

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Terpenoma de cianobactérias isoladas de lagoas salino-alcálinas do Pantanal

Mauricio Junior Machado

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2022

Mauricio Junior Machado
Engenheiro Agrônomo

Terpenoma de cianobactérias isoladas de lagoas salino-alcálinas do Pantanal
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Machado, Mauricio Junior

Terpenoma de cianobactérias isoladas de lagoas salino-alcálinas do Pantanal / Mauricio Junior Machado - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

76 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Ambientes extremos 2. Genômica 3. Metabolômica 4. Metabólitos especializados 5. Terpenóides I. Título

DEDICO aos meus pais Iolanda e
Mauricio e minha irmã Yorrana,
que estiveram sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por me conceder saúde, persistência e coragem para seguir em busca dos meus sonhos.

Aos meus pais, Iolanda e Mauricio e minha irmã Yorrana, por todo amor, apoio e mesmo estando longe sempre estarem comigo.

À Prof^a. Dr^a. Marli F. Fiore, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e orientação.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola da ESALQ-USP, em especial a secretária Maria Solizete Granziol Silva por todo auxílio prestado.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA-USP, pelo fornecimento da infraestrutura para realização do trabalho.

Ao Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da Universidade de São Paulo, em especial a Dr^a. Fernanda Rios Jacinavicius pela disponibilidade e ensinamentos na interpretação das análises.

Às funcionárias do laboratório de Biologia Celular e Molecular CENA-USP Ana Paula Dini Andreote e Renata Beatriz Cruz, por toda ajuda, apoio, conselhos e ensinamentos.

Aos membros do grupo CYANOS, Anderson Feitosa, Carolinne Carvalho, Andrews Delbaje, Gabriel Schimmelpfeng, Rafael B. Dextro, Rafael Erler, Simone Cotta, Thierry Pellegrinetti, Tiago Leão e a Yara Barros por toda ajuda, ensinamentos, conversas e discussões.

Aos amigos Izilda Munhoz e Diogo Munhoz (*in memoriam*), pelo acolhimento na cidade de Piracicaba.

Ao Projeto temático “Mudanças climáticas e impactos ambientais em áreas alagadas (wetlands) do Pantanal (Brasil): quantificação, fatores de controle e previsão em longo prazo” (FAPESP: 16/14227-5).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

"A persistência é o caminho do êxito."

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Lagoas salino-alcálinas do Pantanal	11
2.2 Cianobactérias	12
2.3 Via MEP para biossíntese de terpenos e terpenóides em cianobactérias	13
2.4 Predição e caracterização de metabólitos	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.1 Objetivos específicos	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Análises genômicas <i>in silico</i>	23
4.1.1 Genomas de cianobactérias e MAGs	23
4.1.2. Anotações de genes e agrupamentos gênicos	24
4.1.3. Análise comparativa dos agrupamentos gênicos e genes	25
4.2 Análise química	25
4.2.1 Produção de biomassa e extração dos compostos	25
4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa de alta resolução	25
4.2.3 Análise dos dados de HPLC-MS/MS	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Anotações e análises comparativas da via MEP e agrupamentos gênicos preditos pelo AntiSMASH	29
5.2 Desreplicação dos compostos	40
6 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	67

RESUMO

Terpenoma de cianobactérias isoladas de lagoas salino-alcálinas do Pantanal

No Pantanal brasileiro existem lagoas salino-alcálinas que exibem alto pH e concentrações de sais, onde ocorrem florações de cianobactérias apesar das condições extremas destes ambientes. Esses organismos fotossintetizantes oxigênicos são capazes de produzir diversos metabólitos especializados para a sua sobrevivência, os quais podem ter potencial aplicação biotecnológica. Dentre esses metabólitos produzidos pelas cianobactérias está a classe dos terpenos e terpenóides. Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar a mineração de agrupamentos gênicos de terpenos e terpenóides em genomas de cianobactérias isoladas de lagoas salino-alcálinas do Pantanal [*Alkalinema pantanalense* CENA528, *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563, *Geminocystis* sp. CENA526, *Arthrospira platensis* CENA597 e CENA650, *Pantanalinema rosanae* CENA516 e 11 genomas montados a partir de metagenomas (MAGs – *Metagenome-Assembled Genomes*)]. A via biossintética de terpenos foi visualizada usando a ferramenta BlastKOALA e os agrupamentos de genes preditos na plataforma antiSMASH. Os genes e agrupamentos foram analisados quanto a sintenia e ortologia e comparados aos disponíveis nos bancos de dados. Os extratos celulares da biomassa cultivada das seis linhagens foram analisados por LC-MS/MS para identificar os metabólitos produzidos. Todos os genomas e MAGs apresentaram a via biossintética dos compostos precursores dos terpenos, assim como as vias de biossintese de tetraterpenóides e ubiquinonas. Genes envolvidos na biossintese de esqualeno e hopeno, triterpenóides, foram identificados somente em três genomas e em uma das MAGs. As análises de ortologia e sintenia mostraram que os genes da biossintese de terpenóides são mais conservados entre gêneros e possuem identidade média de 60% para o filo Cyanobacteria. Na desreplicação dos compostos, o maior número foi identificado como pertencentes ao grupo dos tetraterpenóides. Outros compostos anotados nas linhagens foram Cibastacina A, um raro sesterterpeno, Austinoneol, um meroterpenóide e a lactona diterpênica Scytoficina. A utilização das ferramentas *in silico* para predição de genes e metabólitos conhecidos permitiu a exploração do terpenoma de cianobactérias que habitam as lagoas salino-alcálinas do Pantanal, abrindo caminho para futuras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Ambientes extremos, Genômica, Metabolômica, Metabólitos especializados, Terpenóides

ABSTRACT

Terpenome of cyanobacteria isolated from soda-lakes of the Pantanal

In the Brazilian Pantanal exist soda lakes that present high pH and salt concentrations, where cyanobacterial blooms occur despite the extreme conditions of these environments. These oxygenic photosynthesizers are capable of producing several specialized metabolites for their survival, which may have potential biotechnological application. Among these metabolites produced by cyanobacteria is the class of terpenes and terpenoids. Thus, the objective of this study was to carry out the mining of terpene and terpenoid gene clusters in the genomes of cyanobacteria isolated from Pantanal soda lakes, [*Alkalinema pantanalense* CENA528, *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563, *Geminocystis* sp. CENA526, *Arthrospira platensis* CENA597 e CENA650, *Pantanalinema rosanae* CENA516 and 11 Metagenome-Assembled Genomes (MAGs)]. The terpene biosynthetic pathway was visualized using BlastKOALA tool and predicted gene clusters in the antiSMASH platform. The genes and clusters were analyzed for synteny and orthology and compared to those available in the databases. Cell extracts from the cultivated biomass of the six strains were analyzed by LC-MS/MS to identify the metabolites produced. All genomes and MAGs showed the biosynthetic pathway of terpene precursors, as well as the biosynthetic pathways of tetraterpenoids and ubiquinones. Genes involved in the biosynthesis of squalene and hopene, triterpenoids, were identified only in three genomes and in one of the MAGs. The orthology and synteny analyses showed that terpenoid biosynthesis genes are more conserved among genera and have an average identity of 60% for the phylum Cyanobacteria. In the dereplication of the compounds, the largest number was identified as belonging to the group of tetraterpenoids. In two of the three strains that presented the triterpenes biosynthetic genes, the compound bacteriohopanetetrol was annotated. Other compounds annotated in the strains were Cybastacin A, a rare sesterterpene, Austinoneol, a meroterpenoid and the diterpene lactone Scytoficina. The use of *in silico* tools to predict known genes and metabolites allowed to explore the terpenome of cyanobacteria that inhabit the Pantanal soda lakes, paving the way for future biotechnological applications.

Keywords: Extremal environments, Genomics, Metabolomics, Specialized metabolites, Terpenoids

1 INTRODUÇÃO

O Pantanal é um bioma localizado em grande parte na região Centro-Oeste do Brasil, estendendo-se pelo Paraguai e Bolívia e é conhecido por ser a maior planície alagável do Planeta. Uma de suas sub-regiões, denominada Nhecolândia, apresenta centenas de lagoas salino-alcálicas que coexistem com lagoas de água doce, e apesar de muito próximas umas às outras, todas possuem suas próprias características químicas, físicas e biológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2011; PELLEGRINETTI *et al.*, 2022). Mesmo apresentando condições extremas, como o alto pH da água (> 9) e salinidade, muitas destas lagoas apresentam a ocorrência de florações de cianobactérias (ALMEIDA *et al.*, 2011). Os principais gêneros cianobacterianos descritos conhecidos que habitam estas lagoas são: *Alkalinema*, *Anabaenopsis*, *Cyanobacterium*, *Geminocystis*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Arthrospira*, *Pantanalinema* e *Phormidium* (ANDREOTE *et al.*, 2014; VAZ *et al.*, 2015; COSTA, KOLMAN e GIANI, 2016).

As cianobactérias são responsáveis por exercerem diversas atividades nos ciclos biogeoquímicos destas lagoas e por produzirem diversas biomoléculas ativas com potenciais aplicações biotecnológicas (ANDREOTE *et al.*, 2018). Dentre essas substâncias estão os terpenos e terpenóides, que são produzidos pela via do metileritritol-fosfato (MEP). Os terpenóides desempenham um papel fundamental no crescimento e sobrevivência dos organismos fotossintéticos porque formam a estrutura básica dos carotenóides, tocoferóis, fitol, esteróis e hormônios (LINDBERG, PARK e MELIS, 2010), além de atuarem nas cadeias das clorofilas, ubiquinonas e plastoquinonas, essenciais na fotossíntese e fosforilação oxidativa. Esses metabólitos são substâncias químicas de alto valor, podendo ser utilizados na produção de sabores, perfumes, medicamentos, cosméticos e combustíveis (BREITMAIER, 2006).

Terpenoma é definido como todos os compostos naturais semelhantes e derivados de terpenos, incluindo os terpenóides e esteróides (CHRISTIANSON, 2008). Dezenas de milhares de terpenóides estão presentes em plantas, algas, fungos e bactérias e o progresso da exploração e descrição dos compostos terpênicos de origem bacteriana tem aumentado pelo advento das técnicas de mineração de genomas (CANE e IKEDA, 2012). Na era genômica, em que o número de genomas disponíveis está aumentando, estas técnicas permitem pesquisar agrupamentos de genes biossintéticos com alta probabilidade de codificar compostos bioativos anteriormente desconhecidos, permitindo ainda, acessar a biodiversidade desconhecida de muitos lugares (ALBARANO *et al.*, 2020; BAUMAN *et al.*, 2021).

A via de produção de terpenos em cianobactérias já foi reportada por Englund *et al.*, (2014), Kudoh *et al.*, (2014) e Dienst *et al.*, (2020), sendo observado a produção de diversos terpenóides através da via MEP com aplicação biotecnológica. Sendo assim, o estudo de potenciais compostos terpênicos por meio da mineração de genomas e metabolomas mostram-se como uma promissora forma de acessar esses compostos especializados. Ainda, pelo fato desses organismos serem fotoautotróficos favorecer a produção em larga escala dessas moléculas, assim como seu isolamento é promissor na produção sustentável de diversos produtos que podem ser empregados na indústria farmacêutica, química e na agricultura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lagoas salino-alcálinas do Pantanal

O bioma Pantanal é uma das maiores planícies inundáveis do planeta, com área superior a 140.000 Km², localizado em território brasileiro, na região Centro-Oeste nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, estendendo-se pelo Paraguai e Bolívia. A sub-região denominada Nhecolândia, que compreende uma área de 24.000 Km², possui cerca de 15.000 lagoas. Essas lagoas são heterogêneas, separadas por elevações no terreno, com cerca de 2 metros de altura, são geralmente rasas (< 2 metros) e podem possuir águas doces ou salgadas (MARTINS, 2012). Estima-se que cerca de 600 dessas lagoas apresentam alcalinidade, condutividade elétrica e pH elevados e são povoadas por microrganismos tolerantes a estas condições (BARBIERO *et al.*, 2002, FURIAN *et al.*, 2013, BERGIER, KRUSCHE e GUÉRIN, 2014).

Ambientes extremos são conhecidos por abrigarem uma biodiversidade de microrganismos com potencial importância econômica e ambiental, uma vez que são produtores de moléculas interessantes sob o ponto de vista biotecnológico. A bactéria halofílica *Halomonas spp.* (Gammaproteobacteria) pode produzir poli-β-hidroxialcanoato (PHA), um polímero utilizado para produção de bioplásticos (QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2007). Vários compostos protetores de radiação UV foram isolados de bactérias extremófilas resistentes a UV como citonemina e aminoácidos tipo micosporina (MAAs) (SINGH *et al.*, 2010; RASTOGI e INCHAROENSAKDI, 2014). Ademais a biotecnologia microbiana tem potencial para melhorar o tratamento de águas residuais, auxiliar na redução da emissão de carbono, na geração de novas fontes de energia, além de usos na indústria química e farmacêutica (NIELSEN, 2017).

As lagoas salinas da Nhecolândia são ecossistemas únicos de grande importância biológica e ecológica, e vêm sendo estudadas no que diz respeito ao seu funcionamento hidrológico, geoquímico e funções biogeoquímicas (BARBIERO *et al.*, 2008, MARTINS, 2012, FURIAN *et al.*, 2013). Os aspectos microbiológicos destas lagoas foram estudados por Santos e Sant'Ana (2010), Andreote *et al.*, (2014, 2018) e Costa, Kolman e Giani (2016). Os autores observaram que as lagoas salino-alcálinas apresentaram floração de cianobactérias com sua dominância favorecida sobre outros táxons em algumas lagoas. O filo Cyanobacteria possui grande importância como produtor primário de matéria orgânica e aporte de nutrientes em ambientes salinos sendo um organismo estruturante de ambientes aquáticos com seu desenvolvimento favorecido em decorrência de adaptações fisiológicas (LÓPEZ-CÓRTEZ *et al.*, 2001).

2.2 Cianobactérias

As cianobactérias são uns dos grupos de organismos mais antigos do planeta, compreendendo um dos maiores, mais diversos ecologicamente e bem-sucedidos grupo de bactérias na Terra (WILMOTTE, 1994, BLANK e SÁNCHEZ-BARACALDO, 2010). São microrganismos com plasticidade genética e fisiológica, o que favoreceu que se tornassem cosmopolitas, sendo comumente encontrados em corpos de água doce ou marinhos, no solo, sobre rochas, sobre troncos e folhas de plantas, e também em ambientes considerados extremos, como lagos com alto pH, desertos, águas termais e ambientes polares (QUESADA e VINCENT, 2012; SILVA *et al.*, 2014; ALVARENGA *et al.*, 2015; ANDREOTE *et al.*, 2018). Isto demonstra o sucesso da capacidade adaptativa deste filo em se estabelecer e desenvolver-se em diversos habitats.

Cianobactérias são bactérias gram-negativas, cuja morfologia varia desde formas unicelulares até talos formados por filamentos ramificados, com células diferenciadas (RAI, BERGMAN e RASMUSSEN, 2002, KOMÁREK *et al.*, 2014). Caracterizadas principalmente pela sua capacidade de realizar fotossíntese oxigênica (BLANK e SÁNCHEZ-BARACALDO, 2010), necessitam de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para sua sobrevivência. Sua natureza é tipicamente fotossintética aeróbica, mas algumas espécies são heterotróficas facultativas, podendo crescer no escuro e na presença de substratos orgânicos (SMITH, 1983; STAL e MOEZELAAR, 1997).

Assim como fungos filamentosos, leveduras, plantas e outras bactérias, as cianobactérias são também produtoras de metabólitos especializados, que não são necessários para o seu metabolismo primário, tais como, hidrocarbonetos, ácidos graxos, terpenóides, carotenóides, sacarídeos, lipopeptídeos e outros caracterizados como toxinas que possuem importantes atividades biológicas e ecológicas, podendo contribuir para a competição entre os organismos, realização de associações e simbioses (DEMBITSKY e REZANKA, 2005; LIAIMER *et al.*, 2015).

Embora a maioria dos agrupamentos gênicos levantados por mineração genômica para as cianobactérias ainda possuam produtos desconhecidos, e da maioria dos metabólitos especializados produzidos pelas cianobactérias ainda não serem conhecidos, a ecologia química deste filo é um tópico que está em expansão (LEÃO *et al.*, 2012; CALTEAU *et al.*, 2014). As cianobactérias têm sido consideradas como um dos mais promissores grupos de organismos capazes de produzir metabólitos com aplicações farmacêuticas, principalmente pertencentes às classes de peptídeos não ribossomais (NRPs), peptídeos sintetizados por ribossomos e peptídeos modificados pós-tradução (RiPPs), policetídeos (PKs) e os NRPs/PKs

híbridos (DEMAY *et al.*, 2019, KHALIFA *et al.*, 2021). Estas classes de substâncias apresentam atividades antitumorais, antibacterianas, antivirais, anti-inflamatórias, antifúngicas, dentre outras (DITTMANN *et al.*, 2015). Além disso, uma grande variedade de moléculas terpenóides vem sendo encontradas em cianobactérias (NANDAGOPAL *et al.*, 2021).

2.3 Via MEP para biossíntese de terpenos e terpenóides em cianobactérias

Os terpenóides ou isoprenóides são uma grande classe de substâncias com dezenas de milhares de substâncias terpenóides conhecidas. Em todos os organismos vivos, os terpenóides desempenham um papel na respiração pelo transporte de elétrons em cadeia (ubiquinonas e menaquinonas), bem como atuam na parede celular e na membrana, na biossíntese e estabilidade (bactoprenol, hopanóides em bactérias e esteróis em plantas). As plantas são uma das principais fontes de diversidade terpenóides, outras funções conhecidas dos terpenóides em vegetais, incluem papéis importantes na resposta ao estresse ou em mecanismos de defesa (MAZID, KHAN, e MOHAMMAD, 2011; THOLL, 2006). Os terpenóides são vitais para o crescimento e sobrevivência das cianobactérias, uma vez que desempenham um papel essencial na conversão da luz em energia química e na montagem e função dos centros de reação fotossintética.

Apesar de sua diversidade em estrutura e função, todos os terpenóides são sintetizados a partir do mesmo carbono difosfato de isopentenil (IPP) e difosfato de dimetilalil (DMAPP). Sendo ambos originados de qualquer uma das duas vias de produção dos terpenos. A via do mevalonato (MVA) que usa acetil-CoA como um substrato e o converte em seis etapas, onde o mevalonato é um intermediário, para IPP, que pode ser interconvertido em DMAPP por uma isomerase (CHANG, *et al.* 2013). Este caminho opera em eucariotos, arqueias e algumas bactérias, e por muito tempo foi considerada a rota exclusiva para formação de terpenóides nos organismos. No entanto em 1993, foi descoberta uma rota alternativa para a biossíntese de terpenóides em bactérias, que usa piruvato e gliceraldeído-3-fosfato como substratos para formar tanto IPP quanto DMADP (ROHMER *et al.*, 1993; ROHMER, *et al.*, 1996), denominada como via MEP (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato), sendo esta a via metabólica para produção de terpenos encontrada nas cianobactérias.

A via MEP consiste em sete reações enzimáticas (Figura 1). (1) DXP sintase (*DXS*) que catalisa a condensação de gliceraldeído-3-fosfato e piruvato em DXP; (2) DXP redutoisomerase (*DXR* ou *IspC*) que reduz DXP a 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP); (3) MEP-citidiltransferase (*IspD*) que catalisa a citidilação de MEP em 4-difosfocitidil-2-C-metil-

D-eritritol (CDP-ME); (4) CDP-ME quinase (*ispE*) que fosforila CDP-ME em difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP); (5) 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase (MEcPP Sintase ou *ispF*) que catalisa a síntese de MEcPP a partir de CDP-MEP; (6) 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintase (HMBPP sintase ou *IspG*) que catalisa a redução de MEcP para formar um difosfato linear HMBPP; e (7) HMBPP redutase (*IspH*) que catalisa a produção de IPP e DMAPP a partir de HMBPP para produzir a estrutura principal de isoprenóides. A enzima isopentenil difosfato isomerase (*idi*) interconverte IPP e DMAPP, apesar de poderem ser produzidos diretamente pela enzima *ispH* (ZHAO *et al.*, 2013; LIN e PAKRASI, 2019). A formação de terpenóides específicos originários destas moléculas precursoras requer terpeno sintases que utilizam DMAPP, GPP, FPP ou GGPP como substrato (DAVIES, JINKERSON e POSEWITZ, 2015).

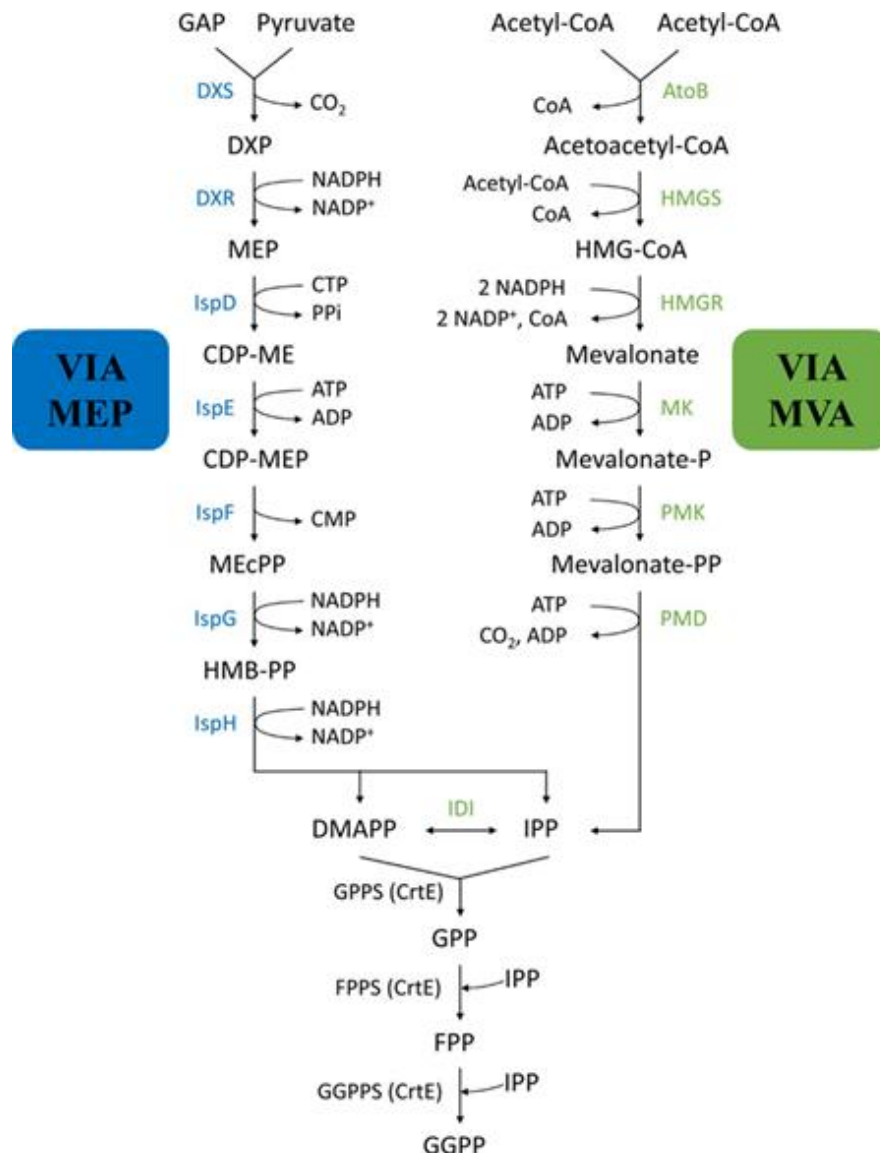


Figura 1. Vias metabólicas da biossíntese de terpenóides, adaptado de Lin e Pakrasi (2019).

O terpenoma bacteriano compreende diversos grupos de terpenos caracterizados por estudos bioquímicos e genômicos cuja produção é associada ao domínio Bacteria (RUDOLF *et al.* 2021). Os terpenos são divididos em subclasses que consistem principalmente na ligação de múltiplos de isoprenil (5 unidades de carbono) entre si, além de reações subsequentes que modificam sua estrutura.

Os hemiterpenóides (C5) são os menores terpenos, pois são gerados diretamente dos blocos de construção IPP e DMAPP sem a adição de quaisquer outras porções químicas. Existem apenas três hemiterpenóides conhecidos que foram isolados de bactérias: isopreno, isoprenol e prenol (MC GENITY, CROMBIE e MURRELL, 2018). O hidrocarboneto volátil isopreno (**1**) é um valioso bloco de construção de polímeros na indústria de química sintética e um potencial biocombustível. A produção de isopreno ocorre naturalmente em algumas cianobactérias marinhas, no entanto a maioria das cianobactérias não possuem um gene de isopreno sintase para a formação de isopreno, porém, com o auxílio da expressão heteróloga utilizando genes nativos da via MVA de plantas a produção pode ser induzida (BENTLEY, ZURBRIGGEN e MELIS, 2014; PATTANAIK, e LINDBERG, 2015).

Os monoterpénóides (C10) são todos derivados do difosfato de geranil (GPP) e podem estar na forma linear ou cíclica, são exemplos: β -felandreno, geraniol, linalol, limoneno e mentol. Esses compostos são importantes componentes de extratos vegetais e óleos essenciais, possuem alta diversidade e são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética, agrícola e alimentícia e como combustíveis renováveis. Algumas espécies de cianobactérias filamentosas produzem o metabólito volátil 2-metilisaborneol (MIB) (**2**), que ainda não tem função biológica determinada, mas é conhecido por dar sabor e odor terroso à água (NAKANO, KIM e OHNISHI, 2011; Li *et al.* 2012, TANG *et al.* 2018).

Sesquiterpenos (C15) são derivados da condensação de um monômero IPP adicional ao monoterpene GPP (C10) para formar difosfato de farnesil, FPP. Um grande número de compostos sesquiterpenos pode ser produzido, devido à maior variabilidade possibilitada pelo aumento do comprimento da cadeia, os compostos produzidos por cianobactérias mais estudados deste grupo incluem: α -bisabolol, β -cariofileno, farneseno e germacreno (RUDOLF *et al.* 2021). O álcool derivado de sesquiterpeno conhecido como geosmina (**3**) é produzido a partir de vários organismos, incluindo cianobactérias. A geosmina dá um sabor de terra e odor de mofo no abastecimento de água potável, assim como o MIB, sendo as cianobactérias relacionadas como as principais responsáveis por esta característica em reservatórios de água, podendo as florações de cianobactérias serem um problema para o abastecimento de água nas cidades (WANG *et al.* 2019).

Os diterpenóides (C20) são derivados do difosfato de geranylgeranyl (GGPP). As cianobactérias produzem vários diterpenos com funções específicas, por exemplo, tolipodiol (**4**), um composto detectado em *Tolypothrix nodosa* que demonstrou possuir propriedades anti-inflamatórias (PRINSEP *et al.* 1996), e o metabólito extracelular noscomin (**5**) que possui propriedades antibacterianas e que foi relatado em uma linhagem de *Nostoc commune* (JAKI, HEILMANN e STICHER, 2000). O GGPP também é o substrato para a formação do fitil, pela ação da enzima geranylgeranyl redutase. O fitol (**6**) é utilizado pelas cianobactérias para formação de tocoferóis, além de ser substrato para adição de fitol á cadeias laterais de clorofila, ubiquinonas, plastoquinona e filoquinona.

Os triterpenóides (C30) são biossintetizados através da condensação de duas moléculas de FPP para formar o precursor comum para todos os triterpenóides, o esqualeno (**7**). O próprio esqualeno é um antioxidante natural e tem uso comercial em cosméticos, nutrição e em vacinas. Os triterpenóides são amplamente distribuídos na natureza e têm papéis importantes na sinalização hormonal e na rigidez, estabilização e organização da membrana (SÁENZ *et al.* 2015). Nem todas as cianobactérias possuem o gene da esqualeno sintase (*sqs*), sendo a caracterização funcional deste gene em cianobactérias verificada experimentalmente por inativação do gene em *Thermosynechococcus elongatus* e *Synechocystis* sp. (LEE e POUTER 2008; ENGLUD *et al.* 2014). O acúmulo de esqualeno em cianobactérias foi observado na presença do gene *shc*, que é a enzima responsável pela ciclização do esqualeno para formar o hopeno (**8**), o precursor para a formação da subclasse de compostos triterpenos conhecidos como hopanóides (SIEDENBURG e JENDROSSEK, 2011).

Os tetraterpenóides (C40) são derivados do fitoeno formado por duas moléculas de GGPP. Embora sejam abundantes em número, os tetraterpenóides não são muito diversos estruturalmente, sendo que quase exclusivamente representados por carotenóides. Os carotenóides têm funções biológicas importantes, com papéis na captura de luz, atividade antioxidante e proteção contra os efeitos nocivos dos radicais livres, síntese de hormônios vegetais e como componentes estruturais em membranas. São componentes essenciais nas membranas fotossintéticas e juntamente com a clorofila estabilizam os centros de reação fotossintética e protegem e regulam a fotossíntese oxigenada (DOMONKOS, *et al.* 2013; MIRKOVIC, *et al.* 2017; SANDMANN, 2019). Além de suas funções biológicas, esses pigmentos têm uso comercial como corante alimentar, suplemento alimentar animal, em produtos nutracêuticos e farmacêuticos.

Os produtos naturais meroterpenóides são moléculas híbridas que consistem em uma porção terpenóide anexada a outro tipo estrutural. Essa adição fornece um conjunto totalmente diferente de grupos químicos que podem ser diversificadas estrutural e funcionalmente. Com base em suas origens biossintéticas, os meroterpenóides podem ser divididos em dois grandes grupos: policetídeos-terpenóides e não-policetídeos-terpenóides. Devido à sua diversidade estrutural, os meroterpenóides ilustraram uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas, tais como: antimicrobiana, anticancerígena/citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e anti-Leishmania. Dentre os inúmeros compostos representantes deste grupo, as clorofilas, fenóis, quinonas e α -tocoferol estão incluídos na classificação de meroterpenóides (GOZARI, *et al.* 2021; NAZIR, *et al.* 2021, RUDOLF *et al.* 2021).

Por meio da biologia sintética tornou-se possível desenvolver muitas variações da biossíntese de terpenóides cianobacterianos através do processo de fotossíntese. Um dos maiores desafios na engenharia genética da via MEP nas cianobactérias é a partição do carbono na fotossíntese, dado que cerca de 5% é destinado a via dos terpenos, mais especificamente para a produção de fitol, carotenóides e ubiquinonas, resultando em uma baixa produção de terpenóides (MELIS, 2013). Visando aumentar a quantidade de precursores de terpenos produzidos, os esforços da engenharia da via MEP em cianobactérias estão concentrados principalmente para a superexpressão das enzimas *dxs*, *ispD*, *ispF* e *idi*, permitindo assim aumentar a síntese de terpenos empregados na produção de biocombustíveis (ENGLUND *et al.*, 2014; HALLFMANN *et al.*, 2014; NIU *et al.*, 2017) e de taxol, um importante anticancerígeno (AJIKUMAR *et al.* 2010). No entanto, o conhecimento do terpenoma no que diz respeito às bibliotecas químicas, vias biossintéticas e suas aplicações ainda são limitados e separados em muitos casos, o que dificulta a descoberta e exploração do terpenoma bacteriano.

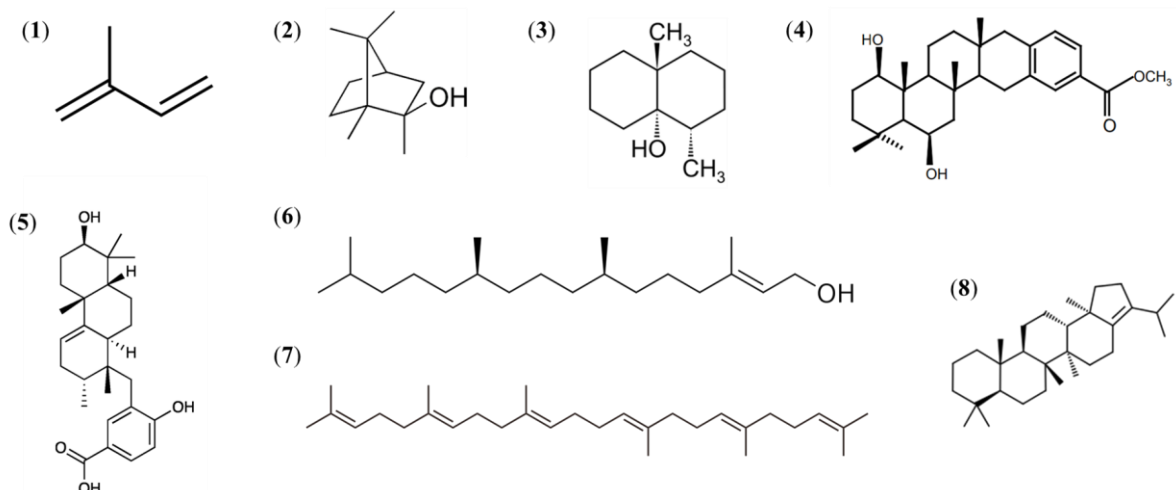


Figura 2. Compostos da classe dos terpenos produzidos pelas cianobactérias. 1: Isopreno; 2: 2-metilaborneol; 3: Geosmina; 4: Tolipodiol; 5: Noscomin; 6: Fitol; 7: Esqualeno e 8: Hopeno.

2.4 Predição e caracterização de metabólitos

Produtos naturais bacterianos, em particular metabólitos secundários ou especializados, são importantes fontes de moléculas para produção de medicamentos, biocombustíveis, entre outros. O aumento do número de dados de sequências genômicas e a utilização de métodos para identificação e classificação independentes de cultivo contribuiu para um aumento na descoberta de novos metabólitos especializados, proporcionando abordagens mais fáceis e baratas para a identificação e caracterização de metabólitos secundários, principalmente no desenvolvimento de ferramentas bio e quimioinformáticas (WINTER, BEHNKEN e HERTWECK, 2011; MICALLEF *et al.*, 2015; D'AGOSTINO *et al.*, 2016; WEBER e KIM, 2016).

Neste sentido a metagenômica, que é o sequenciamento não direcionado dos genomas microbianos presentes em uma amostra, auxilia não só a identificação da composição taxonômica e potencial funcional de micro-organismos e comunidades, como na recuperação de sequências de genomas inteiros (QUINCE, *et al.*, 2017). A mineração de dados genômicos e metagenômicos pode ser focada em vias biossintéticas putativas, agrupamentos gênicos ou genes que codificam enzimas e na descoberta de biocatalisadores para síntese e produção de metabólitos especializados com atividades bioativas (WONG, 2010). Esta estratégia permite partir da sequência gênica e chegar à predição da estrutura final da molécula, explorando assim a diversidade metabólica de micro-organismos. Isso tem impulsionado esforços para identificar e caracterizar esses compostos, além de abordagens clássicas para descoberta de produtos naturais.

A plataforma de análise de metabólitos secundários antiSMASH é um servidor *web* e um software autônomo que tem sido útil para a descoberta de novos metabólitos e auxiliado a engenharia metabólica. Tornou-se uma ferramenta padrão para analisar genoma de bactérias, fungos e plantas quanto ao seu potencial para produzir metabólitos secundários. Esta ferramenta ainda integra outros *softwares* já empregados na detecção de agrupamentos de genes de metabólitos secundários como o ClusterFider e o MIBiG para anotação dos grupos de genes biossintéticos (MAURYA e MISHRA, 2019; BLIN *et al.*, 2021). Ele combina a identificação automatizada de agrupamentos de genes de metabólitos secundários em sequências genômicas com uma grande coleção de algoritmos de análise de compostos específicos.

Técnicas de isolamento, identificação e quantificação de substâncias, como a cromatografia e a espectrometria de massas, são amplamente utilizadas para a exploração de novos metabólitos de amostras que muitas vezes possuem inúmeros metabólitos, com muitos deles já descritos. Com isto a desrepliação das amostras evita o reisolamento de compostos já descritos minimizando custos e desprendimento de tempo (GERWICK e MOORE, 2012). Dados espectroscópicos de LC-MS/MS de amostras complexas são utilizados para exploração de perfis de fragmentação de compostos quimicamente semelhantes, pois através dos íons fragmentos é possível inferir a estrutura química das moléculas (YAUNG *et al.*, 2013). Assim, novas abordagens como a plataforma GNPS foram desenvolvidas para orientar o isolamento de novos metabólitos, com redução dos custos e esforços despendidos para a identificação de metabólitos utilizados no método clássico.

O *Global Natural Products Social* (GNPS) cria redes moleculares baseada em fragmentação de espectros MS/MS, e é um exemplo de plataforma que pode ser integrada ao estudo de produtos naturais, para desrepliar extratos e compostos puros com certa facilidade (YANG *et al.*, 2013; WANG *et al.* 2016). Através de algoritmo computacional para comparar o grau de similaridade espectral entre os espectros MS/MS de diferentes compostos, esta técnica fornece uma visão geral de todos os íons que foram detectados e fragmentados na análise (QUINN *et al.* 2017). As redes moleculares criadas nesta plataforma são baseadas em produtos naturais estruturalmente relacionados que compartilham padrões de fragmentação de massa em tandem semelhantes e famílias moleculares que tendem a se agrupar e podem ser visualizadas em uma rede (YANG *et al.*, 2013, NAMAN, *et al.* 2017).

A prospecção de novos metabolitos pode ser feita também pela abordagem de mineração de genoma baseada em fenótipo. Recentemente uma ferramenta foi desenvolvida para conectar os grupos de genes biossintéticos preditos de genomas e metagenomas aos

espectros de LC-MS/MS de metabolomas não direcionados. A ferramenta *Natural Products Mixed Omics* (NPOmix) utiliza o aprendizado de máquina para preencher uma lacuna no estudo de produtos naturais inéditos e conhecidos, ligando o potencial biossintético inferido pela genômica ao metaboloma, melhorando os programas de engenharia metabólica e acelerando os programas de descoberta de produtos naturais (LEÃO *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi realizar a mineração de agrupamentos gênicos de terpenos e terpenóides em genomas de cianobactérias isoladas de lagoas salino-alcálicas do Pantanal, além de verificar a sua produção por análises de LC-MS/MS.

3.1 Objetivos específicos

- Identificar agrupamentos gênicos de terpenos e terpenóides nos genomas de linhagens de cianobactérias e nos genomas montados a partir de metagenomas ambientais (MAGs) provenientes de lagoas salino-alcálicas do Pantanal;
- Comparar os genes e agrupamentos gênicos identificados com outros existentes em bancos de dados públicos;
- Analisar a produção de compostos terpênicos utilizando cromatografia líquida e espectrometria de massas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análises genômicas *in silico*

4.1.1 Genomas de cianobactérias e MAGs

Os genomas de seis linhagens de cianobactérias isoladas das lagoas salino-alcálicas do Pantanal foram utilizados neste estudo, além de 11 genomas montados a partir de metagenomas (MAGs – *Metagenome-Assembled Genomes*) provenientes de água de 4 lagoas salino-alcálicas (Tabela 1). Os genomas e MAGs analisados foram previamente montados e estão disponíveis para o grupo de pesquisa de cianobactérias do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP. Estas sequências de genomas e metagenomas fazem parte do estudo da comunidade microbiana das lagoas salinas da Nhecolândia, e estão vinculados ao projeto temático da FAPESP “Mudanças climáticas e impactos ambientais em áreas alagadas (*wetlands*) do Pantanal (Brasil): quantificação, fatores de controle e previsão em longo prazo” (Processo: 16/14227-5).

Tabela 1. Genomas e MAG’s de cianobactérias utilizados no estudo, provenientes de lagoas salino-alcálicas do Pantanal, sub-região da Nhecolândia, MS (Continua).

Linhagem/MAG	Origem	Tamanho (Mpb)	Nº scaffolds	Completeness (%)
<i>Anabaenopsis elenkinii</i> CCIBt3563	Salina da Reserva, Fazenda Nhumirim, Corumbá	4,60	1	98,07
<i>Pantanalinema rosanaeae</i> CENA516	Salina Verde, Fazenda Centenário, Aquidauana	7,38	321	99,76
<i>Geminocystis</i> sp. CENA526	Salina Centenário, Fazenda Centenário, Aquidauana	5,06	740	99,78
<i>Alkalinema pantanalense</i> CENA528	Salina Preta, Fazenda Centenário, Aquidauana	6,52	314	99,29
<i>Arthrospira platensis</i> CENA597	Salina Grande, Fazenda Centenário, Aquidauana	8,84	1	99,78
<i>Arthrospira platensis</i> CENA650	Lagoa 08SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	6,21	501	99,78
MAG11-SR01-18	Lagoa 01SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	3,18	224	96,65
MAG14-SR04-18	Lagoa 04SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	2,99	321	90,04
MAG18-SR08-18	Lagoa 08SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	3,32	400	92,05
MAG19-SR01-18	Lagoa 01SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	3,28	280	91,08
MAG24-SR08-18	Lagoa 08SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	3,05	239	95,56

Tabela 1. Genomas e MAG's de cianobactérias provenientes de lagoas salino-alcálicas do pantanal da sub-região da Nhecolândia, MS (Conclusão).

Cianobactérias	Origem	Tamanho (Mpb)	Nº. scaffolds	Completo (%)
MAG36-SR04-18	Lagoa 04SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	4,83	209	97,16
MAG42-SR04-18	Lagoa 04SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	3,53	264	93,43
MAG45-SR08-18	Lagoa 08SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	2,86	96	98,26
MAG48-SR05-18	Lagoa 05SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	1,74	262	77,03
MAG49-SR05-18	Lagoa 05SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	2,94	340	89,31
MAG56-SR08-18	Lagoa 08SR, Fazenda São Roque, Aquidauana	3,59	440	86,50

4.1.2. Anotações de genes e agrupamentos gênicos

A anotação funcional dos genomas e MAGs foi realizada utilizando-se o software Prokka 1.11 (SEEMAN, 2014). A detecção de genes e agrupamentos gênicos potencialmente envolvidos na síntese de terpenos, utilizando-se a versão web do programa antiSMASH 6.0 (BLIN *et al.*, 2021). O rigor de detecção de agrupamento utilizado a ferramenta “relaxed” detecta os agrupamentos bem definidos contendo todas as peças necessárias e parciais, sem uma ou mais partes funcionais. Foi selecionado no momento na análise todos os recursos extras de predição de substâncias e famílias de proteínas disponibilizados pela plataforma.

Para identificar os genes da via biossintética dos terpenos foi criada uma biblioteca de cada um dos genes da via com sequências gênicas de diversos gêneros e espécies de cianobactérias depositadas no banco de dados GenBank. Em seguida, essa biblioteca foi comparada com os genomas e MAGs e as sequências similares visualizadas pelo software Artemis (CARVER *et al.*, 2012). As sequências de proteínas também foram analisadas pelo banco de dados do Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) utilizando a ferramenta BlastKOALA (KANEHISA, SATO e MORISHIMA, 2016) para a inferência de funções de genes individuais e visando reconstruir a via metabólica dos terpenóides.

As análises nesses programas subsidiaram a identificação de genes e agrupamentos de genes candidatos que apresentaram funções possivelmente envolvidas na síntese de terpenos e terpenóides. Curadorias manuais dos genes e comparações destes com o banco de dados GenBank foram utilizadas para o refinamento dos genes preditos.

4.1.3. Análise comparativa dos agrupamentos gênicos e genes

Após a anotação funcional dos seis genomas, foi realizada a análise dos agrupamentos ortólogos, buscando sequências proteicas em comum nos genomas comparados utilizando-se a plataforma online OrthoVenn2 (XU *et al.*, 2019) com configurações padrões da ferramenta. Utilizou-se dois genomas não relacionados filogeneticamente ao filo Cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa* PCC7806 e *Gloeobacter violaceus* PCC7421) para avaliar se os genes envolvidos na biossíntese de terpenos possuem correlação com a evolução do filo.

Os genomas e MAGs que apresentaram similaridade dos agrupamentos preditos pelo antiSMASH superior a 50% para os mesmos acessos no banco de dados de referência foram analisados quanto a sintenia utilizando a ferramenta Clinker (GILCHRIST e CHOOI, 2021).

4.2 Análise química

4.2.1 Produção de biomassa e extração dos compostos

A produção de biomassa das cianobactérias ocorreu por meio da inoculação de alíquotas de células das linhagens em frasco de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura líquido Z8 (KOTAI, 1972) ou Z8 modificado (adição de 7,5 g.L⁻¹ de NaCl; pH 9,5), em triplicatas. As culturas foram mantidas em uma sala de crescimento com iluminação fluorescente (40-50 μmol fótons·m⁻²·s⁻¹), fotoperíodo de 14/10h, temperatura de 22±1°C e umidade relativa do ar de 60 ± 5%. Após o crescimento (30 dias), as culturas foram liofilizadas e armazenadas para a extração das moléculas.

Um total de 10 mg de biomassa liofilizada foi utilizado para extração com 1 mL de metanol (50%) e sonicação (30% de amplitude, 2 minutos, Soni Omni Disruptor), seguido por ruptura com *beads* (50 oscilações/segundo, 5 minutos, TissueLyser LT - QIAGEN). Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 1050 rpm por 10 min a 4°C (Eppendorf 5804R), filtrados através de um filtro de seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22 μm e transferidos para frascos de HPLC antes das análises LC-MS/MS.

4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas de alta resolução

As análises foram realizadas injetando-se 10 μL das amostras, concentração de 1 mg mL⁻¹, em um sistema de Cromatografia Líquida (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massa de tempo de voo-quadrupolo (Micro TOF-QII; Bruker Daltonics, MA, EUA) com uma interfase ESI (ionização por electrospray). As separações foram realizadas usando uma coluna Luna C18 (150 × 2,1 mm, 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). A fase móvel

consistiu em água ultrapura obtida de um sistema de purificação de água Q-8 direto (Millipore, Billerica, EUA) (A) e acetonitrila como fase móvel (Sigma-Aldrich) (B), ambos contendo 0,2% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich). Todos os solventes utilizados no estudo eram de grau HPLC. A separação cromatográfica foi realizada a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min com um gradiente linear de solvente B, de 5% a 90%, ao longo de 15 min. As condições da fonte de ionização foram as seguintes: potencial capilar de 4.000 V, temperatura do gás de secagem (N₂) 200 °C a uma vazão de 8 mL/min e pressão do nebulizador de 45 psi. Os espectros de massa foram adquiridos usando ionização por eletropulverização no modo positivo em uma faixa de m/z de 50 a 1.500. A calibração de massa foi realizada com formato de sódio (Sigma-Aldrich). O instrumento Q/TOF foi operado em modo SCAN e Auto MS/MS, realizando experimentos MS/MS nos três íons mais intensos de cada SCAN obtido no MS. Três experimentos de dissociação induzida por colisão foram realizados variando as energias de colisão de 30 a 70 eV.

4.2.3 Análise dos dados de HPLC-MS/MS

Em seguida os dados brutos foram calibrados e posteriormente convertidos do formato “d” para o formato ‘mzXML’ com o software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para a análise de redes moleculares. As redes moleculares foram obtidas usando o Molecular Networking (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) disponível no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) (WANG *et al.*, 2016). Os dados foram filtrados removendo todos os íons do fragmento MS/MS dentro de +/- 17 Da do precursor m/z . Os espectros de MS/MS foram filtrados por janela escolhendo apenas os 6 principais íons de fragmento na janela de +/- 50Da em todo o espectro. A tolerância da massa do íon precursor foi ajustada para 0,02 Da e uma tolerância do íon do fragmento MS/MS de 0,02 Da. A rede foi então criada onde as arestas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,65 e mais de 5 picos correspondentes. Além disso, as arestas entre dois nós foram mantidas na rede se e somente se cada um dos nós aparecesse nos 10 principais nós mais semelhantes de cada um. Os espectros na rede foram então comparados contra as bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre espectros de rede e espectros de biblioteca precisavam ter uma pontuação acima de 0,7 e pelo menos 6 picos correspondentes. As redes moleculares foram visualizadas utilizando o software Cytoscape 3.8.2.

Para aprimorar as informações estruturais químicas dentro da rede molecular do metaboloma de cada uma das linhagens, informações de anotações de estrutura *in silico* do

GNPS Library Search, Dereplicator foram incorporadas à rede usando o fluxo de trabalho GNPS MolNetEnhancer (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/molnetenhancer/>) no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). As anotações das classes químicas foram realizadas usando a ontologia química ClassyFire (DJOUMBOU FEUNANG *et al.*, 2016; MOHIMANI *et al.*, 2017; ERNST *et al.* 2019).

Os dados precisos de massa foram processados utilizando o software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), Analysis 4.4 (Bruker Daltonics, Germany) e MetaboScape 4.0 (Bruker Daltonics, Germany). Os compostos obtidos passaram por investigação manual da fórmula molecular e fragmentação do composto através de comparação de dados de MS/MS disponíveis em bancos de dados e na literatura de dados espectrais contra os dados obtidos no trabalho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Anotações e análises comparativas da via MEP e agrupamentos gênicos preditos pelo AntiSMASH

Todos os genes da via biossintética MEP para a síntese de terpenos foram identificados nos seis genomas e em sete, das 11 MAGs estudadas (Figura 3). Observou-se que para essa via, os genes não estão organizados em agrupamentos, mas sim dispersos no genoma. Verificou-se também que os genes possuem regularidade em tamanho e identidade entre as diferentes sequências avaliadas. O fato de não terem sido encontrados alguns dos genes em algumas das MAGs pode indicar a ausência desses genes nelas ou, mais provável, pode estar relacionado com a fragmentação destas MAGs. Todos os genes e enzimas envolvidos na via MEP são conhecidos e são encontrados em vários genomas cianobacterianos tais como *Anabaena* sp., *Synechococcus elongatus* e *Synechocystis* sp. (LINDBERG, PARK e MELIS, 2010, HALLFMANN *et al.*, 2014; KIYOTA *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2016). Esta via é a principal rota metabólica para a biossíntese de isoprenóides em procariotos, e por ser uma rota essencial para as cianobactérias a inibição das enzimas desta via causam problemas letais, principalmente por atuarem no metabolismo primário através do processo de fotossíntese, respiração e inibição de atividade oxidativa (PATTANAIK, e LINDBERG, 2015; RUDOLF *et al.*, 2021).

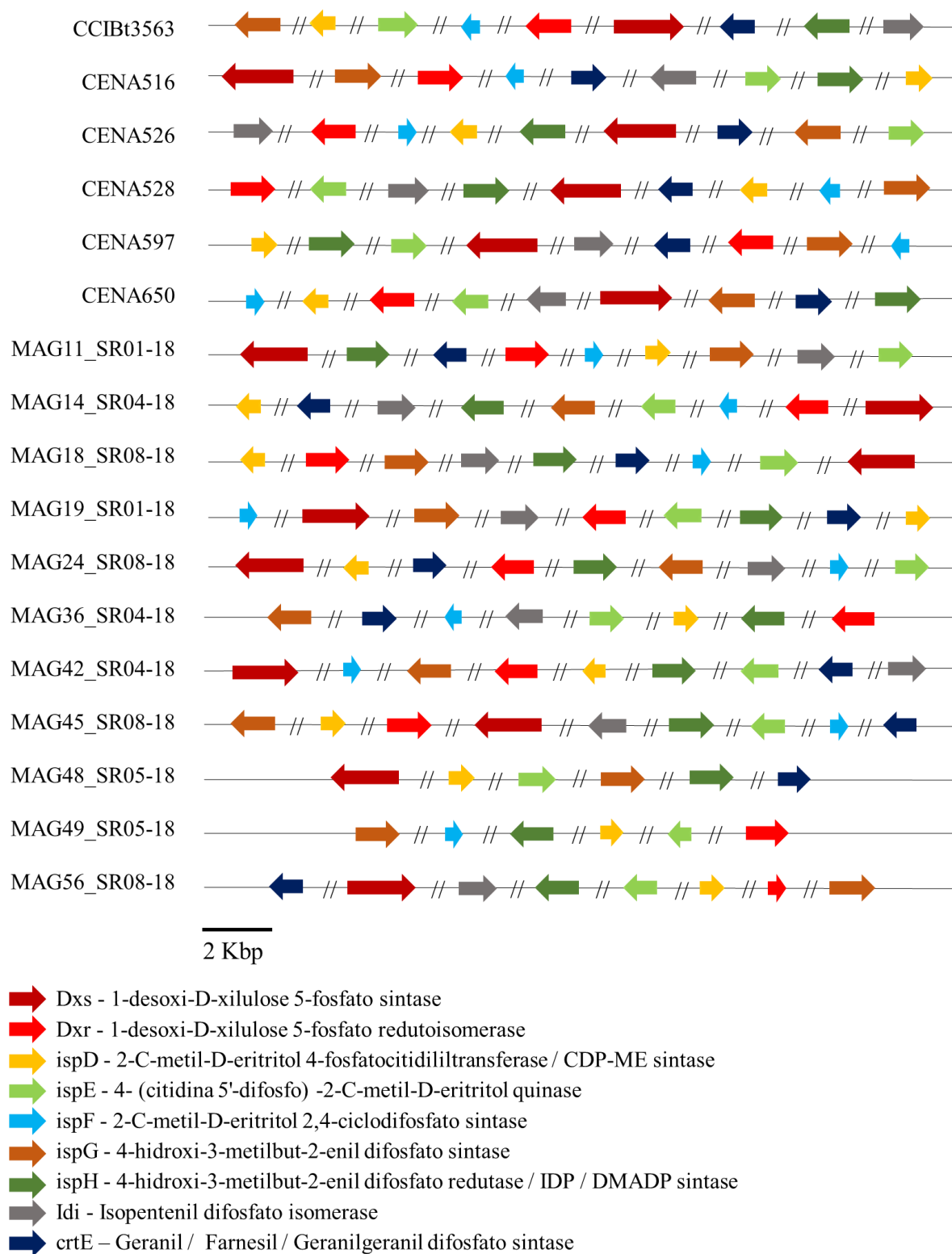


Figura 3. Genes das enzimas da via biossintética MEP, presente nos genomas e MAGs, anotados manualmente e preditos pela ferramenta BlastKOALA por meio da recuperação da via biossintética.

A fragmentação em montagens metagenômicas ocorre por problemas que as plataformas de sequenciamento podem ter na leitura correta de regiões genômicas contendo

elementos repetitivos, visto que essas repetições intergenômicas podem ser compartilhadas por mais de um táxon presente na comunidade microbiana (OLSON *et al.*, 2019; LATORRE-PÉREZ *et al.* 2020). Além de outros desafios que incluem a cobertura desigual de sequenciamento de organismos dentro do metagenoma, a presença de regiões conservadas em diferentes espécies e a introdução de falsos *k-mers* por genomas intimamente relacionados em diferentes abundâncias e erros de sequenciamento também podem afetar a montagem das sequências (GARCÍA-LÓPEZ, VÁZQUEZ-CASTELLANOS e MOYA, 2015; VANDECRAEN *et al.*, 2017; OLSON *et al.*, 2019).

Em decorrência da alta similaridade entre as sequências de genes e do agrupamento de síntese de substâncias da via dos terpenos, realizou-se a análise dos genes ortólogos dos genomas completos para verificar se a via MEP que está presente nos genomas possui relação filogenética entre si. Dentre as 9461 proteínas preditas nos oito genomas avaliados, 1124 proteínas formaram agrupamentos comuns (Figura 4). Dentre esses genes comuns, os que codificam para DXR (*ispD*, *ispE*, *ispF*, *ispG* e *ispH*) da via MEP de biossíntese dos terpenos são ortólogos a todas as linhagens avaliadas e as linhagens externas aos genomas do Pantanal, sendo as únicas exceções o gene *idi*, que não foi predito como ortólogo para o genoma da cianobactéria *Gloeobacter violaceus*, e o gene *DXS* que não apresentou agrupamento para nenhuma das linhagens conforme análise pela plataforma OrthoVenn. Foram também agrupados como ortólogos, sete dos genes relacionados a via de biossíntese de carotenóides e 21 genes ortólogos foram preditos para a biossíntese de ubiquinonas.

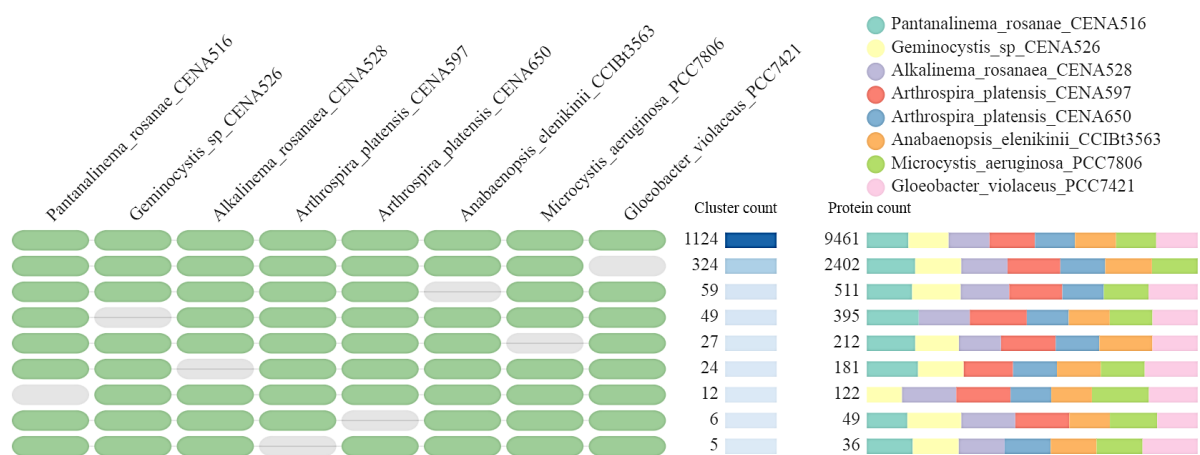


Figura 4. Análise de genes ortólogos entre os genomas de estudo e as linhagens externas *Microcystis aeruginosa* PCC7806 e *Gloeobacter violaceus* PCC7421, a figura elenca a quantidade de agrupamentos de proteínas comuns a todas linhagens e as que são comuns ao menos à sete dos genomas avaliados de forma restrita.

A via biossintética dos terpenos apresenta conservação dos genes (alta similaridade mesmo entre gêneros distantes evolutivamente) e funções confirmando a importância da via para as cianobactérias. Além disso, as árvores filogenéticas montadas pelo OrthoVenn Server para cada um dos genes comuns aos genomas não agruparam as linhagens estudadas de forma que condissessem com a história evolutiva do filo, impossibilitando assim inferir uma relação para os genes desta via biossintética entre as espécies estudadas (APÊNDICES A-G). A falta de consistência pode ser atribuída ao grau limitado de resolução filogenética que pode ser alcançado com a predição de proteínas individuais e a transferência lateral de genes entre procariontes (MARTIN *et al.*, 1998). Lange *et al.* (2000) concluíram em seu trabalho que a transferência horizontal de genes contribuiu para a distribuição entre genomas procarióticos de genes para a biossíntese de IPP, e que os eucariotos herdaram dos procariotos alguns genes que são homólogos as vias de mevalonato e metileritritol fosfato, comprovando assim a importância desta via para todos os organismos.

A plataforma antiSMASH é uma das ferramentas “*in silico*” mais eficientes para predição de genes de biossíntese de metabólitos especializados de bactérias e outros organismos, sendo a principal para a predição de agrupamentos de genes para o grupo dos compostos terpênicos. Os agrupamentos gênicos de terpenos preditos pela ferramenta antiSMASH para os genomas e MAGs do estudo estão relacionados a três enzimas: a enzima esqualeno hopeno ciclase C/N terminal relacionada a produção de triterpenos, e esqualeno fitoeno sintase e licopeno ciclase ligadas diretamente com a síntese de pigmentos carotenoides.

O gene da esqualeno hopeno ciclase (*sqhC*) codifica a enzima SHC que catalisa a ciclização de hopanóides a partir do seu precursor acíclico o esqualeno, um isoprenóide de 30 carbonos de ocorrência natural (HOSHINO e SATO, 2002). Este gene é precursor das substâncias triterpenóides hopeno e hopanol, preditas pela ferramenta BlastKOALA, para as linhagens *P. rosanae* CENA516, *Geminocystis* sp. CENA526, *A. pantanalense* CENA528 e para a MAG45 (anotada taxonomicamente como uma *Raphidiopsis brookii*), e os agrupamentos da enzima SHC preditos pela plataforma AntiSMASH e comparadas com dados disponíveis no banco de dados (Figura 5). Com exceção da MAG45, os agrupamentos preditos apresentaram semelhança apenas para a enzima SHC, e os gêneros das linhagens não estão tão próximos quando avaliados filogeneticamente, indicando assim que este gene é conservado entre os gêneros do filo Cyanobacteria.

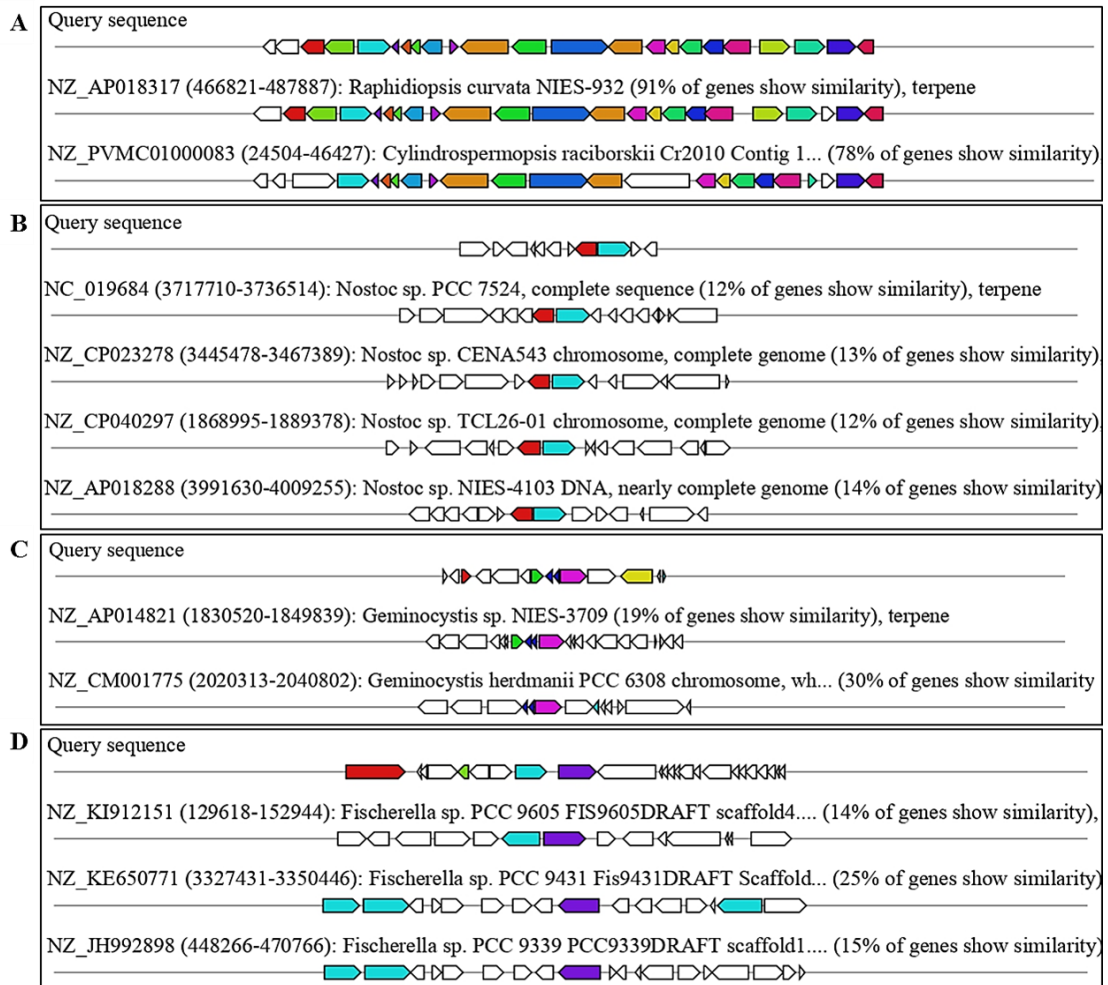


Figura 5. Similaridade dos grupamentos gênicos para o gene da escaleno hopeno ciclase (*sqhC*) predito pelo AntiSMASH para: MAG45 (A – seta azul no centro direcionada para a direita), e para as linhagens *P. rosanae* CENA516 (B – seta azul), *Geminocystis* sp. CENA526 (C - seta rosa) e *A. pantanalense* CENA528 (D – seta roxa) em relação aos dados disponíveis no banco de dados.

O hopeno e outros hopanóides ocorrem em uma ampla gama de bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas. Os hopanóides são utilizados como biomarcadores por geólogos e paleobiólogos, pois refletem as comunidades microbianas locais no momento da sedimentação (TALBOT *et al.*, 2003; BLUMENBERG *et al.*, 2013), podendo estar relacionados com condições de crescimento bacteriano em baixas concentrações de oxigênio (STRAMMA *et al.*, 2008). O *sqhC* é um gene de condição primitiva encontrado em vários gêneros bacterianos modernos, mas estima-se que ocorra em apenas 5 a 10% de todas as espécies bacterianas (PEARSON *et al.*, 2007; KHARBUSH *et al.*, 2013). Atribui-se essa variação a interação com o ambiente, indicando que a diversidade metabólica dos organismos é influenciada por condições de adaptação a ambientes desafiadores, por habitarem

principalmente locais de elevado pH e baixa disponibilidade de oxigênio, além de possíveis níveis maiores de poluição.

Apesar de ser amplamente encontrado entre as bactérias, inicialmente os hopanóides tiveram sua produção associada ao filo Cyanobacteria e a classe Alphaproteobacteria (ZARZYCKI e PORTKA, 2015). No entanto, não existe um consenso referente a quais grupos este gene estaria atrelado pela alta disseminação na produção de hopanóides por bactérias e dado que grupos de um mesmo ambiente podem não apresentar o gene ou a expressão do mesmo. Esta disparidade pode ser observada na análise de sintenia dos agrupamentos gênicos predito pela plataforma AntiSMASH (Figura 6). Enquanto para a MAG45 e as linhagens de *Raphidiopsis curvata* NIES-932 e *Cylindrospermopsis raciborskii* Cr2010 identificou-se alta semelhança, tanto com agrupamentos de genes do banco de dados (>78%) como entre o gene *SHC* (> 95%), para as demais linhagens avaliadas a semelhança para o gene *SHC* foi superior a 60% e a identidade entre os agrupamentos foi inferior a 30% entre as diferentes linhagens do banco de dados.

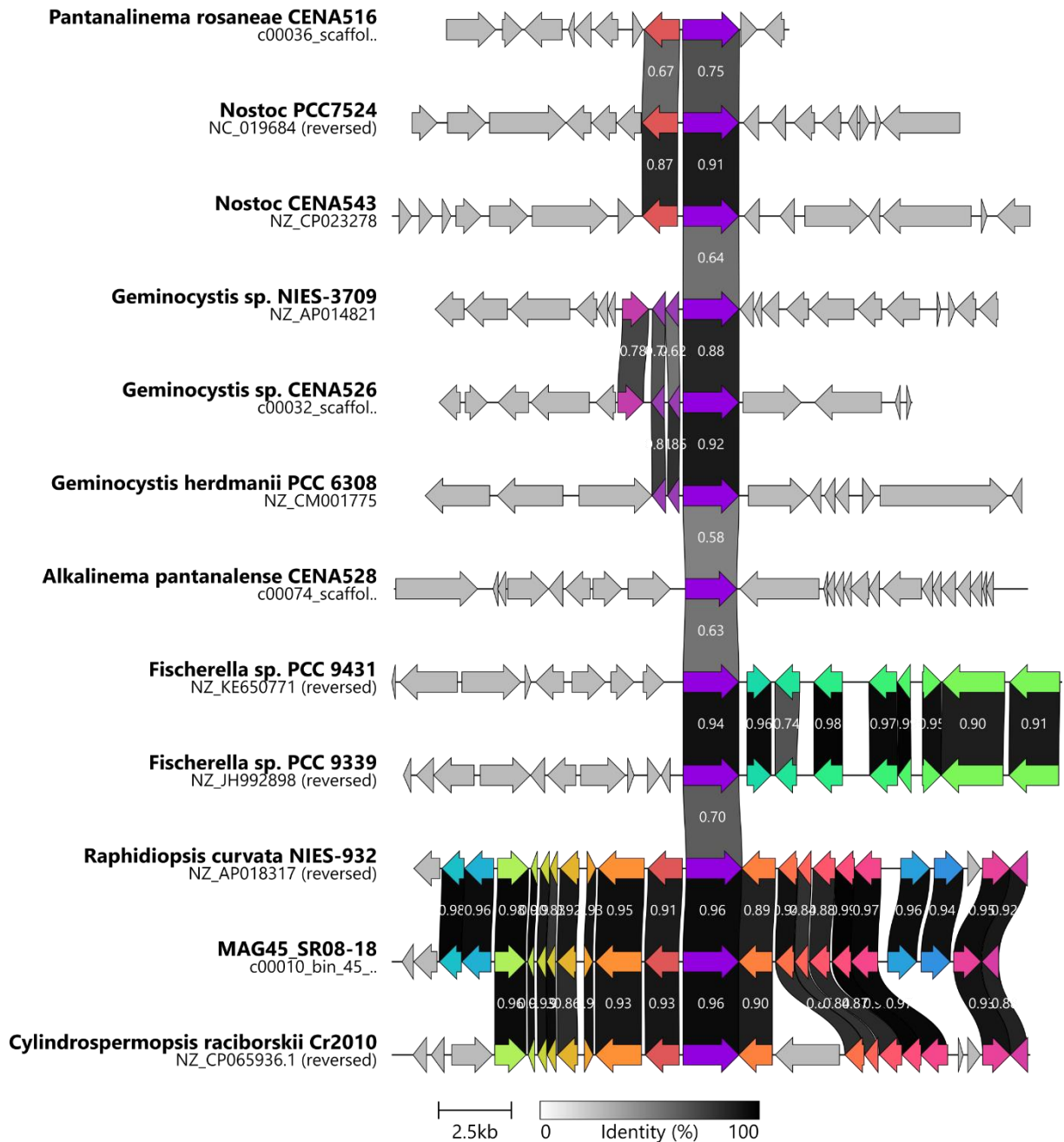


Figura 6. Análise de sintenia para o gene de escaleno hopeno ciclase (seta roxa ao centro), para os agrupamentos gênicos preditos pela plataforma AntiSMASH.

A análise de sintenia para o gene da enzima SHC predita apresentou identidade superior a 60% entre este gene e as sequências das outras linhagens avaliadas. Esta análise corrobora com o trabalho de Pearson *et al.*, (2007) onde concluíram que os SHCs possuem semelhança entre 45 e 55% para o grupo das cianobactérias, podendo ter em média 60% de semelhança entre os subgrupos mais próximos taxonomicamente, e cerca de 90% para espécies dentro de um mesmo gênero. Essa diferença dá-se pela grande diversidade de hopanóides que podem ser produzidos pelas bactérias, refletindo assim na diversidade

estrutural e genética ocasionada pelos gradientes ambientais enfrentados por estes organismos.

Outro agrupamento de genes preditos pela plataforma AntiSMASH compreende o da produção de fitoeno, primeiro composto da via dos carotenoides. O gene da fitoeno sintase (*crtB*) realiza a condensação de duas moléculas GGPP que depois é convertido em licopeno através de etapas de dessaturação e isomerização catalisada pela fitoeno dessaturase, zeta-caroteno dessaturase e cis-caroteno isomerase. Todos os demais carotenóides são sintetizados a partir da molécula de licopeno (MARTÍNEZ-FERÉZ *et al.*, 1994; SANDMANN, 2002; KATO *et al.*, 2016). Todas os genomas e as MAGs estudados apresentaram a presença do gene da fitoeno sintase e 15-sis-fitoeno-desaturase. As linhagens que apresentaram agrupamentos para o gene *crtB* com maior semelhança aos dados do banco de dados foram as linhagens *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563 e *Arthrospira platensis* CENA597 e CENA650, além das MAGs 19-SR01-18, 42-SR04-18, 18-SR08-18 e 36-SR04-18 (Figura 7).

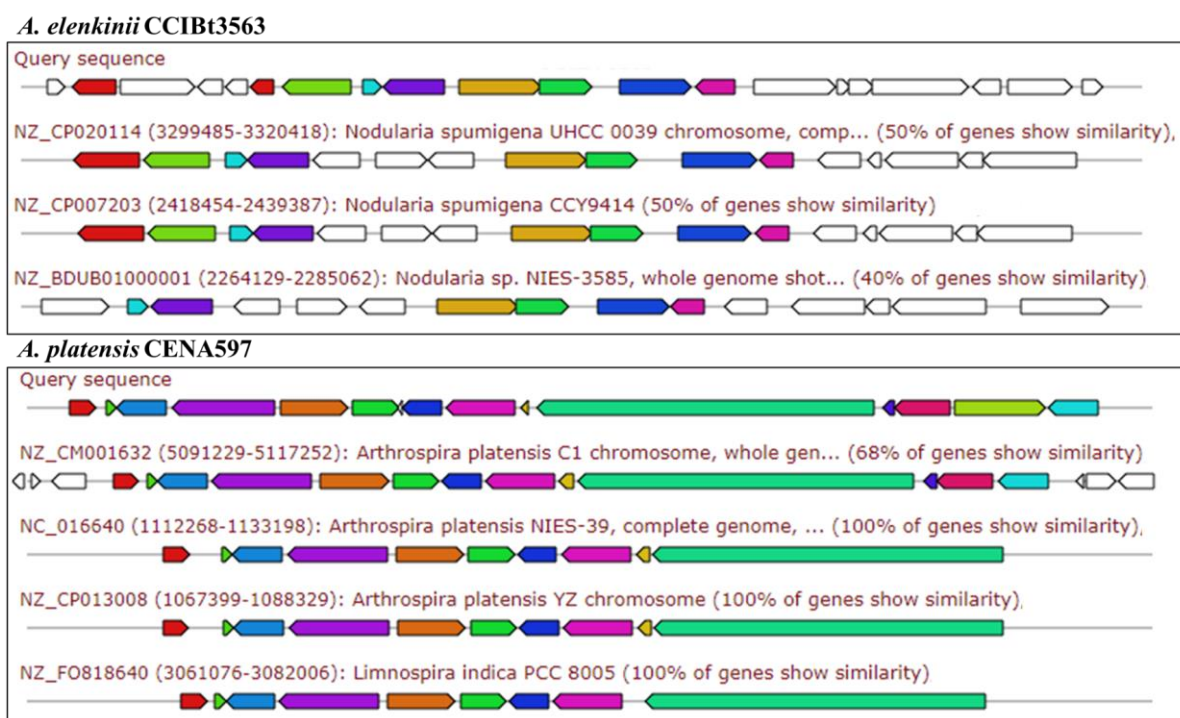


Figura 7. Agrupamento gênico da enzima esqualeno/fitoeno sintase (seta verde sentido à direita) para as linhagens *Anabaenopsis elenkinii* CCIBt3563 e *Arthrospira platensis* CENA597, e similaridade às sequências do banco de dados, predito pela ferramenta antiSMASH.

A análise de sintenia do agrupamento da síntese de esqualeno/fitoeno sintase foi realizada para dois agrupamentos que apresentaram maior similaridade entre si. O primeiro compreendeu a linhagem *A. elenkinii* CCIBt3563 e as MAGs 18, 19 e 42, que apresentaram

identidade de 50% aos acessos de *Nodularia* sp. NIES-3585 e *Nodularia spumigena* CCY9414 e UHCC0039 (Figura 8). Houve o agrupamento das MAGs à linhagem *A. elenkinii* CCIBt3563, e estas por sua vez mostraram-se distintas das linhagens à que foram comparadas. O gene das enzimas 15-cis-fitoeno-desaturase e fitoeno sintase apresentaram 94% de identidade entre as linhagens de *Nodularia* e as de *Anabaenopsis*, sendo que está proximidade pode estar relacionada ao fato de que ambos os gêneros pertencerem a família *Aphanizomenonaceae*, e possuem assim proximidade filogenética.

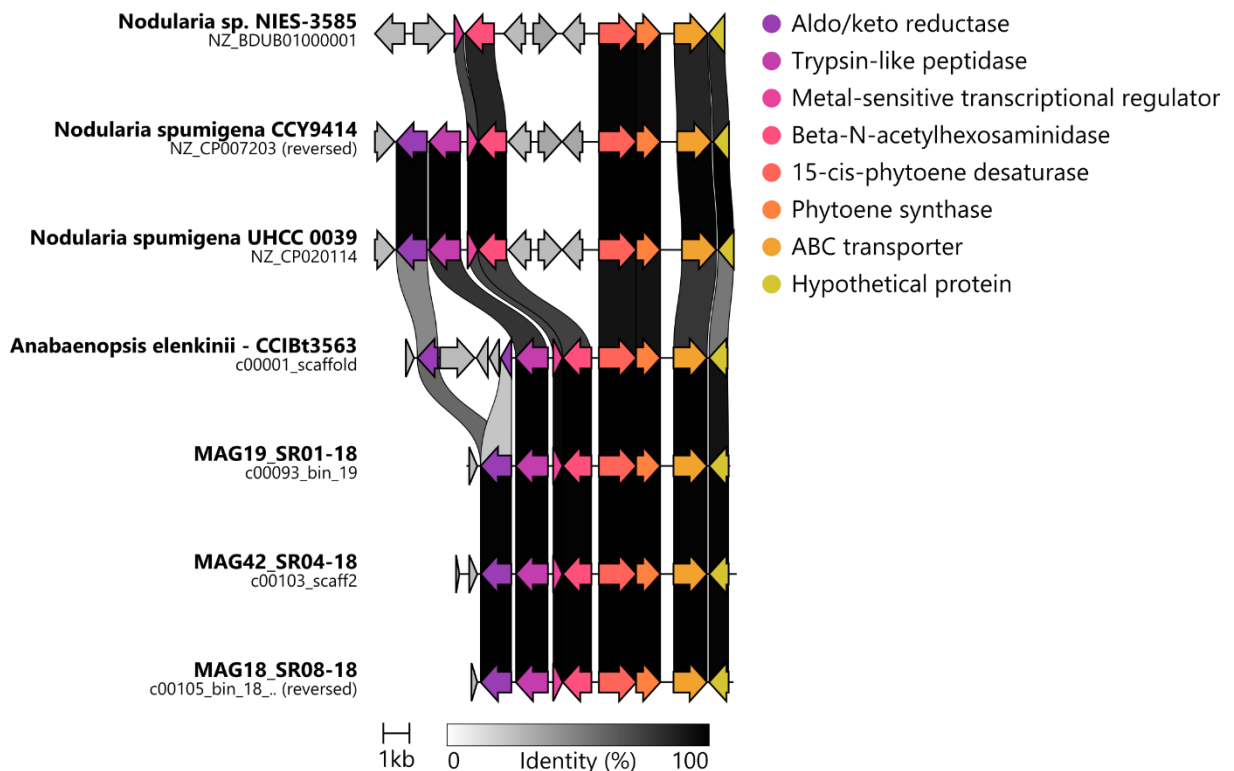


Figura 8. Análise de sintonia do agrupamento gênico da fitoeno sintase predito pela ferramenta antiSMASH para o gênero *Anabaenopsis* (CCIBt3563 e MAGs 18,19 e 42).

O segundo grupo compreendeu as linhagens *Arthrospira platensis* CENA597 e CENA650 e a MAG36, apresentando identidade de 100% para as linhagens e 88% para a MAG36 em relação aos agrupamentos das linhagens de *Arthrospira platensis* YZ, NIES-39 e C1 e *Limnospira indica* PCC8005 (anteriormente denominada *Arthrospira indica* PCC8005) (Figura 9). Conforme anotação taxonômica anterior, a MAG36 foi identificada como uma *Arthrospira platensis*, agrupando com as linhagens isoladas das lagoas salino-alcálicas do Pantanal *A. platensis* CENA597 e CENA650, e estas por sua vez distinguiram-se dos acessos do banco de dados. O gene da enzima 15-cis-fitoeno-desaturase apresentou alta identidade (> 98%) entre todas as linhagens avaliadas, enquanto o da fitoeno sintase apresentou uma diferença de 7% na identidade entre as linhagens deste estudo em comparação às disponíveis

no banco de dados. A alta similaridade entre esses genes do agrupamento predito indica a proximidade filogenética das linhagens aos acessos do banco de dados a que foram comparadas.

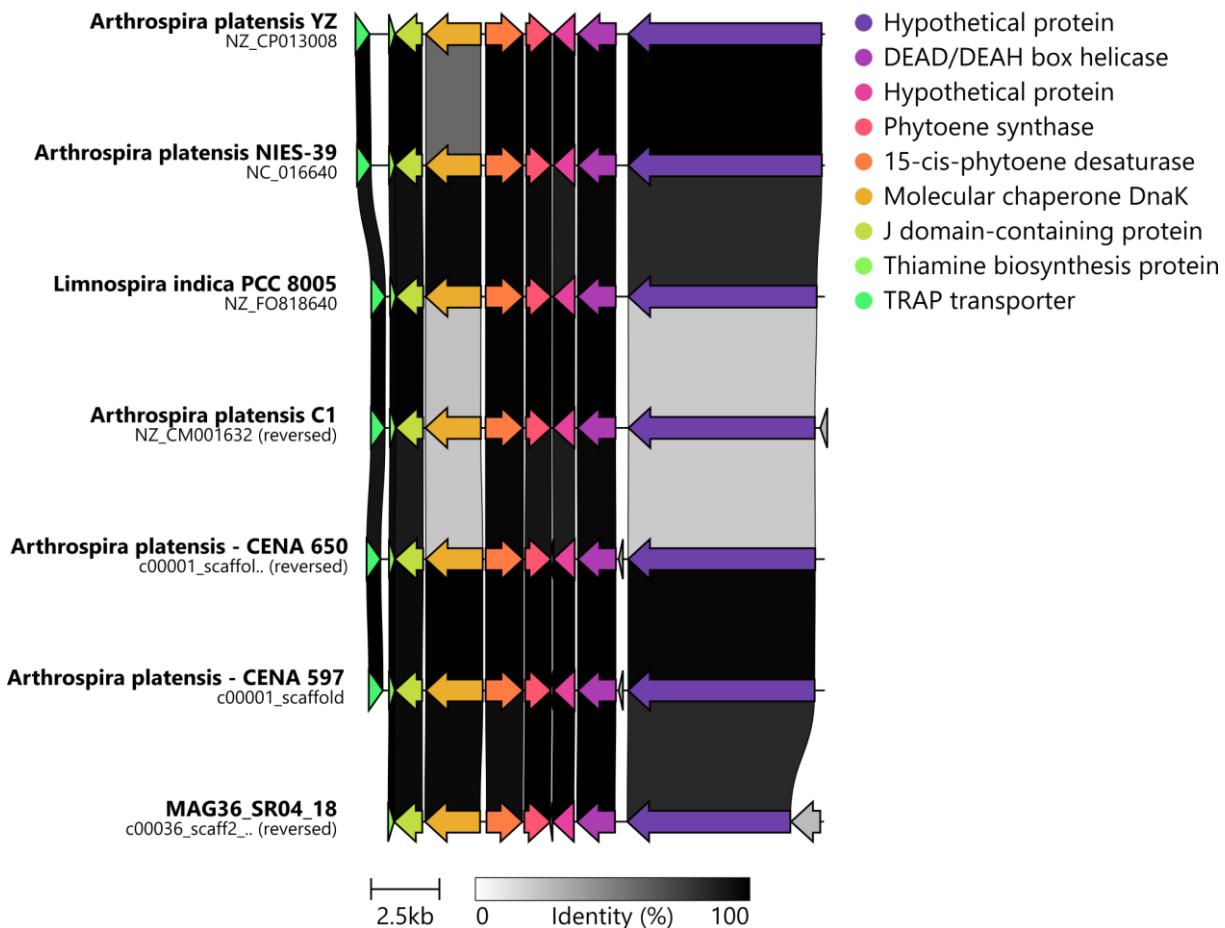


Figura 9. Análise de sintenia do agrupamento gênico da fitoeno sintase predito pela ferramenta antiSMASH para o gênero *Arthrospira* (CENA597, CENA650 e MAG36).

A via para produção de carotenoides inclui a condensação de duas moléculas de geranyl-geranyl pirofosfato em fitoeno catalisado pela fitoeno sintase, quatro etapas de dessaturação e ciclização de ambas as extremidades da molécula em anéis de β -ionona, resultando no composto β -caroteno, esqueleto base para estrutura dos demais pigmentos (SANDMANN 2001). Diversos pigmentos já foram descritos como carotenoides e podem ser divididos em duas classes principais, carotenos e xantofilas (derivados oxigenados de carotenos). Em cianobactérias, o β -caroteno é o principal carotenóide, além da zeaxantina, cantaxantina, β -criptoxantina e echinenona (TAKAICHI, 2013).

Os genes de tetraterpenos ou carotenóides preditos para os genomas e MAGs pela plataforma BlastKOALA apresentaram bastante variações entre os resultados. Os genomas das linhagens *Alkalinema pantanalense* CENA528 e *Pantalinema rosanae* CENA516

foram os que apresentaram os maiores números de genes com correspondências à via de carotenóides, sendo os genes para síntese de licopeno, β -caroteno, β -criptoxantina, echinenona, cantaxantina, astaxantina, zeaxantina. Nas linhagens *Geminocystis* sp. CENA526, *A. platensis* CENA597 e CENA650 e *A. elenkinii* CCIBt3563 foram identificados também genes para a síntese do pigmento isorenierateno. Por fim, em todas as linhagens e MAGS foram anotados os genes da biossíntese de mixol.

A via de biossíntese completa dos pigmentos mencionados acima foi anotada nas MAGs 18-SR08-18, 19-SR01-18, 42-SR04-18 e 56-SR08-18 (Microcystaceae), com exceção do isorenierateno. As demais MAGs continham alguns dos genes de carotenóides, sendo os mais comuns o licopeno, β -caroteno, echinenona, astaxantina e isorenierateno. Esses resultados para as MAGs são esperados devido ao nível de fragmentação e tamanho das montagens, fato que acabou por diminuir o número de genes relacionados aos compostos intermediários da via de biossíntese de carotenóides, sendo pouco observado este efeito nos genomas analisados. A MAG 48-SR05-18 (Synechococcales) que é a menor sequência das avaliadas com cerca de 1.740.000 pares de bases, por exemplo, apresentou apenas oito genes da via de biossíntese de carotenóides.

Os pigmentos carotenóides preditos pelas ferramentas utilizadas destacaram-se pela captação de luz mais eficiente tanto em condições de excesso como escassez de luz (STAMAKIS, TSIMILLI e PAPAGEORGIOU 2014), capacidade fotoprotetora contra os raios UV-B (SOZER *et al.*, 2010), e na absorção da luz UV no comprimento de onda azul através do pigmento isorenierateno (TAKANO *et al.*, 2005). Os pigmentos β -criptoxantina, echinenona, cantaxantina, astaxantina, zeaxantina possuem propriedades antioxidantes atuando contra as espécies reativas de oxigênios na célula (GRUSZECKI e STRZAŁKA, 2005; SEDOUD *et al.*, 2014), além de possuírem atividade antiinflamatórias e antitumorais tornando-os comercialmente atrativos, principalmente para as indústrias de cosméticos e alimentícia (ALVAREZ *et al.*, 2014).

As mixoxantofilas preditas são glicosídeos carotenóides, amplamente distribuídos em cianobactérias. O mixol é sintetizado a partir do γ -caroteno monocíclico, a metade esquerda (grupo terminal β) do γ -caroteno é hidroxilada por CrtR, e então um grupo ceto e um grupo 2'-hidroxi são introduzidos pelas enzimas CrtW e CrtG. A maioria das cianobactérias contém glicosídeos mixol únicos, e as porções glicosídicas são geralmente etilpentose; fucose, ramnose e chinovose (TAKAICHI e MOCHIMARU, 2007; TAKAICHI, 2011, 2013). Em cianobactérias as mixoxantofilas fornecem proteção contra foto-oxidação e peroxidação

lipídica sob várias condições de estresse (DOMONKOS *et al.*, 2009), além de serem um fator importante na organização da membrana tilacóide (MOHAMED *et al.*, 2005).

Outro grupo terpênico predito foi o das ubiquinonas, pertencentes aos meroterpenos devido a inserção do composto diterpenoide fitil difosfato na síntese dos compostos destas vias. Foram recuperados para todos os genomas das linhagens e MAGs os genes precursores das substâncias α -tocoferol e α -tocotrienol (vitamina E) e filoquinol (vitamina K), as linhagens *Geminocystis* sp. CENA526 e *A. pantanalense* CENA528 e a MAG 48-SR05-18 apresentaram ainda a presença do gene referente a interconversão de filoquinona em filoquinol e menaquinona em menaquinol. Nesta via de biossíntese também se observou variação no número de genes intermediários anotados tanto para os genomas quanto para as MAGs estudadas. Dentre as MAGs, a 36-SR04-18 foi a que apresentou maior número de genes correspondentes a produção das ubiquinonas.

A trajetória evolutiva dessas vias sugere que o primeiro conjunto de enzimas biossintéticas das ubiquinonas estava presente em cianobactérias sendo usado para a biossíntese de filoquinona, de modo que os genes atuais destas vias encontrados em outros procariotos e eucariotos são homólogos herdados das cianobactérias (DEGLI ESPOSTI, 2017). O tocoferol possui atividade antioxidante e a sua principal função é a de proteção das membranas contra a auto oxidação de ácidos graxos polinsaturados (WANG e QUINN, 1999, INOUE *et al.*, 2011). Enquanto a menaquinona e a filoquinona (vitamina K) participam na transferência de elétrons do fotossistema I (GROSS *et al.*, 2006; SADRE, PFAFF e BUCHKREMER, 2012), e em humanos, a vitamina K é mais conhecida por seu papel na coagulação do sangue (ZEHNDER, 2018). Estas substâncias produzidas por cianobactérias apresentam potencial para serem incorporadas em nutracêuticos, fármacos, e alimentos fortificados para suplementação humana ou animal atuando como antioxidantes naturais (KAWAMUKAI, 2018).

5.2 Desreplicação dos compostos

Analisando o metaboloma de todas as linhagens em conjunto para avaliar as semelhanças entre elas, obteve-se agrupamentos de compostos correspondentes à classe dos terpenos através da criação da rede molecular e comparação dos espectros das linhagens com o banco de dados do GNPS (*Global Natural Products Social*). A subclasse dos tetraterpenos apresentou a maior rede molecular dentre os terpenóides, composta por um agrupamento com diferentes compostos e 46 nodos. Duas classes de pigmentos, carotenos e xantofilas apresentaram correspondência espectral com bibliotecas do banco de dados do GNPS. Dentre

os carotenos foi predito o composto beta-caroteno para todas as linhagens, enquanto que para as xantofilas (carotenóides com a presença de oxigênio) foram preditos a beta-criptoxantina presente em cinco das seis linhagens estudadas e a cantaxantina encontrada apenas nos espectros da linhagem *A. elenkinii* CCIBt3563 (Figura 10).

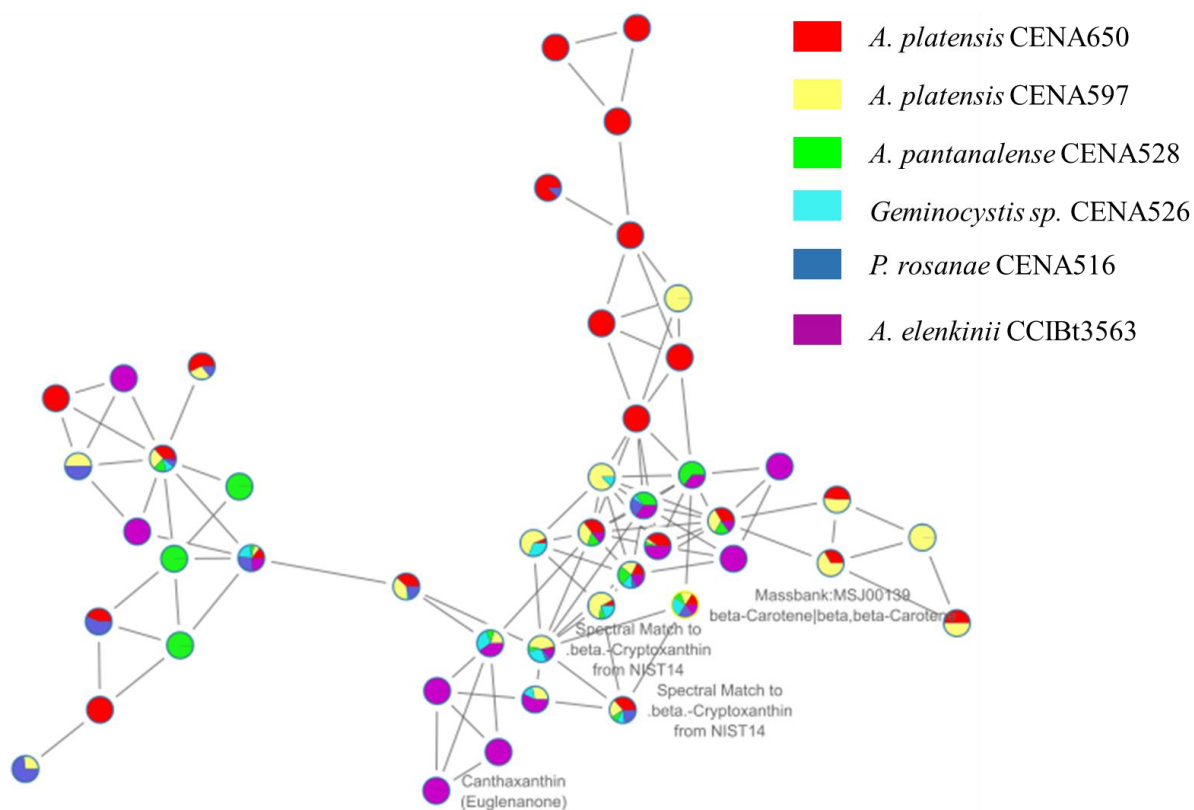


Figura 10. Rede molecular de íons preditos pelo GNPS pertencentes a subclasse de tetraterpenos.

Todas as linhagens avaliadas apresentaram em seus espectros o pico de m/z 537,438 $[M+H]^+$ e tempo de retenção (t_R) médio de 12,26 minutos, correspondente ao composto β -caroteno, $C_{40}H_{56}$, conforme anotação pelo GNPS, os espectros MS/MS apresentaram o pico com m/z 444 característico da fragmentação deste composto, os espectros foram semelhantes aos disponíveis no banco de dados da plataforma GNPS (Figura 11). Para os isômeros 13- β -caroteno, *all-trans*- β -caroteno e 9-*cis*- β -caroteno o principal íon da fragmentação é o de m/z 444, que corresponde a perda da porção correspondente ao tolueno com m/z 92, sendo este íon o que caracteriza o composto 9-*cis*- β -caroteno, uma vez que os outros dois compostos podem apresentar o íon produto com m/z 480 após a dissociação do beta-caroteno ocasionado pelo rearranjo estrutural pela reação retro-Diels-Alder (HUCK *et al.* 2000; FERNANDES *et al.* 2020).

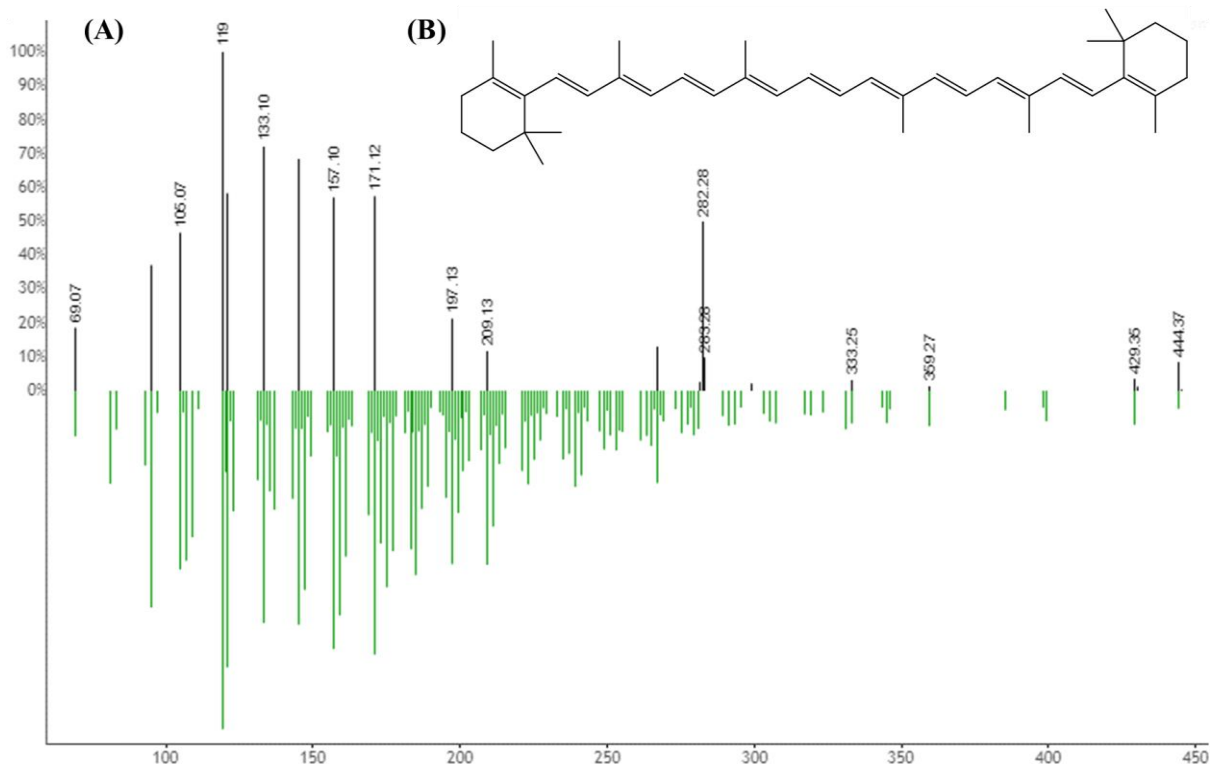


Figura 11. (A) Nodo m/z 537,438 $[M+H]^+$, t_R de 12,26 minutos e fórmula molecular $C_{40}H_{56}$, anotado como o composto β -caroteno, em verde no espelho dos picos são mostrados os dados depositados na biblioteca do GNPS e em preto os dados experimentais. (B) Estrutura molecular do composto β -caroteno.

Com exceção da linhagem *A. elenkinii* CCIBt3563, as linhagens apresentaram o pico correspondente ao composto β -criptoxantina, $C_{40}H_{56}O$, m/z 553,435 $[M+H]^+$ e t_R médio de 12,63 minutos, apesar de todas as linhagens terem apresentado os genes correspondentes a síntese deste pigmento. Este é um carotenoide precursor da vitamina A, e é semelhante em estrutura ao β -caroteno, exceto pela presença de um grupo hidroxila em um dos dois anéis (Figura 12). Dentre os íons de fragmentação comuns aos espectros obtidos neste trabalho, está o íon de m/z 119 que pode ser observado em anteraxantina, luteína, α -criptoxantina, zeaxantina, β -criptoxantina, licopeno, β -apo-8'-caroteno, γ -caroteno e β -caroteno usando várias técnicas de ionização (RIVERA, CHRISTOU, e CANELA-GARAYOA, 2014).

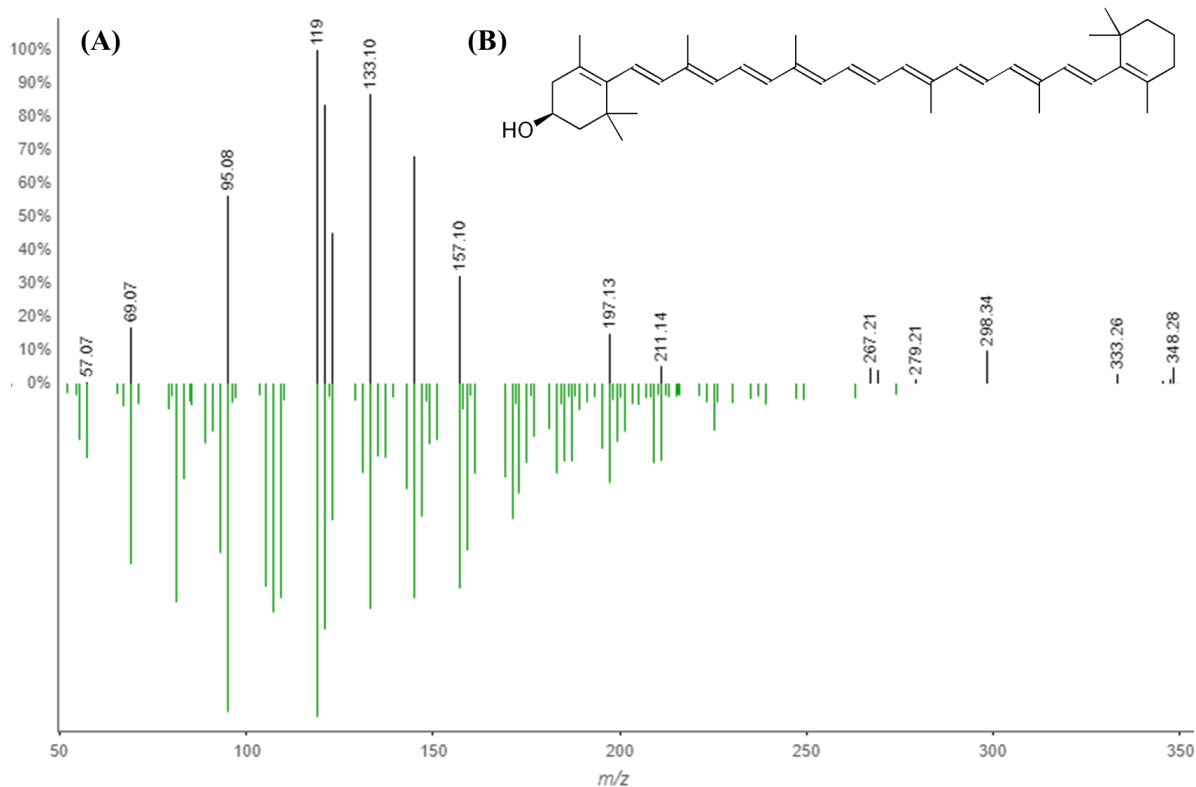


Figura 12. (A) Nodo m/z 553,43 $[M+H]^+$, t_R de 12,63 minutos e fórmula molecular $C_{40}H_{56}O$, anotado como o composto β -criptoxantina, em verde no espelho dos picos são mostrados os dados depositados na biblioteca do GNPS e em preto os dados experimentais. (B) Estrutura molecular do composto β -criptoxantina.

O composto de m/z 565,404 $[M+H]^+$ anotado como cantaxantina (euglenanona), com t_R médio de 12,27 minutos e fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_2$, foi observado apenas para a espécie *A. elenkinii* CCIBt3563. Para esta linhagem, em especial, não foi anotado todos os genes correspondentes a síntese de cantaxantina pelas ferramentas utilizadas. A presença dos íons fragmentos com m/z 203 e m/z 215 observados na fragmentação MS/MS do carotenoide cantaxantina são comuns a este composto (Figura 13), estes íons estão presentes em carotenóides que contém um grupo ceto como o único substituinte no anel β , sendo este íon formado pela clivagem entre os carbonos 10 e 11 com a carga positiva permanecendo na porção cetona (VAN BREEMEN, DONG, e PAJKOVIC, 2012; HAMBLY, VAN DUIJNEVELDT e GATES, 2021).

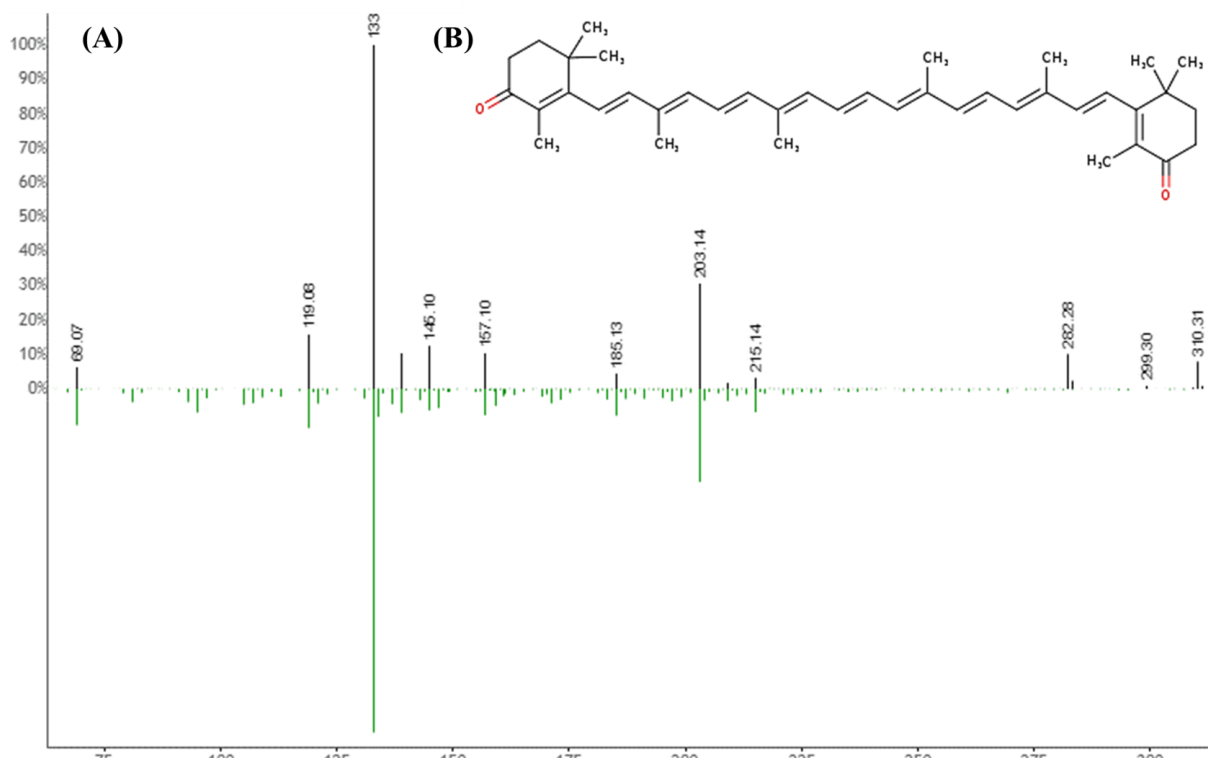


Figura 13. (A) Nodo m/z 565,404 $[M+H]^+$, t_R de 12,27 minutos, e fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_2$, anotado como o composto cantaxantina (Euglanona), em verde no espelho dos picos são mostrados os dados depositados na biblioteca do GNPS e em preto os dados experimentais. (B) Estrutura molecular do composto cantaxantina.

Os nodos de m/z 585,4 $[M+H]^+$ com fórmula molecular $C_{40}H_{56}O_3$, dos agrupamentos tetraterpênicos das linhagens *Geminocystis* sp. CENA526 e *A. pantanalense* CENA528 foram identificados como correspondentes ao pigmento carotenoide anteraxantina pela anotação utilizando a ferramenta MolNetEnhancer (Figura 14 e APÊNDICE K). As xantofilas, grupo carotenoide ao qual pertence este pigmento, têm sua produção estimulada em condições de variância da irradiação solar, para dissipar o excesso de energia, atuando como pigmento fotoprotetor (SCHAGERL e MÜLLER, 2006). A anteraxantina foi encontrada, pela segunda vez, em uma cianobactéria (*Roholtiella mixta*) isolada da porta de uma caverna na Rússia, não havendo muitos relatos de sua presença em cianobactérias (ABDULLIN *et al.*, 2021). Este pigmento não teve os genes de sua biossíntese preditos pelas ferramentas de análises genômicas empregadas no estudo das linhagens e MAGs, e as linhagens deste estudo foram mantidas sobre as mesmas condições de cultivo para a realização das análises, logo o estímulo para a síntese deste pigmento poderia estar relacionado com adaptações destas linhagens ao habitat do qual foram isoladas.

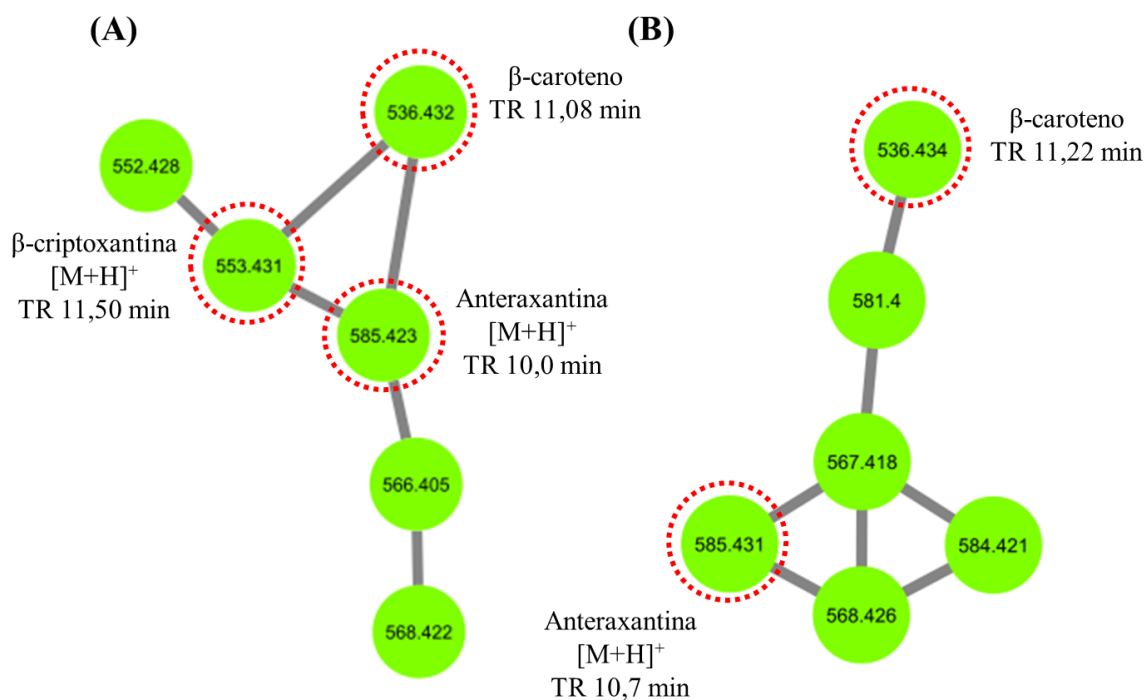


Figura 14. Agrupamentos de compostos correspondentes ao subgrupo dos tetraterpenos para as linhagens *Geminocystis* sp. CENA526 (A) e *A. pantanalense* CENA528 (B).

Embora aja uma grande diversidade e número de carotenóides descritos na literatura, estes compostos com diferentes m/z possuem semelhanças nos espectros de fragmentação MS/MS, podendo ser observado com frequência os íons de m/z 69, 73, 89, 97, 119, 135, 145, 157 entre outros. Além disso, os íons fragmentados em m/z 133, 93 e 69, observados nos espectros MS/MS deste trabalho, são encontrados em vários carotenóides exibindo grupos terminais distintos. Esses íons podem ser resultado da eliminação de parte da cadeia acíclica central do esqueleto carotenóide, e logo podem ser encontrados em quase todos os compostos carotenóides (RIVERA, CHRISTOU, e CANELA-GARAYOA, 2014). Estes padrões de fragmentação encontrados fazem com que os compostos agrupem dentro de uma rede molecular, permitindo assim explorar moléculas idênticas, análogas ou famílias de compostos dentre amostras simples e complexas (NGUYEN *et al.*, 2013).

Na análise de mineração genômica, três das linhagens estudadas apresentaram genes para síntese de squaleno e hopeno, os precursores dos hopanóides, destas, duas linhagens *P. rosanae* CENA516 e *Geminocystis* sp. CENA526 formaram, na desreplcação, um agrupamento de íons que é composto por três nodos pertencentes a subclasse dos triterpenóides. Estes íons que apresentaram a formação de um agrupamento pela análise de redes moleculares com seu espectro possuindo correspondência aos espectros do banco de dados do GNPS, mas não foram nomeados pela ferramenta (Figura 15A). No entanto,

utilizando o software MetaboScape® para anotação, foram identificados como sendo o provável composto Bacteriohopanetrol (BHT). O composto de m/z 708,536 $[M+H]^+$ foi observado nas amostras das linhagens *P. rosanae* CENA516 e *Geminocystis* sp. CENA526, sendo que esta última linhagem apresentou mais dois nodos de m/z 722,55 $[M+H]^+$ (Figura 15B).

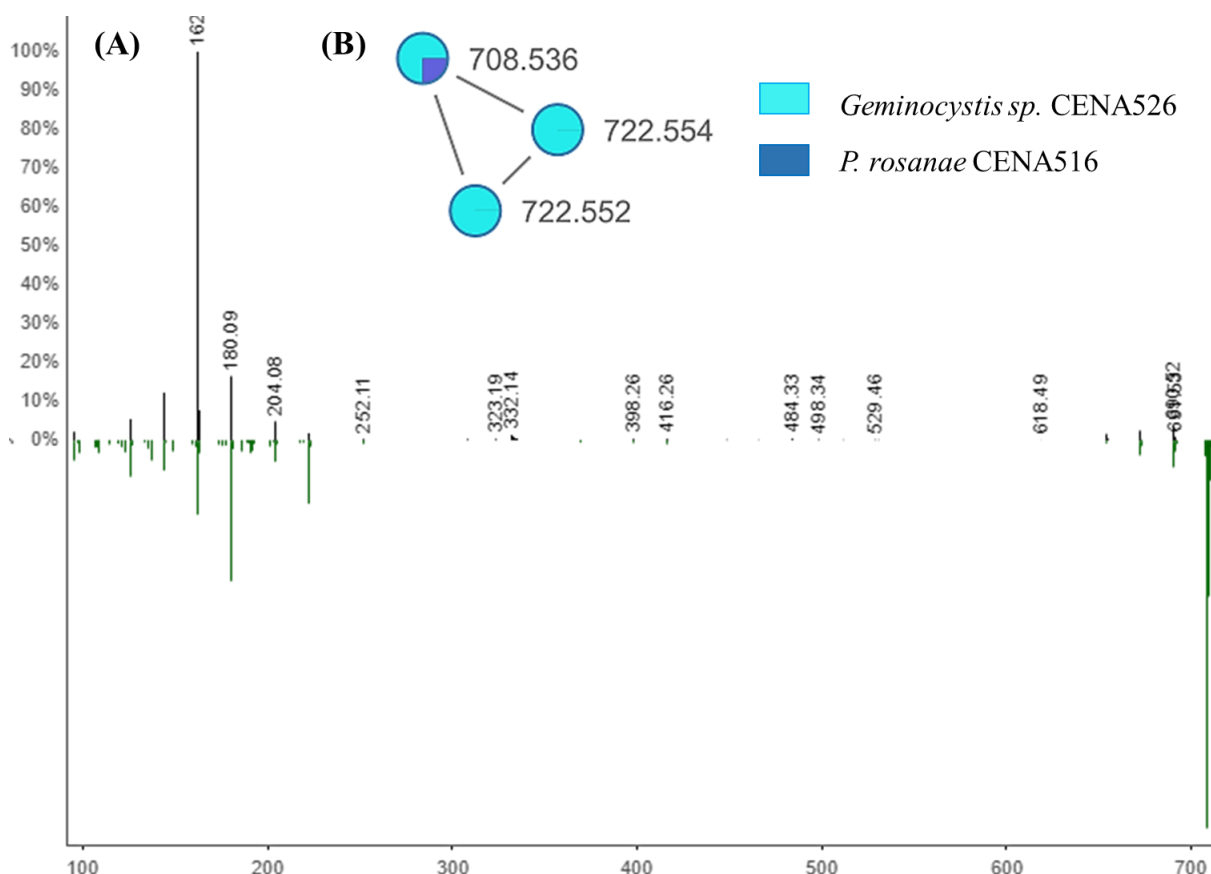


Figura 15. (A) Espectro do nodo de m/z 708,536 $[M+H]^+$, em verde no espelho dos picos são mostrados os dados depositados na biblioteca do GNPS e em preto os dados experimentais. (B) rede molecular com o mesmo íon precursor m/z 708,536 predito pelo GNPS, e as linhagens em que foram encontrados.

Apesar de haver semelhança entre os espectros comparados com o banco de dados, pode ser que estes três nodos não sejam os mesmos compostos, dado que os BHTs possuem diferentes conformações estruturais. Talbot *et al.*, (2008) estudaram 58 cianobactérias e determinaram que 49 produziam hopanóides, confirmando esta análise prévia, Sáenz *et al.* (2012) encontraram 26 hopanóides distintos, em 56 diferentes cianobactérias, cada uma contendo entre uma e oito moléculas diferentes de hopanóides. As estruturas mais comuns de BHTs encontrados em microrganismos são o bacteriohopano-32,33,34,35-tetrol com m/z 547 (Figura 16A), o BHT-glucosamina com m/z 708 (Figura 16B), o BHT ciclitol éter com m/z

708 (Figura 16C) e o metil-BHT ciclitol éter com m/z 722 (Figura 16D e 16E) (TALBOT *et al.*, 2016).

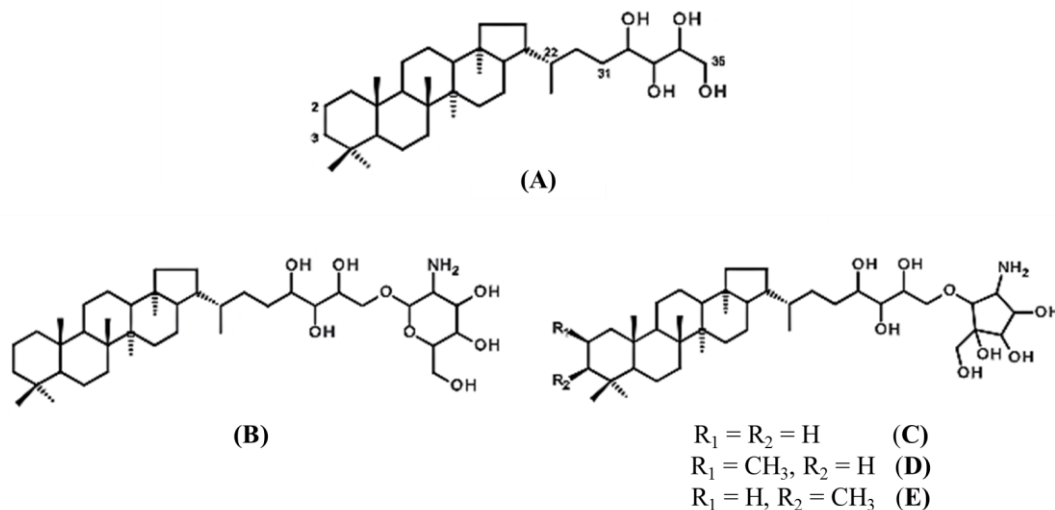


Figura 16. Estruturas moleculares de derivados de Bacteriohopanetetrol. (A) bacteriohopano-32,33,34,35-tetrol, (B) BHT-glucosamina, (C) BHT ciclitol éter e (D e E) metil-BHT ciclitol éter.

Tomando como base a fragmentação dos picos das moléculas de m/z 708,5386[M+H]⁺, t_R : 8,38 minutos e fórmula molecular C₄₁H₇₃NO₈ e de m/z 722,5537 [M+H]⁺, t_R : 8,8 minutos e fórmula molecular C₄₂H₇₅NO₈, presentes na linhagem *Geminocystis* sp. CENA256, e comparando-as aos dados publicados por Talbot *et al.* (2016), observa-se que estes íons assemelham-se aos compostos BHT glucosamina ou BHT ciclitol éter e metil-BHT ciclitol éter, respectivamente. Talbot *et al.* (2016), descrevem ainda que em condições de corrente elétricas superiores a 20 eV, a molécula protonada de m/z 708 apresenta os picos de produto com m/z 162 e m/z 180 correspondentes a metilação no sistema do anel ou a adição de hidroxilas e o pico de m/z 222 com estrutura ainda desconhecida. Estes mesmos picos foram observados nos espectros de fragmentação MS/MS obtidos para ambos os compostos neste trabalho (APÊNDICES I e J).

Os Bacteriohopanepolióis (BHPs) são triterpenóides precursores biológicos dos hopanóides, que possuem aplicação comercial em cosméticos, vacinas, e como matéria-prima para combustíveis e indústria química (ENGLUND, *et al.* 2014). Os Bacteriohopanetetrols são denominados BHPs compostos, dado que possuem funções mais complexas, o primeiro bacteriohopanetetrol foi isolado originalmente da aphaoproteobacteria *Zymomonas mobilis* e da cianobactéria *Anacystis montana* (HERRMANN *et al.*, 1996). Estes compostos por sua vez

têm sido descritos com maior abundância em águas marinhas e em condições de baixas concentrações de oxigênio, podendo assim apresentar papéis fisiológicos relacionados com mecanismos de sobrevivência destas bactérias (SÁENZ *et al.*, 2011; KHARBUSH *et al.*, 2013).

Os hopanóides compartilham propriedades biofísicas semelhantes aos esteróis, como ajustar a fluidez e a permeabilidade da membrana, no entanto ainda não foi determinado como tal ordenação afeta as células e se os hopanóides interagem com proteínas específicas da membrana. De forma geral os hopanóides contribuem para a resistência ao estresse bacteriano, principalmente permitindo a adaptação de bactérias a condições ambientais extremas, incluindo temperaturas elevadas e alto gradiente de pH e salinidade (CARVALHO e FERNANDES, 2010; BELIN *et al.*, 2018). Os BHPs são importantes em outras funções da membrana, como resistência a antibióticos (SCHMERK *et al.*, 2011) e sobrevivência na fase estacionária tardia (WELANDER e SUMMONS, 2012). A característica destas substâncias de modularem a membrana plasmática é relevante para as linhagens de cianobactérias em que foram encontradas, para que estas possam tolerar às condições ambientais que podem ser consideradas extremas das lagoas salino-alcálicas do Pantanal.

O composto Cibastacina A foi anotado pela ferramenta MetaboScape® nas linhagens *P. rosanae* CENA516, *Geminocystis* sp. CENA526 e *A. platensis* CENA597 (Figura 17). A *m/z* carga identificada foi a de 415,35 [M+H]⁺ com fórmula molecular C₂₆H₄₄N₃O e tempo de retenção variando entre 6,5 e 6,7 minutos. No espectro de fragmentação da *m/z* 415,34 [M+H]⁺ obtido para a linhagem *P. rosanae* CENA516 foi possível observar a presença com maior intensidade dos íons fragmentos de *m/z* 70, 83, 115, 119, 135 e 158 que puderam ser observados em quase todos os espectros de terpenoides aqui descritos (APÊNDICE K).

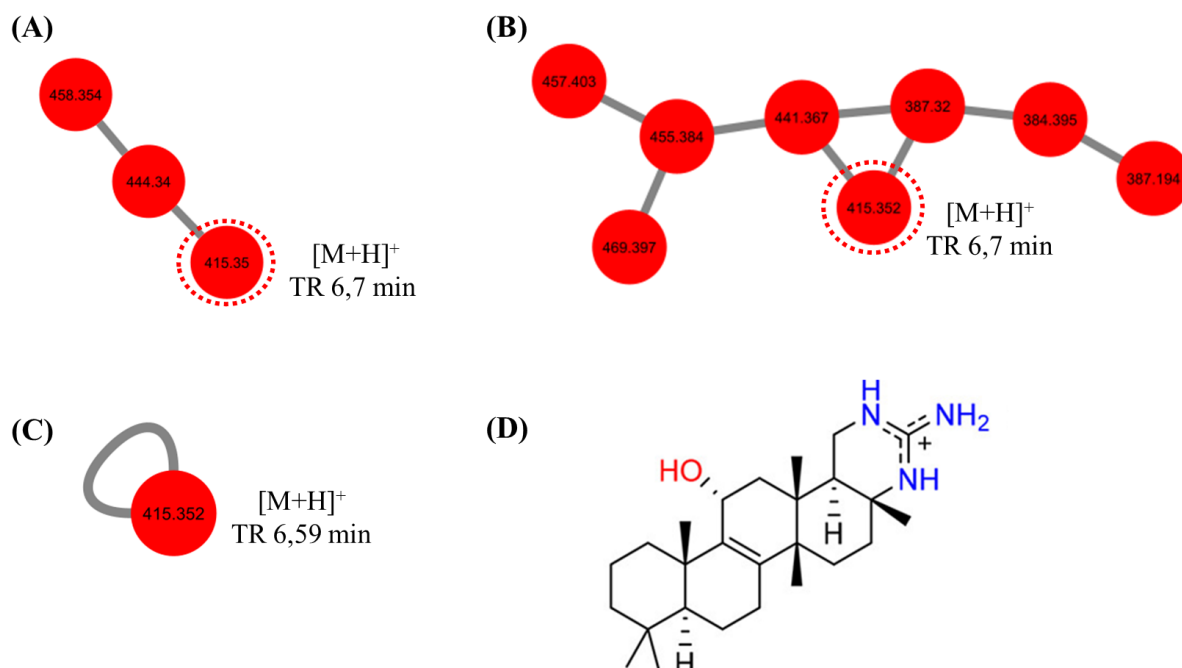


Figura 17. Agrupamentos dos nodos correspondes a m/z 415,35 $[M+H]^+$ anotado como o composto sesterterpeno Cibastacina A (D). A, B e D correspondem aos agrupamentos das linhagens *P. rosanae* CENA516, *A. platensis* CENA597 e *Geminocystis* sp. CENA526, respectivamente.

Os terpenos sesterterpenóides (C25) são muito raros, dos cerca de 1.000 sesterterpenóides conhecidos existem apenas 15 de origem bacteriana (RUDOLF *et al.* 2021). As cibastacinas A e B recentemente isoladas da cianobactéria *Nostoc* sp. BEA-0956, são compostos pentacíclicos com um grupo guanidino cíclico compoendo o quinto anel, ambos os compostos possuem atividade antimicrobiana contra actinomicetos e bactérias patogênicas (CABANILLAS *et al.* 2018). A via biossintética destes compostos ainda não foi elucidada, mas já representam um avanço na obtenção de novas moléculas para serem utilizados em condições de resistência bacteriana a antibióticos, assim como o Scytoscalarol outro composto sesterterpenoide cianobacteriano (MO *et al.*, 2009).

Dentre a subclasse dos meroterpenos o composto, híbrido de policetídeo-terpeno, Austinoneol m/z 415,2 $[M+H]^+$, massa calculada de 414,204 Da e fórmula molecular $C_{24}H_{30}O_6$ foi predito na desreplicação individual para as linhagens *Geminocystis* sp. CENA526, *A. platensis* CENA597 e CENA650 (Figura 18 e APÊNDICE L). O erro para a fórmula deste composto foi 2,3 ppm indicando que apesar de a m/z e o tempo de retenção serem bem próximos da cibastacina A, descrita acima, estes compostos são diferentes. Este composto foi isolado por Santos (2003) do fungo *Penicillium* sp., e em seu trabalho seus espectros apresentaram dois picos mais intensos m/z 353 e m/z 309 resultantes da eliminação

do grupo ceteno com espécie iônica $[M-H-42]$ e o segundo da molécula acetato $[M-H-42-60]$, apresentando ainda as m/z 397, 383, 365, 347, 319 como íons fragmentos principais (SANTOS e RODRIGUES-FILHO, 2003). Para o presente trabalho não foi possível identificar estes picos de fragmentação pois a energia de ionização utilizada é alta em comparação a utilizada pelos autores, não favorecendo a melhor fragmentação do composto.

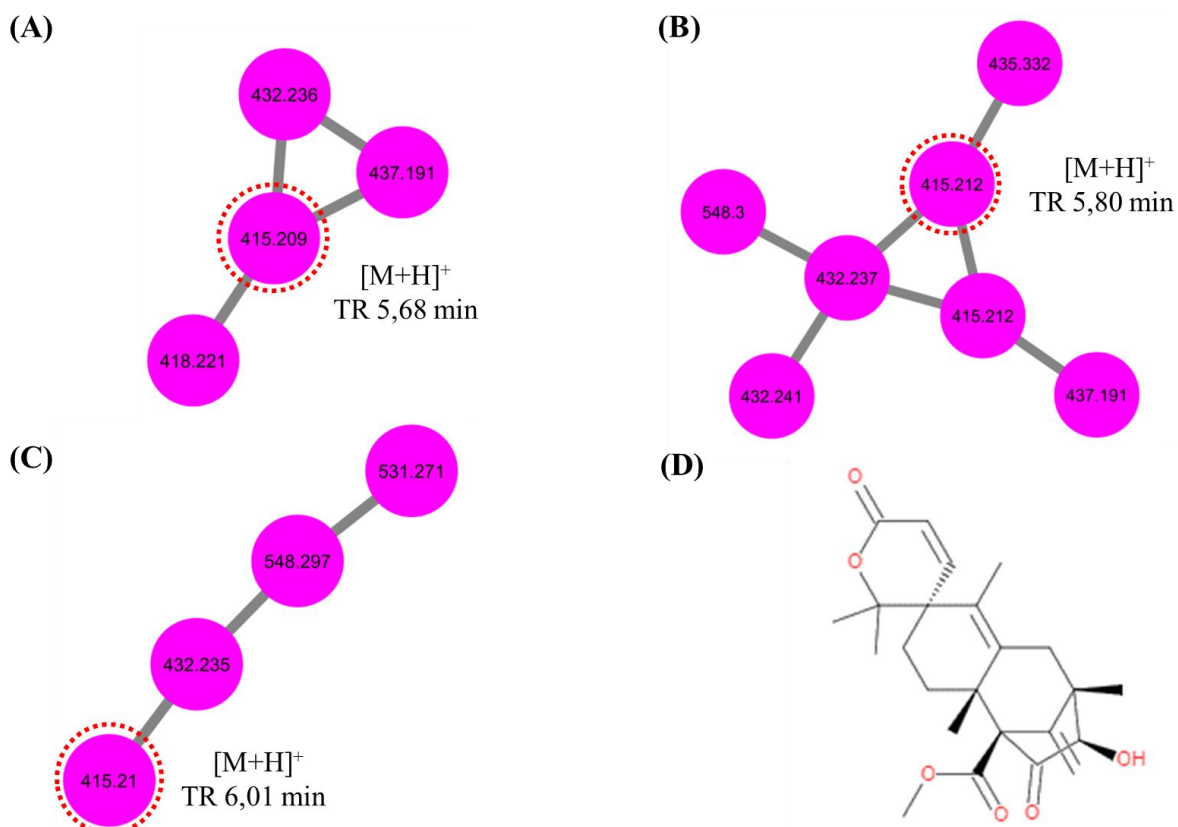


Figura 18. Agrupamentos de nodos m/z 415,2 $[M+H]^+$, preditos como sendo o meroterpeno Austinoneol. A, B, C e D correspondem as linhagens *Geminocystis* sp. CENA526, *A. platensis* CENA597 e CENA650 e a estrutura do composto, respectivamente.

Foram ainda preditos pela desreplicação individual para todas as linhagens os compostos isômeros Scytoficina A e D, que são da subclasse das lactonas diterpênicas (Figura 19). Ambos isômeros possuem a fórmula molecular de $C_{45}H_{75}NO_{12}$ e m/z 821, além de apresentarem a m/z 822 quando protonados $[M+H]$ e m/z 844 quando sodiados $[M+Na]$. Em todas as linhagens avaliadas ambos os picos identificados m/z 804,52 e 844,52 apresentaram o aduto de sódio $[M+Na]^+$ e m/z exata 821,529, não sendo possível identificar qual dos isômeros correspondem aos espectros especificamente. A presença do íon fragmento de m/z 804 é relatada como característica da Scytoficina D após a perda de uma molécula de água $[M+H-H_2O]$ (MOORE, *et al.* 1991). A Scytofincinas A, D e E possuem isomeria entre si

dificultando a elucidação do composto sem o isolamento e utilização de ferramentas como a ressonância magnética nuclear (ISHIBASHI *et al.*, 1986). No entanto a correspondência espectral destes compostos com os dados disponíveis no banco de dados suporta as anotações realizadas pela plataforma, com maior número de picos correspondentes para a Scytoficina A (APÊNDICES M e N).

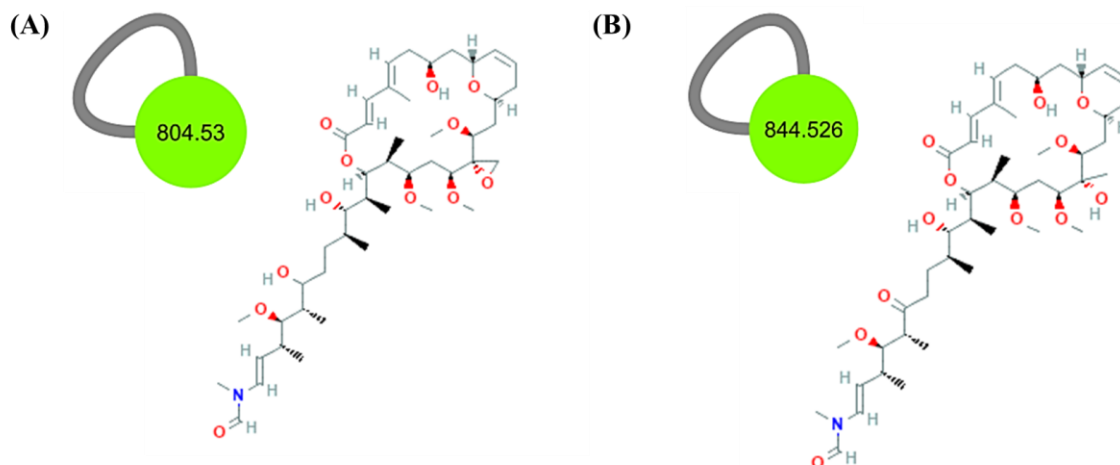


Figura 19. Nodos preditos como correspondes ao composto Scytoficina com perda de uma molécula de água (A) e Scytoficina com aduto de sódio (B).

Neste estudo constatou-se que a utilização da predição de vias biossintéticas dos genomas foi uma maneira eficaz de iniciar os estudos de metabólitos especializados, onde obteve-se uma diversidade de grupos terpênicos e ao mesmo tempo compostos que corresponderam aos genes anotados. A desreplicação dos compostos permitiu confirmar as predições, verificando-se os espectros de fragmentação MS/MS, erro de fórmula e perfil isotópico de cada um deles. Há uma quantidade ainda maior de terpenóides do que as ferramentas utilizadas puderam predizer. Um fato que pode influenciar esta análise é que os terpenos possuem diversas conformações estruturais e a metodologia utilizada buscou cobrir os compostos que tiveram maior representatividade nas análises genômicas. Desta forma, os grupos de compostos terpenóides que possuem a característica de serem voláteis, como os diterpenóides, não puderam ser observados nesta análise, assim como compostos de baixo peso molecular, muito em função da metabolômica não direcionada realizada neste trabalho não ser específica para estes compostos. Logo diferentes metodologias para a realização da extração e análise dos terpenóides devem ser utilizadas, afim de ampliar a quantidade de compostos a serem identificados na desreplicação dos dados espectroscópicos e até mesmo ajudar a elucidar as vias de biossíntese.

6 CONCLUSÕES

- Os genes envolvidos na biossíntese de terpeno, carotenóides e ubiquinonas estão onipresentes nos genomas das seis linhagens estudadas e nos genomas montados do metagenomas (MAGs) das lagoas salino-alcálicas do Pantanal. Três das linhagens e uma das MAGs avaliadas possuem genes para biossíntese dos triterpenos esqualeno e hopeno.
- As ferramentas disponíveis atualmente apresentam limitações quando a predição de genes biossintéticos de compostos terpênicos. No entanto, com o surgimento de ferramentas para conectar metabolomas não direcionados com agrupamentos gênicos permitirá acessar uma quantidade maior de potenciais compostos terpênicos produzidos pelas cianobactérias.
- As cianobactérias possuem potencial para produção de diversos compostos terpenóides com funções ecológicas e aplicações biotecnológicas. As análises realizadas neste trabalho não permitem inferir com precisão a identidade dos compostos encontrados visto que é necessário realizar o isolamento das moléculas para submetê-las a análises espectroscópicas adicionais para a confirmação, no entanto, a desreplicação das anotações *in silico* realizadas, suportam as predições das identidades dos compostos.
- Este estudo contribui para a expansão do conhecimento acerca da produção de metabólitos especializados das cianobactérias e o papel destes metabólitos na sobrevivência destes organismos, além de ampliar o conhecimento acerca da biodiversidade metabólica das lagoas salino-alcálicas do Pantanal.

REFERÊNCIAS

- ABDULLIN, S. R. *Roholtiella mixta* sp. nov. (Nostocales, Cyanobacteria): Morphology, molecular phylogeny, and carotenoid content. **Phycologia**, v. 60, n. 1, p. 73-82, 2021.
- AJIKUMAR, P. K., *et al.* Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. **Molecular pharmaceuticals**, v. 5, n. 2, p. 167-190, 2008.
- ALBARANO, L., *et al.* Genome mining as new challenge in natural products discovery. **Marine drugs**, v. 18, n. 4, p. 199, 2020.
- ALMEIDA, T. I. R. *et al.* Biogeochemical process and the diversity of Nhecolândia lakes, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 2, p. 391-407, 2011.
- ALVARENGA, D. O., RIGONATO, J., BRANCO, L. H. Z., FIORE, M. F. Cyanobacteria in mangrove ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 4, p. 799-817, 2015.
- ALVAREZ, R. *et al.* Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. **Chemical reviews**, v. 114, n. 1, p. 1-125, 2014.
- ANDREOTE, A. P. D., *et al.* Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. **Journal of phycology**, v. 50, n. 4, p. 675-684, 2014.
- ANDREOTE, A. P.; *et al.* Contrasting the Genetic Patterns of Microbial Communities in Soda Lakes with and without Cyanobacterial Bloom. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 244, 2018.
- BARBIÉRO, L., *et al.* Geochemistry of water and ground water in the Nhecolândia, Pantanal of Mato Grosso, Brazil: variability and associated processes. **Wetlands**, v. 22, n. 3, p. 528-540, 2002.
- BARBIÉRO, L., *et al.* Soil morphological control on saline and freshwater lake hydrogeochemistry in the Pantanal of Nhecolândia, Brazil. **Geoderma**, v. 148, n. 1, p. 91-106, 2008.
- BAUMAN, K. D. *et al.* Genome mining methods to discover bioactive natural products. **Natural Product Reports**, v. 38, n. 11, p. 2100-2129, 2021.
- BELIN, B. J. *et al.* Hopanoid lipids: from membranes to plant–bacteria interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 304-315, 2018.
- BENTLEY, F. K., ZURBRIGGEN, A., MELIS, A. Heterologous expression of the mevalonic acid pathway in cyanobacteria enhances endogenous carbon partitioning to isoprene. **Molecular plant**, v. 7, n. 1, p. 71-86, 2014.
- BERGIER, I., A. KRUSCHE, F. GUÉRIN. Alkaline lake dynamics in the Nhecolândia Landscape. In BERGIER, I., e M. L. ASSINE (eds), **Dynamics of the Pantanal Wetland in South America**. Springer International Publishing, 2014, p. 145–161.

BLANK, C.E.; SÁNCHEZ-BARACALDO, P. Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria – a key to understanding the rise in atmospheric oxygen. **Geobiology**, Oxford, v. 8, p. 1–23, 2010.

BLIN, K., *et al.* antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. **Nucleic Acids Research**, v. 49, p. 29–35, 2021.

BLUMENBERG, M., *et al.* Bacteriohopanepolyols record stratification, nitrogen fixation and other biogeochemical perturbations in Holocene sediments of the central Baltic Sea. **Biogeosciences**, v. 10, n. 4, p. 2725-2735, 2013.

BREITMAIER, E. **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. John Wiley & Sons 2006, 223p.

CABANILLAS, A. H. *et al.* Cybastacines A and B: Antibiotic sesterterpenes from a *Nostoc* sp. cyanobacterium. **Journal of natural products**, v. 81, n. 2, p. 410-413, 2018.

CANE, D. E.; IKEDA, H. Exploration and mining of the bacterial terpenome. **Accounts of chemical research**, v. 45, n. 3, p. 463-472, 2012.

CARVALHO, C.C.C.R.; FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 705 – 727, 2010.

CARVER, T., *et al.* Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464-469, 2012.

CALTEAU, A.; *et al.* Phylum-wide comparative genomics unravel the diversity of secondary metabolism in Cyanobacteria. **BMC Genomics**, London, v. 15, p. 977, 2014.

CHANG, W.-C.; *et al.* Current development in isoprenoid precursor biosynthesis and regulation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, p. 571–579, 2013.

COSTA, N. B., KOLMAN, M. A., GIANI, A. Cyanobacteria diversity in alkaline saline lakes in the Brazilian Pantanal wetland: a polyphasic approach. **Journal of Plankton Research**, v. 38, p. 1389–1403, 2016.

D'AGOSTINO, P. M., *et al.* Advances in genomics, transcriptomics and proteomics of toxin-producing cyanobacteria. **Environmental microbiology reports**, v. 8, n. 1, p. 3-13, 2016.

DAVIES, F. K., JINKERSON, R. E., POSEWITZ, M. C. Toward a photosynthetic microbial platform for terpenoid engineering. **Photosynthesis research**, v. 123, n.3, p. 265-284, 2015.

DEMAY, J.; BERNARD, C.; REINHARDT, A.; MARIE, B. Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. **Marine drugs**, v. 17, n. 6, p. 320, 2019.

DEMBITSKY, V.M.; REZANKA, T. Metabolites produced by nitrogen-fixing *Nostoc* species. **Folia Microbiologica**, v. 50, p. 363-393, 2005

DIENST, D. *et al.* High density cultivation for efficient sesquiterpenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2020.

DITTMANN, E. *et al.* Natural product biosynthetic diversity and comparative genomics of the cyanobacteria. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 10, p. 642-652, 2015.

DJOUMBOU FEUNANG, Y. *et al.* ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. **Journal of cheminformatics**, v. 8, n. 1, p. 1-20, 2016.

DOMONKOS, I., *et al.* Phosphatidylglycerol depletion induces an increase in myxoxanthophyll biosynthetic activity in *Synechocystis* PCC6803 cells. **Plant and cell physiology**, v. 50, n. 2, p. 374-382, 2009.

DOMONKOS, I., KIS, M., GOMBOS, Z., UGHY, B. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. **Progress in lipid research**, v. 52, n. 4, p. 539-561, 2013.

ENGLUND, E., *et al.* Production of squalene in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **PLoS one**, v. 9, n. 3, e90270, 2014.

ERNST, M. *et al.* MolNetEnhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. **Metabolites**, v. 9, n. 7, p. 144, 2019.

DEGLI ESPOSTI, M. A journey across genomes uncovers the origin of ubiquinone in cyanobacteria. **Genome biology and evolution**, v. 9, n. 11, p. 3039-3053, 2017.

FERNANDES, A. S. *et al.* HPLC-PDA-MS/MS as a strategy to characterize and quantify natural pigments from microalgae. **Current Research in Food Science**, v. 3, p. 100-112, 2020.

FURIAN, S., *et al.* Chemical diversity and spatial variability in myriad lakes in Nhecolândia in the Pantanal wetlands of Brazil. **Limnology and Oceanography**, v. 58, n. 6, p. 2249-2261, 2013.

GARCÍA-LÓPEZ, R., VÁZQUEZ-CASTELLANOS, J. F., MOYA, A. Fragmentation and coverage variation in viral metagenome assemblies, and their effect in diversity calculations. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, p. 141, 2015.

GAO, X., *et al.* Engineering the methylerythritol phosphate pathway in cyanobacteria for photosynthetic isoprene production from CO₂. **Energy & Environmental Science**, v. 9, n. 4, p. 1400-1411, 2016.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 1, p. 85-98, 2012.

GILCHRIST, C.L.M., CHOOI, Y.-H. Clinker & clustermap.js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. **Bioinformatics**, btab007, 2021.

GOZARI, M. *et al.* Chemistry, biosynthesis and biological activity of terpenoids and meroterpenoids in bacteria and fungi isolated from different marine habitats. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 210, p. 112957, 2021.

GROSS, J.; *et al.* A plant locus essential for phyloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. **Journal of Biological Chemistry**; v. 281, n. 25, p. 17189- 17196, 2006

GRUSZECKI, W. I., STRZAŁKA, K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 2, p. 108-115, 2005.

HALLFMANN, C.; *et al.* Genetically engineering cyanobacteria to convert CO₂, water, and light into the long-chain hydrocarbon farnesene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 9869–9877, 2014.

HAMBLY, A. J.; VAN DUIJNEVELDT, J. S.; GATES, P. J. Identification of β-carotene oxidation products produced by bleaching clay using UPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 353, p. 129455, 2021.

HERRMANN, D., *et al.* Relative configurations of carbapseudopentose moieties of hopanoids of the bacterium *Zymomonas mobilis* and the cyanobacterium ‘*Anacystis montana*’. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 11, p. 1791-1794, 1996.

HOSHINO, T., SATO, T. Squalene–hopene cyclase: catalytic mechanism and substrate recognition. **Chemical Communications**, v. 4, p. 291-301, 2002.

HUCK, C. W. *et al.* Development and evaluation of a new method for the determination of the carotenoid content in selected vegetables by HPLC and HPLC-MS/MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, n. 10, p. 441-449, 2000.

INOUE, S. *et al.* Protection by α-tocopherol of the repair of photosystem II during photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1807, n. 2, p. 236-241, 2011.

ISHIBASHI, M. *et al.* Scytonophycins, cytotoxic and antimycotic agents from the cyanophyte *Scytonema pseudohofmanni*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 51, n. 26, p. 5300-5306, 1986.

JAKI, B., HEILMANN, J., STICHER, O. (New Antibacterial Metabolites from the Cyanobacterium *Nostoc commune* (EAWAG 122b). **Journal of natural products**, v. 63, n. 9, p. 1283-1285, 2000.

KANEHISA, M.; SATO, Y., MORISHIMA, K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 22; n. 428(4), p. 726-731, 2016.

KATO, S. *et al.* Identification and functional analysis of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene (*crtE*) and phytoene synthase gene (*crtB*) for carotenoid biosynthesis in *Euglena gracilis*. **BMC plant biology**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2016.

KAWAMUKAI, M. Biosynthesis and applications of prenylquinones. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 82, n. 6, p. 963-977, 2018.

KHALIFA, S. A.; *et al.* Cyanobacteria: From the oceans to the potential biotechnological and biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 19, n. 5, p. 241, 2021.

KHARBUSH, J. J., *et al.* Composite bacterial hopanoids and their microbial producers across oxygen gradients in the water column of the California Current. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 23, p. 7491-501, 2013.

KIYOTA, H., *et al.* Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO₂. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. 1-7, 2014.

KOMÁREK, J., KAŠTOVSKÝ, J., MAREŠ, J., JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, n. 4, p. 295-335, 2014.

KOTAI, J. **Instructions for Preparation of Modified Nutrient Solution Z8 for Algae**. Norwegian Institute for Water Research: Oslo, Norway, 1972.

KUDOH, K. *et al.* Prerequisite for highly efficient isoprenoid production by cyanobacteria discovered through the over-expression of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase and carbon allocation analysis. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 118, n. 1, p. 20-28, 2014.

LANGE, B. M., *et al.* Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 24, p. 13172-13177, 2000.

LATORRE-PÉREZ, A., VILLALBA-BERMELL, P., PASCUAL, J., & VILANOVA, C. Assembly methods for nanopore-based metagenomic sequencing: a comparative study. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020.

LEÃO, P. N.; *et al.* The chemical ecology of cyanobacteria. **Natural Product Reports**, v. 29, p. 372-391, 2012.

LEÃO, T. F., *et al.* A Multi-Omics Characterization of the Natural Product Potential of Tropical Filamentous Marine Cyanobacteria. **Marine drugs**, v. 19, n. 1, p. 20, 2021.

LEE, S., POULTER, C. D. Cloning, solubilization, and characterization of squalene synthase from *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 11, p. 3808-3816, 2008.

LI, Z., *et al.* Earthy odor compounds production and loss in three cyanobacterial cultures. **Water research**, v. 46, n. 16, p. 5165-5173, 2012.

LIAIMER, A.; *et al.* Nostopeptolide plays a governing role during cellular differentiation of the symbiotic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 112, p. 1862-1867, 2015.

LINDBERG, P.; PARK, S.; MELIS, A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. **Metabolic Engineer**, v. 12, n. 1, p. 70-79, 2010.

LIN, P.C.; PAKRASI, H.B. Engineering cyanobacteria for production of terpenoids. **Planta**, v. 249, p. 145–154, 2019.

LÓPEZ-CORTÉS, A., GARCIA-PICHEL, F., NÜBEL, U., VÁZQUEZ-JUÁREZ, R. Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: a polyphasic study. **International Microbiology**, v. 4, p. 227-236, 2001.

MARTÍNEZ-FÉREZ, I., *et al.* Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for phytoene synthase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1218, n. 2, p. 145-152, 1994.

MARTIN, W. *et al.* Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. **Nature**, v. 393, n. 6681, p. 162-165, 1998.

MARTINS, E. R. C. **Tipologias de lagoas salinas no Pantanal da Nhecolândia (MS)**. 2012. 210 f. Tese (Doutorado em Geografia Física). Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2012

MAURYA, S. K., MISHRA R. Importance of bioinformatics in genome Mining of Cyanobacteria for production of bioactive compounds. In: **Cyanobacteria**. Academic Press, 2019. p. 477-506.

MAZID, M.; KHAN, T.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, v. 3, p. 232–249, 2011.

MCGENITY, T.J., CROMBIE, A.T. MURRELL, J.C. Microbial cycling of isoprene, the most abundantly produced biological volatile organic compound on Earth. **ISME Journal**, v. 12, p. 931–941, 2018.

MELIS, A. Carbon partitioning in photosynthesis. **Current opinion in chemical biology**, v. 17, n. 3, p. 453-456, 2013.

MICALLEF, M. L., *et al.* Genome mining for natural product biosynthetic gene clusters in the Subsection V cyanobacteria. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-20, 2015.

MIRKOVIC, T. *et al.* Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. **Chemical reviews**, v. 117, n. 2, p. 249-293, 2017.

MO, S. *et al.* An antimicrobial guanidine-bearing sesterterpene from the cultured cyanobacterium *Scytonema* sp. **Journal of natural products**, v. 72, n. 11, p. 2043-2045, 2009.

MOHAMED, H. E., *et al.* Myxoxanthophyll is required for normal cell wall structure and thylakoid organization in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 20, p. 6883-6892, 2005.

MOHIMANI, H. *et al.* Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra. **Nature chemical biology**, v. 13, n. 1, p. 30-37, 2017.

MOORE, R. E., *et al.* **Scytophycins**. University of Hawaii, Honolulu, Hi; Eli Lilly and Company, Indianapolis, Ind. USA: N° Patente: 4,996,229. Depósito: 31 de Agosto de 1989. Concessão: 26 de fevereiro de 1991.

NAKANO, C., KIM, H. K., OHNISHI, Y. Identification of the First Bacterial Monoterpene Cyclase, a 1, 8-Cineole Synthase, that Catalyzes the Direct Conversion of Geranyl Diphosphate. **ChemBioChem**, v. 12, n. 13, p. 1988-1991, 2011.

NAMAN, C. B., *et al.* Integrating molecular networking and biological assays to target the isolation of a cytotoxic cyclic octapeptide, samoamide A, from an American Samoan marine cyanobacterium. **Journal of natural products**, v. 80, n. 3, p. 625-633, 2017.

NANDAGOPAL, P., *et al.* Bioactive Metabolites Produced by Cyanobacteria for Growth Adaptation and Their Pharmacological Properties. **Biology**, v. 10, n. 10, p. 1061, 2021.

NAZIR, M. *et al.* Meroterpenoids: A Comprehensive Update Insight on Structural Diversity and Biology. **Biomolecules**, v. 11, n. 7, p. 957, 2021.

NIELSEN, P. H. Microbial biotechnology and circular economy in wastewater treatment. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1102-1105, 2017.

NIU, F. X., LU, Q., BU, Y. F., LIU, J. Z. Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids: carotenoids and isoprenoid-based biofuels. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 167-175, 2017.

NGUYEN, D. D. *et al.* MS/MS networking guided analysis of molecule and gene cluster families. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 28, p. 2611-2620, 2013.

OLIVEIRA, A. P. G. *et al.* Uso de sensoriamento remoto na quantificação das lagoas do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul. In: **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Curitiba, v.15, p. 3695-3702, 2011.

OLSON, N. D., *et al.* Metagenomic assembly through the lens of validation: recent advances in assessing and improving the quality of genomes assembled from metagenomes. **Briefings in bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1140-1150, 2019.

PATTANAIK, B., LINDBERG P. Terpenoids and their biosynthesis in cyanobacteria. **Life**, v. 5, n. 1, p. 269-93. 2015

PEARSON, A., *et al.* Novel hopanoid cyclases from the environment. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2175-2188, 2007.

PELLEGRINETTI, T.A. *et al.* Bacterial Communities Along Environmental Gradients in Tropical Soda Lakes. **Microbial Ecology**, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02086-6>

PRINSEP, M. R. Tolypodiol, an anti-inflammatory diterpenoid from the cyanobacterium *Tolypothrix nodosa*. **Journal of natural products**, v. 59, n. 8, p. 786-788, 1996.

QUESADA, A.; VINCENT, W. F. Cyanobacteria in the cryosphere: snow, ice and extreme cold. In: **Ecology of cyanobacteria II**. Springer, Dordrecht, 2012. p. 387-399.

QUILLAGUAMÁN, J.; *et al.* Optimizing conditions for poly(β -hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 981-986, 2007.

QUINCE, C. *et al.* Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833-844, 2017.

QUINN, R. A., *et al.* Molecular Networking as a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 2, p. 143-154, 2017.

RAI, A.N., BERGMAN, B.; RASMUSSEN, U. **Cyanobacteria in symbiosis**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherland, 2002.

RASTOGI, R. P.; INCHAROENSAKDI, A. Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU2555. **FEMS microbiology ecology**, v. 87, n. 1, p. 244-256, 2014.

RIVERA, S. M.; CHRISTOU, P.; CANELA-GARAYOA, R. Identification of carotenoids using mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 33, n. 5, p. 353-372, 2014.

ROHMER, M.; *et al.* Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. **Biochemical Journal**, v. 295, p. 517-524, 1993.

ROHMER, M.; *et al.* Glyceraldehyde 3-Phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, p. 2564-2566, 1996.

RUDOLF, J. D. *et al.* Bacterial terpenome. **Natural Product Reports**, v. 38, n. 5, p. 905-980, 2021.

SADRE, R.; PFAFF, C.; BUCHKREMER, S.. Plastoquinone-9 biosynthesis in cyanobacteria differs from that in plants and involves a novel 4-hydroxybenzoate solanesyltransferase. **Biochemical Journal**, v. 442, n. 3, p. 621-629, 2012.

SÁENZ, J. P., WAKEHAM, S. G., EGLINTON, T. I., SUMMONS, R. E. New constraints on the provenance of hopanoids in the marine geologic record: Bacteriohopanepolyols in marine suboxic and anoxic environments. **Organic Geochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1351-1362, 2011.

SÁENZ, J.P., WATERBURY, J.B., EGLINGTON, T.I., SUMMONS, R. E. Hopanoids in marine cyanobacteria: probing their phylogenetic distribution and biological role. **Geobiology**, v. 10, p. 311-319, 2012.

SÁENZ, J. P. *et al.* Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 38, p. 11971-11976, 2015.

SANDBMANN, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 38, n. 1, P. 4-12, 2001.

SANDBMANN, G. Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. **Physiologia Plantarum**, v. 116, n. 4, p. 431-440, 2002.

SANDBMANN, G. Antioxidant protection from UV-and light-stress related to carotenoid structures. **Antioxidants**, v. 8, n. 7, p. 219, 2019.

SANTOS, R. M. G. dos. **Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium sp* e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)**. 2003. 453 f. Tese (Doutorado). Pós Graduação em Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 2003.

SANTOS, R. M.; RODRIGUES-FILHO, E. Structures of meroterpenes produced by *Penicillium sp*, an endophytic fungus found associated with *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 5, p. 722-727, 2003.

SANTOS, K. R. D. S., SANT'ANNA, C. L. Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas ("salina", "salitrada" e "baía") representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. **Brazilian journal of botany**, v. 33, p. 61-83, 2010.

SCHAGERL, M., MÜLLER, B. Acclimation of chlorophyll a and carotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria. **Journal of plant physiology**, v. 163, n. 7, p. 709-716, 2006.

SCHMERK, CL, BERNARDS, MA, VALVANO, MA. Hopanoid production is required for low-pH tolerance, antimicrobial resistance, and motility in *Burkholderia cenocepacia*. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 23, p. 6712-67230, 2011.

SEDOUD, A., *et al*. The cyanobacterial photoactive orange carotenoid protein is an excellent singlet oxygen quencher. **The Plant Cell**, v. 26, n. 4, p. 1781-1791, 2014.

SEEMMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, p. 2068–2069, 2014.

SIEDENBURG, G., JENDROSSEK, D. Squalene-hopene cyclases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 3905-3915, 2011.

SILVA, C. S. P., GENUARIO, D. B., VAZ, M. G. M. V., FIORE, M. F. Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. **Systematic and applied microbiology**, v. 37, n. 2, p. 100-112, 2014.

SINGH, S. P. *et al*. Genome mining of mycosporine-like amino acid (MAA) synthesizing and non-synthesizing cyanobacteria: A bioinformatics study. **Genomics**, v. 95, n. 2, p. 120-128, 2010.

SMITH, A. J. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. **Annales de Microbiologie**, v. 134B, p. 93-113, 1983.

- SOZER, O. *et al.* Involvement of carotenoids in the synthesis and assembly of protein subunits of photosynthetic reaction centers of *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Plant Cell Physiology**, v. 51, p. 823–835, 2010.
- STAL, L.J.; MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p. 179-211, 1997.
- STAMAKIS, K., TSIMILLI, M. M.; PAPAGEORGIOU, G.C. On the question of the light-harvesting role of beta-carotene in photosystem II and photosystem I core complexes. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 81, p. 121–127, 2014.
- STRAMMA, L., JOHNSON, G. C., SPRINTALL, J., MOHRHOLZ, V. Expanding oxygen-minimum zones in the tropical oceans. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 655-658, 2008.
- TALBOT, H. M., WATSON, D. F., PEARSON, E. J.; FARRIMOND, P. Diverse biohopanoid compositions of non-marine sediments. **Organic Geochemistry**, v. 34, n. 10, p. 1353-1371, 2003.
- TALBOT, H.M., SUMMONS, R.E., JAHNKE, L.L., COCKELL, C.S., ROHMER, M., FARRIMOND, P. Cyanobacterial bacteriohopanepolyol signatures from cultures and natural environmental settings. **Organic Geochemistry**, v. 39, p. 232-263, 2008.
- TALBOT, H. M. *et al.* Analysis of non-derivatised bacteriohopanepolyols by ultrahigh-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, n. 19, p. 2087-2098, 2016.
- TAKAICHI, S. Carotenoids in algae: distributions, biosynthesis and functions. **Marine drugs**, v. 9, n. 6, p. 1101-1118, 2011.
- TAKAICHI S. Tetraterpenes: Carotenoids. In: RAMAWAT K., MÉRILLON JM. (eds) **Natural Products**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013.
- TAKAICHI, S.; MOCHIMARU, M. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. **Cellular and molecular life sciences**, v. 64, n. 19, p. 2607-2619, 2007.
- TAKANO, H. *et al.* Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3: identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1825-1832, 2005
- TANG, X. *et al.* Antifungal activity of essential oil compounds (geraniol and citral) and inhibitory mechanisms on grain pathogens (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*). **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2108, 2018.
- THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 297–304, 2006.

VAN BREEMEN, R. B., DONG, L., PAJKOVIC, N. D. Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry of carotenoids. **International journal of mass spectrometry**, v. 312, p. 163-172, 2012.

VANDECRAEN, J., *et al.* The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 6, p. 709-730, 2017.

VAZ, M. G. M. V., *et al.* *Pantanalinema* gen. nov. and *Alkalinema* gen. nov.: novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline-alkaline lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 298–308, 2015.

WANG, X.; QUINN, P.J. Vitamin E and its function in membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 38, n. 4, p. 309-36, 1999.

WANG, Z. The diversity, origin, and evolutionary analysis of geosmin synthase gene in cyanobacteria. **Science of the Total Environment**, v. 689, p. 789-796, 2019.

WEBER, T.; KIM, H. U. The secondary metabolite bioinformatics portal: computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 69-79, 2016.

WELANDER, P. V., SUMMONS, R. E. Discovery, taxonomic distribution, and phenotypic characterization of a gene required for 3-methylhopanoid production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 32, p. 12905-12910, 2012.

WILMOTTE, A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: BRYANT, D.A. **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer, 1994. p. 1-25.

WINTER, J.M.; BEHNKEN, S.; HERTWECK, C. Genomics-inspired discovery of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 15, p. 22-31, 2011

WONG, D. Applications of metagenomics for industrial bioproducts. In: MARCO, D (Ed.). **Metagenomics: Theory, Methods and Applications**. 1 Ed. Norwich, RU: Horizon Scientific Press), p. 141–158. 2010

XU, Ling *et al.* OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W52-W58, 2019.

YANG, J. Y. *et al.* Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of natural products**, v. 76, n. 9, p. 1686-1699, 2013.

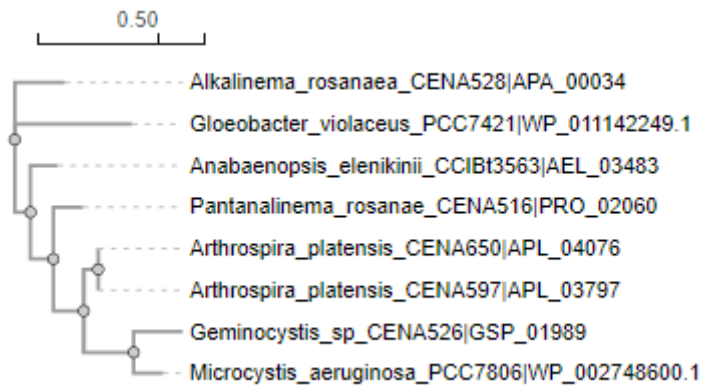
ZARZYCKI, P.K., PORTKA, J.K. Recent advances in hopanoids analysis: Quantification protocols overview, main research targets and selected problems of complex data exploration. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 153, p. 3-26, 2015.

ZEHNDER, J.L. Drugs used in disorders of coagulation. **Basic and clinical pharmacology**, v. 11, p. 587-599, 2018.

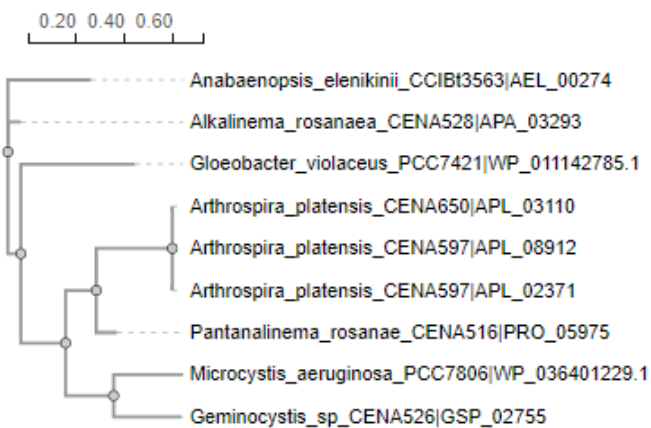
ZHAO, L., *et al.* Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Annual review of biochemistry**, v. 82, p. 497-530, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Árvore filogenética do gene *Dxr* (1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase) conforme a ferramenta OrthoVenn.



APÊNDICE B. Árvore filogenética do gene *ispD* (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidililtransferase) conforme a ferramenta OrthoVenn.



APÊNDICE C. Árvore filogenética do gene *ispE* (4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinase) conforme a ferramenta OrthoVenn.



APÊNDICE D. Árvore filogenética do gene *ispF* (2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase) conforme a ferramenta OrthoVenn.



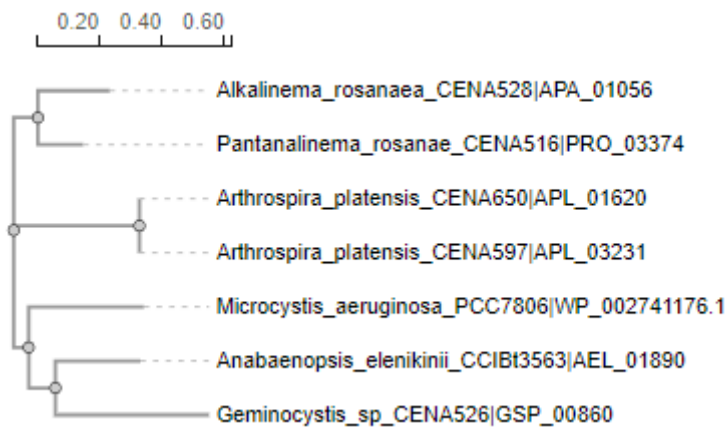
APÊNDICE E. Árvore filogenética do gene *ispG* (4-hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato sintase) conforme a ferramenta OrthoVenn.

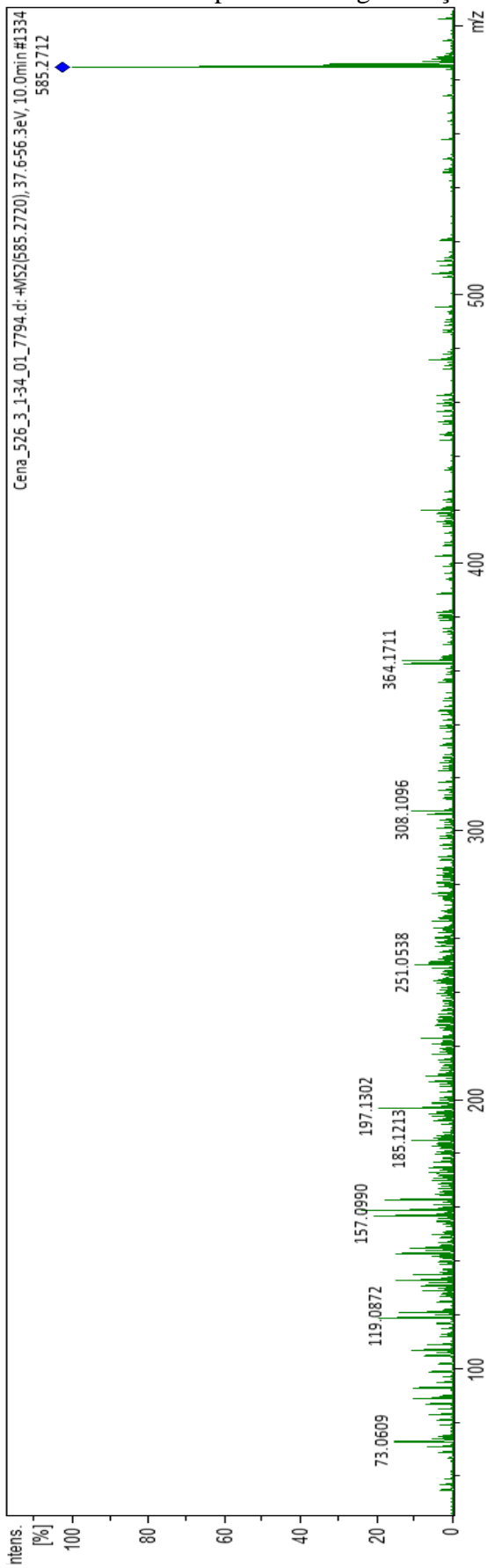


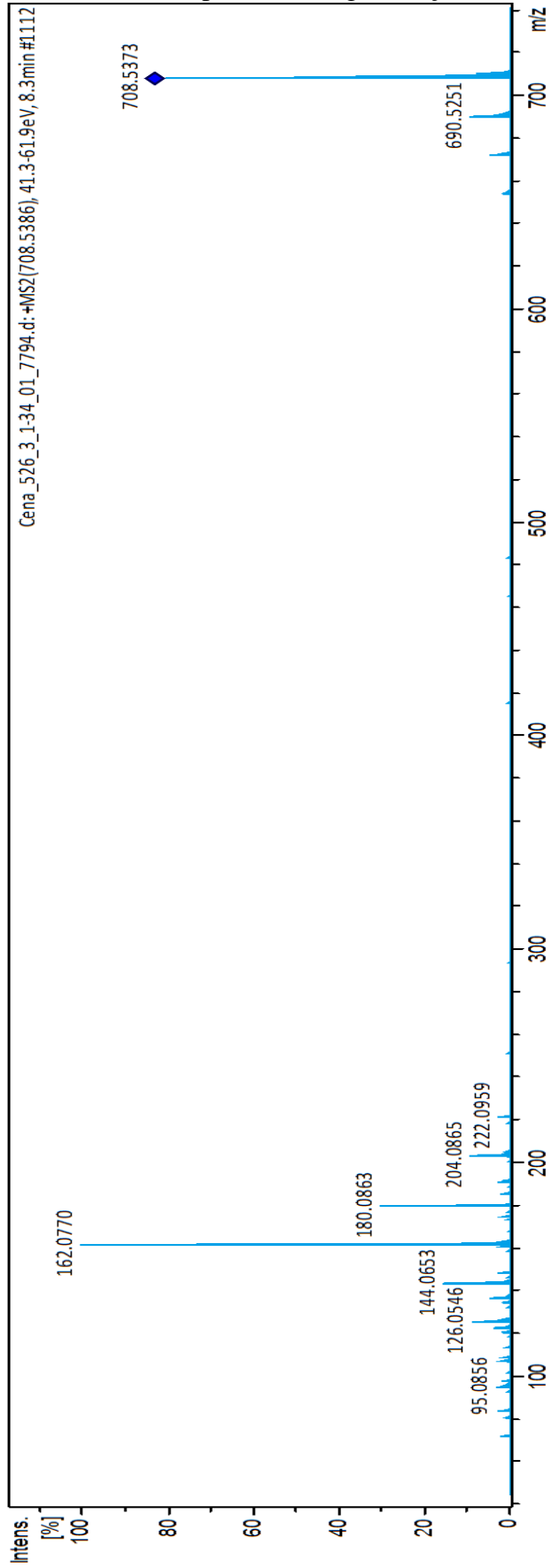
APÊNDICE F. Árvore filogenética do gene *ispH* (4-hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato redutase) conforme a ferramenta OrthoVenn.

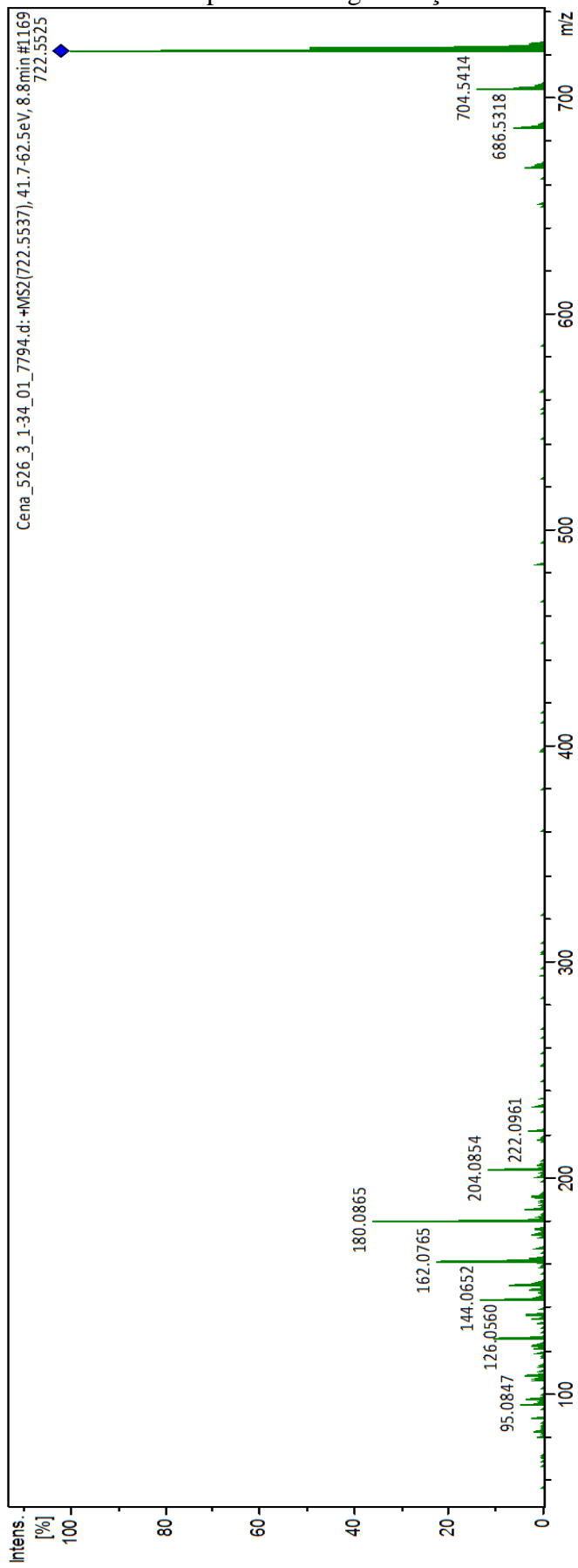


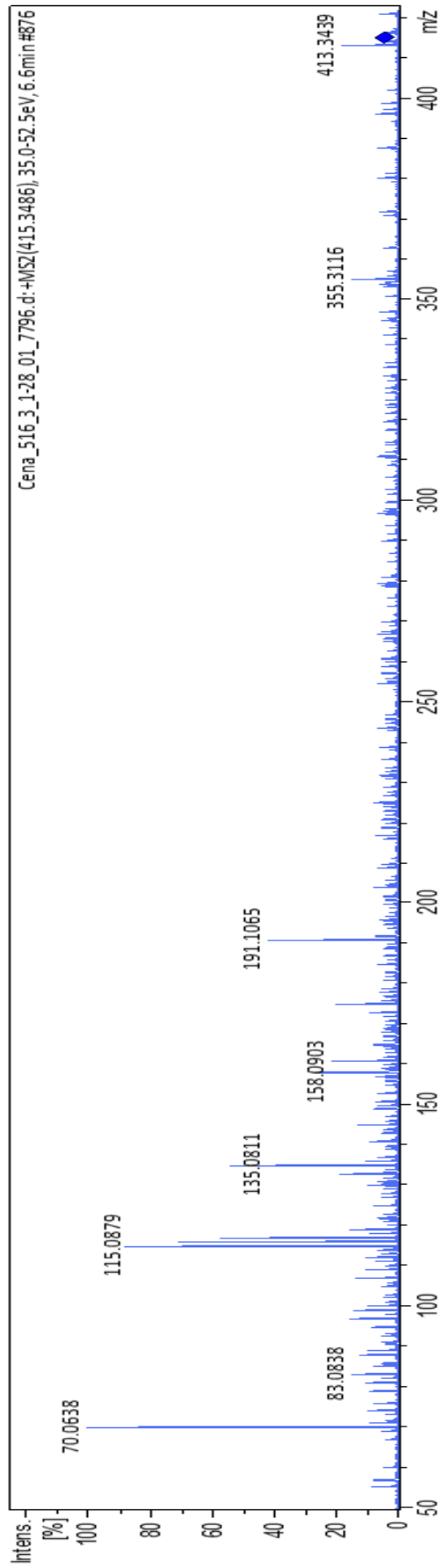
APÊNDICE G. Árvore filogenética do gene *idi* (Isopentenil-difosfato delta-isomerase) conforme a ferramenta OrthoVenn.

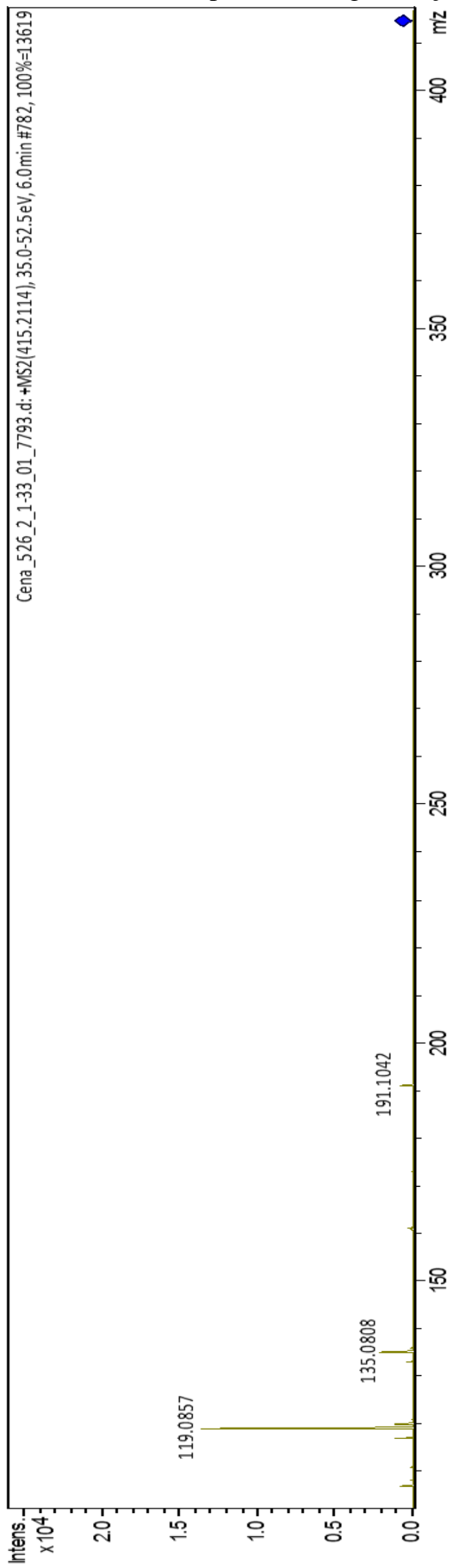


APÊNDICE H. Espectro de fragmentação MS/MS do composto m/z 585,42 $[M+H]^+$.

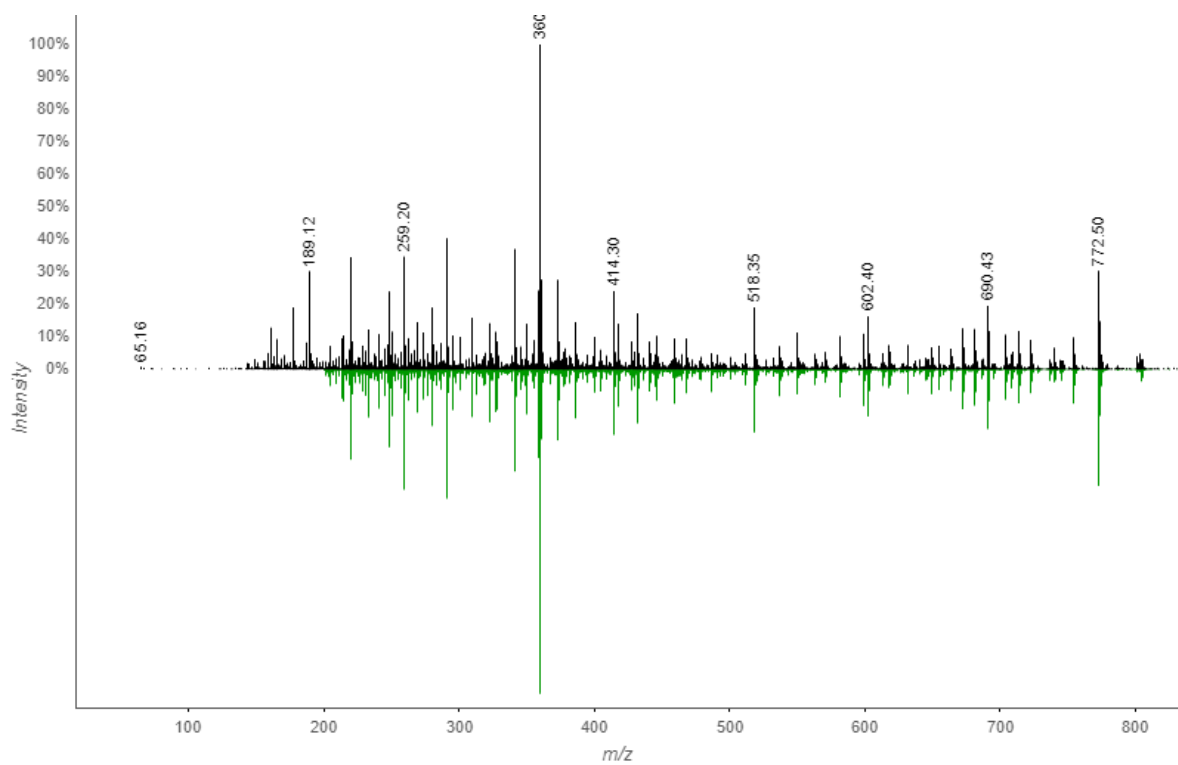
APÊNDICE I. Espectro de fragmentação MS/MS do composto m/z 708,5373 $[M+H]^+$.

APÊNDICE J. Espectro de fragmentação MS/MS do composto m/z 722,5525 $[M+H]^+$.

APÊNDICE K. Espectro de fragmentação MS/MS do composto m/z 414,34.

APÊNDICE L. Espectro de fragmentação MS/MS do composto m/z 414,21.

APÊNDICE M. Correspondência dos espectros disponíveis no GNPS para o composto anotado como Scytocina A.



APÊNDICE N. Correspondência dos espectros disponíveis no GNPS para o composto anotado como Scytocina D.

