UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

LEONARDO ZAMBOTTI VILLELA

Metabolômica de algas expostas a metais

Versão original da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

23/02/2017

LEONARDO ZAMBOTTI VILLELA

Metabolômica de algas expostas a metais

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientador (a): Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo

2017

**A minha esposa Roberta, cujo sentimento é
e sempre será especial. Uma pessoa que me
apoia e sempre esteve próxima nos
momentos de dificuldade**

**Aos meus pais, que sempre estiveram
juntos, principalmente com conselhos e
muita amizade e amor.**

**Às irmãs Caroline e Isabella, cujas
presenças na minha vida são fundameintais,
pois trazem alegrias e descontrações.**

**A todos os meus familiares, que são muito
especiais e sempre proporcionaram
momentos feliz.**

**À família da minha esposa, em especial ao
meu grande amigo Alessandro (*in memorian*)**

**A todos os amigos do laboratório de
Bioquímica e Biologia Molecular de Algas
do IQ.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Pio Colepicolo, que proporcionou toda a infraestrutura e financiamento necessário para conduzir a pesquisa. Também por ter sido um ótimo tutor durante o trabalho.

Ao Dr. Luiz Fernando Mendes, que auxiliou em todos os momentos de dúvidas experimentais, além da ajuda dada no desenvolvimento lógico do trabalho.

À MSc. Cintia Simas Rodrigues dos Santos, pessoa que auxiliou no cultivo das algas e teve participação importante na elaboração conjunta do projeto.

Ao Dr. Eliezer Stefanello, que implantou a metodologia de metabolômica utilizada no trabalho.

Aos técnicos de laboratório Ednailson Pereira de Carvalho e Sandra Regina de Souza.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao CNPq, que proporcionaram o financiamento da pesquisa realizada.

Ao programa PROCONTES da Universidade de São Paulo.

RESUMO

Villela, L.Z. **Metabolômica de algas expostas a metais**. 2017. 90p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O uso da metabolômica ambiental tem sido usada para avaliar a interação dos organismos com o ambiente. Apesar do alto impacto que os metais têm no ambiente, essa abordagem analítica ainda está em seu início, em especial para as macroalgas. Como membro do primeiro nível trófico da cadeia alimentar marinha, fornecendo nutrientes e microelementos para os níveis superiores, as macroalgas são um alvo apropriado tanto para o desenvolvimento de ensaios toxicológicos quanto como bioindicador de degradação do ambiente marinho. Também por causa da sua posição na cadeia alimentar, essas macrófitas são consideradas o principal vetor para a magnificação desses elementos tóxicos. Os efeitos tóxicos dos metais sobre o ambiente aquático são documentados e bem conhecidos, mas relacionam principalmente ao desbalanço do potencial redox intracelular e, assim, o estresse oxidativo em organismos vivos. Com o objetivo de compreender a relação das macroalgas com o metal essencial Cu^{2+} e o metal não essencial Cd^{2+} , a macroalga vermelha *Gracilaria domingensis* foi selecionada. Após 48h de exposição aos metais em águas do mar sintética e natural, as amostras foram extraídas e analisadas em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Em seguida, os dados foram pré-processados e pré-tratados para serem utilizados nas análises estatísticas multivariadas (AEM) de PCA e OPLS-DA. A *G. domingensis* exposta aos metais em água do mar sintética não foram significativamente influenciadas, como indicado pela MVA e pela análise de vias. Apesar disso, alterações significativas foram

observadas na exposição aos metais em água do mar natural. Os principais resultados para o Cu^{2+} foram a interação do metabolismo de glicina, serina e treonina com o metabolismo de glioxilato e dicarboxilato. Foi sugerido que a macroalga poderia estar alterando o modo de adquirir carbono para uma via não fotossintetizante, uma vez que essa via está prejudicada na exposição ao metal. Também, o metabolismo de fenilalanina foi impactado por essa exposição, uma vez que é uma via fundamental para sintetizar compostos fenólicos antioxidantes. Por outro lado, apesar de oito vias terem sido identificadas como significativamente alteradas na exposição ao Cd^{2+} , somente o metabolismo de arginina e prolina parece ter sido significativamente influenciado com o objetivo de produzir prolina, um aminoácido reconhecido por suas propriedades antioxidantes e protetoras em organismos estressados por metais. Em conclusão, os metais essenciais e não essenciais parecem ter mecanismos diferentes na tentativa de promover o combate aos danos gerados pela exposição aos metais.

Palavras-chave: Espectrometria de Massas, *Gracilaria domingensis*, Metabolismo Primário, Metabolômica, Metais.

ABSTRACT

Villela, L.Z. **Metabolomics of algae exposed to metals**. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The environmental metabolomics approach has been used to evaluate the interaction of organisms with their environment. Besides the high impact metals have on the environment, this method of analysis is still in its infancy, in special for macroalgae. As members of the first trophic level in the marine food chain, providing nutrients and microelements to upper levels, macroalgae are appropriate target organisms both for the development of toxicological assays and as a bioindicator of marine degradation. Also, because of their marine food chain position, these macrophytes are considered the main vectors to magnify these toxic elements. The toxic effects of metals on the aquatic environment are documented and well known, but regards mainly to the unbalance of intracellular redox potential and, therefore, oxidative stress in living organisms. In order to understand the relationship of macroalgae with the essential metal Cu^{2+} and the non-essential metal Cd^{2+} , the red macroalga *Gracilaria domingensis* was chosen. After 48h of metal exposure in synthetic and natural seawater, the samples were extracted and analysed in gas chromatograph coupled to mass spectrometry. Afterward, the data were preprocessed and pretreated for the multivariate analysis (MVA) with PCA and OPLS-DA statistics. *G. domingensis* exposed to metals in synthetic seawater were not significantly affected, as indicated by MVA and pathway analysis. Though, significant changes were observed on exposure to metals in natural seawater. The main results for Cu^{2+} were the interlay of glycine, serine and threonine metabolism with glyoxylate and dicarboxylate metabolism. It was suggested that the macroalga could be shifting the metabolism to

acquire carbon from a non-photosynthetic pathway, since it is injured on metal exposure. Also, phenylalanine metabolism was impacted by this metal exposure, since it is a pivotal source of phenolic antioxidant compounds. On the other hand, besides eight pathways were identified as significantly changed on Cd²⁺ exposure, only arginine and proline metabolism seemed to be significantly affected, in order to produce proline, known for its antioxidative and protective properties in metal stressed organisms. In conclusion, essential and non essential metals seem to have distinct mechanism to mitigate the damaged caused by metal exposure.

Keywords: *Gracilaria domingensis*, Mass Spectrometry, Metabolomics, Metals, Primary Metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os resultados das amostras de CS. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,005$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p < 0,005$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p = 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,648$) (D).33
- Figura 2. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os resultados das amostras de CN. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,05$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p = 0,853$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p < 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,053$) (D).34
- Figura 3. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os resultados das amostras de CdS. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,005$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p < 0,005$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p < 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,259$) (D).34
- Figura 4. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os dados das amostras de CdN. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,005$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p = 0,006$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p = 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,617$) (D).35
- Figura 5. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os resultados das amostras de CuS. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,005$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p < 0,005$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p < 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,269$) (D).35
- Figura 6. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os resultados das amostras de CuN. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,005$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p < 0,005$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p < 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,192$) (D).36
- Figura 7. Modelos de PCA (*score plot*) de CS vs CdS. Método de dimensionamento: *automático*, PC1 = 53,1% e PC2 = 16,5%. (o) CS, (•) CdS.38
- Figura 8. Modelos de PCA (*score plots*) de CS vs CuS. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, PC1 = 58,2% e PC2 = 17,4%; e (B) de *pareto*, PC1 = 60,4% e PC2 = 16,2%. (o) CS, (•) CuS.39
- Figura 9. Modelos de PCA (*score plots*) de CN vs CdN. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, PC1 = 59,0% e PC2 = 18,7%; e (B) de *pareto*, PC1 = 71,9% e PC2 = 14,5%. (o) CN, (•) CdN.40
- Figura 10. Modelos de PCA (*score plots*) de CN vs CuN. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, PC1 = 70,1%; e (B) de *pareto*, PC1 = 71,9% e PC2 = 7,3%. (o) CN, (•) CuN.41
- Figura 11. Modelos de OPLS-DA (*score plots*) de CuS vs CuS. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, $R^2X(\text{cum}) = 74,3\%$, $R^2(\text{cum}) = 92,4\%$, $Q^2(\text{cum}) = 82,6\%$ e $R^2(Y) = 100\%$; (B) *pareto*, $R^2X(\text{cum}) = 60,3\%$, $R^2(\text{cum}) = 88\%$, $Q^2(\text{cum}) = 84,5\%$ e $R^2(Y) = 100\%$. (o) CS, (•) CuS.43
- Figura 12. Modelos de OPLS-DA (*score plots*) de CN vs CdN. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, $R^2X(\text{cum}) = 77,5\%$, $R^2(\text{cum}) = 96,8\%$, $Q^2(\text{cum}) =$

88,4% e $R^2(Y) = 100\%$; (B) *pareto*, $R^2X(\text{cum}) = 63,4\%$, $R^2(\text{cum}) = 96\%$, $Q^2(\text{cum}) = 88,6\%$ e $R^2(Y) = 100\%$. (o) CN, (•) CdN.45

Figura 13. Modelos de OPLS-DA (*score plots*) de CN vs CuN. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, $R^2X(\text{cum}) = 83,2\%$, $R^2(\text{cum}) = 96,2\%$, $Q^2(\text{cum}) = 92,1\%$ e $R^2(Y) = 100\%$; (B) *pareto*, $R^2X(\text{cum}) = 86,3\%$, $R^2(\text{cum}) = 96,3\%$, $Q^2(\text{cum}) = 91,2\%$ e $R^2(Y) = 100\%$. (o) CN, (•) CuN.47

Figura 14. Estratégia para a identificação de variáveis discriminantes para CS vs CuS. (A) *S-plot*: 23 metabólitos foram selecionados por estarem na área de baixo risco do gráfico; (B) *Loading plot* com intervalo de confiança tipo *jack-knifed*. As barras cinza indicam que os metabólitos foram excluídos.49

Figura 15. Estratégia para a identificação de variáveis discriminantes para CN vs CdN. (A) *S-plot*: 18 metabólitos foram selecionados por estarem nas áreas de baixo risco do gráfico; (B) *Loading plot* com intervalo de confiança tipo *jack-knifed*. As barras cinza indicam que os metabólitos foram excluídos.50

Figura 16. Estratégia para a identificação de variáveis discriminantes para CN vs CuN. (A) *S-plot*: 23 metabólitos foram selecionados por estarem nas áreas de baixo risco do gráfico; (B) *Loading plot* com intervalo de confiança tipo *jack-knifed*. A barra cinza indica o metabólito que foi excluído.52

Figura 17. Visão global da análise das vias metabólicas alteradas na comparação CS vs CuS. O gráfico mostra todas as 32 vias metabólicas do KEGG dispostas de acordo com os *scores* a partir das análises de enriquecimento [eixo y: $-\ln(p)$] e topologia (eixo x: impacto na via, i.e., soma das medidas de importância dos metabólitos identificados normalizados pela soma da importância de todos os metabólitos da via []). As identificações das vias estão na Tabela 5.54

Figura 18. Visão global da análise das vias metabólicas alteradas na comparação CN vs CuN. O gráfico mostra todas as 37 vias metabólicas do KEGG dispostas de acordo com os *scores* a partir das análises de enriquecimento [eixo y: $-\ln(p)$] e topologia (eixo x: impacto na via, i.e., soma das medidas de importância dos metabólitos identificados normalizados pela soma da importância de todos os metabólitos da via [60]). As identificações das vias estão na Tabela 5.56

Figura 19. Visão global da análise das vias metabólicas alteradas na comparação CN vs CdN. O gráfico mostra todas as 26 vias metabólicas do KEGG dispostas de acordo com os *scores* a partir das análises de enriquecimento [eixo y: $-\ln(p)$] e topologia (eixo x: impacto na via, i.e., soma das medidas de importância dos metabólitos identificados normalizados pela soma da importância de todos os metabólitos da via [60]). As identificações das vias estão na Tabela 5.57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Configuração do forno do CG para análise das amostras derivatizadas com MCF.....	27
Tabela 2. Metabólitos identificados por CG-EM, classificação e presença nos grupos experimentais.....	30
Tabela 3. Comparação dos parâmetros de validação dos modelos de OPLS-DA gerados no presente trabalho.	48
Tabela 4. Comparação dos resultados obtidos por <i>S-plot</i> e <i>Loading plot</i> das comparações CS vs CuS, CN vs CuN e CN vs CdN.....	52
Tabela 5. Resultados da análise das vias metabólicas na comparação CS vs CuS. Mostradas as vias com valores de impacto maiores que 0,1 [].	55
Tabela 6. Resultados da análise das vias metabólicas na comparação CN vs CuN. Mostradas as vias com valores de impacto maiores que 0,1 [61].	56
Tabela 7. Resultados da análise das vias metabólicas na comparação CN vs CdN. Mostradas as vias com valores de impacto maiores que 0,1 [61].	58
Tabela 8. Comparação do perfil metabólico das vias alteradas em <i>G. domingensis</i> devido às exposições aos metais Cu ²⁺ e Cd ²⁺ em água do mar natural. As figuras que mostram as vias metabólicas estão no Anexo (Figuras A1 a A11).....	59

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1. Monitoramento da qualidade da água	15
1.2. Biomonitoramento marinho	16
1.3. Metabolômica	21
2. Objetivos	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. Material e Métodos	24
3.1. Condições de cultivo	24
3.1.1. Água do mar sintética	24
3.1.2. Água do mar natural	24
3.2. Soluções de Cu²⁺ e Cd²⁺	25
3.3. Ensaio toxicológico	25
3.4. Metabolômica	25
3.4.1. Preparo das amostras	25
3.4.2. Extração dos metabólitos	26
3.4.3. Derivatização por cloroformiato de metila (MCF)	26
3.4.4. CG-EM	27
3.4.5. Identificação dos metabólitos	27
3.4.6. Análise estatística	28
4. Resultados	30
4.1. Análise dos metabólitos identificados por CG-EM	30
4.2. Pré-tratamento dos dados	31

4.2.1.	Normalização dos resultados	32
4.2.2.	Conversão dos dados	32
4.3.	Visão geral do efeito das exposições aos metais sobre o metaboloma da <i>G. domingensis</i>.....	37
4.4.	Alterações metabólicas da <i>G. domingensis</i> exposta aos metais.....	42
4.4.1.	Modelos gerados pela OPLS-DA	42
4.4.2.	Identificação dos metabólitos relacionados às diferenças entre grupos experimentais.....	48
4.5.	Interpretação funcional dos resultados metabolômicos.....	53
4.5.1.	Efeito do metal Cu ²⁺ sobre as vias metabólicas da <i>G. domingensis</i> cultivada em água do mar sintética	54
4.5.2.	Efeito dos metais Cu ²⁺ e Cd ²⁺ sobre as vias metabólicas da <i>G. domingensis</i> cultivada em água do mar natural.....	55
5.	Discussão	60
5.1.	Possível atividade coordenada do metabolismo de glicina, serina e treonina com o ciclo de glioxilato e dicarboxilato	62
5.1.1.	Efeito do Cu ²⁺ no metabolismo da fenilalanina	64
5.1.2.	Efeito do Cd ²⁺ no metabolismo de arginina e prolina	64
6.	Conclusão.....	67
7.	Referências Bibliográficas	68

1. Introdução

1.1. *Monitoramento da qualidade da água*

O ecossistema aquático é o receptor de muitos poluentes, como metais (*e.g.*, Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} e Hg^{2+}) (Mendes et al., 2012; Goeman et al., 2016), compostos químicos orgânicos (*e.g.*, bifenilos policlorados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) e poluentes emergentes (*e.g.* princípios ativos de medicamentos e seus metabólitos), seja via escoamento direto de efluentes domésticos e atividades econômicas, seja via processos hidrológicos e atmosféricos (van der Oost; Beyer; Vermeulen, 2003). Destes, as atividades antropogênicas são a parte principal do processo de degradação do ecossistema e comprometem toda a comunidade biótica do planeta.

Isso remete à necessidade de rotineiramente serem conduzidos monitoramentos do ecossistema aquático, os quais, em geral, são realizados por duas abordagens. A primeira destina-se às análises químicas que resultam em informações como a fonte potencial de poluição e a qualidade da água no momento da coleta, enquanto a segunda destina-se ao monitoramento biológico (biomonitoramento), o qual pode utilizar as respostas bioquímicas e fisiológicas (biomarcadores) e os testes de ecotoxicidade (*e.g.* crescimento, sobrevivência e reprodução – bioensaios) em organismos expostos ao poluente (van der Oost; Beyer; Vermeulen, 2003). Interpretar a relação entre os resultados de biomarcadores e bioensaios, em complemento aos resultados das análises químicas, é fundamental para a composição de uma avaliação de risco ambiental (van Gestel; van Brummelen, 1996).

1.2. Biomonitoramento marinho

Estima-se que 80% de toda a poluição que chega as zonas costeira e marinha se originam das atividades industriais, agrícolas, urbanas e rurais (Hildering; Keesen; van Rijswick, 2009). Portanto, o ecossistema marinho é um receptor final de poluentes e, dada a característica transfronteiriça desse ambiente, estes podem impactar áreas intra- e transnacionais, por serem potencialmente transportados por longas distâncias (Tiquio; Marmier; Francour, 2017).

A fim de realizar o biomonitoramento, alguns organismos da fauna e da flora marinha têm sido utilizados em testes de ecotoxicidade. A bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* teve a sua bioluminescência inibida por metabólitos intermediários da degradação do antihipertensivo propranolol, enquanto o teste de desenvolvimento embriolarval (24-28h) apontou toxicidade do também antihipertensivo valsartan ao ouriço marinho *Lytechinus variegatus* (Godoy; Kummrow; Pamplin, 2015). Os nanomateriais foram recentemente reconhecidos como poluentes, cujas toxicidades necessitam ser urgentemente aferidas e caracterizadas em razão da rápida expansão do uso. Os poucos estudos existentes já evidenciaram a toxicidade das nanopartículas de ZnO ao molusco *Mytilus galloprovincialis* (Muller et al., 2014) e à microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* (Aravantinou et al., 2015); as nanopartículas de Ag seguiram o mesmo resultado final em testes com o crustáceo *Artemia franciscana* (Jemec et al., 2016). Para os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, a toxicidade do alquilfenantreno já foi observada em embriões do peixe *Oryzias melastigma* (Mu et al., 2016) e os benz(a)antraceno e fluoranteno foram tóxicos para as microalgas *Alexandrium catenella*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *D. tertiolecta*, *Picochlorum* sp. e *Nannochloris* sp. (Othman et al., 2012).

Outros poluentes que recebem significativa atenção são os metais. Eles são resistentes à biodegradação e se acumulam ao longo da cadeia alimentar, podendo persistir no meio ambiente por centenas de anos, tornando-o em uma fonte crônica de contaminação que representa riscos à saúde pública (Nagaiyoti; Lee; Sreekanth, 2010; Filimonova et al., 2016). Além disso, são especialmente susceptíveis às variações de alguns parâmetros da água do mar, como o pH, a força iônica, a salinidade e a presença de matéria orgânica, todas capazes de influenciar a biodisponibilidade da espécie metálica, i.e., variações capazes de alterar a toxicidade dos metais (Machado et al., 2016). Além dos efeitos negativos sobre o meio ambiente, como a redução da diversidade biológica e a alteração de habitats, a degradação de áreas costeiras afeta mundialmente as atividades econômicas (Tiquio; Marmier; Francour, 2017; Islam; Tanaka, 2014).

Algumas fontes de contaminação podem ser destacadas para os metais, que atingem o ambiente marinho via escoamento para os rios, contaminação dos lençóis freáticos e ao serem descarregados diretamente no mar (Machado et al., 2016). Xisto, calcário e arenito ao passarem pelo processo de meteorização são importantes fontes naturais de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+} . Fertilizantes orgânicos e inorgânicos de uso na agricultura; atividades industriais como as têxteis, metalúrgicas, refinamento de petróleo e mineração; e queima de carvão e outros combustíveis fósseis são exemplos de fontes antropogênicas de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} e outros metais (Nagaiyoti; Lee; Sreekanth, 2010).

Em razão dessas características, muitos estudos ecotoxicológicos com os metais têm sido conduzidos em diversos organismos marinhos. A microalga *Thalassiosira weissflogii*, os crustáceos *Acartia tonsa* e *A. Franciscana* (Filomonova et al., 2016), as macroalgas *G. domingensis* e *G. tenuistipitata* (Mendes et al., 2013;

Pinto et al., 2011) e a lentilha d'água *Lemna minor* (Qiao et al., 2015) foram utilizados em bioensaios com metais isolados. A bactéria *Vibrio fischeri* (Fulladosa et al., 2005) e a macroalga *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Mendes et al., 2014) foram expostas a misturas binárias para verificar os efeitos antagonistas, sinérgicos e aditivos de metais.

Dentro do grupo dos metais, existem os denominados essenciais (e.g., Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+}) que são importantes co-fatores de reações bioquímicas, como a fotossíntese e o sistema redox. Enzimas e proteínas como a superóxido dismutase, o citocromo c e a citocromo c oxidase dependem desses metais e os utilizam como co-fatores (Mendes et al., 2013; Marques, 2016). No entanto, ao atingirem concentrações intracelulares que ultrapassam o limiar de tolerância, eles se tornam tóxicos para a espécie contaminada. No caso das macroalgas marinhas, demonstrou-se que esse limiar não é necessariamente espécie-dependente, e se propôs que o histórico da exposição ao Cu^{2+} parece ser um fator importante para determinar a tolerância do organismo ao poluente (Moenne; González; Sáez, 2016).

Encontrado em concentrações traço no cultivo da macroalga marinha *G.* (Mendes et al., 2012), a presença do Cu^{2+} (concentrações superiores a 30 mg L^{-1}) reduziu a taxa de crescimento após 48h de exposição ao metal (Mendes et al., 2013). Na angiosperma marinha *Zostera marina* L., o Cu^{2+} presente no sedimento reduziu significativamente a taxa de crescimento relativa das folhas (Nielsen et al., 2017). Os mesmos efeitos foram observados para outros organismos marinhos, como para as microalgas *Tetraselmis* sp. e *D. tertiolecta* (Levy et al., 2008), o crustáceo *Tigriopus angulatus* Lang (Medina; Morandi; Correa, 2008) e o molusco *Mesodesma mactroides* (Giacomin; Jorge; Bianchini, 2014). Intracelularmente, o excesso de cobre é capaz de competir com os sítios de ligação de Zn^{2+} e Mg^{2+} ,

resultando na inativação de enzimas Zn-dependentes e na inibição da fotossíntese (Moenne; González; Sáez, 2016).

Com a excessão da diatomácea *Thalassiosira weissflogii*, que possui uma anidrase carbônica capaz de putativamente utiliza o Cd^{2+} como co-fator (Lane et al., 2005), esse é um metal não essencial. Em *G. domingensis*, concentrações superiores a $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ reduziram a taxa de crescimento em teste de 48h de exposição (Mendes et al., 2013). Na poliqueta *Nereis diversicolor*, o Cd^{2+} influenciou as atividades enzimáticas antioxidantes e aumentou a peroxidação lipídica (Gomes et al., 2013). Em ensaios de misturas binárias de metais, que avaliam se um metal auxilia (efeito sinérgico) ou compete (efeito antagonista) por sítios de ligação em transportadores transmembrana, observou-se que Zn^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} reduziram o efeito deletério do Cd^{2+} , i.e., apresentaram-se antagonisticamente (Mendes et al., 2014). Corroborando o dado de competição por sítios de ligação em biomoléculas, a inibição da fotoativação em *Chlamydomonas reinhardtii* exposta ao Cd^{2+} mostrou-se principalmente devido à competição por sítios de Ca^{2+} e não de Mn^{2+} no fotossistema II (PSII) (Faller; Kienzler; Krieger-Liszkay, 2005).

O Cu^{2+} , por ser um metal de transição, participa na reação de Haber-Weiss e produz a espécie reativa de oxigênio (ERO) $\cdot\text{OH}$ (radical hidroxil) a partir do $\text{O}_2^{\cdot-}$ (superóxido) e do H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), ao passo que o Cd^{2+} não apresenta capacidade redox, e a produção de EROs é indireta. Ela ocorre, por exemplo, via a redução do *pool* de antioxidantes intracelulares e também ao agir sobre a cadeia transportadora de elétrons na fotossíntese, gerando $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete) (Pinto et al., 2003). Para lidar com essas EROs, que em última instância modificam biomoléculas (e.g., lipídeos e proteínas de membranas celulares, nucleotídeos), os organismos aquáticos apresentam defesas antioxidantes, como atividades

enzimáticas (e.g., superóxido dismutase, glutathione peroxidase e ascorbato peroxidase) e moléculas de baixo peso molecular (e.g., ascorbato, fenóis, carotenóides, glutathione reduzida e fitoquelatinas) (Pinto et al., 2011; Romano et al., no prelo).

Devido à privilegiada posição trófica na base da cadeia alimentar e ao papel indispensável na transformação de energia e ciclagem de nutrientes, as macroalgas possuem um grande potencial para os estudos ecotoxicológicos. Elas têm sido usadas nesses ensaios por agirem como biofiltros de águas contaminadas, absorvendo metais da coluna d'água e os imobilizando em vacúolos (Pavasant et al., 2006; Sheng; Ting; Chen, 2007; Torres et al., 2008; Volterra; Conti, 2000; Pinto et al., 2003). Além disso, são organismos economicamente importantes, uma vez que as substâncias biosintetizadas pelas macroalgas são utilizadas nas nutrições humana e animal, bem como na indústria farmacêutica (Cardozo et al., 2011). Os metabólitos sintetizados por macroalgas têm sido identificados e apresentam diferentes aplicações biotecnológicas, como os carotenóides, aminoácidos do tipo micosporina, lipídeos e polissacarídeos (Cardozo et al., 2007).

Dentre as macroalgas, a linhagem vermelha da *G. domingensis* é considerada um organismo marinho com o potencial de uso em testes de ecotoxicidade. No Brasil, a espécie está amplamente distribuída pelo litoral e é uma das poucas do gênero *Gracilaria* que ocorre no sul do país. Gouveia et al. (2013) mostraram que as exposições a Pb^{2+} e Cu^{2+} afetam essa espécie morfofuncionalmente. Mendes et al. (2013a, 2013b, 2014, 2015) colaboradores, numa série de quatro publicações (Mendes et al., , mostraram em água do mar sintética o ranqueamento da toxicidade de 15 metais com base na concentração inibitória média (IC_{50}) ($Cd^{2+} >> Cu^{2+} >> Pb^{2+} >> Zn^{2+} >> Ni^{2+} > Co^{2+} > La^{3+} >> Mn^{2+} > Ca^{2+} \sim Li^{+} >> MoO_4^{2-} >> Sr^{2+} >$

$\text{Mg}^{2+} \gg \text{K}^+ > \text{Na}^+$) ; definiram um modelo matemático para a predição de toxicidade de cátions mono-, bi- e trivalentes, que permitiu o ranqueamento de toxicidade de oito metais não testados experimentalmente ($\text{Hg}^{2+} \gg \text{Ag}^+ > \text{Fe}^{3+} \gg \text{Cr}^{3+} \gg \text{Al}^{3+} \gg \text{Fe}^{2+} > \text{Cs}^+ > \text{Ba}^{2+}$); analisaram o efeito das misturas binárias dos metais, que indicaram que Zn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} têm efeitos antagonistas ao Cd^{2+} , ao passo que esses mesmos metais possuem efeito sinérgico; e, por fim, avaliaram o efeito da formação dos complexos metal-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e metal-NTA (ácido nitrilotriacético), que sugeriram a relação da alga com os íons livres.

1.3. *Metabolômica*

O conjunto completo de metabólitos usados ou formados pela célula, em associação com o seu metabolismo, define o termo metaboloma (Nilsen; Oliver, 2005). Por serem os produtos finais dos processos de regulação celular, o conjunto de metabólitos é considerado como a resposta final do sistema biológico, i.e., eles definem o fenótipo celular diante de mudanças genéticas e ambientais (Fiehn, 2007). Os metabólitos possuem funções importantes ao conectarem diferentes vias metabólicas celulares. De fato, os trabalhos de biologia de sistemas e modelos metabólicos apontam que somente 30% dos metabólitos estão envolvidos em apenas duas reações, sendo mais comum as suas participações em três ou quatro reações (60%) (Villas-Bôas et al., 2007).

De um modo amplo, as análises de proteoma e transcriptoma são semelhantes à análise do metaboloma por serem contexto-dependente, i.e., os níveis dos metabólitos dependem do estado celular. No entanto, elas possuem diferenças significativas. A principal delas é o fato de que, diferentemente do fluxo de RNAm e proteínas, é difícil se estabelecer uma relação direta entre genes e metabólitos (Hegeman, 2010; Fiehn, 2002; Villas-Bôas et al., 2007; Kumar et al., 2016). A

concentração de cada metabólito é determinada pelos níveis das atividades de todas as enzimas envolvidas na síntese e na conversão desse metabólito. Assim, quaisquer alterações nessas atividades são capazes de modificar significativamente os níveis dos metabólitos (Villas-Bôas et al., 2007).

A análise desse metaboloma é definido como metabolômica e geralmente se limita ao estudo dos metabólitos com massas moleculares de até 1.000 Da (Villas-Bôas et al., 2007). Para alcançar resultados com significância biológica, deve-se adotar uma abordagem comparativa. Das técnicas analíticas disponíveis para essas análises, a análise por espectrometria de massas é uma das que se destaca (Alonso; Marsal; Julià, 2015). Ao ser acoplada à cromatografia gasosa (CG-EM), tem-se uma plataforma analítica robusta com capacidade de realizar a análise de perfil metabólico (Smart et al., 2010). Apesar de existirem muitos estudos sobre a fisiologia e a ecologia das macroalgas marinhas (Martins; Yokoya; Colepicolo, 2016; Souza; Yokoya, 2016), pouca informação sobre os processos bioquímicos dos metabolismos primário e secundário estão disponíveis (Moenne; González; Sáez, 2016) e, ao serem comparados com as plantas terrestres, pode-se afirmar que a avaliação metabolômica das macroalgas está em estágio inicial (Kumar et al., 2016).

O complemento adequado dessas pesquisas é a geração dos resultados das respostas metabólicas da *G. domingensis* frente a exposição aos metais. Para o melhoramento dos dados bioquímicos gerados nessas avaliações, o uso da metabolômica surge como uma opção tanto para a descoberta de biomarcadores quanto para agregar informações sobre função e regulação biológica (Lin; Viant; Tjeerdema, 2006).

2. Objetivos

2.1. *Objetivo geral*

Avaliar o perfil metabólico da macroalga *G. domingensis* após a exposição a Cu^{2+} e Cd^{2+} , para especificar as vias metabólicas alteradas diante da exposição aos metais.

2.2. *Objetivos específicos*

- Definir as alterações metabólicas estatisticamente significantes com base em análise estatística multivariada;
- Comparar o perfil metabólico da *G. domingensis* exposta ao Cu^{2+} em água do mar sintética com o da macroalga cultivada em água do mar natural;
- Comparar o perfil metabólico da *G. domingensis* exposta ao Cd^{2+} em água do mar sintética com o da macroalga cultivada em água do mar natural;
- Especificar as vias metabólicas impactadas e significativamente alteradas pela exposição aos metais;
- Sugerir a atuação das vias metabólicas mais impactadas na exposição aos metais.

3. Material e Métodos

3.1. Condições de cultivo

A cultura unialgal da *G. domingensis* foi obtida da Coleção de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica, São Paulo/SP. A macroalga foi mantida em câmara climatizada (Ethik technologies) a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $70 \pm 5 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em fotoperíodo 14h:10h (claro:escuro). A irradiância foi aferida pelo fotômetro LI-1400 Data Logger com um sensor quântico esférico (LI-COR, Inc). As algas tiveram o período mínimo de 4 semanas de adaptação aos meios de cultivo sintético e natural.

3.1.1. Água do mar sintética

A água do mar sintética (32 ± 1 psu), pH $8,1 \pm 1$, foi produzida de acordo com (Mendes et al., 2012): A composição é a que segue (em água deionizada): KCl ($9,6 \text{ mmol L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($28,4 \text{ mmol L}^{-1}$), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($19,7 \text{ mmol L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($2,7 \text{ mmol L}^{-1}$), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($8 \mu\text{mol L}^{-1}$), NaNO_3 ($80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), NaCl ($479,1 \text{ mmol L}^{-1}$), Ácido Nitrilotriacético ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), Tris base ($8,3 \text{ mmol L}^{-1}$), Tiamina-HCl ($2,9 \text{ nmol L}^{-1}$), Cianocobalamina ($0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$), Biotina ($0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($27,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($21,9 \mu\text{mol L}^{-1}$), H_3BO_3 ($184,4 \mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($8,2 \mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($170,8 \text{ nmol L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($30,4 \text{ nmol L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($8,0 \text{ nmol L}^{-1}$), KBr ($129,4 \mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($26,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), RbCl ($2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$), LiCl ($27,6 \mu\text{mol L}^{-1}$), KI ($79,6 \text{ nmol L}^{-1}$) e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,0 \text{ nmol L}^{-1}$).

3.1.2. Água do mar natural

A água do mar natural (32 ± 1 psu) enriquecida com solução de von Stoch/2, pH $8,1 \pm 1$, foi produzida de acordo com (Yokoya, 1996): A composição é a que segue

[em água do mar filtrada e esterilizada em autoclave (Phoenix Luferco)]: NaNO_3 (0,5 mmol L^{-1}), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (30,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), Tiamina-HCl (0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$), Biotina (4,1 nmol L^{-1}) e Cianocobalamina (1 nmol L^{-1}).

3.2. Soluções de Cu^{2+} e Cd^{2+}

Os sais de Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e Cd^{2+} [$3(\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O})$] foram adquiridos da Merck. As soluções de Cu^{2+} (0,90 mmol L^{-1}) e Cd^{2+} (0,03 mmol L^{-1}) foram preparados em águas do mar sintética e natural preparados de acordo com [Error! Bookmark not defined.].

3.3. Ensaio toxicológico

Os segmentos apicais da *G. domingensis* (ca. 15 mg) foram colocados em meio de cultivo (150 mL em frasco erlenmeyer) recém preparado, uma hora antes de serem iniciados os experimentos. Todos os experimentos iniciaram no mesmo horário e nas condições de cultivo descritas anteriormente. A exposição a Cd^{2+} e Cu^{2+} se deu por 48h e foi realizado nas concentrações de IC_{50} determinados por (Mendes et al., 2013a).

3.4. Metabolômica

A estratégia para avaliar o metaboloma da *G. domingensis*, frente aos desafios experimentais, foi a análise de perfil metabólico com quantificação relativa, proposta por [Error! Bookmark not defined.].

3.4.1. Preparo das amostras

Após a exposição por 48h aos metais, as amostras de *G. domingensis* foram imediatamente colocadas em microtubos e levadas ao nitrogênio líquido para a extinção de suas atividades metabólicas (*quenching*). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -80°C até o uso.

3.4.2. Extração dos metabólitos

Antes de realizar a extração dos metabólitos pelo método de (Salem et al., 2016), as amostras (cerca de 15 mg de ápice) foram trituradas em microtubos (contendo 2 bolas de inox com $\varnothing$ 4mm e 1 mL de solução éter metil-terc-butílico (MTBE):metanol (MeOH) (3:1) a -20°C .) com o auxílio de um moinho (Mixer Mill MM301, Retsch) em frequência de 20 Hz por 2 minutos. Os suportes de microtubos do moinho foram colocados em nitrogênio líquido para manter a baixa temperatura durante a trituração.

Após triturar, as bolas de inox foram retiradas, 4 μL do padrão D4-Alanina 10 mM (L-Alanine-2,3,3,3-d₄, Sigma-Aldrich) foram adicionados e as amostras foram levados ao vortex por 30 segundos. Após, as amostras ficaram em agitação de 300 rpm a 4°C por 45 minutos. Em seguida, foram levadas ao banho de sonicação por 15 min. Ao término dessa etapa, adicionaram-se 650 μL da solução H₂O:MeOH (3:1) a 4°C para a separação de fases. Levou-se ao vortex por 1 minutos e, em seguida, procedeu-se a centrifugação a 20.000 Xg a 4°C por 5 min (5340R, Eppendorf). A fase H₂O:MeOH de cada amostra foi levada ao speed vac (Thermo Fischer) para a secagem, antes de serem usadas na etapa de derivatização. Após a secagem, foram mantidas a -80°C até o uso.

Para a normalização dos resultados, o pellet também foi levado ao speed vac e determinou-se o peso seco das amostras.

3.4.3. Derivatização por cloroformiato de metila (MCF)

A derivatização por MCF foi realizada de acordo com (Smart et al., 2010). Nesse procedimento, as amostras foram ressuspensas em 200 μL de NaOH 1,0 M, transferidas para tubos de vidro e foram adicionados 167 μL de metanol, 34 μL de piridina e 20 μL de MCF. Cada tubo com a amostra foi submetido à agitação

vigorosa em vortex por 30 segundos, acrescentado mais 20 μL de MCF e mais 30 segundos de homogeneização. Para separar os derivados de MCF (metabólitos) dos substratos, 400 μL de clorofórmio foram adicionados e misturados por 10 segundos e, subsequentemente, seguidos pela adição de mais 400 μL de solução de bicarbonato de sódio (50 mM).

3.4.4. CG-EM

A cromatografia foi realizada de acordo com (Smart et al., 2010). As amostras (1,5 μL) foram injetadas no CG-EM (QP2010 Plus, Shimadzu, Inc) com detector de impacto de elétron (EI) operando a 70 eV e 230 °C. O modo de injeção foi do tipo pulsado *splitless* (1,8 bars por 1 min) com o injetor a 290°C. A coluna capilar usada para todas as análises foi a ZB-1701 (30 m x 250 μm de diâmetro interno x 0,15 μm de espessura do filme com 5 m de coluna de guarda, Phenomenex) e o hélio foi o gás de arraste utilizado, em fluxo de 1 mL min⁻¹. As temperaturas de interface e quadrupolo foram 300°C e 200°C, respectivamente. A programação da corrida está mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Configuração do forno do CG para análise das amostras derivatizadas com MCF.

Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Duração (min.)
-	45	2
9	180	5
40	220	5
40	240	11,5
40	280	2

3.4.5. Identificação dos metabólitos

Para identificar os metabólitos, o software AMDIS (*Automated Mass-Spectral Deconvolution and Identification System*) foi utilizado. A anotação dos picos ocorreu com base nos dados provenientes da biblioteca disponível em (Smart et al., 2010). Após serem identificados, os dados foram analisados com o auxílio do script Metab

no R, e os dados gerados passaram por curadoria manual, com a normalização pelo padrão interno e a biomassa seca.

3.4.6. Análise estatística

Após a normalização dos resultados, procedeu-se a conversão dos mesmos. Foram empregadas as conversões por $\log_{10}$ e potências $X^{0,5}$ e $X^{0,25}$. Esses dados foram levados para a análise no Teste de Normalidade de Anderson-Darling no software Minitab^(R) 17. Os resultados convertidos foram utilizados para as análises estatísticas multivariadas PCA, OPLS-DA e permutação no software SIMCA 14.1 (MKS Umetrics). A metodologia escolhida para análise de vias do presente estudo foi a *MetaboAnalyst Pahtway Analysis* (MetPA) (Xia; Wishart, 2016)[**Error! Bookmark not defined.**]. Três parâmetros tiveram de ser especificados para a análise: **(1)** biblioteca de vias, na qual se define o organismo modelo a ser comparado com a pesquisa alvo. No presente caso, por não haver quaisquer espécies de algas como opção, definiu-se pela *Arabidopsis thaliana*, um organismo que pertence ao Reino *Plantae*, o mesmo das macroalgas vermelhas e verdes (Cock et al., 2010). Também, deve-se destacar que as vias metabólicas identificadas como alteradas em *A. thaliana* são idênticas às da macroalga vermelha *Chondrus crispus*; **(2)** o algoritmo para a análise de enriquecimento de vias, no qual o Globaltest foi a opção selecionada. Com esse algoritmo, definiu-se se o perfil metabólico foi capaz de modificar o grupo de metabólitos presente na via de interesse ($p < 0,05$), i.e., alterações isoladas nos níveis dos metabólitos não influenciam o resultado (Goeman et al., 2004); **(3)** o algoritmo para a análise topológica (impacto na via), no qual o Grau de Centralidade (*Degree Centrality*) foi a opção selecionada. Nesse, mede-se o número de conexões que um nó de interesse na via tem com os outros (Xia;

Wishart, 2016). O valor do impacto na via equivale a percentagem cumulativa de nós coincidentes (Saini et al., 2016).

4. Resultados

4.1. Análise dos metabólitos identificados por CG-EM

Os experimentos realizados com as macroalgas controles (cultivadas em meios de cultivos sintético e natural, respectivamente CS e CN) e expostas a Cd^{2+} (CdS e CdN) e Cu^{2+} (CuS e CuN), resultaram na identificação de 42 metabólitos por CG-EM. Desses, quinze foram retirados das análises estatísticas posteriores, uma vez que foram anotados como ácidos graxos e estão fora do escopo do trabalho. Também, com a extração empregada, não é possível assegurar que essas moléculas foram eficientemente extraídas devido a polaridade da mistura $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$, uma vez que os ácidos graxos particionam melhor em solventes com polaridades menores, como é o caso do MTBE utilizado.

Ao analisar a presença dos metabólitos nos grupos experimentais (Tabela 2), verifica-se a não detecção do triptofano no grupo experimental CS. Situação igual à CdS (no qual também está ausente o ácido adípico) e revertida em CuS. Diferentemente, a macroalga cultivada em água do mar natural apresentou todos os metabólitos identificados no estudo. Contudo, as exposições a Cd^{2+} e Cu^{2+} reduziram os níveis de cisteína abaixo do limite de detecção.

Tabela 2. Metabólitos identificados por CG-EM, classificação e presença nos grupos experimentais.

Metabólito	Classificação	Presença no grupo experimental					
		CS	CdS	CuS	CN	CdN	CuN
Ácido 2-Oxovalérico	Ácidos oxo-monocarboxílicos	P	P	P	P	P	P
Ácido adípico	Ácidos dicarboxílicos	P	<LD	P	P	P	P
Ácido benzóico	Ácidos benzóicos	P	P	P	P	P	P
cis-Aconitato	Ácidos carboxílicos	P	P	P	P	P	P
Alanina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Asparagina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Aspartato	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Cisteína	Aminoácidos	P	P	P	P	<LD	<LD

Metabólito	Classificação	Presença no grupo experimental					
		CS	CdS	CuS	CN	CdN	CuN
Citrato	Ácidos carboxílicos	P	P	P	P	P	P
Fenilalanina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Glicina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Glioxilato	Ácidos carboxílicos	P	P	P	P	P	P
Glutamato	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Glutathiona reduzida	Peptídeos	P	P	P	P	P	P
Isoleucina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Lactato	Ácidos carboxílicos	P	P	P	P	P	P
Leucina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Lisina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Nicotinamida	Piridinas	P	P	P	P	P	P
Ornitina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Prolina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Serina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Succinato	Ácidos carboxílicos	P	P	P	P	P	P
Tirosina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Treonina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P
Triptofano	Aminoácidos	<LD	<LD	P	P	P	P
Valina	Aminoácidos	P	P	P	P	P	P

CS, CdS e CuS: Controle, Cd²⁺ e Cu²⁺ em água do mar sintética, respectivamente; CN, CdN e CuN: Controle, Cd²⁺ e Cu²⁺ em água do mar natural; P: presente; <LD: menor que o Limite de Detecção.

4.2. Pré-tratamento dos dados

Uma vez definido o conjunto de metabólitos do presente estudo, prosseguiu-se o pré-tratamento dos dados gerados. A análise dos dados de metabolômica é sempre trabalhosa, dada a complexidade inerente aos organismos que faz com que cada célula ou tecido seja único, independentemente de serem da mesma espécie e estarem submetidos simultaneamente às mesmas condições experimentais (Worley; Powers, 2016).

Em razão disso, diferentes magnitudes e flutuações entre as abundâncias dos metabólitos (os mais abundantes não são obrigatoriamente os mais relevantes) podem ser observadas frente a um desafio. Somam-se a essas variações a de origem técnica e à heteroscedasticidade, i.e., a não observância nas medidas analíticas da simetria acerca do zero com desvios padrões iguais (van den Berg et al., 2006). Assim, fica evidente que esses fatores de ordens biológica e não-biológica devem ser considerados para minimizar a influência deles na geração dos modelos estatísticos, com o objetivo de alcançar resultados com significância biológica.

4.2.1. Normalização dos resultados

O padrão interno d4-Alanina (L-Alanine-2,3,3,3-d4, Sigma-Aldrich) teve seu uso preconizado para normalizar os dados brutos obtidos pelas metodologias de CG-EM. Assim, com base em d4-Alanina, o coeficiente de variação de 6% comprova que as extrações foram realizadas de modo reprodutível e com uma pequena fonte de variação na base de dados.

4.2.2. Conversão dos dados

Em metabolômica, a conversão dos dados comumente é realizada com o uso do $\log_{10}$ e, numa frequência menor, pela potência (raíz quadrada ou potência $X^{0,5}$). Ambas as abordagens são hábeis em reduzir a heteroscedasticidade, mas a $\log_{10}$ apresenta dificuldade em equalizar dados com grandes desvios padrões, efeito não apontado como tão significativo para a potência (van den Berg et al., 2006). Assim, para avaliar os resultados da transformação dos dados por $\log_{10}$ e potências $X^{0,5}$ e $X^{0,25}$, procedeu-se o teste de normalidade. Esse é um teste usado para determinar se os dados seguem uma distribuição anormal, i.e., valores de $p > 0,05$ indicam uma distribuição normal e desejada.

Os resultados dos testes de normalidade (Figuras 1A a 6A) indicaram a necessidade de realizar a conversão dos dados, por esses seguirem a distribuição anormal ($p < 0,005$). Exceto para as amostras CN, que apresentaram uma distribuição normal para o tratamento do dado com $\log_{10}$ ($p = 0,853$, Figura 2B), os dados dos outros grupos experimentais, quando submetidos a essa conversão (Figuras 1B e 3B a 6B), seguiram a distribuição anormal ($p < 0,005$). Para a potência $X^{0,5}$ (Figuras 1C a 6C), nenhum grupo experimental teve os dados corrigidos para a distribuição normal. Diferentemente, a potência $X^{0,25}$ conseguiu eliminar a heteroscedasticidade de todos os grupos (Figuras 1D a 6D) e, assim, foi a conversão escolhida para a continuidade das análises.

Figura 1. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os resultados das amostras de CS. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,005$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p < 0,005$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p = 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,648$) (D).

Figura 2. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os resultados das amostras de CN. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,05$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p = 0,853$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p < 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,053$) (D).

Figura 3. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os resultados das amostras de CdS. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,005$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p < 0,005$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p < 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,259$) (D).

Figura 4. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os dados das amostras de CdN. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,005$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p = 0,006$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p = 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,617$) (D).

Figura 5. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os resultados das amostras de CuS. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,005$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p < 0,005$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p < 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,269$) (D).

Figura 6. Gráfico de Probabilidade de Dados Normais para os resultados das amostras de CuN. São apresentados os resultados do Teste de Normalidade de Anderson-Darling para os dados sem conversão ($p < 0,005$) (A) e os convertidos por $\log_{10}$ ($p < 0,005$) (B), potência $X^{0,5}$ ($p < 0,005$) (C) e potência $X^{0,25}$ ($p = 0,192$) (D).

A conversão dos dados, no presente trabalho a potenciação, possui um efeito de pseudo-dimensionamento, ou seja, reduz a diferença entre os maiores e menores valores. Isso raramente é suficiente para ajustar a magnitude das diferenças presentes nos dados da pesquisa. Para melhorar a qualidade dos dados, os dimensionamentos (1) automático e (2) de pareto foram aplicados aos modelos de Análise de Componente Principal (PCA, *Principal Component Analysis*) e Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA, *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*), cujos resultados podem ser vistos nas seções subsequentes.

4.3. Visão geral do efeito das exposições aos metais sobre o metaboloma da *G. domingensis*

Ainda com o objetivo de verificar a qualidade dos dados, mas já com a possibilidade de se ter a visão geral de como a exposição aos metais Cd^{2+} e Cu^{2+} influenciaram o metaboloma da *G. domingensis*, a PCA foi realizada. Com essa análise não-supervisionada, i.e., não utilizando informações prévias de classes (grupos experimentais), tem-se o método menos tendencioso para avaliar a discriminação dos grupos (Worley; Powers, 2006).

A Figura 7 mostra o resultado de PCA para o experimento CdS. Nessa análise foi empregado o dimensionamento automático. Pode-se verificar que a exposição ao Cd^{2+} não foi eficiente para alterar o perfil metabólico avaliado no presente estudo. A literatura aponta que a ausência da separação de grupos no modelo de PCA geralmente indica um subsequente modelo OPLS-DA inválido, i.e, mesmo que uma eventual separação de grupos seja bem sucedida pela OPLS-DA, os resultados e as discussões advindas da interpretação dos mesmos não são confiáveis (Worley; Powers, 2006). Por tanto, optou-se por não prosseguir com a análise supervisionada.

Figura 7. Modelos de PCA (*score plot*) de CS vs CdS. Método de dimensionamento: *automático*, PC1 = 53,1% e PC2 = 16,5%. (o) CS, (•) CdS.

Diferentemente do resultado da exposição ao Cd^{2+} , o grupo CS separou do CuS (Figura 8). Isso é observado em ambos os métodos de dimensionamento. No dimensionamento automático, os dois primeiros PCs foram responsáveis por 75,6% da variância total dos dados, resultado pouco inferior ao encontrado no dimensionamento de pareto, cujos dois primeiros PCs contabilizaram 76,6% da variância.

Figura 8. Modelos de PCA (*score plots*) de CS vs CuS. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, PC1 = 58,2% e PC2 = 17,4%; e (B) de *pareto*, PC1 = 60,4% e PC2 = 16,2%. (o) CS, (•) CuS.

A exposição da *G. domingensis* ao Cd^{2+} em água do mar natural foi efetiva em alterar o metaboloma da macroalga (Figura 9), diferentemente do observado na água do mar sintética (Figura 7). Em ambos os métodos de dimensionamento, a separação dos grupos experimentais foi significativa. Na comparação entre os métodos automático e de pareto, o último foi o mais significativo, com a soma dos dois primeiros PCs resultando em 86,4% da variância total dos dados, contra os 77,7% da variância observada no método automático.

Figura 9. Modelos de PCA (*score plots*) de CN vs CdN. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, PC1 = 59,0% e PC2 = 18,7%; e (B) de *pareto*, PC1 = 71,9% e PC2 = 14,5%. (o) CN, (•) CdN.

Assim como para os dois experimentos imediatamente anteriores (Figuras 8 e 9), a separação de grupos em CN vs CuN é evidenciada pelos dois métodos de dimensionamento utilizados na PCA (Figura 10). Para o método automático, um PC foi a resposta para 70,1% da variância total dos dados. Ao passo que o método de pareto teve em seus dois primeiros PCs a resposta para 79,2% da variância total dos resultados, valor superior ao apresentado no outro método.

Figura 10. Modelos de PCA (*score plots*) de CN vs CuN. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, PC1 = 70,1%; e (B) de *pareto*, PC1 = 71,9% e PC2 = 7,3%. (o) CN, (•) CuN.

Esse conjunto de dados permitiu verificar que os metais foram capazes de alterar os metabólitos da *G. domingensis*, porém sem apontar se essas alterações foram suficientes para impactar as vias metabólicas. A excessão foi o grupo CdS. Ademais, os resultados mostraram desempenhos semelhantes para os métodos de dimensionamento empregados, apesar de uma pequena superioridade encontrada para o método de pareto.

4.4. Alterações metabólicas da *G. domingensis* exposta aos metais

Com o objetivo de aprofundar as análises e compreender as diferenças metabólicas resultantes da exposição da *G. domingensis* aos metais, empregou-se a OPLS-DA. Essa análise foi realizada com os dados dos experimentos que apresentaram modelos da PCA válidos (Worley; Powers, 2006).

4.4.1. Modelos gerados pela OPLS-DA

O primeiro modelo para CS vs CuS (Figura 11A), com os dados dimensionados pelo método automático, resultou em um componente preditivo e um componente ortogonal (1+1) com o poder de predição validado de forma cruzada $Q^2(Y) = 82,6\%$ ($p=0,0388$, com base na validação cruzada 7-vezes (Tabela 3). Um valor de 74,3% de variância em X ($R^2(X)$) é usado para contabilizar 100% de variância em Y ($R^2(Y)$) e a variância relacionada à separação de classes foi de 51,3% ($R^2p(X)$). Complementarmente, o teste de permutação feito com 100 replicatas foi utilizado para avaliar a robustez do modelo, que resultou em $R^2 = 0,593$ e $Q^2 = -0,8$ (Tabela 3). O segundo modelo para CS vs CuS (Figura 11B), com os dados dimensionados pelo método de pareto, resultou em um componente preditivo e nenhum componente ortogonal (1+0) com o poder de predição validado de forma cruzada $Q^2(Y) = 84,5\%$ ($p=0,0015$, com base na validação cruzada 7-vezes (Tabela 3). Um valor de 60,3% de variância em X ($R^2(X)$) é usado para contabilizar 100% de variância em Y ($R^2(Y)$) e, assim, a variância relacionada à separação de classes foi de 60,3% ($R^2p(X)$). Complementarmente, o teste de permutação feito com 100 replicatas foi utilizado para avaliar a robustez do modelo, que resultou em $R^2 = 0,162$ e $Q^2 = -0,615$ (Tabela 3).

O critério de validação seguido foi o sugerido por Eriksson et al. (2001), no qual: $Q^2(Y) > 0,5$; $0 < R^2(Y) - Q^2(Y) < 0,3$; R^2 preferencialmente $< 0,4$, porém não

exclusivamente; $Q^2 < 0$. Com base nesses critérios, o método de dimensionamento de pareto foi o que obteve o melhor desempenho. Vale destacar que o modelo 2 também foi validado, pois não atendeu somente ao critério $R^2 < 0,4$ no teste de permutação, cujo limite não é rígido.

Figura 11. Modelos de OPLS-DA (*score plots*) de CuS vs CuS. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, $R^2X(\text{cum}) = 74,3\%$, $R^2(\text{cum}) = 92,4\%$, $Q^2(\text{cum}) = 82,6\%$ e $R^2(Y) = 100\%$; (B) *pareto*, $R^2X(\text{cum}) = 60,3\%$, $R^2(\text{cum}) = 88\%$, $Q^2(\text{cum}) = 84,5\%$ e $R^2(Y) = 100\%$. (o) CS, (•) CuS.

O primeiro modelo para CN vs CdN (Figura 12A), com os dados dimensionados pelo método automático, resultou em um componente preditivo e um componente

ortogonal (1+1) com o poder de predição validado de forma cruzada $Q^2(Y) = 88,4\%$ ($p=0,0374$, com base na validação cruzada 7-vezes (Tabela 3). Um valor de 77,5% de variância em X ($R^2(X)$) é usado para contabilizar 100% de variância em Y ($R^2(Y)$) e a variância relacionada à separação de classes foi de 51% ($R^2p(X)$). Complementarmente, o teste de permutação feito com 100 replicatas foi utilizado para avaliar a robustez do modelo, que resultou em $R^2 = 0,53$ e $Q^2 = -0,74$ (Tabela 3).

O segundo modelo para CN vs CdN (Figura 12B), com os dados dimensionados pelo método de pareto, resultou em um componente preditivo e um componente ortogonal (1+1) com o poder de predição validado de forma cruzada $Q^2(Y) = 88,6\%$ ($p=0,0363$, com base na validação cruzada 7-vezes (Tabela 3). Um valor de 86,1% de variância em X ($R^2(X)$) é usado para contabilizar 100% de variância em Y ($R^2(Y)$) e a variância relacionada à separação de classes foi de 63,4% ($R^2p(X)$). Complementarmente, o teste de permutação feito com 100 replicatas foi utilizado para avaliar a robustez do modelo, que resultou em $R^2 = 0,491$ e $Q^2 = -0,68$ (Tabela 3).

Assim como para CS vs CuS, ambos os modelos puderam ser validados, sendo novamente o método de dimensionamento de pareto o com o resultado que mais se aproximou do $R^2 < 0,4$ ($R^2 = 0,491$) no teste de permutação.

Figura 12. Modelos de OPLS-DA (*score plots*) de CN vs CdN. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, $R^2X(\text{cum}) = 77,5\%$, $R^2(\text{cum}) = 96,8\%$, $Q^2(\text{cum}) = 88,4\%$ e $R^2(Y) = 100\%$; (B) *pareto*, $R^2X(\text{cum}) = 63,4\%$, $R^2(\text{cum}) = 96\%$, $Q^2(\text{cum}) = 88,6\%$ e $R^2(Y) = 100\%$. (o) CN, (•) CdN.

O primeiro modelo para CN vs CuN (Figura 13A) com os dados dimensionados pelo método automático, resultou em um componente preditivo e um componente ortogonal (1+1) com o poder de predição validado de forma cruzada $Q^2(Y) = 91,6\%$ ($p=0,0067$, com base na validação cruzada 7-vezes (Tabela 3). Um valor de 82,4% de variância em X ($R^2(X)$) é usado para contabilizar 100% de variância em Y ($R^2(Y)$) e a variância relacionada à separação de classes foi de 65% ($R^2p(X)$). Complementarmente, o teste de permutação feito com 100 replicatas foi utilizado

para avaliar a robustez do modelo, que resultou em $R^2 = 0,473$ e $Q^2 = -0,84$ (Tabela 3).

O segundo modelo para CN vs CuN (Figura 13B), com os dados dimensionados pelo método de pareto, resultou em um componente preditivo e um componente ortogonal (1+1) com o poder de predição validado de forma cruzada $Q^2(Y) = 90,8\%$ ($p=0,0084$, com base na validação cruzada 7-vezes (Tabela 3). Um valor de 85,4% de variância em X ($R^2(X)$) é usado para contabilizar 100% de variância em Y ($R^2(Y)$) e a variância relacionada à separação de classes foi de 71,5% ($R^2p(X)$). Complementarmente, o teste de permutação feito com 100 replicatas foi utilizado para avaliar a robustez do modelo, que resultou em $R^2 = 0,528$ e $Q^2 = -0,70$ (Tabela 3).

Assim como para as outras exposições, ambos os modelos puderam ser validados. No entanto, o desempenho do método de dimensionamento automático apresentou o resultado que mais se aproximou do $R^2 < 0,4$ ($R^2 = 0,464$) no teste de permutação.

Todas as comparações entre os grupos experimentais analisados por OPLS-DA demonstraram que tanto a qualidade do ajuste quanto a capacidade preditiva foram elevadas nos modelos gerados.

Figura 13. Modelos de OPLS-DA (*score plots*) de CN vs CuN. Métodos de dimensionamento: (A) *automático*, $R^2X(\text{cum}) = 83,2\%$, $R^2(\text{cum}) = 96,2\%$, $Q^2(\text{cum}) = 92,1\%$ e $R^2(Y) = 100\%$; (B) *pareto*, $R^2X(\text{cum}) = 86,3\%$, $R^2(\text{cum}) = 96,3\%$, $Q^2(\text{cum}) = 91,2\%$ e $R^2(Y) = 100\%$. (o) CN, (•) CuN.

A Tabela 3 apresenta a compilação dos resultados de validação para os modelos de OPLS-DA. Em razão de algumas análises das próximas seções serem realizadas de modo comparativo, optou-se por prosseguir as análises com os dados tratados com o dimensionamento de pareto. Como supramencionado, todos os modelos puderam ser validados, no entanto, o dimensionamento de pareto teve o melhor desempenho em duas das três comparações realizadas.

Tabela 3. Comparação dos parâmetros de validação dos modelos de OPLS-DA gerados no presente trabalho.

<i>Comparação</i>	Automático			Pareto		
	Permutação (R ²)	Permutação (Q ²)	CV-ANOVA (p)	Permutação (R ²)	Permutação (Q ²)	CV-ANOVA (p)
Ctrl vs Cu²⁺ (sintética)	0,593	-0,8	0,0388	0,162	-0,615	0,0015
Ctrl vs Cu²⁺ (natural)	0,473	-0,84	0,0067	0,528	-0,70	0,0084
Ctrl vs Cd²⁺ (natural)	0,530	-0,74	0,0374	0,491	-0,68	0,0363

Quantidade de permutações: 100.

Com o objetivo de identificar as variáveis discriminantes, i.e., as responsáveis pelas separações de classes, as próximas seções mostram as análises do *S-plot* e do *Loading plot* com o intervalo de confiança tipo *jack-knifed*.

4.4.2. Identificação dos metabólitos relacionados às diferenças entre grupos experimentais

A Figura 14A mostra o *S-plot* de CS vs CuS, no qual a região de interesse do gráfico de dispersão é a que combina elevadas contribuição (covariância, $[p] > 0,5$) e confiança (correlação, $p(\text{corr})[1] > 0,05$) das variáveis com efeito na separação de classes, i.e., área de baixo risco de identificação de falsos positivos. Os critérios usados para delimitar a região de interesse para selecionar os metabólitos que passariam para a análise do *Loading plot*, estão de acordo com a literatura (Wiklund et al., 2008; Xia; Wishart, 2016). Por esse critério, uma região de interesse foi identificada (correlação e covariância positivas), estando os metabólitos ácido adípico, asparagina, cisteína e succinato fora dessa região e, assim, classificados como variáveis de baixa confiabilidade para a separação dos grupos experimentais. Na Figura 14B, é mostrado que cinco metabólitos não atenderam ao critério de confiança após a análise do *Loading plot* (ácido 2-oxovalérico, ácido benzóico, aspartato, glioxilato e lactato), i.e., o intervalo de confiança tipo *jack-knifed* incluiu o

valor zero. Dessa forma, dezoito metabólitos foram considerados responsáveis pela separação dos grupos e, assim, utilizados para a interpretação dos resultados.

Figura 14. Estratégia para a identificação de variáveis discriminantes para CS vs CuS. (A) *S-plot*: 23 metabólitos foram selecionados por estarem na área de baixo risco do gráfico; (B) *Loading plot* com intervalo de confiança tipo *jack-knifed*. As barras cinza indicam que os metabólitos foram excluídos.

A Figura 15A mostra o *S-plot* de CN vs CdN, no qual foram identificadas duas regiões de interesse. A primeira região (correlação e covariância negativas) conta com *cis*-aconitato, citrato, cisteína, glutamato e glutatona reduzida. Para esse grupo de metabólitos, a cisteína não apresentou capacidade discriminante e os outros apresentaram correlação e covariância positivas na comparação CS vs CuS. A segunda região (correlação e covariância positivas) conta com treze metabólitos e inclui a asparagina, que não apresentou capacidade discriminante na comparação

CS vs CuS. O grupo de metabólitos com baixa confiabilidade para a separação de classes, conta com nove variáveis, das quais, somente o ácido adípico e o succinato não estavam na região de interesse na comparação CS vs CuS. Na Figura 15B, é mostrado que três metabólitos não atenderam ao critério de confiança após a análise de *Loading plot* (ácido adípico, ácido 2-oxovalérico e glutamato).

Figura 15. Estratégia para a identificação de variáveis discriminantes para CN vs CdN. (A) *S-plot*: 18 metabólitos foram selecionados por estarem nas áreas de baixo risco do gráfico; (B) *Loading plot* com intervalo de confiança tipo *jack-knifed*. As barras cinza indicam que os metabólitos foram excluídos.

A Figura 16A mostra o *S-plot* de CN vs CuN e, assim como para CN vs CdN, foram identificadas duas regiões de interesse. A primeira região (correlação e covariância negativas) conta com a cisteína (sem significância em CS vs CuS e equivalente ao observado em CN vs CdN) e a serina, que apresentou-se sem

significância em CN vs CdN e inversamente ao observado em CS vs CuS. A segunda região (correlação e covariância positivas) conta com vinte e um metabólitos e o succinato aparece pela primeira vez com capacidade discriminante de classes. Ácido adípico, glutamato, glutathione e ornitina aparecem como metabólitos com baixa confiabilidade para a separação de classes. Em nenhuma comparação, o ácido adípico mostrou capacidade discriminante. Na Figura 16B, é mostrado que somente a nicotinamida não atendeu ao critério de confiança, i.e., o intervalo de confiança tipo *jack-knifed* incluiu o valor zero.

Figura 16. Estratégia para a identificação de variáveis discriminantes para CN vs CuN. (A) *S-plot*: 23 metabólitos foram selecionados por estarem nas áreas de baixo risco do gráfico; (B) *Loading plot* com intervalo de confiança tipo *jack-knifed*. A barra cinza indica o metabólito que foi excluído.

Tabela 4. Comparação dos resultados obtidos por *S-plot* e *Loading plot* das comparações CS vs CuS, CN vs CuN e CN vs CdN.

	CS vs CuS	CN vs CuN	CN vs CdN
Covariância e correlação positivas (os metabólitos identificados fora do intervalo de confiança tipo <i>jack-knifed</i> estão sublinhados)	<u>Ácido 2-Oxovalérico</u>	Ácido 2-Oxovalérico	<u>Ácido 2-Oxovalérico</u>
	<u>Ácido benzóico</u>	Ácido benzóico	Alanina
	cis-Aconitato	cis-Aconitato	Asparagina
	Alanina	Alanina	Isoleucina
	<u>Aspartato</u>	Asparagina	Lactato
	Citrato	Aspartato	Leucina
	Fenilalanina	Citrato	Lisina
	Glicina	Fenilalanina	Ornitina
	<u>Glioxilato</u>	Glicina	Prolina
	Glutamato	Glioxilato	Tirosina
	Glutationa reduzida	Isoleucina	Treonina
	Isoleucina	Lactato	Triptofano
	<u>Lactato</u>	Leucina	Valina
	Leucina	Lisina	

	CS vs CuS	CN vs CuN	CN vs CdN
	Lisina Nicotinamida Ornitina Prolina Serina Tirosina Treonina Tryptofano Valina	<u>Nicotinamida</u> Prolina Succinato Tirosina Treonina Tryptofano Valina	
Covariância e correlação negativas (os metabólitos identificados fora do intervalo de confiança tipo <i>jack-knifed</i> estão sublinhados)	-	Cisteína Serina	cis-Aconitato Cisteína Citrato <u>Glutamato</u> <u>Glutathione reduzida</u>
Metabólitos sem covariância e correlação significativas	Ácido adípico Asparagina Cisteína Succinato	Ácido adípico Glutamato Glutathione reduzida Ornitina	Ácido adípico Ácido benzóico Aspartato Fenilalanina Glicina Glioxilato Nicotinamida Serina Succinato

(continuação)

4.5. Interpretação funcional dos resultados metabolômicos

Os estudos de metabolômica utilizam uma série de análises uni- e multivariadas, que resultam em listas de metabólitos estatisticamente influenciados pelos desafios experimentais. Esses resultados são o ponto de partida para a interpretação e a formulação das hipóteses, ao invés de serem o objetivo final da pesquisa (Xia; Whishart, 2016). Sendo assim, todas as alterações estatísticas observadas na presente pesquisa (sumarizadas na Tabela 4) formaram a base para as análises das vias metabólicas impactadas pelas exposições aos metais Cu^{2+} e Cd^{2+} .

4.5.1. Efeito do metal Cu^{2+} sobre as vias metabólicas da *G. domingensis* cultivada em água do mar sintética

A Figura 17 e a Tabela 5 mostram os resultados da MetPA. Apesar de apresentarem valores significativos para os impactos na via ($>0,1$), as alterações promovidas pelo Cu^{2+} no perfil metabólico da *G. domingensis* não foram suficientes para indicar que as 11 vias impactadas foram significativamente alteradas. Esse é um exemplo do que é preconizado pelo teste, i.e., relevante é a variação no perfil metabólico e não se os metabólitos estão isoladamente sub- ou supra-regulados (Goeman et al., 2004).

Figura 17. Visão global da análise das vias metabólicas alteradas na comparação CS vs CuS. O gráfico mostra todas as 32 vias metabólicas do KEGG dispostas de acordo com os scores a partir das análises de enriquecimento [eixo y: $-\ln(p)$] e topologia (eixo x: impacto na via, i.e., soma das medidas de importância dos metabólitos identificados normalizados pela soma da importância de todos os metabólitos da via [Xia; Wishart, 2010]). As identificações das vias estão na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados da análise das vias metabólicas na comparação CS vs CuS. Mostradas as vias com valores de impacto maiores que 0,1 (Wang et al., 2012).

Nº	Nome da via	Nº de metabólitos na via	Nº de metabólitos encontrados	Valor de p	Impacto na via
1	Metabolismo de glicina, serina e treonina	30	4	0,657	0,534
2	Metabolismo da glutatona	26	3	0,990	0,505
3	Biossíntese de alcalóides tipo isoquinolina	6	1	0,203	0,500
4	Metabolismo da fenilalanina	8	1	0,736	0,500
5	Metabolismo de arginina e prolina	38	3	0,793	0,355
6	Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	22	2	0,894	0,333
7	Metabolismo da tirosina	18	1	0,203	0,273
8	Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato	17	2	0,259	0,201
9	Metabolismo de triptofano	27	1	0,242	0,171
10	Metabolismo do metano	11	2	0,727	0,167
11	Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)	20	2	0,259	0,142

4.5.2. Efeito dos metais Cu^{2+} e Cd^{2+} sobre as vias metabólicas da *G. domingensis* cultivada em água do mar natural

Diferentemente de CS vs CuS, a exposição da *G. domingensis* ao Cu^{2+} em água do mar natural resultou em alterações significativas nas vias metabólicas impactadas (Figura 18 e Tabela 5). Das 37 vias com metabólitos identificados no estudo (Figura 18), 10 se enquadraram nos critérios de $p < 0,05$ (análise de enriquecimento de vias) e impacto na via $> 0,1$ (análise de topologia) (Tabela 6). A maioria das vias impactadas estão relacionadas aos metabolismos energético e de aminoácidos.

Figura 18. Visão global da análise das vias metabólicas alteradas na comparação CN vs CuN. O gráfico mostra todas as 37 vias metabólicas do KEGG dispostas de acordo com os *scores* a partir das análises de enriquecimento [eixo y: $-\ln(p)$] e topologia (eixo x: impacto na via, i.e., soma das medidas de importância dos metabólitos identificados normalizados pela soma da importância de todos os metabólitos da via [Error! Bookmark not defined.]). As identificações das vias estão na Tabela 5.

Tabela 6. Resultados da análise das vias metabólicas na comparação CN vs CuN. Mostradas as vias com valores de impacto maiores que 0,1.

Nº	Nome da via	Nº de metabólitos na via	Nº de metabólitos encontrados	Valor de p	Impacto na via
1	Metabolismo de glicina, serina e treonina	30	6	<0,001	0,534
2	Biossíntese de alcalóides tipo isoquinolina	6	1	<0,001	0,500
3	Metabolismo da fenilalanina	8	1	0,0114	0,500
4	Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato	17	4	<0,001	0,432
5	Metabolismo da tirosina	18	2	<0,001	0,273
6	Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	22	4	<0,001	0,201
7	Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)	20	3	<0,001	0,189
8	Metabolismo do triptofano	27	1	<0,001	0,171

Nº	Nome da via	Nº de metabólitos na via	Nº de metabólitos encontrados	Valor de p	Impacto na via
9	Metabolismo do metano	11	2	<0,001	0,167
10	Metabolismo do enxofre	12	2	<0,001	0,133

(Continuação)

Assim como CN vs CuN, a exposição da *G. domingensis* ao Cu^{2+} em água do mar natural resultou em alterações significativas nas vias metabólicas impactadas (Figura 19 e Tabela 7). Das 26 vias com metabólitos identificados no estudo (Figura 18), 8 se enquadraram nos critérios de $p < 0,05$ (análise de enriquecimento de vias) e impacto na via $> 0,1$ (análise de topologia) (Tabela 6). Também, a maioria das vias impactadas estão relacionadas aos metabolismos energético e de aminoácidos.

Figura 19. Visão global da análise das vias metabólicas alteradas na comparação CN vs CdN. O gráfico mostra todas as 26 vias metabólicas do KEGG dispostas de acordo com os scores a partir das análises de enriquecimento [eixo y: $-\ln(p)$] e topologia (eixo x: impacto na via, i.e., soma das medidas de importância dos metabólitos identificados normalizados pela soma da importância de todos os metabólitos da via [Error! Bookmark not defined.]). As identificações das vias estão na Tabela 5.

Tabela 7. Resultados da análise das vias metabólicas na comparação CN vs CdN. Mostradas as vias com valores de impacto maiores que 0,1 [Error! Bookmark not defined.].

Nº	Nome da via	Nº de metabólitos na via	Nº de metabólitos encontrados	Valor de p	Impacto na via
1	Biossíntese de alcalóides tipo isoquinolina	6	1	0,0029	0,500
2	Metabolismo da tirosina	18	1	0,0029	0,273
3	Metabolismo de arginina e prolina	38	2	0,0102	0,215
4	Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato	17	2	0,0136	0,201
5	Metabolismo do triptofano	27	1	0,0025	0,171
6	Ciclo do TCA	20	2	0,0136	0,142
7	Metabolismo de glicina, serina e treonina	30	2	0,0029	0,137
8	Metabolismo do enxofre	12	1	0,0102	0,133

A Tabela 8 mostra o perfil metabólico da *G. domingensis* após a exposição aos metais Cu^{2+} e Cd^{2+} em água do mar natural. Nessa, é possível verificar que o metabolismo de glicina, serina e treonina, a biossíntese de alcalóides tipo isoquinoloina, o metabolismo de glioxilato e dicarboxilato, o metabolismo da tirosina, o ciclo do TCA, o metabolismo do triptofano e o metabolismo do enxofre foram impactados pela exposição a ambos os metais. Apesar de serem igualmente impactadas, as regulações do metabolismo de glioxilato e dicarboxilato e do ciclo do TCA foram opostas, i.e., os metabólitos identificados no estudo estiveram supra-regulados na exposição ao Cu^{2+} e sub-regulados na exposição ao Cd^{2+} . Além dessas diferenças, o metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, o metabolismo do metano e o metabolismo da fenilalanina estiveram isoladamente alterados na exposição ao Cu^{2+} , enquanto o metabolismo de arginina e prolina esteve alterado na exposição ao Cd^{2+} .

Tabela 8. Comparação do perfil metabólico das vias alteradas em *G. domingensis* devido às exposições aos metais Cu^{2+} e Cd^{2+} em água do mar natural. As figuras que mostram as vias metabólicas estão no Anexo (Figuras A1 a A11).

Vias metabólicas e metabólitos alterados	
CN vs CuN	CN vs CdN
Metabolismo de glicina, serina e treonina Aspartato (supra-regulado) Glicina (supra-regulada) Gloxilato (supra-regulado) Serina (sub-regulada) Treonina (supra-regulado) Tryptofano (supra-regulado)	Metabolismo de glicina, serina e treonina Treonina (supra-regulada) Tryptofano (supra-regulado)
Biossíntese de alcalóides tipo isoquinolina Tirosina (supra-regulada)	Biossíntese de alcalóides tipo isoquinolina Tirosina (supra-regulada)
Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato <i>cis</i> -Aconitato (supra-regulado) Citrato (supra-regulado) Glioxilato (supra-regulado) Succinato (supra-regulado)	Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato <i>cis</i> -Aconitato (sub-regulado) Citrato (sub-regulado)
Metabolismo da tirosina Succinato (supra-regulado) Tirosina (supra-regulado)	Metabolismo da tirosina Tirosina (supra-regulada)
Ciclo do TCA <i>cis</i> -Aconitato (supra-regulado) Citrato (supra-regulado) Succinato (supra-regulado)	Ciclo do TCA <i>cis</i> -Aconitato (sub-regulado) Citrato (sub-regulado)
Metabolismo do triptofano Tryptofano (supra-regulado)	Metabolismo do triptofano Tryptofano (supra-regulado)
Metabolismo do enxofre Cisteína (sub-regulada) Serina (sub-regulada)	Metabolismo do enxofre Cisteína (sub-regulado)
Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato Alanina (supra-regulado) Asparagina (supra-regulado) Aspartato (supra-regulado) Succinato (supra-regulado)	Metabolismo de arginina e prolina Ornitina (supra-regulada) Prolina (supra-regulada)
Metabolismo do metano Glicina (supra-regulado) Serina (sub-regulada)	
Metabolismo da fenilalanina Fenilalanina (supra-regulada)	

5. Discussão

Desde 2013, ensaios de toxicidade com metais têm sido realizados em *G. domingensis* cultivada na água do mar sintética (meio de cultivo totalmente controlado). Essa abordagem permitiu avaliar a toxicidade de 14 cátions e um ânion com base na toxicidade do íon livre (metal especiado, complexo aquoso) e, assim, estabeleceu-se um ranqueamento de toxicidade com maior significância e consistência do que o feito com metais não-especiados. Neste, os metais Cd^{2+} e Cu^{2+} foram os mais tóxicos (Mendes et al., 2013a). Além disso, o uso do meio de cultivo sintético permitiu determinar a predição da toxicidade de alguns metais mono-, bi- e trivalentes (Mendes et al., 2013b), os efeitos das misturas binárias de metais [Error! Bookmark not defined.] e os efeitos da formação dos complexos metal-EDTA/NTA (Mendes et al., 2015). Esse conjunto de resultados evidenciou que a *G. domingensis* é um organismo apropriado para o desenvolvimento de testes toxicológicos e também um potencial organismo bioindicador da degradação do ambiente marinho (Mendes et al., 2013a).

Para explorar o potencial advindo com o uso da metabolômica, a presente pesquisa avaliou uma fração dos metabólitos intermediários do metabolismo central (Smart et al., 2010) na *G. domingensis* exposta e não exposta aos metais Cu^{2+} e Cd^{2+} em águas do mar sintética e natural. Na Tabela 2, foi possível verificar qualitativamente que o triptofano não foi detectado em CS, diferentemente do observado em CN. O triptofano é um precursor do ácido indolacético (IAA), uma auxina. Apesar de ter sido demonstrado anteriormente que a aplicação exógena desse fitohormônio não é capaz de influenciar a taxa de crescimento apical da linhagem vermelha da *G. domingensis* (Ramlov; Plastino; Yokoya, 2013), o IAA endógeno é essencial para o crescimento, o desenvolvimento e a regeneração das

macroalgas (Ramlov; Plastino; Yokoya, 2013; Wang et al., 2016). Contudo, caso a deficiência desse aminoácido tenha prejudicado a síntese do IAA, existe uma via alternativa, que é triptofano-independente, para a produção deste fitohormônio (Woodward; Bartel, 2005). Corrobora a existência dessa via alternativa a demonstração de que uma mutação que interfere na síntese das subunidades α e β da triptofano sintase (consequentemente prejudica a produção do triptofano), resultou no aumento da concentração do IAA intracelular em *A. thaliana* (Wang et al., 2015). Apesar de não se poder assegurar uma relação causa-efeito somente com os dados do presente estudo, pode-se destacar que a ausência do triptofano foi a primeira diferença observada na macroalga cultivada em água do mar sintética em comparação com a cultivada em meio natural.

Outras diferenças “meio de cultivo dependentes” foram significativamente encontradas. A exposição da *G. domingensis* ao Cd^{2+} em água do mar sintética não foi suficiente em promover alterações metabólicas para separar os grupos na PCA (Figura 7), o que impediu o prosseguimento das análises por estatística supervisionada (OPLS-DA). Também, apesar de ter sido adequadamente separado nas PCA (Figura 8) e OPLS-DA (Figura 11), a exposição ao Cu^{2+} em água do mar sintética não foi capaz de promover alterações significativas nas vias metabólicas impactadas (Figura 14 e Tabela 5). Diferentemente, as exposições aos metais em água do mar natural promoveram alterações significativas no metabolismo da *G. domingensis* (Tabela 8). Apesar destes resultados indicarem que a água do mar sintética não foi capaz de mimetizar o meio de cultivo natural para a *G. domingensis*, deve-se destacar que somente uma fração dos metabólitos do metabolismo central foi avaliada. Tanto os carboidratos quanto os metabólitos secundários (os maiores influenciados em situação de estresse ambiental) estiveram fora do escopo do

presente trabalho. No entanto, esse conjunto de resultados mostra que existe espaço para a otimização do meio de cultivo sintético, além do já realizado (Mendes et al., 2012), e que esse ajuste pode ser assistido pela metabolômica.

Das alterações observadas, o aumento nos níveis dos aminoácidos foi evidente para ambas as exposições aos metais (Tabela 4). Cerca de 75% e 65% dos aminoácidos identificados estiveram supra-regulados nas exposições a Cu^{2+} e Cd^{2+} , respectivamente. O aumento no *pool* dos aminoácidos durante a exposição a metais deve ser compreendido como uma resposta do organismo ao estresse (Sharma; Dietz, 2006) e, como já mostrado para a macroalga vermelha *Chondrus crispus* (Kovacik et al., 2011), não estaria relacionado à proteólise das proteínas solúveis. De fato, das 10 vias metabólicas impactadas e significativamente alteradas na exposição ao Cu^{2+} , cinco foram diretamente relacionadas ao metabolismo de aminoácidos. Para o Cd^{2+} , das oito vias impactadas e significativamente alteradas, quatro foram diretamente relacionadas ao metabolismo de aminoácidos (Tabela 8).

5.1. *Possível atividade coordenada do metabolismo de glicina, serina e treonina com o ciclo de glioxilato e dicarboxilato*

Das vias dos aminoácidos, a do metabolismo de glicina, serina e treonina é a que se conecta com todas as vias identificadas no presente estudo (Figura A 1). Timm e colaboradores (2013) (Timm et al., 2013) mostraram que a concentração intracelular elevada da serina e a razão serina/glicina, são fatores importantes para o ajuste fino da via de fotorrespiração em *A. thaliana* em nível transcricional. Essa via converte o fosfoglicolato (tóxico e inevitavelmente produzido durante a fixação do CO_2) em 3-fosfoglicerato e viabiliza a operação do ciclo de Calvin-Benson na presença de oxigênio molecular, inclusive em algas (Timm et al., 2016). Mais especificamente, a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) é a

responsável pela fixação do CO₂ em ribulose-1,5-bifosfato que, em seguida, é convertido em 3-fosfoglicerato (Dellero et al., 2016).

Essa enzima chega a compor ca. 30% das proteínas das folhas de plantas terrestres e é amplamente aceita como a última etapa taxa-limitante para a fixação e carbono (Jensen, 2000). Por ser uma enzima chave, metabólitos intracelulares exercem regulação sobre ela, sendo a maior produção do glioxilato, como observado no presente estudo para a exposição ao Cu²⁺, um dos *feedbacks* negativos existentes porém por mecanismo ainda desconhecido (Chastain; Ogren, 1989). Além da importância da glicina no nível transcricional, foi demonstrado que o seu acúmulo intracelular é tóxico para a célula na cianobactéria *Synechocystis* sp. possivelmente por reduzir o nível de Mg²⁺ [compõe o sítio ativo da RuBisCO após a carbamilação da Lys201 (Taylor; Andersson, 1996)], uma vez que esse aminoácido parece restringir o nível celular desse metal (Eisenhut; Bauwe; Hagemann, 2007). Adicionalmente, a redução do acúmulo de glicina facilita o fluxo de carbono fotorrespiratório e estimula o crescimento da *A. thaliana* (Timm et al., 2012).

Com esse conjunto de evidências, que podem ser extrapoladas para a *G. domingensis*, apesar de ser necessário o aprofundamento dos estudos, fica clara a necessidade da macroalga buscar alternativa para a captação de carbono. Em *C. reinhardtii*, a exposição ao Cu²⁺ resultou em um aumento de pelo menos duas vezes na atividade enzimática da isocitrato liase, enzima-chave do metabolismo do glioxilato. Ela catalisa a quebra do isocitrato em succinato e glioxilato e é um mecanismo adaptativo para permitir a assimilação do carbono de modo mixotrófico (Plancke et al., 2014). Os resultados do presente estudo indicam a mesma direção para a exposição da *G. domingensis* ao Cu²⁺, que resultou na supra-regulação de citrato, *cis*-aconitato, glioxilato e succinato (Tabela 8). Esse seria o primeiro indício

da ativação dessa via em macroalgas submetida ao estresse por metais em razão do prejuízo ao sistema fotossintetizante reconhecidamente prejudicada na exposição a metais.

5.1.1. Efeito do Cu^{2+} no metabolismo da fenilalanina

O metabolismo de fenilalanina mostrou-se significativamente influenciado pela exposição ao Cu^{2+} (Tabela 8). Em plantas e algas submetidas ao estresse por esse metal, tem sido observado o aumento da atividade enzimática da fenilalanina amônia-liase (PAL), cuja atividade (formar *trans*-cinamato a partir da fenilalanina) é passo fundamental para fornecer moléculas fenólicas antioxidantes (Kovacik et al., 2008; Li; Leisner, 2008). Desta forma, sugere-se que a modulação do metabolismo da fenilalanina possa estar acontecendo no sentido de tamponar os EROs gerados pela exposição ao Cu^{2+} , como observado para a macroalga verde *Ulva compressa* (Gonzalez et al., 2010).

5.1.2. Efeito do Cd^{2+} no metabolismo de arginina e prolina

Em relação ao Cd^{2+} , apesar de a análise de vias indicar que a exposição ao metal alterou estatisticamente oito vias metabólicas, poucas alterações de metabólitos foram identificadas (Tabela 4), o que reduz a possibilidade de discussão funcional dessas vias. A excessão parece ter sido no metabolismo de arginina e prolina que, apesar de pouca variação observada, existe uma literatura que possibilita realizar uma discussão sobre as alterações observadas no presente estudo.

Quando expostas a metais, as algas e os outros organismos fotossintetizantes acumulam especificamente alguns aminoácidos (e.g., prolina), peptídeos (glutathiona e fitoquelatinas) e aminas (e.g., espermina, espermidina, putrescina e nicotinamida) para se protegerem do estresse ambiental (Pinto et al., 2003; Sharma; Dietz, 2006;

Romano et al., no prelo; Celekli; Kapi; Bozkurt, 2013). No presente trabalho, os resultados de enriquecimento de vias e topologia apontaram que o metabolismo de arginina e prolina foi significativamente alterado na exposição ao Cd^{2+} em água do mar natural (Tabela 7). Nesta via, os aminoácidos prolina e ornitina foram encontrados em níveis maiores do que os observados em *G. domingensis* controle. Esse resultado é o inverso do observado na exposição ao Cd^{2+} em macroalga vermelha *Pterocladia capillacea*, na qual as concentrações de ornitina e prolina estavam abaixo dos limites de detecção (Schmidt et al., 2016).

Em ensaios de exposição a metais, o acúmulo da prolina esteve relacionado a proteção da nitrato redutase, a remoção de EROs (e.g., H_2O_2 e $^1\text{O}_2$) e a redução dos danos ao fotossistema II (PSII) ocasionados por EROs (Szabados; Savoure, 2009) [Error! Bookmark not defined.]. Esse aminoácido é sintetizado principalmente a partir do glutamato pelas enzimas pirrolina-5-carboxilato sintase (P5CS) e P5C redutase. Em *C. reinhardtii*, a mutação do gene de P5CS aumentou a produção de prolina em 80% e permitiu a essa microalga crescer eficientemente na presença de Cd^{2+} ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Siripornadulsil et al., 2002), uma evidência da participação desse aminoácido na tolerância ao Cd^{2+} . Adicionalmente, existe uma via alternativa para a síntese da prolina, que é a partir da ornitina e conta com a participação das enzimas ornitina delta-aminotransferase (OAT) e P5C (Szabados; Savoure, 2009). O efeito do Cd^{2+} sobre essa via já foi avaliado na *L. minor*, na qual a P5CS apresentou um aumento transitório da sua atividade enzimática na exposição a $1\text{-}3 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cd^{2+} , e uma atividade enzimática da OAT duas vezes superior na exposição a $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cd^{2+} . Por conseguinte, a concentração intracelular de prolina acompanhou esses aumentos (Qia et al., 2015). Devido às supra-regulações de ornitina (intermediário) e prolina encontrados no presente estudo e às importantes atividades

protetoras desse aminoácido já descritas em organismo submetido a estresse ambiental (Romano et al., no prelo) [Error! Bookmark not defined.], é possível sugerir que a produção de prolina a partir da ornitina está significativamente ativa na *G. domingensis* para reagir à exposição ao Cd^{2+} .

6. Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo geral, avaliar o perfil metabólico da macroalga *G. domingensis* após a exposição a Cu^{2+} e Cd^{2+} , para especificar as vias metabólicas alteradas diante da exposição aos metais. Após o tratamento dos dados com as análises estatísticas multivariadas PCA e OPLS-DA, identificou-se os metabólitos e as vias que foram potencialmente impactadas pela exposição aos metais. Após a exposição aos metais Cd^{2+} e Cu^{2+} em água do mar sintética, a macroalga não teve vias significativamente impactadas. Esse conjunto de resultados mostra que ainda existe espaço para a otimização do meio de cultivo sintético e, em especial, evidencia o potencial da metabolômica em assistir esses processos de melhorias. Na água do mar natural, a exposição ao Cu^{2+} foi eficiente em estimular alterações de vias e indicou, pela primeira vez, um possível mecanismo da alga em obter carbono por via não-fotossintetizante. Ao passo que os resultados da exposição ao Cd^{2+} sugerem papel central do metabolismo de arginina e prolina na tentativa de mitigar os danos causados pela exposição ao metal. Por fim, metais essenciais e não essenciais parecem ter mecanismos diferentes na tentativa de promover o combate aos danos gerados pela exposição aos metais.

7. Referências Bibliográficas

Alonso A, Marsal S, Julià A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015;3:23.

Aravantinou AF, Tsarpali V, Dailianis S, Manariotis ID. Effect of cultivation media on the toxicity of ZnO nanoparticles to freshwater and marine microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015;114:109-116.

Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA Souza, AO, Colepicolo P, Pinto E. Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol Part C*. 2007;146:60-78.

Cardozo KHM. Marques LG, Cravalho VM, Carignan MO, Pinto E, Marinho ES, Colepicolo P. Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. *Rev Bras Farmacogn*. 2011;21:202-208.

Celekli A, Kapi M, Bozkurt. Effect of Cadmium on Biomass, Pigmentation, Malondialdehyde, and Proline of *Scenedesmus quadricauda* var. *longispina*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2013;91:571-576.

Chastain CJ, Ogren WL. Glyoxylate inhibition of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation state in vivo. *Plant and Cell Physiology*. 1989;30:937-944.

Chen Y, Zhang R, Song Y, He J, Sun J, Bai J, An Z, Dong L, Zhan Q, Abliz Z. RRLC-MS/MS-based metabonomics combined with in-depth analysis of metabolic correlation network: finding potential biomarkers for breast cancer. *Analyst*. 2009;134:2003-2011.

Cock JM, Sterck L, Rouzé P et al. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*. 2010;465: 617–621

Dellero Y, Jossier M, Schmitz J, Maurino VG, Hodges M. Photorespiratory glycolate–glyoxylate metabolism. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67:3041-3052.

Eisenhut M, Bauwe H, Hagemann M. Glycine accumulation is toxic for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, but can be compensated by supplementation with magnesium ions. *FEMS Microbiology Letters*. 2007;277:232-237.

Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikstrom C, Wold S. 2001. In: *Multivariate and Megavariate Data Analysis Part I: Basic Principles and Applications*, Umetrics Academy, Sweden, 2001.

Faller P, Kienzler K, Krieger-Liszkay A. Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2005;1706:158-164.

Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 2002;48:155–171.

Fiehn, O. In: *Concepts in Plant Metabolomics*. Capítulo 1, Páginas 1-18, 2007.

Filimonova V, Gonçalves F, Marques JC, De Troch M, Gonçalves AMM. Biochemical and toxicological effects of organic (herbicide Primextra® Gold TZ) and inorganic (copper) compounds on zooplankton and phytoplankton species. *Aquatic Toxicology*. 2016;177:33-43.

Fulladosa E, Murat JC, Martinez M, Villaescusa I. Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target. *Chemosphere*. 2005;58:551-557.

Giacomin M, Jorge MB, Bianchini A. Effects of copper exposure on the energy metabolism in juveniles of the marine clam *Mesodesma mactroides*. *Aquatic Toxicology*. 2014;152:30-37.

Godoy AA, Kummrow F, Pamplin PAZ. Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment - A review. *Chemosphere*. 2015;138:281-291.

Goeman JJ, van de Geer SA, de Kort F, van Houwelingen HC. A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics*. 2004;20:93-99.

Gomes T, Gonzalez-Rey M, Rodriguez-Romero A, Trombini C, Riba I, Blasco J, Bebianno MJ. Biomarkers in *Nereis diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) as management tools for environmental assessment on the southwest Iberian coast. *Scientia Marina*. 2013;77:69-78.

Gonzalez A, Vera J, Castro J, Dennett G, Mellado M, Morales B, Correa JÁ, Moenne A. Co-occurring increases of calcium and organellar reactive oxygen species determine differential activation of antioxidant and defense enzymes in *Ulva compressa* (Chlorophyta) exposed to copper excess. *Plant, Cell & Environment*. 2010;33:1627-1640.

Gouveia C, Kreusch M, Schmidt E, Felix MRL, Osorio LKP, Pereira DT, dos Santos R, Ouriques LC, Martins RP, Latini A, Ramlov F, Carvalho TJG, Chow F, Maraschin M, Bouzon ZL. The effects of lead and copper on the cellular architecture and metabolism of the red alga *Gracilaria domingensis*. *Microscopy and Microanalysis*. 2013;19:513-524.

Hegeman AD. Plant metabolomics-meeting the analytical challenges of comprehensive metabolite analysis. *Briefings in Functional Genomics*. 2010;9:139-148

Hildering A, Keesen AM, van Rijswick HFMW. Tackling pollution of the Mediterranean Sea from land-based sources by an integrated ecosystem approach and the use of the combined international and European legal regimes. *Utrecht Law Rev*. 2009;5:80-100.

Islam S, Tanaka M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*. 2004;48:624-649.

Jemec A, Kahru A, Potthoff A, Drobne D, Heinlaan M, Bohme S, Geppert M, Novak S, Schirmer K, Rekulapally R, Singh S, Aruoja V, Sihtmae M, Juganson K, Kakinen A, Kuhnel D. An interlaboratory comparison of nanosilver characterisation and hazard identification: Harmonising techniques for high quality data. *Environment International*. 2016;87:20-32.

Jensen RG. Activation of Rubisco regulates photosynthesis at high temperature and CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:12937-12938.

Kovacik J, Gruz J, Backor M, Tomko J, Strnad M, Repcak M. Phenolic compounds composition and physiological attributes of *Matricaria chamomilla* grown in copper excess. *Environmental and Experimental Botany*. 2008;62:145-152.

Kovacik J, Klejdus B, Stork F, Hedbavny J, Backor M. Comparison of methyl jasmonate and cadmium effect on selected physiological parameters in

Scenedesmus quadricauda (Chlorophyta, Chlorophyceae). *Journal of Phycology*. 2011;47:1044-1049.

Kumar M, Kuzhiumparambil U, Pernice M, Jiang Z, Ralph PJ. Metabolomics: an emerging frontier of systems biology in marine macrophytes. *Algal Research*. 2016;16:76-92.

Lane TQ, Saito MA, George GN, Pickering IJ, Prince RC, Morel FMM. Biochemistry: A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*. 2005;435:42.

Levy JL, Angel BM, Stauber JL, Poon WL, Simpson SL, Cheng SH, Jolley DF. Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: Comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species. *Aquatic Toxicology*. 2008;89:82-93.

Li J, Leisner SM. Alleviation of Copper Toxicity in *Arabidopsis thaliana* by Silicon Addition to Hydroponic Solutions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2008;133:670-677.

Lin CY, Viant MR, Tjeerdema RS. Metabolomics: Methodologies and applications in the environmental sciences. *Journal of Pesticide Science*. 2006;31:245-251.

Machado AAdeS, Spencer K, Kloas W, Toffolon M, Zarfl C. Metal fate and effects in estuaries: A review and conceptual model for better understanding of toxicity. *Science of The Total Environment*. 2016;541:268-281.

Marques CR. Bio-rescue of marine environments: On the track of microbially-based metal/metalloid remediation. *Science of The Total Environment*. 2016;565:165-180.

Martins AP, Yokoya NS, Colepicolo P. Biochemical Modulation by Carbon and Nitrogen Addition in Cultures of *Dictyota menstrualis*. *Marine Biotechnology*. 2016;18:314-326.

Medina MH, Morandi B, Correa JA. Copper effects in the copepod *Tigriopus angulatus* Lang, 1933: natural broad tolerance allows maintenance of food webs in copper-enriched coastal areas. 2008;59:1061-1066.

Mendes LF, Vale LAS, Martins AP, Yokoya NS, Soriano EM, Colepicolo P. Influence of temperature, light and nutrients on the growth rates of the macroalga *Gracilaria domingensis* in synthetic Seawater using experimental design. J Appl Phycol. 2012;4:1419-1426.

Mendes LF, Zambotti-Villela L, Yokoya NS, Bastos EL, Stevani CV, Colepicolo P. Prediction of mono -, bi -, and trivalent metal cation relative toxicity to the seaweed *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) in synthetic seawater. Environmental Toxicology and Chemistry. 2013b;32:2571-2575.

Mendes LF, Zambotti-Villela L, Colepicolo P, Marinho-Soriano E, Stevani CV, Yokoya NS. Metal cation toxicity in the alga *Gracilaria domingensis* as evaluated by the daily growth rates in synthetic seawater. J Applied Phycology. 2013a;25:1939-1947

Mendes LF, Stevani CV, Zambotti-Villela L, Yokoya NS, Colepicolo P. Toxic effect of metal cation binary mixtures to the seaweed *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Environmental Science and Pollution Research. 2014;21:8216-8223.

Mendes LF, Zambotti-Villela L, Simas-Rodrigues C, Colepicolo P. Toxicological effects of metal-EDTA/NTA complex formation in a synthetic medium on the macroalga *Gracilaria domingensis*. Journal of Applied Phycology. 2015;27:1307-1314.

Moenne A, González A, Sáez CA. Mechanisms of metal tolerance in marine macroalgae, with emphasis on copper tolerance in Chlorophyta and Rhodophyta. *Aquatic Toxicology*. 2016;176:30-37.

Mu JL, Jin F, Wang JY, Wang Y, Cong Y. The effects of CYP1A inhibition on alkyl-phenanthrene metabolism and embryotoxicity in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Environmental Science and Pollution Research*. 2016;23:11289-11297.

Muller EB, Hanna SK, Lenihan HS, Miller RJ, Nisbet RM. Impact of engineered zinc oxide nanoparticles on the energy budgets of *Mytilus galloprovincialis*. *J Sea Research*. 2014;94:29-36.

Nagaiyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environment Chemistry Letters*. 2010;8:199-216.

Nielsen SL, Banta GT, Khan FR, Palmqvist A. Copper in the sediment: a major stressor for eelgrass, *Zostera marina* L. *Hydrobiologia*. 2017;788:143-155.

Nilsen J, Oliver S. The next wave in metaboloma analysis. *Trends Biotechnol*. 2005;23:544-546.

Othman HB, Leboulanger C, Floc'h EL, Mabrouk HH, Hlaili AS. Toxicity of benz(a)anthracene and fluoranthene to marine phytoplankton in culture: Does cell size really matter?. *J Hazardous Materials*. 2012;243:204-211.

Pavasant P, Apiratikul R, Sungkhum V, Suthiparinyanont P, Wattanachira S, Marhaba TF. Biosorption of Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, and Zn²⁺ using dried marine green macroalga *Caulerpa lentillifera*. *Bioresour Technol*. 2006;97:2321-2329.

Pinto E, Carvalho AP, Cardozo KHM, Malcata FX, Anjos FM d, Colepicolo P. Effects of heavy metals and light levels on the biosynthesis of carotenoids and fatty acids in

the macroalgae *Gracilaria tenuistipitata* (var. *liui* Zhang & Xia). *Rev Bras Farmacognosia*. 2011;21:349–354

Pinto E, Sigaud-kutner TCS, Leitão MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*. 2003;39:1008-1018.

Plancke C, Vigeolas H, Höhner R, Roberty S, Emonds-Alt B, Larosa V, Willamme R, Duby F, Dhali DO, Thonart P, Hiligsmann S, Franck F, Eppe G, Cardol P, Hippler M, Remacle C. Lack of isocitrate lyase in *Chlamydomonas* leads to changes in carbon metabolism and in the response to oxidative stress under mixotrophic growth. *Plant Journal*. 2014;77:404-417.

Qiao X, Wang P, Shi G, Yang H. Zinc conferred cadmium tolerance in *Lemna minor* L. via modulating polyamines and proline metabolism. *Plant Growth Regulation*. 2015;77:1-9.

Ramlov F, Plastino EM, Yokoya NS. Growth, callus formation and plant regeneration in color morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) cultured under different irradiance and plant growth regulators. *Phycologia*. 2013;52:508-516.

Ramlov F. 2010. Variação sazonal dos carotenóides e compostos fenólicos e estudos fisiológicos em diferentes estádios reprodutivos de *Gracilaria domingensis* (Kuttz.) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta). Tese de Doutorado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. 150 p.

Romano RL, Liria CW, Machini MT, Colepicolo P, Zambotti-Villela L. Cadmium decreases the levels of glutathione and enhances the phytochelatin concentration in the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *Journal of Applied Phycology*. 2017;DOI: 10.1007/s10811-016-0927-z

Saini V, Cumming BM, Guidry L, Lamprecht DA, Adamson JH, Reddy VP, Chinta KC, Mazorodze JH, Glasgow JN, Richard-Greenblatt M, Gomez-Velasco A, Bach H, Av-Gay Y, Eoh H, Rhee K, Steyn AJ. Ergothioneine Maintains Redox and Bioenergetic Homeostasis Essential for Drug Susceptibility and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Rep*. 2016;14:572-585.

Salem MA, Jüppner J, Bajdzienko K, Giavalisco P. Protocol: a fast, comprehensive and reproducible one-step extraction method for the rapid preparation of polar and semi-polar metabolites, lipids, proteins, starch and cell wall polymers from a single sample. *Plant Methods*. 2016;12:45.

Schmidt EC, Felix MRdeL, Kreusch MG, Pereira DT, Costa GB, Simioni C, Ouriques LC, Steiner N, Chow F, Floh ESL, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL. Profiles of carotenoids and amino acids and total phenolic compounds of the red alga *Pterocladia capillacea* exposed to cadmium and different salinities. *Journal of Applied Phycology*. 2016;28:1955-1963.

Sharma SS, Dietz KJ. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*. 2006;57:711-726.

Sheng PX, Ting Y-P J, Chen JP. Biosorption of heavy metal ions (Pb, Cu, and Cd) from aqueous solutions by the marine alga *Sargassum* sp. in single- and multiple-metal systems. *Ind. Eng Chem Res*. 2007;46:2438-2444.

Siripornadulsil S, Traina S, Verma DPS, Sayre RT. Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. *Plant Cell*. 2002;14:2837-2847.

Smart KF, Aggio RB, Van Houtte JR, Villas-Bôas SG. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Nature Protocols*. 2010;5:1709-1729.

Souza JMC, Yokoya NS. Effects of cytokinins on physiological and biochemical responses of the agar-producing red alga *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*. 2016;28:3491-3499.

Szabados L, Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 2009;15:89-97.

Taylor TC, Andersson I. Structural transitions during activation and ligand binding in hexadecameric Rubisco inferred from the crystal structure of the activated unliganded spinach enzyme. *Nat Struct Biol*. 1996;3:95-101.

Timm S, Florian A, Arrivault S, Stitt M, Fernie AR, Bauwe H. Glycine decarboxylase controls photosynthesis and plant growth. *FEBS Letters* 2012;586:3692-3697

Timm S, Florian A, Wittmiss M, Jahnke K, Hagemann M, Fernie AR, Bauwe H. Serine Acts as a Metabolic Signal for the Transcriptional Control of Photorespiration-Related Genes in Arabidopsis. *American Society of Plant Biologists*. 2013;162:379-389.

Timm S, Florian A, Fernie AR, Bauwe H. The regulatory interplay between photorespiration and photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67:2923-2929

Tiquio MaGJP, Marmier N, Francour P. Management frameworks for coastal and marine pollution in the European and South East Asian regions. *Ocean & Coastal Management*. 2017;135:65-78.

Torres MA, Barros MP, Campos SCG, Pinto E, Rajamani S, Sayre R, Colepicolo P. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008;71:1-15.

van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data . *BMC Genomics.* 2006;7:PMC1534033

van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2003;13:57-149.

van Gestel CAM, van Brummelen TC. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology.* 1996;5:217-225.

Villas-Bôas SG, Roessner U, Hanses MAE. et al. Metabolome Analysis – an Introduction. 319p. 2007.

Volterra L, Conti ME. Algae as biomarkers, bioaccumulators and toxin producers. *Int J Environ Pollut.* 2000;13:92-125.

Wang B, Chu J, Yu T, Xu Q, Sun X, Yuan J, Xiong G, Wang G, Wang Y, Li J. Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015;112:4821-4826.

Wang W, Li H, Lin X, Zhang F, Fang B, Wang Z. The effect of polar auxin transport on adventitious branches formation in *Gracilaria lichenoides* in vitro. *Physiologia Plantarum.* 2016;158:356-365.

Wang X, Yang B, Sun H, Zhang A. Pattern recognition approaches and computational systems tools for ultra performance liquid chromatography-mass

spectrometry-based comprehensive metabolomic profiling and pathways analysis of biological data sets. *Anal. Chem.* 2012;84:428-439.

Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, Gottfries J, Moritz T, Trygg J. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal. Chem.* 2008;80:115-122.

Woodward AW, Bartel B. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany.* 2005;95:707-735.

Worley B, Powers R. PCA as practical indicator of OPLS-DA model reliability. *Curr Metabolomics.* 2016;4:97-103.

Xia J, Wishart DS. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. *Bioinformatics.* 2010;26:2342-2344.

Xia J, Wishart DS. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinform.* 2016;55:14.10.1-14.10.91.

Yokoya NS. 1996. Controle do desenvolvimento e da morfogênese por auxinas e citocinas em três espécies de rodófitas: *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gratelupia dichotoma* e *Solieria filiformis*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 202 p.

ALANINE, ASPARTATE AND GLUTAMATE METABOLISM

Figura A 8 Metabolismo do enxofre da macroalga *Chondrus crispus*. Fonte: **KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**

Figura A 9 Metabolismo do metano da macroalga *Chondrus crispus*. Fonte: **KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**

PHENYLALANINE METABOLISM

Figura A 10 Metabolismo da fenilalanina da macroalga *Chondrus crispus*. Fonte: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Figura A 11 Metabolismo de arginina e prolina da macroalga *Chondrus crispus*. Fonte: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes