oxilipinas com dezoito carbonos, substâncias derivadas de ácidos graxos poli-insaturados, produzidas por vinte e duas cepas de algas de água doce, uma cianobactéria e três espécies de plantas, com ênfase em microalgas verdes das divisões Chlorophyta e Charophyta, e também em espécies da família Selenastraceae (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales). O objetivo principal foi detectar, identificar e quantificar as oxilipinas derivadas de ácidos linoléico e linolênico produzidas por esses organismos utilizando-se de técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Utilizou-se cepas de microalgas da coleção de culturas do Laboratório de Ficologia da UFSCar, espécies já classificadas através da taxonomia clássica e/ou molecular, como também espécies de plantas para fins comparativos. Para os experimentos, a biomassa algal foi proveniente do final da fase estacionária.

Uma vez identificados estes compostos pelas técnicas acima, testou-se a possibilidade de se utilizar estes perfis como características diacríticas em uma abordagem quimiotaxonômica para a formação de *clusters* hierárquicos. Também foi discutido o potencial farmacológico destes compostos por apresentarem atividades antibióticas e anti-inflamatórias. Outras possíveis aplicações comerciais também foram abordadas uma vez que as microalgas revelaram seu potencial valor como reservas naturais de hidroxi-ácidos.

Não foi observada qualquer oxilipina exclusiva para determinado organismo que pudesse servir como um indicador de espécie. Esta condição limita a utilização de oxilipinas derivadas de PUFAs C18 na taxonomia da família Selenastraceae. Porém, mesmo assim, a quantidade e proporções das oxilipinas nos diversos perfis permitem que estes compostos forneçam informações complementares sobre os organismos que podem

ser úteis na sua identificação. Houve universalidade quanto à presença das oxilipinas analisadas em todos os grupos taxonômicos estudados. As cepas pertencentes à divisão Chlorophyta apresentaram as maiores concentrações totais de oxilipinas. As algas Charophyta apresentaram concentrações de oxilipinas dezenas de vezes menor que Chlorophyta e semelhantes às concentrações encontradas em plantas, fato que pode estar relacionado à proximidade evolutiva entre plantas e Charophyta.



---

## ***ABSTRACT***

This research focuses on the oxylipins with eighteen carbons, compound derived of polyunsaturated fatty acids, produced by twenty-two species of freshwater algae, one cyanobacteria and three species of plants, with emphasis on green microalgae from the Chlorophyta and Charophyta phylum, and also species of the Selenastraceae family (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales). The aim was detected, identified and quantified oxylipins derived from linoleic and linolenic acids produced by microorganisms using High-Performance Liquid Chromatography coupled tandem Mass Spectrometry technique. It was used microalgae from the Culture Collection of Freshwater Microalgae (CCMA-UFSCar), species already classified by classic and / or molecular taxonomy, as well as the species of plants for comparative purposes. For the experiments, the material came from the end of stationary phase.

Once the compounds were identified by these techniques, it was tested the possibility of using profiles as diacritical characteristics in a chemotaxonomic approach for formation of hierarchical clusters. The pharmacological potential of these compounds was discussed since they present antibiotic and anti-inflammatory activities. Other possible commercial applications were approached since microalgae revealed their potential value as natural sources of hydroxy fatty acids.

No oxylipin was exclusively observed to determined organism that could represents as species indicator. This condition limits the use of oxylipins derived from C18 PUFAs in the taxonomy of the Selenastraceae family, but even so, these compounds provide complementary information for organisms that may be useful in their identification. There was universality regarding the presence of oxylipins analysed in all the taxonomic groups studied. The strains belonging to Chlorophyta division showed the highest total concentrations of oxylipins. Charophyta algae have a concentration of

oxylipins dozens of times lower than Chlorophyta, and similar to concentrations found in plants, which may be related to the evolutionary proximity among plants and Charophyta.

---

## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS***

- 13-d6-HODE – Ácido 13-hidroxi-octadecadienoico com o 6° carbono deuterado.
- ALA – Ácido  $\alpha$ -Linolênico
- ARA – Ácido Araquidônico
- CB – Christina Bock
- CCMA-UFSCar – Coleção de Cultura de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos
- Chl-a – Clorofila-a
- CYP74 – Citocromo P450 74
- DHA – Docosahexaenoico
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- EE Jataí – Estação Ecológica do Jataí
- EPA – Ácido Eicosapentaenoico
- HEPE – Ácido Eicosapentaenoico
- HEpETE – Ácido Hidroxi-Epoxi-Eicosatetranoico
- HHTrE – Ácido Hexadecatrienoico
- HODE - Ácido Hidroxi-Octadecadienoico
- HOTE - Ácido Hidroxi-Octadecatrienoico
- HPLC-MS/MS – High-Performance Liquid Chromatography coupled tandem Mass Spectrometry
- IBt – Instituto de Botânica
- IndVal – Indicator Value
- JA – Ácido Jasmônico
- LA – Ácido Linoleico

LC/MS – Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

LOX – Lipoxigenase

MeJA – Metil-Jasmonato

m/z – Relação Massa-Carga

nMDS – Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (Non-Metric Multidimensional Scaling)

NVO – Oxilipinas Não Voláteis (Non Volatile Oxylipins)

OPDA – Ácido Oxo-Fitodienoico

OXO-ODE - Ácido Oxo-Octadecadienoico

OXO-OME - Ácido Oxo-Octadecanoico

P+G – Peptona+Glicose

PERMANOVA – Análise de Variância Multivariada Permutacional (Permutation Analysis of Variance)

PUA – Aldeídos Poli-insaturados (Polyunsaturated aldehydes)

PUFA – Ácido Graxo Poli-insaturado (Polyunsaturated Fatty Acid)

rDNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico (Ribosomal Ribonucleic Acid)

SIMPER – Similarity Percentages

SRM – Single Reaction Monitoring

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor)

WC – Wright's Cryptophyte

WDCM – World Data Centre for Microorganisms

---

## *LISTA DE FIGURAS*

- Figura 1.1** Principais ácidos graxos poli-insaturados envolvidos na formação de oxilipinas em algas verdes.....25
- Figura 1.2** Oxilipinas encontradas nas microalgas analisadas, seus números, nomes, siglas e estruturas.....37
- Figura 1.3** Médias das concentrações de cada oxilipina nas microalgas analisadas. Barras de erro representam o desvio-padrão de três réplicas independentes.....38
- Figura 1.4** Concentrações relativas (%) dos quatro tipos de oxilipinas encontradas em cada uma das cepas de microalgas analisadas.....41
- Figura 1.5** Análise nMDS utilizando os valores das concentrações dos compostos apresentados para as espécies de microalgas da ordem Sphaeropleales.....47
- Figura 1.6** Análise nMDS utilizando os valores das proporções dos compostos apresentados para as espécies de microalgas da ordem Sphaeropleales.....48
- Figura 2.1** Cladograma simbolizando relações filogenéticas entre classes e divisões abordadas neste estudo. Classificação de acordo com Reiers (2006) 3 Leliaert *et al.* (2012). Abreviações: Crypto – Cryptophyta; Xanto – Xantophyceae; Bacillario – Bacillariophyceae; Chloro – Chlorophyceae; Trebouxio – Trebouxiophyceae; Charo – Charophyceae; Zygnema – Zygnematophyceae; Embryo – Embryophyta.....72
- Figura 2.2** Análise nMDS utilizando os valores das concentrações dos compostos apresentados para as classes de algas verdes, das divisões Chlorophyta (Chlorophyceae e Trebouxiophyceae) e Charophyta (Zygnematophyceae e Charophyceae) e para as plantas terrestres (Magnoliopsida).....85
- Figura 2.3** Dendograma gerado por análise de agrupamento hierárquico (HCA) das espécies da linhagem verde mostrando diferenças nas concentrações de oxilipinas entre plantas terrestres e algas verdes das divisões Chlorophyta e Charophyta (Complete linkage com Distância de Bray-Curtis).....86
- Anexo 1** Curvas de calibração dos padrões comerciais dos compostos **4** (13-HODE), **5/6** (9-HODE), **7/8** (13-OXO-ODE) e **9/10** (9--OXO-ODE).....108
- Anexo 2** Cromatogramas SRM para as oxilipinas presentes nos organismos analisados.....109
- Anexo 3** Valores médios das concentrações ( $\mu\text{g/g}$  de biomassa seca), bem como proporção (entre parênteses) de cada oxilipina por cepa de microalga estudada segundo classificação taxonômica clássica e molecular (Garcia da Silva *et al.*, 2017).....110

**Anexo 4** Valores médios das concentrações ( $\mu\text{g/g}$  de biomassa seca) de cada oxilipina e sua proporção entre parênteses por divisão/classe de algas, cianobactéria e plantas terrestres segundo classificação taxonômica clássica (Reviere, 2006; Bicudo & Menezes, 2017) e molecular (Garcia da Silva *et al.*, 2017).....111

---

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1** Relação das treze cepas pertencentes à família Selenastraceae e um grupo externo analisados por Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometria de massas em tandem (HPLC/MS-MS).....30
- Tabela 1.2** Relação dos tempos de cultivo (em dias) até a fase estacionária de crescimento (dados baseados em curvas de crescimento) e valores (em mg) das biomassas das cepas de microalgas estudadas. Valores de desvio-padrão entre parênteses.....35
- Tabela 1.3** Resultados das análises PERMANOVA por gênero, espécie e cepa de organismos baseadas na matriz de distância das concentrações (A) e (B) na matriz de distância das proporções de oxilipinas, utilizando para ambas a distância de Bray-Curtis. Em itálico destacam-se os resultados das BETADISPERSÃO que não foram estatisticamente significativos para  $p < 0,05$  e, em negrito, os resultados das PERMANOVA que foram estatisticamente significativos para  $p < 0,01$ .....43
- Tabela 1.4** Resultados da análise SIMPER por contraste das espécies de microalgas baseado na matriz de proporções das oxilipinas, utilizando a distância de Bray-Curtis e número de permutações igual a 1000. A espécie em negrito corresponde ao *outgroup*.....45
- Tabela 1.5** Resultados da análise SIMPER por contraste das espécies de microalgas baseado na matriz de concentrações das oxilipinas, utilizando a distância de Bray-Curtis e número de permutações igual a 1000. A espécie em negrito corresponde ao *outgroup*.....46
- Tabela 2.1** Relação das doze cepas de algas eucarióticas, uma cianobactéria e três vegetais superiores analisados por HPLC-MS/MS (High-Performance Liquid Chromatography coupled tandem Mass Spectrometry – Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometria de Massa) .....73
- Tabela 2.2** Relação dos tempos de cultivo (em dias) até a fase estacionária de crescimento (dados baseados em curvas de crescimento) e valores (em mg) das biomassas das cepas de microalgas e a cianobactéria estudadas.....79
- Tabela 2.3** Oxilipinas encontradas nas microalgas analisadas, seus números, nomes, siglas e estruturas.....80
- Tabela 2.4** Resultados das análises PERMANOVA para classes de organismos baseadas na (A) matriz das concentrações de oxilipinas e (B) na matriz das proporções de oxilipinas, utilizando para ambas a distância de Bray-Curtis. Em itálico destacam-se os resultados das BETADISPERSÃO que não foram estatisticamente significativos para  $p < 0,05$  e, em negrito, os resultados das PERMANOVA que foram estatisticamente significativos para  $p < 0,01$ .....84
- Anexo 3** Valores médios das concentrações ( $\mu\text{g/g}$  de biomassa seca), bem como proporção (entre parênteses) de cada oxilipina por cepa de microalga estudada segundo classificação taxonômica clássica e molecular (Garcia da Silva *et al.*, 2017).....110

**Anexo 4** Valores médios das concentrações ( $\mu\text{g/g}$  de biomassa seca) de cada oxilipina e sua proporção entre parênteses por divisão/classe de algas, cianobactéria e plantas terrestres segundo classificação taxonômica clássica (Reviere, 2006; Bicudo & Menezes, 2017) e molecular (Garcia da Silva *et al.*, 2017).....111



---

## **APRESENTAÇÃO DA TESE**

A tese será apresentada da seguinte maneira: (I) Introdução geral; (II) Hipóteses e Objetivos; (III) Capítulo 1 e Capítulo 2 (com resultados, discussões e conclusões) e (IV) Conclusão Geral.

Os capítulos foram escritos em formato de artigo científico, com seus respectivos resumos, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas. Este arranjo foi escolhido para dividir os assuntos desenvolvidos e os resultados obtidos visando publicações de artigos. Visto que a tese está dividida na forma de artigos e ainda haver uma introdução geral e conclusão geral, repetições tornam-se inevitáveis.

O primeiro capítulo apresenta os resultados obtidos em estudo direcionado ao perfil de oxilipinas presentes em microalgas verdes de água doce da grande família Selenastraceae, suas aplicações quimiotaxonômicas, potencial farmacológico e perspectivas comerciais.

O segundo capítulo apresenta uma prospecção de hidroxi- e oxo-ácidos com dezoito carbonos encontrados em quatorze cepas de microalgas de cinco divisões distintas. Para uma análise filogenética comparativa, foram adicionadas três espécies de vegetais superiores. Neste capítulo é destacada a importância econômica e ecológica destes compostos pouco explorados em microalgas de água doce. Este capítulo encontra-se formatado para publicação na revista à qual foi submetido, *Algal Research*.

Por último, uma breve conclusão geral foi elaborada com base nos dois capítulos apresentados.

---

# SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL .....   | 1  |
| Microalgas e sua diversidade na natureza.....  | 1  |
| Taxonomia das Microalgas .....   | 2  |
| Ácidos Graxos nas Microalgas: aspectos quimiotaxonômicos e econômicos .....  | 3  |
| Oxilipinas nas Microalgas: escassez de estudos científicos .....   | 6  |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 11 |
| HIPÓTESES .....  | 19 |
| OBJETIVOS .....  | 20 |
| CAPÍTULO 1 .....   | 21 |
| DIVERSIDADE DE OXILIPINAS EM MICROALGAS DE ÁGUA DOCE DA FAMÍLIA SELENASTRACEAE (SPHAEROPLEALES, CHLOROPHYCEAE) E POTENCIAL QUIMIOTAXONÔMICO..... | 21 |
| 1. RESUMO.....   | 21 |
| 2. ABSTRACT.....   | 23 |
| 3. INTRODUÇÃO .....  | 24 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 29 |
| 4.1 Espécies de microalgas .....   | 29 |
| 4.2 Preparação e Condições de cultivos das microalgas .....  | 31 |
| 4.3 Curvas de crescimento e cultivos experimentais.....  | 31 |
| 4.4 Análises das Oxilipinas .....  | 32 |
| 4.4.1 Extração das Oxilipinas .....  | 32 |
| 4.4.2 Métodos Analíticos para Oxilipinas .....   | 32 |
| 4.5 Análises estatísticas .....  | 33 |
| 5. RESULTADOS .....  | 35 |
| 6. DISCUSSÃO .....   | 49 |
| 7. FINANCIAMENTO .....   | 53 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 54 |
| CAPÍTULO 2 .....   | 60 |
| OCORRÊNCIA DE OXILIPINAS COM 18 CARBORNOS EM MICROALGAS VERDES DE ÁGUA DOCE.....   | 60 |
| 1. RESUMO.....   | 61 |
| 2. ABSTRACT.....   | 63 |

|  |     |
|--|-----|
| 3. INTRODUÇÃO .....                                      | 66  |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....                             | 71  |
| 4.1 Seleção das cepas.....                               | 71  |
| 4.2 Condições de Cultivos .....                          | 74  |
| 4.3 Curvas de crescimento e cultivos experimentais ..... | 74  |
| 4.4 Análises das Oxilipinas .....                        | 75  |
| 4.4.1 Extração das Oxilipinas .....                      | 75  |
| 4.4.2 Métodos Analíticos para Oxilipinas .....           | 76  |
| 4.5 Análises estatísticas .....                          | 77  |
| 5. RESULTADOS .....                                      | 78  |
| 6. DISCUSSÃO .....                                       | 87  |
| 7. FINANCIAMENTO .....                                   | 97  |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                      | 98  |
| 9. DESTAQUES .....                                       | 105 |
| CONCLUSÃO GERAL .....                                    | 106 |
| ANEXOS .....   | 108 |

---

# **INTRODUÇÃO GERAL**

## ***Microalgas e sua diversidade na natureza***

Na ficologia, o termo microalga refere-se às algas microscópicas *stricto sensu* bem como aos microrganismos procarióticos fotossintetizantes, as Cyanobacteria (Reviere, 2006). As microalgas são organismos importantes em todos os ecossistemas aquáticos e podem viver em diversos habitats ecológicos tais como água doce, salobra ou marinha, suportando variação de temperatura e pH, e disponibilidade de nutrientes. Além disso estes organismos também são encontrados na superfície de vários substratos como rochas e plantas (Hoek *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2008).

Embora sejam geralmente de vida livre, um certo número de microalgas vive em simbiótica associação com uma variedade de outros organismos. Elas são responsáveis por mais da metade da produção primária em todo o planeta, fixando CO<sub>2</sub> e liberando O<sub>2</sub> para a atmosfera (Harwood & Guschina, 2009), além de serem a base das cadeias alimentares aquáticas (Tomaselli, 2004; Andersen, 2005; Reynolds, 2006).

As microalgas são um grupo muito variado e altamente especializado de organismos. A sistemática ao nível de Divisão (Phylum) de algas baseia-se na ocorrência e combinações de pigmentos fotossintéticos presentes em diferentes espécies de algas. A natureza química dos produtos de armazenamento, organização da parede celular, particularidades dos cloroplastos, entre outras características desempenham também um importante papel na definição *taxa* superiores de algas (Hoek *et al.*, 1995, Reviere, 2006).

Na classificação taxonômica destes organismos, algumas divisões merecem destaque por sua abundância no meio ambiente. São elas: as algas eucarióticas pertencentes aos grupos Chlorophyta e Streptophyta (esta última intitulada por muitos autores como Charophyta, nome que adotaremos neste trabalho), as chamadas algas

verdes; Ochrophyta, divisão que inclui as classes Bacillariophyceae (também chamadas diatomáceas) e Crysophyceae (algas douradas), que ocorrem em água doce, principalmente, mas também no ambiente marinho; e as Cyanobacteria (procariotos) (Reviere, 2006; Bicudo & Menezes, 2017).

Assim como as plantas terrestres, as microalgas verdes pertencentes às Divisões Chlorophyta e Charophyta apresentam clorofila *a* e *b* como pigmentos fotossintetizantes e utilizam amido como principal material de reserva e, em muitos casos, possuem parede celular de celulose. Essas e outras semelhanças caracterizam estes organismos como pertencentes à base considerada antecessora dos vegetais superiores. Além disso, não surpreende o fato de que algas verdes se assemelhem a vegetais superiores também em relação à composição bioquímica. De fato, muitos autores classificam as Charophyta (Charophyceae + Zygnematophyceae), juntamente com as plantas, em uma superdivisão denominada Streptophyta. Atualmente, as algas, principalmente as pertencentes às Classes Charophyceae, Zygnematophyceae e Chlorophyceae (Chlorophyta) têm sido cada vez mais utilizadas como modelos para o estudo da bioquímica e metabolismo de plantas (Guschina & Harwood, 2006). Tais pesquisas destacam algumas semelhanças metabólicas entre algas e plantas como evoluídos mecanismos de sinalização hormonais e vias regulatórias como rota biossintética dos lipídios (Thompson, 1996).

### ***Taxonomia das Microalgas***

Os critérios de classificação das espécies microalgais vêm sendo alterados ao longo dos últimos 200 anos. Estas modificações são necessárias a fim de se considerar corretamente as características particulares dos *taxa* que são exploradas à medida que os estudos científicos evoluem.

Existe um considerável obstáculo quanto à classificação taxonômica das algas no que diz respeito ao conceito biológico de espécie proposto por Mayr (1942). Devido à sua restrição aos organismos reprodutores sexuais, este conceito não se aplica a um considerável número de espécies algais por não apresentarem reprodução sexuada em seu ciclo de vida. Tal condição torna a tarefa de classificação das algas um desafio. Assim, adotou-se o conceito de espécie morfológica em que o referencial está na observação das características diacríticas baseadas na morfologia de cada organismo (Krienitz & Bock, 2012). Portanto, o esforço para superar a limitação do conceito biológico de espécie em que a reprodução é a característica essencial foi reforçado pela cautela ao adotar o conceito de espécie morfológica utilizado por ficologistas.

A fim de se obter um estudo taxonômico mais acurado, surgiu a necessidade da integração de diversas áreas do conhecimento biológico. Morfologia, genética, fisiologia e quimiotaxonomia cooperam de forma complementar à luz da *taxonomia polifásica*.

### ***Ácidos Graxos nas Microalgas: aspectos quimiotaxonômicos e econômicos***

A *quimiotaxonomia* consiste em uma ferramenta acessória na identificação/classificação de organismos. Esta se apoia na diversidade química expressa em perfis qualitativos e quantitativos de compostos metabólitos primários de diversas classes como ácidos graxos, proteínas, polissacarídeos e metabólitos secundários (p.e. oxilipinas), entre outros. Com o desenvolvimento de métodos de análises cromatográficas e espectrometria de massa, o leque de recursos científicos para avaliar esta diversidade química entre as espécies foi ampliado. Assim, o metabolismo celular torna-se um grande aliado da taxonomia polifásica, uma vez que a síntese metabólica é coordenada principalmente pelo código genético.

Em seu metabolismo, as microalgas produzem uma série de substâncias primordiais às funções intra e extracelulares. Este é o caso dos lipídios que podem assumir diferentes papéis dependendo das necessidades celulares imediatas: componentes estruturais (p.e., membrana celular), substâncias de reserva, entre outras (Harwood & Guschina, 2009). Estima-se que 5 a 50% do peso seco das algas corresponde a lipídios (Breuer *et al.*, 2012; Chisti, 2007). Dentre estes lipídios, destacam-se os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs – polyunsaturated fatty acids) cuja produção algal é caracterizada pela ampla diversidade tanto no que se refere ao tamanho da cadeia carbônica como no número de duplas insaturações (Harwood & Guschina, 2009; Breuer *et al.*, 2013).

PUFAs são considerados compostos bioativos de amplo interesse comercial para as indústrias médica, farmacêutica e nutracêutica. Estes compostos apresentam um destacado papel nutricional tanto para alimentação/saúde humana como animal. Eles representam uma classe de substâncias essenciais para o metabolismo como os ácidos linoléico (C18:2 $\omega$ 6, onde Cx:y é o ácido graxo que contém x carbonos e y duplas ligações e  $\omega$  corresponde ao carbono da primeira instauração a contar da metila terminal),  $\alpha$ -linolênico (C18:3 $\omega$ 3), araquidônico (C20:4 $\omega$ 6), eicosapentaenoico (C20:5 $\omega$ 3) e docosahexaenoico (C22:6 $\omega$ 3) (Pereira *et al.*, 2004). Além disso, os PUFAs são considerados fonte de energia renovável por se tratarem de lipídios que podem ser utilizados na produção de biocombustíveis (Parrish *et al.*, 2015).

A identificação de uma espécie com características desejáveis (p.e., para a indústria alimentícia e farmacêutica, uma espécie que produza altas quantidades de PUFAs ômega 3, 6 e 9) é um componente chave para alcançar a viabilidade econômica do processo. Assim, as microalgas têm um grande potencial econômico como fonte de PUFAs, tanto devido ao seu alto conteúdo destas substâncias, como a facilidade em se

obter biomassa em larga escala por causa de seu crescimento relativamente rápido e sua alta aplicabilidade comercial.

No que concerne à quimiotaxonomia, o perfil dos ácidos graxos pode ser uma ferramenta útil para a classificação das microalgas uma vez que além de serem estruturalmente diversificados, estes são metabólitos da via conservada da acetil coenzima A (Sahu *et al.*, 2013), uma rota metabólica amplamente estudada no contexto quimiotaxonômico na maioria dos organismos vivos como bactérias (Suzuki & Komagata, 1983; Elvert *et al.*, 2013), cianobactérias (Li & Watanabe, 2001; Shukla *et al.*, 2011), microalgas (Lang *et al.*, 2011; Thompson, 1996), macroalgas (Dunstan *et al.*, 2005; Kumari *et al.*, 2013) e plantas (Dussert *et al.*, 2008). Especificamente sobre classificação taxonômica de microalgas, os ácidos graxos são amplamente estudados como marcadores quimiotaxonômicos (Lang *et al.*, 2011; Mori *et al.*, 2018). Uma função ecológica destes compostos consiste no monitoramento de alterações no fitoplâncton, já que estes organismos ditam a situação fisiológica e nutricional de praticamente toda a cadeia alimentar por serem fornecedores de nutrientes essenciais (Kainz *et al.*, 2004; Taipale *et al.*, 2016).

Em microalgas, o perfil de ácidos graxos demonstrou ser conservado dentro de divisões (Hu *et al.*, 2008); ao mesmo tempo, pode variar entre outros grupos taxonômicos. Lang *et al.* (2011) observaram tendências na distribuição de ácidos graxos que refletem relações filogenéticas entre divisões e classes, porém sua variação é grande em nível de espécie. Além disso, pesquisadores concluíram que conteúdos qualitativos e quantitativos de PUFAs e outros ácidos graxos em microalgas da família Selenastraceae (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales) são bastante variáveis, podendo diferenciar gêneros, espécies e até mesmo cepas (Mori *et al.*, 2018).



### ***Oxilipinas nas Microalgas: escassez de estudos científicos***

A oxidação de PUFAs é uma das principais reações do metabolismo celular de lipídeos, cujos produtos são derivados biologicamente ativos chamados oxilipinas (Mosblech *et al.*, 2009). A presença de oxilipinas é generalizada na natureza e ocorrem em fungos, animais, plantas, musgos, algas eucarióticas e procarióticas (Cyanobacteria) e bactérias (Schillmiller & Howe, 2005; Senger *et al.*, 2005; Singh & Del Poeta, 2011). Distintos organismos produzem uma grande variedade de oxilipinas específicas segundo os diversos substratos (PUFAs) e seus grupos enzimáticos característicos de cada grupo.

Nos animais, um grupo amplamente estudado de oxilipinas são os eicosanóides, substâncias oxidadas a partir dos ácidos graxos com vinte carbonos como o ácido eicosapentaenoico (EPA - C20:5) e, principalmente, o ácido araquidônico (ARA - C20:4) (Marks, 2007). Existem três famílias de eicosanóides: os prostanóides, as lipoxinas e os leucotrienos; todas estas substâncias estão intensamente envolvidas com atividades imunológicas pró-inflamatórias bem como mensageiras do sistema nervoso central (Noverr *et al.*, 2003; Marks, 2007).

Os PUFAs que servem de substrato para tais reações podem ser de origem estrutural como fosfolipídios das membranas celulares e galactolipídeos das membranas dos cloroplastos, bem como podem ser substâncias de reserva ou em trânsito no interior da célula (Andreou *et al.*, 2009). O primeiro produto da oxidação tanto química quanto enzimática dos PUFAs são os hidroperóxidos de ácidos graxos que, por sua vez, são oxidados a hidroxi-, oxo- e epóxi-ácidos, divinil éters, compostos voláteis como álcoois e aldeídos poli-insaturados (PUAs), jasmonatos das plantas (Blée, 1998; Bouarab *et al.*, 2004; Guschina & Harwood, 2006; Cutignano *et al.*, 2011) entre outros.

Com relação às algas, a maioria dos estudos foi realizado com macroalgas marinhas e microalgas diatomáceas marinhas. Além de uma pequena quantidade de

PUFAs com 18 carbonos, as macroalgas pertencentes aos grupos Rhodophyta e Phaeophyceae possuem PUFAs com 20 carbonos, incluindo ácidos araquidônico (ARA-C20:4) e eicosapentaenoico (EPA-C20:5) que também podem ser oxidados a estes compostos bioativos (Abou El-Wafa *et al.*, 2009; Gerwick *et al.*, 1993; Gerwick, 1994; Kumari *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013). Na classe macroalgas verdes, a fonte de oxilipinas encontra-se na oxidação de PUFAs C18, como é o caso do ácido linolênico (ALA-C18:3) e o ácido linoleico (LA-C18:2) (Andreou *et al.*, 2009; Guschina & Harwood, 2006; Gerwick, 1994).

As microalgas podem produzir oxilipinas a partir de PUFAs C18, C16 e C20 (Andreou *et al.*, 2009; Guschina & Harwood, 2006; D'Ippolito *et al.*, 2005; Santiago-Vazquez *et al.*, 2004). Embora sua função em microalgas não tenha sido estabelecida, é considerada a hipótese de que as oxilipinas atuam como mensageiros e podem estar envolvidas em uma ampla gama de atividades em algas, como reparação de lesões, homeostasia, crescimento, defesa química e adaptação ambiental (Gerwick, 1994; Pohnert & Boland, 2002).

As diatomáceas (Bacillariophyceae, Ochrophyta) constituem a classe alvo da maior parte dos estudos envolvendo microalgas e oxilipinas. Nesse *taxon* a oxidação dos PUFAs C16, C18 e C20 produz uma série de oxilipinas. Um tipo de oxilipina que exhibe grande destaque para estas microalgas são os PUAs, compostos envolvidos na defesa química contra predadores e também na sinalização molecular, p.e. moléculas envolvidas na sinalização de morte celular (Caldwell, 2009; Fontana *et al.*, 2007; Pohnert, 2005). Em termos ecológicos, é notável a importância dos PUAs no ambiente. Há cerca de 15 anos iniciou-se a obtenção de dados que mostram que os PUAs podem inibir a eclosão de ovos e causar malformações em juvenis de copépodos marinhos que se alimentam de diatomáceas (Miralto *et al.*, 1999). Entretanto, ainda existe muita controvérsia a respeito

dos efeitos deletérios sobre a reprodução de predadores que se alimentam de diatomáceas produtoras de PUAs (Jónasdóttir *et al.*, 1998; Ianora *et al.*, 1999; Ianora *et al.*, 2003; Korski *et al.*, 2008). Em diatomáceas, eventos de predação como quebra de suas frústulas por ataque de copépodos desencadeiam as reações enzimáticas envolvidas na produção de PUAs e outras oxilipinas.

Os PUAs também podem assumir um papel inibitório do crescimento de espécies bacterianas (Adolph *et al.*, 2004, Ribalet *et al.*, 2008) e de microalgas, a fim de favorecer certas espécies fitoplanctônicas (Adolph *et al.*, 2004; Casotti *et al.*, 2005; Ribalet *et al.*, 2007). Através de altas concentrações destes compostos, sua ação se daria por efeitos genotóxicos, interferindo na progressão do ciclo celular ou induzindo a degradação do DNA e a fragmentação da cromatina, um mecanismo que se assemelha ao da apoptose em organismos superiores (Casotti *et al.*, 2005). Porém, segundo Jüttner (2005), pelo menos em algumas diatomáceas de água doce formadoras de biofilmes, os PUAs atuariam também como moléculas sinalizadoras avisando sobre a toxicidade do ácido eicosapentanoico (C20:5, um dos principais precursores das oxilipinas em diatomáceas) que é formado em grandes concentrações e é retido pelas células fraturadas, enquanto os PUAs são liberados no meio. Além disso, obteve-se indícios que PUAs podem estar envolvidos em mecanismos de *stress-signaling* na diatomácea marinha *Phaeodactylum tricorutum* (Vardi *et al.*, 2006). Esta espécie de diatomácea, na presença de altas concentrações de PUAS, entra em apoptose, mas, se expostas a concentrações intermediárias, adquirem resistência às altas concentrações.

Ainda sobre o papel das oxilipinas em diatomáceas, recentemente foram obtidos resultados que mostram que outros tipos de oxilipinas com efeitos deletérios à reprodução de copépodos podem ser produzidos por estas microalgas (Fontana *et al.*, 2007; Barreiro *et al.*, 2011). Tais compostos são conhecidos como oxilipinas não voláteis (NVOs),

oriundas de oxidação de PUFA, porém envolvem outras rotas enzimáticas. Em diatomáceas marinhas, oxilipinas não-voláteis como ácido 9-hexadecatrienoico (9-HHTrE), ácido 15-hidroxi-5,8,11,13,17-eicosapentanoico (15S-HEPE) e ácido 13,14-13R-hidroxi-14S,15S-trans-epoxyeicosa-5Z,8Z,11Z,17Z-tetranoico (13,14-HEpETE) e 15-oxo-ácido-5Z,9E,11E,13E-pentadecatetranoico (15-oxo-ácido) já foram detectadas (Barreiro *et al.*, 2011). Ainda, d'Ippolito (2009) sugerem que a produção de NVOs está envolvida no término de florações de diatomáceas por funcionar como um sinalizador de morte celular sob condições de estresse ambiental.

Muitas pesquisas sobre a ação/aplicação destes compostos também foram desenvolvidas ao longo das duas últimas décadas, o que mostrou um grande potencial farmacológico de algumas oxilipinas produzidas por microalgas e plantas envolvendo atividades anti-inflamatórias e ação antibiótica (Reyes *et al.*, 2014; Trapp *et al.*, 2015).

Em se tratando de águas continentais, apesar do primeiro relato destes compostos em diatomáceas ser obtido com espécies de água doce (Wender & Jüttner 1996), dados sobre oxilipinas nesta e em outras classes de microalgas destes ambientes não são muito numerosos e os existentes abordaram apenas alguns *taxa* superiores. PUAs foram detectados nas Chrysophyceae *Synura uvella* (Jüttner, 1981); *Synura petersenni*, *Dinobryon cylindricum* e *Dinobryon divergens* (Watson *et al.*, 2001) e *Mallomonas papillosa*, *Dinobryon cylindricum* e *Uroglena americana* (Watson & Satchwill, 2003). Também é relatado na literatura a ocorrência de NVOs como os hidroxi-ácidos estudados em *Euglena gracilis* (Euglenophyta) de Santiago-Vazquez e colaboradores (2004).

Um dos principais grupos de microalgas de água doce são as verdes, clorofíceas (Chlorophyta), principalmente as pertencentes à classe Chlorophyceae (sensu Hoek *et al.*, 1995) que frequentemente são dominantes em corpos d'água doce lânticos. Porém, outras classes de algas verdes também são importantes produtoras de biomassa nesses

ambientes, como é o caso das Zygnematophyceae (Charophyceae) e Pleurostrophyceae (Trebouxiophyceae). São raros os relatos sobre oxilipinas em algas verdes, salvo alguns trabalhos relacionados com macroalgas marinhas: *Acrosiphonia coalita*, *Cladophora columbiana* (Gerwick *et al.*, 1993) e *Ulva fasciata* (Tsai *et al.*, 2008). Com relação às microalgas verdes de água doce, até o presente momento foram registrados apenas seis estudos sobre este grupo de metabólitos secundários: três envolvendo a Chlorophyta *Chlorella pyrenoidosa* (Trebouxiophyceae) (Watson & Satchwill, 2003; Zimmerman & Vick, 1973; Vick & Zimmerman, 1989; Nuñez *et al.*, 2000), um com *Chlamydomonas debaryana* (Chlorophyta, Chlorophyceae) (Reyes *et al.*, 2014) e outro sobre enzimas de *Klebsormidium flaccidum*, uma microalga filamentosa da divisão Streptophyta (Koeduka *et al.*, 2015). Ressalta-se que o trabalho de Zimmerman & Vick (1973), além de ser o primeiro trabalho a abordar a produção de oxilipinas em algas, foi um dos primeiros sobre a ocorrência desses compostos em todos os organismos.

Sabe-se pouco sobre oxilipinas e seus PUFAs precursores em microalgas de água continentais. Assim, mesmo nas diatomáceas não existem informações sobre a produção de oxilipinas voláteis, se estas reações são de ampla ocorrência e se tal fato está relacionado a certos grupos taxonômicos, ou até linhagens (Barreiro *et al.*, 2011), ou se depende de condições ambientais, ou até um particular estado fisiológico das células (Ribalet *et al.*, 2007).

De um modo geral, podemos concluir que informações sobre oxilipinas em microalgas de água doce pertencentes à classe Chlorophyceae são muito raras, e para a família Selenastraceae são mais raras ainda.

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABOU-ELWAFI, G. S. E. *et al.* Three new unsaturated fatty acids from the marine green alga *Ulva fasciata* Delile. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 64, n. 10, p. 1199-1207, 2009.

ADOLPH, S. *et al.* Cytotoxicity of diatom-derived oxylipins in organisms belonging to different phyla. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 17, p. 2935-2946, 2004.

ANDERSEN, R. A. (Ed.). **Algal culturing techniques**. 1ª. Ed., Academic Press, Cambridge, USA, 2005, 578 p.

ANDREOU, A.; BRODHUN, F.; FEUSSNER, I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 3, p. 148-170, 2009.

BARREIRO, A. *et al.* Diatom induction of reproductive failure in copepods: the effect of PUAs versus non-volatile oxylipins. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 401, n. 1-2, p. 13-19, 2011.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. 3ª. Ed., Rima, 2017.

BLÉE, E. Phytooxylipins and plant defense reactions. **Progress in Lipid Research**, v. 37, n. 1, p. 33-72, 1998.

BOUARAB, K. *et al.* The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1838-1848, 2004.

BREUER, G. *et al.* The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 217-226, 2012.

- BREUER, G. *et al.* Analysis of fatty acid content and composition in microalgae. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 80, 2013.
- CALDWELL, G. S. The influence of bioactive oxylipins from marine diatoms on invertebrate reproduction and development. **Marine Drugs**, v. 7, n. 3, p. 367-400, 2009.
- CASOTTI, R. *et al.* Growth inhibition and toxicity of the diatom aldehyde 2-trans, 4-trans-decadienal on *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). **Journal of Phycology**, v. 41, n. 1, p. 7-20, 2005.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- CUTIGNANO, A. *et al.* Lipoxygenase products in marine diatoms: a concise analytical method to explore the functional potential of oxylipins. **Journal of Phycology**, v. 47, n. 2, p. 233-243, 2011.
- REYES, C. *et al.* Oxylipins from the microalgae *Chlamydomonas debaryana* and *Nannochloropsis gaditana* and their activity as TNF- $\alpha$  inhibitors. **Phytochemistry**, v. 102, p. 152-161, 2014.
- REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. 1<sup>a</sup>. Ed., Artmed, Porto Alegre, BR, 2006, 280 p.
- D'IPPOLITO, G. *et al.* New C 16 fatty-acid-based oxylipin pathway in the marine diatom *Thalassiosira rotula*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, n. 22, p. 4065-4070, 2005.
- D'IPPOLITO, G. *et al.* 15S-Lipoxygenase metabolism in the marine diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima*. **New Phytologist**, v. 183, n. 4, p. 1064-1071, 2009.
- DUNSTAN, G. A.; BROWN, M. R.; VOLKMAN, J. K. Cryptophyceae and Rhodophyceae; chemotaxonomy, phylogeny, and application. **Phytochemistry**, v. 66, n. 21, p. 2557-2570, 2005.

DUSSERT, S. *et al.* Effectiveness of the fatty acid and sterol composition of seeds for the chemotaxonomy of *Coffea* subgenus *Coffea*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 17, p. 2950-2960, 2008.

ELVERT, M. *et al.* Characterization of specific membrane fatty acids as chemotaxonomic markers for sulfate-reducing bacteria involved in anaerobic oxidation of methane. **Geomicrobiology Journal**, v. 20, n. 4, p. 403-419, 2003.

FONTANA, A. *et al.* LOX-induced lipid peroxidation mechanism responsible for the detrimental effect of marine diatoms on zooplankton grazers. **Chembiochem**, v. 8, n. 15, p. 1810-1818, 2007.

FONTANA, A. *et al.* Chemistry of oxylipin pathways in marine diatoms. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 481-490, 2007.

GERWICK, W. H. *et al.* Biologically active oxylipins from seaweeds. **Hydrobiologia**, v. 260, n. 1, p. 653-665, 1993.

GERWICK, W. H. Structure and biosynthesis of marine algal oxylipins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1211, n. 3, p. 243-255, 1994.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 160-186, 2006.

HARWOOD, J. L.; GUSCHINA, I. A. The versatility of algae and their lipid metabolism. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 679-684, 2009.

HOEK, C.; MANN, D.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press, 1995.

HU, Q. *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.



IANORA, A.; MIRALTO, A.; POULET, S. A. Are diatoms good or toxic for copepods? Reply to comment by Jónasdóttir *et al.* **Marine Ecology Progress Series**, v. 177, p. 305-308, 1999.

IANORA, A.; POULET, S. A.; MIRALTO, A. The effects of diatoms on copepod reproduction: a review. **Phycologia**, v. 42, n. 4, p. 351-363, 2003.

JÓNASDÓTTIR, S. H. *et al.* Role of diatoms in copepod production: good, harmless or toxic? **Marine Ecology Progress Series**, v. 172, p. 305-308, 1998.

JÜTTNER, F. Detection of lipid degradation products in the water of a reservoir during a bloom of *Synura uvella*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 100-106, 1981.

JÜTTNER, F. Evidence that polyunsaturated aldehydes of diatoms are repellents for pelagic crustacean grazers. **Aquatic Ecology**, v. 39, n. 3, p. 271-282, 2005.

KAINZ, M.; ARTS, M. T.; MAZUMDER, A. Essential fatty acids in the planktonic food web and their ecological role for higher trophic levels. **Limnology and Oceanography**, v. 49, n. 5, p. 1784-1793, 2004.

KOEDUKA, T. *et al.* Biochemical characterization of allene oxide synthases from the liverwort *Marchantia polymorpha* and green microalgae *Klebsormidium flaccidum* provides insight into the evolutionary divergence of the plant CYP74 family. **Planta**, v. 242, n. 5, p. 1175-1186, 2015.

KOSKI, M.; WICHARD, T.; JÓNASDÓTTIR, S. H. "Good" and "bad" diatoms: development, growth and juvenile mortality of the copepod *Temora longicornis* on diatom diets. **Marine Biology**, v. 154, n. 4, p. 719-734, 2008.

KRIENITZ, L.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, v. 698, n. 1, p. 295-326, 2012.

KUMARI, P.; REDDY, R.; JHA, B. Quantification of selected endogenous hydroxy-oxylipins from tropical marine macroalgae. **Marine Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 74-87, 2014.

KUMARI, P. *et al.* Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. **Phytochemistry**, v. 86, p. 44-56, 2013.

LANG, I. *et al.* Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 124, 2011.

LEE, R. E. **Phycology**. 4<sup>a</sup> Ed., Cambridge University Press, New York, USA, 2008, 547 p.

LI, R.; WATANABE, M. M. Fatty acid profiles and their chemotaxonomy in planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) with straight trichomes. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 727-731, 2001.

MARKS, F. Arachidonic acid and companions: an abundant source of biological signals. Prostaglandins, Leukotrienes and Other Eicosanoids: From Biogenesis to Clinical Application, p. 1-46, 2007.

MAYR, E. **Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist**. 7<sup>a</sup> Ed., Harvard University Press, Cambridge, USA, 1942. 334 p.

MIRALTO, A. *et al.* The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. **Nature**, v. 402, n. 6758, p. 173, 1999.

MOSBLECH, A.; FEUSSNER, I.; HEILMANN, I. Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 511-517, 2009.

MORI, C. C. *et al.* Use of fatty acids in the chemotaxonomy of the family Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae). **Phytochemistry**, v. 151, p. 9-16, 2018.

NOVERR, M.C.; ERB-DOWNWARD, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 517-533, 2003.

NUÑEZ, A. *et al.* Anaerobic lipoxygenase activity from *Chlorella pyrenoidosa* responsible for the cleavage of the 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 3, p. 181-188, 2000.

PARRISH, C. C. *et al.* Direct determination of fatty acids in fish tissues: quantifying top predator trophic connections. **Oecologia**, v. 177, n. 1, p. 85-95, 2015.

PEREIRA, S. L. *et al.* Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the  $\omega$ 3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid. **Biochemical Journal**, v. 384, n. 2, p. 357-366, 2004.

POHNERT, G.; BOLAND, W. The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms. **Natural Product Reports**, v. 19, n. 1, p. 108-122, 2002.

POHNERT, G. Diatom/copepod interactions in plankton: the indirect chemical defense of unicellular algae. **ChemBioChem**, v. 6, n. 6, p. 946-959, 2005.

REYNOLDS, C. S. **Ecology of Phytoplankton** - Ecology, Biodiversity and Conservation. 1<sup>a</sup>. Ed., Cambridge University Press, New York, USA, 2006, 564p.

RIBALET, F. *et al.* Growth inhibition of cultured marine phytoplankton by toxic algal-derived polyunsaturated aldehydes. **Aquatic Toxicology**, v. 85, n. 3, p. 219-227, 2007.

RIBALET, F. *et al.* Differential effect of three polyunsaturated aldehydes on marine bacterial isolates. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 2, p. 249-255, 2008.

SANTIAGO-VÁZQUEZ, L. Z. *et al.* Identification of hydroxy fatty acids by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectroscopy in *Euglena gracilis*. **Journal of Chromatography B**, v. 803, n. 2, p. 233-236, 2004.

SAHU, A. *et al.* Fatty acids as biomarkers of microalgae. **Phytochemistry**, v. 89, p. 53-58, 2013.

SCHILMILLER, A. L.; HOWE, G. A. Systemic signaling in the wound response. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 369-377, 2005.

SENGER, T. *et al.* A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 7588-7596, 2005.

SHUKLA, E. *et al.* Chemotaxonomy of heterocystous cyanobacteria using FAME profiling as species markers. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 651-661, 2012.

SINGH, A.; DEL POETA, M. Lipid signalling in pathogenic fungi. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 177-185, 2011.

SUZUKI, K.; KOMAGATA, K. Taxonomic significance of cellular fatty acid composition in some coryneform bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 188-200, 1983.

TAIPALE, S. J. *et al.* Suitability of phytosterols alongside fatty acids as chemotaxonomic biomarkers for phytoplankton. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, artigo 212, 2016.

THOMPSON JR, G. A. Lipids and membrane function in green algae. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1302, n. 1, p. 17-45, 1996.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. **Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology**, v. 1, p. 3-19, 2004.

TRAPP, M. A. *et al.* Antibiotic oxylipins from *Alternanthera brasiliensis* and its endophytic bacteria. **Phytochemistry**, v. 110, p. 72-82, 2015.

TSAI, C.; LI, W.; PAN, B. Characterization and immobilization of marine algal 11-lipoxygenase from *Ulva fasciata*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 8, p. 731, 2008.

VARDI, A. *et al.* A stress surveillance system based on calcium and nitric oxide in marine diatoms. **PLoS biology**, v. 4, n. 3, p. e60, 2006.

VICK, B. A.; ZIMMERMAN, D. C. Metabolism of fatty acid hydroperoxides by *Chlorella pyrenoidosa*. **Plant Physiology**, v. 90, n. 1, p. 125-132, 1989.

WATSON, S.B.; SATCHWILL, T. Chrysophyte odour production: the impact of resources at the cell and population levels. **Phycologia**, v. 42, n. 4, p. 393-405, 2003.

WENDEL, T.; JÜTTNER F. Lipoxygenase-mediated formation of hydrocarbons and unsaturated aldehydes in freshwater diatoms. **Phytochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1445-1449, 1996.

WANG, R.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Seaweed extracts and unsaturated fatty acid constituents from the green alga *Ulva lactuca* as activators of the cytoprotective Nrf2–ARE pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 57, p. 141-153, 2013.

WATSON, S. B. *et al.* Under-ice blooms and source-water odour in a nutrient-poor reservoir: biological, ecological and applied perspectives. **Freshwater Biology**, v. 46, n. 11, p. 1553-1567, 2001.

ZIMMERMAN, D. C.; VICK, B. A. Lipoxygenase in *Chlorella pyrenoidosa*. **Lipids**, v. 8, n. 5, p. 264-266, 1973.

---

## ***HIPÓTESES***

- Devido à ampla biodiversidade representada pelas microalgas e ao grande número de compostos produzidos a partir da oxidação de PUFA's, é considerável a possibilidade de utilização do perfil de hidroxi-ácidos e oxo-ácidos derivados de PUFA's C18 como critério diacrítico em uma abordagem quimiotaconômica auxiliar de classificação para as várias espécies de microalgas verdes da família Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae, Chlorophyta).
- Os perfis de oxilipinas derivadas de PUFA's C18 possivelmente seguem um padrão universal, com poucas variações nos *taxa* derivados de Archaeoplastida "verdes". Assim, estes perfis são conservados na linhagem verde de algas e esta característica confirma o posicionamento dos *taxa*.
- Por fim, é possível que os perfis de oxilipinas derivadas de PUFA's C18 das algas Charophyta confirmem o posicionamento deste *taxon* na divisão Streptophyta juntamente com as plantas.

---

## ***OBJETIVOS***

- Obter a composição de hidroxí- e oxo-ácidos em microalgas e plantas decorrentes dos processos de oxidação enzimática dos ácidos graxos linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3), utilizando-se de técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas.
- Explorar o valor potencial do perfil de linoleatos como característica taxonômica auxiliar (Quimiotaxonomia) na classificação de microalgas de água doce de diversas divisões e classes de microalgas e plantas.
- Revelar perspectivas da exploração econômica das microalgas como recurso natural de oxilipinas derivadas de PUFA's C18.

---

# CAPÍTULO 1

## ***DIVERSIDADE DE OXILIPINAS EM MICROALGAS DE ÁGUA DOCE DA FAMÍLIA SELENASTRACEAE (SPHAEROPLEALES, CHLOROPHYCEAE) E POTENCIAL QUIMIOTAXONÔMICO***

### ***1. RESUMO***

O perfil de hidroxi- e oxo-ácidos graxos derivados da oxidação de PUFA C18 (linoleatos), no caso o ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3 $\omega$ 3) e o ácido linoléico (C18:2 $\omega$ 6) foi delineado para treze cepas de microalgas da família Selenastraceae (ordem Sphaeropleales) e uma cepa *outgroup* de Scenedesmaceae (Sphaeropleales). As possíveis aplicações quimiotaconômicas e perspectivas farmacêutica/industrial dos resultados foram discutidos. Quatorze oxilipinas foram encontradas, oito hidroxi-ácidos e seis oxo-ácidos. Os hidroxi-ácidos encontrados foram: 16-HOTE (ácido 16-hidroxi-octadecatrienoico), 12-HOTE e 13-HOTE, 13-HODE (ácido 13-hidroxi-octadecadienoico), 9-HODE (dois isômeros), 10-HODE e 12-HODE. Os oxo-ácidos encontrados foram: 13-OXO-ODE (ácido 13-oxo-octadecadienoico), 9-OXO-ODE, 10-OXO-OME (ácido 10-oxo-octadecenoico) e 9-OXO-OME. Hidroxi-ácidos apresentaram concentrações maiores em relação aos oxo-ácidos. Todos linoleatos estão presentes em todas cepas de algas, exceto 16-HOTE para *Ankistrodesmus densus*. Não foi observada nenhuma oxilipina exclusiva para determinada espécie ou gênero que pudesse servir como um indicador de espécie. Esta condição limita a utilização de oxilipinas derivadas de PUFA C18 na taxonomia da família Selenastraceae Porém, mesmo assim, a quantidade e proporções das oxilipinas nos diversos perfis permitem que estes compostos



forneçam informações complementares sobre os organismos que podem ser úteis na sua identificação.

*Kirchneriella lunaris* (CCMA-UFSCar 087) apresentou as maiores quantidades de oxilipinas, seguida de *Selenastrum bibraianum* (CCMA-UFSCar 334). A maioria das cepas mostrou grande potencial como reservas naturais de oxilipinas o que evidencia seu possível uso comercial, já que algumas oxilipinas apresentam grande interesse para a indústria farmacêutica.

## 2. ABSTRACT

The profile of hydroxy and oxo fatty acids derived from the oxidation of C18 PUFAs (in this case  $\alpha$ -linolenic acid - C18:3 $\omega$ 3 and linoleic acid - C18:2 $\omega$ 6), was delineated for thirteen strains of microalgae of Selenastraceae family (order Sphaeropleales) and an outgroup strain of Scenedesmaceae (Sphaeropleales) by HPLC-MS / MS techniques. Fourteen oxylipins were found, eight hydroxy acids and six oxo acids. Among hydroxy acids we find: 16-HOTE (16-hydroxy-octadecatrienoic acid), 12-HOTE and 13-HOTE, 13-HODE (13-hydroxy-octadecadienoic acid), 9-HODE (two isomers), 10-HODE and 12-HODE. For oxo acids we have: 13-OXO-ODE (ácido 13-oxo-octadecadienoico), 9-OXO-ODE, 10-OXO-OME (ácido 10-oxo-octadecenoico) e 9-OXO-OME. Hydroxy acids presented higher concentrations than oxo acids. All linoleates are present in all strains of algae except 16-HOTE for *Ankistrodesmus densus*. No oxylipin was observed exclusive to a particular species or genus that could serve as an indicator of species. This condition limits the use of oxylipins derived from C18 PUFAs in the taxonomy of the Selenastraceae family, but even so, these compounds provide complementary information for organisms that may be useful in their identification.

*Kirchneriella lunaris* (CCMA-UFSCar 087) presented highest amounts of oxylipins, followed by *Selenastrum bibraianum* (CCMA-UFSCar 334). Most of strains showed great potential as natural sources of oxylipins, which evidences their possible commercial use, as some oxylipins are of great interest to the pharmaceutical industry.

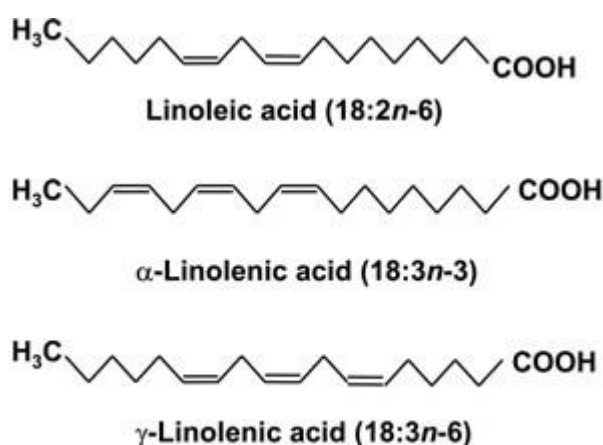
### 3. INTRODUÇÃO

As oxilipinas são compostos produzidos por via oxidativa química ou enzimática de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Compõem uma das principais reações do metabolismo celular de lipídeos produzindo moléculas sinalizadoras intra e intercelular (Mosblech *et al.*, 2009). Estes compostos ocorrem em praticamente todo tipo de organismo na natureza, desde bactérias, cianobactérias e algas eucarióticas até fungos, briófitas, plantas e animais (Schillmiller & Howe, 2005; Senger *et al.*, 2005; Singh & Del Poeta, 2011). Organismos produzem uma grande variedade de oxilipinas específicas segundo seus distintos substratos (PUFAs) e seus grupos enzimáticos característicos de cada grupo. Alguns dos PUFAs que servem de substrato para tais reações em clorófitas (**Figura 1.1**) podem ser de origem estrutural como fosfolipídios das membranas celulares ou galactolipídios das membranas dos cloroplastos, bem como podem ser substâncias de reserva ou em trânsito no interior da célula.

No que se refere a seres autotróficos, as oxilipinas são bem diversificadas e cumprem diversas funções. Nas plantas terrestres, estas substâncias participam do sistema imune, regulando respostas a herbívoros, patógenos e pesticidas (Blée, 1998; 2002). Também podem intervir na maturação do fruto, germinação da semente e no crescimento da raiz (Peña-Cortés *et al.*, 2004; Wasternack & Kombrink, 2009; Staswick *et al.*, 1992). Em Bryophyta, ocorrem grandes quantidades de oxilipinas derivadas de PUFAs C18 e C20, este último raramente presente em fanerógamas (Abou El-Wafa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Kumari *et al.*, 2014). Nas traqueófitas, os principais substratos para a formação das oxilipinas são os ácidos linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3) e, em menor quantidade, o ácido rugânico (C16:3), que desempenham papéis importantes como moléculas sinalizadoras e compostos defensivos (Blée, 2002; Howe & Schillmiller, 2002; Andreou *et al.*, 2009).

Uma importante família de oxilipinas derivadas de PUFAs C18 nos vegetais superiores são os jasmonatos, um grupo específico que incluem o ácido oxo-fitodienoico (OPDA), o ácido jasmônico (JA) e o metil-jasmonato (MeJA). Estes compostos são importantes hormônios que controlam o crescimento, o desenvolvimento de flores e frutos, além da senescência, e de atuarem como reguladores das respostas a estresses bióticos e abióticos (Wasternak & Hause, 2013).

No que tange às algas, Rhodophyta e Phaeophyceae produzem oxilipinas derivadas principalmente de PUFAs com 20 carbonos, incluindo ácidos araquidônico e eicosapentaenoico (Abou-ElWafa *et al.*, 2009; Gerwick *et al.*, 1993, Gerwick, 1994; Kumari *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013). Para as algas verdes, a formação de oxilipinas dá-se principalmente a partir da oxidação de PUFAs C18, principalmente ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA-C18:3 $\omega$ 3) e o ácido linoléico (LA-C18:2 $\omega$ 6) (Andreou *et al.*, 2009; Guschina & Harwood, 2006; Gerwick, 1994). Por esse motivo e pelo fato que grande parte das oxilipinas de plantas são derivadas de PUFAs C18, neste trabalho abordamos a produção de oxilipinas produzidas somente a partir deste tipo de lipídio.



**Figura 1.1** Principais ácidos graxos poli-insaturados envolvidos na formação de oxilipinas em algas verdes.

São escassos os estudos envolvendo oxilipinas complexas em microalgas, a grande maioria das pesquisas envolvendo metabólitos de ácidos graxos oxidados foca a produção de compostos voláteis de cadeia curta (6 a 12 carbonos), como é o caso dos aldeídos poli-insaturados (PUAs) em diatomáceas. Acredita-se que estas substâncias bioativas atuam como mensageiros e podem estar envolvidas em uma ampla gama de atividades metabólicas, como reparação de lesões, homeostasia, crescimento, defesa química e adaptação ambiental (Gerwick, 1994; Pohnert & Boland, 2002).

A respeito da biotecnologia, algumas pesquisas realizadas ao longo das últimas décadas revelaram um grande potencial farmacológico de algumas oxilipinas produzidas por microalgas e plantas. Tais substâncias bioativas estão envolvidas em atividades anti-inflamatórias e ação antibiótica (Reyes *et al.*, 2014; Trapp *et al.*, 2015).

As diatomáceas (Bacillariophyceae, Ochrophyta) destacam-se nas pesquisas sobre oxilipinas em ambientes marinhos. O substrato é diversificado: a oxidação dos PUFAs C16, C18 e C20 produz várias classes de oxilipinas com destaque para os PUAs, substâncias voláteis sinalizadoras envolvidas na defesa química contra predação e sinalização molecular (Caldwell, 2009; Fontana *et al.*, 2007; Pohnert, 2005). Também foi constatada a produção de hidroxí-ácidos a partir de EPA em *Nannocloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae, Ochrophyta) (Reyes *et al.*, 2014) e hidroxí-ácidos a partir de ALA e LA em *Dunaliella acidophila* (Chlorophyceae, Chlorophyta) (Pollio *et al.*, 1988), ambas espécies marinhas.

São incomuns pesquisas sobre oxilipinas produzidas por microalgas de água doce. Foi detectada a presença de PUAs em representantes da classe Chrysophyceae (Watson *et al.*, 2001; Jüttner, 1981; Watson & Satchwill, 2003) e hidroxí-ácidos derivados de PUFAs C20 em *Euglena gracilis* (Euglenophyta) (Santiago-Vázquez *et al.*, 2004).

Relacionado a microalgas verdes de água doce, é limitado o conhecimento acerca da sua produção de oxilipinas. As Chlorophyta *Chlorella pyrenoidosa* (Zimmerman & Vick, 1973; Vick & Zimmerman, 1989; Nuñez *et al.*, 2000) e *Chlamydomonas debaryana* (Reyes *et al.*, 2014) e a Streptophyta *Klebsormidium flaccidum* (Koeduka *et al.*, 2015) compõe a lista de espécies dulcícolas cujas oxilipinas já foram estudadas.

As espécies da família Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae, Chlorophyta) compõem um grupo de microalgas verdes de água doce cosmopolitas (Krienitz *et al.*, 2001). Principalmente em ambientes lênticos constituem uma família com notável expressão na comunidade fitoplanctônica. Alguns autores preveem que a família Selenastraceae seja formada por centenas de *taxa* (Fawley *et al.*, 2005).

As microalgas da família Selenastraceae constituem uma fonte importante de lipídios de interesse comercial na indústria alimentícia (reservas nutricionais), farmacêutica (ácidos graxos essenciais, família Ômega e compostos bioativos) e biocombustíveis (Mori *et al.*, 2018). Os gêneros mais comuns dessa família são *Ankistrodesmus*, *Selenastrum*, *Kirchneriella* e *Monoraphidium*, que possuem tênues diferenças morfológicas e isso dificulta sua distinção (Komarék & Fott, 1983; Krienitz *et al.*, 2001; Fawley *et al.*, 2005). Dessa forma, os limites morfológicos destas espécies muitas vezes são insuficientes para a correta diferenciação das espécies e concomitante classificação taxonômica.

Pesquisas recentes que envolvem taxonomia baseada em análises moleculares dos genes 18S rDNA (Krienitz *et al.*, 2001) e *rbcL* (Garcia da Silva *et al.*, 2017) na família Selenastraceae resultaram em discordância com a classificação baseada em aspectos morfológicos. Devido aos conflitos de classificação taxonômica entre as abordagens morfológicas e moleculares, Fawley *et al.* (2005) propuseram ampliar o leque de critérios para a determinação de gêneros e espécies nesta família ao adotar um estudo baseado na

taxonomia polifásica aliando morfologia, genética, fisiologia e quimiotaxonomia. Portanto, qualquer informação sobre sua bioquímica poderá ser útil como característica diacrítica.

Considerando que dados sobre produção de oxilipinas são muito raros na família Selenastraceae, o objetivo do presente estudo é obter a composição de hidroxi- e oxo-ácidos graxos derivados da oxidação de PUFA's C18, no caso o ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3 $\omega$ 3) e o ácido linoléico (C18:2 $\omega$ 6), dessas microalgas verdes de água doce. Também é propósito desta pesquisa explorar o valor potencial de suas possíveis aplicações quimiotaxonômicas bem como revelar perspectivas de sua exploração econômica. Assim, foram examinadas as biomassas derivadas de cultivos controlados de treze cepas de Selenastraceae mais uma cepa *outgroup* pertencente a mesma ordem (Sphaeropleales), porém de família diferente (Scenedesmaceae).

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### *4.1 Espécies de microalgas*

Quatorze cepas de microalgas eucarióticas pertencentes a classe Chlorophyceae, ordem Sphaeropleales foram utilizadas no presente trabalho. Treze destas pertencem à família Selenastraceae e uma pertence à família Scenedesmaceae (*outgroup*). Estas algas foram isoladas de ambientes lênticos variados (**Tabela 1.1**) e posteriormente axenizadas. As cepas CCMA-UFSCar estão depositadas na Coleção de Culturas de Microalgas do Laboratório de Ficologia (Departamento de Botânica) da Universidade Federal de São Carlos (World Data Centre for Microorganisms – WDCM n° 835) e as cepas CB são mantidas na coleção particular da professora Dra. Christina Bock da Universidade de Duisburg-Essen, Alemanha. As espécies foram classificadas e são continuamente atualizadas através da taxonomia clássica e molecular. Aqui foi adotado o sistema de classificação proposto por Reviere (2006).

A condição axênica de cada cepa foi testada periodicamente através da inoculação de uma pequena alíquota da microalga em meio de cultura WC (Guillard & Lorenzen, 1972) enriquecido com dextrose (glicose) e peptona bacteriológica (250mg/l de cada reagente) (WC/P+G).



**Tabela 1.1** Relação das treze cepas pertencentes à família Selenastraceae e um grupo externo analisados por cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massa em tandem (HPLC-MS/MS).

| CEPA            | TÁXON  | LOCAL DA COLETA                                |
|-----------------|--|--|
| CCMA-UFSCar 088 | <i>Scenedesmus ecornis</i> Ralfs                                   | Lagoa do Infernã (EE Jataí), Luis Antonio - SP |
| CCMA-UFSCar 087 | <i>Kirchneriella lunaris</i> (Kirchner) K.Möbius 1894              | Lagoa do Infernã (EE Jataí), Luis Antonio - SP |
| CCMA-UFSCar 516 | <i>Kirchneriella obesa</i> (West) West & G.S.West 1894             | Lago das Ninféias – IBt – São Paulo – SP       |
| CB-2012-37-S    | <i>Kirchneriella obesa</i> (West) West & G.S.West 1894             | Lago de Montbel , França                       |
| CCMA-UFSCar 345 | <i>Kirchneriella obesa</i> (West) West & G.S.West 1894             | Bebedouro Fazenda Santa Cruz – Pantanal - MS   |
| CCMA-UFSCar 003 | <i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953                        | Represa do Lobo, Broa, São Carlos - SP         |
| CCMA-UFSCar 423 | <i>Ankistrodesmus bernardii</i> Komárek 1983                       | Sítio São Judas Tadeu – Dourado – SP           |
| CCMA-UFSCar 277 | <i>Ankistrodesmus stipitatus</i> (Chodat) Komárková-Legnerová 1969 | Lagoa Vitória, São João Batista do Glória - MG |
| CCMA-UFSCar 593 | <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda ex Korshkov 1953            | Fazenda Tamboril - Cristais Paulista - SP      |
| CB-2012-06-N    | <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda ex Korshikov 1953           | Järnsjön, Suécia                               |
| CCMA-UFSCar 333 | <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda ex Korshikov 1953           | Lagoa Cujubim, Rio Maderia - RO                |
| CCMA-UFSCar 334 | <i>Selenastrum bibraianum</i> Reinsch 1866                         | Rio Jamari, braço do Rio Maderia - RO          |
| CB-2009-36-S    | <i>Selenastrum bibraianum</i> Reinsch 1866                         | Tanque de oxidação, Neuglobsow - Alemanha      |
| CCMA-UFSCar 047 | <i>Selenastrum bibraianum</i> Reinsch 1866                         | Represa do Monjolinho,UFSCar, São Carlos - SP  |

### 4.2 Preparação e Condições de cultivos das microalgas

O cultivo para construção das curvas de crescimento bem como para extração de material para análises cromatográficas foram realizados em frascos de vidro Boeco® de 2 L de capacidade total, estritamente idênticos, em triplicatas, com volume de 1,8 L de meio de cultura WC, pH= 7.0, sob regime de luz 12h claro:12h escuro, intensidade luminosa de  $200 \mu\text{mol f\u00f3tons} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  de irradi\u00e2ncia (Quantameter QSL-100, Biospherical Instruments), temperatura de incubação de  $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , borbulhamento constante de ar comprimido filtrado ( $0,05 \text{ L} \times \text{min}^{-1}$ ) e concentra\u00e7\u00e3o inicial de  $10^4$  c\u00e9lulas  $\times \text{mL}^{-1}$ , conferida por contagem de c\u00e9lulas em c\u00e2mara Fuchs Rosenthal 3.2 (catalog No. 3720, Hausser Scientific, Horsham, PA). A condi\u00e7\u00e3o ax\u00eanica das culturas foi checada no in\u00edcio e fim do cultivo por inocula\u00e7\u00e3o de uma al\u00edquota das culturas em meio WC pH 7.0 enriquecido com peptona bacteriol\u00f3gica e dextrose (glicose) (250mg/L de cada).

### 4.3 Curvas de crescimento e cultivos experimentais

A amostragem dos cultivos experimentais foi feita na fase estacion\u00e1ria (determinada por curvas de crescimento) em que h\u00e1 consider\u00e1vel ac\u00famulos de PUFA precusores das oxilipinas (Guschina & Harwood, 2006; Bigogno *et al.*, 2002). A curva de crescimento de cada microalga foi determinada em cultivos pr\u00e9vios e o acompanhamento do crescimento dos cultivos foi feito por clorofila-a (Chl-a) *in vivo* (fluor\u00f4metro Trilogy™, Turner Designs, Sunnyvale, CA) e absorv\u00e2ncia do maior comprimento de onda entre 668-682 nm subtra\u00eddo de 750 nm (turbidez) em espectrofot\u00f4metro DR5000 (Hach®). As amostragens foram realizadas nos mesmos dias de cultivos para todas as esp\u00e9cies, em intervalos de no m\u00e1ximo 72 h at\u00e9 o estabelecimento da fase estacion\u00e1ria de crescimento.

## Capítulo 1- Materiais e Métodos

Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, os cultivos foram concentrados em centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5804), a 10°C, velocidade de 7 a 11.5g e tempo variando de 5 a 10 minutos, dependendo da microalga. As biomassas algais concentradas foram lavadas três vezes com meio WC sem micronutrientes e vitaminas, congeladas, liofilizadas, separadas em alíquotas de 25 mg em tubos Eppendorf estéreis de 1,5 mL e mantidas a -20 °C até que as análises de oxilipinas fossem realizadas.

### 4.4 Análises das Oxilipinas

#### 4.4.1 Extração das Oxilipinas

Cada amostra foi extraída com 250µL de metanol:água (7:3) contendo 20 ng/mL do padrão interno deuterado 13-d6HODE (OIChemIm LTD, Olomouc, Czech Republic) e sonicadas por 10 min. A extração foi seguida por centrifugação (5 min a 15000g), e o sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf esteril. 20 µL do sobrenadante foi diretamente analisado por HPLC-MS/MS. As oxilipinas detectadas aqui foram previamente isoladas e identificadas em *Alternanthera brasiliana* (Trapp *et al.*, 2015) e posteriormente o mesmo método foi validado para microalgas, utilizando as espécies *Ankistrodesmus densus* e *Selenastrum bibrainum* (Trapp, 2016).

#### 4.4.2 Métodos Analíticos para Oxilipinas

Oxilipinas foram medidas por HPLC-MS/MS de acordo com Trapp (2016). As análises HPLC-MS/MS foram realizadas em um sistema HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Böblingen, Germany) conectado a um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Separação cromatográfica foi realizada em um Phenomenex Kinetex®, com coluna de phenyl-hexyl de medidas 100Å 100 x 2.1 mm, 2.6 µm, usando 0.05 % de ácido fórmico (solução A) e metanol com 0.05% de ácido

fórmico (solução B) como fase móvel. O gradiente de eluição (0.250  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) foi realizado da seguinte maneira: 70-100% de B por 12 min, 100% de B por 2 min, e um equilíbrio por 8 min a 70% de B. Os compostos foram detectados no modo negativo por experimentos de SRM (single reaction monitoring) com os seguintes parâmetros de ionização: voltagem da fonte: 4,4 kV, voltagem do capilar: -48 V, tube lens -113 V, potencial de *desclustering* 10 V, temperatura de turbo gás: 300 °C, fluxo de gás auxiliar: 4.5 L/min, fluxo de sheath gás: 9 L/min.

As transições SRM usadas para a detecção seletiva de compostos foram: composto **1** ( $m/z$  293>235), composto **2** ( $m/z$  293>171), composto **3** ( $m/z$  293>195), composto **4** ( $m/z$  295>195), compostos **5** e **6** ( $m/z$  295>171), compostos **7** e **8** ( $m/z$  293>113), composto **9** e **10** ( $m/z$  293>197), compostos **11** e **12** ( $m/z$  295>183), composto **13** ( $m/z$  295>151), composto **14** ( $m/z$  295>155) e padrão interno 13-HODE ( $m/z$  299>172).

As quantificações dos compostos **4**, **5/6**, **7/8** e **9/10** foram realizadas com base nas curvas de calibração de padrões comerciais disponíveis e o montante dos demais compostos foram estimados com base nestas curvas de calibração. As soluções para as curvas de calibração foram feitas em solvente (metanol:água (7:3)), a partir de uma solução contendo 20ng/mL de cada padrão. Foram utilizadas regressões lineares e peso de 1 ou 2 para todas as curvas, dependendo da concentração.

### 4.5 Análises estatísticas

O software R (Team, 2016) foi usado para realizar as análises estatísticas. As diferenças estatisticamente significativas entre a concentração e a proporção de cada oxilipina entre espécies, gêneros e famílias microalgais foram calculadas com a análise SIMPER (Similarity Percentages) (Pacote Vegan) (Oksanen *et al.*, 2013).

## Capítulo 1- Materiais e Métodos

As dissimilaridades nos perfis de oxilipinas entre os *taxa* foram calculadas com base na matriz das concentrações de oxilipinas utilizando a distância de Bray-Curtis e ordenadas em duas dimensões em um diagrama de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS). A mesma matriz de distância foi utilizada para análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) que abordou os dados de três maneiras: todos os dados das seis divisões, os dados das plantas terrestres e das algas verdes em conjunto e os dados das plantas terrestres e das algas verdes por classe em uma análise par-a-par, sendo que a homogeneidade das variâncias foi previamente testada (comando betadisper no Pacote Vegan). A possível presença de oxilipinas indicadoras de grupos taxonômicos foi verificada por meio do “valor indicador” (IndVal) do pacote labdsv (Roberts, 2015).

**5. RESULTADOS**

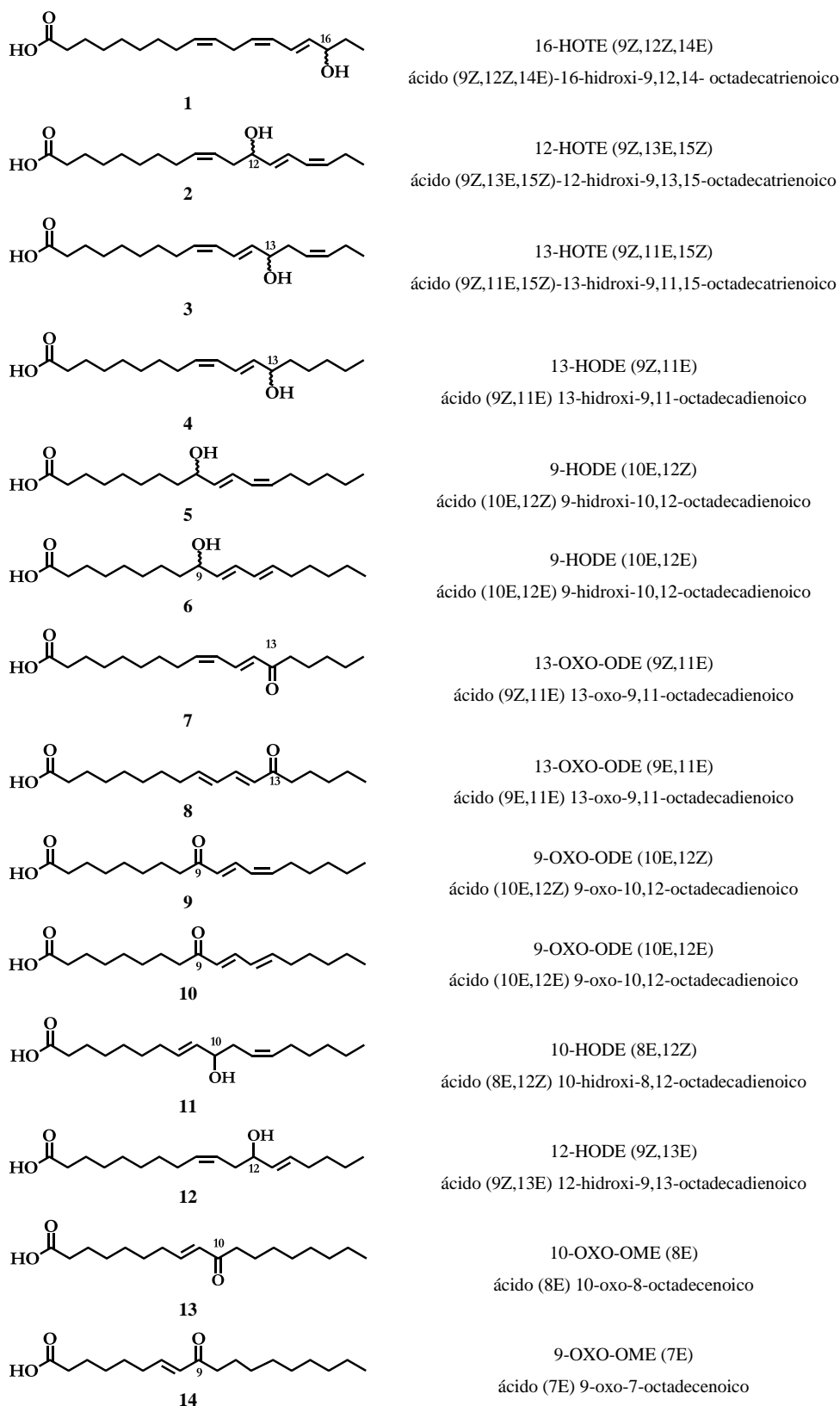
No presente estudo foram investigadas as oxilipinas previamente identificadas e isoladas da planta *Alternanthera brasiliana* (Trapp *et al.*, 2015). Estes derivados de PUFAs C18 são genericamente chamados também de linoleatos. O termo *linoleatos* deriva dos nomes destes PUFAs precursores, ácido linoleico (LA - C18:2 $\omega$ 6) e ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA – C18:3 $\omega$ 3). Não foram analisadas oxilipinas provenientes da oxidação de outros PUFAs como o ácido araquidônico (C20:4), ácido eicosapentaenoico (C20:5) ou ácido rugânico (C16:4) devido ao foco aqui adotado na rota metabólica dos linoleatos precursores dos jasmonatos (fitormônios).

A **Tabela 1.2** apresenta o tempo que cada microalga levou para atingir a fase estacionária de crescimento e o valor médio de biomassa seca encontrado para as triplicatas de cultivo.

**Tabela 1.2** Relação dos tempos de cultivo (em dias) até a fase estacionária de crescimento (dados baseados em curvas de crescimento) e valores (em mg) das biomassas das cepas de microalgas estudadas. Valores de desvio-padrão entre parênteses.

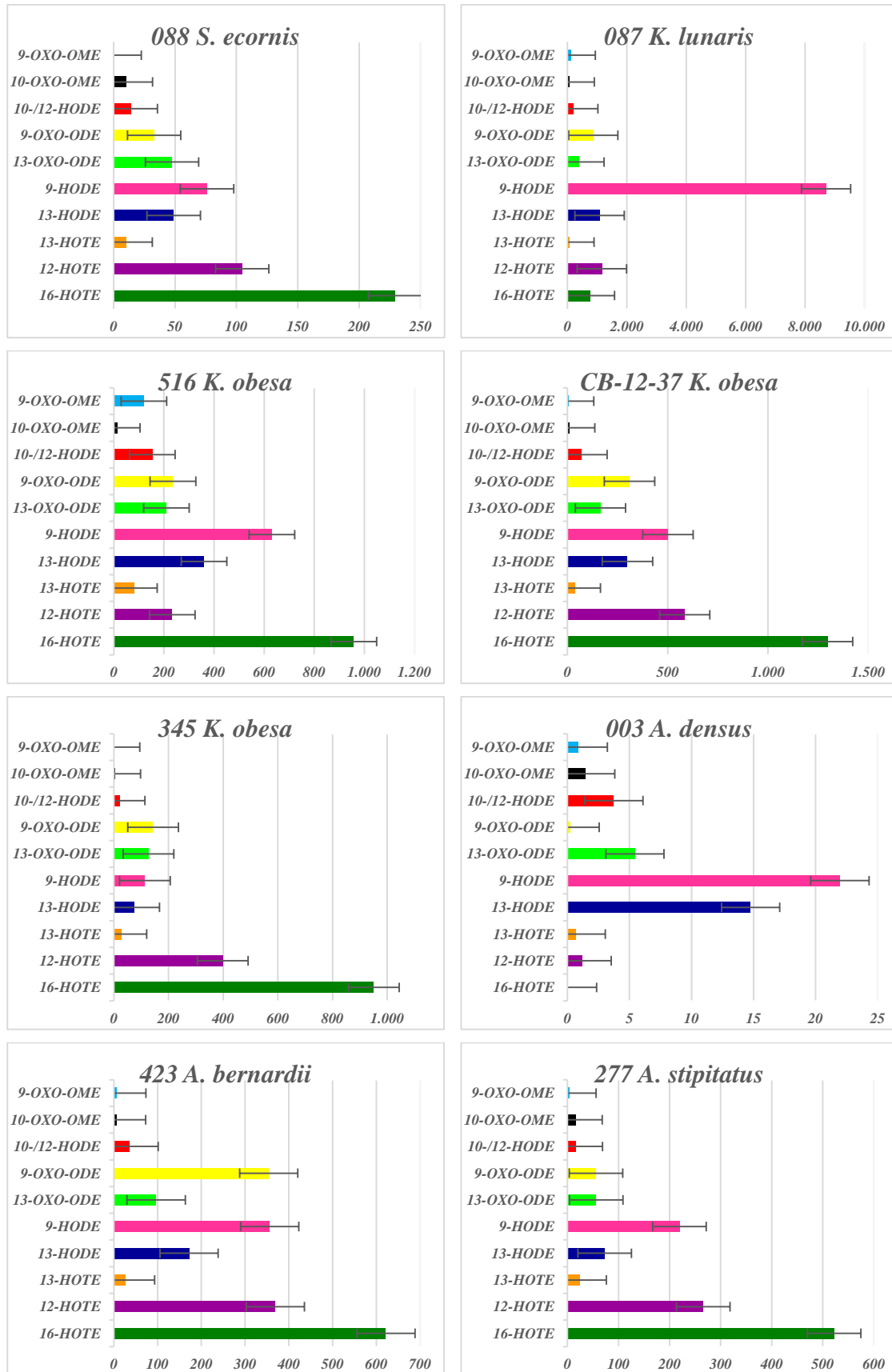
| CEPA            | TAXON                            | TEMPO DE CULTIVO | BIOMASSA SECA  |
|-----------------|----------------------------------|------------------|----------------|
| CCMA-UFSCar 088 | <i>Scenedesmus ecornis</i>       | 28               | 216,84 (25,19) |
| CCMA-UFSCar 087 | <i>Kirchneriella lunaris</i>     | 24               | 680,21 (78,52) |
| CCMA-UFSCar 516 | <i>Kirchneriella obesa</i>       | 29               | 610,21 (58,29) |
| CB-2012-37-S    | <i>Kirchneriella obesa</i>       | 24               | 505,17 (42,47) |
| CCMA-UFSCar 345 | <i>Kirchneriella obesa</i>       | 25               | 490,21 (52,95) |
| CCMA-UFSCar 003 | <i>Ankistrodesmus densus</i>     | 28               | 294,84 (25,07) |
| CCMA-UFSCar 423 | <i>Ankistrodesmus bernardii</i>  | 26               | 328,61 (24,88) |
| CCMA-UFSCar 277 | <i>Ankistrodesmus stipitatus</i> | 26               | 275,61 (19,99) |
| CCMA-UFSCar 593 | <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> | 28               | 297,24 (20,76) |
| CB-2012-06-N    | <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> | 30               | 398,29 (21,13) |
| CCMA-UFSCar 333 | <i>Ankistrodesmus fusiformis</i> | 27               | 448,38 (51,86) |
| CCMA-UFSCar 334 | <i>Selenastrum bibraianum</i>    | 28               | 686,59 (80,42) |
| CB-2009-36-S    | <i>Selenastrum bibraianum</i>    | 26               | 400,97 (25,15) |
| CCMA-UFSCar 047 | <i>Selenastrum bibraianum</i>    | 24               | 391,19 (25,47) |

Quatorze oxilipinas foram detectadas nas microalgas analisadas (**Figura 1.2**) dentre as dezessete oxilipinas descritas por Trapp *et al.* (2015) para a planta *Alternanthera brasiliana*, sendo oito hidroxí-ácidos e seis oxo-ácidos. O padrão de fragmentação fornecido pelas análises de espectrometria de massa de cada uma das oxilipinas encontradas nos organismos aqui estudados são apresentados nos cromatogramas SRM (**Anexo 2**). Os pares de isômeros geométricos E-Z **5** e **6** (9-HODE), **7** e **8** (13-OXO-ODE), **9** e **10** (9-OXO-ODE) são apresentados nos resultados como um composto. As diferenças estão nas configurações espaciais das duplas ligações do carbono 12 do par **5** e **6** (12Z e 12E, respectivamente), do carbono 9 do par **7** e **8** (9Z e 9E, respectivamente), do carbono 12 do par **9** e **10** (12Z e 12E, respectivamente). Por sua vez, os compostos **11** e **12** (10- e 12-HODE) são isômeros de posição; as diferenças estão nas posições do grupo hidroxila (carbono 10 e 12, respectivamente) e das duplas insaturações (8E e 12Z para o composto 11 e 9Z e 13E para o composto 12). Em nossas análises não foi possível separar estes dois compostos por cromatografia líquida. As curvas de calibração dos compostos **4**, **5/6**, **7/8** e **9/10** são apresentadas no **Anexo 1**.



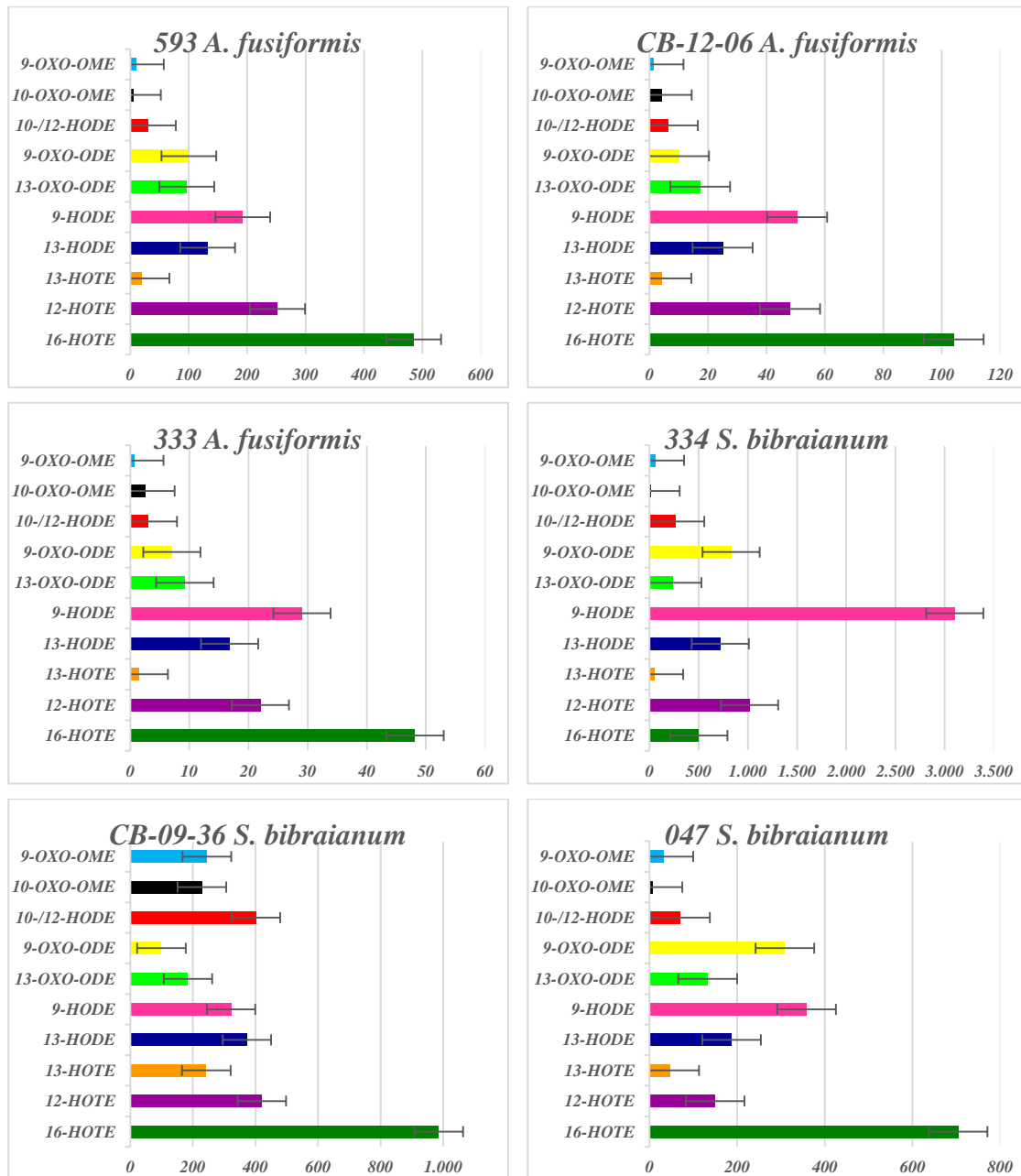
**Figura 1.2** Oxilipinas encontradas nas microalgas analisadas, seus números, nomes, siglas e estruturas.





**Figura 1.3** Médias das concentrações de cada oxilipina nas microalgas analisadas. Barras de erro representam o desvio-padrão de três réplicas independentes.

Continuação figura 1.3

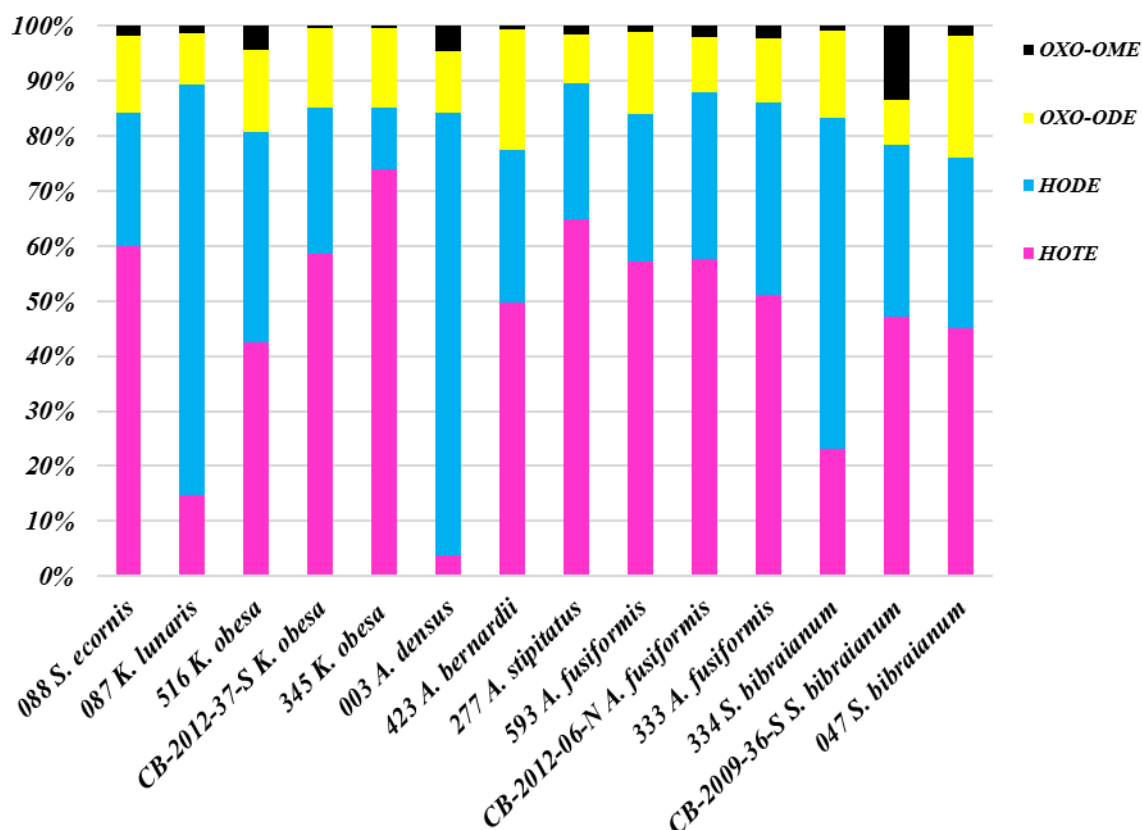


As médias das concentrações de cada oxilipina por cepa, bem como suas proporções são apresentadas no Anexo 3. A Figura 1.3 apresenta de forma gráfica estas médias das concentrações de cada oxilipina por cepa bem como os correspondentes desvios-padrão. Em termos de quantidades totais de oxilipinas, as análises quantitativas revelaram que a microalga CCMA-UFSCar 003, pertencente à espécie *Ankistrodesmus densus*, possui as menores concentrações (50,30 µg/g de biomassa seca), seguida pelas

cepas CCMA-UFSCar 333 (140,23 µg/g) e CB 2012-06-N (270,83 µg/g), ambas as cepas da espécie *Ankistrodesmus fusiformis*. A cepa *outgroup* CCMA-UFSCar 088 *Scenedesmus ecornis* apresentou concentração relativamente baixa, com 573,40 µg/g.

Já as maiores concentrações totais de oxilipinas foram observadas para a cepa CCMA-UFSCar 087 da espécie *Kirchneriella lunaris*, com 13.399,87 µg/g de biomassa seca, seguida das cepas CCMA-UFSCar 334 e CB 2009-36-S, ambas da espécie *Selenastrum bibraianum*, apresentando 6.793,37 e 3.503,60 µg/g respectivamente. As cepas de *Kirchneriella obesa* CB 2012-37-S e CCMA-UFSCar 516 também apresentaram quantidades consideráveis de oxilipinas, 3.281,60 e 2.996,53 µg/g respectivamente. Concentrações intermediárias foram observadas para *Ankistrodesmus bernardii* (CCMA-UFSCar 423; 2.044,77 µg/g), *Selenastrum bibraianum* (CCMA-UFSCar 047; 1.997,03 µg/g), *Kirchneriella obesa* (CCMA-UFSCar 345, 1.864,63 µg/g), *Ankistrodesmus stipitatus* (CCMA-UFSCar 277, 1.329,80 µg/g) e *Ankistrodesmus fusiformis* (CCMA-UFSCar 593, 1.325,20 µg/g).

A **Figura 1.4** apresenta os dados de proporção de cada tipo de oxilipina (HOTEs, HODEs, OXO-ODEs e OXO-OMEs) por cepa estudada.



**Figura 1.4** Concentrações relativas (%) dos quatro tipos de oxilipinas encontradas em cada uma das cepas de microalgas analisadas.

As proporções de oxo-ácidos monoinsaturados em todas as cepas de Selenastraceae variam de 0,39% (CCMA-UFSCar 345 – *K. obesa*) a 13,52% (CB 2009-36-S – *S. bibratianum*). Já os oxo-ácidos com duas insaturações correspondem a porcentagens maiores, variando de 8,10% para CB 2009-36-S (*S. bibratianum*) a 22,10% em CCMA-UFSCar 047 (*S. bibratianum*).

Com relação aos hidroxi-ácidos, HOTES e HODEs equivaleram às maiores proporções entre todas as cepas de Selenastraceae analisadas, bem como na cepa *outgroup S. ecornis*. Os hidroxi-ácidos tri-insaturados corresponderam às maiores quantidades relativas em onze das treze cepas de Selenastraceae abordadas e também na cepa *outgroup* (59,94%). Entre as cepas da espécie *Kirchneriella obesa*, CCMA-UFSCar 345 apresentou a maior concentração de HOTES, com 73,87% do total de oxilipinas, seguida de CB 2012-

37-S com 58,53% e CCMA-UFSCar 516 com 42,47%. *Kirchneriella lunaris* (CCMA-UFSCar 087) apresentou a segunda menor concentração proporcional de HOTES, 14,79%. Quanto às cepas do gênero *Ankistrodesmus*, CCMA-UFSCar 003 (*A. densus*) curiosamente apresentou a menor proporção de HOTES, 3,71%, lembrando que esta cepa também apresentou a menor concentração total bruta de oxilipinas (50,30 µg/g de biomassa seca). Já as demais cepas de *Ankistrodesmus* apresentaram valores médios de proporção de HOTES próximos a 50%. São elas: *A. stipitatus* (277) com 64,89%; *A. fusiformis* CB-2012-06-N com 57,67%; *A. fusiformis* 593 com 57,13%; *A. fusiformis* 333 com 51,11% e *A. bernardii* (423) com 49,78%.

Por fim, as quantidades relativas de HODEs variaram consideravelmente entre as cepas de Selenastraceae. A cepa CCMA-UFSCar 345 de *K. obesa* exibiu apenas 11,23% de HODEs. Proporções expressivas destes compostos foram encontradas para as cepas CCMA-UFSCar 003 (*A. densus* – 80,45%), seguida de *K. lunaris* (CCMA-UFSCar 087) correspondendo a 74,46% e *S. bibraianum* (CCMA-UFSCar 334) com 60,19% de HODEs. As proporções de HODEs nas demais cepas de Selenastraceae oscilaram entre 24,63% (CCMA-UFSCar 277) e 38,21% (CCMA-UFSCar 516).

A **Tabela 1.3** exibe os resultados das análises estatísticas PERMANOVA por concentração de oxilipinas e por proporção de cada oxilipina entre as microalgas estudadas. Em termos de concentrações, foi previamente constatada homogeneidade das variâncias das concentrações de oxilipinas considerando **gêneros** (betadispersão  $p > 0,05$ ,  $p = 0,262$ ) e a PERMANOVA indicou diferenças altamente significativas entre todas as avaliadas aqui e a separação dos dados em gêneros explicou não mais que 22% da variação dos dados ( $p = 0,001$ ). Do mesmo modo, confirmada a homogeneidade das variâncias dos resultados para **cepas** de microalgas (betadispersão  $p > 0,05$ ,  $p = 0,125$ ), a PERMANOVA indicou diferenças altamente significativas e a separação em cepas de

algas explicou 74,4% da variação dos dados ( $p=0.001$ ). Por sua vez, apesar de não haver homogeneidade entre as variâncias das concentrações de oxilipinas considerando **espécies** (betadispersão  $p>0,05$ ,  $p=0,008$ ), a PERMANOVA indicou diferenças altamente significativas entre todas as algas avaliadas aqui e a separação em espécies explicou 50,10% da variação dos dados ( $p=0.001$ ).

Em relação à matriz de proporções das oxilipinas, a análise de betadispersão indicou homogeneidade das variâncias entre os **gêneros** de microalgas ( $p=0,288$ ), porém a PERMANOVA não indicou diferenças significativas entre as algas avaliadas ( $p=0,821$ ). Quanto a **espécies**, a PERMANOVA indicou diferenças altamente significativas entre as proporções das oxilipinas ( $p=0,001$ ) e a separação em espécies explicou 50,1% da variação dos dados. Porém, os resultados acima descritos podem sofrer influência da heterogeneidade nas variâncias dos dados (betadispersão  $p>0,05$ ,  $p=0,019$ ). Por fim, a PERMANOVA apontou diferenças altamente significativas entre as microalgas e a separação em cepas explicou 80,43% da variação dos dados. Contudo, estes resultados estão sujeitos a possível interferência da heterogeneidade das variâncias dos dados ( $p=0,033$ ).

**Tabela 1.3:** Resultados das análises PERMANOVA por gênero, espécie e cepa de organismos baseadas na matriz de distância das concentrações (A) e (B) na matriz de distância das proporções de oxilipinas, utilizando para ambas a distância de Bray-Curtis. Em itálico destacam-se os resultados das BETADISPERSÃO que não foram estatisticamente significativos para  $p<0,05$  e, em negrito, os resultados das PERMANOVA que foram estatisticamente significativos para  $p<0,01$ .

| DADOS       | BETA DISPER  | (A) PERMANOVA |          |       |              | BETA DISPER  | (B) PERMANOVA |          |       |              |
|-------------|--------------|---------------|----------|-------|--------------|--------------|---------------|----------|-------|--------------|
|             | <i>p</i>     | gl            | pseudo-F | R2    | <b>p</b>     | <i>p</i>     | gl            | pseudo-F | R2    | <b>p</b>     |
| Por gênero  | <i>0,262</i> | 3             | 3,5827   | 0,220 | <b>0,001</b> | <i>0,288</i> | 3             | 0,559    | 0,042 | 0,821        |
| Por espécie | 0,008        | 7             | 4,8872   | 0,501 | <b>0,001</b> | 0,019        | 7             | 4,887    | 0,501 | <b>0,001</b> |
| Por cepa    | <i>0,125</i> | 13            | 6,2478   | 0,744 | <b>0,001</b> | 0,033        | 13            | 8,853    | 0,804 | <b>0,001</b> |

\*gl = graus de liberdade

As oxilipinas que apresentaram diferenças estatisticamente significativas em suas concentrações e proporções contrastando as espécies algais par-a-par na análise SIMPER estão listadas nas **Tabelas 1.4** e **1.5**, respectivamente.

Em termos de proporções (**Tabela 1.4**), o SIMPER indicou que o par de oxilipinas 10-/12-HODE foi o principal responsável pelas diferenças das espécies *S. bibrainum* e as demais espécies, exceto *A. densus*. A análise SIMPER também indicou que 9-OXO-ODE foi o principal composto responsável pelas diferenças de *A. bernardii* e as outras espécies. Entre *K. lunaris* e demais espécies, a oxilipina indicativa de diferenças significativas foi 9-HODE. Por fim, entre *A. densus* e todas as demais algas as diferenças são devidas ao composto 13-HODE principalmente. Já análise SIMPER para concentrações (**Tabela 1.5**) indica que, dentre todas as oxilipinas, 9-HODE foi a principal responsável pelas diferenças entre *K. lunaris* e as demais espécies. Para *S. bibrainum*, a oxilipinas 9-OXO-OME correspondeu a principal diferença quando comparada a espécie às demais, exceto para as cepas do gênero *Kirchneriella*.

**Tabela 1.4:** Resultados da análise SIMPER por contraste das espécies de microalgas baseado na matriz de proporções das oxilipinas, utilizando a distância de Bray-Curtis e número de permutações igual a 1000. A espécie em negrito corresponde ao *outgroup*.

| <b>Contraste de Espécies</b>               | <b>Oxilipinas</b>                                  | <b>Valor de p</b>                             |
|--|--|---|
| <i>S. ecornis</i> X <i>K. lunaris</i>      | 9-HODE; 16-HOTE                                    | 0,014*; 0,013*                                |
| <i>S. ecornis</i> X <i>A. densus</i>       | 16-HOTE; 13-HODE; 12-HOTE                          | 0,002**; 0,0009***; 0,006**                   |
| <i>S. ecornis</i> X <i>A. bernardii</i>    | 9-OXO-ODE  | 0,025*  |
| <i>K. lunaris</i> X <i>K. obesa</i>        | 9-HODE; 16-HOTE                                    | 0,006**; 0,002**                              |
| <i>K. lunaris</i> X <i>A. densus</i>       | 13-HODE; 9-OXO-ODE; 13-OXO-ODE; 10-/12-HODE        | 0,0009***; 0,026*; 0,037*; 0,023*             |
| <i>K. lunaris</i> X <i>A. bernardii</i>    | 9-HODE   | 0,043*  |
| <i>K. lunaris</i> X <i>A. fusiformis</i>   | 9- HODE; 9-OXO-ODE                                 | 0,013*; 0,042*                                |
| <i>K. lunaris</i> X <i>A. stipitatus</i>   | 16-HOTE; 9-HODE                                    | 0,0049**; 0,036*                              |
| <i>K. lunaris</i> X <i>S. bibrainum</i>    | 9-OXO-ODE; 9-HODE                                  | 0,017*; 0,03*                                 |
| <i>K. obesa</i> X <i>A. densus</i>         | 16-HOTE; 9-HODE; 13-HODE; 12-HOTE; 10-/12-HODE     | 0,0009***; 0,036*; 0,0009***; 0,005**; 0,042* |
| <i>K. obesa</i> X <i>S. bibrainum</i>      | 13-HOTE ; 10- 12-HODE                              | 0,004**; 0,009**                              |
| <i>A. densus</i> X <i>A. bernardii</i>     | 16- HOTE; 13-HODE; 9-OXO-ODE; 12-HOTE; 10-/12-HODE | 0,014*; 0,002**; 0,0009***; 0,006**; 0,036*   |
| <i>A. densus</i> X <i>A. stipitatus</i>    | 16-HOTE; 13-HODE; 12-HOTE; 10-/12-HODE             | 0,0009***; 0,0009***; 0,0009***; 0,017*       |
| <i>A. densus</i> X <i>A. fusiformis</i>    | 16-HOTE; 9-HODE; 13-HODE; 12-HOTE                  | 0,0009***; 0,046*; 0,0009***; 0,006**         |
| <i>A. densus</i> X <i>S. bibrainum</i>     | 16-HOTE; 13-HODE                                   | 0,032*; 0,0009***                             |
| <i>A. bernardii</i> X <i>A. stipitatus</i> | 9-OXO-ODE  | 0,009**                                       |
| <i>A. bernardii</i> X <i>A. fusiformis</i> | 9-OXO-ODE  | 0,017*  |
| <i>A. bernardii</i> X <i>S. bibrainum</i>  | 9-OXO-ODE  | 0,027*  |
| <i>A. stipitatus</i> X <i>S. bibrainum</i> | 10-/12-HODE  | 0,039*  |
| <i>A. fusiformis</i> X <i>S. bibrainum</i> | 10-OXO-OME; 9-OXO-OME; 10-/12-HODE; 13-HOTE        | 0,014*; 0,018*; 0,029*; 0,0009***             |

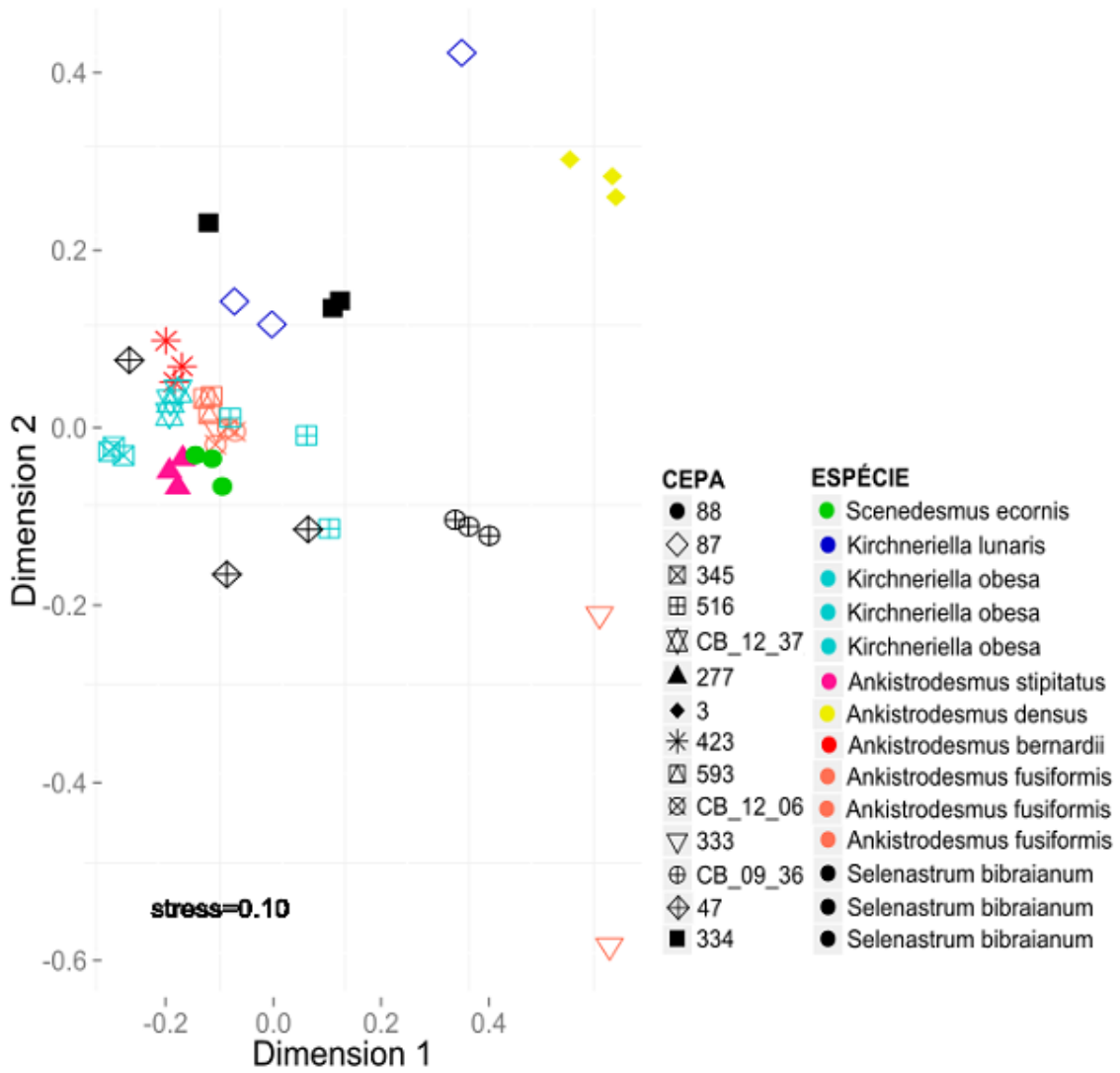
**Significado códigos: 0 \*\*\* 0.001, \*\* 0.01, \* 0.05**



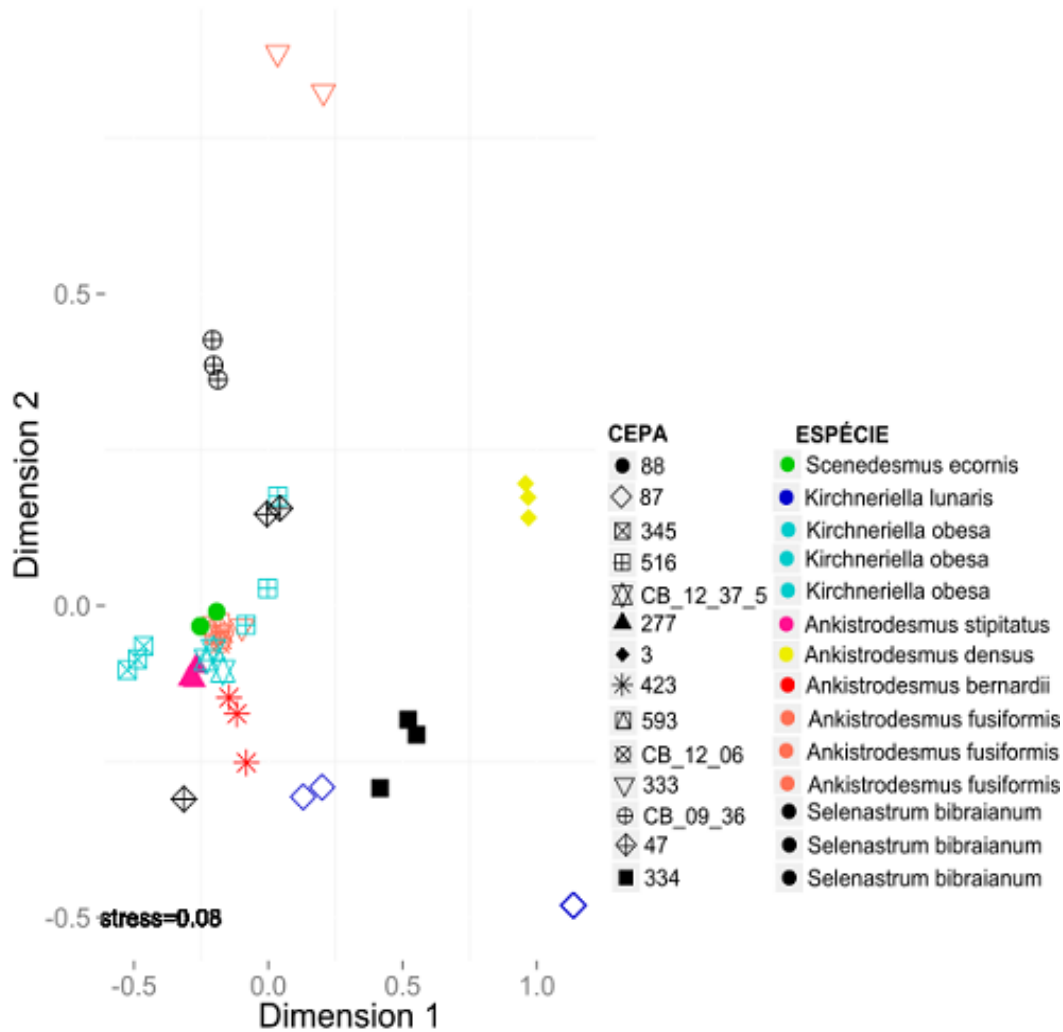
**Tabela 1.5:** Resultados da análise SIMPER por contraste das espécies de microalgas baseado na matriz de concentrações das oxilipinas, utilizando a distância de Bray-Curtis e número de permutações igual a 1000. A espécie em negrito corresponde ao *outgroup*.

| <b>Contraste de Espécies</b>               | <b>Oxilipinas</b>  | <b>Valor de p</b>                                     |
|--|--|---|
| <i>S. ecornis</i> X <i>K. lunaris</i>      | 9-HODE; 9-OXO-ODE  | 0,0009***; 0,049*                                     |
| <i>S. ecornis</i> X <i>K. obesa</i>        | 16-HOTE  | 0,016*  |
| <i>S. ecornis</i> X <i>A. densus</i>       | 16-HOTE; 12-HOTE; 13-OXO-ODE                                     | 0,004**; 0,011*; 0,008**                              |
| <i>S. ecornis</i> X <i>A. bernardii</i>    | 9-OXO-ODE  | 0,009**   |
| <i>S. ecornis</i> X <i>S. bibrainum</i>    | 10-/12-HODE; 9-OXO-OME   | 0,008**; 0,02*  |
| <i>K. lunaris</i> X <i>K. obesa</i>        | 9-HODE   | 0,019*  |
| <i>K. lunaris</i> X <i>A. densus</i>       | 9-HODE; 9-OXO-ODE  | 0,003**; 0,014*                                       |
| <i>K. lunaris</i> X <i>A. bernardii</i>    | 9-HODE   | 0,03*   |
| <i>K. lunaris</i> X <i>A. fusiformis</i>   | 9-HODE; 9-OXO-ODE  | 0,0009***; 0,017*                                     |
| <i>K. lunaris</i> X <i>A. stipitatus</i>   | 9-HODE   | 0,011*  |
| <i>K. lunaris</i> X <i>S. bibrainum</i>    | 9-HODE   | 0,032*  |
| <i>K. obesa</i> X <i>A. densus</i>         | 16-HOTE; 12-HOTE; 13-OXO-ODE                                     | 0,0009***; 0,002**; 0,002**                           |
| <i>K. obesa</i> X <i>A. fusiformis</i>     | 16-HOTE; 12-HOTE; 13-OXO-ODE                                     | 0,0009***; 0,044*; 0,006**                            |
| <i>A. densus</i> X <i>A. bernardii</i>     | 16- HOTE; 12-HOTE; 9-OXO-ODE                                     | 0,02*; 0,0009***; 0,0009***                           |
| <i>A. densus</i> X <i>A. stipitatus</i>    | 16-HOTE; 12-HOTE   | 0,0009***; 0,0009***                                  |
| <i>A. densus</i> X <i>A. fusiformis</i>    | 16-HOTE; 12-HOTE; 13-HODE; 13-OXO-ODE                            | 0,012*; 0,023*; 0,0009***; 0,0009***                  |
| <i>A. densus</i> X <i>S. bibrainum</i>     | 13- HODE; 10-/12-HODE;13-OXO-ODE; 13-HOTE; 9-OXO-OME; 10-OXO-OME | 0,003**; 0,0009***; 0,017*; 0,006**; 0,0099**; 0,015* |
| <i>A. bernardii</i> X <i>A. fusiformis</i> | 9-OXO-ODE  | 0,0009***   |
| <i>A. stipitatus</i> X <i>S. bibrainum</i> | 10-/12-HODE  | 0,041*  |
| <i>A. fusiformis</i> X <i>S. bibrainum</i> | 10-OXO-OME; 9-OXO-OME; 10-/12-HODE; 13-HOTE; 13-HODE             | 0,0009***; 0,0009***; 0,0009***; 0,0009***; 0,002**   |

**Significado códigos: 0 \*\*\* 0.001, \*\* 0.01, \* 0.05**



**Figura 1.5** Análise nMDS utilizando os valores das concentrações dos compostos apresentados para as espécies de microalgas da ordem Sphaeropleales.



**Figura 1.6** Análise nMDS utilizando os valores das proporções dos compostos apresentados para as espécies de microalgas da ordem Sphaeropleales.

As análises nMDS tanto para concentrações quanto para proporções de oxilipinas (Figuras 1.5 e 1.6, respectivamente) mostraram agrupamento entre as triplicatas de cultivo da mesma espécie para quase todas as cepas, exceto uma réplica de *K. lunaris* CCMA-UFSCar 087, uma réplica de *A. fusiformis* CCMA-UFSCar 333 e uma réplica de *S. bibraianum* CCMA-UFSCar 047. Não houve eficiência na separação de todas as espécies ou gêneros nesta análise gráfica. Além disso, é claro o distanciamento da cepa *A. densus* CCMA-UFSCar 003 das demais representantes de Sphaeropleales.

## 6. DISCUSSÃO

Considerando a escassez de informação acerca de oxilipinas em microalgas, em especial hidroxi- e oxo-ácidos da rota dos jasmonatos em algas verdes, esta pesquisa apresenta extenso valor em termos quimiotaxonômicos, ecológicos e de aplicabilidade comercial/industrial. Os perfis de oxilipinas obtidos podem ser utilizados para separar cepas e espécies tanto em termos de concentrações ( $R^2=74,4\%$ ;  $R^2=50,1\%$ ) como de proporções destes compostos ( $R^2=80,4\%$ ;  $R^2=50,1\%$ ), porém não temos homogeneidade entre as variâncias dos dados na maioria dos casos. Assim, é necessário reforçar os resultados com informações de outras cepas da família Selenastraceae a fim de tornar as análises mais robustas. Também se faz útil associar os resultados aqui obtidos para hidroxi e oxo-ácidos C18 a outros estudos envolvendo outras classes lipídicas a fim de complementar o conhecimento quimiotaxonômico atual acerca destes grupos de organismos fotossintetizantes.

Microalgas produzem diversos tipos de oxilipinas como hidroperóxi-ácidos, hidroxi-ácidos, aldeídos poliinsaturados e oxo-ácidos de importância farmacológica e eco-fisiológica (Nuñez *et al.*, 2000; Santiago-Vázquez *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2014; Trapp, 2016). A semelhança estrutural entre diferentes moléculas de oxilipinas, particularmente isômeros, como é o caso do resultado obtido no presente estudo, aumenta ainda mais a complexidade em sua análise, e assim requer cuidadosa separação e otimização de métodos para quantificar tais moléculas (Yang *et al.*, 2009). É evidente a partir deste estudo que as microalgas da família Selenastraceae (ordem Sphaeropleales) são ricas principalmente em hidroxi-oxilipinas, porém estes não são produtos exclusivos da oxidação dos PUFA's C18 nestes organismos devido à presença em menor quantidade de oxo-ácidos com uma ou duas insaturações. Ainda, marcantes variações observadas no conteúdo de oxilipinas podem ser atribuídas à disponibilidade

de seus substratos bem como às diferenças na especificidade das enzimas LOX (lipoxigenase) de cada espécie (Gerwick *et al.*, 1993; Potin, 2008; Göbel & Feussner, 2009).

Algas verdes da classe Chlorophyceae são particularmente ricas em PUFAs C18 (Kumari *et al.*, 2010 (macroalgas); Lang *et al.*, 2011 e Mori *et al.*, 2017 (microalgas)). Assim, similar tendência é esperada para seus derivados oxidados. Por outro lado, a literatura relata que algumas espécies de macroalgas pertencentes à classe Chlorophyceae apresentam níveis baixos de compostos do tipo hidroxi-ácidos (Kumari *et al.*, 2014). Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram que microalgas desta mesma classe produzem quantidades elevadas de hidroxi-ácidos. Os altos níveis de HODEs e HOTEs aqui encontrados podem estar ligados tanto à disponibilidade dos PUFAs precursores quanto à especificidade da enzima LOX para oxidação de LA e ALA. No entanto, a literatura não deixa claro se a mesma enzima LOX é responsável por diversas oxilipinas (específica para mais de um sítio de reação, p.e. 13- e 9-) encontradas aqui ou se mais de uma enzima está envolvida (se ocorre mais de um tipo de enzima LOX, responsáveis cada uma por um sítio específico de reação).

Por sua vez, os perfis de oxilipinas encontrados para Selenastraceae evidenciam similaridade em relação a outros estudos presentes na literatura realizados com espécies filogeneticamente próximas àquelas aqui abordadas, porém não há relatos de trabalhos que exploram especificamente esta família de microalgas. Matsumoto e Nagashima (1984) encontraram em *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae, Chlamydomonadales) 2-hidroxi-ácidos C16, C18 e C22 a 26, e para *Chlorella pyrenoidosa* (Trebouxiophyceae, Chlorellales) 2-hidroxi-ácidos C16 e C22 a C26. Em estudo paralelo, Matsumoto *et al.* (1984) mencionam que 3- e 2-hidroxi-ácidos podem ser utilizados para classificação de espécies de microalgas. Reyes *et al.* (2014) relatam

a presença dos compostos 16-HOTE, 12-HOTE, 13-HOTE, 9-HOTE e 13-HODE em *Chlamydomonas debaryana* (Chlorophyceae, Chlamydomonadales), porém os mesmos não foram detectados em *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae). Já Vick e Zimmerman (1989) observaram a presença do composto 13-HOTE em *Chlorella pyrenoidosa* (Trebouxiophyceae), oxilipina que apresenta valores inferiores a 7% em todas as microalgas aqui avaliadas.

Resultado peculiar em termos de concentração total de oxilipinas foi encontrado para a cepa CCMA-UFSCar 003, da espécie *A. densus*. Este fato justifica a variação dos dados verificada pela betadispersão, o que pode influenciar os resultados das análises PERMANOVA. A baixa concentração total de oxilipinas da cepa em questão também é responsável pelas dissimilaridades percentuais com as demais microalgas avaliadas.

Ainda sobre a concentração total de oxilipinas, as microalgas *Kirchneriella lunaris* (CCMA-UFSCar 087) e *Selenastrum bibraianum* (CCMA-UFSCar 334) se destacam das demais cepas pela sua alta produtividade. Trapp (2016) também obteve altas concentrações de oxilipinas derivadas de PUFA C18 para duas espécies de microalgas da família Selenastraceae quando comparados a vegetais superiores. A cepa *outgroup Scenedesmus ecornis* (CCMA-UFSCar 088) revelou diferenças expressivas quanto ao total de oxilipinas analisadas o que sugere distinção entre estas duas famílias quanto ao total de hidroxi- e oxo-ácidos. Estas descobertas revelam o potencial destes organismos como fonte de oxilipinas derivadas de PUFA C18 de interesse para a indústria farmacêutica. Em sua pesquisa, Reyes *et al.* (2014) explorou a ação anti-inflamatória de algumas oxilipinas produzidas por *Chlamydomonas debaryana*. Os autores constataram que 9-HOTE, 13-HOTE e 13-HODE induzem a produção de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) em macrófagos THP-1. Esta substância é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos e macrófagos em respostas imunológicas e

inflamatórias (Iqbal *et al.*, 2013) e macrófagos THP-1 constituem modelo de células cancerígenas e são encontradas em pacientes com leucemia monocítica aguda, um tipo de câncer sanguíneo.

Conclui-se que: (I) os resultados confirmam a expectativa de que oxo- e hidroxi-oxilipinas derivadas de PUFA's C18 amplamente distribuídos na natureza são relativamente preservados entre as cepas da família Selenastraceae embora o conteúdo dessas oxilipinas varie em quantidade e qualidade entre as espécies estudadas. (II) As elevadas concentrações de 13-HOTE, 12-HOTE, 13-HODE e 9-HODE encontrados em algumas das cepas de microalgas constituem potencial fonte destes bioativos de interesse farmacêutico. Essas oxilipinas de microalgas que são análogas àquelas encontradas em mamíferos na estrutura e função (Gerwick *et al.*, 1993) podem constituir alternativa para aquisição de oxilipinas quimicamente sintetizadas envolvidas no tratamento de inflamações como artrite, arteriosclerose e câncer, diminuindo custos terapêuticos. (III) Embora não tenham sido encontradas oxilipinas biomarcadores e o universo utilizado tenha sido reduzido para uma abordagem filogenética da família Selenastraceae, os perfis de oxilipinas obtidos podem ser úteis como estratégia quimiotaxonômica complementar para classificar cepas e espécies em termos de concentrações e/ou proporções destes compostos.

Por fim, todos os resultados aqui apresentados constituem informação essencial para progresso na pesquisa envolvendo compostos interessantes para diversas áreas da ciência.

### **7. FINANCIAMENTO**

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 141267/2014-3) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2011/50054-4).



**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABOU-ELWAFI, G. S. E. *et al.* Three new unsaturated fatty acids from the marine green alga *Ulva fasciata* Delile. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 64, n. 10, p. 1199-1207, 2009.

ANDREOU, A.; BRODHUN, F.; FEUSSNER, I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 3, p. 148-170, 2009.

BIGOGNO, C. *et al.* Lipid and Fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. **Phytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 497-503, 2002.

BLÉE, E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. **Trends in plant science**, v. 7, n. 7, p. 315-322, 2002.

BLÉE, E. Phytooxylipins and plant defense reactions. **Progress in Lipid Research**, v. 37, n. 1, p. 33-72, 1998.

CALDWELL, G. S. The influence of bioactive oxylipins from marine diatoms on invertebrate reproduction and development. **Marine Drugs**, v. 7, n. 3, 367-400, 2009.

FAWLEY, M. W. *et al.* Evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 142-154, 2005.

FONTANA, A. *et al.* Chemistry of oxylipin pathways in marine diatoms. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, 481-490, 2007.

GARCIA DA SILVA, T. *et al.* 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**, v. 17, n. 1, p. 1-19, 2017.

## Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

GERWICK, W. H. *et al.* Biologically active oxylipins from seaweeds. **Hydrobiologia**, v. 260, n. 1, p. 653-665, 1993.

GERWICK, W. H. Structure and biosynthesis of marine algal oxylipins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1211, n. 3, p. 243-255, 1994.

GÖBEL, C.; FEUSSNER, I. Methods for the analysis of oxylipins in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n. 13-14, p. 1485-1503, 2009.

GUILLARD, R. R.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide C. **Journal of Phycology**, v.8, n. 1, 10-14, 1972.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 160-186, 2006.

IQBAL, M. *et al.* Phytochemicals as a potential source for TNF- $\alpha$  inhibitors. **Phytochemistry reviews**, v. 12, n. 1, p. 65-93, 2013.

JÜTTNER, F. Detection of lipid degradation products in the water of a reservoir during a bloom of *Synura uvella*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 100-106, 1981.

HOWE, G. A.; SCHILMILLER, A. L. Oxylipin metabolism in response to stress. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 230-236, 2002

KOEDUKA, T. *et al.* Biochemical characterization of allene oxide synthases from the liverwort *Marchantia polymorpha* and green microalgae *Klebsormidium flaccidum* provides insight into the evolutionary divergence of the plant CYP74 family. **Planta**, v. 242, n. 5, p. 1175-1186, 2015.

KOMÁREK, J.; FOTT, B. Das Phytoplankton des Süßwassers Systematik und Biologie. 7. Teil: Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales: 1-1044. In: H.J.

## Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

Elster. & W. Ohle, [Eds]. **Die Binnengewässer**. Stuttgart, Begründet von August Thienemann. 1983.

KRIENITZ, L. *et al.* Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 37, n. 5, p. 852-865, 2001.

KUMARI, P. *et al.* Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 749-757, 2010.

KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. **Analytical biochemistry**, v. 415, n. 2, p. 134-144, 2011.

KUMARI, P.; REDDY, R.; JHA, B. Quantification of selected endogenous hydroxy-oxylipins from tropical marine macroalgae. **Marine Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 74-87, 2014.

LANG, I. *et al.* Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 124, 2011.

MOSBLECH, A.; FEUSSNER, I.; HEILMANN, I. Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 511-517, 2009.

MATSUMOTO, G. I.; SHIOYA, M.; NAGASHIMA, H. Occurrence of 2-hydroxy acids in microalgae. **Phytochemistry**, v. 23, n. 7, p. 1421-1423, 1984.

MATSUMOTO, G. I.; NAGASHIMA, H. Occurrence of 3-hydroxy acids in microalgae and cyanobacteria and their geochemical significance. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 48, n. 8, p. 1683-1687, 1984.

## Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

MORI, C. C. *et al.* Use of fatty acids in the chemotaxonomy of the family Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae). **Phytochemistry**, v. 151, p. 9-16, 2018.

NUÑEZ, A. *et al.* Anaerobic lipoxygenase activity from *Chlorella pyrenoidosa* responsible for the cleavage of the 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 3, p. 181-188, 2000.

OKSANEN, J., *et al.* Package ‘vegan’. **Community ecology package**, version, 2(9). 2013.

PEÑA-CORTÉS, H. *et al.* Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant response to pathogen and insects and in fruit ripening. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 23, n. 3, p. 246-260, 2004.

POHNERT, G. Diatom/copepod interactions in plankton: the indirect chemical defense of unicellular algae. **ChemBioChem**, v. 6, n. 6, 946-959, 2005.

POHNERT, G.; BOLAND, W. The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms. **Natural product reports**, v. 19, n. 1, p. 108-122, 2002.

POLLIO, A. *et al.* Lipid composition of the acidophilic alga *Dunaliella acidophila* (Volvocales, Chlorophyta) I. Non-polar lipids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 963, n. 1, p. 53-60, 1988.

POTIN, P. Oxidative burst and related responses in biotic interactions of algae. In: **Algal chemical ecology**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 245-271, 2008.

REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. Artmed Editora, 2006.

REYES, C. *et al.* Oxylipins from the microalgae *Chlamydomonas debaryana* and *Nannochloropsis gaditana* and their activity as TNF- $\alpha$  inhibitors. **Phytochemistry**, v. 102, p. 152-161, 2014.

ROBERTS, D. W. Labdsv: Ordination and Multivariate Analysis for Ecology. *R package version 1.7-0*. <http://CRAN.R-project.org/package=labdsv>, 2015.

## Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

SANTIAGO-VÁZQUEZ, L. Z. *et al.* Identification of hydroxy fatty acids by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectroscopy in *Euglena gracilis*. **Journal of Chromatography B**, v. 803, n. 2, p. 233-236, 2004.

SCHILMILLER, A. L.; HOWE, G. A. Systemic signaling in the wound response. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 369-377, 2005.

SENGER, T. *et al.* A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 7588-7596, 2005.

SINGH, A.; DEL POETA, M. Lipid signalling in pathogenic fungi. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 177-185, 2011.

STASWICK, P. E.; SU, W.; HOWELL, S. H. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 15, p. 6837-6840, 1992.

TEAM, R. Core. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016. 2017.

TRAPP, M. A. *et al.* Antibiotic oxylipins from *Alternanthera brasiliana* and its endophytic bacteria. **Phytochemistry**, 110, 72-82, 2015.

TRAPP, M.A. Bioactivity, chemical and microbial diversity in *Alternanthera brasiliana*: the influence of endophytes on antibiotic production. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos. 121p. 2016.

VICK, B. A.; ZIMMERMAN, D. C. Metabolism of fatty acid hydroperoxides by *Chlorella pyrenoidosa*. **Plant physiology**, v. 90, n. 1, p. 125-132, 1989.

WANG, R.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Seaweed extracts and unsaturated fatty acid constituents from the green alga *Ulva lactuca* as activators of the cytoprotective Nrf2–ARE pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 57, p. 141-153, 2013.

## Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

WASTERACK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1021-1058, 2013.

WASTERACK, C.; KOMBRINK, E. Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 63-77, 2009.

WATSON, S. B. *et al.* Under-ice blooms and source-water odour in a nutrient-poor reservoir: biological, ecological and applied perspectives. **Freshwater Biology**, v. 46, n. 11, p. 1553-1567, 2001.

WATSON, S. B.; SATCHWELL, T. Chrysophyte odour production: resource-mediated changes at the cell and population levels. **Phycologia**, v. 42, n. 4, p. 393-405, 2003.

YANG, J. *et al.* Quantitative profiling method for oxylipin metabolome by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 19, p. 8085-8093, 2009.

ZIMMERMAN, D. C.; VICK, B. A. Lipoxygenase in *Chlorella pyrenoidosa*. **Lipids**, v. 8, n. 5, p. 264-266, 1973.

---

## ***CAPÍTULO 2***

### ***OCORRÊNCIA DE OXILIPINAS COM 18 CARBORNOS EM MICROALGAS***

#### ***VERDES DE ÁGUA DOCE***

**AUTORES:** Ingritt Caroline Moreira<sup>a</sup>, Marilia Almeida Trapp<sup>b,c</sup>, Inessa Lacativa Bagatini<sup>a\*</sup> Edson Rodrigues-Filho<sup>b</sup>, Axel Mithöfer<sup>c</sup>, Armando Augusto Henriques Vieira<sup>a</sup>

**a** Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Rodovia Washington Luiz, km 235, São Carlos – SP, CEP 13.565-905, Brasil

**b** LaBioMMi, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luiz, km 235, CP 676, São Carlos – SP, CEP 13.565-905, Brasil

**c** Departamento de Química Biorgânica, Instituto Max Planck de Ecologia Química, Hans-Knöll-Straße 8, Jena, Alemanha

\* [ingritt@gmail.com](mailto:ingritt@gmail.com)

### **1. RESUMO**

Oxilipinas derivadas dos ácidos linolênico e linoléico (linoleatos) foram analisadas e comparadas entre uma cepa de Cyanobacteria de água doce, doze cepas de algas eucarióticas de água doce (uma Cryptophyta, duas Ochrophyta, três Charophyta e seis Chlorophyta), e três espécies de plantas terrestres por Cromatografia líquida de Alta Performance acoplada a Espectrômetro de Massas. Ênfase foi dada às (micro) algas verdes Chlorophyta e Charophyta, uma vez que esta última compreende a divisão mais próxima das plantas terrestres, um grupo extensivamente estudado para oxilipinas derivadas de PUFAs C18. Quatorze oxilipinas foram encontradas, sendo oito hidróxi ácidos e seis ceto (oxo) ácidos. Oxo ácidos ocorreram em quantidades variadas e apresentaram razões menores que os hidróxi ácidos. A cianobactéria *Microcystis aeruginosa* foi a cepa com menor conteúdo de oxilipinas. Em Ochrophyta, *Centritractus belenophorus* (Xanthophyceae, Ochrophyta) exibiu concentrações de oxilipinas três vezes maior que aquelas encontradas para a cepa de diatomácea (CCMA-UFSCar 383; Bacillariophyceae, Ochrophyta). *Cryptomonas obovata* (Cryptophyta) apresentou concentrações de oxilipinas similares às aquelas encontradas para a diatomácea. A inclusão destas três espécies objetivou obter dados sobre a ocorrência de perfis oxilipinas em organismos pertencentes a *taxa* derivados de “Archaeoplastida Rhodophyta” – Ochrophyta e Cryptophyta. Todos linoleatos identificados estão presentes em todas divisões de algas, exceto 12-HOTE o qual não foi encontrado em *Cryptomonas obovata*. Não foi observada nenhuma oxilipina que pudesse ser um indicador para determinada divisão ou classe. Em algas verdes, as cepas de Chlorophyta mostraram potencial de aplicação na produção de oxilipinas comerciais, como por exemplo aplicação farmacêutica devido a suas atividades antibióticas e anti-inflamatórias bem como produção de oxilipinas para padrões analíticos. Cepas de Charophyta apresentaram



grandes quantidades de 9- e 13-HODE. Além disso, as algas Charophyta apresentam concentração de oxilipinas dezenas de vezes menor que Chlorophyta, assemelhando-se mais às concentrações de oxilipinas encontradas em plantas, fato que pode estar relacionado à proximidade evolutiva entre plantas e Charophyta compreendendo as Streptophyta.

## 2. ABSTRACT

Oxylipins derived from linolenic and linoleic acid (linoleates) were analyzed and compared among one strain of freshwater Cyanobacteria, twelve freshwater strains of eukaryotic algae (one Cryptophyta, two Ochrophyta, three Charophyta and six Chlorophyta), and three species of land plants by High-Performance Liquid Chromatography coupled tandem Mass Spectrometry. Emphasis has been placed on green (micro)algae Chlorophyta and Charophyta, since the last one comprise the phylum closer to land plants, a group extensively studied for oxylipins derived from C18 PUFAs. Fourteen oxylipins were found, i.e. eight hydroxy acids and six keto (oxo) acids. There was found six oxo acids and eight hydroxy acids. Oxo acids occurred in variable quantities and presented lower total ratios than hydroxy acids. Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* was the strain with lowest content of oxylipins. In Ochrophyta, *Centritractus belenophorus* (Xanthophyceae, Ochrophyta) exhibited oxylipin concentrations three times higher than those found for strain of diatom (CCMA-UFSCar 383; Bacillariophyceae, Ochrophyta). Likewise, *Cryptomonas obovata* (Cryptophyta) presented oxylipin concentrations similar to those found for diatom. The inclusion of these three species aimed to obtain data on the occurrence of oxylipin profiles for organisms belonging to taxa derived from "Archaeplastida Rhodophyta" - Ochrophyta and Cryptophyta. All linoleates are present in all phyla, except 12-HOTE, which was not found in *Cryptomonas obovata*. The absence of oxylipins could be an indicator for a determined phylum or class. Concerning green algae, strains of Chlorophyta showed potential application in production of commercial oxylipins, i.e. pharmaceutical application due to their antibiotic and anti-inflammatory activities and production of oxylipins as analytical standards. Strains of Charophyta presented large amounts of 9- and 13-HODE. Besides that, Charophyta algae showed oxylipins concentrations dozen

times lower than Chlorophyta, resembling the concentrations of oxylipins found in plants, a fact that may be related to the evolutionary proximity between plants and Charophyta that comprise Streptophyta.

**Palavras-chave:** oxilipinas, algas, Chlorophyta, Charophyta, hidroxi-ácidos, oxo-ácidos.

**Abreviações:**

**HOTE** - ácido hidroxi-octadecatrienoico

**HODE** - ácido hidroxi-octadecadienoico

**OXO-ODE** - ácido oxo-octadecadienoico

**OXO-OME** - ácido oxo-octadecanoico

### 3. INTRODUÇÃO

A oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) é uma das principais reações do metabolismo celular de lipídeos, cujos produtos são derivados biologicamente ativos chamados oxilipinas (Mosblech *et al.*, 2009). A presença de oxilipinas é generalizada na natureza e ocorrem em fungos, animais, plantas, musgos, algas eucarióticas e procarióticas (Cyanobacteria) e bactérias (Schillmiller & Howe, 2005; Senger *et al.*, 2005; Singh & Del Poeta, 2011). Distintos organismos produzem uma grande variedade de oxilipinas específicas segundo os diversos substratos (PUFAs) e seus grupos enzimáticos característicos de cada grupo. Os PUFAs que servem de substrato para tais reações podem ser de origem estrutural como fosfolipídios das membranas celulares e galactolipídeos das membranas dos cloroplastos, bem como podem ser substâncias de reserva ou em trânsito no interior da célula (Andreou *et al.*, 2009) O primeiro produto da oxidação dos PUFAs são os hidroperóxidos de ácidos graxos que, por sua vez, são oxidados a hidroxi-, oxo- e epóxi-ácidos, divinil éteres, compostos voláteis como álcoois e aldeídos poli-insaturados (PUAs), jasmonatos entre outros (Blée, 1998; Bouarab *et al.*, 2004; Guschina & Harwood, 2006; Cutignano *et al.*, 2011).

Em geral, as oxilipinas são bem diversificadas e cumprem diversos papéis nas plantas terrestres. Nas Bryophyta (plantas avasculares), que incluem musgos, hepáticas e antóceros, além de oxilipinas provenientes de PUFAs C18, são encontradas grandes quantidades de oxilipinas produzidas a partir de PUFAs C20, raramente presentes em plantas com flores (Gerwick *et al.*, 1993; Gerwick, 1994; Abou El-Wafa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Kumari *et al.*, 2014). Estudos relatam que, nas Bryophyta, oxilipinas estão envolvidas em diversos processos biológicos como desenvolvimento e respostas de defesa contra patógenos (Machado *et al.*, 2015; Yamamoto *et al.*, 2015). Nas plantas vasculares, as oxilipinas são produzidas principalmente pelos PUFAs C18 e C16 e suas

funções estão ligadas a processos regulatórios como resposta a estresse ambientais e também sinalizadores moleculares que agem na defesa contra patógenos (Blée, 2002; Howe & Schilmiller, 2002; Andreou *et al.*, 2009). Uma classe de oxilipinas constante em plantas terrestres são os jasmonatos, um grupo específico de oxilipinas que incluem o ácido oxo-fitodienoico (OPDA), o ácido jasmônico (JA) e o metil-jasmonato (MeJA). Estes compostos são importantes hormônios que controlam o crescimento, o desenvolvimento de flores e frutos, além da senescência, e de atuarem como reguladores das respostas a estresses bióticos e abióticos (Wasternack & Hause, 2013).

Com relação às algas, a maioria dos estudos foi realizada com macroalgas marinhas e microalgas diatomáceas. Além de uma pequena quantidade de PUFAs com 18 carbonos, as macroalgas Rhodophyta e Phaeophyceae possuem PUFAs com 20 carbonos, incluindo ácidos araquidônicos (ARA-C20:4) e eicosapentaenoico (EPA-C20:5) que também podem ser oxidados a estes compostos bioativos (Gerwick *et al.*, 1993; Gerwick, 1994; Kumari *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013). Na classe Ulvophyceae (Chlorophyta), a formação de oxilipinas dá-se principalmente a partir da oxidação de PUFAs C18, como é o caso do ácido linolênico (ALA-C18:3) e o ácido linoleico (LA-C18:2) (Abou El-Wafa *et al.*, 2009; Andreou *et al.*, 2009; Guschina & Harwood, 2006; Gerwick, 1994).

Em geral, as microalgas podem formar oxilipinas a partir tanto de PUFAs C18 como também de PUFAs C16 e C20 (Andreou *et al.*, 2009; 8, 24, 25]. Embora sua função em microalgas não tenha sido estabelecida, é considerada a hipótese de que as oxilipinas atuam como mensageiros e podem estar envolvidas em uma ampla gama de atividades, como reparação de lesões, homeostasia, crescimento, defesa química e adaptação ambiental (Gerwick, 1994; Pohnert & Boland, 2002).

As microalgas com maior foco de estudo de oxilipinas pertencem à classe Bacillariophyceae (Ochrophyta). Aqui, a oxidação dos PUFA's C16, C18 e C20 produz uma série de oxilipinas e um tipo de destaque são os PUAs, aldeídos envolvidos na defesa química contra predadores e também na sinalização molecular (Cadwell, 2009; Fontana *et al.*, 2007; Pohnert, 2005).

Muitas pesquisas sobre a ação/aplicação destes compostos também foram desenvolvidas ao longo das duas últimas décadas o que mostrou um grande potencial farmacológico de algumas oxilipinas produzidas por microalgas e plantas envolvendo atividades anti-inflamatórias e ação antibiótica (Reyes *et al.*, 2014; Trapp *et al.*, 2015).

Com relação a águas continentais, estudos sobre oxilipinas em várias classes de microalgas destes ambientes não são muito numerosos e os existentes abordaram apenas alguns *taxa* superiores. Foram detectadas oxilipinas voláteis em representantes da classe Chrysophyceae (Divisão Ochrophyta ou Heterokontophyta, dependendo dos autores): uma floração da microalga *Synura uvella* (Jüttner, 1981); em florações de *Dinobryon divergens* e *Synura petersenii* (Watson *et al.*, 2001), e em culturas de *Mallomonas papillosa*, *Dinobryon cylindricum* e *Uroglena americana* (Watson & Satchwill, 2003). Também é relatada ocorrência de oxilipinas não-voláteis como os hidróxi-ácidos derivados de PUFA's C20 estudados em *Euglena gracilis* (Euglenophyta) (D'Ippolito *et al.*, 2005; Santiago-Vazquez, 2004).

Em se tratando das microalgas verdes, estas são divididas em dois grupos: Chlorophyta e Charophyta. Estas microalgas são frequentemente dominantes em corpos d'água doce lênticos e também se destacam como importantes produtores primários nesses ambientes (Hoek *et al.*, 1995). Surpreendentemente, são extremamente raros os relatos sobre oxilipinas em microalgas verdes de água doce. Até a presente data, conseguimos rastrear poucos trabalhos, três envolvendo a Chlorophyta (classe

Trebouxiophyceae) *Chlorella pyrenoidosa* (Zimmermann & Vick, 1973; Nuñez *et al.*, 2000), um com *Chlamydomonas debaryana* (Chlorophyceae) (Reyes *et al.*, 2014) e outro sobre enzimas envolvidas na formação de oxilipinas em *Klebsormidium flaccidum*, uma microalga da divisão Charophyta (Koeduka *et al.*, 2015). Ressalta-se que a pesquisa envolvendo *C. pyrenoidosa* (Zimmermann & Vick, 1973), além de ser o primeiro trabalho a abordar a produção de oxilipinas em algas, foi um dos primeiros sobre a ocorrência desses compostos entre todos os organismos. Com relação à Selenastraceae, a qual pertence a maioria das espécies de Chlorophyceae abordadas neste trabalho, apenas Trapp (2016) também avaliou duas espécies pertencentes à esta família.

Considerando os escassos trabalhos referentes a microalgas de água doce, esta pesquisa tem como objetivo estudar comparativamente a produção de oxilipinas que possam ser produzidas por algas e plantas a partir da oxidação de PUFA's C18, principalmente ácido linolênico (ALA - C18:3) e ácido linoléico (LA -C18:2). Particular enfoque é dado às divisões de microalgas verdes, Chlorophyta e Charophyta e, nesta última, as classes Zygnematophyceae e Charophyceae despertam singular interesse, pois são algas evolutivamente muito próximas das plantas, e ambos os grupos considerados por muitos como pertencentes ao *supergrupo* Streptophyta que, segundo alguns autores, inclui as plantas terrestres correspondendo à *superdivisão* Embryophyta (Leliaert *et al.*, 2012).

Oxilipinas derivadas de PUFA's C18 são bem conhecidas em plantas (Embryophyta). Também é sabido que ocorrem em plantas vasculares sem flores *extantes*, arquegoniadas, em algumas algas verdes marinhas e nos poucos *taxa* de água doce já estudados. Também existem relatos, poucos, sobre a ocorrência em algumas algas verdes Streptophyta, grupo composto pelas algas verdes Charophyta e plantas, filogeneticamente muito próximos. Entretanto, com relação às algas verdes Chlorophyta,



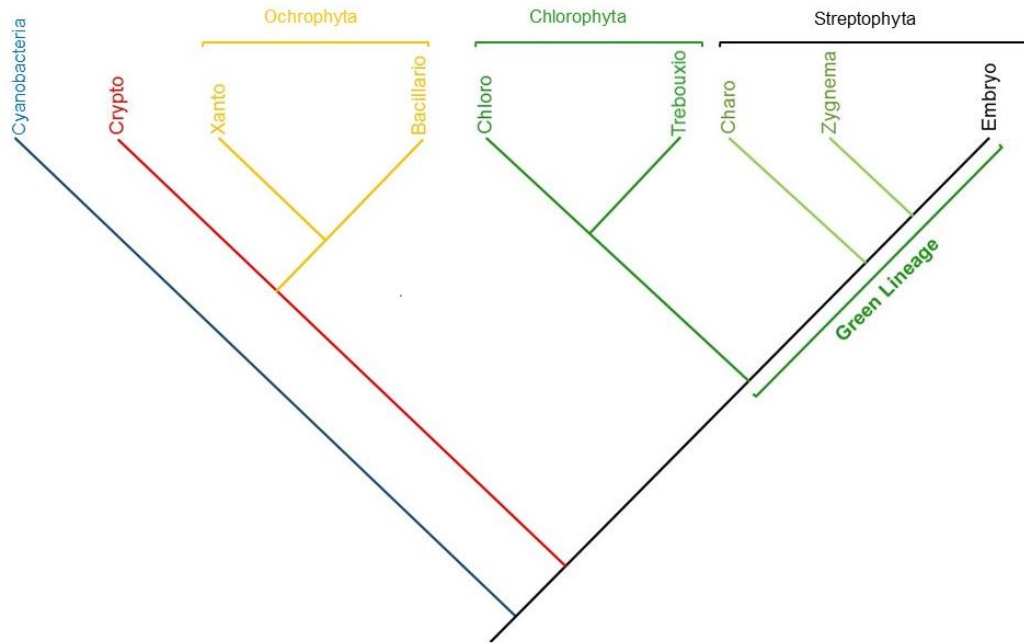
principalmente da classe Chlorophyceae e Trebouxiophyceae, e mesmo as Charophyta, o número de espécies estudadas é muito restrito. No entanto, ainda assim, os poucos dados disponíveis mostram que o perfil de oxilipinas derivadas de C18 aparentemente é semelhante, verticalmente na linhagem evolutiva derivada da endossimbiose primária envolvendo Chlorophyta, Charophyta e plantas, incluindo as arquegoniadas e as *extantes* plantas vasculares sem flores.

Portanto, em paralelo à prospecção da diversidade das oxilipinas derivadas de PUFAs C18 em microalgas de água doce, um dos objetivos, elegemos como um segundo objetivo utilizar um número maior e diversificado de algas verdes, juntamente com uma cianobactéria e três plantas (Embryophyta) para comparar seus perfis de oxilipinas e testar se tais perfis se repetem realmente nesses grupos “verdes”; e se o perfil das oxilipinas de Charophyta confirma o posicionamento deste *taxon* em Streptophyta juntamente com as plantas.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Seleção das cepas

Onze cepas de microalgas eucarióticas (dez microalgas cocoides, uma filamentosa), uma macroalga eucariótica (*Chara* sp), uma cepa de Cyanobacteria e três plantas foram investigadas (**Tabela 2.1**). As algas eucarióticas pertencem a quatro divisões: seis cepas de Chlorophyta, três Charophyta, duas Ochrophyta e uma Cryptophyta. Entre as Chlorophyta, quatro cepas pertencem à classe Chlorophyceae e outras duas são Trebouxiophyceae. Em Charophyta, *Spondylosium pygmaeum* e *Micrasterias pinnatifida* pertencem à classe Zygnematophyceae e a macroalga *Chara* sp. pertence à classe Charophyceae. Em Ochrophyta, *Centrtractus belenophorus* pertencem à classe Xantophyceae e a diatomácea não identificada à classe Bacillariophyceae. As cepas foram coletadas em diferentes locais e datas (**Tabela 2.1**). Aqui foi adotado o sistema de classificação proposto por Reviere (2006) com adaptações (Bicudo & Menezes, 2017) (**Figura 2.1**). Neste trabalho é dada maior ênfase à comparação da ocorrência das oxilipinas entre as classes de Chlorophyta, Charophyta e Embryophyta (plantas) (Leliaert *et al.*, 2012).



**Figura 2.1** Cladograma simbolizando relações filogenéticas entre classes e divisões abordadas neste estudo. Classificação de acordo com Reiers (2006) e Leliaert *et al.* (2012). Abreviações: Crypto – Cryptophyta; Xanto – Xantophyceae; Bacillario – Bacillariophyceae; Chloro – Chlorophyceae; Trebouxio – Trebouxiophyceae; Charo – Charophyceae; Zygnema – Zygnematophyceae; Embryo – Embryophyta.

As microalgas utilizadas nesta pesquisa são mantidas sob condições axênicas na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar), São Paulo, Brasil. *Chara* sp. é mantida em um tanque aberto no jardim experimental do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos.

Três espécies de plantas terrestres, *Alternanthera brasiliana*, *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus lunatus*, a fim de se obter uma análise abrangente que envolvesse ambas divisões de organismos que compõem o *supergrupo* Streptophyta. Aqui plantas terrestres são representadas por estas espécies de Embryophyta.

**Tabela 2.1** Relação das doze cepas de algas eucarióticas, uma cianobactéria e três vegetais superiores analisados por HPLC-MS/MS (High-Performance Liquid Chromatography coupled tandem Mass Spectrometry – Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometria de Massa).

| ORGANISMO       | DIVISÃO/CLASSE/ORDEM                      | TAXON  | ORIGEM   |
|-----------------|---|--|--|
| LIMA            | Embryophyta/Magnoliopsysda/Fabales        | <i>Phaseolus lunatus</i> L.  | Cultivada em casa de vegetação no Max Planck, Jena, Alemanha |
| ARA             | Embryophyta/Magnoliopsysda/Brassicales    | <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.                            | Cultivada em casa de vegetação no Max Planck, Jena, Alemanha |
| ALTER           | Embryophyta/Magnoliopsysda/Caryophyllales | <i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze                        | Horta municipal de São Carlos – SP, Brasil                   |
| CHARA           | Charophyta/Charophyceae/Charales          | <i>Chara</i> sp  | Ilha do Padre, Rio Formoso, Bonito - MS, Brasil              |
| CCMA-UFSCar 014 | Charophyta/Zygnematophyceae/Desmidiiales  | <i>Spondylosium pygmaeum</i> Cooke                                 | Lagoa do Infernã (EE Jataí), Luis Antonio - SP, Brasil       |
| CCMA-UFSCar 089 | Charophyta/Zygnematophyceae/Desmidiiales  | <i>Micrasterias pinnatifida</i> Kützing                            | Lagoa do Infernã (EE Jataí), Luis Antonio - SP, Brasil       |
| CCMA-UFSCar 277 | Chlorophyta/Chorophyceae/Sphaeropleales   | <i>Ankistrodesmus stipitatus</i> (Chodat) Komárková-Legnerová 1969 | Lagoa Vitória, São João Batista do Glória - MG, Brasil       |
| CCMA-UFSCar 047 | Chlorophyta/Chorophyceae/Sphaeropleales   | <i>Selenastrum bibraianum</i> Reinsch 1866                         | Represa do Monjolinho, UFSCar, São Carlos - SP, Brasil       |
| CCMA-UFSCar 087 | Chlorophyta/Chorophyceae/Sphaeropleales   | <i>Kirchneriella lunaris</i> (Kirchner) K.Möbius 1894              | Lagoa do Infernã (EE Jataí), Luis Antonio - SP, Brasil       |
| CCMA-UFSCar 088 | Chlorophyta/Chorophyceae/Sphaeropleales   | <i>Scenedesmus ecornis</i> Ralfs                                   | Lagoa do Infernã (EE Jataí), Luis Antonio - SP, Brasil       |
| CCMA-UFSCar 399 | Chlorophyta/Trebouxiophyceae/Trebouxiales | <i>Botryococcus braunii</i> Kützing                                | Universidade do Texas (UTEX), EUA                            |
| CCMA-UFSCar 663 | Chlorophyta/Trebouxiophyceae/Chlorellales | <i>Dictyosphaerium</i> sp Nägeli, 1849                             | Represa Municipal - Icém - SP, Brasil                        |
| CCMA-UFSCar 558 | Ochrophyta/Xanthophyceae/Mischococcales   | <i>Centrtractus belenophorus</i> Lemmermann 1900                   | Lagoa Centro de Zootecnia - Sertãozinho - SP, Brasil         |
| CCMA-UFSCar 383 | Ochrophyta/Bacillariophyceae/Penales      | Penales sp. (não identificada)                                     | Fonte de jardim particular - São Carlos - SP, Brasil         |
| CCMA-UFSCar 148 | Cryptophyta/Cryptophyceae/Cryptomonadales | <i>Cryptomonas obovata</i> Skuja                                   | Represa da EE Jataí – Luis Antonio - SP, Brasil              |
| CCMA-UFSCar 666 | Cyanobacteria/Cyanophyceae/Chroococcales  | <i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing                    | Reservatório de Barra Bonita - SP, Brasil                    |

### 4.2 Condições de Cultivos

Com exceção de *Chara* sp, que foi cultivada *outdoor* em um tanque de 500 litros com água de torneira sem cloro, todas as outras cepas (**Tabela 2.1**) foram cultivadas (em triplicata) em frascos de vidro Boeco® de 2 L de capacidade total com volume de 1,8 L de meio de cultura WC (Guillard & Lorenzen, 1972), pH 7,0. Todas as cepas, com a exceção já citada, foram cultivadas sob condições idênticas: intensidade luminosa de 200  $\mu\text{mol f\u00f3tons} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  de irradi\u00e2ncia (Quantameter QSL-100, Biospherical Instruments), temperatura de  $23 \pm 1$  °C, fotoper\u00edodo de 12/12 horas (claro/escuro), borbulhamento constante de ar comprimido filtrado ( $0,05 \text{ L} \times \text{min}^{-1}$ ) e concentra\u00e7\u00e3o inicial de  $10^4$  c\u00e9lulas  $\times \text{mL}^{-1}$ , conferida por contagem de c\u00e9lulas em c\u00e2mara Fuchs Rosenthal 3.2 (catalog N\u00b0 3720, Hauser Scientific, Horsham, PA). A condi\u00e7\u00e3o ax\u00eanica das culturas foi checada no in\u00edcio e fim do cultivo por inocula\u00e7\u00e3o de uma al\u00edquota das culturas em meio WC pH 7.0 enriquecido com peptona bacteriol\u00f3gica e dextrose (glicose) (250mg/L de cada). O cultivo de *Chara* sp n\u00e3o foi ax\u00eanico, contudo o organismo foi lavado com meio de cultura WC pH 7,0 autoclavado e centrifugado seis vezes para a elimina\u00e7\u00e3o de bact\u00e9rias em suspens\u00e3o.

Plantas de *Alternanthera brasiliana*, *Arabidopsis thaliana* e *Phaseolus lunatus* foram cultivadas (em triplicata) sob regime de dia curto (10 h/14 h, claro/escuro) a 21 °C e 50–60% de umidade por quatro semanas.

### 4.3 Curvas de crescimento e cultivos experimentais

A amostragem dos cultivos experimentais foi feita na fase estacion\u00e1ria em que h\u00e1 consider\u00e1vel ac\u00famulo de alguns \u00e1cidos graxos precursores das oxilipinas (Guschina & Harwood, 2006; Bigogno *et al.*, 2002). A curva de crescimento de cada microalga foi determinada em cultivos pr\u00e9vios e o acompanhamento do crescimento dos cultivos foi

feito por clorofila-a (Chl-a) *in vivo* (fluorômetro Trilogy™, Turner Designs, Sunnyvale, CA) e absorvância do maior comprimento de onda entre 668-682 nm subtraído de 750 nm (turbidez) em espectrofotômetro DR5000 (Hach®). As amostragens foram realizadas em intervalos de no máximo 72 h até o estabelecimento da fase estacionária de crescimento.

Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, os cultivos foram concentrados em centrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5804), a 10 °C, velocidade de 7 a 11.5g e tempo variando de 5 a 10 minutos, dependendo da microalga. As biomassas algais concentradas foram lavadas três vezes com meio WC sem micronutrientes e vitaminas, congeladas, liofilizadas, separadas em alíquotas de 25 mg em tubos de 1,5 mL e mantidas a -20 °C até que as análises de oxilipinas fossem realizadas. Uma vez lavada, a biomassa fresca da alga *Chara* sp. também foi congelada, liofilizada, separada em alíquotas de 25 mg em tubos de 1,5 mL e mantidas a -20 °C até que as análises de oxilipinas fossem realizadas. Três folhas de cada planta *Alternanthera brasiliana*, *Arabidopsis thaliana* e *Lima bean* foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas, separada em três alíquotas de 25 mg em tubos de 1,5 mL e mantidas a -20 °C até que as análises de oxilipinas fossem realizadas.

### 4.4 Análises das Oxilipinas

#### 4.4.1 Extração das Oxilipinas

Cada amostra foi extraída com 250µL de metanol:água (7:3) contendo 20 ng/mL do padrão interno 13-d6HODE (OIChemIm LTD, Olomouc, Czech Republic) e sonicadas por 10 min. A extração foi seguida por centrifugação (5 min a 15000g), e o sobrenadante foi transferido para outro tubo esterilizado. 20 µL do sobrenadante foram diretamente analisados por HPLC-MS/MS. As oxilipinas detectadas aqui foram previamente isoladas

e identificadas em pesquisa anterior envolvendo a espécie *Alternanthera brasiliana* (Trapp *et al.*, 2015) e posteriormente o mesmo método foi validado para as microalgas *Ankistrodesmus densus* e *Selenastrum bibraianum* (Trapp, 2016).

### 4.4.2 Métodos Analíticos para Oxilipinas

Oxilipinas foram medidas por HPLC-MS/MS de acordo com Trapp (2016). As análises HPLC-MS/MS foram realizadas em um sistema HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Böblingen, Germany) conectado a um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Separação cromatográfica foi realizada em um Phenomenex Kinetex<sup>®</sup>, com coluna de phenyl-hexyl de medidas 100Å 100 x 2.1 mm, 2.6 µm, usando 0.05 % de ácido fórmico (solução A) e metanol com 0.05% de ácido fórmico (solução B) como fase móvel. O gradiente de eluição (0.250 µL/min) foi realizado da seguinte maneira: 70-100% de B por 12 min, 100% de B por 2 min, e um equilíbrio por 8 min a 70% de B. Os compostos foram detectados no modo negativo por experimentos de SRM (single reaction monitoring) com os seguintes parâmetros de ionização: voltagem da fonte: 4,4 kV, voltagem do capilar: -48 V, tube lens -113 V, potencial de desclustering 10 V, temperatura de turbo gás: 300 °C, fluxo de gás auxiliar: 4.5 L/min, fluxo de sheath gás: 9 L/min.

As transições SRM usadas para a detecção seletiva de compostos foram: composto **1** ( $m/z$  293>235), composto **2** ( $m/z$  293>171), composto **3** ( $m/z$  293>195), composto **4** ( $m/z$  295>195), compostos **5** e **6** ( $m/z$  295>171), compostos **7** e **8** ( $m/z$  293>113), composto **9** e **10** ( $m/z$  293>197), compostos **11** e **12** ( $m/z$  295>183), composto **13** ( $m/z$  295>151), composto **14** ( $m/z$  295>155) e padrão interno 13-HODE ( $m/z$  299>172).

As quantificações dos compostos **4**, **5/6**, **7/8** e **9/10** foram realizadas com base nas curvas de calibração de padrões comerciais disponíveis e o montante dos demais

compostos foram estimados com base nestas curvas de calibração. As soluções para as curvas de calibração foram feitas em solvente (metanol:água (7:3)), a partir de uma solução contendo 20ng/mL de cada padrão. Foram utilizadas regressões lineares e peso de 1 ou 2 para todas as curvas, dependendo da concentração.

### *4.5 Análises estatísticas*

O software R (Team, 2016) foi usado para realizar as análises estatísticas. As diferenças estatisticamente significativas entre a concentração de uma oxilipina e a proporção da oxilipina entre as classes e divisões microalgais foram calculadas com a análise SIMPER (Similarity Percentages) (Pacote Vegan) (Oksanen *et al.*, 2013).

As dissimilaridades nos perfis de oxilipinas entre os *taxa* foram calculadas com base na matriz das concentrações de oxilipinas utilizando a distância de Bray-Curtis e ordenadas em duas dimensões em um diagrama de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS). A mesma matriz de distância foi utilizada para análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) que abordou os dados de três maneiras: todos os dados das seis divisões, os dados das plantas terrestres e das algas verdes em conjunto e os dados das plantas terrestres e das algas verdes por classe em uma análise par-a-par, sendo que a homogeneidade das variâncias foi previamente testada (comando betadisper no Pacote Vegan). A possível presença de oxilipinas indicadoras de classes ou divisões foi verificada por meio do “valor indicador” (IndVal) do pacote labdsv (Roberts, 2015). Para gerar um dendograma de classificação para a linhagem verde, foi realizada a análise HCA (Hierarchical Cluster Analysis) com base nas concentrações de oxilipinas por espécie (complete linkage e distância de Bray-Curtis) usando a função hclust no software R.



### 5. RESULTADOS

Das dezessete oxilipinas descritas por Trapp *et al.*, 2015, quatorze foram detectadas nos organismos avaliados nesta pesquisa (**Tabela 2.2**), sendo oito hidroxí-ácidos e seis oxo-ácidos. O padrão de fragmentação fornecido pelas análises de espectrometria de massa de cada uma das oxilipinas encontradas nos organismos aqui estudados são apresentados nos cromatogramas SRM (**Anexo 2**). Por serem isômeros geométricos E-Z, cada par de linoleatos **5 e 6** (9-HODE), **7 e 8** (13-OXO-ODE), **9 e 10** (9-OXO-ODE) é apresentado nos resultados como um único composto. As diferenças estão nas configurações espaciais das duplas ligações do carbono 12 do par **5 e 6** (12Z e 12E respectivamente), do carbono 9 do par **7 e 8** (9Z e 9E respectivamente), do carbono 12 do par **9 e 10** (12Z e 12E respectivamente). Já os compostos **11 e 12** (10- e 12-HODE) são isômeros de posição; as diferenças encontram-se nas posições do grupo hidroxila (10- e 12-) e das duplas insaturações, 8E e 12Z para o composto 11 e 9Z e 13E para o composto 12. Além disso, não foi possível separar os picos destes dois compostos na cromatografia líquida. As curvas de calibração dos compostos **4, 5/6, 7/8 e 9/10** são apresentadas no **Anexo 1**.

A **Tabela 2.2** apresenta o tempo que cada um dos organismos (microalgas e cianobactéria) levou para atingir a fase estacionária de crescimento, o valor médio de biomassa seca encontrado para as triplicatas de cultivo. Como a macroalga *Chara* sp é constantemente mantida em um tanque no jardim do Departamento de Botânica da UFSCar, foram coletados 5 g de biomassa fresca que foi dividida em triplicatas. Para as plantas terrestres utilizadas aqui, as três folhas coletadas foram liofilizadas e posteriormente divididas em triplicatas para a extração das oxilipinas.

**Tabela 2.2** Relação dos tempos de cultivo (em dias) até a fase estacionária de crescimento (dados baseados em curvas de crescimento) e valores (em mg) das biomassas das cepas de microalgas e a cianobactéria estudadas.

| <b>CEPA</b>     | <b>TAXON</b>                     | <b>TEMPO DE CULTIVO</b> | <b>BIOMASSA SECA</b> |
|-----------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------|
| CCMA-UFSCar 014 | <i>Spondylosium pygmaeum</i>     | 34                      | 158,55 (8,74)        |
| CCMA-UFSCar 089 | <i>Micrasterias pinnatifida</i>  | 32                      | 143,49 (12,13)       |
| CCMA-UFSCar 277 | <i>Ankistrodesmus stipitatus</i> | 26                      | 275,61 (19,99)       |
| CCMA-UFSCar 047 | <i>Selenastrum bibraianum</i>    | 24                      | 391,19 (25,47)       |
| CCMA-UFSCar 087 | <i>Kirchneriella lunaris</i>     | 24                      | 680,21 (78,52)       |
| CCMA-UFSCar 088 | <i>Scenedesmus ecornis</i>       | 28                      | 216,84 (25,19)       |
| CCMA-UFSCar 399 | <i>Botryococcus braunii</i>      | 29                      | 199,63 (14,42)       |
| CCMA-UFSCar 663 | <i>Dictyosphaerium</i> sp        | 33                      | 187,15 (90,04)       |
| CCMA-UFSCar 558 | <i>Centrtractus belenophorus</i> | 22                      | 127,55 (10,66)       |
| CCMA-UFSCar 383 | Diatomácea não identificada      | 30                      | 188,92 (11,31)       |
| CCMA-UFSCar 148 | <i>Cryptomonas obovata</i>       | 30                      | 130,44 (48,77)       |
| CCMA-UFSCar 666 | <i>Microcystis aeruginosa</i>    | 21                      | 200,66 (19,65)       |

**Tabela 2.3** Oxilipinas encontradas nas microalgas analisadas, seus números, nomes, siglas e estruturas.

|             |  |  |
|-------------|--|--|
| Composto 1  | 16-HOTE (9Z,12Z,14E) ou ácido (9Z,12Z,14E)-16-hidroxi-9,12,14- octadecatrienoico |  |
| Composto 2  | 12-HOTE (9Z,13E,15Z) ou ácido (9Z,13E,15Z)-12-hidroxi-9,13,15-octadecatrienoico  |  |
| Composto 3  | 13-HOTE (9Z,11E,15Z) ou ácido (9Z,11E,15Z)-13-hidroxi-9,11,15-octadecatrienoico  |  |
| Composto 4  | 13-HODE (9Z,11E) ou ácido (9Z,11E) 13-hidroxi-9,11-octadecadienoico              |  |
| Composto 5  | 9-HODE (10E,12Z) ou ácido (10E,12Z) 9-hidroxi-10,12-octadecadienoico             |  |
| Composto 6  | 9-HODE (10E,12E) ou ácido (10E,12E) 9-hidroxi-10,12-octadecadienoico             |  |
| Composto 7  | 13-OXO-ODE (9Z,11E) ou ácido (9Z,11E) 13-oxo-9,11-octadecadienoico               |  |
| Composto 8  | 13-OXO-ODE (9E,11E) ou ácido (9E,11E) 13-oxo-9,11-octadecadienoico               |  |
| Composto 9  | 9-OXO-ODE (10E,12Z) ou ácido (10E,12Z) 9-oxo-10,12-octadecadienoico              |  |
| Composto 10 | 9-OXO-ODE (10E,12E) ou ácido (10E,12E) 9-oxo-10,12-octadecadienoico              |  |
| Composto 11 | 10-HODE (8E,12Z) ou ácido (8E,12Z) 10-hidroxi-8,12-octadecadienoico              |  |
| Composto 12 | 12-HODE (9Z,13E) ou ácido (9Z,13E) 12-hidroxi-9,13-octadecadienoico              |  |
| Composto 13 | 10-OXO-OME (8E) ou ácido (8E) 10-oxo-8-octadecenoico                             |  |
| Composto 14 | 9-OXO-OME (7E) ou ácido (7E) 9-oxo-7-octadecenoico                               |  |

As médias das concentrações de cada oxilipina por grupo (divisão/classe) bem como suas proporções são apresentadas no **Anexo 4**. Na divisão Ochrophyta, tanto a Xanthophyceae *C. belenophorus* como a diatomácea se destacaram na produção do composto **1**, 16-HOTE (499,47 e 230,77 µg/g de biomassa seca, respectivamente), seguido do composto **2** (12-HOTE) (297,30 e 99,03 µg/g biomassa seca). Foram observados para o composto **1** (16-HOTE) níveis próximos aos de Chlorophyta e Ochrophyta, porém superiores a Cyanobacteria. Os demais compostos apresentaram concentrações similares àquelas encontradas em Embryoophyta, contudo muito menores que aquelas encontradas em Ochrophyta e Cyanobacteria: 13-OXO-ODE com 29,67 µg/g de biomassa seca; 9-OXO-ODE com 22,57 µg/g; 9-HODE com 21,93 µg/g; 13-HOTE com 19,23 µg/g; 13-HODE com 11,20 µg/g; 10- e 12-HODE com 8,37 µg/g e finalmente 10- e 9-OXO-OME com 1,40 e 1,03 µg/g.

A cepa representante de Cyanobacteria (*M. aeruginosa*) apresentou as menores concentrações de oxilipinas comparadas as outras cepas de microalgas. Por exemplo, as concentrações dos compostos **2** e **3** são 100 e 60 vezes menores em *M. aeruginosa* que na Cryptophyta, enquanto que compostos **4** e **5/6** e **7/8**, **9/10** e **11/12** foram, respectivamente, 7 e 20 vezes menos concentrados na cianobactéria.

Em relação às algas verdes, foram observadas concentrações baixas de oxilipinas para Charophyta quando comparadas às demais algas. A maior diferença foi encontrada para o par **9/10** que apresentou em Charophyta uma concentração 200 vezes menor que em Chlorophyta, seguidos dos compostos **1**, **2** e **5/6** que foram 100 vezes menos concentrados no primeiro grupo. Não foram encontradas grandes diferenças no conteúdo de oxilipinas nas amostras pertencentes às diferentes classes dentro desta divisão.

Na divisão Chlorophyta, os representantes da classe Chlorophyceae apresentaram em geral as maiores razões de oxilipinas entre todos os grupos analisados, sendo que o

composto **14** (9-OXO-OME) foi 35 vezes mais concentrado em Chlorophyceae do que em Trebouxiophyceae, seguido pelos compostos 9-HODE e 9-OXO-ODE, os quais se apresentaram 15 vezes mais concentrados na primeira classe que na última. Mais uma vez os oxo-ácidos monoinsaturados apresentaram as menores concentrações.

Por fim, os representantes dos vegetais superiores (divisão Embryophyta) apresentaram valores similares para a maioria dos compostos quando comparados àqueles observados para a cepa representante de Charophyta, divisão de algas verdes filogeneticamente mais próximas das plantas entre todas as divisões apresentadas aqui. Exceção é feita aos compostos **13** e **14**, que se apresentaram muito mais concentrados em Embryophyta que em qualquer cepa de Charophyta.

Os perfis de ocorrência de oxilipinas foram idênticos para todas as classes analisadas, excetuando-se, como já dito acima, a ausência de 12-HOTE em *Cryptomonas obovata*. No entanto, verificou-se grande variação com relação à quantidade e proporções das oxilipinas entre as cepas.

Os resultados de todas as análises estatísticas PERMANOVA estão resumidos na **Tabela 2.4**. Considerando homogeneidade das variâncias (betadispersão  $p > 0,05$ ), para a matriz de concentrações de oxilipinas, a PERMANOVA geral indicou diferenças altamente significativas entre todas as algas e plantas avaliadas aqui e a separação dos dados em classes explicou 65,50% da variação dos dados ( $p = 0,001$ ). Por sua vez, ao analisar apenas as algas verdes e plantas, a PERMANOVA indicou diferenças altamente significativas e a separação dos dados em classes destas algas explicou 56,80% da variação dos dados ( $p = 0,001$ ). Já a PERMANOVA que considerou os grupos de algas verdes e plantas terrestres par-a-par indicou que há diferenças significativas entre as plantas terrestres (classe Magnoliopsida) e desmídias (Zygnematophyceae) e a separação dos dados nestes dois grupos avaliados explicou 56,50% da variação dos dados ( $p = 0,006$ ).

Esta análise também mostra diferenças significativas entre Chlorophyta e Zygnematophyceae e a separação dos dados nestes dois grupos explicou 34,2% da variação dos dados ( $p=0,006$ ). Entre Chlorophyta e Magnoliopsida, a análise mostra que as diferenças são significativas ( $p=0,006$ ) e a separação dos dados nestes dois grupos explicou 43,4% da variação dos dados.

Para a matriz de proporções de oxilipinas, a PERMANOVA geral mostrou diferenças altamente significativas entre todas algas e plantas e a separação dos dados em classes explicou 73,80% da variação dos dados ( $p=0.001$ ). As análises envolvendo algas verdes e plantas, a PERMANOVA apontou diferenças significativas e a separação dos dados em classes explicou 68,80% da variação dos dados ( $p=0.001$ ). Já a PERMANOVA que considerou os grupos de algas verdes e plantas terrestres par-a-par revelou que há diferenças significativas entre plantas terrestres e Zygnematophyceae e a separação dos dados avaliados explicou 67,80% da variação dos dados ( $p=0,006$ ). Foram encontradas diferenças significativas entre Chlorophyta e Zygnematophyceae e a separação dos dados nestes dois grupos explicou 33,5% da variação dos dados ( $p=0,006$ ). Chlorophyta e Magnoliopsida mostra diferenças significativas entre si ( $p=0,006$ ) e a separação dos dados nestes dois grupos explicou 62,2% da variação dos dados.

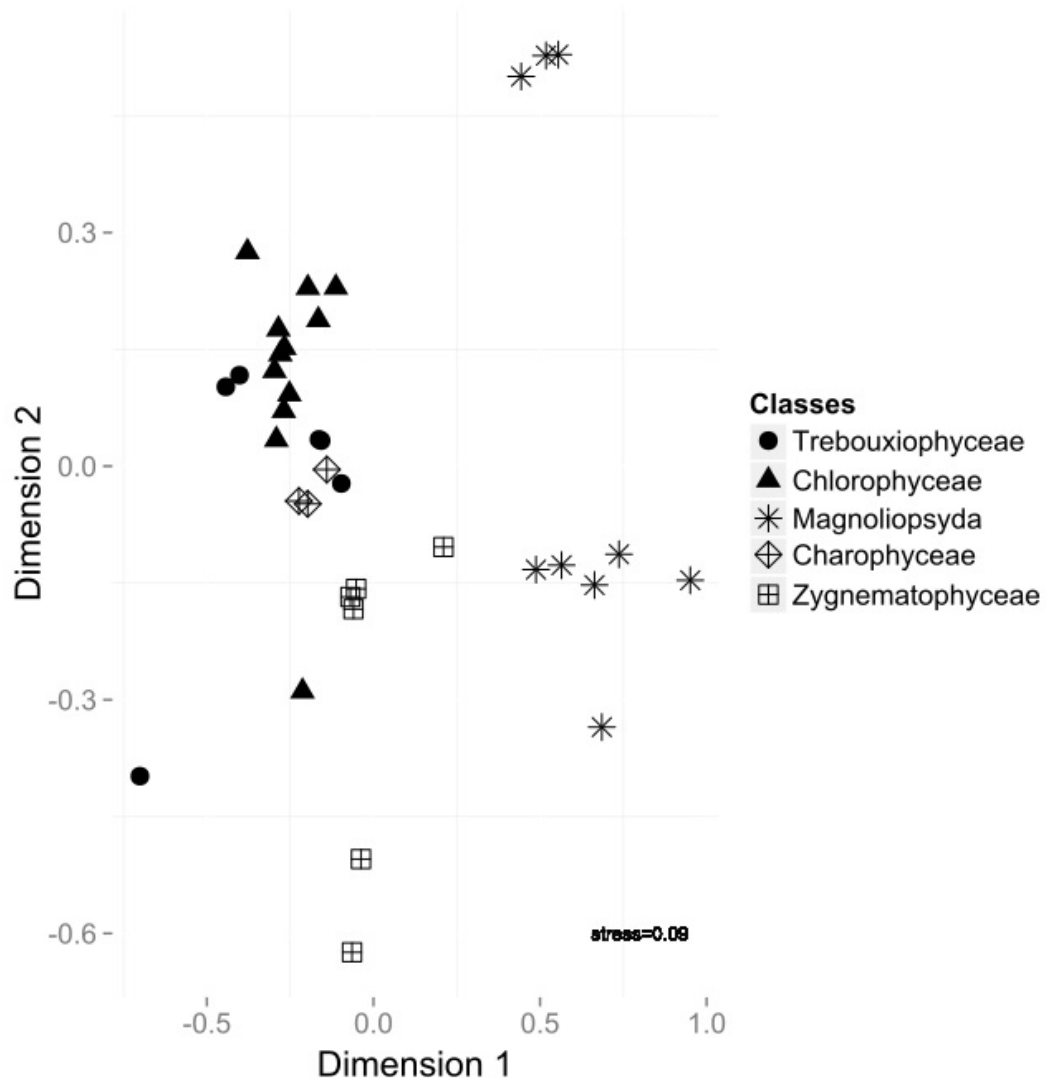
A ordenação nMDS utilizando apenas a linhagem verde mostrou que Magnoliopsida e Zygnematophyceae tiveram maior contribuição para a variação entre classes (**Figura 2.2**).

**Tabela 2.4** Resultados das análises PERMANOVA para classes de organismos baseadas na (A) matriz das concentrações de oxilipinas e (B) na matriz das proporções de oxilipinas, utilizando para ambas a distância de Bray-Curtis. Em itálico destacam-se os resultados das BETADISPERSÃO que não foram estatisticamente significativos para  $p < 0,05$  e, em negrito, os resultados das PERMANOVA que foram estatisticamente significativos para  $p < 0,01$ .

| DADOS UTILIZADOS                 | BETA DISPER  | (A) PERMANOVA |                 |           |              | BETA DISPER  | (B) PERMANOVA |                 |           |              |
|----------------------------------|--------------|---------------|-----------------|-----------|--------------|--------------|---------------|-----------------|-----------|--------------|
|                                  | <i>p</i>     | <b>gl</b>     | <b>pseudo-F</b> | <b>R2</b> | <b>p</b>     | <i>p</i>     | <b>gl</b>     | <b>pseudo-F</b> | <b>R2</b> | <b>p</b>     |
| Todos os organismos              | <i>0,059</i> | 8             | 9,256           | 0,655     | <b>0,001</b> | <i>0,177</i> | 8             | 13,231          | 0,738     | <b>0,001</b> |
| Algas verdes e plantas           | <i>0,152</i> | 4             | 10,179          | 0,568     | <b>0,001</b> | <i>0,515</i> | 4             | 17,055          | 0,688     | <b>0,001</b> |
| Charophyceae x Chlorophyta       | 0,010        | 20            | 7,40            | 0,280     | 0,012        | <i>0,097</i> | 20            | 2,130           | 0,101     | 0,815        |
| Charophyceae x Magnoliopsida     | 0,006        | 11            | 17,35           | 0,634     | 0,018        | 0,006        | 11            | 22,939          | 0,696     | 0,036        |
| Charophyceae x Zygnematophyceae  | <i>0,235</i> | 8             | 2,38            | 0,254     | 0,306        | <i>0,174</i> | 8             | 5,014           | 0,417     | 0,060        |
| Chlorophyta x Magnoliopsida      | 0,045        | 26            | 19,16           | 0,434     | <b>0,006</b> | <i>0,933</i> | 26            | 41,105          | 0,622     | <b>0,006</b> |
| Chlorophyta x Zygnematophyceae   | <i>0,316</i> | 23            | 10,53           | 0,342     | <b>0,006</b> | <i>0,948</i> | 23            | 11,069          | 0,335     | <b>0,006</b> |
| Magnoliopsida x Zygnematophyceae | <i>0,707</i> | 14            | 16,91           | 0,565     | <b>0,006</b> | <i>0,836</i> | 14            | 27,341          | 0,678     | <b>0,006</b> |

\*gl = graus de liberdade

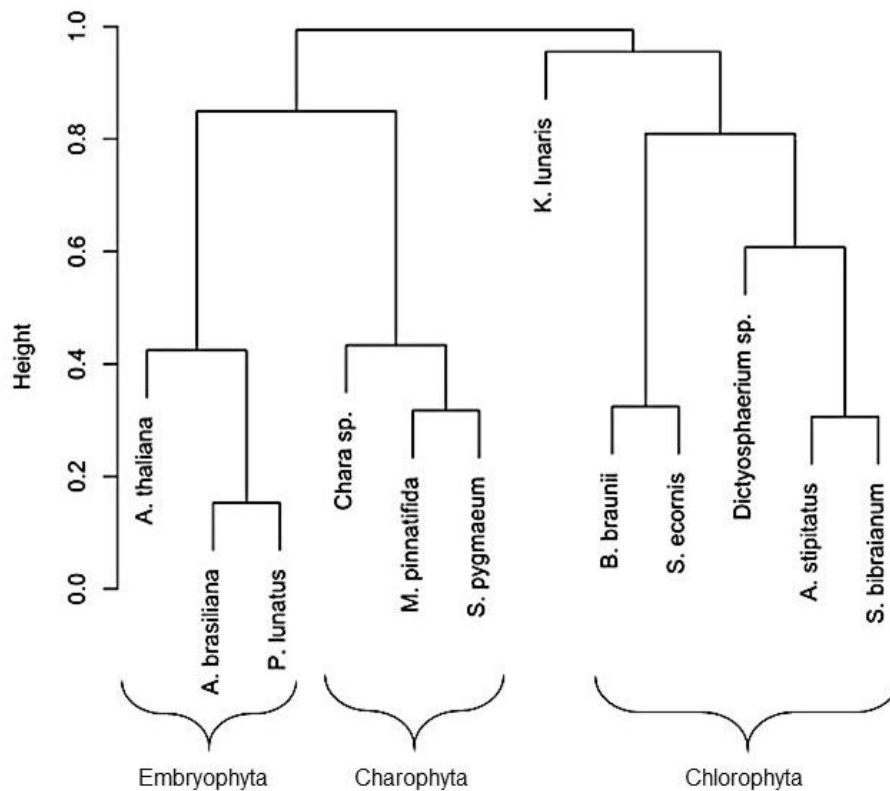
\*Magnoliopsida = classe das plantas terrestres



**Figura 2.2** Análise nMDS utilizando os valores das concentrações dos compostos apresentados para as classes de algas verdes, das divisões Chlorophyta (Chlorophyceae e Trebouxioiphyceae) e Charophyta (Zygnematophyceae e Charophyceae) e para as plantas terrestres (Magnoliopsysda).



A análise de agrupamento hierárquico (HCA) usando todas as espécies da linhagem verde mostrou diferenças nas concentrações de oxilipinas entre plantas terrestres e os dois clados de algas verdes: Chlorophyta e Charophyta. Além disso, esta análise mostrou que as espécies pertencentes a Embryophyta se agruparam junto às espécies pertencentes a Charophyta, formando o grupo das Streptophyta (**Figura 2.3**).



**Figura 2.3** Dendrograma gerado por análise de agrupamento hierárquico (HCA) das espécies da linhagem verde mostrando diferenças nas concentrações de oxilipinas entre plantas terrestres e algas verdes das divisões Chlorophyta e Charophyta (Complete linkage com Distância de Bray-Curtis).

### 6. DISCUSSÃO

A seleção das oxilipinas analisadas neste estudo foi feita baseando-se nas oxilipinas previamente identificadas e isoladas da planta *Alternanthera brasiliana* (Trapp *et al.*, 2015). Estas oxilipinas, chamadas também de linoleatos, são produzidas exclusivamente a partir dos PUFAs C18 ácido linoleico (LA) e ácido linolênico (ALA), ácidos graxos precursores dos jasmonatos, outro grupo de oxilipinas que será estudada em pesquisas futuras. Assim, não foram analisadas oxilipinas provenientes da oxidação de outros PUFAs como o ácido araquidônico (C20:4), ácido eicosapentaenoico (C20:5) ou ácido rougânico (C16:4) devido ao tempo hábil e complexidade desta pesquisa aqui desenvolvida.

Baseado no limitado conhecimento atual acerca das oxilipinas presentes em microalgas, o presente estudo foi delineado a fim de analisar as primeiras oxilipinas formadas na rota metabólica de oxidação dos octadecanóides (PUFAs C18). O foco aqui é voltado aos linoleatos precursores dos jasmonatos (fitormônios), oxilipinas abundantes em plantas. Os produtos das primeiras reações de oxidação tanto enzimática (oxidação dos carbonos 9- e 13-) quanto química (oxidação dos carbonos 10-, 12- e 16-) dos ácidos linoléico e linolênico nestes organismos produzem hidróxi-ácidos (compostos **1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 e 12**) e oxo-ácidos (compostos **7, 8, 9, 10, 13 e 14**) (Andreou *et al.*, 2009). A partir deste estudo, é evidente que as microalgas, em especial aquelas pertencentes à divisão Chlorophyta, possuem altos níveis de hidroxil- e oxo-linoleatos em comparação aos resultados obtidos para Charophyta e Embryophyta aqui avaliadas, *Klebsormidium flaccidum* (Koeduka *et al.* 2015) e plantas terrestres (Trapp, 2016).

Todos os compostos encontrados estão presentes em todas as algas abordadas neste estudo, exceto o composto **2** (12-HOTE) ausente na Cryptophyta *Cryptomonas obovata* e o composto **1** (16-HOTE) que não foi detectado em *Phaseolus lunatus*. Os

resultados sugerem que a rota de oxidação dos PUFA's C18:2 e C18:3 é muito conservada entre microalgas e plantas terrestres. No que se refere à especificidade, não foi observada nenhuma oxilipina exclusiva (indicadora) para determinada divisão ou classe (análise *IndVal*, resultados não mostrados). Variações nas concentrações totais de oxilipinas observadas são possivelmente atribuídas à disponibilidade de ácidos graxos precursores bem como às atividades específicas das enzimas LOX particular em cada espécie/cepa (Gerwick *et al.* 1993; Göbel & Feussner 2009) que, por sua vez, podem se relacionar com o estado fisiológico da espécie.

O emprego de cepas das divisões Cyanobacteria, Cryptophyta e Ochrophyta teve por objetivo verificar a universalidade da ocorrência das oxilipinas prospectadas na verticalidade evolutiva das várias linhagens oriundas da endossimbiose primária e secundária. Cyanobacteria é uma divisão pertencente ao domínio Eubacteria, grupo com origem anterior aos eucariotos e com papel preponderante na origem dos organismos Archaeplastida através de endossimbiose primária (plantas, algas verdes, Rhodophyta e Glaucophyta) e, por endossimbiose secundária, de todas as outras algas incluindo euglenóides, Chlorarachniophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta e dinoflagelados (Bhattacharya & Medlin, 1995; Falkowski *et al.*, 2004).

*M. aeruginosa*, apresentou quantidades baixas de oxilipinas quando comparadas com algas e plantas, porém todas oxilipinas foram detectadas nesta cepa, sugerindo a provável ancestralidade. O par de compostos **5/6** (9-HODE) já havia sido reportado para cianobactéria *Anabaena flos-aquae* (ordem Nostocales) (Murakami *et al.*, 1992). Pesquisadores observaram em *Nostoc punctiforme* (Nostocales) a formação de 16-, 12-, 13- e 9-HOTE e 13- e 9-HODE (Lang & Feussner, 2007).

*C. obovata* (Cryptophyta) apresentou quantidades de oxilipinas muito superiores às encontradas em Cyanobacteria apesar do composto **2** (12-HOTE) não ter sido

detectado nesta alga. Ainda, a concentração do composto **1** (16-HOTE) e do composto **3** (12-HOTE) foram 100 e 60 vezes maiores em *C. obovata* que em *M. aeruginosa*. Estes níveis de oxilipinas são mais próximos aos encontrados na diatomácea do que aos encontrados na cianobactéria. Esta é a primeira vez que tais oxilipinas são descritas para Cryptophyta.

Em Ochrophyta, as microalgas apresentaram altas proporções de 16- e 12-HOTE, com 499,47 e 297,30 µg/g de biomassa seca para a Xanthophyceae e 230,77 e 99,03 µg/g de biomassa seca para a diatomácea (Bacillariophyceae). Ainda, houve destaque na produção dos compostos 9- e 13-HODE perfazendo um total de 351,63 µg/g de biomassa seca para a Xanthophyceae e 146,97 µg/g de biomassa seca para a cepa de Bacillariophyceae. Diversos autores investigaram as oxilipinas presentes em diatomáceas marinhas responsáveis por florações em ambientes temperados (Cutignano *et al.*, 2011; D'Ippolito *et al.*, 2005; Pohnert & Boland, 2002; Fontana *et al.*, 2007). A maioria destes estudos envolve compostos derivados de PUFAs C20 e/ou C16, frequentemente presentes em maiores quantidades que os PUFAs C18 nas diatomáceas marinhas. Devido ao pequeno número de pesquisas envolvendo oxilipinas provenientes de PUFAs C18 em diatomáceas de água doce, destaque é dado ao presente estudo por envolver a oxidação deste particular substrato. A classe Xanthophyceae (Ochrophyta) é representada aqui pela microalga *Centritractus belenophorus* e a revisão da literatura permite afirmar que esta é a primeira vez que estes compostos são estudados na classe Xantophyceae.

Apesar de serem da mesma divisão (Chlorophyta), as microalgas das classes Chlorophyceae e Trebouxiophyceae avaliadas aqui apresentaram diferenças nas proporções de cada oxilipina. Os representantes de Trebouxiophyceae se destacaram na produção dos compostos **4** (13-HODE; 609,32 µg/g de biomassa seca) e **7/8** (13-OXO-ODE; 432,50 µg/g de biomassa seca). Já as microalgas Chlorophyceae exibiram

expressiva produção do composto **5/6** (9-HODE), com 2.340,66 µg/g de biomassa seca. Estas microalgas mostraram um grande potencial para a produção de hidroxi-ácidos, principalmente 16-HOTE, 12-HOTE, 13-HODE e 9-HODE, dados corroborados por pesquisadores que encontraram os compostos 16-HOTE em *Chlamydomonas debaryana* (Chlorophyceae, Chlamydomonadales) (Reyes *et al.*, 2014). A literatura relata também a presença do composto **3** (13-HOTE) em *Chlorella pyrenoidosa* (Trebouxiophyceae) (Vick & Zimmerman, 1989). Nós detectamos estes compostos em ambas as classes de Chlorophyta, sendo que as cepas de Chlorophyceae apresentaram os maiores conteúdos nesta divisão. Por sua vez, foram identificados hidroperóxidos de ácido linoléico (LA) em *C. pyrenoidosa* (Nuñez *et al.*, 2000), precursores das oxilipinas aqui apresentadas. Também existem relatos de uma variedade de hidroxi-ácidos graxos saturados nas clorófitas *Chlamydomonas reinhardtii* e *C. pyrenoidosa* (Matsumoto & Nagashima, 1984).

Os representantes de Chlorophyceae apresentaram as maiores concentrações de oxilipinas entre todas as nove classes distribuídas em cinco divisões diferentes avaliadas aqui. As espécies da divisão Chlorophyta se destacaram como potenciais produtores de oxilipinas em larga escala, em especial na produção de algumas substâncias de interesse farmacológico, como é o caso dos HOTES, compostos **1** (16-HOTE), **2** (12-HOTE) e **3** (13-HOTE) e mais o composto **4** (13-HODE), que exibiram ação anti-inflamatória em pesquisas prévias (Reyes *et al.*, 2014). Ainda, os compostos **5/6** (9-HODE), **7/8** (13-OXO-ODE) e **9/10** (9-OXO-ODE) apresentaram ação antibiótica em pesquisa desenvolvida por Trapp *et al.* (2015).

Além disso, Chlorophyta também são organismos interessantes para a produção de oxilipinas como padrões analíticos. Muitas vezes pesquisas são inviabilizadas devido ao alto custo do insumo demandado para tanto. Hoje uma alternativa à compra destes

padrões ofertados pela indústria química é a produção de oxilipinas a partir do padrão do ácido graxo precursor do composto desejado (também adquirido do mercado) e a enzima específica extraída de um organismo, por exemplo, LOX do tomate (*Solanum lycopersicum*; Matthew *et al.*, 1977) ou soja (*Glycine max*; Gardner, 1996; Jie & Pasha, 1998) seguido de isolamento do composto por cromatografia líquida de alta pressão de fase direta. Os custos envolvidos na produção, extração e purificação de oxilipinas a partir de cultivos de microalgas são dezenas de vezes menores que as técnicas utilizadas atualmente, assim, produzir padrões de oxilipinas extraídas de microalgas amenizaria os gastos envolvidos na pesquisa científica.

Por sua vez, as algas verdes representantes da classe Zygnematomphyceae (Charophyta) apresentaram apreciáveis proporções de 13- e 9-HODE (17,65 e 16,98 µg/g de biomassa seca). Nesta classe também houve destaque para o par de isômeros **7/8** (13-OXO-ODE), com 8,68 µg/g de biomassa seca. A alga representante de Charophyceae (*Chara* sp) exibiu proporções consideráveis dos compostos **5/6** (9-HODE; 19,10 µg/g de biomassa seca) e do composto **4** (13-HODE; 11,03 µg/g de biomassa seca). A produção de hidróxi-ácidos tri-insaturados 16-HOTE (composto **1**) e 12-HOTE (composto **2**) também foi apreciável para esta alga, com 11,27 e 7,17 µg/g de biomassa seca, respectivamente. Ainda, o par de isômeros **7/8** (10- e 12-HODE), originados a partir de oxidação química do ácido linoleico (18:2) (Andreou *et al.*, 2009), apresentaram quantidades razoáveis correspondendo a 7,30 µg/g de biomassa seca nesta espécie.

Em termos evolutivos, as algas verdes Charophyta são mais próximas das Embryophyta do que as Chlorophyta (Leliaert *et al.*, 2012). No presente estudo, observamos que Charophyta apresentou concentração total de oxilipinas cinquenta e oito vezes menor que Chlorophyta (57,40 e 3381,15 µg/g de biomassa seca, respectivamente). Ao comparar os resultados obtidos de plantas terrestres com das divisões de algas verdes,

é possível dizer que Charophyta é realmente mais próxima das plantas terrestres que Chlorophyta, uma vez que as quantidades de oxilipinas em plantas e algas carófitas são próximas.

Resultados semelhantes foram observados no padrão de concentração de oxilipinas em estudo envolvendo duas cepas de Chlorophyta e a espécie de planta terrestre *Alternanthera brasiliana* (Trapp, 2016). A autora verificou que microalgas verdes produziram quantidades de hidroxí- e oxo-ácidos muito maiores que aquelas observadas para planta, sugerindo que as microalgas Chlorophyta são grandes produtoras de oxilipinas.

Os resultados alcançados nesta pesquisa envolvendo proporções das oxilipinas sugerem um distanciamento entre as divisões de algas verdes Chlorophyta e Charophyta, bem como destas divisões de Embryophyta. Entre as cepas avaliadas, plantas terrestres se destacam claramente na produção dos compostos **13** e **14**, oxo-ácidos monoinsaturados com dezoito carbonos (10- e 9- OXO-OME).

Para as oxilipinas relacionadas à rota de biossíntese dos jasmonatos, estudos anteriores também levantam evidências da existência de diferenças nas oxilipinas entre Chlorophyta e Charophyta (Trapp, 2016; Koeduka *et al.*, 2015), sendo que essas últimas aparentemente apresentam padrão mais próximo às plantas terrestres que outras classes de Chlorophyta e Ochrophyta.

Foi constatada para os gêneros *Chlamydomonas* e *Volvox* (Chlorophyta) ausência de genes codificantes das enzimas do complexo CYP74 (citocromo P450 74) envolvidas na formação dos jasmonatos (OPDA, JA e MeJA, formados a partir da oxidação de PUFAs C18) sugerindo que Embryophyta adquiriram a habilidade de produzir JA e MeJA após a divergência desta linhagem de algas Chlorophyta (Nelson & Werck-Reichhart, 2011). Porém, há necessidade de se avaliar mais espécies de várias outras classes de

Chlorophyta para se confirmar a ausência destas enzimas. Por outro lado, verificou-se a produção de OPDA (precursor de JA e MeJA) em *Klebsormidium flaccidum* (Koeduka *et al.*, 2015), uma microalga Charophyta, aproximando estas algas das plantas terrestres.

Em plantas terrestres, a rota dos jasmonatos é foco de atuais estudos a fim de preencher as lacunas sobre a evolução das enzimas envolvidas nesta rota metabólica. Recentes pesquisas com espécies de Bryophytas revelaram a presença de enzimas CYP74 em *Pyscomitrella patens* (Musci) (Stumpe *et al.*, 2010; Scholz *et al.*, 2012) e *Marchantia polymorpha* (Hepaticae) (Koeduka *et al.*, 2015). Estudos envolvendo *Selaginella moellendorffii* (Banks *et al.*, 2011; Gorina *et al.*, 2016) e *Selaginella martensii* (Ogorodnikova *et al.*, 2015), representantes extants de uma das divisões mais antigas de plantas vasculares sem sementes, Lycophyta, revelaram que seu genoma contém diversos genes codificantes de enzimas do grupo CYP74.

Os dados aqui apresentados em conjuntos com a literatura abordada acima concordam com os estudos atuais sobre evolução das algas verdes, que demonstram a divergência de duas linhagens discretas: Chlorophyta e Charophyta (Leliaert *et al.*, 2012; Lemieux *et al.*, 2007), constituindo a última linhagem um clado parafilético de algas verdes de água doce. Observamos também que os representantes de Charophyta apresentam concentrações de oxilipinas muito menores que as observadas em Chlorophyta, o que pode ser atribuído à divergência dessas duas linhas discretas de algas verdes. A análise de *clustering* hierárquico (**Figura 2.3**) revela o agrupamento das espécies de algas carófitas mais próximas das espécies Embryophyta do que de Chlorophyta, o que concorda com estudos recentes sobre a filogenia da linhagem verde.

O gráfico nMDS dos dados referentes às algas verdes e plantas (**Figura 2.2**), observa-se que os representantes da classe Zygnematophyceae se separam das demais algas verdes, bem como de plantas. Os resultados das análises PERMANOVA par-a-par



reforçam estas observações uma vez que, ao confrontar Zygnematophyceae com Chlorophyta e Zygnematophyceae com plantas terrestres, há diferenças significativas tanto entre quantidades das oxilipinas como entre proporção de cada composto (**Tabela 2.4**).

Contudo, o gráfico nMDS (**Figura 2.2**) também revela que Charophyceae se agrupa próxima às espécies de Chlorophyta. Ao se agrupar contígua às Chlorophyta, a alga *Chara* sp (Charophyceae) evidencia semelhança com as algas verdes clorófitas. Além disso, pela observação dos dados de quantidade de cada oxilipina (**Anexo 4**), constata-se que, apesar da quantidade total de oxilipinas ser dezenas de vezes menor em Charophyceae, não há diferenças significativas nas proporções das oxilipinas de ambos os grupos, Charophyceae e Chlorophyta (PERMANOVA par-a-par proporções;  $p=0,815$ ).

De modo geral, as diferenças nas quantidades e proporções parciais e totais de oxilipinas entre a cianobactéria e as demais algas e plantas são claras e tal fato reflete a evolução metabólica destas substâncias nestes grupos de organismos, procariotos e eucariotos. A variedade e especificidade das enzimas envolvidas no metabolismo das oxilipinas também reflete a história evolutiva dos organismos. Estudo com genes codificantes das LOXs em Cyanobacteria descreve notável conservação dentro deste grupo o que sugere uma origem comum em comparação a Proteobacteria (Hansen *et al.*, 2013). Estes resultados concordam com a teoria da origem endossimbiótica, em que uma cianobactéria primitiva foi incorporada por uma célula eucariótica via endossimbiose primária e originou um plastídio primitivo (McFadden, 2001), indicando que LOX de cianobactérias possam ter originado LOX de plantas, uma vez que estes dois grupos se assemelham quanto a esta família de enzimas (Andreou *et al.*, 2009).

Os PUFAs precursores de oxilipinas são extensivamente estudados em plantas e algas. As algas verdes Chlorophyceae são ricas em PUFAs C18, Rhodophyceae em PUFAs C20 e Phaeophyceae em ambos os PUFAs C18 e C20 (Lang *et al.*, 2011; Taipale *et al.*, 2013; Kumari *et al.*, 2010; 2011). Já em relação às oxilipinas, a literatura relata presença de linoleatos em praticamente todos os grupos de macroalgas (Gerwick *et al.*, 1993; Kumari *et al.*, 2013; 2014) e muitos grupos de microalgas (Nuñez *et al.*, 2000; Santiago-Vázquez *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2014). A diferença está na quantidade total e parcial de cada tipo de oxilipina derivada de PUFAs C18 entre os diversos grupos taxonômicos de algas. Esta pesquisa também constatou que linoleatos são oxilipinas frequentes em todas as divisões de microalgas, bem como em plantas.

Com relação aos derivados C18, os representantes de Ochrophyta e Cryptophyta (duas divisões derivadas da Archaeplastida Rhodophyta por endossimbiose secundária), aparentemente seguiram o mesmo padrão de proporção das oxilipinas encontrado em algas verdes. Tal como em Rhodophyta, boa parte das reservas celulares de lipídios em Ochrophyta e Cryptophyta são PUFAs C16 e/ou C20 (Gerwick, 1994; Cutignano *et al.*, 2006, Lang *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2014). Enquanto em Chlorophyta, os depósitos celulares de PUFAs são constituídos em sua grande parte de ácidos graxos C18, assim como as plantas (Blée, 2002).

A semelhante natureza no metabolismo de PUFAs C16 e C20 e de suas oxilipinas derivadas em Rhodophyta, Ochrophyta e Cryptophyta sugere que seus ancestrais eucariotos apresentavam eicosanóides característicos de animais que foram incorporados a esta via evolutiva através da endossimbiose secundária de uma alga vermelha, e a presença de octadecanóides semelhantes à linhagem verde dos organismos fotossintetizantes é herdada de ancestrais procarióticos (Bouarab *et al.*, 2004), o que reforça a teoria da endossimbiose plastidial primária (McFadden, 2001). Ainda, análises

filogenéticas de proteínas de LOX de diversos organismos fotossintetizantes indicam que estas enzimas irradiam a partir de ancestrais de procariotos em uma série de enzimas com atividades específicas e plasticidade catalítica entre estes organismos fotossintetizantes apesar de seu alto grau de similaridade. Dessa forma, LOXs de plantas e musgos podem ter divergido em um momento posterior a irradiação evolutiva de Rhodophyta e Chlorophyta, respectivamente (Andreou *et al.*, 2009).

Conclui-se que: (I) não há variação significativa das oxilipinas derivadas de C18 entre as classes estudadas que possibilite a utilização do perfil ou de determinada oxilipina como indicador de gênero ou espécie; (II) as hidroxilipinas se destacam no metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados C18 nos representantes de todas as divisões avaliadas; (III) as microalgas da divisão Chlorophyta são grandes produtores de oxilipinas o que as posicionam em um lugar de interesse para a indústria farmacêutica e química analítica; (IV) representantes das algas Charophyta apresentam quantidades totais de oxilipinas dezenas de vezes menores que aquelas observadas em Chlorophyta o que remonta à divergência destas duas linhagens discretas de algas verdes.

### **7. FINANCIAMENTO**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida e apoio financeiro e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos 2011/50054-4 e 2013/18083-0), CAPES e Fundação Alexander von Humboldt (processo número 99999.007611/2015-03) pelo apoio financeiro e científico.

### 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ELWAFI, G. S. E. *et al.* Three new unsaturated fatty acids from the marine green alga *Ulva fasciata* Delile. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 64, n. 10, p. 1199-1207, 2009.

ANDREOU, A.; BRODHUN, F.; FEUSSNER, I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 3, p. 148-170, 2009.

BANKS, J. A. *et al.* The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. **Science**, v. 332, n. 6032, p. 960-963, 2011.

BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L. The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. **Journal of Phycology**, v. 31, n. 4, p. 489-498, 1995.

BIGOGNO, C. *et al.* Lipid and Fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. **Phytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 497-503, 2002.

BLÉE, E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. **Trends in plant science**, v. 7, n. 7, p. 315-322, 2002.

BLÉE, E. Phytooxylipins and plant defense reactions. **Progress in Lipid Research**, v. 37, n. 1, p. 33-72, 1998.

BOUARAB, K. *et al.* The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1838-1848, 2004.

CUTIGNANO, A. *et al.* Chloroplastic glycolipids fuel aldehyde biosynthesis in the marine diatom *Thalassiosira rotula*. **ChemBioChem**, v. 7, n. 3, p. 450-456, 2006.

## Capítulo 2 – Referências Bibliográficas

CUTIGNANO, A. *et al.* Lipoxygenase products in marine diatoms: a concise analytical method to explore the functional potential of oxylipins 1. **Journal of Phycology**, v. 47, n. 2, p. 233-243, 2011.

D'IPPOLITO, G. *et al.* New C 16 fatty-acid-based oxylipin pathway in the marine diatom *Thalassiosira rotula*. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 3, n. 22, p. 4065-4070, 2005.

FALKOWSKI, P. G. *et al.* The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. **Science**, v. 305, n. 5682, p. 354-360, 2004.

FONTANA, A. *et al.* Chemistry of oxylipin pathways in marine diatoms. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 481-490, 2007.

GARDNER, H. W. Lipoxygenase as a versatile biocatalyst. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 11, p. 1347-1357, 1996.

GERWICK, W. H. *et al.* Biologically active oxylipins from seaweeds. **Hydrobiologia**, v. 260, n. 1, p. 653-665, 1993.

GERWICK, W. H. Structure and biosynthesis of marine algal oxylipins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1211, n. 3, p. 243-255, 1994.

GÖBEL, C.; FEUSSNER, I. Methods for the analysis of oxylipins in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n. 13-14, p. 1485-1503, 2009.

GORINA, S. S. *et al.* Oxylipin biosynthesis in spikemoss *Selaginella moellendorffii*: molecular cloning and identification of divinyl ether synthases CYP74M1 and CYP74M3. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 4, p. 301-309, 2016.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide C1, 2. **Journal of Phycology**, v. 8, n. 1, p. 10-14, 1972.

## Capítulo 2 – Referências Bibliográficas

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in lipid research**, v. 45, n. 2, p. 160-186, 2006.

HANSEN, J. *et al.* Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 4737-4747, 2013.

HOEK, C.; MANN, D.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press, 1995.

HOWE, G. A.; SCHILMILLER, A. L. Oxylin metabolism in response to stress. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 230-236, 2002.

JIE, M. F. L. K.; PASHA, M. Fatty acids, fatty acid analogues and their derivatives. **Natural Product Reports**, v. 15, n. 6, p. 607-629, 1998.

JÜTTNER, F. Detection of lipid degradation products in the water of a reservoir during a bloom of *Synura uvella*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 100-106, 1981.

KOEDUKA, T. *et al.* Biochemical characterization of allene oxide synthases from the liverwort *Marchantia polymorpha* and green microalgae *Klebsormidium flaccidum* provides insight into the evolutionary divergence of the plant CYP74 family. **Planta**, v. 242, n. 5, p. 1175-1186, 2015.

KUMARI, P. *et al.* Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 749-757, 2010.

KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. **Analytical biochemistry**, v. 415, n. 2, p. 134-144, 2011.

## Capítulo 2 – Referências Bibliográficas

KUMARI, P. *et al.* Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. **Phytochemistry**, v. 86, p. 44-56, 2013.

KUMARI, P.; REDDY, R.; JHA, B. Quantification of selected endogenous hydroxy-oxylipins from tropical marine macroalgae. **Marine biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 74-87, 2014.

LANG, I.; FEUSSNER, I. Oxylin formation in *Nostoc punctiforme* (PCC73102). **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1120-1127, 2007.

LANG, I. *et al.* Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 124, 2011.

LELIAERT, F. *et al.* Phylogeny and molecular evolution of the green algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 1-46, 2012.

LEMIEUX, C.; OTIS, C.; TURMEL, M. A clade uniting the green algae *Mesostigma viride* and *Chlorokybus atmophyticus* represents the deepest branch of the Streptophyta in chloroplast genome-based phylogenies. **BMC biology**, v. 5, n. 1, p. 2, 2007.

MACHADO, L. *et al.* The *Physcomitrella patens* unique alpha-dioxygenase participates in both developmental processes and defense responses. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, 45, 2015.

MATSUMOTO, G. I.; NAGASHIMA, H. Occurrence of 3-hydroxy acids in microalgae and cyanobacteria and their geochemical significance. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 48, n. 8, p. 1683-1687, 1984.



## Capítulo 2 – Referências Bibliográficas

MATTHEW, J. A.; CHAN, H. W. S.; GALLIARD, T. A simple method for the preparation of pure 9-D-hydroperoxide of linoleic acid and methyl linoleate based on the positional specificity of lipoxygenase in tomato fruit. **Lipids**, v. 12, n. 3, p. 324-326, 1977.

McFADDEN, G. I. Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 6, p. 951-959, 2001.

MOSBLECH, A.; FEUSSNER, I.; HEILMANN, I. Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 511-517, 2009.

MURAKAMI, N. *et al.* Two unsaturated 9R-hydroxy fatty acids from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae f. flos-aquae*. **Lipids**, v. 27, n. 10, p. 776-778, 1992.

NELSON, D.; WERCK-REICHHART, D. A P450-centric view of plant evolution. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 194-211, 2011.

NUÑEZ, A. *et al.* Anaerobic lipoxygenase activity from *Chlorella pyrenoidosa* responsible for the cleavage of the 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 3, p. 181-188, 2000.

OGORODNIKOVA, A. V.; MUKHITOVA, F. K.; GRECHKIN, N. Oxylipins in the spikemoss *Selaginella martensii*: Detection of divinyl ethers, 12-oxophytodienoic acid and related cyclopentenones. **Phytochemistry**, v. 118, p. 42-50, 2015.

OKSANEN, J., *et al.* Package ‘vegan’. **Community ecology package**, version, 2(9). 2013.

POHNERT, G. Diatom/copepod interactions in plankton: the indirect chemical defense of unicellular algae. **ChemBioChem**, v. 6, n. 6, p. 946-959, 2005.

POHNERT, G.; BOLAND, W. The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms. **Natural product reports**, v. 19, n. 1, p. 108-122, 2002.

## Capítulo 2 – Referências Bibliográficas

- REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. Artmed Editora, 2006.
- REYES, C. *et al.* Oxylipins from the microalgae *Chlamydomonas debaryana* and *Nannochloropsis gaditana* and their activity as TNF- $\alpha$  inhibitors. **Phytochemistry**, v. 102, p. 152-161, 2014.
- ROBERTS, D. W. Labdsv: Ordination and Multivariate Analysis for Ecology. *R package version 1.7-0*. <http://CRAN.R-project.org/package=labdsv>, 2015.
- SANTIAGO-VÁZQUEZ, L. Z. *et al.* Identification of hydroxy fatty acids by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectroscopy in *Euglena gracilis*. **Journal of Chromatography B**, v. 803, n. 2, p. 233-236, 2004.
- SCHILMILLER, A. L.; HOWE, G. A. Systemic signaling in the wound response. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 369-377, 2005.
- SCHOLZ, J. *et al.* Biosynthesis of allene oxides in *Physcomitrella patens*. **BMC plant biology**, v. 12, n. 1, p. 228, 2012.
- SENGER, T. *et al.* A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 7588-7596, 2005.
- SINGH, A.; DEL POETA, M. Lipid signalling in pathogenic fungi. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 177-185, 2011.
- STUMPE, M. *et al.* The moss *Physcomitrella patens* contains cyclopentenones but no jasmonates: mutations in allene oxide cyclase lead to reduced fertility and altered sporophyte morphology. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 740-749, 2010.
- TAIPALE, S. *et al.* Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 71, n. 2, p. 165-178, 2013.

## Capítulo 2 – Referências Bibliográficas

- TEAM, R. Core. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016. 2017.
- TRAPP, M. A. *et al.* Antibiotic oxylipins from *Alternanthera brasiliana* and its endophytic bacteria. **Phytochemistry**, *110*, 72-82, 2015.
- TRAPP, M.A. Bioactivity, chemical and microbial diversity in *Alternanthera brasiliana*: the influence of endophytes on antibiotic production. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos. 121p. 2016.
- VICK, B. A.; ZIMMERMAN, D. C. Metabolism of fatty acid hydroperoxides by *Chlorella pyrenoidosa*. **Plant physiology**, v. 90, n. 1, p. 125-132, 1989.
- WANG, R.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Seaweed extracts and unsaturated fatty acid constituents from the green alga *Ulva lactuca* as activators of the cytoprotective Nrf2–ARE pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 57, p. 141-153, 2013.
- WATSON, S. B. *et al.* Under-ice blooms and source-water odour in a nutrient-poor reservoir: biological, ecological and applied perspectives. **Freshwater Biology**, v. 46, n. 11, p. 1553-1567, 2001.
- WATSON, S. B.; SATCHWILL, T. Chrysophyte odour production: the impact of resources at the cell and population levels. **Phycologia**, v. 42, n. 4, p. 393-405, 2003.
- YAMAMOTO, Y. *et al.* Functional analysis of allene oxide cyclase, MpAOC, in the liverwort *Marchantia polymorpha*. **Phytochemistry**, v. 116, p. 48-56, 2015.
- ZIMMERMAN, D. C.; VICK, B. A. Lipoxygenase in *Chlorella pyrenoidosa*. **Lipids**, v. 8, n. 5, p. 264-266, 1973.

**9. DESTAQUES**

- Destaque de hidroxí-oxilipinas no metabolismo de PUFA C18 em microalgas de água doce.
- Microalgas Chlorophyta são grandes produtores de oxilipinas.
- Charophyta apresentam quantidades de oxilipinas próximas de plantas terrestres.

---

## **CONCLUSÃO GERAL**

Os resultados confirmam a expectativa de que oxo- e hidroxi-oxilipinas derivadas de PUFA's C18 amplamente distribuídos na natureza são preservados entre as cepas da família Selenastraceae, como também nas demais algas verdes, demais divisões de microalgas e plantas. As diferenças encontram-se na variação da quantidade total e parcial de oxilipinas entre as espécies estudadas. As elevadas concentrações de 16-HOTE, 13-HOTE, 12-HOTE, 13-HODE e 9-HODE encontrados em algumas das cepas de microalgas constituem potencial fonte destes bioativos de interesse farmacêutico já que estas substâncias apresentam atividade anti-inflamatória em diferentes amostras fisiológicas, mesmo em mínimas concentrações (Yang *et al.*, 2009; Reyes *et al.*, 2014, Trapp *et al.*, 2015). Os perfis de oxilipinas obtidos podem ser utilizados como estratégia quimiotaxonômica complementar para classificar cepas e espécies em termos de concentrações e/ou proporções destes compostos apesar de não haver variação significativa no conteúdo das oxilipinas derivadas de C18 entre as cepas estudadas que possibilite a utilização do perfil ou de determinada oxilipina como indicador de gênero ou espécie.

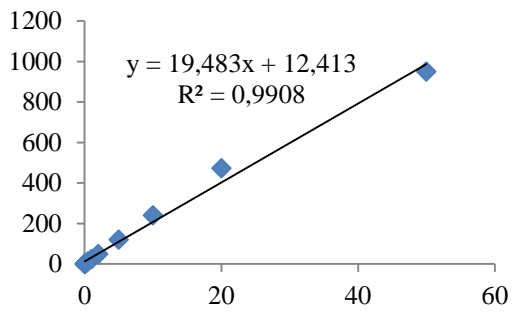
Ao analisar apenas os resultados obtidos para algas verdes, conclui-se que microalgas da divisão Chlorophyta são grandes produtores de oxilipinas e representantes das algas Charophyta apresentam quantidades totais de oxilipinas dezenas de vezes menores que aquelas observadas em Chlorophyta o que remonta à divergência destas duas linhagens discretas de algas verdes. As algas Charophyta apresentaram concentração de oxilipinas dezenas de vezes menor que Chlorophyta assemelhando-se mais às concentrações de oxilipinas encontradas em plantas, fato que pode estar relacionado à proximidade evolutiva entre plantas e Charophyta.

## Conclusão Geral

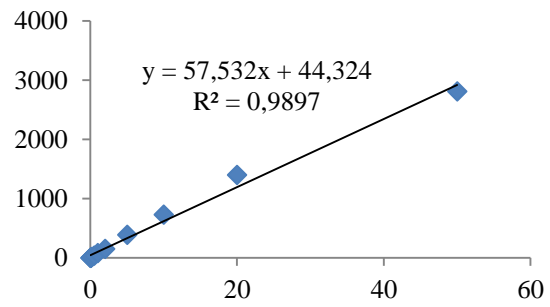
Finalmente todos os resultados aqui apresentados constituem informação essencial para progresso na pesquisa envolvendo compostos com notável destaque para diversas áreas da ciência.

**Anexo 1** Curvas de calibração dos padrões comerciais dos compostos **4** (13-HODE), **5/6** (9-HODE), **7/8** (13-OXO-ODE) e **9/10** (9-OXO-ODE).

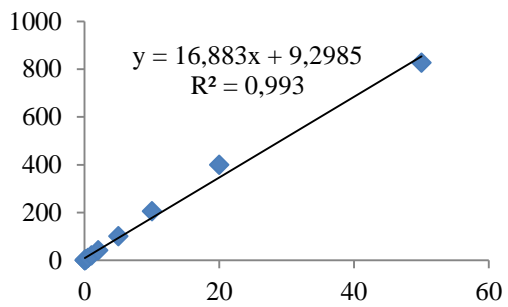
### 13-HODE



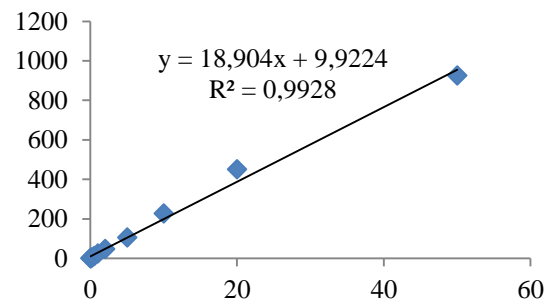
### 9-HODE



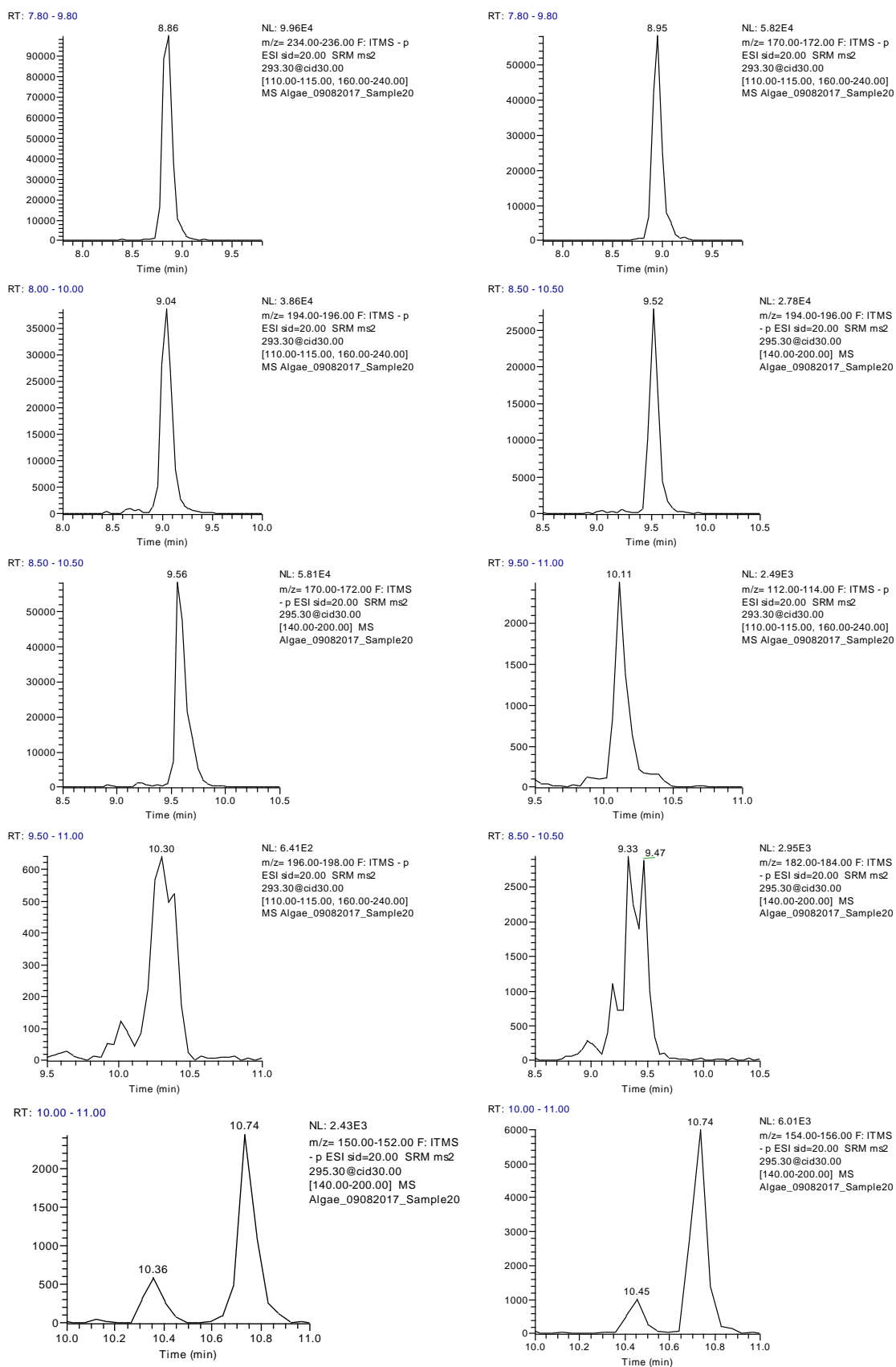
### 13-OXO-ODE



### 9-OXO-ODE



## Anexo 2 Cromatogramas SRM para as oxilipinas presentes nos organismos analisados.





**Anexo 3** Valores médios das concentrações ( $\mu\text{g/g}$  de biomassa seca), bem como proporção (entre parênteses) de cada oxilipina por cepa de microalga estudada segundo classificação taxonômica clássica e molecular (Garcia da Silva *et al.*, 2017).

| CEPA     | 16-HOTE             | 12-HOTE             | 13-HOTE          | 13-HODE            | 9-HODE              | 13-OXO-ODE       | 9-OXO-ODE         | 10-/12-HODE       | 10- OXO-OME      | 9- OXO-OME       |
|----------|---------------------|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| CCMA_088 | 229,27<br>(40,17)   | 104,63<br>(18,33)   | 7,17<br>(1,26)   | 48,87<br>(8,56)    | 76,00<br>(13,32)    | 47,47<br>(8,32)  | 32,90<br>(5,76)   | 13,83<br>(2,42)   | 10,00<br>(1,75)  | 0,63<br>(0,11)   |
| CCMA_087 | 756,53<br>(5,65)    | 1.157,00<br>(8,63)  | 68,03<br>(0,51)  | 1.078,00<br>(8,04) | 8.709,03<br>(64,99) | 396,33<br>(2,96) | 868,13<br>(6,48)  | 190,37<br>(1,42)  | 71,00<br>(0,53)  | 105,43<br>(0,79) |
| CCMA_516 | 957,70<br>(31,96)   | 232,97<br>(7,77)    | 82,00<br>(2,74)  | 360,50<br>(12,03)  | 631,10<br>(21,06)   | 209,70<br>(7,00) | 235,90<br>(7,87)  | 153,37<br>(5,12)  | 13,10<br>(0,44)  | 120,20<br>(4,01) |
| CB_12_37 | 1.297,37<br>(39,53) | 585,00<br>(17,83)   | 38,57<br>(1,18)  | 298,83<br>(9,11)   | 500,80<br>(15,26)   | 164,37<br>(5,01) | 309,10<br>(9,42)  | 71,57<br>(2,18)   | 10,17<br>(0,31)  | 6,13<br>(0,19)   |
| CCMA_345 | 951,43<br>(51,03)   | 398,57<br>(21,38)   | 27,43<br>(1,47)  | 74,67<br>(4,00)    | 113,37<br>(6,08)    | 126,70<br>(6,79) | 143,87<br>(7,72)  | 21,37<br>(1,15)   | 5,23<br>(0,28)   | 2,00<br>(0,11)   |
| CCMA_003 | 0,00<br>(0)         | 1,17<br>(2,32)      | 0,70<br>(1,39)   | 14,77<br>(29,36)   | 21,97<br>(43,67)    | 5,43<br>(10,80)  | 0,20<br>(0,40)    | 3,73<br>(7,42)    | 1,47<br>(2,92)   | 0,87<br>(1,72)   |
| CCMA_423 | 621,90<br>(30,41)   | 369,33<br>(18,06)   | 26,57<br>(1,30)  | 172,10<br>(8,42)   | 356,17<br>(17,42)   | 96,70<br>(4,73)  | 354,00<br>(17,31) | 35,03<br>(1,71)   | 5,93<br>(0,29)   | 7,03<br>(0,34)   |
| CCMA_277 | 533,10<br>(40,09)   | 275,10<br>(20,69)   | 22,67<br>(1,70)  | 96,43<br>(7,25)    | 211,70<br>(15,92)   | 75,60<br>(5,69)  | 74,97<br>(5,64)   | 22,00<br>(1,65)   | 10,70<br>(0,80)  | 7,53<br>(0,57)   |
| CCMA_593 | 485,10<br>(36,61)   | 252,00<br>(19,02)   | 20,00<br>(1,51)  | 132,27<br>(9,98)   | 192,40<br>(14,52)   | 96,67<br>(7,29)  | 100,07<br>(7,55)  | 31,10<br>(2,35)   | 5,10<br>(0,38)   | 10,50<br>(0,79)  |
| CB_12_06 | 104,10<br>(38,44)   | 48,07<br>(17,75)    | 4,03<br>(1,49)   | 25,00<br>(9,23)    | 50,50<br>(18,65)    | 17,30<br>(6,39)  | 10,03<br>(3,70)   | 6,27<br>(2,31)    | 4,17<br>(1,54)   | 1,37<br>(0,50)   |
| CCMA_333 | 48,13<br>(34,32)    | 22,00<br>(15,69)    | 1,53<br>(1,09)   | 16,80<br>(11,98)   | 29,03<br>(20,70)    | 9,23<br>(6,58)   | 7,03<br>(5,02)    | 3,07<br>(2,19)    | 2,63<br>(1,88)   | 0,77<br>(0,55)   |
| CCMA_334 | 500,17<br>(7,36)    | 1.017,40<br>(14,98) | 51,67<br>(0,76)  | 719,60<br>(10,59)  | 3.103,60<br>(45,69) | 233,93<br>(3,44) | 829,37<br>(12,21) | 265,93<br>(3,91)  | 13,50<br>(0,20)  | 58,20<br>(0,86)  |
| CB_09_36 | 985,87<br>(28,14)   | 420,23<br>(11,99)   | 242,73<br>(6,93) | 372,93<br>(10,64)  | 322,33<br>(9,20)    | 184,27<br>(5,26) | 99,67<br>(2,84)   | 401,93<br>(11,47) | 228,90<br>(6,53) | 244,73<br>(6,99) |
| CCMA_047 | 704,10<br>(35,26)   | 149,50<br>(7,49)    | 46,03<br>(2,31)  | 187,10<br>(9,37)   | 358,20<br>(17,94)   | 132,53<br>(6,64) | 308,80<br>(15,46) | 70,70<br>(3,54)   | 7,87<br>(0,39)   | 32,20<br>(1,61)  |

**Anexo 4** Valores médios das concentrações ( $\mu\text{g/g}$  de biomassa seca) de cada oxilipina e sua proporção entre parênteses por divisão/classe de algas, cianobactéria e plantas terrestres segundo classificação taxonômica clássica (Reviere, 2006; Bicudo & Menezes, 2017) e molecular (Garcia da Silva *et al.*, 2017).

| CLASSE/DIVISÃO        | 16-HOTE           | 12-HOTE           | 13-HOTE         | 13-HODE           | 9-HODE             | 13-OXO-ODE        | 9-OXO-ODE        | 10-/12-HODE     | 10-OXO-OME       | 9-OXO-OME        |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| 1.Magnoliophyta       | 14,49<br>(7,65)   | 1,26<br>(0,66)    | 2,37<br>(1,25)  | 6,78<br>(3,58)    | 2,76<br>(1,45)     | 5,67<br>(2,99)    | 7,68<br>(4,05)   | 8,62<br>(4,55)  | 44,21<br>(23,33) | 95,68<br>(50,49) |
| 2.Charophyta          | 4,94<br>(8,61)    | 3,07<br>(5,34)    | 0,81<br>(1,41)  | 15,44<br>(26,91)  | 17,69<br>(30,82)   | 7,43<br>(12,95)   | 1,09<br>(1,90)   | 4,62<br>(8,05)  | 1,58<br>(2,75)   | 0,72<br>(1,26)   |
| 1.1.Zygnematophyceae  | 1,78<br>(3,35)    | 1,02<br>(1,91)    | 0,67<br>(1,25)  | 17,65<br>(33,11)  | 16,98<br>(31,86)   | 8,68<br>(16,29)   | 0,72<br>(1,34)   | 3,28<br>(6,16)  | 1,90<br>(3,56)   | 0,62<br>(1,16)   |
| 1.2.Charophyceae      | 11,27<br>(17,17)  | 7,17<br>(10,92)   | 1,10<br>(1,68)  | 11,03<br>(16,82)  | 19,10<br>(29,12)   | 4,93<br>(7,52)    | 1,83<br>(2,79)   | 7,30<br>(11,13) | 0,93<br>(1,42)   | 0,93<br>(1,42)   |
| 2.Chlorophyta         | 429,06<br>(12,69) | 304,50<br>(9,01)  | 27,82<br>(0,82) | 434,20<br>(12,84) | 1615,90<br>(47,79) | 249,59<br>(7,38)  | 218,72<br>(6,47) | 57,39<br>(1,70) | 19,98<br>(0,59)  | 23,98<br>(0,71)  |
| 2.1.Chlorophyceae     | 553,05<br>(12,85) | 419,25<br>(9,74)  | 36,86<br>(0,86) | 346,65<br>(8,05)  | 2340,66<br>(54,37) | 158,14<br>(3,67)  | 316,36<br>(7,35) | 72,74<br>(1,69) | 26,16<br>(0,61)  | 35,48<br>(0,82)  |
| 2.2.Trebouxiophyceae  | 181,09<br>(11,81) | 75,02<br>(4,89)   | 9,73<br>(0,64)  | 609,32<br>(39,75) | 166,37<br>(10,85)  | 432,50<br>(28,22) | 23,45<br>(1,53)  | 26,70<br>(1,74) | 7,63<br>(0,50)   | 0,98<br>(0,06)   |
| 3.Ochrophyta          | 365,12<br>(36,05) | 198,17<br>(19,57) | 27,78<br>(2,74) | 87,10<br>(8,60)   | 162,20<br>(16,01)  | 66,43<br>(6,56)   | 41,45<br>(4,09)  | 39,28<br>(3,88) | 18,88<br>(1,86)  | 6,42<br>(0,63)   |
| 3.1.Xanthophyceae     | 499,47<br>(34,87) | 297,30<br>(20,76) | 41,00<br>(2,86) | 115,40<br>(8,06)  | 236,23<br>(16,49)  | 85,83<br>(5,99)   | 48,97<br>(3,42)  | 61,83<br>(4,32) | 34,87<br>(2,43)  | 11,27<br>(0,79)  |
| 3.2.Bacillariophyceae | 230,77<br>(38,88) | 99,03<br>(16,69)  | 14,57<br>(2,45) | 58,80<br>(9,91)   | 88,17<br>(14,86)   | 47,03<br>(7,92)   | 33,93<br>(5,72)  | 16,73<br>(2,82) | 2,90<br>(0,49)   | 1,57<br>(0,26)   |
| 4.Cryptophyta         | 247,40<br>(68,19) | 0<br>(0)          | 19,23<br>(5,30) | 11,20<br>(3,09)   | 21,93<br>(6,05)    | 29,67<br>(8,18)   | 22,57<br>(6,22)  | 8,37<br>(2,31)  | 1,40<br>(0,39)   | 1,03<br>(0,28)   |
| 5.Cyanobacteria       | 2,87<br>(17,06)   | 1,53<br>(9,13)    | 0,30<br>(1,79)  | 2,77<br>(16,47)   | 3,53<br>(21,03)    | 2,73<br>(16,27)   | 0,90<br>(5,36)   | 0,47<br>(2,78)  | 0,93<br>(5,56)   | 0,77<br>(4,56)   |