

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

JAEWON YOON

**Desreplicação de metabólitos secundários de cianobactérias brasileiras
utilizando metabolômica**

São Paulo
2023

JAEWON YOON

**Desreplicação de metabólitos secundários de cianobactérias brasileiras
utilizando metabolômica**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia pela Escola de
Artes, Ciências e Humanidades da
Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a Dr^a Camila
Manoel Crnkovic

São Paulo
2023



Esta obra é de acesso aberto. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e autoria e respeitando a Licença Creative Commons indicada.

Universidade de São Paulo - Escola de Artes, Ciências e Humanidades - Biblioteca.
Ficha automatizada com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Yoon, Jaewon
Desreplicação de metabólitos secundários de
cianobactérias brasileiras utilizando metabolômica /
Jaewon Yoon ; orientadora, Camila Manoel Crnkovic.
2024.
48 f: il.

Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) -
Escola de Artes, Ciências e Humanidades,
Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

1. Cyanobacteria. 2. Bioensaio. 3.
Espectrometria de massas. 4. Produtos naturais. I.
Crnkovic, Camila Manoel, orient. II. Título.

Nome: YOON, Jaewon

Título: Desreplicação de metabólitos secundários de cianobactérias brasileiras utilizando
metabolômica

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia pela
Escola de Artes, Ciências e Humanidades da
Universidade de São Paulo.

Aprovado em: ___ / ___ / _____

Banca Examinadora

Profª. Drª. Camila Manoel Crnkovic Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profª. Drª. Miriam Sannomiya Instituição: Escola de Artes, Ciências e
Humanidades da Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profª. Drª. Simone Possedente de Lira Instituição: Escola Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz" da Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha família, que foi a minha motivação para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas e entidades que tornaram este trabalho possível. Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora, professora Camila Manoel Crnkovic, que me orientou, ajudou e motivou desde a iniciação científica. Ter sido orientanda dela foi uma imensa sorte na minha vida e o caminho árduo até aqui somente foi possível devido à ajuda dela.

Também gostaria de agradecer muito a cada um dos integrantes do Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais (Lab Azul), que me ensinaram conhecimentos técnicos e sempre me deram suporte tanto profissional quanto emocional.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) também foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, viabilizando sonhos e possibilitando usar materiais e equipamentos cruciais para o trabalho. A dedicação da FAPESP em incentivar a pesquisa no Brasil é uma fonte constante de inspiração e motivação para finalizar e continuar este trabalho.

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."

Marie Curie

RESUMO

YOON, Jaewon. **Desreplicação de metabólitos secundários de cianobactérias brasileiras utilizando metabolômica**. 2023. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) - Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Cianobactérias são seres fotossintetizantes capazes de produzir compostos com aplicações biotecnológicas. O Brasil abriga uma grande diversidade de gêneros e espécies de cianobactérias, porém a química desses organismos ainda é pouco estudada. Para a descoberta de novas moléculas bioativas, a estratégia de desreplicação guiada por bioensaio acelera o processo de quimioprospecção. Assim, nesse estudo foi avaliada a toxicidade de quatro linhagens de cianobactérias brasileiras frente a *Artemia salina*. As moléculas associadas à bioatividade foram desreplicadas por meio de ferramentas metabolômicas, incluindo DAFdiscovery, redes moleculares GNPS e SIRIUS. Extratos e frações obtidos de três linhagens de cianobactérias brasileiras se mostraram inativas frente à *A. salina*, enquanto frações de uma das linhagens demonstrou toxicidade. A abordagem permitiu a desreplicação de metabólitos potencialmente associadas à bioatividade.

Palavras-chave: Cyanobacteria. Bioensaio. Espectrometria de massas. Produtos naturais.

ABSTRACT

YOON, Jaewon. **Secondary metabolite dereplication of Brazilian cyanobacteria using metabolomics**. 2023. 48 p. Undergraduate thesis (Bachelor of Biothechnology) - School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2023.

Cyanobacteria, as photosynthetic organisms, produce compounds with various biotechnological applications. Brazil boasts a rich diversity of cyanobacterial genera and species; however, the chemistry of these organisms remains poorly explored. While discovering novel bioactive compounds, the strategy of bioassay-guided dereplication serves to accelerate the chemoprospection process. In this study, we assessed the toxicity of four strains of Brazilian cyanobacteria against *Artemia salina*. Metabolomic tools, including DAFdiscovery, molecular networks GNPS, and SIRIUS, were employed for the dereplication of molecules associated with bioactivity. Extracts and fractions obtained from three strains of Brazilian cyanobacteria exhibited no activity against *A. salina*; however, fractions from one strain demonstrated toxicity. This approach facilitated the dereplication of metabolites potentially linked to bioactivity.

Keywords: Cyanobacteria. Bioassay. Mass spectrometry. Natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diversidade morfológica de cianobactérias	15
Figura 2 – Estruturas químicas de algumas cianotoxinas	16
Figura 3 – Aplicações de cianobactérias em diversas áreas, dentre elas como fonte de corantes, suplementos alimentares, biopolímeros, biocombustíveis e moléculas bioativas.	17
Figura 4 – Micrografia de (1) <i>Calothrix</i> sp. CCIBt3320, (2) <i>Desertifilum tharense</i> CCIBt3265, (3) <i>Leptolyngbya</i> sp. CCIBt3338 e (4) <i>Anagnostidinema amphibium</i> CCIBt3231. As barras de escala representam 20 µm	18
Figura 5 – Etapas do processo de descoberta de moléculas bioativas a partir de linhagens ambientais. As etapas de ensaio biológico e desreplicação, destacada em rosa, são o foco desta pesquisa.	19
Figura 6 – Náuplio de <i>A. salina</i>	20
Figura 7 – Etapas do desenvolvimento de redes moleculares GNPS	21
Figura 8 – Etapas para desreplicação de moléculas	27
Figura 9 – Rede molecular das linhagens <i>A. amphibium</i> CCIBt3231 (vermelho), <i>D. tharense</i> CCIBt3265 (verde), <i>Calothrix</i> sp. CCIBt3320 (azul escuro) e <i>Leptolyngbya</i> sp. CCIBt3338 (lilás). Os <i>features</i> desreplicados estão destacados com fundo azul	29
Figura 10 – Gráfico de correlação gerado pelo DAFdiscovery para as frações da linhagem <i>A. amphibium</i> CCIBt3231. Cinco <i>features</i> em destaque foram detalhadas.	30
Figura 11 – <i>Cluster</i> em que os <i>features</i> priorizados pelo DAFdiscovery (destacados em azul) pertencem. <i>A. amphibium</i> CCIBt3231 está representado com vermelho, <i>D. tharense</i> CCIBt3265 com verde, <i>Calothrix</i> sp. CCIBt3320 com azul escuro e <i>Leptolyngbya</i> sp. CCIBt3338 com lilás.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de linhagens de cianobactérias utilizadas no estudo	24
Tabela 2 – Composição do meio BG-11	24
Tabela 3 – Parâmetros utilizados para o pré-processamento dos dados	26
Tabela 4 – Parâmetros utilizados no SIRIUS 5.7.0	27
Tabela 5 – Resultados do bioensaio de <i>A. salina</i> para amostras da linhagem CCIBt3231	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASM-1	<i>Artificial sea water medium</i>
BG-11	<i>Blue green algae medium</i>
CCIBt	Coleção de cianobactérias do instituto de botânica
DAA	<i>Data dependente analysis</i>
DAFdiscovery	<i>Data fusion-based discovery</i>
DCM	Diclorometano
DDA	<i>Data dependente analysis</i>
DGDG	Digalactosildiácilglicerol
ESI	Ionização por <i>eletrospray</i>
FAPESP	Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo
GC	Cromatografia gasosa
GNPS	<i>Global natural product social molecular networking</i>
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução (<i>High performance liquid chromatography</i>)
IPA	Isopropanol
IV	Infravermelho
LC	Cromatografia líquida
MeOH	Metanol
MGDG	Monogalactosildiácilglicerol
MS/MS	Espectrometria de massas em <i>tandem</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo de difeniltetrazólio
NMR	Ressonância magnética nuclear
PG	Fosfatidilglicerol
PPM	Partes por milhão
PubChem	<i>Public repository for information on Chemical substances and their biological activities</i>
QToF	Quadrupolo e tempo de voo (<i>quadrupole time-of-flight</i>)
SisGen	Sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado
SGDG	Sulfoquinovosildiácilglicerol

STOCSY	Espectroscopia de correlação total estatística
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV-vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	PRODUTOS NATURAIS	13
1.2	BIOLOGIA DAS CIANOBACTÉRIAS	14
1.3	IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E APLICAÇÕES DAS CIANOBACTÉRIAS	15
1.4	BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS	19
1.5	METABOLÔMICA	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	CULTIVO, OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES	24
3.2	BIOENSAIO DE <i>ARTEMIA SALINA</i>	25
3.3	LC-MS E METABOLÔMICA	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1	BIOENSAIO DE <i>ARTEMIA SALINA</i>	28
4.2	METABOLÔMICA E DESREPLICAÇÃO	28
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	34
	REFERÊNCIAS	35
	APÊNDICE	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRODUTOS NATURAIS

Produtos naturais são fontes de moléculas para o tratamento de doenças desde a medicina tradicional até a contemporaneidade. É possível encontrar conhecimentos populares antigos que descrevem as plantas e suas prescrições. Por exemplo, óleo de *Cupressus sempervirens*, popularmente conhecido como cipreste-italiano, encontra-se registrado na civilização mesopotâmica (Abdel-Razek *et al.*, 2020; Huang; Lu; Ding, 2021).

Os produtos naturais são metabólitos de seres vivos, frutos de longo tempo de competição e evolução, que auxiliam sua sobrevivência no meio ambiente. Muitos produtos naturais possuem estruturas complexas e são de difícil síntese (Atanasov *et al.*, 2021).

As plantas foram as principais fontes de produtos naturais até a descoberta de penicilina a partir do *Penicillium notatum* em 1928. Desde então, produtos naturais derivados de microrganismos como bactérias, fungos e microalgas vêm sendo explorados em diversas áreas da biotecnologia (Pham *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2002).

Poucos produtos naturais encontrados no Brasil se desenvolveram em formato de medicamentos fora do país, apesar de o Brasil ser um grande detentor de biodiversidade (Valli; Russo; Bolanzi, 2018). No Brasil, estão registrados mais de 8 milhões de plantas, 10 mil bactérias e 273 mil fungos, que podem ser fontes de novas descobertas (Calixto, 2019; Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira, 2023).

No Brasil, já foram relatadas mais de 400 espécies de cianobactérias, porém esse número é considerado subestimado para a biodiversidade presente no país, por ser um país tropical com domínios fitogeográficos diversificados. Ele possui um ambiente propício para o desenvolvimento de cianobactérias de diversas espécies (Sant'Anna *et al.*, 2011). Assim, no contexto em que a descoberta de novos fármacos é uma demanda constante e considerando que mais da metade das moléculas farmacêuticas são derivadas ou inspiradas em produtos naturais, a exploração das cianobactérias brasileiras é uma alternativa promissora na diversificação da busca por novas moléculas bioativas (Mohs; Greig, 2017; Arora; Banerjee, 2019; Newman; Cragg, 2020; Pye *et al.*, 2017).

1.2 BIOLOGIA DAS CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias são os primeiros procariontes que realizam fotossíntese oxigênica que surgiram na Terra. Evidências fósseis sugerem que seu surgimento ocorreu há pelo menos 3,5 bilhões de anos (Baumgartner *et al.*, 2019). Com a capacidade de produzir oxigênio, esses organismos foram responsáveis pelo evento da Grande Oxigenação na Terra, que resultou na extinção em massa de seres anaeróbicos e possibilitou o desenvolvimento de seres multicelulares que utilizam o oxigênio no processo de obtenção energética, permitindo a forma de vida como a conhecemos (Sánchez-Baracaldo; Cardona, 2019).

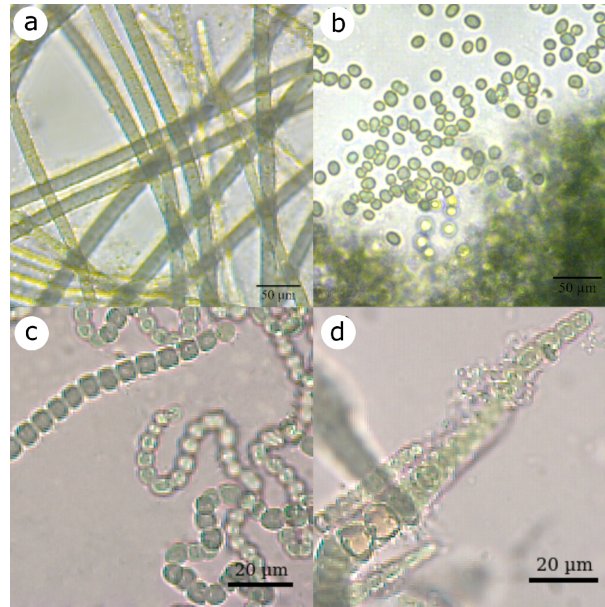
Em sua estrutura morfológica, as células de cianobactérias possuem parede celular Gram-negativa e podem ser englobadas por uma camada de mucilagem de polissacarídeo ou polipeptídeo, contendo uma ou mais células. Algumas cianobactérias apresentam motilidade vertical e/ou horizontal. Vesículas de gás permitem que a célula diminua sua densidade e consiga se movimentar verticalmente para alcançar a intensidade luminosa ideal. Enquanto isso, movimentos de deslizamento ou pendulares possibilitam o deslocamento horizontal (Boone; Castenholz; Garrity, 2001). A coloração das cianobactérias é, em sua maioria, verde-azulada – corolação ciano, em que origina seu nome –, sendo o reflexo da presença de clorofilas e ficobiliproteínas, que absorvem comprimentos de ondas distintas da luz para realizar o processo de fotossíntese (Saini; Pabbi; Shukla, 2018) (**Figura 1**).

As cianobactérias podem se dispor de forma individual, colonial ou filamentosa. Alguns tipos de cianobactérias dispostas em filamento podem produzir células especializadas – como acinetos e heterócitos. Acinetos são células de resistência formadas a partir da diferenciação de células vegetativas em situações adversas – como baixa intensidade luminosa, baixa disponibilidade de nutrientes e temperaturas baixas. Geralmente possuem parede celular espessa e extensa reserva de nutrientes, com baixo metabolismo (Garg; Maldener, 2021).

Heterócitos são células especializadas na fixação de nitrogênio atmosférico (**Figura 1(d)**). A enzima nitrogenase é responsável por catalisar a redução do gás nitrogênio em amônia, sendo inativada na presença de oxigênio. Devido a isso, o heterócito passa por metamorfose, perdendo seus aparatos fotossintéticos e desenvolvendo a parede celular espessada que forma um ambiente anaeróbico, propício para o funcionamento da enzima. Assim, perdida a capacidade de metabolismo básico, ela recebe nutrientes de células vegetativas vizinhas por meio de plasmodesmos (Zhang *et al.*, 2005).

Apesar de pertencer ao domínio Bactéria, devido à semelhança com plantas pela capaci-

Figura 1 – Diversidade morfológica de cianobactérias



(a) Tricoma sem constrição celular. (b) Tricoma em desintegração. (c) Tricoma com células constrictas. (d) Filamento uniseriado heteropolar com mucilagem e heterócito (cor amarela-verde clara). Fonte: Jaewon Yoon, 2022.

dade fotossintética, as cianobactérias foram classificadas segundo dois diferentes códigos de taxonomia – botânica e bacteriológica. As cianobactérias podem apresentar morfologia diferente dependendo do ambiente e da fase de vida. Por exemplo, *Nostoc* é um gênero em que o hormogônio possui células quadradas enquanto o indivíduo adulto tem células esféricas e possui um fase de vida que se assemelha a um cocóide (Mateo *et al.*, 2011). Outro exemplo é *Microcystis*, que sem a associação de bactérias heterotróficas não é capaz de formar mucilagem externa (Le *et al.*, 2022).

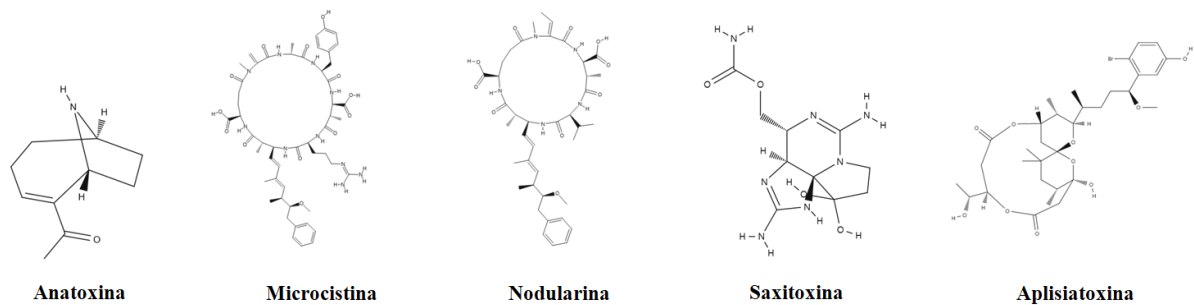
O desenvolvimento da biologia molecular e sequenciamento genético incorporaram maior assertividade à classificação das cianobactérias. O sistema de classificação moderno polifásico divide as cianobactérias em oito ordens monofiléticas: Gloeobacterales, Synechococcales, Spirulinales, Pleurocapsales, Chroococcidiopsidales, Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales, baseado, na morfologia, no sequenciamento genético de 16S rRNA e na organização dos tilacoides na célula (Komarek *et al.*, 2014).

1.3 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E APLICAÇÕES DAS CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias são conhecidamente agentes de desequilíbrio ambiental em águas eutrofizadas. Em florações – que consistem em proliferação de algas e cianobactérias em águas

devido ao excesso de nutrientes –, é comum a produção de cianotoxinas que afetam plantas, animais e seres humanos, como as hepatotoxinas (microcistina e nodularina) e neurotoxinas (saxitoxina, anatoxina e aplisiatoxina) (Sviržev *et al.*, 2019; Tanvir *et al.*, 2021) (**Figura 2**). A exposição a cianotoxinas provoca sintomas como náusea, fraqueza e dor e pode levar à morte, sendo importante medidas de controle de qualidade de águas de lagos e de reservatórios para esses compostos (Ferrão-Filho; Kozlowsky-Suzuki, 2011; Sonobe; Lamparelli; Cunha, 2019). Análises rotineiras de controle de qualidade visam à detecção e/ou quantificação das principais cianotoxinas já descritas e ensaios biológicos contribuem para a determinação da bioatividade de amostras contendo toxinas (Lawton *et al.*, 2021; Janssen, 2019).

Figura 2 – Estruturas químicas de algumas cianotoxinas



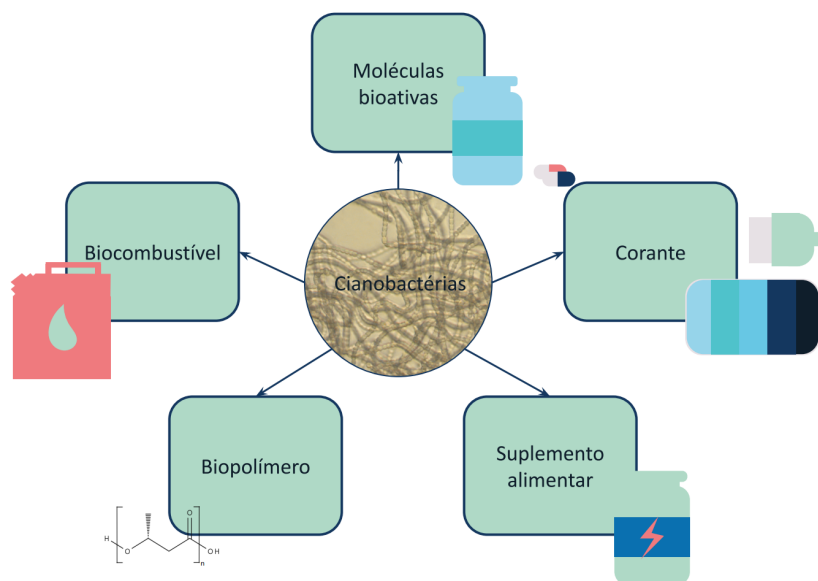
Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

Além disso, as cianobactérias e seus bioprodutos também são explorados por diversas indústrias. Na indústria alimentícia, a biomassa de *Spirulina* sp. é utilizada como suplemento devido à sua riqueza em nutrientes como vitaminas, proteínas e fibras (Moradi *et al.*, 2019). Os pigmentos advindos de cianobactérias também são uma alternativa aos corantes químicos atualmente utilizados (Saini; Pabbi; Shukla, 2018).

Outra inovação biotecnológica em que as cianobactérias podem ser aplicadas é na área dos biocombustíveis, uma vez que elas servem como fonte energética, devido ao baixo custo de cultivo e facilidade em modificação genética (Farrokh *et al.*, 2019). Elas também são fontes promissoras de bioplásticos polihidroxibutirato (PHB), produzidas como reserva energética (**Figura 3**) (Price *et al.*, 2020).

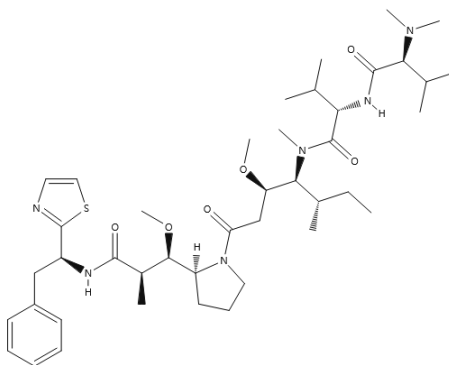
Na área da pesquisa, as cianobactérias inspiram o desenvolvimento de novos fármacos, sendo seus metabólitos secundários, fontes promissoras de novas moléculas com propriedade antiviral, antifúngica, algicida, antioxidante e antitumoral (Kini *et al.*, 2020; Burja *et al.*, 2001; Gheda; Ismail, 2020; Murakami *et al.*, 1991; Jha; Zi-rong, 2004). Por exemplo, a dolasta-

Figura 3 – Aplicações de cianobactérias em diversas áreas, dentre elas como fonte de corantes, suplementos alimentares, biopolímeros, biocombustíveis e moléculas bioativas.



Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

tina 10 (1), um peptídeo linear produzido pela *Symploca* sp., foi base para síntese do conjugado anticorpo-droga brentuximabe vedotina, fármaco utilizado para tratamento de linfoma de Hodgkin clássico (Gao *et al.*, 2021). Nesse contexto, ensaios biológicos contribuem para a determinação da bioatividade de amostras contendo moléculas potencialmente inéditas e bioativas.



(1) Dolastatina 10

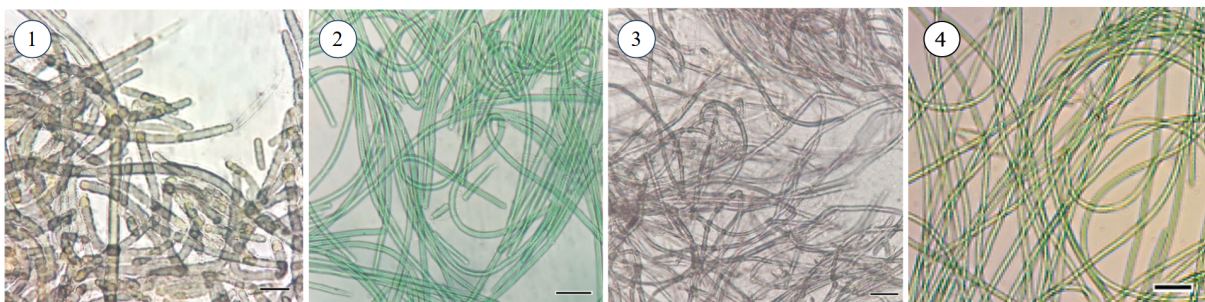
Na presente pesquisa por moléculas inéditas e bioativas, propusemos a investigação de linhagens de cianobactérias dos gêneros *Desertifilum*, *Calothrix*, *Leptolyngya* e *Anagnostidinema*.

Desertifilum tharense é uma cianobactéria bentônica de filamentos solitários, inicialmente encontrada no Deserto do Thar (Índia), um habitat de altas temperaturas e baixa umidade (Dadheech *et al.*, 2012). Essa espécie demonstrou capacidade de remover nutrientes e corantes em efluentes e foi pouco explorada até o momento (Gul; Şenol; Taştan, 2021; Khemka;

Saraf, 2017) (**Figura 4(1)**).

Calothrix é um gênero marinho e terrestre, com célula apical alongada e produtor de heterócitos basais. Até o momento, poucos produtos naturais foram descobertos a partir de linhagens de *Calothrix*, dentre eles as calothrixamidas, calothrixinas, caloficina, sulcatol, eremofilona e ionona (Crnkovic *et al.*, 2018; Rickards *et al.*, 1999; Moon *et al.*, 1992; Hockelmann; Juttner, 2004; Hockelmann *et al.*, 2009) (**Figura 4(2)**).

Figura 4 – Micrografia de (1) *Calothrix* sp. CCIBt3320, (2) *Desertifilum thareense* CCIBt3265, (3) *Leptolyngbya* sp. CCIBt3338 e (4) *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3231. As barras de escala representam 20 µm



Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

Extratos metanólicos de *Desertifilum thareense* CCIBt3265, isolado da lagoa salina em Pantanal (caracterizado por elevado pH) e *Calothrix* sp. CCIBt3320, isolado de Parque Estadual do Serra do Mar, possuem inibição reversível *in vitro* de acetilcolinesterase. Essa enzima está presente nos neurônios do sistema nervoso central e periférico e tem ação crucial na propagação do impulso nervoso (Carvalho *et al.*, 2013). A inibição da acetilcolinesterase aumenta a concentração do neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas e pode ser usada para tratamento de sintomas comportamentais e cognitivos de doenças neurodegenerativas. No entanto, em altas concentrações, o acúmulo de acetilcolina pode levar à fraqueza muscular, perda de consciência e morte (Baek; Choi; Rhee, 2015; Colovic *et al.*, 2013).

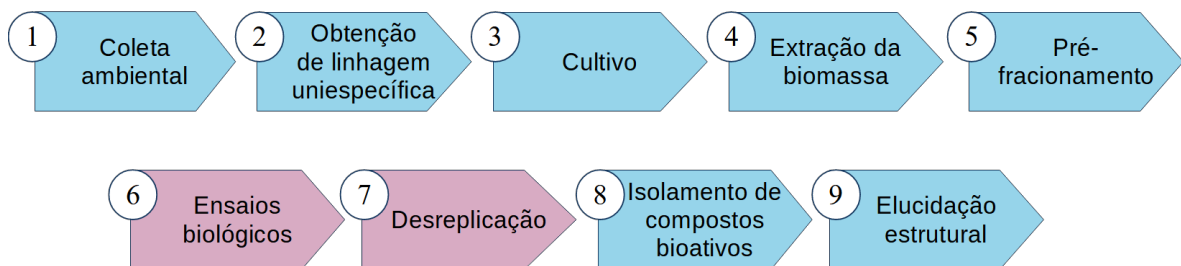
Leptolyngbya é um gênero que abrange um número grande e diversificado de espécies, muito devido ao seu habitat cosmopolita, que abrange desde ambientes terrestres até fontes termais (**Figura 4(3)**). Elas produzem metabólitos secundários diversificadas, como grassy-peptolídeo, ibu-epidemethoxylyngbyastatina, coibamida, crossbyanol, kalkipyrona, leptazolina, leptolyngbyalídeo, companeramida, honaucina, loggerpeptina, yoshinona e leptolyngbyolídeo (Thornburg *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2008; Neupane *et al.*, 2019a; Helfrich *et al.*, 2019; Neupane *et al.*, 2019b; Vining *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2012; Al-Awadhi; Paul; Luesch, 2018; Inuzuka *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2017).

Anagnostidinema amphibium, anteriormente conhecida como *Geitlerinema unigranulatum*, é uma espécie de cianobactérias motil e bentônica presente nos reservatórios do Brasil. Ela foi pouco estudada e se mostra capaz de absorver e acumular arsênio (Komárek; Azevedo, 2000; Braun *et al.*, 2019). Além disso, essa espécie contém significativas porcentagens de proteínas (Baracho; Lombardi, 2023; Silva, 2022).

1.4 BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

O processo de descoberta de moléculas bioativas a partir de cianobactérias em cultura quase sempre envolve as seguintes etapas: coleta ambiental, obtenção de linhagem uniespecífica, cultivo de linhagem para obtenção da biomassa seguida de liofilização, extração da biomassa, pré-fracionamento, testes de bioatividade, desreplicação de moléculas guiado pela bioatividade e, por fim, isolamento e elucidación estrutural dos compostos bioativos (Nothias *et al.*, 2018) (**Figura 5**). Os ensaios biológicos podem focar em estudar compostos específicos a determinados alvos, como receptores e enzimas (*target-based assay*) ou em simular, *in vitro*, o ambiente celular para investigar efeitos em cultivos celulares (*cell-based assay*), como mudança no metabolismo, inibição de proliferação e citotoxicidade (Blay *et al.*, 2020).

Figura 5 – Etapas do processo de descoberta de moléculas bioativas a partir de linhagens ambientais. As etapas de ensaio biológico e desreplicação, destacada em rosa, são o foco desta pesquisa.



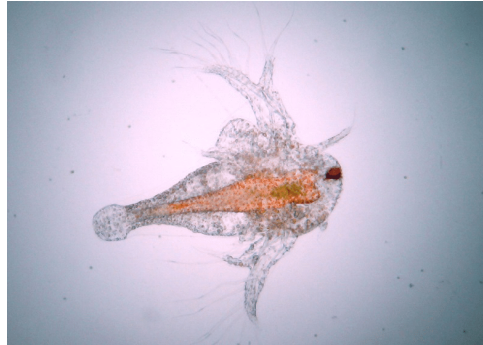
Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

Um dos bioensaios utilizados para estudar a toxicidade preliminar de compostos é realizado com *Artemia salina*, uma espécie de microcrustáceo que habita águas com concentrações salinas elevadas de até 250 g/L (Epole *et al.*, 2020).

Esse organismo também é utilizado como modelo em ecotoxicologia, devido à facilidade em aquisição dos seus cistos, versatilidade de adaptação às diferentes condições abióticas, curto ciclo de vida e baixo nível de biossegurança requerida (Okumu *et al.*, 2021). Em comparação com outros modelos de teste como camundongos e peixes, a artêmia possui uma sensibilidade

menor. Essa característica pode ser uma desvantagem para detectar toxicidades baixas, porém torna-se uma vantagem para diferenciar toxicidade alta de baixa, principalmente para investigação de compostos bioativos (**Figura 6**) (Nunes *et al.*, 2006).

Figura 6 – Náuplio de *A. salina*



Fonte: Hamidi, Jovanova & Panovska, 2014.

Uma outra aplicação consiste em seu uso em testes preliminares para priorizações posteriores em aos ensaios celulares, como o de redução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo de difeniltetrazólio (MTT) (Solis *et al.*, 1993). Esse ensaio com MTT avalia a viabilidade das células expostas aos compostos por meio da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais, sendo amplamente utilizado na prospecção de novos produtos naturais (Fadholly *et al.*, 2019; Elshafie *et al.*, 2020).

1.5 METABOLÔMICA

As amostras biológicas contêm uma grande quantidade de diferentes moléculas em concentrações variadas. Dentre essa gama de moléculas a serem exploradas, pode haver compostos já conhecidos, ou seja, previamente isolados, elucidados e descritos na literatura. Uma vez que essas etapas demandam recursos e tempo, a desreplicação é uma etapa crucial. A desreplicação consiste na rápida identificação de compostos conhecidos utilizando análises espectroscópicas e espectrométricas com subsequente busca em bases de dados, evitando a redescoberta de compostos (Schrimpe-Rutledge *et al.*, 2016).

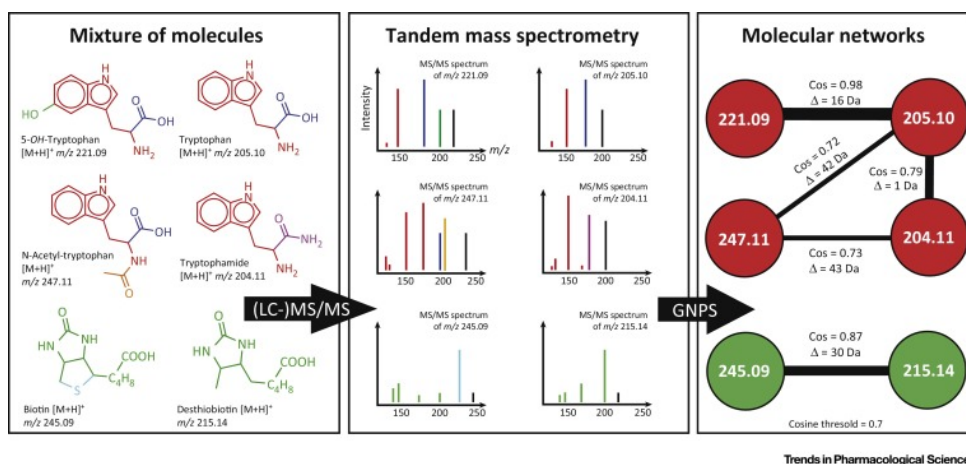
Para a desreplicação, amostras de interesse são analisadas através de técnicas analíticas, sendo as mais comuns a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), a espectroscopia no infravermelho (IV), espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) (Wishart, 2016).

Dentre essas, a espectrometria de massas é uma técnica de alta sensibilidade que utiliza baixa quantidade de amostra e é acoplável a sistemas cromatográficos. A espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) gera dados que podem ser utilizados para o cálculo de fórmulas moleculares, que auxiliam no processo de desrepliação. Quando utilizada a espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS), os padrões de fragmentação são registrados como espectros característicos que podem ser utilizados para alimentar buscas em bases de dados para a identificação de compostos (Demarque *et al.*, 2020; Alvarez-Rivera *et al.*, 2019).

Recentemente, plataformas de metabolômica têm contribuído de forma significativa para acelerar o processo de desrepliação. A metabolômica combina técnicas analíticas com bioinformática para a investigação de amostras biológicas complexas. Exemplos de plataformas de metabolômica utilizadas para a descoberta de produtos naturais incluem *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS), DAFdiscovery, SNAP-MS e SIRIUS (O’Shea; Misra, 2020).

A plataforma GNPS, por meio da ferramenta de *Classic Molecular networking*, cria redes moleculares baseadas na similaridade de espectros MS/MS, já que moléculas estruturalmente semelhantes tendem a se fragmentar de forma semelhante. Espectros de massa MS/MS com determinado grau de similaridade são alinhados gerando um “espectro consenso” (*feature*), representado na rede na forma de um nodo. Diversos *features* espectralmente semelhantes são unidos formando agrupamentos (*clusters*) (Figura 7) (Wang *et al.*, 2016).

Figura 7 – Etapas do desenvolvimento de redes moleculares GNPS



Fonte: Quinn *et al.*, 2017.

A ferramenta pode ser utilizada para a desrepliação através da anotação automática com sua base de dados e/ou correlação dos dados experimentais com espectros gerados de moléculas conhecidas que são “semeados” na rede molecular (Yang *et al.*, 2013). Uma de suas limitações,

porém, se deve ao fato de que sua base de dados contém um número reduzido de espectros de produtos naturais de cianobactérias, sendo necessário realizar a desreplicação direcionada. Sendo a desreplicação individual inviável para um grande número de compostos, essa requer alguma estratégia para a priorização de *features*.

O *Data Fusion-based Discovery* (DAFdiscovery) é um *pipeline* de licença aberta que correlaciona resultados de bioensaios com dados de espectrometria de massas e/ou de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de amostras fracionadas. Por meio de cálculo de Espectroscopia de Correlação Total Estatística (STOCSY), cada *feature* recebe uma medida de correlação com os dados de bioatividade nas amostras. Essa ferramenta leva em consideração a concentração relativa dos sinais dentro das frações e é de grande utilidade para a priorização de *features* para desreplicação *in silico*, quando existem os dados de bioensaio (Borges *et al.*, 2022).

A desreplicação de compostos oriundos de cianobactérias pode ser feita por meio de cruzamento de dados em bases de dados como CyanoMetDB, ChemSpider, PubChem, METLIN e NPAtlas (Sorokina; Steinbeck, 2020). Também pode ser acelerada com o uso de ferramentas bioinformáticas *in silico*, como SIRIUS.

A plataforma SIRIUS auxilia a análise combinada de dados de HRMS e MS/MS, calculando fórmulas moleculares putativas condizentes com os espectros de massa fornecidos, utilizando massa acurada, perfil de fragmentação e padrão isotópico (Duhrop *et al.*, 2019). Além disso, ela realiza buscas semi-automáticas em bases de dados e sugere as classes químicas mais prováveis para os compostos de interesse através da ferramenta CANOPUS (Duhrop *et al.*, 2020).

Assim, o presente estudo realizou a avaliação de bioatividade contra *A. salina* de extratos e frações de cianobactérias brasileiras, assim como a desreplicação de amostras de compostos associados à bioatividade. Para isso, utilizou-se DAFdiscovery como ferramenta metabolômica para a priorização de *features*, seguida de análise detalhada dos espectros através das ferramentas GNPS e SIRIUS, além das buscas extensivas em bases de dados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de extratos e frações de cianobactérias brasileiras em bioensaio contra *Artemia salina* e desreplicar compostos potencialmente associados à bioatividade utilizando metabolômica baseado em espectrometria de massa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o potencial de extratos e frações de quatro linhagens de cianobactérias brasileiras contra *A. salina*;
2. Identificar potenciais *features* associados à bioatividade utilizando DAFdiscovery;
3. Desreplicar *features* associados à bioatividade das linhagens por meio de GNPS, SIRIUS e buscas em bases de dados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO, OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES

A atividade de acesso às linhagens da Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica estão cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de acesso A531C68. Elas foram cultivadas em BG-11 para Oscillatoriales e BG-11 0% (BG-11 sem NaNO_3) para Nostocales (**Tabela 1 e 2**).

Tabela 1 – Dados de linhagens de cianobactérias utilizadas no estudo

Código	Identificação	Família	Local de coleta	Bioma
CCIBt3220	<i>Calothrix</i> sp.	Rivulariaceae	Parque Santa Virgínia, SP	Mata Atlântica
CCIBt3231	<i>Anagnostidinema amphibium</i>	Coleofasciculaceae	Pirassununga, SP	Cerrado
CCIBt3265	<i>Desertifilum tharense</i>	Coleofasciculaceae	Represa Billings, SP	Mata Atlântica
CCIBt3338	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Leptolyngbyaceae	Salina da Ponta, MS	Pantanal

Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

As linhagens foram cultivadas durante 2 meses sob aeração estéril contínua e sob fotoperíodo claro-escuro de 12h-12h com irradiância $40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a uma temperatura média de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o crescimento, as biomassas foram obtidas por centrifugação durante 10 minutos a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ e 10.700g e liofilizadas.

Tabela 2 – Composição do meio BG-11

Componente	Concentração
NaNO_3	150 mg/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	40 mg/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75 mg/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36 mg/L
Ácido cítrico	6 mg/L
EDTANa_2	1 mg/L
Na_2CO_3	20 mg/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	12 mg/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,86 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222 mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,39 mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079 mg/L
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0494 mg/L

pH do meio: 7,4. Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

A extração da biomassa liofilizada iniciou-se com maceração de 3 ciclos usando 200 mL de diclorometano e metanol (DCM:MeOH) 1:1. Em seguida, as soluções extrativas foram filtradas em lã de vidro e secas a uma temperatura média de 37 °C em rotaevaporador.

Os extratos obtidos foram pré-fracionados em manifold a vácuo utilizando coluna cromatográfica empacotada com o Diaion[®] HP-20SS. Foi usado um gradiente decrescente de polaridade de isopropanol e água (IPA:H₂O) para o fracionamento em proporções 0:100, 20:80, 40:60, 70:30, 90:10 e 100:0, obtendo 6 pré-frações, sendo a fração 1 mais polar e a fração 6 mais apolar.

3.2 BIOENSAIO DE *ARTEMIA SALINA*

O bioensaio de toxicidade frente à *A. salina* foi baseada na metodologia de Solis *et al.* (1993). Para obtenção de náuplios, cistos de *A. salina* foram incubados em água do mar artificial mantendo luminosidade e aeração constantes à temperatura de 30 °C durante 24 horas. Após a eclosão dos náuplios, em cada um dos poços da microplaca de 96 poços foram transferidos 99 µL de solução contendo cerca de 15 náuplios de *A. salina*, acrescidos de 1 µL das amostras teste, obtendo-se uma concentração final de 100 µg/mL. Todas as amostras foram testadas em triplicata e acompanhadas de controles positivo (200 µg/mL de dicromato de potássio), negativo (1% de dimetilsulfóxido) e branco (água do mar artificial). As placas com as amostras foram incubadas a 25 °C na ausência de luz durante 18 h e foi calculada a mortalidade para cada amostra, sendo considerado tóxica quando a mortalidade média > 50%.

3.3 LC-MS E METABOLÔMICA

Espectros em modo positivo e negativo de extratos e pré-frações foram obtidos por meio do equipamento Waters Acquity UPLC H-class acoplado a um espectrômetro de massas Waters Xevo G2-XS QToF com ionização por *eletrospray* (ESI) no modo *full scan* (varredura total de íons) por *data dependente analysis* (DDA). Para obtenção de MS/MS, os 3 íons de maior intensidade em cada MS1 sofreram fragmentação.

Para UPLC foi utilizada a coluna Kinetex C18 (2.1 × 50mm × 1.7 µm, Phenomenex) a 0,5 mL/min a 40 °C. Como fase móvel, foram utilizadas água (A) e acetonitrila (B) de grau analítico, ambas acidificadas com ácido fórmico a 0,1%, sob gradiente de 10-100% B (7 min), 100% (1 min), 100-10% B (0,1 min) e 10% B (1,9 min). Os parâmetros utilizados no equipamentos

foram: voltagem do capilar de 1.200 V, voltagem do cone de 30 eV, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, vazão de gás nitrogênio no cone de 50 L/h, vazão do gás de dessolvatação de 750 L/h, intervalo de detecção de 100 a 2000 Da, tempo de scan de 0,2s, energia de colisão em rampa de 15-30 eV e 60-80 eV.

A partir dos dados obtidos em UPLC-HRMS-MS/MS, os espectros foram convertidos para a extensão .mzXML utilizando o ProteoWizard e o pré-processados com MZMine (Pluskal *et al.*, 2010) (**Tabela 3**).

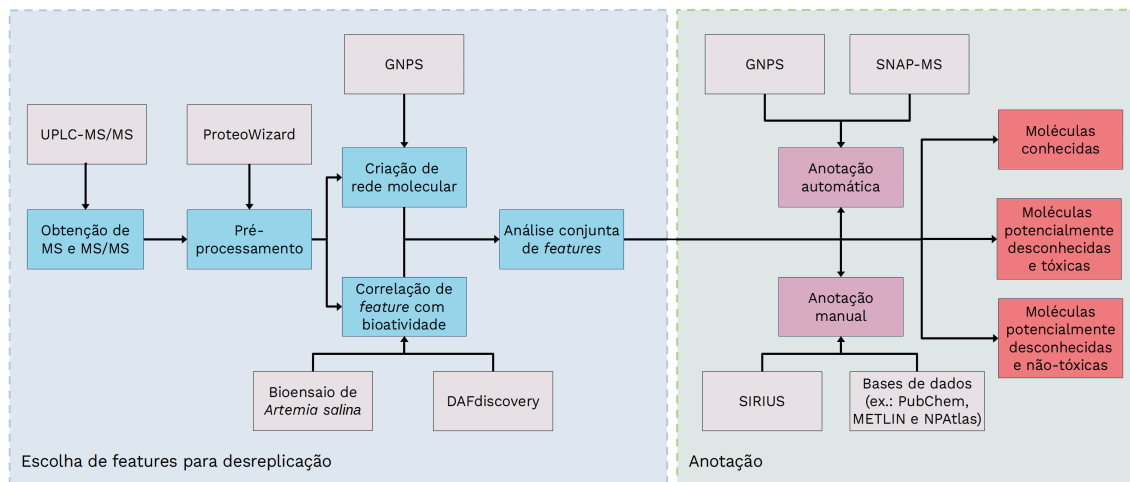
Tabela 3 – Parâmetros utilizados para o pré-processamento dos dados

ProteoWizard		
Mass detection	MS1 noise level	10 ⁵
	MS2 noise level	10 ¹
Chromatogram builder	Min time span	0,01 min
	Min height	2.10 ⁵
	<i>m/z</i> tolerance	20 ppm
Chromatogram deconvolution	<i>m/z</i> range for MS2 scan pairing	0,5 Da
	RT range for MS2 scan pairing	0,15 min
	<i>m/z</i> tolerance	20 ppm
Isotopic peak grouper	RT tolerance	0,1 min
	Maximum charge	3
	Representative isotope	Most intense

Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

Para a criação de redes moleculares na plataforma GNPS, foram utilizados os parâmetros: 0,02 Da *precursor ion mass tolerance*; 0,02 Da *fragment ion mass tolerance*, 0,6 *min pairs cos*, 4 *minimum matched fragment ions*, 4; *minimum*. A rede molecular foi visualizada no software Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003).

Os arquivos pré-processados, junto com os dados de mortalidade obtidos em bioensaio de *A. salina* e normalizados entre 0 e 1, foram analisados pelo DAFdiscovery (Borges *et al.*, 2022). Os *features* com maior correlação com bioatividade e que foram fragmentados em MS/MS foram priorizados para desreplicação (**Figura 8**).

Figura 8 – Etapas para desreplcação de moléculas

A desreplcação se inicia com priorização de *features* (representado em azul na figura) e se finaliza com anotação de moléculas (representado em rosa na figura). Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

Para auxiliar a desreplcação, foi utilizada a ferramenta SIRIUS, em que pelo menos 2 ou mais MS2 de mesma molécula com adutos diferentes foram analisados simultaneamente (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Parâmetros utilizados no SIRIUS 5.7.0

SIRIUS 5	
MS/MS isotope scorer	Score
Use DBs in formula only	False
Fallback Adducts	All
Search DBs	All
Tag Lipids	False
CANOPUS	True

Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

Os *features* priorizados foram desreplcados com auxílio da plataforma GNPS e SIRIUS 5.7.0, seguido por buscas em bases de dados CyanoMetDB, NPAtlas, CHEMnetBASE, PubChem e ChemSpider.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 BIOENSAIO DE *ARTEMIA SALINA*

Extratos e frações de *Calothrix* sp. CCIBt3320, *D. tharense* CCIBt3265 e *Leptolyngbya* sp. CCIBt3338 não apresentaram bioatividade contra *A. salina*. Apenas a linhagem *A. amphibium* CCIBt3231 demonstrou atividade, com resultados positivos para o extrato e as frações 4, 5 e 6 (**Tabela 5**). O bioensaio de *A. salina* se mostrou eficaz para priorizar amostras das linhagens estudadas.

Tabela 5 – Resultados do bioensaio de *A. salina* para amostras da linhagem CCIBt3231

Amostra	Mortalidade ± Desvio padrão
Controle positivo	100% ± 0,0%
Controle negativo	10% ± 6,4%
Extrato	51% ± 1,9%
Fração 1	0% ± 0,0%
Fração 2	7% ± 7,1%
Fração 3	14% ± 7,2%
Fração 4	89% ± 9,3%
Fração 5	55% ± 13,5%
Fração 6	62% ± 13,6%

n = 3; as frações bioativas foram destacadas em negrito. Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

O extrato de *A. amphibium* CCIBt3231 se mostrou ativo em bioensaio, e o seu pré-fracionamento dele possibilitou uma análise mais detalhada sobre a bioatividade. As frações 4, 5 e 6 apresentaram níveis de bioatividade superiores aos do extrato, evidenciando a eficácia do pré-fracionamento em aumentar a concentração das moléculas (Ozaki *et al.*, 2019). Resultados negativos das frações 1, 2 e 3 indicam que o composto ou os compostos responsáveis pela bioatividade tem polaridade intermediária a baixa.

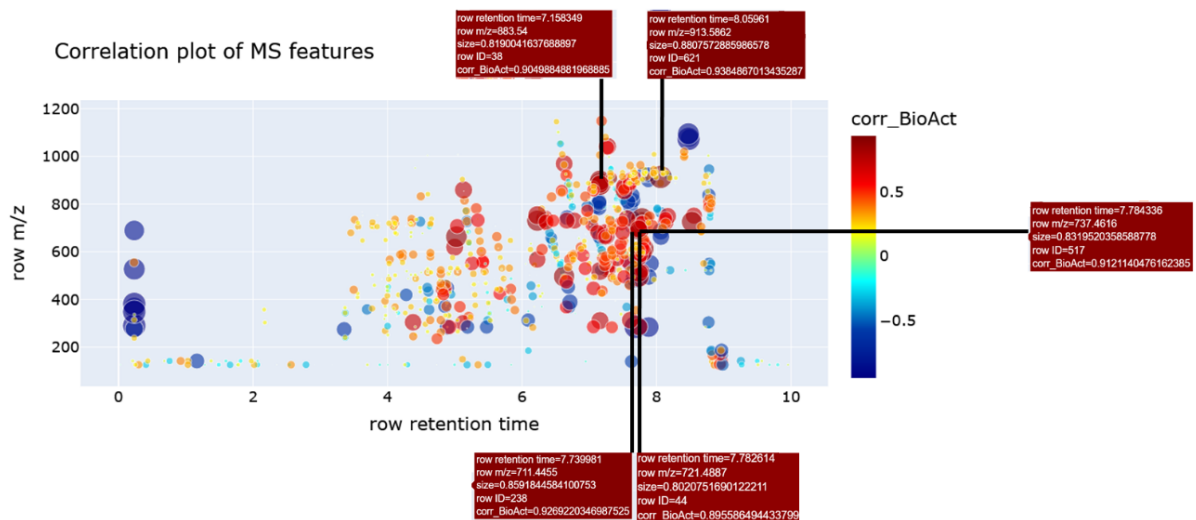
4.2 METABOLÔMICA E DESREPLICAÇÃO

A rede molecular clássica foi criada com os dados de MS/MS no modo positivo detectados nas amostras de quatro linhagens, sendo grupo 1 (vermelho) *A. amphibium* CCIBt3231, grupo 2 (verde) *D. tharense* CCIBt3265, grupo 3 (azul escuro) *Calothrix* sp. CCIBt3320 e grupo 4 (lilás) *Leptolyngbya* sp. CCIBt3338. O branco analítico foi utilizado como G6 no GNPS para remover contaminantes da rede molecular. A rede molecular foi visualizada com Cytoscape (**Figura 9**).

Ao todo, foram formados 372 nodos, sendo 47% (176) formados a partir dos dados detectados em amostras da linhagem *A. amphibium* CCIBt3231. 70% (261) dos nodos formaram *clusters* e 30% (111) dos nodos sendo *single nodes*. Dentre os *clusters*, 7 deles eram formados por *features* exclusivos de CCIBt3231. Comparado com as outras três linhagens, a *A. amphibium* CCIBt3231 apresentou maior produção de metabólitos exclusivos.

Os dados de MS1 da *A. amphibium* pré-processados em formato .csv e os dados de bioatividade foram normalizados entre 0 e 1. A correlação entre esses dados foi realizada pelo *pipeline* DAFdiscovery, utilizando a opção 4 (MS + Bioact). O resultado apontou 603 (68,68%) *features* com correlação positiva e 275 (31,32%) *features* com correlação negativa. Em se tratando de correlações acima de índice de correlação de 0,5 – na escala de 0,0 a 1,0, sendo 1 com maior correlação –, houveram 107 (12,19%) *features*. Como ainda se trata de um número alto de *features* para desreplicação detalhada, foram desreplicados de os cinco *features* com maiores correlação (**Figura 10**).

Figura 10 – Gráfico de correlação gerado pelo DAFdiscovery para as frações da linhagem *A. amphibium* CCIBt3231. Cinco *features* em destaque foram detalhadas.

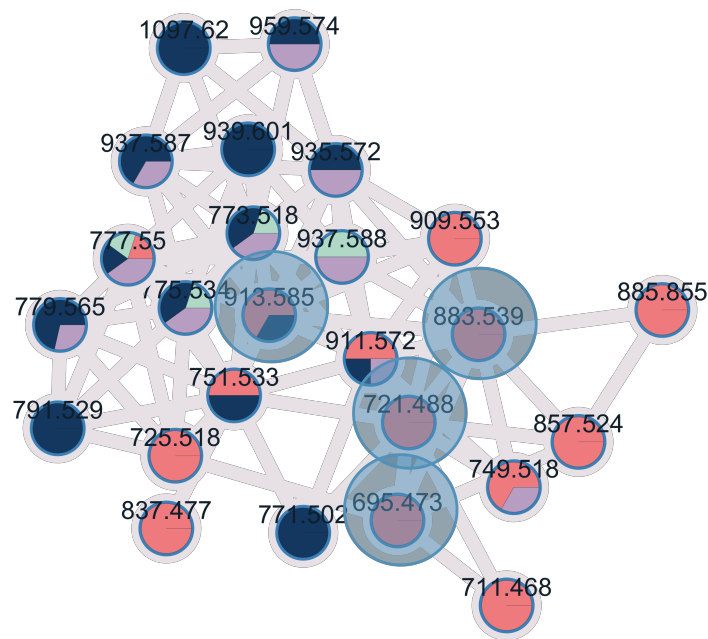


Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

Os *features* priorizados pelo DAFdiscovery pertencem ao mesmo *cluster* na rede molecular (**Figura 11**). Apesar dos íons de m/z 711,4442 e 721,4902 não estarem diretamente representados na rede molecular, seus íons com adutos diferentes, m/z 695,4768 e 737,4612, respectivamente, formam *features* na rede. O nodo de m/z 959,574 e tempo de retenção 7,16 min foi anotado automaticamente pelo GNPS como digalactosildiglicerídeo (20:5/18:3) (**Apêndice 1**). Esse composto é um glicolípídeo presente na membrana, composto por galactoses ligados ao glicerol através de ligações glicosídicas. Monogalactosildiácilglicerol (MGDG), digalac-

tosildiácilglicerol (DGDG), sulfoquinovosildiácilglicerol (SGDG) e fosfatidilglicerol (PG) são principais lipídeos que compõem as membranas de tilacóides, sendo um componente essencial para fotossistemas I e II (Yoshihara; Kobayashi, 2022; Kobayashi; Yoshihara; Kubota-Kawai, 2023).

Figura 11 – Cluster em que os *features* priorizados pelo DAFdiscovery (destacados em azul) pertencem. *A. amphibium* CCIBt3231 está representado com vermelho, *D. tharense* CCIBt3265 com verde, *Calothrix* sp. CCIBt3320 com azul escuro e *Lep-tolyngbya* sp. CCIBt3338 com lilás.



Fonte: Jaewon Yoon, 2023.

O íon de m/z de 913,5858 $[M+Na]^+$ e tempo de retenção de 8,06 min foi correlacionada com a bioatividade. Sua fórmula molecular putativa calculada com SIRIUS foi $C_{47}H_{86}O_{15}Na^+$, com erro de - 0,10 ppm. A ferramenta também anotou a molécula como análogo de glicosildiácilglicerol (**Apêndice 2 e 9**). Glicosildiácilglicerol pertence à classe de glicolipídeos, a mesma classe do íon no mesmo cluster anotada automaticamente pelo GNPS. Em bases de dados, foi encontrado DGDG com esta mesma fórmula molecular. Analisando-se manualmente o espectro, foi possível identificar os íons característicos de de m/z 243 e 405, referentes respectivamente ao grupo polar galactosil $[C_9H_{16}O_6 + Na]^+$ e grupo polar digalactosil $[C_{15}H_{26}O_{11} + Na]^+$. Além disso, foram identificadas perdas neutras de resíduos de hexose, caracterizado pela diferença de massa de 162 Da. Assim, a molécula se trata de um glicolipídeo da família de DGDG (Kim *et al.*, 2013). Porém, devido às limitações da técnica utilizada, não foi possível identificar a localização da insaturação. Alguns glicolipídeos de cianobactérias e microalgas apresentam

atividade antiviral e antitumoral (Costa *et al.*, 2016).

Além disso, a bioatividade também foi associada ao íon de m/z de 711,4442 $[M+K]^+$ e tempo de retenção de 7,73 min. Analisando através do cromatograma de íon extraído (EIC), foi identificado que o íon de m/z 695,4768 $[M+Na]^+$ possui o mesmo tempo de retenção, tratando-se de diferente aduto do mesmo composto (**Apêndice 3**). O composto foi representado no *cluster* com nodo de m/z 695,473. Sua fórmula molecular putativa calculada com SIRIUS foi $C_{37}H_{68}O_{15}K^+$, com erro de -0,29 ppm. A ferramenta também indicou similaridade espectral com o composto glicosildiaglicerol (**Apêndice 4 e 10**). Analisando-se o espectro de $[M+Na]^+$, foi possível identificar o íon fragmento de m/z 243 $[C_9H_{16}O_6 + Na]^+$, sem a presença do fragmento de m/z 405 (*Apêndice 5*). A presença de perdas neutras de resíduos de hexose (162 Da), sem o fragmento de m/z 405, indica ser um glicolípido da família de MGDG (Kim *et al.*, 2013). Em bases de dados foram encontrados compostos da família de MGDG não pertencente às cianobactérias, corroborando com a análise manual.

Através da análise por EIC, identificou-se que os íons de m/z 737,4612 $[M+K]^+$ e 721,4902 $[M+Na]^+$ possuem o mesmo tempo de retenção de 7,73 min e são diferentes adutos de um mesmo composto (**Apêndice 3**). Apesar disso, apenas o íon de m/z 737,4612 $[M+K]^+$ fragmentou em MS/MS. Sua fórmula molecular putativa calculada com SIRIUS foi $C_{36}H_{74}O_{10}SK^+$, com erro de 0,98 ppm. A ferramenta também indicou similaridade espectral com o composto glicosildiaglicerol (**Apêndice 7 e 11**). Foi encontrada correspondência em base de dados PubChem, porém não pertencente a cianobactérias. Glicolídeos podem possuir atividade citotóxica e antitumoral, por meio de inibição da replicação de DNA e indução à apoptose (Grabowska *et al.*, 2021; Maeda *et al.*, 2011).

Por fim, o íon de m/z 883,5388 $[M+Na]^+$ e tempo de retenção de 7,16 min também foi associado à bioatividade. Sua fórmula molecular putativa calculada com SIRIUS foi $C_{45}H_{80}O_{15}Na^+$, com erro de 3,61 ppm. A ferramenta também anotou a molécula com similaridade espectral com glicosildiaglicerol (**Apêndice 8 e 12**). Analisando-se manualmente o espectro, foi possível identificar os íons característicos de m/z 243 e 405, referentes respectivamente ao grupo polar galactosil $[C_9H_{16}O_6 + Na]^+$ e grupo polar digalactosil $[C_{15}H_{26}O_{11} + Na]^+$. Além disso, foram identificadas perdas neutras de resíduos de hexose, caracterizado pela diferença de massa de 162 Da. Somado com a existência de compostos da família de DGDG com esta mesma fórmula molecular no PubChem, não pertencente às cianobactérias, a molécula se trata de um glicolípido da família de DGDG.

A análise dos íons priorizados pelo DAFdiscovery levou à desreplicação de glicolídeos

produzidos por *A. amphibium*. A análise se mostra consistente uma vez que no mesmo *cluster* estavam agrupados íons que puderam ser anotados através da propagação da anotação automática da plataforma GNPS e desreplicação detalhada pelo SIRIUS. Os resultados indicam a presença de glicolipídeos possivelmente bioativos.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo, foram realizados bioensaios contra o microcrustáceo *A. salina* de 28 amostras, que incluíam extratos e frações de 4 linhagens de cianobactérias brasileiras (*Calothrix* sp. CCIBt3220, *A. amphibium* CCIBt3231, *D. tharense* CCIBt3265 e *Leptolyngbya* sp. CCIBt3338). Na concentração de 100 µg/mL, somente as amostras da linhagem *A. amphibium* apresentaram bioatividade, destacando-se as frações mais apolares. Esse resultado destaca a eficácia do bioensaio de *A. salina* na seleção e priorização de amostras de cianobactérias.

A desreplicação subsequente dos *features* com correlação com bioatividade levou à anotação de compostos análogos ao glicosildiaglicerol.

O uso de fracionamento guiado pela bioatividade e realização de outros bioensaios complementares serão fundamentais para avaliar potenciais impactos das moléculas em diversas áreas, desde a biotecnologia até a descoberta de novos fármacos.

REFERÊNCIAS¹

- ABDEL-RAZEK, A. S. *et al.* Microbial natural products in drug discovery. **Processes**, MDPI AG, v. 8, n. 4, p. 470, abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pr8040470>>.
- AL-AWADHI, F. H.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Structural diversity and anticancer activity of marine-derived elastase inhibitors: Key features and mechanisms mediating the antimetastatic effects in invasive breast cancer. **ChemBioChem**, Wiley, v. 19, n. 8, p. 815–825, mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cbic.201700627>>.
- ALVAREZ-RIVERA, G. *et al.* Recent applications of high resolution mass spectrometry for the characterization of plant natural products. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier BV, v. 112, p. 87–101, mar 2019.
- ARORA, N.; BANERJEE, A. K. Dereplication in natural product discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 101–102, 3 2019. ISSN 15680266.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, Springer Science and Business Media LLC, v. 20, n. 3, p. 200–216, jan. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>>.
- BAEK, I.; CHOI, H.-J.; RHEE, J.-S. Inhibitory effects of biocides on hatching and acetylcholinesterase activity in the brine shrimp artemia salina. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 7, p. 303–308, 12 2015. ISSN 2005-9752.
- BARACHO, D. H.; LOMBARDI, A. T. Study of the growth and biochemical composition of 20 species of cyanobacteria cultured in cylindrical photobioreactors. **Microbial Cell Factories**, Springer Science and Business Media LLC, v. 22, n. 1, fev. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-023-02035-z>>.
- BAUMGARTNER, R. J. *et al.* Nanoporous pyrite and organic matter in 3.5-billion-year-old stromatolites record primordial life. **Geology**, v. 47, n. 11, p. 1039–1043, 09 2019. ISSN 0091-7613. Disponível em: <<https://doi.org/10.1130/G46365.1>>.
- BLAY, V.; TOLANI, B.; HO, S. P.; ARKIN, M. R. High-throughput screening: today's biochemical and cell-based approaches. **Drug Discovery Today**, Elsevier BV, v. 25, n. 10, p. 1807–1821, out. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.07.024>>.
- BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. (Ed.). **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. Springer New York, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6>>.
- BORGES, R. M. *et al.* Data fusion-based discovery (DAFdiscovery) pipeline to aid compound annotation and bioactive compound discovery across diverse spectral data. **Phytochemical Analysis**, Wiley, oct 2022.
- BRAUN, A. B.; TRENTIN, A. W. d. S.; VISENTIN, C.; THOMÉ, A. Biorremediação como alternativa de tratamento de solos contaminados com metais tóxicos. **Revista CIATEC-UPF**, v. 11, n. 2, p. 73–87, jul. 2019. Disponível em: <<https://seer.upf.br/index.php/ciatec/article/view/8971>>.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 10520 (2023).

BURJA, A. M. *et al.* Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. **Tetrahedron**, v. 57, p. 9347–9377, 11 2001. ISSN 00404020.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, FapUNIFESP (SciELO), v. 91, n. suppl 3, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190105>>.

CARVALHO, L. R. *et al.* Biologically active compounds from cyanobacteria extracts: in vivo and in vitro aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Springer Science and Business Media LLC, v. 23, n. 3, p. 471–480, may 2013.

CHOI, H. *et al.* Crossbyanols a-d, toxic brominated polyphenyl ethers from the hawai'ian bloom-forming cyanobacterium *ileptolyngbya crossbyana/i*. **Journal of Natural Products**, American Chemical Society (ACS), v. 73, n. 4, p. 517–522, fev. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/np900661g>>.

CHOI, H. *et al.* Honaucins a-c, potent inhibitors of inflammation and bacterial quorum sensing: Synthetic derivatives and structure-activity relationships. **Chemistry & Biology**, Elsevier BV, v. 19, n. 5, p. 589–598, maio 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.03.014>>.

COLOVIC, M. B. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 315–335, 4 2013. ISSN 1570159X.

COSTA, E. da *et al.* Lipidomic approaches towards deciphering glycolipids from microalgae as a reservoir of bioactive lipids. **Marine Drugs**, MDPI AG, v. 14, n. 5, p. 101, maio 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md14050101>>.

CRNKOVIC, C. M. *et al.* Calothrixamides a and b from the cultured cyanobacterium *icalothrix/i* sp. UIC 10520. **Journal of Natural Products**, American Chemical Society (ACS), v. 81, n. 9, p. 2083–2090, set. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00432>>.

CUI, J. *et al.* Leptolyngbyolides, cytotoxic macrolides from the marine cyanobacterium *ileptolyngbya/i* sp.: Isolation, biological activity, and catalytic asymmetric total synthesis. **Chemistry – A European Journal**, Wiley, v. 23, n. 35, p. 8500–8509, maio 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/chem.201701183>>.

DADHEECH, P. K. *et al.* Polyphasic characterization of cyanobacteria isolated from desert crusts, and the description of *desertifilum tharense/igen. et sp. nov.* (oscillatoriales). **Phycologia**, Informa UK Limited, v. 51, n. 3, p. 260–270, may 2012.

DEMARQUE, D. P. *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Sci Rep**, Springer Science and Business Media LLC, v. 10, n. 1, jan 2020.

DUHRKOP, K. *et al.* SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. **Nature Methods**, Springer Science and Business Media LLC, v. 16, n. 4, p. 299–302, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>>.

DUHRKOP, K. *et al.* Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. **Nature Biotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 39, n. 4, p. 462–471, nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0740-8>>.

- ELSHAFIE, H. *et al.* Biological investigations of essential oils extracted from three juniperus species and evaluation of their antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford University Press (OUP), v. 129, n. 5, p. 1261–1271, jun. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jam.14723>>.
- EPOLE, N. *et al.* Artemia species: An important tool to screen general toxicity samples. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, 04 2020.
- FADHOLLY, A. *et al.* Cytotoxic effect of iallium cepa/i l. extract on human colon cancer (WiDr) cells: iin vitro/i study. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, A and V Publications, v. 12, n. 7, p. 3483, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.5958/0974-360x.2019.00591.2>>.
- FARROKH, P. *et al.* Cyanobacteria as an eco-friendly resource for biofuel production: A critical review. **Biotechnology Progress**, Wiley, v. 35, n. 5, maio 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/btpr.2835>>.
- FERRÃO-FILHO, A. da S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals. **Marine Drugs**, MDPI AG, v. 9, n. 12, p. 2729–2772, dez. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md9122729>>.
- GAO, G. *et al.* Marine antitumor peptide dolastatin 10: Biological activity, structural modification and synthetic chemistry. **Marine Drugs**, v. 19, p. 363, 6 2021. ISSN 1660-3397.
- GARG, R.; MALDENER, I. The formation of spore-like akinetes: A survival strategy of filamentous cyanobacteria. **Microbial Physiology**, S. Karger AG, v. 31, n. 3, p. 296–305, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000517443>>.
- GHEDA, S. F.; ISMAIL, G. A. Natural products from some soil cyanobacterial extracts with potent antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, 2020. ISSN 1678-2690.
- GRABOWSKA, K. *et al.* Multidirectional anti-melanoma effect of galactolipids (MGDG-1 and DGDG-1) from *impatiens parviflora* DC. and their synergy with doxorubicin. **Toxicology in Vitro**, Elsevier BV, v. 76, p. 105231, out. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105231>>.
- GUL Ülküye D.; ŞENOL, Z. M.; TAŞTAN, B. E. Treatment of the allura red food colorant contaminated water by a novel cyanobacterium *idesertifilum tharense/i*. **Water Science and Technology**, IWA Publishing, v. 85, n. 1, p. 279–290, dec 2021.
- HAMIDI, M.; JOVANOVA, B.; PANOVSKA, T. K. Toxicological evaluation of the plant products using brine shrimp (*artemia salina* l.) model. **Macedonian Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, p. 9–18, 04 2014.
- HELFRICH, E. J. N. *et al.* Automated structure prediction of trans-acyltransferase polyketide synthase products. **Nature Chemical Biology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 15, n. 8, p. 813–821, jul. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41589-019-0313-7>>.
- HOCKELMANN, C.; BECHER, P. G.; REUSS, S. H. von; JUTTNER, F. Sesquiterpenes of the geosmin-producing cyanobacterium *calothrix* PCC 7507 and their toxicity to invertebrates. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Walter de Gruyter GmbH, v. 64, n. 1-2, p. 49–55, jun. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/znc-2009-1-209>>.

- HOCKELMANN, C.; JUTTNER, F. Volatile organic compound (VOC) analysis and sources of limonene, cyclohexanone and straight chain aldehydes in axenic cultures of calothrix and plectonema. **Water Science and Technology**, IWA Publishing, v. 49, n. 9, p. 47–54, maio 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.2166/wst.2004.0531>>.
- HUANG, M.; LU, J.-J.; DING, J. Natural products in cancer therapy: Past, present and future. **Natural Products and Bioprospecting**, Springer Science and Business Media LLC, v. 11, n. 1, p. 5–13, jan. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13659-020-00293-7>>.
- INUZUKA, T. *et al.* An inhibitor of the adipogenic differentiation of 3t3-11 cells, yoshinone a, and its analogs, isolated from the marine cyanobacterium leptolyngbya sp. **Tetrahedron Letters**, Elsevier BV, v. 55, n. 49, p. 6711–6714, dez. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.10.032>>.
- JANSSEN, E. M.-L. Cyanobacterial peptides beyond microcystins – a review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. **Water Research**, Elsevier BV, v. 151, p. 488–499, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.048>>.
- JHA, R.; ZI-RONG, X. Biomedical compounds from marine organisms. **Marine Drugs**, v. 2, p. 123–146, 8 2004. ISSN 1660-3397.
- KHEMKA, A.; SARAF, M. Strategic enhancement of desertifilum tharense MSAK01 on dairy wastewater: an integrated approach for remediation and biomass production. **Appl Water Sci**, Springer Science and Business Media LLC, v. 7, n. 6, p. 2779–2785, jan 2017.
- KIM, S.-H. *et al.* Effects of light intensity and nitrogen starvation on glycerolipid, glycerophospholipid, and carotenoid composition in dunaliella tertiolecta culture. **PLoS ONE**, Public Library of Science (PLoS), v. 8, n. 9, p. e72415, set. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072415>>.
- KINI, S.; DIVYASHREE, M.; MANI, M. K.; MAMATHA, B. S. **Algae and cyanobacteria as a source of novel bioactive compounds for biomedical applications**. [S.l.]: Elsevier, 2020. 173-194 p.
- KOBAYASHI, K.; YOSHIHARA, A.; KUBOTA-KAWAI, H. Evolutionary implications from lipids in membrane bilayers and photosynthetic complexes in cyanobacteria and chloroplasts. **The Journal of Biochemistry**, Oxford University Press (OUP), jul. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jb/mvad058>>.
- KOMÁREK, J.; AZEVEDO, M. T. de P. Geitlerinema unigranulatum, a common tropical cyanoprokaryote from freshwater reservoirs in brazil. **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes**, Schweizerbart, v. 99, p. 39–52, set. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1127/algol_stud/99/2000/39>.
- KOMAREK, J.; KATOYSKY, J.; MARE, J.; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, 2014.
- LAWTON, L. A. *et al.* Laboratory analysis of cyanobacterial toxins and bioassays. In: **Toxic Cyanobacteria in Water**. [S.l.]: CRC Press, 2021. p. 745–800.
- LE, V. V. *et al.* Microcystis colony formation: Extracellular polymeric substance, associated microorganisms, and its application. **Bioresource Technology**, Elsevier BV, v. 360, p. 127610, set. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127610>>.

- MAEDA, N.; MATSUBARA, K.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. Anti-cancer effect of spinach glycoglycerolipids as angiogenesis inhibitors based on the selective inhibition of DNA polymerase activity. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Bentham Science Publishers Ltd., v. 11, n. 1, p. 32–38, jan. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/138955711793564042>>.
- MATEO, P. *et al.* Life cycle as a stable trait in the evaluation of diversity of nostoc from biofilms in rivers. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford University Press (OUP), v. 76, n. 2, p. 185–198, jan. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01040.x>>.
- MEDINA, R. A. *et al.* Coibamide a, a potent antiproliferative cyclic depsipeptide from the panamanian marine cyanobacterium *ileptolyngbya/i* sp. **Journal of the American Chemical Society**, American Chemical Society (ACS), v. 130, n. 20, p. 6324–6325, abr. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja801383f>>.
- MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimers Dement. (N. Y.)**, v. 3, n. 4, p. 651–657, nov. 2017.
- MOON, S. S.; CHEN, J. L.; MOORE, R. E.; PATTERSON, G. M. L. Calophycin, a fungicidal cyclic decapeptide from the terrestrial blue-green alga *calothrix fusca*. **The Journal of Organic Chemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 57, n. 4, p. 1097–1103, fev. 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jo00030a013>>.
- MORADI, S. *et al.* Effects of spirulina supplementation on obesity: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Complementary Therapies in Medicine**, Elsevier BV, v. 47, p. 102211, dez. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102211>>.
- MURAKAMI, N. *et al.* Studies on glycolipids. iii. glyceroglycolipids from an axenically cultured cyanobacterium, *phormidium tenue*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 2277–2281, 1991. ISSN 0009-2363.
- NEUPANE, J. B. *et al.* Characterization of leptazolines a–d, polar oxazolines from the cyanobacterium *ileptolyngbya/i* sp., reveals a glitch with the “willoughby–hoye” scripts for calculating NMR chemical shifts. **Organic Letters**, American Chemical Society (ACS), v. 21, n. 20, p. 8449–8453, out. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b03216>>.
- NEUPANE, J. B. *et al.* Characterization of leptazolines a–d, polar oxazolines from the cyanobacterium *ileptolyngbya/i* sp., reveals a glitch with the “willoughby–hoye” scripts for calculating NMR chemical shifts. **Organic Letters**, American Chemical Society (ACS), v. 21, n. 20, p. 8449–8453, out. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b03216>>.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J. Nat. Prod.**, American Chemical Society (ACS), v. 83, n. 3, p. 770–803, mar 2020.
- NOTHIAS, L.-F. *et al.* Bioactivity-based molecular networking for the discovery of drug leads in natural product bioassay-guided fractionation. **Journal of Natural Products**, v. 81, p. 758–767, 4 2018. ISSN 0163-3864.
- NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; STAPPEN, G. V. Use of the genus *artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, Elsevier BV, v. 144, n. 2, p. 453–462, nov. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.037>>.

OKUMU, M. O. *et al.* Artemia salina as an animal model for the preliminary evaluation of snake venom-induced toxicity. **Toxicon**, **X**, v. 12, p. 100082, 2021. ISSN 2590-1710. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590171021000187>>.

O'SHEA, K.; MISRA, B. B. Software tools, databases and resources in metabolomics: updates from 2018 to 2019. **Metabolomics**, Springer Science and Business Media LLC, v. 16, n. 3, mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11306-020-01657-3>>.

OZAKI, K. *et al.* Isolation and total synthesis of mabuniamide, a lipopeptide from an iokeania/i sp. marine cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, American Chemical Society (ACS), v. 82, n. 10, p. 2907–2915, set. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00749>>.

PHAM, J. V. *et al.* A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media SA, v. 10, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404>>.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, FapUNIFESP (SciELO), v. 25, p. 45–61, maio 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000800009>>.

PLUSKAL, T.; CASTILLO, S.; VILLAR-BRIONES, A.; OREŠIČ, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, Springer Science and Business Media LLC, v. 11, n. 1, jul 2010.

PRICE, S.; KUZHIUMPARAMBIL, U.; PERNICE, M.; RALPH, P. J. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate for sustainable bioplastic production: Critical review and perspectives. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 4, p. 104007, 2020. ISSN 2213-3437. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343720303559>>.

PYE, C. R. *et al.* Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 114, n. 22, p. 5601–5606, maio 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1614680114>>.

QUINN, R. A. *et al.* Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, Elsevier BV, v. 38, n. 2, p. 143–154, fev. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.011>>.

RICKARDS, R. W. *et al.* Calothrixins a and b, novel pentacyclic metabolites from calothrix cyanobacteria with potent activity against malaria parasites and human cancer cells. **Tetrahedron**, Elsevier BV, v. 55, n. 47, p. 13513–13520, nov. 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0040-4020\(99\)00833-9](https://doi.org/10.1016/s0040-4020(99)00833-9)>.

SAINI, D. K.; PABBI, S.; SHUKLA, P. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. **Food and Chemical Toxicology**, Elsevier BV, v. 120, p. 616–624, out. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.002>>.

SÁNCHEZ-BARACALDO, P.; CARDONA, T. On the origin of oxygenic photosynthesis and cyanobacteria. **New Phytologist**, Wiley, v. 225, n. 4, p. 1440–1446, nov. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/nph.16249>>.

SANT'ANNA, C. L.; BRANCO, L. H. Z.; JÚNIOR, W. A. G.; WERNER, V. R. Lista de cyanobacteria do estado de são paulo. **Biota Neotropica**, FapUNIFESP (SciELO), v. 11, n. suppl 1, p. 455–495, dez. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1676-06032011000500017>>.

SCHRIMPE-RUTLEDGE, A. C.; CODREANU, S. G.; SHERROD, S. D.; MCLEAN, J. A. Untargeted metabolomics strategies—challenges and emerging directions. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, American Chemical Society (ACS), v. 27, n. 12, p. 1897–1905, sep 2016.

SHANNON, P. *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, Cold Spring Harbor Laboratory, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, nov. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/gr.1239303>>.

SILVA, D. H. B. d. Doutor em Ciência, **Estudo ecofisiológico e prospecção de cianobactérias: crescimento, fotossíntese e composição bioquímica relacionados ao controle de fatores abióticos**. 2022. 116 f.

Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. **SiBBr em números**. 2023. Acesso em: 26 de set. de 2023. Disponível em: <<https://dashboard.sibbr.gov.br/dashboard/>>.

SOLIS, P. *et al.* A microwell cytotoxicity assay using artemia salina (brine shrimp). **Planta Medica**, v. 59, p. 250–252, 6 1993. ISSN 0032-0943.

SONOBE, H. G.; LAMPARELLI, M. C.; CUNHA, D. G. F. Avaliação espacial e temporal de aspectos sanitários de reservatórios com captação de água para abastecimento em SP com ênfase em cianobactérias e cianotoxinas. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, FapUNIFESP (SciELO), v. 24, n. 5, p. 909–918, out. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1413-41522019193351>>.

SOROKINA, M.; STEINBECK, C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. **J Cheminform**, Springer Science and Business Media LLC, v. 12, n. 1, apr 2020.

SVIRĀEV, Z. *et al.* Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. **Archives of Toxicology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 93, n. 9, p. 2429–2481, jul. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>>.

TANVIR, R. U.; HU, Z.; ZHANG, Y.; LU, J. Cyanobacterial community succession and associated cyanotoxin production in hypereutrophic and eutrophic freshwaters. **Environmental Pollution**, Elsevier BV, v. 290, p. 118056, dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118056>>.

THORNBURG, C. C. *et al.* Cyclic depsipeptides, grassypeptolides d and e and ibu-epidemethoxylyngbyastatin 3, from a red sea ileptolyngbya/i cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, American Chemical Society (ACS), v. 74, n. 8, p. 1677–1685, ago. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/np200270d>>.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLANZI, V. S. The potential contribution of the natural products from brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, FapUNIFESP (SciELO), v. 90, n. 1 suppl 1, p. 763–778, abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>>.

VINING, O. B. *et al.* Depsipeptide companionamides from a panamanian marine cyanobacterium associated with the coibamide producer. **Journal of Natural Products**, American Chemical Society (ACS), v. 78, n. 3, p. 413–420, jan. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/np5007907>>.

WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking. **Nature Biotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 34, n. 8, p. 828–837, ago. 2016.

WISHART, D. S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. **Nat Rev Drug Discov**, Springer Science and Business Media LLC, v. 15, n. 7, p. 473–484, mar 2016.

YANG, J. Y. *et al.* Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, American Chemical Society (ACS), v. 76, n. 9, p. 1686–1699, set. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/np400413s>>.

YOSHIHARA, A.; KOBAYASHI, K. Lipids in photosynthetic protein complexes in the thylakoid membrane of plants, algae, and cyanobacteria. **Journal of Experimental Botany**, Oxford University Press (OUP), v. 73, n. 9, p. 2735–2750, fev. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jxb/erac017>>.

ZHANG, C.-C. *et al.* Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. **Molecular Microbiology**, Wiley, v. 59, n. 2, p. 367–375, nov. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04979.x>>.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Comparação do espectro MS2 de m/z 959,5740, anotado como DGDG pelo GNPS

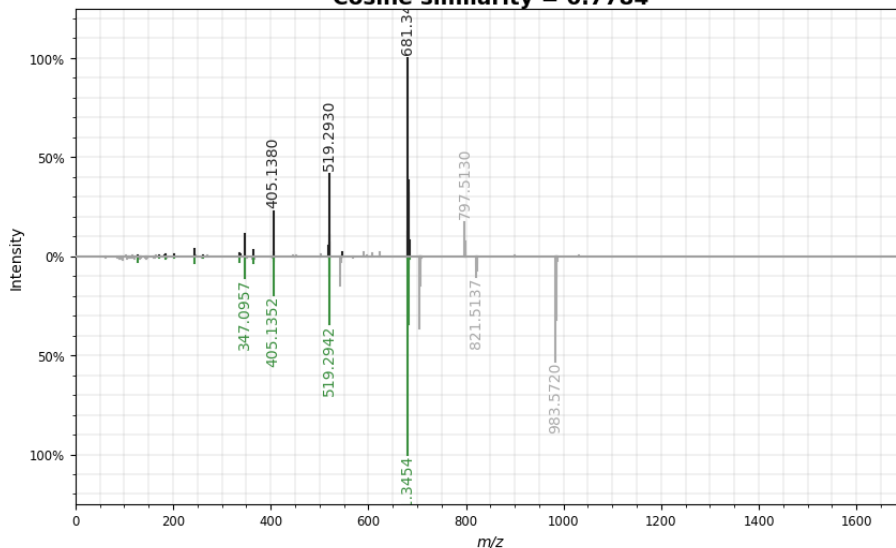
Top: mzspect:GNPS:TASK-0d8437335a23477894f7cc7b4184183a-spectra/specs_ms.mgf:scan:11961

Precursor m/z : 959.5740 Charge: 1

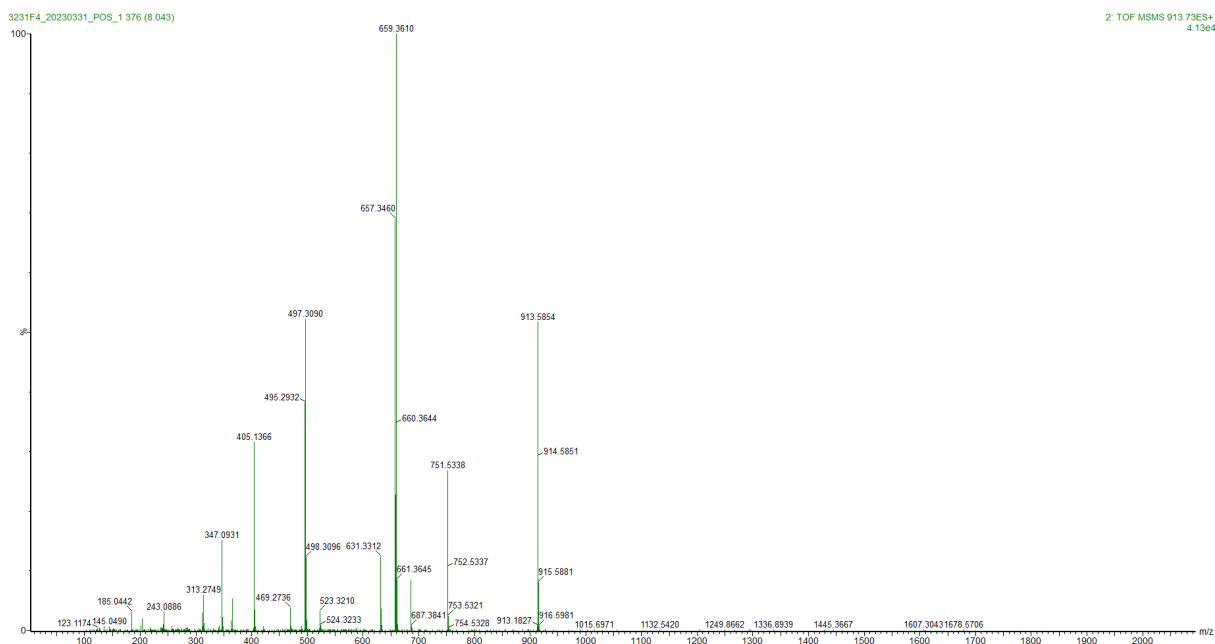
Bottom: mzspect:GNPS:GNPS-LIBRARY:accession:CCMSLIB00005723379

Precursor m/z : 983.6940 Charge: 0

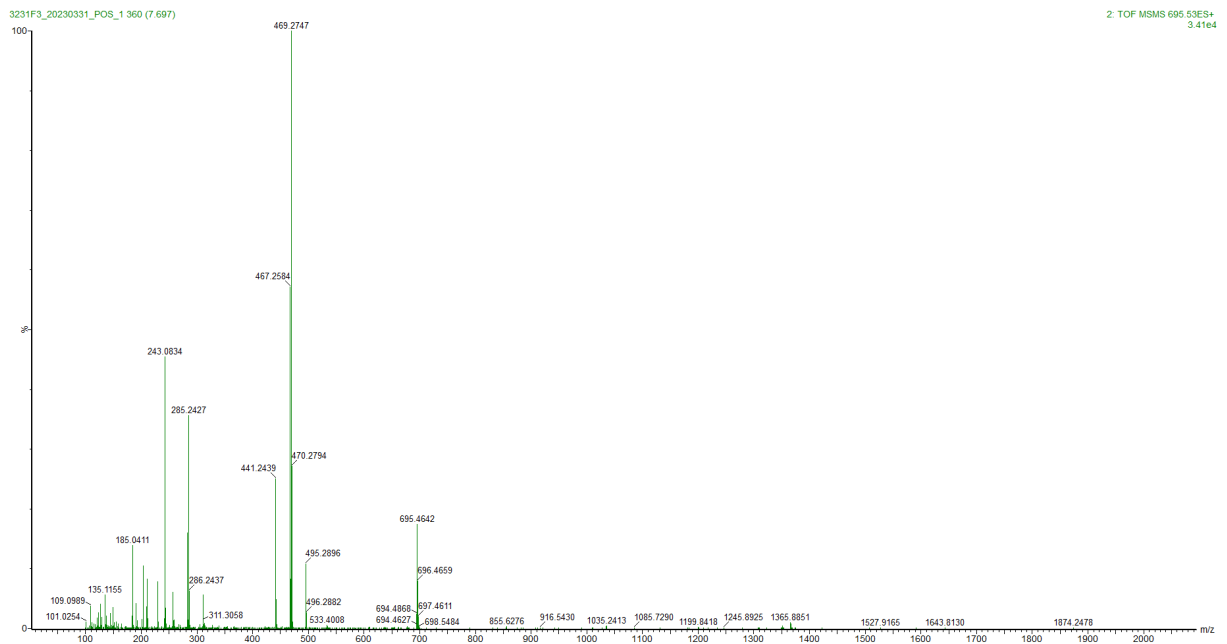
Cosine similarity = 0.7784



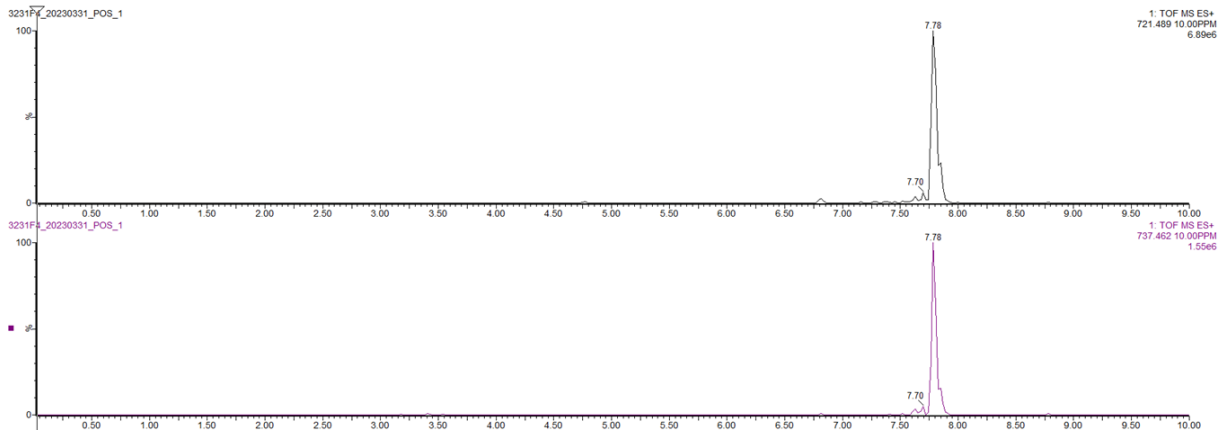
Apêndice 2 - Padrão de fragmentação do íon de m/z 913,5862 $[M+Na]^+$ de fórmula molecular $C_{47}H_{86}O_{15}Na^+$



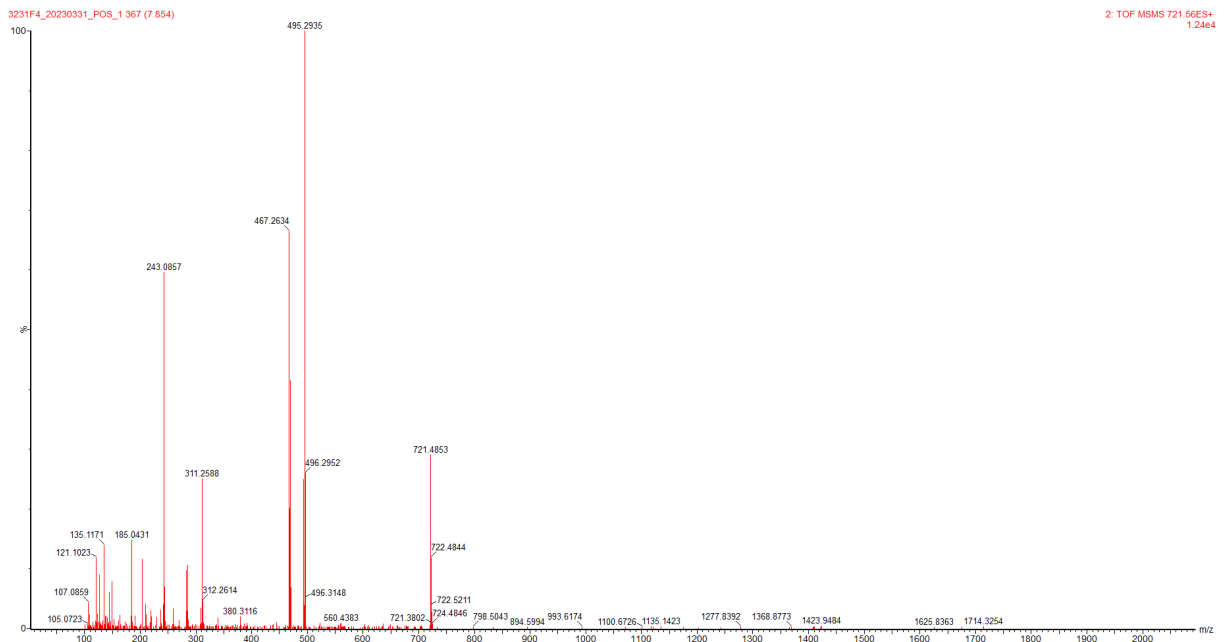
Apêndice 5 - Padrão de fragmentação do íon de m/z 695,4768 $[M+Na]^+$ de fórmula molecular $C_{37}H_{68}O_{10}Na^+$



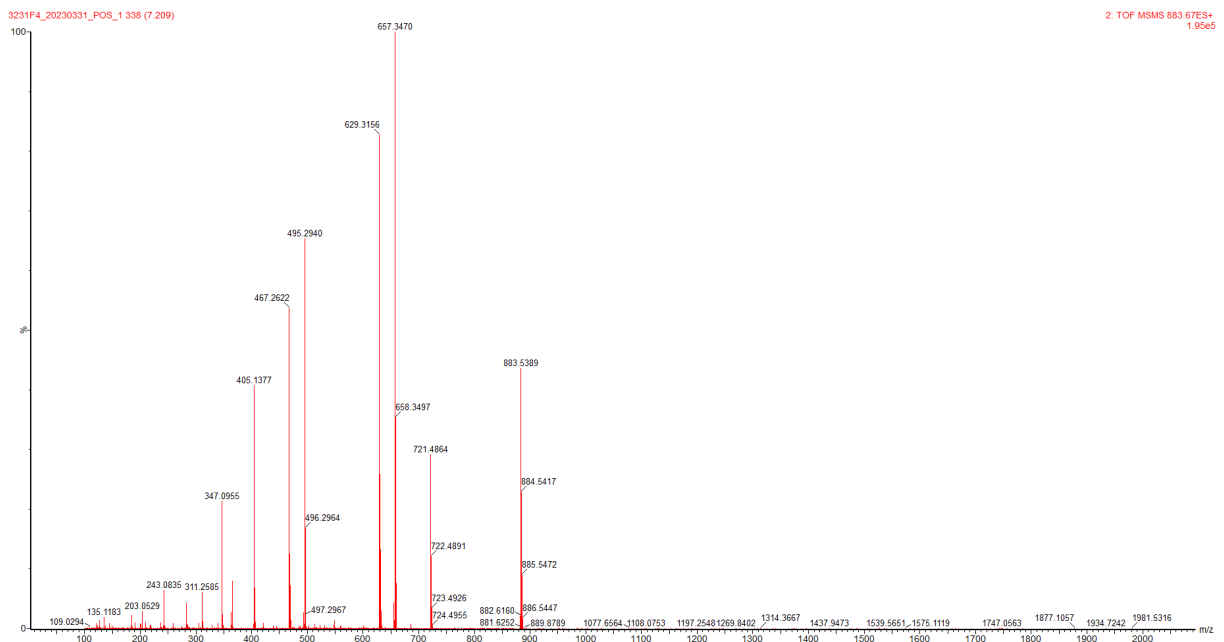
Apêndice 6 - Cromatograma de íons extraídos de *features* com m/z 737,4616 e 721,4887



Apêndice 7 - Padrão de fragmentação do íon de m/z 737,4612 $[M+K]^+$ de fórmula molecular $C_{36}H_{74}O_{10}SK^+$



Apêndice 8 - Padrão de fragmentação do íon de m/z 883,5400 $[M+Na]^+$ de fórmula molecular $C_{45}H_{80}O_{15}Na^+$



Apêndice 9 - Classificação da classe química realizada pelo SIRIUS do íon de m/z 913,5862 $[M+Na]^+$ apontando-o como um análogo de glicosildiaglicerol

Main Classes

Level 6: Glycosyldiacylglycerols ⇒ Level 5: Glycosyldiradylglycerols ⇒ Subclass: Glycosylglycerols ⇒ Class: Glycerolipids ⇒ Superclass: Lipids and lipid-like molecules ⇒ Kingdom: Organic compounds

Description
This compound belongs to the class Glycosyldiacylglycerols, which describes diacylglycerols that carry a saccharide moiety linked to the glycerol.

Alternative Classes

Lineolic acids and derivatives, Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides, Disaccharides, O-glycosyl compounds, Fatty acid esters, Dicarboxylic acids and derivatives, Oxanes, Carboxylic acid esters, Secondary alcohols, Acetals, Polyols, Primary alcohols, Oxacyclic compounds, Carbonyl compounds, Hydrocarbon derivatives, Organic oxides

Natural Product Classes

Glycosyldiacylglycerols (class), Glycerolipids (Superclass), Fatty acids (Pathway)

Apêndice 10 - Classificação da classe química realizada pelo SIRIUS do íon de m/z 711,4442 $[M+K]^+$ apontando-o como um análogo de glicosildiaglicerol

Main Classes

Level 6: Glycosyldiacylglycerols ⇒ Level 5: Glycosyldiradylglycerols ⇒ Subclass: Glycosylglycerols ⇒ Class: Glycerolipids ⇒ Superclass: Lipids and lipid-like molecules ⇒ Kingdom: Organic compounds

Description
This compound belongs to the class Glycosyldiacylglycerols, which describes diacylglycerols that carry a saccharide moiety linked to the glycerol.

Alternative Classes

Lineolic acids and derivatives, Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides, Hexoses, O-glycosyl compounds, Fatty acid esters, Dicarboxylic acids and derivatives, Oxanes, Carboxylic acid esters, Secondary alcohols, Acetals, Polyols, Primary alcohols, Oxacyclic compounds, Carbonyl compounds, Hydrocarbon derivatives, Organic oxides

Natural Product Classes

Glycosyldiacylglycerols (class), Glycerolipids (Superclass), Fatty acids (Pathway)

Apêndice 11 - Classificação da classe química realizada pelo SIRIUS do íon de m/z 737,4616 $[M+K]^+$ apontando-o como um análogo de glicosildiaglicerol

Main Classes

Level 5: Glycosyldiradylglycerols ⇒ Subclass: Glycosylglycerols ⇒ Class: Glycerolipids ⇒ Superclass: Lipids and lipid-like molecules ⇒ Kingdom: Organic compounds

Description
This compound belongs to the class Glycosyldiradylglycerols, which describes glycosylglycerols that carry exactly two acyl chains attached to the glycerol moiety.

Alternative Classes

Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides, Hexoses, O-glycosyl compounds, Fatty acid esters, Oxanes, Organosulfonic acids and derivatives, Sulfonyls, Carboxylic acid esters, Secondary alcohols, Acetals, Polyols, Primary alcohols, Oxacyclic compounds, Carbonyl compounds, Hydrocarbon derivatives, Organic oxides

Natural Product Classes

Glycosyldiacylglycerols (class), Glycerolipids (Superclass), Fatty acids (Pathway)

Apêndice 12 - Classificação da classe química realizada pelo SIRIUS do íon de m/z 883,5400 $[M+Na]^+$ apontando-o como um análogo de glicosildiaglicerol

Main Classes

Subclass: Glycosylglycerols ⇒ Class: Glycerolipids ⇒ Superclass: Lipids and lipid-like molecules ⇒ Kingdom: Organic compounds

Description
This compound belongs to the class Glycosylglycerols, which describes glycerolipids structurally characterized by the presence of one or more sugar residues attached to glycerol via a glycosidic linkage.

Alternative Classes

Alkyl glycosides, Disaccharides, O-glycosyl compounds, Fatty acid esters, Oxanes, Carboxylic acid esters, Secondary alcohols, Acetals, Polyols, Primary alcohols, Oxacyclic compounds, Monocarboxylic acids and derivatives, Carbonyl compounds, Hydrocarbon derivatives, Organic oxides

Natural Product Classes

Glycerolipids (Superclass), Fatty acyl glycosides (Superclass), Fatty acids (Pathway)