

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-  
FARMACÊUTICA)  
ÁREA DE TECNOLOGIA QUÍMICO-FARMACÊUTICA

**Quimioprospecção de cianobactérias brasileiras utilizando metabolômica e  
ensaios biológicos**

MÁRCIO BARCZYSZYN WEISS

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Camila Manoel Crnkovic

SÃO PAULO  
2023



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-  
FARMACÊUTICA)  
ÁREA DE TECNOLOGIA QUÍMICO-FARMACÊUTICA

Quimioprospecção de cianobactérias brasileiras utilizando metabolômica e  
ensaios biológicos

MÁRCIO BARCZYSZYN WEISS

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Camila Manoel Crnkovic

SÃO PAULO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

W429 Weiss, Márcio Barczyszyn  
Quimioprospecção de cianobactérias brasileiras  
utilizando metabolômica e ensaios biológicos / Márcio  
Barczyszyn Weiss. - São Paulo, 2023.  
122 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.  
Orientador: Crnkovic, Camila Manoel

1. Cyanobacteria. 2. Metabolômica. 3.  
Desrepliação. 4. Produtos Naturais. I. T. II.  
Crnkovic, Camila Manoel, orientador.

MARCIO BARCZYSZYN WEISS

**Quimioprospecção de cianobactérias brasileiras utilizando metabolômica e ensaios biológicos**

Comissão julgadora da Dissertação para a obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Camila Manoel Crnkovic  
orientadora/presidente

---

1o. Examinador

---

2o. Examinador

---

3o. Examinador

---

4o. Examinador

São Paulo, 22 de setembro de 2023

SÃO PAULO  
2023



## **AGRADECIMENTOS**

A realização desse trabalho foi possível devido à presença e apoio de pessoas e instituições às quais eu imensamente agradeço.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Camila Manoel Crnkovic pela confiança e por acreditar em mim. Obrigado pela oportunidade de retornar ao convívio universitário quando eu mesmo não achava mais possível. Obrigado por compartilhar tanto conhecimento e experiências durante esses quase três anos que foram fundamentais para o meu crescimento como pesquisador; quando nem eu mesmo achava possível chegar aonde eu cheguei.

À Profa. Dra. Célia Sant'anna, do Instituto de Botânica de São Paulo, por nos ter cedido linhagens do precioso banco de cianobactérias CCIBt, linhagens estas que foram analisadas por metabolômica e ensaios biológicos no presente estudo.

Ao Prof. Dr. Roberto Berlinck por abrir as portas de seu laboratório no IQSC-USP para que pudéssemos realizar as análises de LC-MS/MS. Agradeço também ao Dr. Vítor Freire e à Dra. Fabiana T. Rodrigues Martinelli por nos ajudar com as análises.

À Prof. Dra. Silvyta Stuchi Maria-Engler pela oportunidade de realizarmos os testes de viabilidade celular contra células de câncer em seu laboratório. Agradeço também ao doutorando Manoel Oliveira de Moraes Junior por compartilhar o seu conhecimento sobre os bioensaios e por ter se disponibilizado a ajudar.

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto por nos receber em seu laboratório do LTPNA e nos disponibilizar a sua estrutura para que esse trabalho pudesse ser iniciado em plena pandemia. Agradeço a todos os seus alunos que prontamente me ajudaram e tão bem me receberam. Muito obrigado à Dra. Fernanda Rios Jacinavicius, Dra. Vanessa Geraldine, às doutorandas Mariana Torres, Rhuana Valdetário Médici e Éryka Costa de Almeida. Aos mestrandos Felipe Garcia e Larissa Souza.

Ao Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso, do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela parceria na realização dos testes anti-*Leishmania*, assim como o agradecimento à Dra. Sandra Regina Castro Soares por ter realizado todos os testes.

Ao prof. Ricardo Moreira Borges do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ por nos ter permitido participar do desenvolvimento e lançamento da ferramenta DAFdiscovery que foi importante na condução e fechamento desse projeto. Obrigado pela ajuda e pelas conversas.

Agradeço aos técnicos de laboratório Gledson Manso Guimarães, Larissa Bentin, Anderson Franco Anselmo e Alexandre Mariane Rodrigues por toda ajuda e disponibilidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 "*This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.*

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelos auxílios financeiros (Processos no. 2022/02872-4, 2020/07710-7 e 2019/17721-9) que possibilitaram o desenvolvimento da pesquisa com a aquisição de equipamentos e materiais para o laboratório, a realização de análises, e proporcionaram as minhas participações nos Congressos da *American Society of Pharmacognosy (ASP) Annual Meeting* em Charleston 2022 e Maryland 2023.

Ao programa de Pós-graduação Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF e à Universidade de São Paulo.

Obrigado aos membros do Lab. Azul, João Pedro Brandão Domingues, Jaewon Yoon, Heloísa Maria Muneratti Amorim, Renata Porto Sampaio, Sarah Salviano, Francisco Henrique Santana da Silva, Leonardo Santos de Jesus e Leonardo de Faria Figueiredo por todo o companheirismo, por tornar a rotina mais leve e divertida e pelos divertidos momentos juntos. Sem vocês esse trabalho não existiria.

Aos alumni do Lab Azul Maria Gabriela Silva Bueno, Yuri Nunes Reche e Luiza Viana e Oliveira pela parceria e companheirismo.

Agradeço à minha amiga Susan Egbert, Lichenlady, pela amizade internacional que a ASP me deu; (*Thanks to my friend Susan Egbert, Lichenlady, for the international friendship that ASP given to me*).

Obrigado aos amigos de longa data pela presença, desabafos, ajuda e amizade que não esmorece e só cresce (da escola para a vida), Pablo Eric Toledo Majer,



Raissa Souza Santos, Mauricio Muller Francisco, Jessica Dipold e Douglas Bettioli.

Obrigado aos amigos-irmãos que a FCFar UNESP Araraquara me deu, Erick Urano Braga e Jhohann Richard de Lima Benzi por estarem comigo desde as épocas de república, compartilhando momentos bons e ruins, sempre com boas risadas e memes.

Obrigado especial para Rhuana Valdetário Médice, Natália Trigo Balestrin, Erick Urano Braga por todos os momentos dessa jornada.

Agradeço especialmente à Thabata Martins Brandão Correia que sem o seu incentivo e apoio eu jamais teria me arriscado nessa empreitada. Obrigado por ter feito parte de tudo isso e de tantos momentos especiais.

Por fim, agradeço aos meus pais, Nelson Weiss (*in memoriam*) e Maria Augusta Barczyszyn por terem sempre me apoiado, ajudado, ensinado e amado. Tudo o que eu sou eu devo a vocês.



“Everything in this world is magic except to the magician.”  
(Chestnut, 2016)



## Resumo

Os produtos naturais são uma importante fonte de moléculas com aplicações terapêuticas e biotecnológicas. No entanto, a complexidade inerente às matrizes biológicas e as crescentes taxas de redescoberta de moléculas impõem desafios para a busca por novos compostos bioativos. A exploração de novos espécimes da biodiversidade e a aplicação de ferramentas computacionais são imperativos para a identificação de novas entidades químicas promissoras. Foi proposto catalisar o processo de prospecção química para demonstrar o potencial das cianobactérias brasileiras como fonte de novas moléculas bioativas. Nove linhagens de cianobactérias de água doce/terrestres foram cultivadas, extraídas e fracionadas. Extratos e frações foram testados quanto ao potencial citotóxico contra o microcrustáceo *Artemia salina*, antiproliferativo contra linhagens celulares de melanoma humano e contra promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. As amostras foram analisadas em paralelo via UPLC-HRMS/MS. Foi criada uma rede molecular através da plataforma GNPS. A desrepliação contou também com o suporte da plataforma DAFdiscovery, ferramenta que, através da fusão de informações dos dados de LC-MS/MS com os metadados contendo informações obtidas dos bioensaios, elenca quais as *features* se correlacionam com a atividade biológica. A anotação seguida de busca em base de dados foi realizada com auxílio do software SIRIUS. Quatro linhagens de cianobactérias foram selecionadas seguindo essa abordagem devido ao seu potencial ineditismo químico e bioatividade, sendo elas *Brasilonema octagenarum*, *Anagnostidinema amphibium*, *Nostoc* sp. e *Komarekiella atlantica*.

**Palavras-chave:** Cyanobacteria, Metabolômica, Desrepliação, Produtos Naturais.



## Abstract

Natural products are an important source of molecules with therapeutic and biotechnological applications. However, the inherent complexity of biological matrices and the increasing rediscovery rates challenge the search for new bioactive compounds. Exploring new specimens of biodiversity and applying computational tools are imperative for identifying promising new chemical entities. In this study, we proposed to catalyze the chemical prospecting process to demonstrate the potential of Brazilian cyanobacteria as a source of new bioactive molecules. Nine strains of freshwater cyanobacteria were cultivated, extracted, and fractionated. Extracts and fractions were tested for cytotoxic potential against the microcrustacean *Artemia salina*, antiproliferative against human melanoma cell lines, and *Leishmania* (L.) *amazonensis* promastigotes. Samples were analyzed in parallel via UPLC-HRMS/MS. A molecular network was created using the GNPS platform. Dereplication was guided by DAFdiscovery, a computational tool that, through the fusion of information from LC-MS/MS data with metadata containing information obtained from bioassays, indexed which features correlate with biological activity. Annotation followed by a database search was performed using the SIRIUS software. *Brasilonema octagenarum*, *Anagnostidinema amphibium*, *Nostoc* sp., and *Komarekiella atlantica* were selected following this approach due to their potential chemical novelty and bioactivity.

**Key-words:** Cyanobacteria, metabolomics, dereplication, natural products.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Micrografia das nove linhagens cianobactérias brasileiras de água doce analisadas neste estudo. ....	26
<b>Figura 2</b> - Estruturas das toxinas produzidas por cianobactérias .....	28
<b>Figura 3</b> - Floração de cianobactérias em um lago do museu Mariano Procópio em Juiz de Fora, Minas Gerais.....	29
<b>Figura 4</b> - Estrutura química da dolastatina .....	30
<b>Figura 5</b> - Estruturas de produtos naturais bioativos produzidas por cianobactérias.....	31
<b>Figura 6</b> - Esquema representativo de uma rede molecular .....	34
<b>Figura 7</b> - Representação do alinhamento espectral de espectros de massas da amostra analisada e a da base de dados GNPS .....	35
<b>Figura 8</b> - Local de coleta das cianobactérias.....	40
<b>Figura 9</b> - Rede molecular formada pelos metabólitos detectados em extratos e frações das nove linhagens de cianobactérias analisadas.....	54
<b>Figura 10</b> - Anotação estrutural química da rede molecular formada pelos metabólitos detectados de extratos e frações das nove linhagens de cianobactérias pela ferramenta MolNetEnhancer .....	55
<b>Figura 11</b> - Rede molecular com destaque para dois clusters formados por metabólitos primários de cianobactérias.....	57
<b>Figura 12</b> - Cluster formado por nodos que representam glicolipídios e derivados.....	58
<b>Figura 13</b> - Cluster dos catabólitos da clorofila, com indicação para o feoforbídeo	
<b>Figura 14</b> - Esquema do desmembramento da rede molecular em quatro redes diferentes .....	60
<b>Figura 15</b> - Rede molecular com destaque para a diversidade metabólica de duas linhagens de cianobactéria, <i>Brasilonema octagenarum</i> e <i>Komarekiella atlantica</i> .....	61
<b>Figura 16</b> - Destaque para os clusters Brasoc-1 e Brasoc-2 totalmente anotados.....	62

<b>Figura 17</b> - Rede molecular com destaque para a atividade de citotoxicidade aguda contra o microcrustáceo <i>Artemia salina</i> .....	67
<b>Figura 18</b> - Gráfico de correlação do padrão MS1 com a bioatividade gerado a partir do DAFdiscovery.....	68
<b>Figura 19</b> - Clusters formados exclusivamente por features correlacionadas com a bioatividade detectadas a partir do extrato e fração F4 da linhagem <i>Anagnostidinema amphibium</i> . ....	69
<b>Figura 20</b> - Rede molecular MS/MS para as features de amostras com atividade da avaliação da viabilidade celular. ....	73
<b>Figura 21</b> - Cromatograma de íon extraído .....	75
<b>Figura 22</b> - Cromatograma de íon extraído .....	76
<b>Figura 23</b> - Clusters formados exclusivamente por features do extrato e frações da linhagem <i>Komarekiella atlantica</i> CCIBt3307. ....	80
<b>Figura 24</b> - Cluster Komar-1 contendo as features que foram anotadas com auxílio do software SIRIUS. ....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Reagentes para as soluções estoque dos meios BG-0 e BG-11.....	41
<b>Tabela 2</b> - Reagentes para o preparo de 1 L da solução estoque de micronutrientes para meios BG-0 e BG-11.....	41
<b>Tabela 3</b> - Solução A para preparo de 200 mL de solução estoque do meio ASM-1.....	42
<b>Tabela 4</b> - Solução B para preparo de 100 mL de solução do meio ASM-1..	42
<b>Tabela 5</b> - Solução C para preparo de 100 mL de solução do meio ASM-1..	42
<b>Tabela 6</b> - Solução D para preparo de 100 mL de solução do meio ASM-1..	43
<b>Tabela 7</b> - Compilados de solventes utilizados para a extração de biomassa a partir de cianobactérias.....	50
<b>Tabela 8</b> - Linhagens de cianobactérias e relação de cultivo e biomassa.....	
<b>Tabela 9</b> - Resultados dos fracionamentos e rendimentos .....	52
<b>Tabela 10</b> - Resultado obtido pela ferramenta DAFdiscovery correlacionando dados de LC-MS e bioatividade das frações da linhagem Nostoc sp. ....	74



## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Gráfico demonstrando a citotoxicidade da linhagem <i>Anagnostidinema amphibium</i> CCIBt3214 observada no bioensaio contra <i>Artemia salina</i> .....	66
<b>Gráfico 2</b> - Resultados do ensaio de viabilidade celular de amostras da linhagem <i>Nostoc</i> sp. CCIBt3329.....	72
<b>Gráfico 3</b> - Resultados do ensaio da atividade citotóxica contra <i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i> de amostras da linhagem <i>Komarekiella atlantica</i> CCIBt3307 .....	79



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ASM-1:** *artificial sea water medium*

**BG-11:** *blue green algae medium*

**CCIBt:** Coleção de Cianobactérias do Instituto de Botânica

**CLAE:** cromatografia líquida de alta eficiência CLAE

**DCM:** diclorometano

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**EIC:** cromatograma de íon extraído (*extracted ion chromatogram*)

**ESI:** ionização pelo processo electrospray (*electrospray ionisation*)

**AcOEt:** acetato de etila

**EtOH:** etanol

**EXT:** extrato(s)

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FRA:** fração/frações

**GNPS:** *Global Natural Product Social Media Networking*

**HABs:** proliferação de algas nocivas (*harmful algal blooms*)

**HPLC:** cromatografia líquida de alta eficiência

**HRMS:** espectrometria de massas de alta resolução

**HTS:** *High throughput-screening*

**IPA:** isopropanol

**MeOH:** metanol

**MGDG:** monogalactosil diacilglicerol

**mgf:** *mascot generic format files*

**MS:** espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

**MTT:** 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazólio

**NRPS:** sintetases de peptídeos não ribossomais (*nonribosomal peptide synthetases*)

**P.A.:** padrão analítico

**PKS:** sintases de policetídeos (*polyketide synthases*)

**PNs:** produtos naturais

**ppm:** partes por milhão

**PubChem:** *Public repository for information on Chemical substances and their biological activities*

**RMN:** ressonância magnética nuclear

**Sisgen:** Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

**SHY:** estatística de hetero espectroscopia (*statistical hetero spectroscopy*)

**SK-MEL-28:** linhagem celular de melanoma maligno isolada da pele de um paciente

**SPE:** extração em fase sólida (*solid phase extraction*)

**STOCSY:** espectroscopia de correlação total estatística (*statistical total correlation spectroscopy*)

**TIC:** cromatograma de íon total (*total ion chromatogram*)

**QToF:** quadrupolo e tempo de voo (*quadrupole time-of-flight*)

**UPLC:** cromatografia líquida de ultra eficiência



## Sumário

1 - Introdução.....	25
1.1- Cianobactérias.....	25
1.2 - Produtos Naturais.....	30
1.3 - Quimioprospecção de cianobactérias e suas inovações.....	31
2 - Objetivos.....	39
2.1 - Objetivos específicos.....	39
3 - Materiais e métodos.....	39
3.1 - Material Biológico.....	39
3.2 - Cultivo.....	40
3.3 – Coleta, liofilização e extração.....	43
3.4 - Fracionamento.....	44
3.5 - Ensaio de atividade biológica.....	44
3.6 - Análises metabolômicas.....	46
4 - Resultados e Discussão.....	48
4.1 - Cultivo, extração e fracionamento.....	48
4.2 - Análises metabolômicas através de redes moleculares.....	53
4.3 - Análises metabolômicas utilizando a ferramenta MolNetEnhancer..	55
4.5 - Desreplcação e análise de metabólitos primários.....	56
4.6 - Rede molecular multicamada.....	59
5 – Conclusão.....	82
6 – Referências.....	83
7. APÊNDICE.....	97



## **1 - Introdução**

Compreender a capacidade da natureza de produzir moléculas bioativas é importante para diversas áreas do conhecimento, incluindo para a descoberta de fármacos (Pye *et al.*, 2017). Descobrir novas moléculas biologicamente ativas originárias de Produtos Naturais (PNs) é um processo científico que se justifica, uma vez que, de 1981 a 2019, cerca de 65% de todas as pequenas moléculas aprovadas como fármacos pelo FDA foram inspiradas em ou derivadas de produtos naturais (Newman e Cragg, 2020). Essas moléculas têm em geral estruturas complexas (Vetter *et al.*, 2011), em particular no que diz respeito à estereoquímica e ao espaço conformacional (Chen e Kirchmair, 2020). Uma vez que a estrutura molecular está intrinsecamente ligada à atividade biológica, os PNs representam um tesouro de possibilidades biotecnológicas (Chopra e Dhingra, 2021).

### **1.1- Cianobactérias**

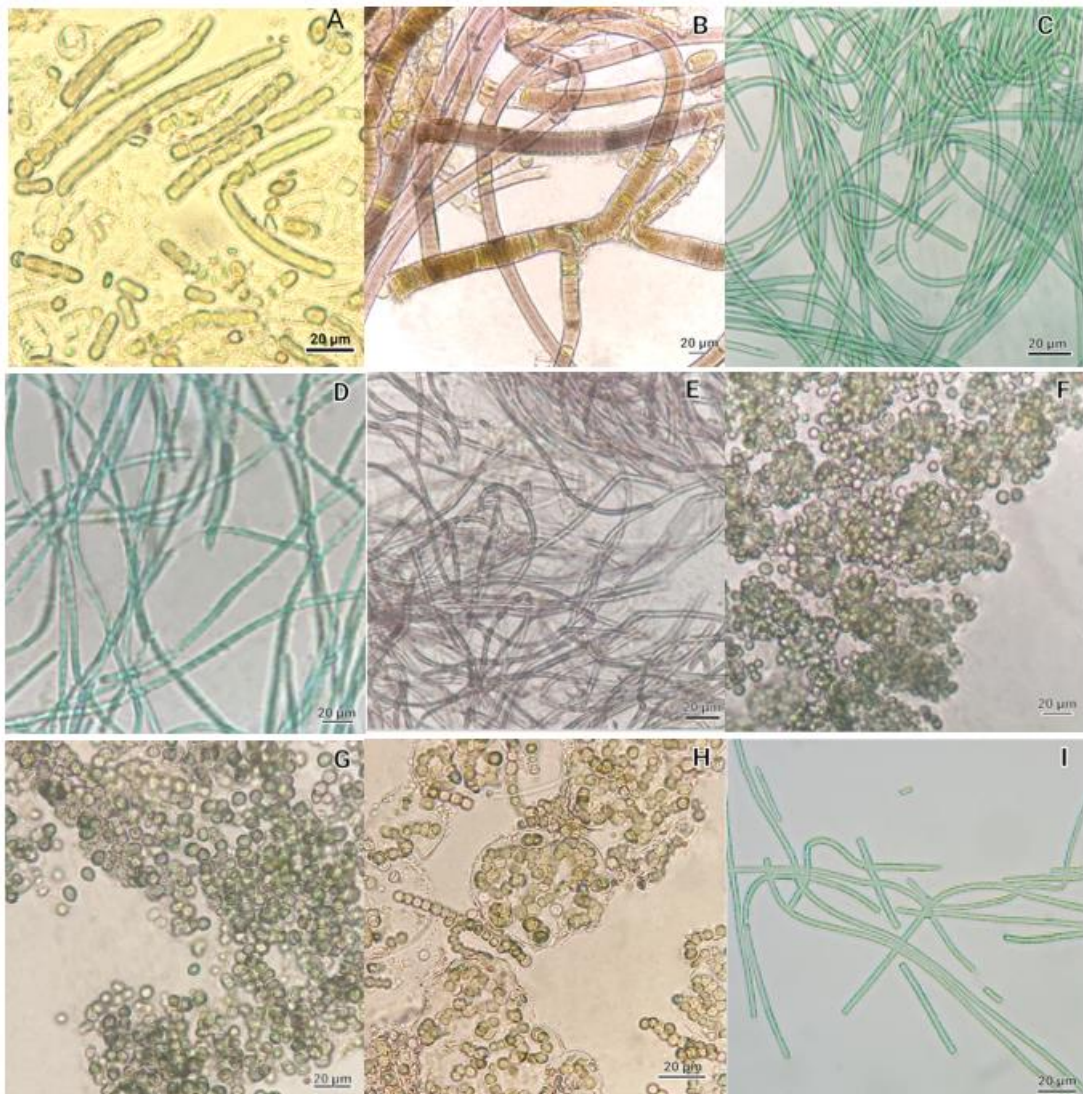
Os estudos de nichos biológicos pouco prospectados representam potencial de inovação, como é o caso das cianobactérias (Niedermeyer, 2015), que são umas das mais antigas formas de vida presentes na Terra (Dixit e Suseela, 2013). Geologistas e geoquímicos estimam que as cianobactérias existem há pelo menos 3,5 bilhões de anos (Damazio, 2006). Estromatólitos são fósseis que se formaram há bilhões de anos pelas atividades metabólicas microbianas, principalmente de procariotos fotoautotróficos (Schopf, 2006).

A capacidade fotossintetizante das cianobactérias é apontada como a responsável pela transmutação da atmosfera terrestre, antes predominantemente constituída de gás carbônico, para uma atmosfera rica em oxigênio, o que possibilitou o desenvolvimento de formas mais complexas de vida a partir de então (Mazard *et al.*, 2016). A existência das cianobactérias precede, portanto, a da camada de ozônio (Jain *et al.*, 2017).

Inicialmente as cianobactérias foram classificadas como algas, sendo agrupadas conforme as classificações botânicas, que utilizam critérios morfológicos e fisiológicos (Moreira, Vasconcelos e Antunes, 2013). Posteriormente, a classificação foi atualizada ao ser reconhecida a origem bacteriana (estrutura procariótica), resultando em mudanças na

nomenclatura e terminologia, sendo o nome “algas azuis” substituído por “cianobactérias” (Komárek, 2020). Atualmente a classificação das cianobactérias (**Figura 1**) obedece a critérios polifásicos, considerando as informações genéticas e as características morfológicas e ecológicas (Komárek *et al.*, 2014).

**Figura 1** - Micrografia das nove linhagens cianobactérias brasileiras de água doce analisadas neste estudo. A = *Calothrix* sp. CCIBt3320, B = *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551, C = *Desertifilum tharense* CCIBt3265, D = *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214, E = *Leptolyngbya* sp. CCIBt3338, F = *Myxosarcina* sp. CCIBt3496, G = *Komarekiella atlantica* CCIBt3307, H = *Nostoc* sp. CCIBt3329, I = *Desertifilum tharense* CCIBt3275



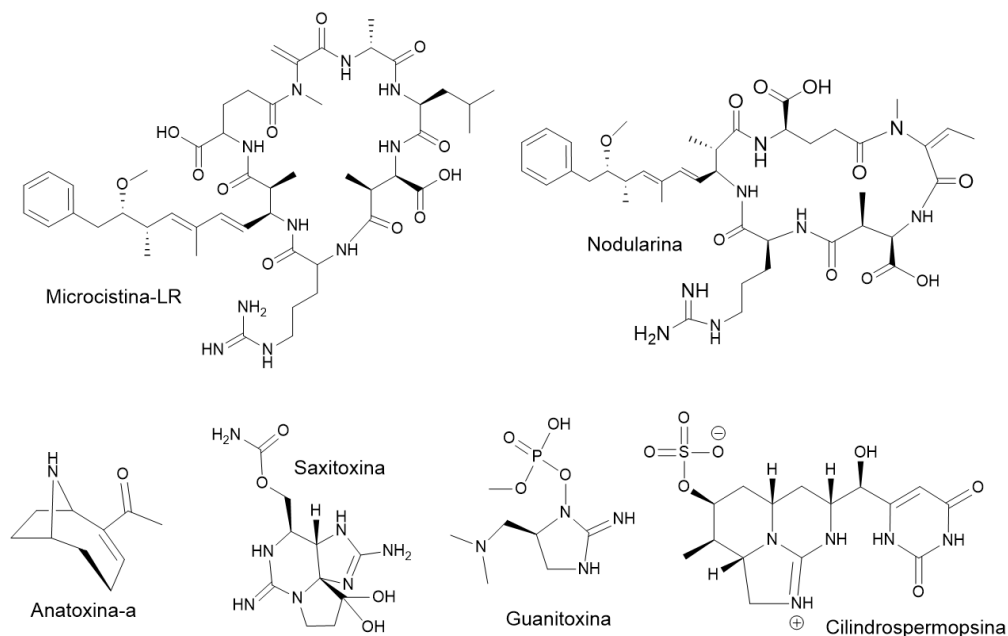
**Fonte:** arquivo pessoal

As cianobactérias formam um grupo de microrganismos adaptados a vários habitats ecológicos, sendo encontrados em ambientes terrestres,

marinhos, salobros e de água doce (Dixit e Suseela, 2013), vivendo de modo independente ou em relações simbióticas com fungos, plantas e animais, como corais e esponjas (Huang e Zimba, 2019). Além disso, há o registro da presença de cianobactérias em ambientes extremos, como áreas glaciais, fontes termais, gêiseres, lagoas ácidas e desertos (Vishnivetskaya, 2009). A habilidade de fixar nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) de certas espécies de cianobactérias, torna-as fundamentais na sustentação de diversos ecossistemas (Bauersachs, Gugger e Schwark, 2020), como por exemplo, em regiões de *permafrost*, uma vez que as plantas dessas regiões têm dificuldade na fixação desse elemento (Sayed *et al.*, 2020).

As cianobactérias, através da sua trajetória evolutiva, interagem com diversos seres em variados habitats, situações que contribuem para a grande diversidade morfológica celular, complexidade genética e riqueza química observadas (Cassier-Chauvat, Dive e Chauvat, 2017; Mazard *et al.*, 2016). Dessa interação surgem diversas moléculas que cumprem papel de proteção contra competidores, aquisição de nutrientes, entre outras. Essas substâncias são chamadas de metabólitos secundários (Zainuddin *et al.*, 2009). Quimicamente, os metabólitos secundários de cianobactérias pertencem a diversas classes químicas, incluindo peptídeos, policetídeos, flavonoides, alcaloides, terpenos, dentre outros (Cassier-Chauvat, Dive e Chauvat, 2017; Mazard *et al.*, 2016).

As cianobactérias são notórias produtoras de moléculas chamadas cianotoxinas, substâncias que fazem parte do seu metabolismo especializado e que podem causar danos à saúde humana e animal (Moreira, Vasconcelos e Antunes, 2013). Algumas das cianotoxinas mais conhecidas são as microcistinas, nodularinas, anatoxinas, saxitoxinas e cilindrospermopsinas (Nielsen e Jiang, 2020) **(Figura 2)**.

**Figura 2** - Estruturas das toxinas produzidas por cianobactérias

A atividade antropomórfica causa o despejo, em rios e mares, de substâncias químicas/orgânicas não tratadas, ricas principalmente em nitrogênio e fósforo, que podem levar ao crescimento exagerado de determinados gêneros de cianobactérias nos cursos de água, gerando assim as florações (do inglês HABs – *harmful algal blooms*) (Nielsen e Jiang, 2020). A ocorrência dessas florações (**Figura 3**) tem aumentado em frequência e distribuição, comprometendo o abastecimento de água própria para consumo (He *et al.*, 2016).

**Figura 3** - Floração de cianobactérias em um lago do museu Mariano Procópio em Juiz de Fora, Minas Gerais



**Fonte:** fotografia por Rhuana Valdetário Médice

Um caso emblemático de intoxicação por cianotoxinas se deu no Brasil, em 1996, no estado de Pernambuco, conhecido como ‘Síndrome de Caruaru’ quando 110 pacientes de uma clínica de hemodiálise apresentaram sintomas de intoxicação por hepatotoxinas, como náusea, vômito, distúrbios de visão, dores de cabeça, confusão mental, fraqueza muscular e sangramento nasal e do trato gastrointestinal. Dos pacientes contaminados, 100 desenvolveram insuficiência hepática aguda e 76 vieram a óbito (Bortoli e Pinto, 2015). Após investigações toxicológicas através de análises de espectrometria de massas foi confirmada a presença de três variantes de microcistinas no soro e tecidos hepáticos dos pacientes, microcistina-YR, microcistina-LR e microcistina-AR (Hu e Qiu, 2023).

A partir da década de 1980, as cianobactérias marinhas, terrestres e de água doce começaram a ganhar mais destaque em estudos científicos, para além das pesquisas sobre toxinas, quando se notou que elas poderiam ser uma fonte de novas moléculas com potencial farmacológico para serem empregadas no combate a doenças (Chilczuk *et al.*, 2020). Numerosos compostos bioativos já foram catalogados, com enfoque para aqueles isolados de cianobactérias terrestres e de água doce, como depsipeptídeos citotóxicos contra células de câncer de nasofaringe, cólon e carcinoma de ovário humano. Peptídeos inibidores de elastases, tripsinas, quimiotripsinas,

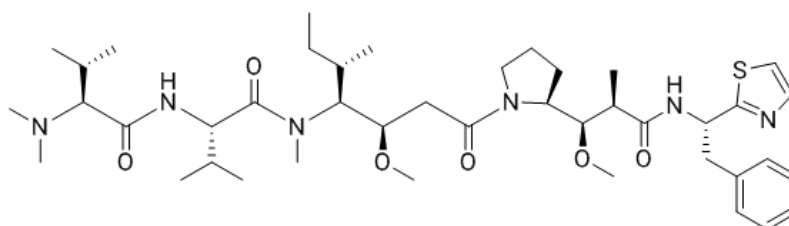
trombinas e serinas. Além de alcaloides com atividade antifúngica, terpenoides antimicrobianos (Chlipala, Mo e Orjala, 2011).

## 1.2 - Produtos Naturais

Há diversos exemplos de fármacos originados de PNs, descobertos através do estudo de plantas, microrganismos e até mesmo de animais. Essas moléculas exitosas podem ser citadas para justificar a importância da continuidade da pesquisa por novos PNs. Como exemplos há o hipocolesteremiante lovastatina, descoberto a partir do fungo *Aspergillus terreus* (Barrios-González e Miranda, 2010); a imunossupressora tacrolimus descoberta da bactéria *Streptomyces tsukubaensis* (Ordóñez-Robles, Santos-Beneit e Martín, 2018); o antitumoral docetaxel, um derivado semissintético originado das árvores do teixo *Taxus baccata* L. (Alken e Kelly, 2013); e o famoso antimicrobiano penicilina obtido a partir de fungos do gênero *Penicillium* sp. (ALEXANDER FLEMING, 1929).

Um exemplo de descoberta bem-sucedida de PNs, desta vez oriunda de uma cianobactéria, é a dolastatina 10 (**Figura 4**), uma molécula com potente atividade citotóxica produzida pela cianobactéria marinha *Symploca* sp. (Luesch *et al.*, 2001). Esse composto serviu de inspiração para o desenvolvimento de um análogo sintético, a monometil auristatina E que, ao ser conjugada a um anticorpo monoclonal, passou a compor o fármaco brentuximabe vedotina, comercializado com o nome de Adcetris, empregado no tratamento de alguns tipos de câncer, em especial o linfoma de Hodgkin (Senter e Sievers, 2012).

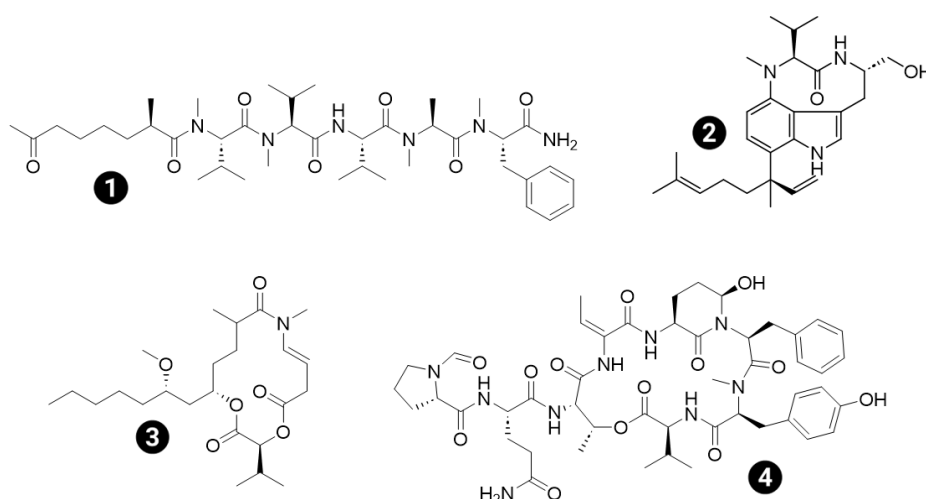
**Figura 4** - Estrutura química da dolastatina





Pode-se destacar ainda um rol de moléculas bioativas e estruturalmente diversas descobertas a partir de cianobactérias. Como a almiramida **(1)**, um peptídeo com atividade anti-*Leishmania* descoberto a partir da cianobactéria marinha *Lyngbya majuscula*. A molécula 12-epi-lingbiatoxina **(2)**, um alcaloide com atividade antiproliferativa contra células de leucemia L1210 de camundongo descoberto da cianobactéria marinha *Moorea producens*. O macrolídeo citotóxico contra *Artemia salina* sanctolida **(3)** isolado da terrestre *Oscillatoria sancta*. E o peptídeo cíclico stigonemapeptina **(4)** inibidor de elastase e quimotripsina isolado da cianobactéria de água doce *Stigonema* sp. **(Figura 5)** (Jiang *et al.*, 2014; Kang, Krunic e Orjala, 2012a; b; Sanchez *et al.*, 2010).

**Figura 5** - Estruturas de produtos naturais bioativos produzidas por cianobactérias



### 1.3 - Quimioprospecção de cianobactérias e suas inovações

Com esse histórico bem-sucedido do uso de PNs na terapêutica, seria esperado que a descoberta de metabólitos inéditos oriundos de organismos vivos fosse empregada com frequência nos processos das empresas farmacêuticas. No entanto, as pesquisas na indústria não seguiram nessa direção nos últimos anos (Li e Vederas, 2011). O declínio do interesse por parte das indústrias farmacêuticas aos produtos naturais pode ser atribuído, dentre outros fatores, à investigação repetitiva dos mesmos organismos, levando à redescoberta de compostos; à dificuldade de triagem de extratos brutos que requer a compatibilização de bioensaios com amostras obtidas a

partir de matrizes biológicas complexas; além do perfil intrincado apresentado pelas estruturas químicas, que acabam por tornar esse empreendimento longo e de alto risco para as empresas que buscam retornos rápidos (Hubert, Nuzillard e Renault, 2017).

Uma alternativa para o problema da redundância da pesquisa de PNs está no foco em explorar organismos pouco estudados, como as cianobactérias (Raja *et al.*, 2016). A criação de uma biblioteca de extratos pré-fracionados é uma outra estratégia que pode resultar em respostas mais acuradas nos ensaios biológicos. Uma vez que a matriz metabólica de um organismo é complexa, seu extrato bruto contém, portanto, muitos compostos, presentes em diferentes concentrações (Bisson *et al.*, 2016). Detectá-los e identificá-los representa um desafio, porque os metabólitos especializados encontram-se em baixas concentrações, podendo não ser detectados em extratos brutos (Gaudêncio e Pereira, 2015).

Outro processo que auxilia a contornar a problemática da redescoberta de PNs consiste na desreplificação, cuja função é orientar eficientemente a identificação dos PNs conhecidos, diferenciando-os dos inéditos nas amostras biológicas em que se situam (Allard *et al.*, 2016). A desreplificação consiste na identificação rápida de moléculas conhecidas em uma amostra através da aplicação de análises espectroscópicas, seguidas de buscas em bases de dados e bibliotecas espectrais (Gaudêncio e Pereira, 2015), evitando esforços de isolamento e elucidação estrutural de moléculas já descritas, representando uma aceleração no processo de descoberta de PNs (Wilson *et al.*, 2020). Desde que o termo foi cunhado e utilizado pela primeira vez no final dos anos 70, a desreplificação passou por aprimoramentos, contando hoje com a ajuda de sistemas analíticos de alta performance, como a cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massas de alta resolução e bases de dados espectrais cada vez mais volumosas (Gaudêncio e Pereira, 2015; Zubyk, Cox e Wright, 2019). As informações sobre a estrutura química de substâncias adquiridas pela espectrometria de massas, por exemplo, são utilizadas para anotar as moléculas já conhecidas em uma amostra, possibilitando que os esforços

sejam direcionados àquelas moléculas que permanecem sem identificação, contornando assim a redescoberta de moléculas (Mohimani *et al.*, 2018).

A cromatografia líquida de alta eficiência CLAE (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) é um dos métodos de separação de analitos que pode ser acoplado à espectrometria de massas. As substâncias separadas pela cromatografia líquida passam por um processo de ionização, através do processo de electrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*). Os íons formados são separados no analisador do espectrômetro de massas de acordo com a sua razão massa-carga ( $m/z$ ), para serem então detectados pelo detector (Agthoven, van *et al.*, 2019). Para cada íon detectado, além da razão massa-carga é registrada sua intensidade. Todos os sinais detectados em determinado momento são representados como um espectro de massas, que consiste em um gráfico com os valores de razão massa-carga no eixo x, e com os valores de intensidade (absoluta ou relativa) no eixo y (Maher, Jjunju e Taylor, 2015).

O desenvolvimento da espectrometria de massas sequencial (MS/MS ou, em inglês, *tandem mass spectrometry*) permite que um íon precursor seja fragmentado, resultando em um espectro de massas de íons fragmento, o qual é específico para cada molécula dentro dos parâmetros escolhidos para análise, a forma de detecção e obtenção de dados, e o modelo de equipamento utilizado (Maher, Jjunju e Taylor, 2015; Vetter *et al.*, 2011).

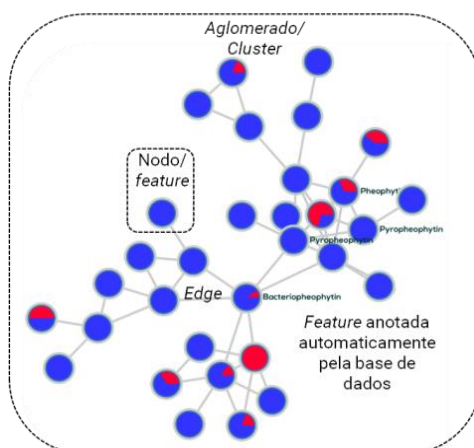
A plataforma GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Networking* - <http://gnps.ucsd.edu>) fornece ferramentas para estudos de metabolômica e desreplicação de PNs (Gao *et al.*, 2020). Utilizando uma dessas ferramentas, chamada de redes moleculares (em inglês, *molecular networking*), é possível analisar dados espectrais MS/MS obtidos experimentalmente, comparando-os a uma base de dados compartilhada e alimentada colaborativamente por pesquisadores do mundo todo (Santen, Van *et al.*, 2019).

Na ferramenta de redes moleculares, um algoritmo calcula a similaridade entre espectros de fragmentação MS/MS, e a traduz em um valor de cosseno (*cosine score*) entre zero (0) (sem similaridade) e um (1) (espectros idênticos). E então, essas informações são representadas em

sistemas gráficos, em que um espectro de consenso é representado como um nó (*node*) recebendo o nome de *feature*, ou seja, uma fusão matemática de espectros MS/MS com mesma massa de íon precursor e padrões de fragmentação praticamente idênticos. O índice de similaridade entre duas *features* (valor de cosseno) é representado por linhas conectoras, chamadas de *edges* (Aron *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2016).

O agrupamento de *features* formam aglomerados ou *clusters*, quando espectros de consenso apresentam fragmentação semelhante tendo por base um limite pré-estabelecido de cosseno (*cossine cutoff*). Quanto maior a pontuação de cosseno entre dois espectros de consenso, mais semelhantes serão os espectros de MS/MS e, com isso, assume-se semelhança estrutural entre as moléculas correspondentes (Yang *et al.*, 2013) **(Figura 6)**.

**Figura 6** - Esquema representativo de uma rede molecular

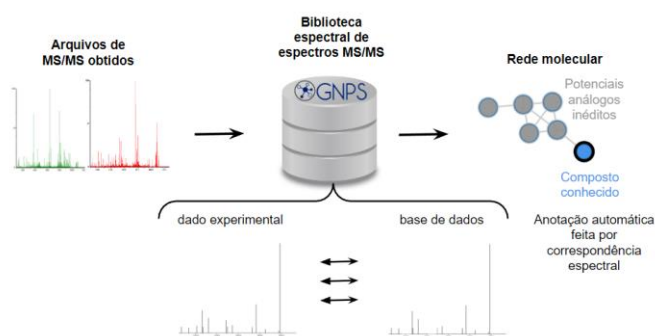


Moléculas estruturalmente semelhantes apresentam, em geral, padrões de fragmentação MS/MS semelhantes, portanto, “famílias moleculares” tendem a se agrupar em *clusters*. Moléculas que diferem, por exemplo, por modificações como oxidação, acetilação, metilação, etc., comumente se apresentam na rede molecular como *features* conectadas em um mesmo *cluster*. Frisa-se aqui que a localização espacial de um *cluster* ou *feature* na rede molecular não se relaciona com similaridade espectral.

A anotação de *features* conhecidos na rede molecular é realizada automaticamente através da comparação de similaridade espectral entre os dados experimentais e aqueles presentes na base de dados **(Figura7)**. Dessa

forma, a expansão contínua da base de dados espectrais da plataforma GNPS contribui progressivamente para a eficiência do processo de desreplicação (Yang *et al.*, 2013). Uma rede molecular permite a desreplicação de novas variantes de PNs através da propagação de anotações. Quando uma *feature* é anotada automaticamente pela similaridade de seu espectro MS/MS em comparação com um espectro depositado na biblioteca espectral do GNPS, pode-se assumir que as *features* a ela conectadas por arestas se trata hipoteticamente de análogos.

**Figura 7** - Representação do alinhamento espectral de espectros de massas da amostra analisada e a da base de dados GNPS para a anotação automática



Existem diversas bases de dados que armazenam dados de espectrometria de massas de PNs de microrganismos, plantas e animais podendo ser também utilizadas para auxiliar o processo de desreplicação (Santen, Van *et al.*, 2019). Dentre tais bases de dados podemos citar a AntiBase e MarinLit, CyanoMetDB e NPAtlas (Brkljača, Göker e Urban, 2015; Jones *et al.*, 2021; Pilon *et al.*, 2017; Santen, Van *et al.*, 2019; Tawfike, Viegelmann e Edrada-Ebel, 2013; Wibowo *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2013).

Há também bases de dados que contêm a estrutura molecular, atividades biológicas e mecanismos de ação de compostos, como por exemplo, PubChem e ChEBML; há bases de dados que relacionam a molécula alvo com informações de patente, propriedades químicas e reações, como ChemSpider e Reaxys; e há também um repositório de código aberto importante para a desreplicação utilizando dados de RMN, como NMRShiftDB (Dias, Gaudêncio e Pereira, 2019; Kind e Fiehn, 2017; Steinbeck e Kuhn, 2004).

Para otimizar as análises metabolômicas, os aspectos visuais da rede molecular podem ser alterados de maneira personalizada com a aplicação de metadados. Cada *feature* (representada por um nó/*node*) na rede pode ser destacado por vários atributos escolhidos pelo pesquisador (Quinn *et al.*, 2017). Os metadados podem funcionar, portanto, como um rótulo (*tag*), sendo organizados de forma que contenham, por exemplo, informações de bioensaios realizados (atividade citotóxica, antiparasitária), tipo de preparo de amostras (fracionamento), origem da amostra (local de coleta ambiental, bioma), dentre outros (Schorn *et al.*, 2021).

Quando os dados espectroscópicos e/ou espectrométricos de uma determinada molécula não correspondem aos dados de compostos conhecidos depositados em bases de dados ou na literatura científica, a molécula é considerada potencialmente inédita. É importante frisar que a anotação de uma molécula somente com os dados adquiridos usando espectrometria de massas nem sempre leva à identificação do composto, uma vez que a análise de massas possui limitações por sofrer variações significativas dependendo do equipamento utilizado e dos parâmetros configurados para a análise (Tawfike, Viegelmann e Edrada-Ebel, 2013) e por não diferenciar, por exemplo, alguns estereoisômeros ou isômeros de posição de mesma fórmula molecular, quando essas moléculas compartilham os mesmos perfis de fragmentação e valor de razão massa-carga.

A anotação de uma molécula não encontrada automaticamente em bases de dados pode ser realizada com o emprego de ferramentas *in silico*. Porém, esse processo requer uma análise detalhada que pode, por vezes, ser onerosa. Assim, é importante estabelecer uma estratégia de priorização das *features* metabolômicas. Caso seja de interesse a busca de metabólitos bioativos, algumas ferramentas de priorização podem ser aplicadas, como é o caso da DAFdiscovery - *Data Fusion-based Discovery*. A ferramenta, baseia-se no emprego da função de Espectroscopia de Correlação Total Estatística (STOCSY, do inglês *statistical total correlation spectroscopy*) e da função de hetero espectroscopia estatística (SHY, do inglês *statistical hetero spectroscopy*). Essas funções conseguem analisar cinco formas diferentes de dados, sendo estas: **(Opção 1)** fusão de dados de RMN, MS e metadados de

bioensaio; **(Opção 2)** fusão de dados de RMN e MS; **(Opção 3)** fusão de dados de RMN e metadados de bioensaio; e **(Opção 4)** fusão de dados de MS e metadados de bioensaio.

O resultado gera um gráfico de correlação de dados que permite visualizar quais as *features* propensas a serem os responsáveis pela bioatividade observada. Uma tabela contendo os valores de correlação com a bioatividade é também originado. As *features* são listadas em ordem decrescente de correlação, sendo aquelas que tendem ao valor de um (1) como maior correspondência e as que tendem a zero (0) como menor (Borges *et al.*, 2022).

Para anotação, as ferramentas SIRIUS e CANOPUS combinam dados de espectrometria de massas de alta resolução, utilizando as informações como análise de padrão isotópico, identificação de aduto e perfil de fragmentação MS/MS para prever fórmulas moleculares plausíveis e suas correspondentes classificações químicas (Dührkop *et al.*, 2019).

Outra ferramenta que auxilia no processo de desreplcação é o MolNetEnhancer, presente na plataforma do GNPS, que utiliza informações de estruturas químicas de bases de dados para anotar qual a mais provável família e subfamília molecular dos metabólitos segundo seus sinais espectrais. Algumas das classes químicas determinadas pelo MolNetEnhancer incluem alcaloides, ácidos graxos, peptídeos, polissacarídeos, lipídios e glicolipídios, terpenos, flavonoides e taninos. A lista de compostos pode ser expandida conforme mais dados são analisados pela ferramenta (Ernst *et al.*, 2019). Com a combinação dessas análises é possível ter robustez e confiança na interpretação dos dados espectrais para direcionar os estudos metabolômicos e de desreplcação.

O processo de anotação possui níveis de classificação que refletem o grau de confiabilidade e precisão da identificação dos metabólitos. Quanto maior o nível da classificação, mais confiável é a anotação (Sumner *et al.*, 2007). São estabelecidas quatro categorias de confiança:

**1. Compostos identificados:** emprego de ao menos duas técnicas analíticas diferentes e complementares como espectrometria de massas de alta resolução e ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  (HMBC, HMQC, NOESY,

COSY), entre outras possivelmente necessárias. Os dados obtidos são disponibilizados publicamente.

**2. Compostos putativamente anotados:** anotação baseada em propriedades físico-químicas e/ou semelhança espectral comparada com bases de dados e bibliotecas espectrais (sem o emprego de padrões de referência).

**3. Classes de compostos supostamente caracterizadas:** identificação baseada nas propriedades físico-químicas ou por semelhança espectral característica de uma determinada classe química já conhecida.

**4. Compostos desconhecidos:** diferenciação ou quantificação de algum composto baseado em análises espectrais.

No presente trabalho, nos propusemos a catalisar o processo de prospecção química (quimioprospecção) de cianobactérias brasileiras de origem terrestre e de água doce com a introdução de pré-fracionamento para o desenvolvimento de biblioteca de frações em paralelo à utilização de ensaios de atividade biológica e técnicas de metabolômica baseada em espectrometria de massas para a desreplcação de PNs. Para isso, utilizamos linhagens de cianobactérias da Coleção de Culturas de Cianobactérias do Instituto de Botânica. Após o cultivo, as biomassas celulares foram separadas do meio de cultura, liofilizadas e extraídas com solventes orgânicos, seguidas de filtração e evaporação para obtenção dos extratos. Cada extrato foi fracionado por cromatografia em coluna usando resina Diaion® HP-20SS e gradiente decrescente de polaridade.

Os extratos e frações gerados foram submetidos a testes de atividade biológica contra *Artemia salina*, contra células de melanoma humano e contra as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. As amostras foram analisadas por UPLC-HRMS-MS, seguido de análise metabolômica por redes moleculares. O processo de desreplcação consistiu em anotações utilizando a base de dados do GNPS e análises detalhadas utilizando a ferramenta DAFdiscovery e o software SIRIUS (nível de anotação 2 - compostos putativamente anotados). Esse trabalho buscou priorizar metabólitos secundários de cianobactérias de acordo com sua atividade biológica e



ineditismo químico. Em trabalhos futuros, os compostos priorizados serão submetidos a isolamento e elucidação estrutural completa.

## 2 - Objetivos

Desenvolver e analisar uma biblioteca de extratos e frações de cianobactérias brasileiras utilizando ensaios de atividade biológica e metabolômica baseada em espectrometria de massas como uma estratégia eficiente para a priorização de amostras que contenham produtos naturais de potencial aplicação biotecnológica.

### 2.1 - Objetivos específicos

- a) cultivar linhagens de cianobactérias brasileiras;
- b) coletar, liofilizar e extrair a massa celular com solventes orgânicos;
- c) realizar o pré-fracionamento de extratos;
- d) desenvolver uma biblioteca de extratos e frações padronizadas;
- e) analisar extratos e frações em ensaios biológicos (atividade contra *Artemia salina*, antiproliferativa contra células de melanoma humano e anti-*Leishmania*);
- f) analisar extratos e frações por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução em tandem (LC-MS/MS) para estudo metabolômico utilizando a plataforma GNPS e as ferramentas de bioinformática DAFdiscovery e SIRIUS.

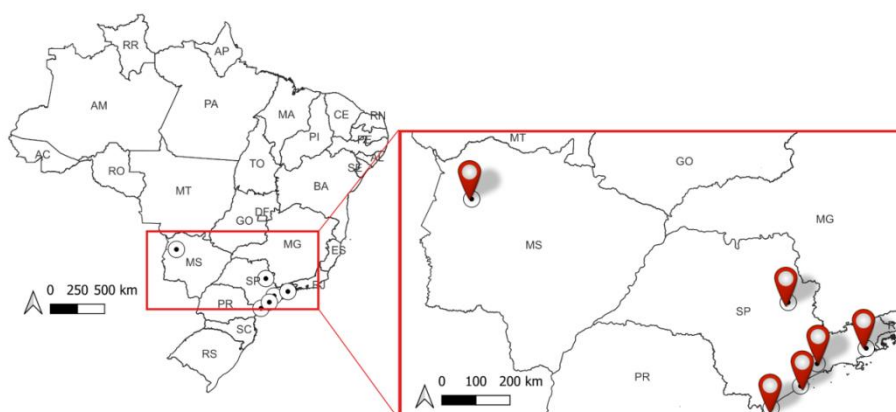
## 3 - Materiais e métodos

### 3.1 - Material Biológico

Todas as nove linhagens de cianobactérias avaliadas nesse estudo, assim como as informações sobre os respectivos locais de coleta e classificações taxonômicas foram fornecidas pela Coleção de Culturas de Cianobactérias (CCIBt) do Instituto de Botânica, sob curadoria da Prof. Célia Leite Sant'Anna (Sant'Anna *et al.*, 2011) (**Apêndice AP. 2**). Essa atividade de acesso está cadastrada no **Sisgen** sob o número de cadastro A531C68. A **figura 8** ilustra os locais de coleta das linhagens. As linhagens *Calothrix* sp.

CCIBt3320, *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551, *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214, *Myxosarcina* sp. CCIBt3496, *Komarekiella atlantica* CCIBt3307 e *Nostoc* sp. CCIBt3329 foram coletadas em regiões de Mata Atlântica. A linhagem *Leptolyngbya* sp. CCIBt3338 foi coletada na região do cerrado, e as duas linhagens *Desertifilum tharense* CCIBt3265 e CCIBt3275 vieram da região do pantanal.

**Figura 8** - Local de coleta das cianobactérias



### 3.2 - Cultivo

Todas as linhagens de cianobactérias foram cultivadas respeitando os meios em que elas já se encontravam no banco de culturas, sendo estes: ASM-1, BG-0 ou BG-11 (Jacinavicius *et al.*, 2013).

Cada linhagem foi transferida de seu respectivo tubo original para uma cultura de passagem (pré-inóculo) em um volume de 150 mL de meio de cultura em Erlenmeyer de 250 mL, para posteriormente, após três a quatro semanas ou conforme a velocidade de crescimento da linhagem, ser transferida para os cultivos em maior escala. A transferência para os cultivos em escala ampliada foi realizada respeitando a proporção de ao menos 10% da biomassa em meio de cultura (m/v). As culturas foram mantidas em temperatura de 25 °C por aproximadamente dois meses sob aeração estéril contínua e fotoperíodo claro-escuro de 12h-12h, sob irradiação de 40  $\mu\text{mol}$  fótons  $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

O preparo dos meios de cultivo seguiu a relação de reagentes conforme constam nas tabelas a seguir. Todos os meios foram preparados sob agitação

magnética com água ultrapura, tendo o pH ajustado para 7,4 para os meios BG-0 e BG-11 e pH 8,0 para o meio ASM-1. Todos os meios foram esterilizados por autoclavação.

### Meios BG-0 e BG-11

**Tabela 1** - Reagentes para as soluções estoque dos meios BG-0e BG-11

<b>Solução</b>	<b>Nutriente</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Volume final (mL)</b>
1	NaNO <sub>3</sub>	15,0	1000
2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,4	100
3	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,75	100
4	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,36	100
5	Ácido cítrico	0,12	200
6	EDTANa <sub>2</sub>	0,02	200
7	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,2	100
8	FeCl <sub>3</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0,12	100

**Tabela 2** - Reagentes para o preparo de 1 L da solução estoque de micronutrientes para meios BG-0 e BG-11

<b>Solução</b>	<b>Nutriente</b>	<b>Quantidade (g)</b>
1	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2,86
2	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,222
3	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,39
4	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,079
5	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0494

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura em temperatura ambiente sob agitação magnética até total dissolução do sal, e armazenadas em geladeira.

Para o preparo de 1 L de meio de cultivo, as soluções estoque foram adicionadas obedecendo à sequência a seguir:

1. 10 mL da solução 1 (para meio BG-11) ou 10 mL de água (para meio BG-0);
2. 10 mL das soluções 2, 3, 4, 7 e 8;
3. 10 mL das soluções 5 e 6;
4. 1 mL da solução de micronutrientes;

Completou-se o volume para 1 L com água ultrapura e o pH foi ajustado para 7,4 sob agitação magnética.

#### Meio ASM-1

O meio é feito com quatro tipos diferentes de soluções estoque, conforme as tabelas a seguir:

**Tabela 3** - Solução A para preparo de 200 mL de solução estoque do meio ASM-1

<b>Nutriente</b>	<b>Quantidade (g)</b>
NaNO <sub>3</sub>	1,70
MgCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,41
MgSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,49
CaCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,29

**Tabela 4** - Solução B para preparo de 100 mL de solução do meio ASM-1

<b>Nutriente</b>	<b>Quantidade (g)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,68
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·1H <sub>2</sub> O	0,69
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,34
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1,79

**Tabela 5** - Solução C para preparo de 100 mL de solução do meio ASM-1

<b>Nutriente</b>	<b>Quantidade (g)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,48
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,39
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,08
ZnCl <sub>2</sub>	0,335

CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,019
CuCl <sub>2</sub>	0,0014

**Tabela 6** - Solução D para preparo de 100 mL de solução do meio ASM-1

Nutriente	Quantidade (g)
EDTANa <sub>2</sub>	1,86

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura em temperatura ambiente sob agitação magnética até total dissolução do sal, e armazenadas em geladeira.

Para o preparo de 1 L de meio de cultivo, as soluções estoque foram adicionadas obedecendo à sequência a seguir:

1. 20 mL da solução A;
2. 2 mL da solução B;
3. 0,1 mL da solução C;
4. 0,4 mL da solução D;

Completo-se o volume para 1 L com água ultrapura e o pH foi ajustado para 8,0 sob agitação magnética.

### 3.3 – Coleta, liofilização e extração

Após aproximadamente dois meses de crescimento, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 15 °C e 10.700 g. O sobrenadante foi desprezado e a biomassa sedimentada foi transferida para tubos Falcon de 50 mL devidamente etiquetados e vedados, os quais foram levados para refrigeração em ultra freezer a -80 °C.

As biomassas congeladas foram liofilizadas para completa remoção da água, preservando as suas características bioquímicas. As biomassas liofilizadas foram maceradas exaustivamente utilizando diclorometano e metanol (DCM:MeOH) 1:1 / (v:v) em 3 ciclos de 200mL, totalizando 600 mL de solvente de extração utilizado por linhagem. As soluções extrativas foram filtradas utilizando lã de vidro, sendo coletado o filtrado em balão de fundo redondo. O filtrado foi seco em rotaevaporador sob pressão reduzida a uma

faixa de temperatura de 36-38 °C. Os extratos foram transferidos para frascos previamente pesados e rotulados, onde foram secos sob nitrogênio para terem a massa de extrato aferida. Uma alíquota de 10mg de cada extrato foi retirada para compor a biblioteca química. Os frascos foram armazenados devidamente vedados em freezer a -20 °C até o momento do fracionamento.

### **3.4 - Fracionamento**

Cada um dos extratos secos foi ressuscitado com DCM:MeOH. Na sequência, resina Diaion® HP-20SS foi adicionado ao extrato ressuscitado na quantidade de 1:1 (m:m), seguido de secagem sob nitrogênio para a formação do *dry-load*. Utilizando uma coluna cromatográfica empacotada com o Diaion® HP-20SS, o extrato foi fracionado por SPE (*solid phase extraction*) em manifold a vácuo seguindo gradiente decrescente de polaridade de isopropanol e água (IPA:H<sub>2</sub>O, v/v) 0:100, 20:80, 40:60, 70:30, 90:10 e 100:0 (20 mL por fração) (Crnkovic, May e Orjala, 2018). Ao final, a coluna foi eluída utilizando acetato de etila (AcOEt) e acetona (20 mL cada).

Todas as frações foram secas sob nitrogênio, alocadas em frascos previamente pesados e rotulados para que o rendimento do fracionamento fosse calculado. As frações foram armazenadas sob refrigeração compondo a biblioteca de frações.

### **3.5 - Ensaios de atividade biológica**

#### **3.5.1 - Ensaio de citotoxicidade contra *Artemia salina***

Os extratos e frações foram avaliados em ensaio de toxicidade contra *Artemia salina* segundo os procedimentos descritos por (Metcalf *et al.*, 2002). Considerado um teste rápido e eficiente, é bastante útil em triagens preliminares de citotoxicidade. Cistos de *Artemia salina* foram incubados por 24 h em água do mar artificial sob aeração estéril e iluminação para eclosão. Após 24 h, os náuplios foram diluídos a uma concentração de 150 organismos por mL e alíquotas de 99 µL (contendo cerca de 15 náuplios) foram transferidas para microplacas de 96 poços juntamente de 1 µL de amostra. Dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) foi utilizado como controle positivo e DMSO

1% como controle negativo. A microplaca foi mantida protegida de luz por 24h, após as quais foi feita a contagem das mortes. Testes foram realizados em triplicata.

### **3.5.2 - Avaliação da viabilidade celular contra melanoma humano por MTT**

Os ensaios foram realizados em parceria com o Laboratório de Fisiopatologia da Pele (iNOVA Pele) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob supervisão da Profa. Dra. Silvy Stuchi M. Engler. Foi utilizada a linhagem celular de melanoma naïve SK-MEL-28. A determinação da viabilidade celular se deu pelo ensaio de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As células foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com suplementação de 10% de soro fetal bovino (FBS). Para o bioensaio, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^4$  células/mL por poço) e, após atingirem 70%–80% de confluência, foram incubadas durante 72h com 1  $\mu$ L de cada extrato e fração de cianobactérias em DMSO, resultando na concentração final de 25  $\mu$ g/mL. Para o controle positivo foi utilizado doxorrubicina e como controle negativo DMSO 0,5%. Após o intervalo do tratamento, o meio foi retirado e as células foram incubadas com solução de MTT 5 mg/mL durante 3 horas. O precipitado (formazan) foi dissolvido em 150  $\mu$ L DMSO/poço. A absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor microplaca (BioTekPowerWave XS, VT, EUA) (Denizot e Lang, 1986).

### **3.5.3 - Determinação *in vitro* da atividade citotóxica em formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis***

Os ensaios foram realizados em parceria com o Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, sob supervisão do Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso. Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1972/LD) foram obtidas da cultura semeada em patas de camundongos Balb/C experimentalmente infectadas. Promastigotas em fase estacionária foram diluídos até a concentração de  $5 \times 10^6$  em meio RPMI sem fenol vermelho, seguido de distribuição em placas

de 96 poços, em duplicata. Amostras de extratos e frações foram dissolvidos em DMSO e diluído em meio RPMI, sem fenol, para obter concentrações de 800 M a 0,09 M. DMSO 1,0% foi usado como controle negativo. Anfotericina B foi utilizada como controle positivo na mesma concentração das amostras. Após incubação de 48 horas a 26 °C, 20 µL de MTT (Sigma; 5 mg/ml em PBS) foram adicionados na cultura e então incubados a 26 °C por 4 horas. A viabilidade de promastigotas foi determinada em um leitor de microplacas (Multiskan MCC / 340 - Brasil) em comprimento de onda de 570 nm.

### **3.6 - Análises metabólicas**

Extratos e frações foram solubilizados em metanol para as análises por LC-MS/MS. Os extratos e frações F6 foram sujeitos a um procedimento de *cleanup*. Foram empregados cartuchos C18 para a retirada de lipídios e pigmentos antes das análises por UPLC-HRMS-MS/MS (cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas de alta resolução sequencial).

Empregou-se um sistema *Waters Acquity* UPLC H-class ligado sequencialmente a um espectrômetro de massas *Waters* modelo Xevo G2-XS QToF via *eletrospray* como fonte de ionização. A separação por UPLC foi produzida a 0,5 mL/min via coluna Kinetex C18 (2,1 × 50mm × 1,7 µm, Phenomenex) a 40 °C. Foram utilizadas água H<sub>2</sub>O (A) e acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) (B), acidificadas com ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 0,1% como fase móvel. O gradiente da fase móvel consistiu em: 10-100% B por 7 minutos, 100% por 1 min, 100-10% B por 0,1 min e 10% B por 1,9 min. Foram realizadas análises em modo positivo e negativo no espectrômetro de massas por aquisição de dados DDA (*data dependent analysis*) de acordo com os parâmetros a seguir: voltagem do capilar de 1,2 kV, temperatura de dessolvatação de 450 °C, temperatura da fonte de 100 °C, voltagem do cone de 30 eV, vazão do gás de dessolvatação de 750 L/h e vazão de N<sub>2</sub> no cone de 50 L/h. O hiato de detecção de 100 a 2000 Da, tempo de *scan* de 0,2 s, a energia de colisão em rampa foi de 15-30 eV (para o limite inferior de massa) e 60-80 eV (para o limite superior de massa). Três íons de maior intensidade para cada espectro de MS1 foram fragmentados (MS/MS). A calibragem interna, aplicou-se



leucina-encefalina a 20 µg/mL infundida pela sonda de *lock mass* a 10 µL/min. As análises foram realizadas no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck.

Os arquivos de dados foram convertidos para o formato .mzXML utilizando o software MSConvert (ProteoWizard) e processados utilizando MZMine 2 (Olivon *et al.*, 2017) com os parâmetros: *Mass detection* (MS1 noise level  $1 \times 10^4$ , M2 noise level  $1 \times 10^1$ ), *Chromatogram builder* (min time span 0,01 min, min height  $2 \times 10^5$ , m/z tolerance 20 ppm), *Chromatogram deconvolution* (baseline cut-off, m/z range for MS2 scan pairing 0,2 Da, RT range for MS2scanpairing 0,15 min), *Isotopic peak grouper* (m/z tolerance 20 ppm, RT tolerance 0,1 min, maximum charge 3, representative isotope-most intense). Os dados processados foram exportados como arquivos .mgf e importados na plataforma GNPS para análise por redes moleculares.

Parâmetros utilizados para a construção das redes moleculares foram: *precursor ion mass tolerance*: 0,02 Da; *fragmention mass tolerance*: 0,02 Da; *min pairs cos*: 0,6; *network topk*: 10; *minimum matched fragments*: 4; *minimum cluster size*: 2. No grupo 6 (G6) foi adicionado o branco analítico (solventes utilizados nas etapas de *cleanup*, fracionamento e análises cromatográficas). Este último grupo foi usado como filtro para a remoção de *features* presentes nos brancos, os quais não aparecem na rede molecular. A visualização da rede molecular foi feita no software Cytoscape 3.6.1. (Yang *et al.*, 2013).

A seleção de *features* promissoras para desreplicação foi realizada com auxílio da ferramenta *Data Fusion-based Discovery* (DAFdiscovery) através da fusão de informações das análises de LC-MS/MS com os metadados contendo informações obtidas dos bioensaios. A anotação foi realizada utilizando o software SIRIUS 5, cuja capacidade computacional foi utilizada para calcular fórmulas moleculares putativas das *features* selecionadas através da análise de fragmentação MS/MS e padrão isotópico (Dührkop *et al.*, 2019).

As fórmulas foram calculadas seguindo os parâmetros: *General - Instrument* (Q-TOF), *MS2 mass accuracy* (10 ppm), *MS/MS isotope scorer*

(Score), *Candidates stored* (20); *Use DBs in formula only* (none), *Elements allowed in Molecular Formula* (H, C, N e O). *CSI:FingerID Fingerprint Prediction* - *Fallback Adducts* (All), *Search DBs* (All); *Tag Lipids* (off); CANOPUS (ON).

## **4 - Resultados e Discussão**

### **4.1 - Cultivo, extração e fracionamento**

Foram cultivadas nove linhagens de cianobactérias (**Tabela 7**). Os cultivos foram realizados respeitando os meios de cultura em que as linhagens estavam acondicionadas no banco de microrganismos do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo.

**Tabela 7** - Linhagens de cianobactérias e suas respectivas condições de cultivo e biomassa final obtida

<b>Código</b>	<b>Gênero/espécie</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Volume (L)</b>	<b>Biomassa (g)</b>	<b>Extrato (mg)</b>
CCIBt3320	<i>Calothrix</i> sp.	BG-0	1,5	1,148	103,50
CCIBt3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>	BG-11	4,0	1,008	173,30
CCIBt3265	<i>Desertifilum tharense</i>	BG-11	1,5	0,572	78,40
CCIBt3214	<i>Anagnostidinema amphibium</i>	ASM-1	5,0	0,715	178,80
CCIBt3338	<i>Leptolyngbya</i> sp.	BG-11	4,0	1,120	117,90
CCIBt3496	<i>Myxosarcina</i> sp.	BG-11	4,0	1,420	112,00
CCIBt3307	<i>Komarekiella atlantica</i>	BG-0	1,5	2,020	67,82
CCIBt3329	<i>Nostoc</i> sp.	BG-0	1,5	0,350	60,00
CCIBt3275	<i>Desertifilum tharense</i>	BG-11	1,5	0,650	113,10

A escolha do solvente para extração diclorometano:metanol 1:1 se deu após uma breve revisão na literatura em que foram contemplados 25 artigos nos quais reportava-se a descoberta de metabólitos secundários a partir de cianobactérias, publicados entre os anos de 2017 e 2019 na revista científica *Journal of Natural Products* (**Tabela 8**). Desses, 52% (13 artigos) utilizaram uma mistura de diclorometano:metanol CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH como solvente de extração, 32% (8 artigos) utilizaram apenas MeOH, 8% (2 artigos) usaram a combinação acetato de etila:metanol AcOEt:MeOH e 12% (3 artigos) reportaram o uso de acetato de etila AcOEt, ou a mistura de água e acetato de etila H<sub>2</sub>O:AcOEt, ou metanol e água MeOH:H<sub>2</sub>O, como solvente de extração.

**Tabela 8** - Solventes utilizados para a extração de biomassa de cianobactérias descritos em artigos publicados na revista *Journal of Natural Products* de 2017 a 2019

Metabólito descoberto	Solvente de extração	Referência
criptomaldamida	2:1 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	(Kinnel <i>et al.</i> , 2017)
biseokeaniamidas A,B,C	MeOH	(Iwasaki, Tadenuma, <i>et al.</i> , 2017)
samoamida A	2:1 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	(Naman, Rattan, <i>et al.</i> , 2017)
kohamamidas A,B,C	MeOH	(Iwasaki, Shiota, <i>et al.</i> , 2017)
dudawalamidas A–D	(2:1) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	(Almaliti <i>et al.</i> , 2017)
caracolamida A	(2:1) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	(Naman, Almaliti, <i>et al.</i> , 2017)
namalideos B, C; spumiginas K–N	MeOH 70%	(Sanz, Salinas e Pinto, 2017)
serinolamidas e lingbiabellinas	MeOH	(Petitbois <i>et al.</i> , 2017)
grassistatinas D–F	AcOEt:MeOH (1:1)/EtOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	(Al-Awadhi, Law, <i>et al.</i> , 2017)
merocyclophanos C, D	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	(May <i>et al.</i> , 2017)
ypaoamidas B, C	1:2 (m:v) MeOH	(Sueyoshi <i>et al.</i> , 2018)
ribocyclophanos A–E	1:1 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	(May <i>et al.</i> , 2018)
Microginina Peptideos	80:20 MeOH:H <sub>2</sub> O	(Stewart <i>et al.</i> , 2018)

bastimolida B	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (2:1)	(Shao <i>et al.</i> , 2018)
cibastacinas AB	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	(Cabanillas <i>et al.</i> , 2018)
jizanpeptinas	2:1 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	(Gallegos <i>et al.</i> , 2018)
tiahuramidas A–C	AcOEt	(Levert <i>et al.</i> , 2018)
izenamidas A,B	MeOH	(Kanamori <i>et al.</i> , 2018)
calothrixamidas A, B	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH (1:1)	(Crnkovic <i>et al.</i> , 2018)
hoshinoamidas A, B	MeOH	(Iwasaki <i>et al.</i> , 2018)
anaephenos A–C	1:1 AcOEt:MeOH - 1:9 H <sub>2</sub> O:EtOH	(Brumley <i>et al.</i> , 2018)
trikoramida A	2:1 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	(Phyo <i>et al.</i> , 2019)
mabuniamida	MeOH	(Ozaki <i>et al.</i> , 2019)
microcolina	2:1 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	(Yu <i>et al.</i> , 2019)
hierridina C	2:1 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	(Costa <i>et al.</i> , 2019)

---

Os extratos foram fracionados por SPE (*solid phase extraction*), obtendo-se seis frações a partir de cada extrato. As informações de massa de fração e rendimento do processo são apresentadas na **Tabela 9**. Em média, o processo de fracionamento apresentou rendimento de 71,63%, sendo o rendimento máximo de 95,82% e o mínimo de 40,53%.

**Tabela 9** - Resultados dos fracionamentos e seus respectivos rendimentos

<b>Código</b>	<b>Gênero/espécie</b>	<b>Biblioteca (EXT)</b>	<b>F1 (g)</b>	<b>F2 (g)</b>	<b>F3 (g)</b>	<b>F4 (g)</b>	<b>F5 (g)</b>	<b>F6 (g)</b>	<b>Wash (g)</b>	<b>Rendimento</b>
CCIBt3320	<i>Calothrix</i> sp.	10,00	20,00	3,90	7,80	7,80	12,90	7,64	9,60	76,95%
CCIBt3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>	10,00	58,70	5,80	7,90	9,30	19,80	8,70	5,90	72,76%
CCIBt3265	<i>Desertifilum tharense</i>	10,00	19,70	6,10	7,52	5,90	9,80	7,50	8,60	95,82%
CCIBt3214	<i>Anagnostidinema amphibium</i>	10,00	22,06	3,90	5,20	12,50	6,80	4,70	7,30	40,53%
CCIBt3338	<i>Leptolyngbya</i> sp.	10,00	35,14	6,10	6,50	9,97	13,52	1,02	9,40	77,74%
CCIBt3496	<i>Myxosarcina</i> sp.	10,00	19,09	12,45	5,61	6,28	5,34	2,85	4,89	59,38%
CCIBt3307	<i>Komarekiella atlantica</i>	10,00	14,90	0,60	1,60	4,40	4,40	2,10	15,90	79,48%
CCIBt3329	<i>Nostoc</i> sp.	10,00	16,10	3,90	3,00	4,60	4,70	2,30	2,81	79,02%
CCIBt3275	<i>Desertifilum tharense</i>	10,00	17,62	8,38	7,92	8,00	7,20	5,30	6,80	62,97%

## 4.2 - Análises metabolômicas através de redes moleculares

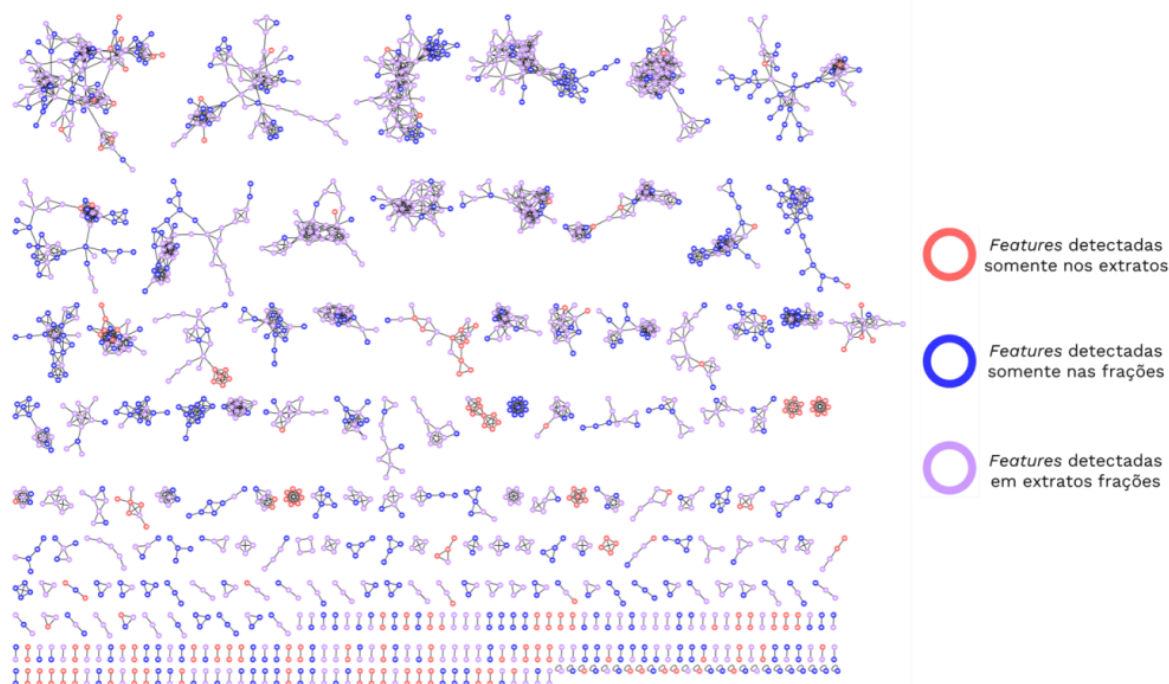
Para a construção da rede molecular através da plataforma do GNPS foram empregados dados de UPLC-HRMS/MS obtidos das análises dos extratos (EXT) e frações (FRA) de cianobactérias (F1, F2, F3, F4, F5 e F6). Como metadados, foram adicionadas à rede molecular os resultados dos bioensaios contra *Artemia salina*, viabilidade celular contra melanoma humano e resultados de atividade *in vitro* anti-*Leishmania*. O link de acesso para a rede molecular se encontra no **Apêndice AP. 1**.

A visualização da rede molecular (**Figura 9**) se deu pelo software Cytoscape. Um total de 4969 *features* formaram a rede, destes, 3448 estão interconectadas formando *clusters* (69,39%) e 1521 *features* se apresentam isoladas (*single nodes*) sem nenhuma ligação entre si (30,61%). Apenas 239 *features* foram anotadas através de comparação automática com a base de dados do GNPS, representando 4,8% do total. Nenhuma toxina clássica (microcistinas, nodularinas, anatoxinas, saxitoxinas e cilindrospermopsinas) foi automaticamente anotada. A baixa anotação da rede é decorrência da limitação da base de dados do GNPS quanto a quantidade de arquivos de espectros de MS/MS decompostos de cianobactérias para que possa ser realizada a correspondência espectral (Wang et al., 2016). A incorporação progressiva de espectros de microrganismos, principalmente de cianobactérias, beneficiará significativamente o processo de desreplicação. À medida que essa coleção de espectros cresce, mais útil se torna a ferramenta da rede molecular para encontrar metabólitos secundários inéditos, além de seus respectivos análogos e isômeros (YANG et al., 2013).

O pré-fracionamento mostrou-se eficaz ao aumentar a sensibilidade das análises de LC-MS/MS em relação a compostos minoritários e, por consequência, a quantidade de *features* na rede molecular. Foram contabilizados 303 *features* detectadas exclusivamente nos extratos (6,09%) e 2281 *features* oriundas exclusivamente das frações (45,90%). *Features* detectadas em ambos extratos e frações totalizam 2385 (47,99%). O total de *features* em extratos e frações são, portanto, 2688 e 4666 respectivamente, representando um aumento de 1,7 vezes. Isso indica que compostos que

estavam presentes em quantidades menores e abaixo dos limites de detecção no extrato, puderam ser registrados pelas análises das frações.

**Figura 9** - Rede molecular formada pelos metabólitos detectados em extratos e frações das nove linhagens de cianobactérias analisadas: *Calothrix* sp. CCIBt3320, *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551, *Desertifilum tharense* CCIBt3265, *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214, *Leptolyngbya* sp. CCIBt3338, *Myxosarcina* sp. CCIBt3496, *Komarekiella atlantica* CCIBt3307, *Nostoc* sp. CCIBt3329 e *Desertifilum tharense* CCIBt3275. As cores dos nodos indicam a amostra de origem dos metabólitos, sendo em vermelho aqueles detectados somente nos extratos, em azul aqueles detectados unicamente em frações e violeta para os metabólitos detectados em ambos, extratos e frações.



As linhagens de cianobactérias analisadas neste estudo são pertencentes a três ordens, as Oscillatoriales, Nostocales e Chroococcales. *Features* detectadas das Oscillatoriales originaram 3143 nodos na rede molecular (63,25%). Desses, 1099 são compartilhadas com as outras duas ordens, e 2044 *features* são exclusivas (41,13%). Os gêneros que fazem parte dessa ordem são: *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214, *Desertifilum tharense* CCIBt3265 e *Leptolyngbya* sp. CCIBt3338.

As *features* detectadas em amostras de cianobactérias da ordem das Nostocales possuem 2561 nodos ao todo (51,54%), 1040 compartilhados com as demais, e 1521 nodos exclusivos (30,61%). Os gêneros incluídos nessa



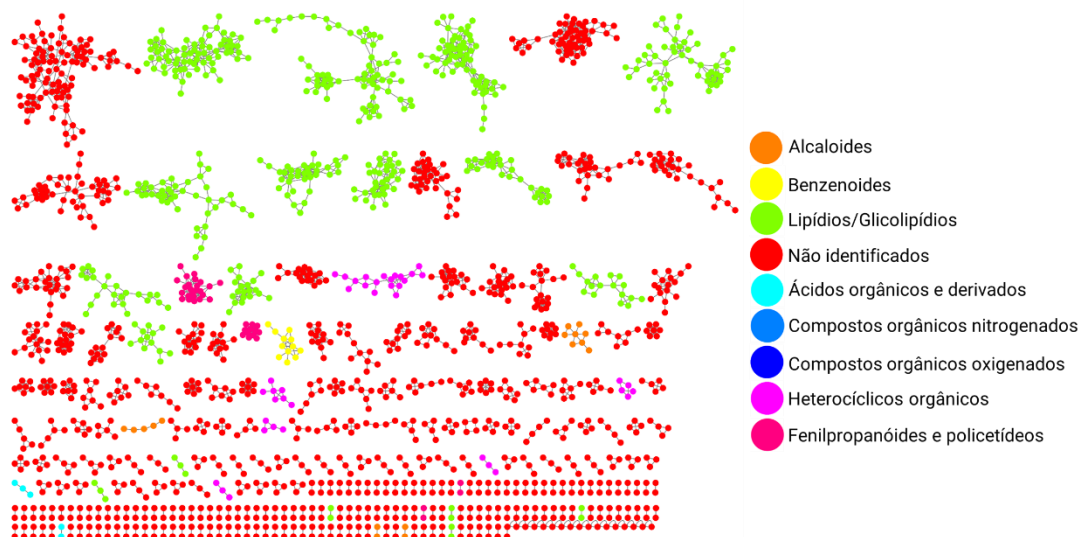
ordem são: *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551, *Nostoc* sp. CCIBt3329, *Calothrix* sp. CCIBt3320 e *Komarekiella atlantica* CCIBt3307.

As *features* detectadas em amostras de cianobactérias da ordem das Chroococcales possuem 742 nodos ao todo (14,93%), 525 compartilhados com as demais três ordens, e 217 nodos exclusivos (4,37%). A linhagem *Myxosarcina* sp. CCIBt3496 é a única pertencente dessa ordem.

#### 4.3 - Análises metabolômicas utilizando a ferramenta MolNetEnhancer

De modo a otimizar as análises metabolômicas, e a complementar o processo de desreplicação, a ferramenta MolNetEnhancer (**Figura 10**) foi aplicada para obter uma classificação putativa das *features* de interesse. As classes químicas identificadas foram: alcaloides 19 *features* (0,4%), Benzenoides 12 *features* (0,2%), lipídios/glicolipídios 497 *features* (9,4%), ácidos orgânicos e derivados cinco *features* (0,1%), compostos orgânicos nitrogenados uma *feature* (0,01%), compostos orgânicos oxigenados uma *feature* (0,01%), compostos orgânicos heterocíclicos 48 *features* (0,9%) e fenilpropanoides/policetídeos 43 *features* (0,8%). A maior parte da rede molecular, 87,4%, não pode ser identificada pela ferramenta (*no matches*), sendo o total de 4343 *features*, o que é um indicativo de ineditismo químico promissor dos metabólitos produzidos pelas cianobactérias.

**Figura 10** - Anotação estrutural química da rede molecular formada pelos metabolitos detectados de extratos e frações das nove linhagens de cianobactérias pela ferramenta MolNetEnhancer

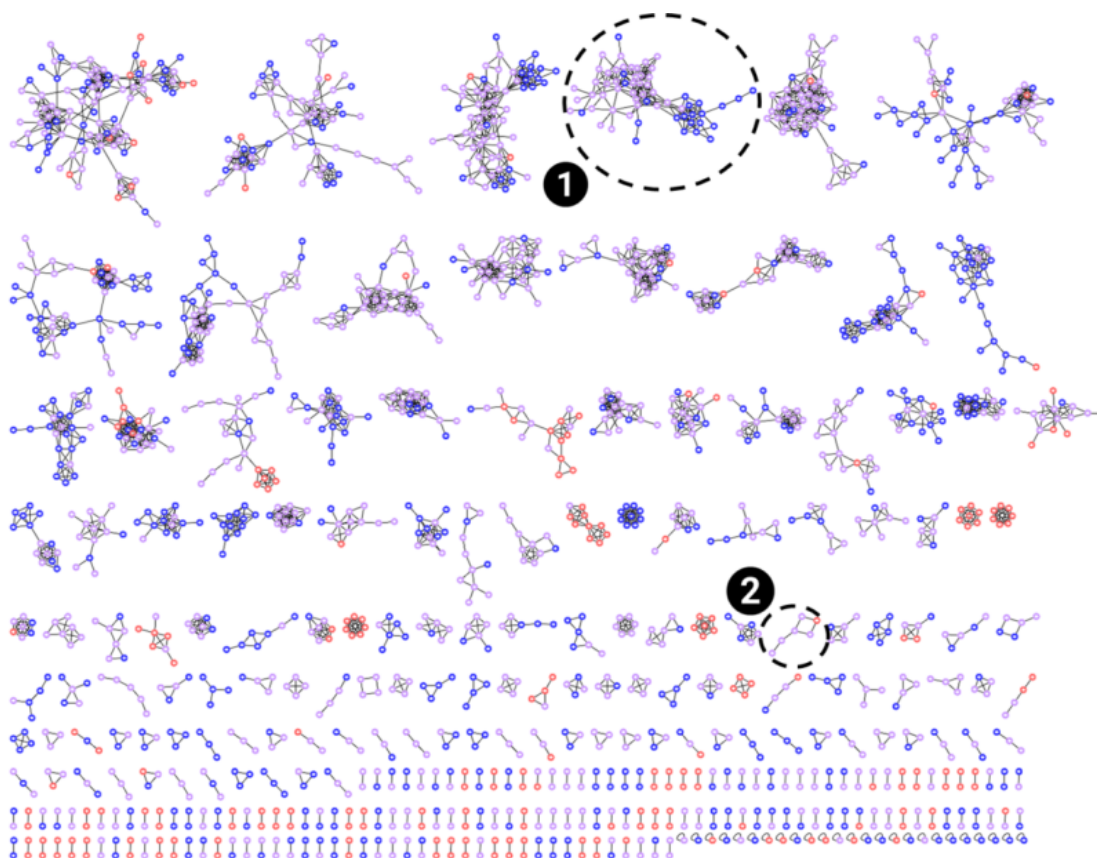


#### 4.5 - Desrepliação e análise de metabólitos primários

Considerando que metabólitos primários são altamente conservados e diretamente necessários para o crescimento de uma espécie, os metabólitos secundários evoluem dinamicamente de espécie para espécie sendo inerentemente variáveis em estrutura e produção (Erb e Kliebenstein, 2020). Durante o processo evolutivo, as vias do metabolismo primário contribuíram para a subjacente variação química e enzimática observada para a síntese do metabolismo secundário (Maeda, 2019). Os produtos secundários precisam de enzimas específicas para sua biossíntese, cuja variedade decorre de diferenças genotípicas selecionadas em populações distintas ambientadas em um determinado ambiente. O acionamento de uma via metabólica pode advir, portanto, como resposta a estímulos ambientais, sendo assim regulado pelo mesmo (Santamaria *et al.*, 2022).

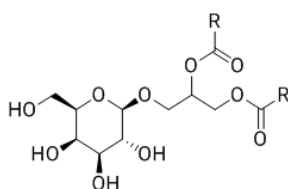
Como o foco deste trabalho é investigar moléculas produzidas pelo metabolismo secundário, é necessário identificar primeiramente os metabólitos primários (conservados) para que sejam, assim, despriorizados. A partir dessa identificação, segue-se o foco para os *clusters* que não foram automaticamente anotados ou formados por *features* exclusivas detectadas a partir de uma única linhagem. A desrepliação com o auxílio da rede molecular auxilia a rapidamente identificar *clusters* de metabólitos primários (**Figura 11**), permitindo que a atenção seja direcionada aos *clusters* contendo *features* promissoras.

**Figura 11** - Rede molecular com destaque para dois clusters formados por metabólitos primários de cianobactérias. O cluster de nº 1 é formado por glicolipídios e o cluster de nº 2 é formado por catabólitos de clorofila.



#### 4.5.1 – Glicolipídios

Dois grandes *clusters* foram anotados como sendo compostos por glicolipídios e possíveis análogos (**Figura 12**). Trata-se de compostos que constituem as membranas celulares (Buedenbender, Astone e Tasdemir, 2020).

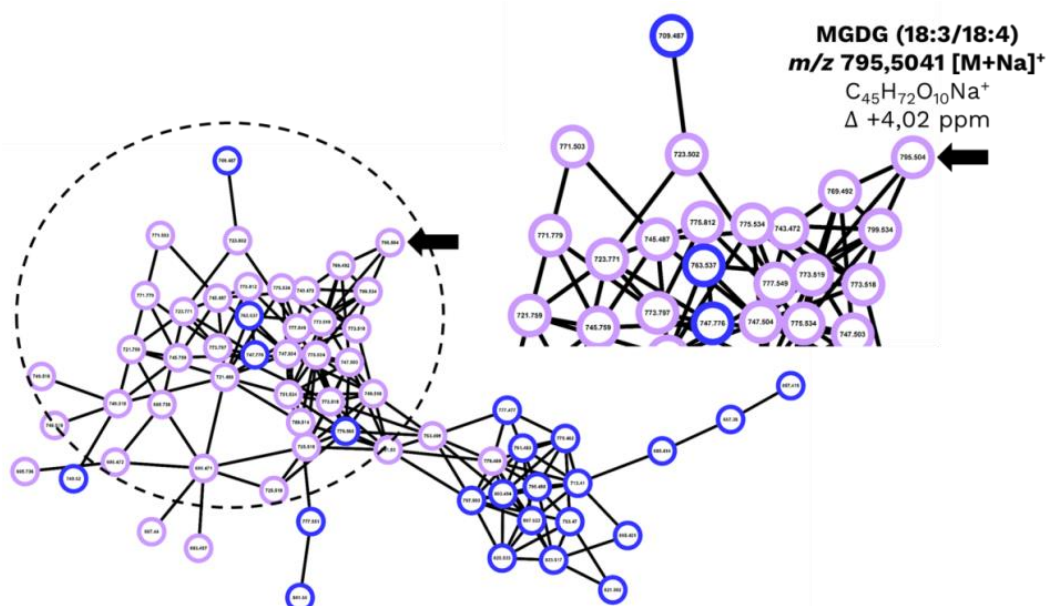


Glicolipídios

Como exemplo, o padrão de fragmentação da *feature* de  $m/z$  795 é bastante similar ao galactolipídio MGDG (18:3/18:4), como anotado automaticamente pela comparação com a base de dados espectral da plataforma GNPS. Com os presentes dados foi possível atribuir uma fórmula

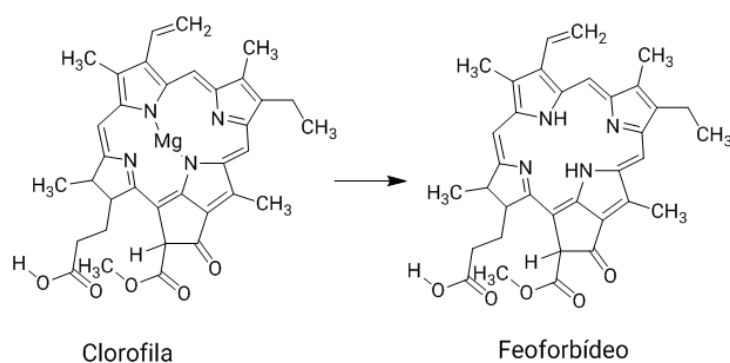
ao íon  $m/z$  795,5041  $[M+Na]^+$ , sendo esta  $C_{45}H_{72}O_{10}Na^+$  com erro de +4,02 ppm. O perfil de fragmentação pode ser encontrado na seção de apêndice **AP. 5.1**. Essa correspondência foi detectada como parte de um *cluster* formado por *features* detectadas em extratos e frações de todas as linhagens analisadas.

**Figura 12** - Cluster formado por nodos que representam glicolipídios e derivados. Destaque para a feature referente ao galactolipídio MGDG (18:3/18:4), íon de  $m/z$  795,5041  $[M+Na]^+$ , detectada no extrato e frações da linhagem *Calothrix* sp. CCIBt3320 sendo atribuído a este a fórmula molecular  $C_{45}H_{72}O_{10}Na^+$



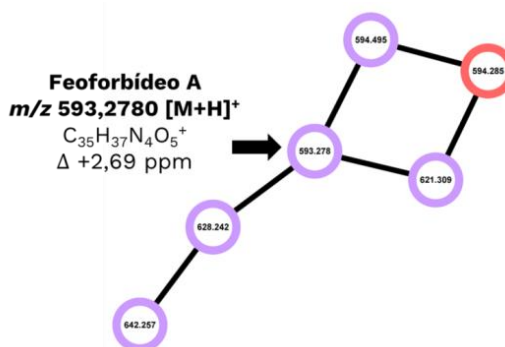
#### 4.5.2 - Derivados da clorofila e feoforbídeos

Um pequeno *cluster* foi identificado como sendo formado por moléculas derivadas da clorofila pertencentes majoritariamente às linhagens *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 e *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551. Foi anotada automaticamente pela base de dados do GNPS a *feature* de  $m/z$  593 como feoforbídeo A. Os feoforbídeos são as primeiras moléculas formadas na primeira etapa do processo catabólico da clorofila, identificada pela perda do átomo de magnésio do centro do anel porfirínico (Chen *et al.*, 2015).



A desreplcação utilizando o software SIRIUS (**Figura 13**) corroborou para a anotação do íon  $m/z$  593,2780  $[M+H]^+$  de fórmula  $C_{35}H_{37}N_4O_5^+$  como feoforbídeo A. A ferramenta CANOPUS indicou que o padrão de fragmentação MS/MS da *feature* é condizente com as porfirinas, o que corrobora com a anotação automática feita pelo GNPS. O espectro de fragmentação pode ser encontrado na seção de apêndice **AP. 5.2**.

**Figura 13** - Cluster dos catabólitos da clorofila, com indicação para o feoforbídeo A, substância detectada na linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 e na linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551



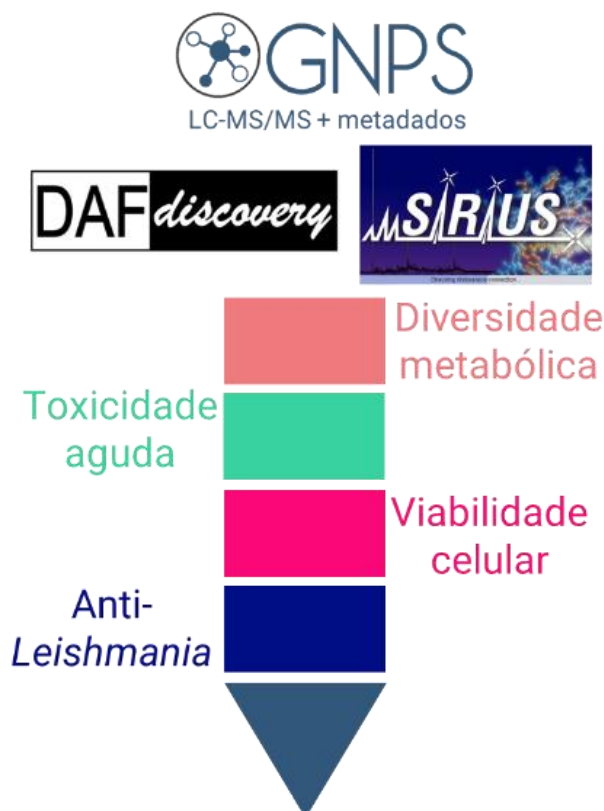
#### 4.6 - Rede molecular multicamada

Para sistematizar as análises da rede molecular, foi empregado um desmembramento dela de forma a orientar a desreplcação. A aplicação de metadados permite uma melhor inspeção da diversidade metabólica detectada de cada extrato e frações das cianobactérias relacionadas com a respectiva atividade biológica resultante de cada bioensaio.

Quatro diferentes filtros foram aplicados, gerando quatro tipos de camadas de uma mesma rede. Uma camada para cada bioensaio realizado, e

uma para a investigação da diversidade dos metabólitos detectados, conforme demonstrado na **Figura 14**.

**Figura 14** - Esquema do desmembramento da rede molecular em quatro redes diferentes, cada uma focando em um parâmetro de análise. Uma rede para as análises de diversidade metabólica e três redes para os bioensaios (toxicidade aguda contra *Artemia salina*, viabilidade celular contra células de melanoma humano e atividade anti-*leishmania*)



#### 4.6.1 - Análise de metabólitos secundários

Duas linhagens destacaram-se devido à grande quantidade de *features* exclusivas não compartilhados com outras linhagens, o que pode ser um indicativo de metabolismo secundário. Da linhagem *Komarekiella atlantica* CCIBt3307 foram obtidas frações que mostraram atividade biológica anti-*Leishmania*, portanto sua priorização é devida a dois cenários, de diversidade química e bioatividade.

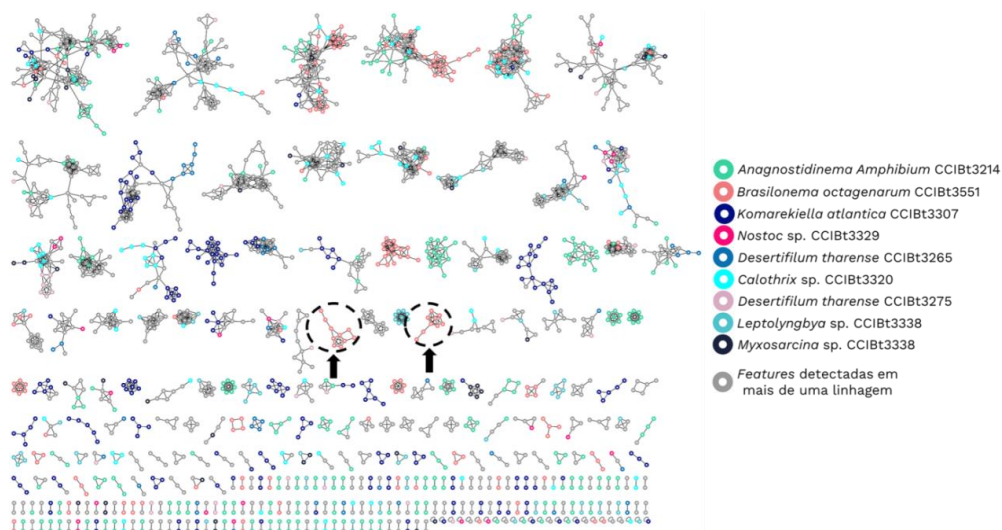
As amostras da linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551, apesar de não terem apresentado bioatividade em nenhum dos bioensaios realizados, foram priorizadas devido à sua diversidade química. O gênero *Brasilonema*, recentemente separado do gênero *Scytonema*, pertence à ordem das Nostocales (Vaccharino e Johansen, 2012). Esse gênero de

cianobactéria é geralmente encontrado em áreas tropicais e subtropicais do Brasil, vivendo sob a superfície do solo e de folhas de plantas, como bromélias, orquídeas e eucaliptos (Alvarenga *et al.*, 2020).

Na rede molecular, foram identificados 393 *features* exclusivas dessa linhagem (7,9%) e 400 *features* compartilhadas com outras linhagens, totalizando 793 *features* (15,9%) da rede molecular. Do total de *features*, 14 (3,56%) foram automaticamente anotadas pela base de dados do GNPS, todas como lipídios comuns à membrana das células. Nenhum metabólito secundário ou toxinas clássicas foram anotadas automaticamente.

Dois *clusters* dessa linhagem que não foram anotados pelo GNPS passaram por análises detalhadas, tendo suas *features* anotadas com auxílio do software SIRIUS (**Figura 15**). Esses *clusters* foram priorizados por serem formados unicamente por *features* exclusivas de uma única linhagem. Ambos os *clusters* receberam a denominação de Brasoc-1 e Brasoc-2.

**Figura 15** - Rede molecular com destaque para a diversidade metabólica de duas linhagens de cianobactéria, *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551 (cor rosa) e a *Komarekiella atlantica* CCIBt3307 (cor azul escuro). Destaque para dois *clusters* formados por *features* únicas da *Brasilonema octagenarum*, chamados de Brasoc-1 e Brasoc-2 circulado e apontados por uma seta. *Features* únicas de cada linhagem estão destacadas por cores específicas conforme a legenda. *Features* formadas por espectros detectados em mais de uma linhagem que compõem a rede estão em cinza

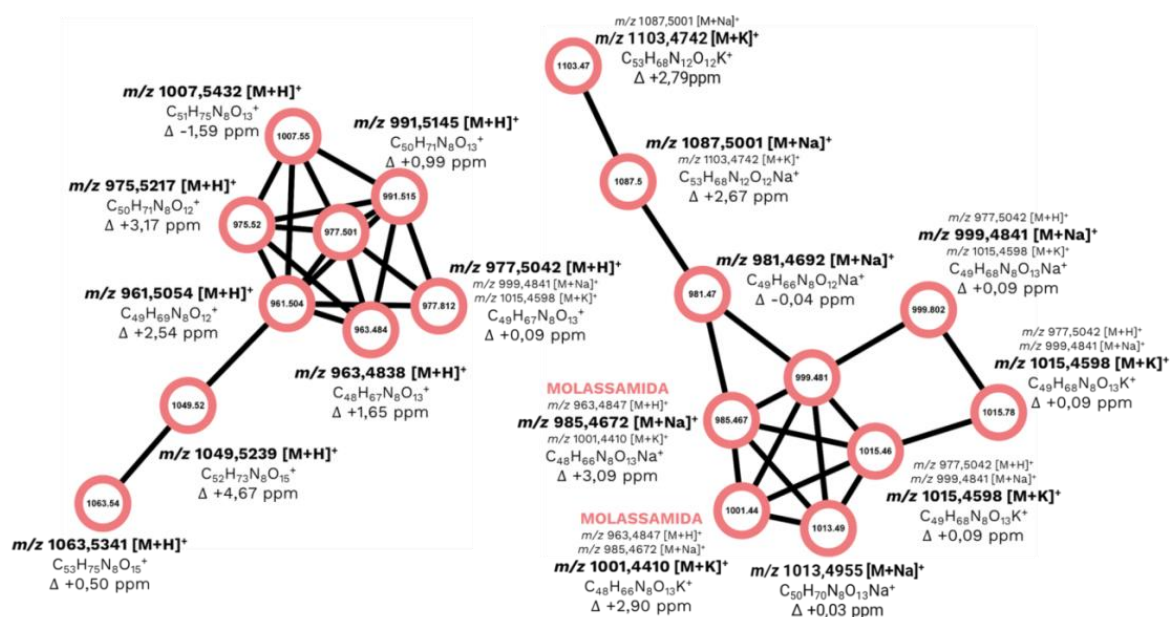


As análises dos espectros de MS/MS utilizando a ferramenta CANOPUS geraram resultados indicativos de peptídeos (**apêndice AP.5**). As fórmulas químicas putativas geradas foram utilizadas como *query* em buscas a bases

de dados para desrepliação, de modo a identificar as *features* que já pudessem ser conhecidas. Propagando-se a anotação foi possível estabelecer fórmulas putativas para os nodos que compõem os dois *clusters*, Brasoc-1 e Brasoc-2, para serem então utilizadas nas buscas a bases de dados no processo de desrepliação (**Figura 16**).

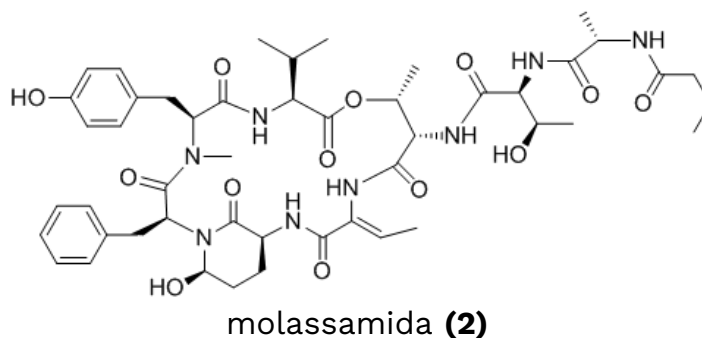
No *cluster* Brasoc-1, foi identificado o íon de  $m/z$  985, cuja fórmula molecular putativa calculada foi a  $C_{48}H_{66}N_8O_{13}Na^+$ , tendo sido calculada a partir da massa exata 985,4672  $[M+Na]^+$  e análise do espectro MS/MS. Essa fórmula é consistente com uma molécula já descrita na literatura, a molassamida, um depsipeptídeo isolado da cianobactéria marinha *Dichothrix utahensis* (Gunasekera *et al.*, 2010). Ao compararmos os espectros MS/MS obtidos experimentalmente e o espectro de molassamida (**2**) depositado na base de dados GNPS, observou-se grande semelhança nos perfis de fragmentação. Apesar do perfil de fragmentação estar depositado na base de dados do GNPS a *feature* de  $m/z$  985 não foi automaticamente anotada na rede molecular. Os espectros MS/MS podem ser encontrados na seção de apêndice **AP. 5.3**.

**Figura 16** - Destaque para os clusters Brasoc-1 e Brasoc-2 totalmente anotados com base nos perfis de MS/MS e com auxílio do software SIRIUS. Destaque para a *feature* de  $m/z$  985 de fórmula molecular putativa  $C_{48}H_{66}N_8O_{13}Na$  985,4664  $[M+Na]^+$ , cuja desrepliação indicou a possível presença do peptídeo molassamida





A hipótese da molassamida foi sustentada pela ferramenta de predição de estrutura do SIRIUS. A análise da fragmentação gerou um índice de 90,62% de similaridade com a molassamida **(2)**.



A confirmação dessa hipótese requer análises adicionais com técnicas complementares, por exemplo, o isolamento seguido de análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Porém, os dados obtidos conforme análise da ferramenta CANOPUS e o processo de desrepliação detalhado indicam a presença de um composto peptídico. Propagando-se a anotação, pode-se deduzir que os demais íons que formam o *cluster* possam ser análogos potencialmente inéditos da molassamida.

Analisando-se os *clusters*, buscas na literatura indicaram que houve correspondência das fórmulas químicas propostas com substâncias já descritas e originadas de cianobactérias, e destaca-se que nenhuma dessas *features* foi automaticamente anotada pela base de dados do GNPS. Com isso, procedeu-se à análise dos espectros MS/MS para a verificação das possíveis anotações:

- Íon de  $m/z$  991: composto de fórmula molecular  $C_{50}H_{70}N_8O_{13}^+$ , calculada a partir da massa acurada 991,5152  $[M+H]^+$ . Em bases de dados, encontrou-se a correspondência com a molécula kempopeptina A (Taori, Paul e Luesch, 2008). Através da comparação dos espectros MS/MS obtidos experimentalmente e o espectro depositado na base de dados foi possível concluir que este composto não se trata da kempopeptina A, sendo considerada uma molécula potencialmente inédita **(AP.5.4)**.

- Íon de  $m/z$  961: composto de fórmula molecular  $C_{49}H_{68}N_8O_{12}^+$ , calculada a partir da massa acurada 961,5047  $[M+H]^+$ . Em bases de dados,

encontrou-se correspondência com a fórmula molecular da micropeptina HH960, originária da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Lodin-Friedman e Carmeli, 2013). Mas ao comparar o perfil de fragmentação obtidos experimentalmente com o perfil da micropeptina 966 obtido da base de dados do GNPS, deduziu-se que este composto pode ser uma substância potencialmente inédita **(AP.5.5)**.

- Íon de  $m/z$  975: composto de fórmula molecular  $C_{50}H_{70}N_8O_{12}^+$ , calculada a partir da massa acurada 975,5198  $[M+H]^+$ . Em bases de dados, encontrou-se a correspondência com a fórmula molecular da loggerpeptina C (molécula análoga da molassamida) que é originária de cianobactéria marinha DRTO-73 (Al-Awadhi, Salvador, *et al.*, 2017). Mas ao comparar o perfil de fragmentação obtidos experimentalmente com o perfil da loggerpeptina A obtido da base de dados do GNPS, deduziu-se que este composto pode ser uma substância potencialmente inédita **(AP.5.5)**.

- Íon de  $m/z$  1007: composto de fórmula molecular  $C_{51}H_{74}N_8O_{13}^+$ , calculada a partir da massa acurada 1007,5459  $[M+H]^+$ . Em bases de dados, encontrou-se correspondência com a molécula micropeptina DR1006 que é originária da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e tem a mesma fórmula molecular (Adiv e Carmeli, 2013). Mas, ao comparar os padrões de fragmentação dos espectros MS/MS entre os dados depositados no GNPS da micropeptina 966 com os dados MS/MS obtidos experimentalmente, pode-se concluir que o íon de  $m/z$  1007 pode ser derivado de uma molécula potencialmente inédita **(AP.5.7)**.

Há quatro *features* nesses *clusters* que representam a mesma molécula, cuja fórmula molecular é  $C_{49}H_{68}N_8O_{13}$ . Trata-se das *features* de  $m/z$  999,802, 1015,78 e 1015,46 do Brasoc-1 e  $m/z$  977,812 do Brasoc-2. Todos esses íons apresentam o mesmo tempo de retenção de 2,85 minutos. Ao analisar os espectros em modo positivo e negativo, percebeu-se que se trata de adutos diferentes que foram representadas separadamente na rede molecular:  $m/z$  977,5043  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  999,4813  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  1015,4553  $[M+K]^+$ .

Há outros *clusters* de *features* derivados da linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551 que futuramente podem ser explorados na busca de

novas moléculas. A desreplicação será de extrema importância para determinar o ineditismo químico dessas moléculas. Há um cenário promissor para o aprofundamento das pesquisas com essa linhagem em relação à bioatividade. Em 2022, foi publicado um estudo em que foram detectados e isolados análogos inéditos da molassamida B com bioatividade como inibidores de protease produzidos pela cianobactéria marinha *Rivularia* sp. (Reher *et al.*, 2022). A linhagem CCIBt3551 foi, portanto, priorizada para estudos futuros de fracionamento bioguiado visando a obtenção e purificação de seus compostos bioativos terem sua estrutura elucidada.

#### **4.6.2 - Análise de metabólitos secundários em relação aos resultados do teste de toxicidade aguda contra *Artemia salina***

Foram testados os nove extratos e suas respectivas frações no bioensaio de toxicidade aguda contra o microcrustáceo *Artemia salina*. Esse bioensaio é conveniente para triagens de amostras por causa da sua rapidez e baixo custo, além de gerar resultados preliminares para a pesquisa na área farmacêutica (Rajabi *et al.*, 2015). A mortalidade foi calculada pela razão de náuplios mortos pelo total de náuplios no respectivo poço. Como controle positivo foi utilizado o dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) que apresentou 100% de letalidade, enquanto o controle negativo (DMSO 1%) e branco (água do mar artificial) não demonstraram toxicidade. Todas as amostras foram testadas triplicata.

Apenas o extrato da linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 apresentou resultado positivo para citotoxicidade. O gênero *Anagnostidinema*, pertencente à ordem Oscillatoriales, é caracterizado por células filamentosas, que não possuem diferenciação de heterocistos ou acinetos (Boone, Castenholz e Garrity, 2001). Anteriormente classificado como *Geitlerinema*, o gênero *Anagnostidinema* foi separado deste após análises morfológicas e genéticas do rRNA ribossomal 16S, recebendo a nomenclatura em homenagem ao pesquisador especialista em cianobactérias Konstantinos Anagnostidis (Strunecký *et al.*, 2017).

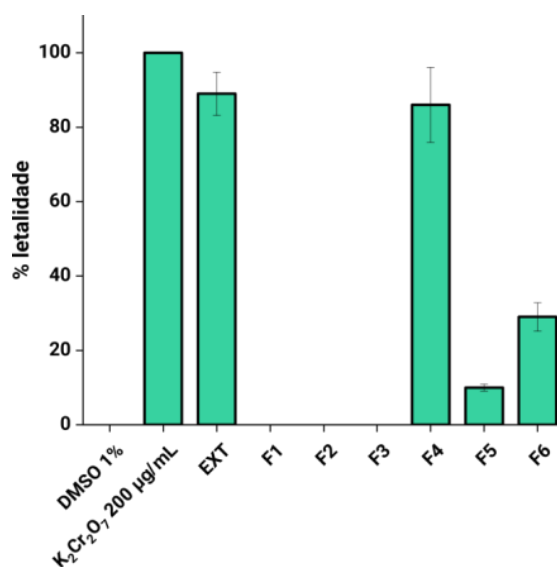
*Anagnostidinema amphibium* é uma espécie de água doce frequentemente encontrada em reservatórios de abastecimento de água

públicos no estado de São Paulo. Apesar desta frequência, ainda existem poucos estudos voltados para a toxicidade desta cianobactéria (Dogo *et al.*, 2011). Já foram detectados genes produtores de microcistinas de amostras criopreservadas de cianobactérias contendo espécies do gênero *Anagnostidinema* coletadas na Ilha de Ross no continente Antártico (Zaki *et al.*, 2020). Porém, na rede molecular nenhuma toxina conhecida foi anotada através de comparações com a base de dados do GNPS para essa linhagem.

Em um estudo brasileiro realizado por (Sant'Anna *et al.*, 2008), demonstrou-se toxicidade dessa linhagem de *A. amphibium* em bioensaios de cianotoxinas, indicando coerência nos resultados obtidos. Entretanto, ainda são necessárias mais análises com o objetivo de isolar e identificar quais a(s) molécula(s) responsável(eis) pela atividade citotóxica.

As frações obtidas a partir do extrato da *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 foram testadas contra *A. salina* e apenas a fração 4 (F4) apresentou resultado significativo (>50% de inibição) para citotoxicidade (**Gráfico 1**). Essa informação direciona os esforços de desreplicação, focando nas moléculas que estejam concentradas na fração (Bisson *et al.*, 2016)

**Gráfico 1** - Gráfico demonstrando a citotoxicidade da linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 observada no bioensaio contra *Artemia salina*

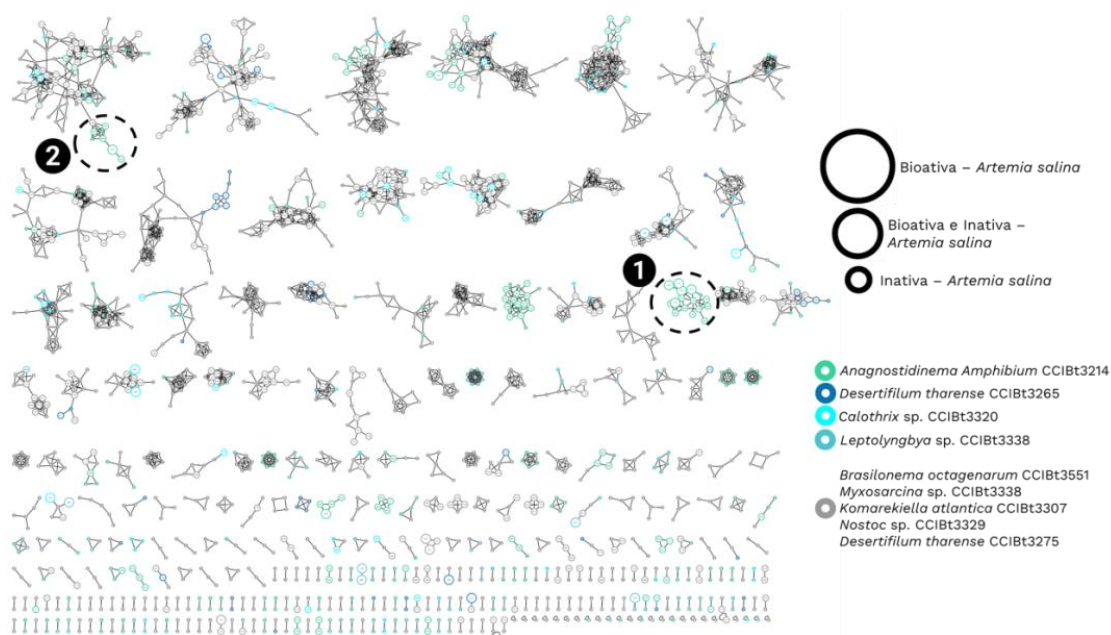


As frações 3 (F3) obtidas a partir do extrato da *Calothrix* sp. CCIBt3320, *Desertifilum tharense* CCIBt3265 e *Leptolyngbya* sp. CCIBt3338 também

apresentaram bioatividade. Nenhum dos extratos havia apresentado bioatividade. Isso é um indicativo de que o fracionamento cumpriu o seu papel ao revelar metabólitos que estavam presentes nos extratos em concentrações abaixo da sensibilidade do teste de citotoxicidade aguda contra a *Artemia salina*.

Analisando a rede molecular construída com dados de amostras de diferentes linhagens sob essa perspectiva, pode-se inferir que um *cluster* contendo *features* de uma única linhagem podem indicar a presença de metabólitos secundários. Com isso, foi possível identificar na rede molecular **(Figura 17)** *features* agrupadas que eram produzidas apenas pela linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214. Os metadados utilizados na criação da rede molecular indicaram que esses *clusters* eram formados em sua maioria por *features* detectados na fração bioativa. A desreplcação foi guiada por essas informações para a identificação de possíveis novos compostos bioativos.

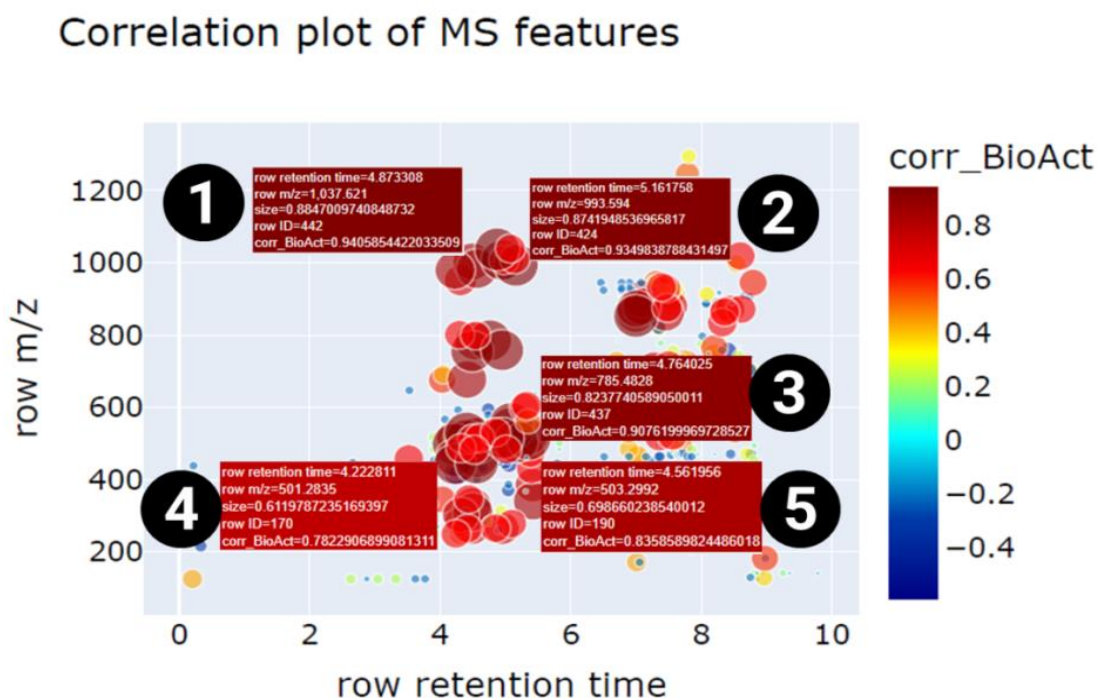
**Figura 17** - Rede molecular com destaque para a atividade de citotoxicidade aguda contra o microcrustáceo *Artemia salina*. Quatro linhagens apresentaram resultado positivo nesse bioensaio, sendo estas *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 (cor verde), *Desertifilum tharense* CCIBt3265 (cor azul escuro), *Calothrix* sp. CCIBt3320 (cor azul claro) e *Leptolyngbya* sp. CCIBt3338 (cor verde água). Dois *clusters* formados por *features* advindas de frações positivas da *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 estão demonstradas na rede com os números 1 e 2.



Através da análise da rede molecular, foram identificadas 1654 *features* (33,28% da rede) pertencentes à *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214. Dessas *features*, 1264 são produzidas exclusivamente por essa linhagem (25,43% da rede). Foram contabilizadas 39 *features* exclusivas da fração F4, positiva contra *Artemia salina*.

No processo da metabolômica não-alvo (*untargeted*) a triagem de *features* promissoras pode ser um processo desafiador (McCloud, 2010). Para guiar a desreplcação, *features* presentes na fração bioativa foram priorizadas com o auxílio da ferramenta DAFdiscovery. A ferramenta permitiu que fossem evidenciadas aquelas altamente correlacionadas com citotoxicidade observada (Borges *et al.*, 2023), conforme demonstrado na **Figura 18**.

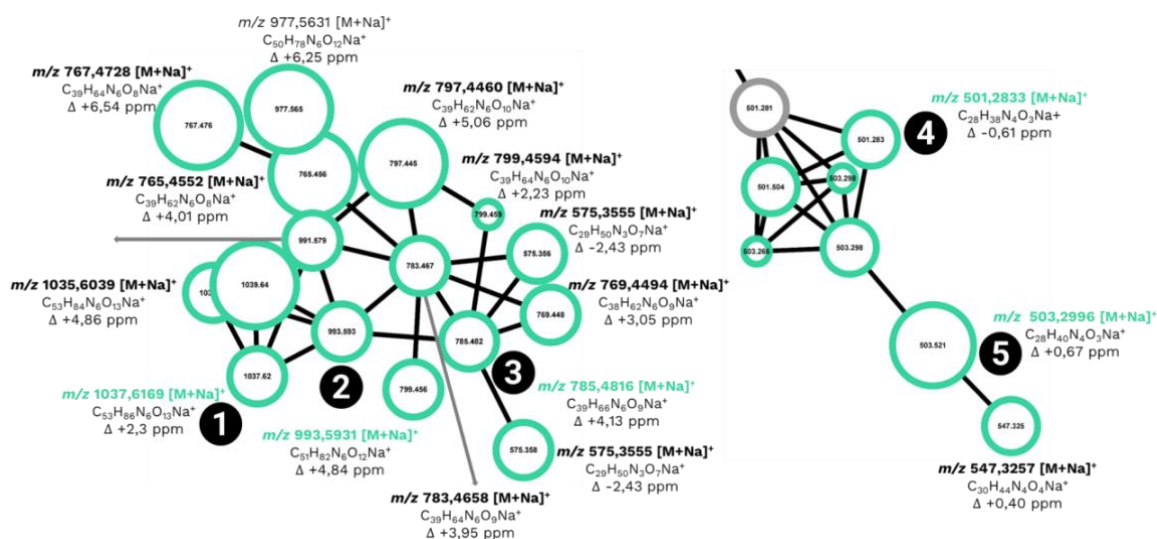
**Figura 18** - Gráfico de correlação do padrão MS1 com a bioatividade gerado a partir da **Opção 4** do pipeline do DAFdiscovery. Cinco *features* de *m/z* 1037, *m/z* 993, *m/z* 785, *m/z* 501 e *m/z* 503 foram destacadas por terem sido apontadas como correlacionadas à citotoxicidade contra *Artemia salina*



As cinco *features* foram priorizadas com auxílio do DAFdiscovery foram: nº1 de *m/z* 1037,6169, nº2 de *m/z* 993,5931, nº3 de *m/z* 785,4816, nº4 de *m/z* 501,2833 e nº5 de *m/z* 503,2996. As *features* número 1, 2 e 3 foram localizadas em um *cluster* formado apenas por *features* exclusivas da *A. amphibium*

CCIBt3214, ao qual foi chamado de *cluster* Anag-1. As *features* de número 4 e 5 foram localizadas em uma parte de um *cluster* compartilhado entre *features* advindas de outras linhagens, porém em uma posição de *features* detectadas apenas na CCIBt3214, ao qual foi chamado de semi-*cluster*Anag-0,5 (**Figura 19**). Esse resultado foi fundamental para guiar o processo de anotação seguida de desreplcação.

**Figura 19** - Clusters formados exclusivamente por *features* correlacionadas com a bioatividade detectadas a partir do extrato e fração F4 da linhagem Anagnostidinema amphibium CCIBt3214. *Features* detectadas somente nas amostras bioativas estão destacadas em maior tamanho em relação às demais. *Features* detectadas tanto em frações bioativas quanto em inativas estão representadas em tamanho intermediário, e *features* presentes apenas em frações inativas são representadas por pequenos círculos. As numerações de 1 a 5 indicam as *features* apontadas pelo DAFdiscovery como promissoras em termos de bioatividade



As *features* foram anotadas com auxílio do software SIRIUS. Vinte fórmulas moleculares putativas foram geradas pelo sistema para cada *feature*. A ferramenta CANOPUS classificou-as como moléculas da classe dos peptídeos.

Análises manuais, tendo por base a regra do nitrogênio e padrão isotópico, levaram à escolha dos candidatos mais prováveis. As fórmulas para cada *feature* foram:

- Íon de *m/z* 1037 de fórmula molecular  $C_{53}H_{86}N_6O_{13}Na^+$  e massa acurada de 1037,6169 [M+Na]<sup>+</sup> (**AP. 5.8**);

- Íon de *m/z* 993 de fórmula molecular  $C_{51}H_{82}N_6O_{12}Na^+$  e massa acurada de 993,5931 [M+Na]<sup>+</sup> (**AP. 5.9**);

- Íon de  $m/z$  785 de fórmula molecular  $C_{39}H_{66}N_6O_9Na^+$  e massa acurada de 785,4816  $[M+Na]^+$ ;

- Íon de  $m/z$  501 de fórmula molecular  $C_{28}H_{38}N_4O_3Na^+$  e massa acurada de 501,2833  $[M+Na]^+$  (**AP. 5.11**)e;

- Íon de  $m/z$  503 de fórmula molecular  $C_{28}H_{40}N_4O_3Na^+$  e massa acurada de 503,2996  $[M+Na]^+$  (**AP. 5.10**).

Não foi encontrada correspondência de nenhuma dessas fórmulas moleculares em bases de dados de produtos naturais. Após a determinação das fórmulas, a propagação da anotação foi realizada para o restante dos *clusters*.

O íon de  $m/z$  799, foi anotado com a fórmula molecular putativa  $C_{39}H_{64}N_6O_{10}Na^+$  calculada a partir da massa acurada 799,4594  $[M+Na]^+$ . Após buscas em bases de dados, encontrou-se a correspondência com a molécula aeruginosina NOL7, peptídeo descoberto em 2013 e produzido pela cianobactéria marinha *Nodularia spumigena* (Fewer *et al.*, 2013). Ao comparar dados dos espectros MS/MS obtidos experimentalmente com um estudo feito por (Jacinavicius *et al.*, 2021) em que estão descritas as fragmentações características das aeruginosinas foi possível concluir que esta *feature* não se trata da aeruginosina NOL7, podendo ser uma molécula potencialmente inédita (**AP.5.12**). Futuramente este composto será isolado e submetido a análises espectroscópicas e espectrométricas para elucidação estrutural, assim como os demais presentes em ambos os *clusters* que foram identificadas como sendo possivelmente inéditas através da desreplicação.

Como as outras três linhagens produtoras de frações bioativas, CCIBt3320, CCIBt3265 e CCIBt3338, apresentaram, na rede molecular, apenas *clusters* compartilhados com as demais, outras estratégias serão aplicadas para a desreplicação dos seus metabólitos (Buedenbender, Astone e Tasdemir, 2020). Através dos resultados deste trabalho, priorizaram-se moléculas da linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 de acordo com seu potencial ineditismo e bioatividade para que sejam isoladas e elucidadas estruturalmente.



#### **4.6.3 - Análise de metabólitos secundários em relação aos resultados do teste *in vitro* da viabilidade celular contra melanoma humano por MTT**

Diversos produtos naturais de cianobactérias terrestres ou de água doce foram descritos como bioativos contra células de câncer. Entre os anos de 2010 e 2020 podem ser citados, por exemplo, os merociclofanos (Kang *et al.*, 2012) e ribociclofanos (May *et al.*, 2018), além das cusperinas (Kust *et al.*, 2018) e anabaenopeptinas (Saha *et al.*, 2020).

Essas descobertas motivaram a utilização deste bioensaio para a triagem dos extratos e frações para a avaliação da atividade antiproliferativa contra células de melanoma humano no teste *in vitro* de viabilidade celular indireta MTT.

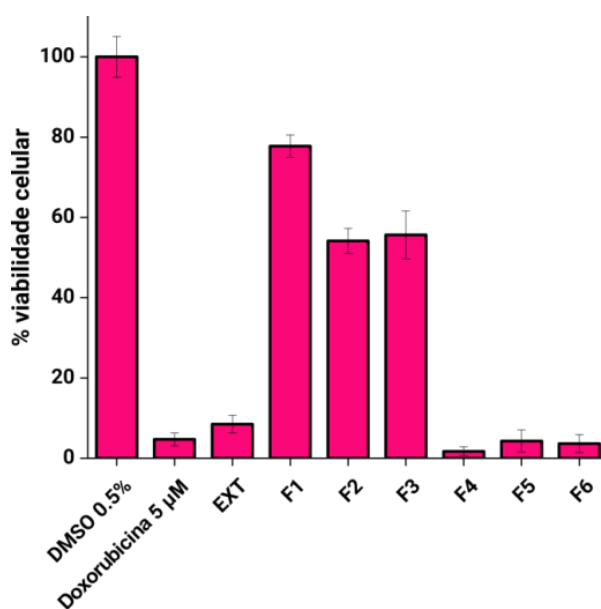
O câncer de pele é uma neoplasia maligna cujos tipos mais comuns são: o carcinoma basocelular, o carcinoma espinocelular e o melanoma (Gray-Schopfer, Wellbrock e Marais, 2007). Essa neoplasia representa apenas 4% dos casos de câncer de pele, mas é responsável por 65% de todas as mortes relacionadas a essa doença (Gordon, 2013).

Ensaio celulares *in vitro* desempenham um papel fundamental na pesquisa por gerar dados iniciais que podem direcionar futuros estudos *in vivo* e clínicos (Khor *et al.*, 2017). Empregados em triagens, os ensaios de viabilidade celular podem determinar se uma amostra possui atividade antiproliferativa (Adan, Kiraz e Baran, 2016). O ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um teste colorimétrico de viabilidade celular indireto. O mecanismo desse bioensaio consiste em medir a capacidade das mitocôndrias presentes nas células de melanoma (linhagem celular naïve SK-MEL-28) de reduzir o MTT (amarelo) transformando-o no sal de formazan (roxo). Essa reação se traduz na medida de viabilidade celular diretamente proporcional a mudança de cor detectada pelo espectrofotômetro (Liu e Peterson, 1997; Mosmann, 1983). Antes que o teste seja realizado, é necessário que cada uma das amostras seja incubada sem a presença de células para descartar a hipótese de que as amostras não causem a redução do MTT em formazan, levando a um resultado falso-negativo. A reação de conversão do MTT em formazan é realizada predominantemente por enzimas mitocondriais, portanto as células que

foram mortas pelas substâncias presentes nas frações de cianobactérias apresentam coloração amarela (Liu e Peterson, 1997).

A partir dos ensaios de MTT, foi observado o resultado positivo de amostras obtidas a partir da linhagem *Nostoc* sp. CCIBt3329 (**Gráfico 2**), uma linhagem originária do cerrado brasileiro que foi coletada sob a casca de uma árvore em Pirassununga, no estado de São Paulo. As frações F4, F5 e F6, além do próprio extrato CCIBt3329, inibiram significativamente a viabilidade celular de SK-MEL-28, com perfil semelhante ao da doxorrubicina (controle positivo).

**Gráfico 2** - Resultados do ensaio de viabilidade celular de amostras da linhagem *Nostoc* sp. CCIBt3329

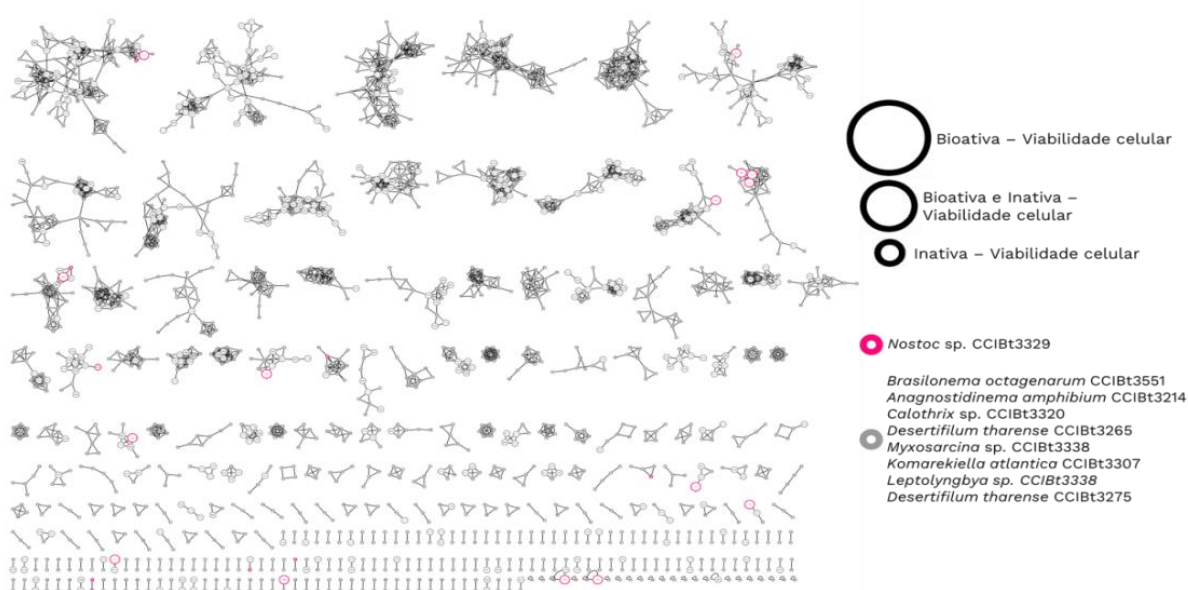


Cianobactérias do gênero *Nostoc* são fixadoras de nitrogênio (N<sub>2</sub>) atmosférico, podendo ser encontradas em ambientes terrestres e aquáticos (água doce, salobra e marinha) vivendo de forma independente ou em simbiose com outros seres vivos (Fidor, Konkel e Mazur-Marzec, 2019). A conversão do N<sub>2</sub> atmosférico em amônia é feita por enzimas localizadas em células especializadas chamadas de heterócitos, cuja parede celular é formada por polissacarídeos e glicolipídios de estruturas únicas (Schouten *et al.*, 2013). As estruturas dos glicolipídios são compartilhadas com outras espécies de cianobactérias como *Nodularias* e *Anabaenas* (Bauersachs *et al.*, 2009).

Foi analisada a rede molecular multicamada através dos metadados do bioensaio de viabilidade celular. A linhagem *Nostoc* sp. CCIBt3329 apresentou 857 *features* (17,24% dos nodos da rede molecular), sendo apenas 206 exclusivas dessa linhagem (4,14% dos nodos da rede molecular). *Features* exclusivas e presentes nas frações bioativas contra as células de melanoma humano foram contabilizadas em 117, representando 2,35% dos nodos da rede molecular total e 13,65% de todas as *features* detectadas nas amostras da *Nostoc* sp. CCIBt3329.

A análise da rede molecular não resultou na identificação de nenhum *cluster* formado unicamente de *features* detectadas somente da linhagem CCIBt3329. Na rede molecular (**Figura 20**) as *features* coloridas na cor magenta, apesar de comporem clusters contendo nodos compartilhados, foram detectadas exclusivamente em extratos e frações da *Nostoc* sp. CCIBt3329. Com a adição de metadados foi possível identificar quais as *features* eram provenientes das amostras bioativas no ensaio de viabilidade celular.

**Figura 20** - Rede molecular MS/MS de frações de cianobactérias com destaque para as *features* de amostras com atividade da avaliação da viabilidade celular contra células de melanoma humano usando a linhagem celular de melanoma naïve SK-MEL-28 por MTT. Amostras de uma única linhagem apresentaram resultado positivo nesse bioensaio, *Nostoc* sp. CCIBt3329 (cor magenta). *Features* detectadas somente nas amostras bioativas estão destacadas em maior tamanho. *Features* detectadas tanto em frações bioativas quanto em inativas estão representadas em tamanho intermediário. *Features* presentes apenas em frações inativas são representadas por pequenos círculos.



Para complementar o processo de desreplicação, a ferramenta DAFdiscovery foi empregada para distinguir quais as *features* correlacionadas com a citotoxicidade verificada no bioensaio de viabilidade celular (Borges *et al.*, 2023). A ferramenta apontou como candidatas diversas *features*, porém todas compartilhadas com outras linhagens analisadas nesse estudo e sem atividade no bioensaio. A tabela de correlação com a bioatividade gerada pelo DAFdiscovery foi analisada cuidadosamente e as *features* com maiores índices foram anotadas e desreplicadas (**Tabela 10**). Essas *features* tiveram suas respectivas fórmulas moleculares putativas geradas com o emprego do software SIRIUS. As respectivas fórmulas moleculares foram buscadas em bases de dados para encontrar possíveis correspondências.

**Tabela 10** - Resultado obtido pela ferramenta DAFdiscovery correlacionando dados de LC-MS e bioatividade das frações da linhagem *Nostoc* sp. CCIBt3329 analisadas em ensaio de viabilidade celular contra melanoma humano por MTT juntamente com as respectivas fórmulas moleculares putativas e a anotação decorrente do processo de desreplicação

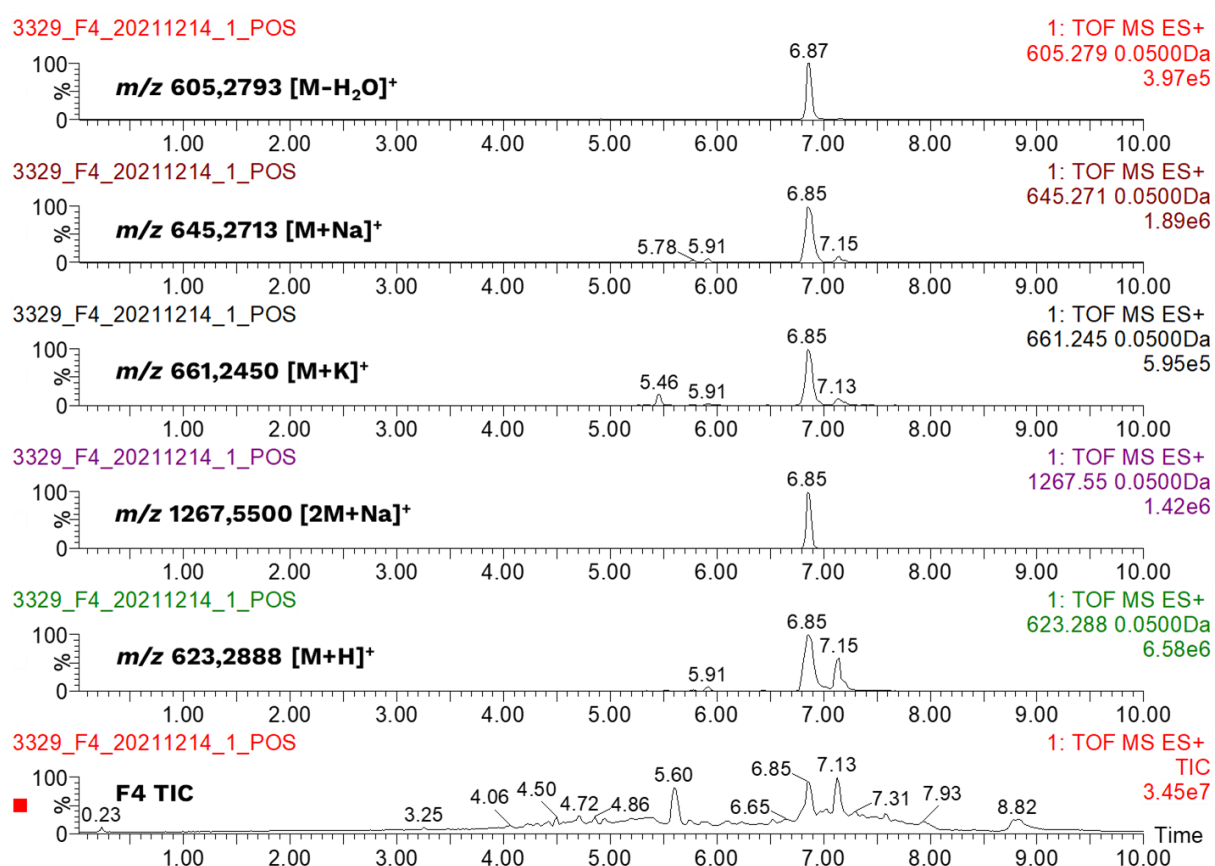
número	m/z	Índice de correlação de bioatividade	Fórmula molecular putativa	Aduto	Erro em ppm	Anotação
1	623,2875	0,9667	C <sub>36</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	+1,74	porfirina
2	730,4814	0,9546	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub> PS	[M] <sup>+</sup>	+0,13	lipídio
3	645,2697	0,9404	C <sub>36</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	+1,74	porfirina
4	620,3784	0,9345	C <sub>35</sub> H <sub>51</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	[M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>	+3,62	peptídeo
5	660,3727	0,8878	C <sub>35</sub> H <sub>51</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	+3,62	peptídeo
6	661,2450	0,8716	C <sub>36</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	[M+K] <sup>+</sup>	+1,74	porfirina
7	653,2982	0,8535	C <sub>37</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	+1,86	desconhecido
8	392,2959	0,8590	N/D	N/D	N/D	N/D
9	605,2793	0,8238	C <sub>36</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	[M-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	+1,74	porfirina
10	1267,5500	0,8087	C <sub>36</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	[2M+Na] <sup>+</sup>	+1,74	porfirina

N/D (não determinado)

Foi realizada uma inspeção cuidadosa dos cromatogramas a partir dos dados gerados pelo DAFdiscovery. Os cromatogramas de íons extraídos - EIC

(do inglês *extracted ion chromatogram*) revelaram que as *features* de  $m/z$  605,2793  $[M-H_2O]^+$ ,  $m/z$  645,2713  $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  661,2450  $[M+K]^+$ ,  $m/z$  1267,5500  $[2M+Na]^+$  e  $m/z$  623,2888  $[M+H]^+$  são adutos diferentes de uma mesma molécula (**Figura 21**) correspondendo à fórmula molecular  $C_{36}H_{38}N_4O_6$ . A análise do espectro MS/MS pela ferramenta CANOPUS (**AP.5.13**) indicou uma fragmentação característica das porfirinas. Não é possível, somente com a desrepliação, confirmar a estrutura química com exatidão.

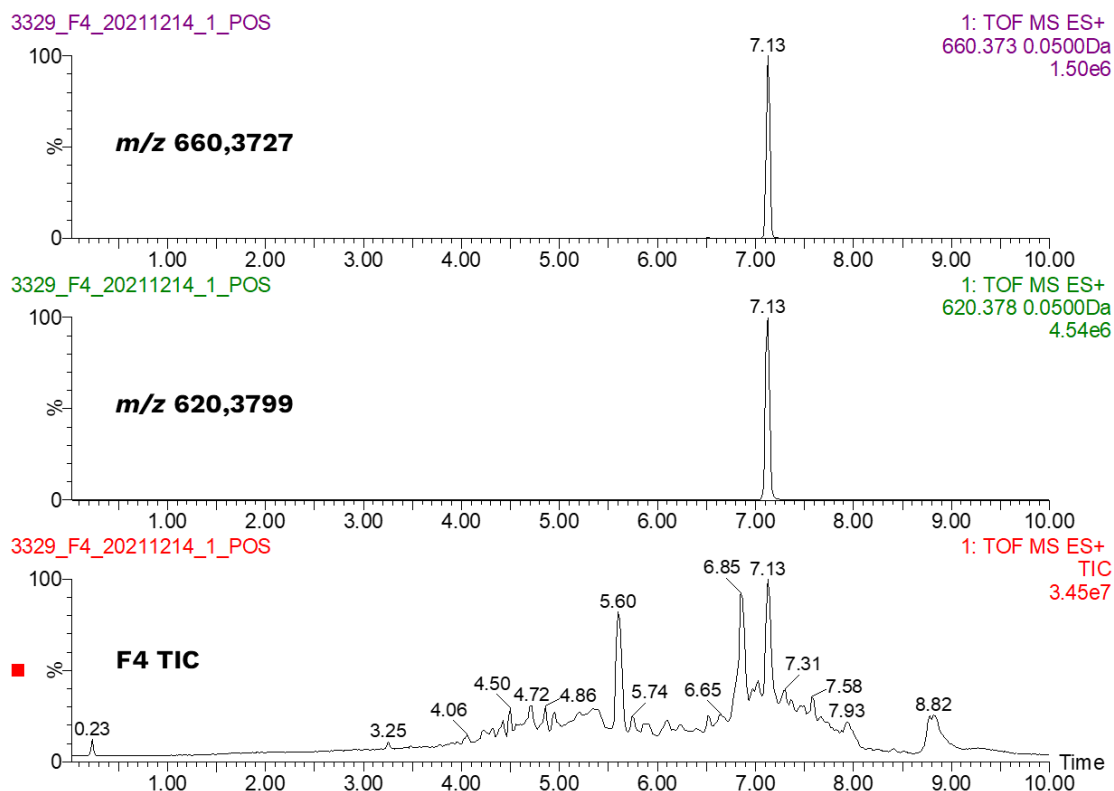
**Figura 21** - Cromatograma de íon extraído das *features* de  $m/z$  605,2793  $[M-H_2O]^+$ ,  $m/z$  645,2713  $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  661,2450  $[M+K]^+$ ,  $m/z$  1267,5500  $[2M+Na]^+$  e  $m/z$  623,2888  $[M+H]^+$  demonstrando que todas são adutos da mesma molécula que elui no tempo de retenção de 6,8 minutos



As *features* de  $m/z$  660,3727  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  620,3799  $[M-H_2O+H]^+$  também são adutos da mesma molécula e equivalem à fórmula molecular  $C_{35}H_{51}N_5O_6$ , sem correspondência em bases de dados (**Figura 22**). O perfil de fragmentação MS/MS segundo pontuado pela ferramenta CANOPUS indica a classificação como possível peptídeo (**AP. 5.14**) (Fidor *et al.*, 2020). O

aprofundamento das pesquisas com utilização de estratégias de fracionamento bioguiado e aquisição de dados de ressonância magnética nuclear poderão confirmar a estrutura química dessa molécula.

**Figura 22** - Cromatograma de íon extraído das *features* de  $m/z$  660,3727  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  620,3799  $[M-H_2O+H]^+$  demonstrando que são adutos da mesma molécula com tempo de retenção de 7,2 minutos



A *feature* de  $m/z$  de 730,4814  $[M]^+$  de fórmula molecular  $C_{35}H_{68}N_7O_5PS$  teve o perfil de fragmentação analisado, sendo encontrada possível correspondência com um composto lipídico (**AP.5.15**). Maiores investigações serão necessárias para confirmar a estrutura e a fórmula molecular desse composto.

Para a *feature* de  $m/z$  653,2982  $[M+H]^+$  de fórmula molecular  $C_{37}H_{40}N_4O_7$  não foram encontradas correspondências em bases de dados.

A *feature* de  $m/z$  392,2959 não teve seu aduto identificado mesmo através de análise de dados de espectrometria de massas de alta resolução em modo positivo e modo negativo, não podendo assim ter sua fórmula molecular calculada.

Através dos resultados obtidos, a linhagem *Nostoc* sp. CCIBt3329 foi priorizada de acordo com a sua bioatividade. Entretanto, diferentes abordagens serão aplicadas para a continuidade dos estudos dessa linhagem. As suas frações serão novamente fracionadas, analisadas por UPLC-HRMS/MS e submetidas a novas etapas de bioensaio para que seja, então, possível identificar qual(is) o(s) composto(s) responsáveis pela bioatividade. Uma vez confirmado o ineditismo químico das entidades bioativas os processos de isolamento e elucidação estrutural serão aplicados.

#### **4.6.4 - Análise de metabólitos secundários em relação aos resultados in vitro da atividade citotóxica em formas amastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis***

Os extratos e frações foram submetidos à avaliação quanto ao potencial citotóxico contra o parasita *Leishmania* (L.) *amazonensis*. As leishmanioses são doenças negligenciadas e geograficamente espalhadas. O parasita é transmitido pelo mosquito palha, um Flebotomíneo (*Psychodidae*). As leishmanioses podem se apresentar clinicamente como quadro de lesões cutâneas ou em mucosas, conhecida como leishmaniose tegumentar, ou como lesões viscerais com comprometimento do sistema linfohematopoiético, chamada de leishmaniose visceral (Conceição-Silva e Morgado, 2019). Pacientes acometidos por leishmanioses costumam apresentar febre, perda de peso, aumento do baço e pancitopenia. O parasita consegue sobreviver em gânglios linfáticos manifestando-se tardiamente após alta clínica, o que é um problema em pacientes imunocomprometidos (Porto *et al.*, 2022).

Por conta desse cenário é importante que sejam descobertas novas moléculas eficazes e com menores eventos adversos para tratar essas doenças. No Brasil, três fármacos estão disponíveis para o tratamento de leishmanioses, sendo estes o antimonial pentavalente, anfotericina B e pentamidina. Todas de aplicação parenteral com risco de eventos adversos severos como lesão renal, pancreatite e insuficiência cardíaca (Mendonça *et al.*, 2016). Novas alternativas terapêuticas mais fáceis de administrar e com baixo número de eventos adversos são imprescindíveis. Além da necessidade

de contornar a resistência aos fármacos já utilizados (Basmaciyan e Casanova, 2019).

Testes *in vitro* de viabilidade celular foram conduzidos utilizando as formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis*. Extratos e frações foram diluídos na concentração de 25µg/mL em meio RPMI contendo DMSO 1%. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo e DMSO 1% como controle negativo. O resultado foi apresentado por porcentagem de inibição considerando a Anfotericina B como 100% de atividade (Mendonça *et al.*, 2019).

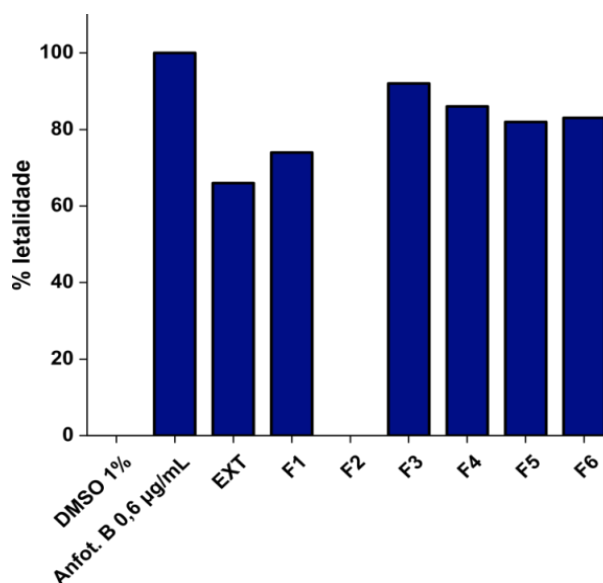
Extratos e frações provenientes de três diferentes linhagens foram bioativas contra *Leishmania* (L.) *amazonensis*, sendo estes *Myxosarcina* sp. CCIBt3496, *Desertifilum tharense* CCIBt3275 e *Komarekiella atlantica* CCIBt3307. O nível de inibição acima de 60% das amostras em relação ao controle positivo (100%) fez com que a aplicação da ferramenta DAFdiscovery não resultasse na priorização de *features*. Como a função de Espectroscopia de Correlação Total Estatística, STOCYSY, calcula a covariância e a correlação entre os picos MS1 da amostra bioativa com relação às demais amostras não bioativas a aplicação da ferramenta foi limitada devido ao bioensaio. Portanto, os ensaios *in vitro* de viabilidade celular contra os promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* serão repetidos em concentrações menores para a identificação das amostras que de fato são mais promissoras do ponto de vista da atividade biológica.

Como não houve destaque de *features* altamente correlacionados com a bioatividade, a priorização foi baseada na diversidade metabólica observada na rede molecular. Dentre as linhagens que geraram amostras com resultados bioativos, extratos e frações provenientes da linhagem *Komarekiella atlantica* CCIBt3307 se mostraram, através da rede molecular, especialmente quimiodiversos. Destaque para o **Gráfico 3** contendo os resultados da atividade do extrato e frações da CCIBt3307. Com exceção da fração F2 (sem bioatividade), todas as demais amostras incluindo o extrato apresentaram um nível de inibição acima de 60% em relação ao controle positivo (100%). Pertencente à ordem das Nostocales, a cianobactéria *Komarekiella* sp. é encontrada vivendo sob casca de árvores, madeira ou



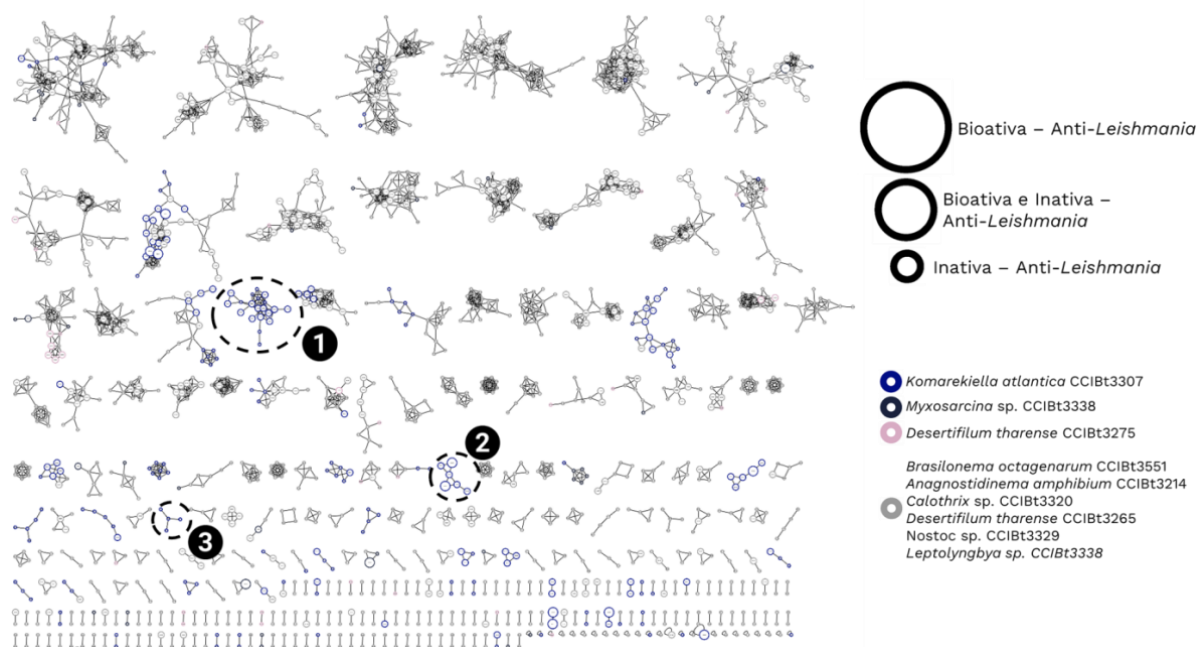
concreto. Em sua morfologia celular se evidenciam acinetos contendo heterócitos, esféricos ou subesféricos (Hentschke *et al.*, 2017).

**Gráfico 3** - Resultados do ensaio da atividade citotóxica contra *Leishmania amazonensis* de amostras da linhagem *Komarekiella atlantica* CCIBt3307. O extrato e as frações F1, F3, F4, F5 e F6 demonstraram bioatividade de 60% de inibição em relação ao controle positivo, anfotericina B



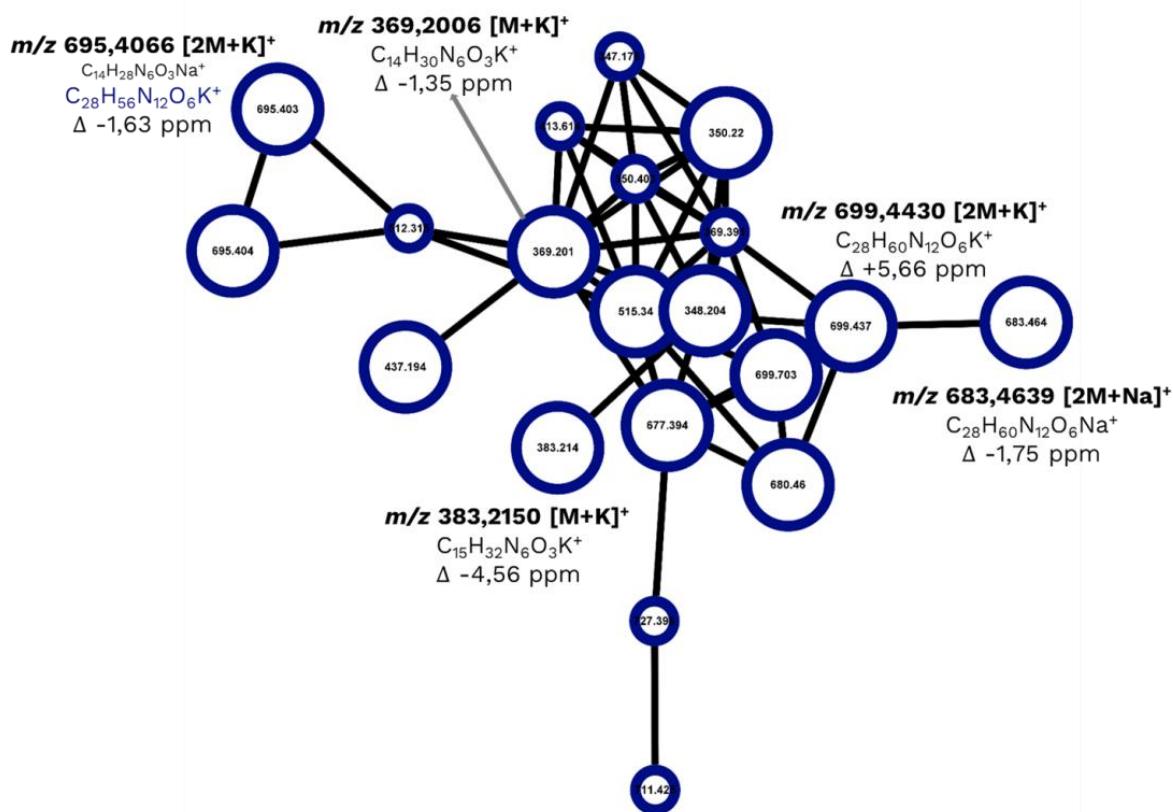
A linhagem CCIBt3307 já havia sido priorizada conforme seção **5.6.1 - Análise de metabólitos secundários**". A rede molecular multicamada foi filtrada através dos metadados do ensaio *in vitro* de viabilidade celular. A análise dos dados obtidos das amostras da linhagem CCIBt3307 revelaram a presença de 946 *features* (19,03% da rede), sendo destas 579 exclusivas, ou seja, não compartilhados com nenhuma outra das oito linhagens (11,65% da rede). *Features* exclusivas e bioativas no bioensaio foram contabilizadas em 44 (0,88% da rede total) e 7,6% de todas as *features* detectadas da *Komarekiella atlantica* CCIBt3307. Três *clusters* exclusivos foram destacados para serem desreplicados. Os *clusters* foram denominados *cluster* Komar-1, Komar-2 e Komar-3, sendo pontuados respectivamente pelos números 1, 2 e 3 conforme mostrados na **Figura 23**.

**Figura 23** - Clusters formados exclusivamente por *features* do extrato e frações da linhagem *Komarekiella atlantica* CCIBt3307. *Features* detectadas somente nas amostras bioativas estão destacadas em maior tamanho em relação às demais. *Features* detectadas tanto em frações bioativas quanto em inativas estão representadas em tamanho intermediário, e *features* presentes apenas em frações inativas são representadas por pequenos círculos



A desrepliação teve início com o *cluster* Komar-1. Na análise detalhada dos dados de MS1 e MS2, identificou-se que as *features* eram derivadas de adutos complexos (multímeros) de difícil anotação. A dimerização e a formação de multímeros complexos pode ocorrer nas análises de LC-MS/MS devido à ionização por ESI e reações *in loco* na fonte de ionização. As moléculas ao serem submetidas brevemente ao calor, alta voltagem e variações de pH podem reagir com seus próprios fragmentos ou com solventes gerando multímeros, ou ainda reagindo entre si formando dímeros com vários adutos (Novotny, Capley e Stenson, 2014). A determinação dos adutos é essencial para o cálculo de fórmulas moleculares através do emprego do software SIRIUS (**Figura 24**).

**Figura 24** - Cluster Komar-1 contendo as features que foram anotadas com auxílio do software SIRIUS. Destaque para os íons de  $m/z$  369 e  $m/z$  383 que se formaram com adutos de potássio sem serem dimerizados. Os demais íons de  $m/z$  683,  $m/z$  699 e  $m/z$  695 se apresentam como multímeros que possivelmente foram formados na fonte de ionização ESI do espectrômetro de massas. As demais *features* se apresentam como multímeros de difícil identificação e análise



Não foi encontrada correspondência dessas fórmulas moleculares em bases de dados de acesso aberto. Portanto podemos supor que a linhagem *Komarekiella atlantica* CCIBt3307 produz compostos potencialmente inéditos. Os demais *clusters* únicos Komar-2 e Komar-3 formados a partir de *features* detectadas somente nos extratos e frações da *Komarekiella atlantica* CCIBt3307 serão futuramente analisados e anotados durante o processo de desreplicação. Esse processo associado ao resultado de novas rodadas do bioensaio anti-*Leishmania* serão essenciais para o devido estudo dessa linhagem. A futura determinação de qual(is) o(s) composto(s) são responsáveis pela bioatividade acarretará análises de isolamento e elucidação estrutural dessas respectivas substâncias.

## 5 – Conclusão

Até o presente momento, conseguimos demonstrar que as cianobactérias brasileiras apresentam ineditismo químico e grande variedade de metabólitos. Não foi anotada pela base de dados do GNPS nenhum composto bioativo já conhecido, assim como cianotoxinas clássicas. Foram anotadas automaticamente apenas moléculas oriundas do metabolismo primário, o que justifica termos realizado esse trabalho de desreplicação, e nos faz continuar a explorar a busca por novos PNs.

Além disso, foi possível mostrar que combinar análises metabolômicas com os resultados dos bioensaios é uma abordagem eficaz para priorização de amostras. O pré-fracionamento beneficiou o processo de desreplicação, uma vez que *features* pontuadas como promissoras pela ferramenta DAFdiscovery foram detectadas somente nas frações. Conseguimos elencar quatro linhagens dentre as nove analisadas através da atividade biológica de suas frações e do ineditismo químico observado.

A linhagem CCIBt3214 foi priorizada através da bioatividade de seu extrato e fração F4 no ensaio contra *Artemia salina* e ineditismo químico. A linhagem CCIBt3329 foi priorizada devido à atividade antiproliferativa de suas frações F4, F5 e F6 contra células de melanoma humano. A linhagem CCIBt3307 foi priorizada devido à atividade *in vitro* de seu extrato e frações contra *Leishmania (L.) amazonensis*. A linhagem CCIBt3551 foi priorizada tendo em vista o ineditismo químico ímpar revelado pelo processo de pré-fracionamento, análise por redes moleculares e desreplicação.

As demais linhagens que tiveram as frações bioativas serão encaminhadas para outros estudos do nosso grupo de pesquisa. Novos testes de bioatividade poderão levar à priorização de outras linhagens.

Conforme propusemos neste projeto, foi possível catalisar o processo de prospecção química (quimioprospecção) de cianobactérias brasileiras através do pré-fracionamento para o desenvolvimento de biblioteca química para organizar a realização de ensaios de atividade biológica e técnicas de metabolômica para a desreplicação e identificação de compostos bioativos inéditos.

## 6 – Referências

- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213–1221, 2016.
- ADIV, S.; CARMELI, S. Protease inhibitors from microcystis aeruginosa bloom material collected from the dalton reservoir, israel. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 12, p. 2307–2315, 2013.
- AGTHOVEN, M. A. VAN *et al.* Two-dimensional mass spectrometry: new perspectives for tandem mass spectrometry. **European Biophysics Journal**, v. 48, n. 3, p. 213–229, 2019.
- AL-AWADHI, F. H.; LAW, B. K.; *et al.* Grassystatins D-F, Potent Aspartic Protease Inhibitors from Marine Cyanobacteria as Potential Antimetastatic Agents Targeting Invasive Breast Cancer. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 11, p. 2969–2986, 2017.
- AL-AWADHI, F. H.; SALVADOR, L. A.; *et al.* Kempopeptin C, a novel marine-derived serine protease inhibitor targeting invasive breast cancer. **Marine Drugs**, v. 15, n. 9, p. 1–17, 2017.
- ALEXANDER FLEMING. ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B. INFLUENZAE. **The British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, n. 3, p. 226–236, 1929.
- ALKEN, S.; KELLY, C. M. Benefit risk assessment and update on the use of docetaxel in the management of breast cancer. **Cancer Management and Research**, v. 5, n. 1, p. 357–365, 2013.
- ALLARD, P. M. *et al.* Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3317–3323, 15 mar. 2016.
- ALMALITI, J. *et al.* Dudawalamides A–D, Antiparasitic Cyclic Depsipeptides from the Marine Cyanobacterium *Moorea producens*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 6, p. 1827–1836, jun. 2017.
- ALVARENGA, D. O. *et al.* Evaluating Eucalyptus leaf colonization by *Brasilonema octagenarum* (Cyanobacteria, Scytonemataceae) using in planta experiments and genomics. **PeerJ**, v. 8, n. 5, p. e9158, 27 maio 2020.

ARON, A. T. *et al.* Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, v. 15, n. 6, p. 1954–1991, 2020.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; MIRANDA, R. U. Biotechnological production and applications of statins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 869–883, 2010.

BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. Cell death in Leishmania . **Parasite**, v. 26, p. 71, 2019.

BAUERSACHS, T. *et al.* Distribution of heterocyst glycolipids in cyanobacteria. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17–18, p. 2034–2039, 2009.

BAUERSACHS, T.; GUGGER, M.; SCHWARK, L. Heterocyte glycolipid diketones: A novel type of biomarker in the N<sub>2</sub>-fixing heterocytous cyanobacterium *Microchaete* sp. **Organic Geochemistry**, v. 141, 2020.

BISSON, J. *et al.* Can Invalid Bioactives Undermine Natural Product-Based Drug Discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1671–1690, 2016.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology - Vol 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria**. [s.l: s.n.].

BORGES, R. M. *et al.* Data fusion discovery (DAFdiscovery) pipeline to aid compound annotation and bioactive compound discovery across diverse spectral data. 2022.

\_\_\_\_. Data Fusion-based Discovery (DAFdiscovery) pipeline to aid compound annotation and bioactive compound discovery across diverse spectral data. **Phytochemical Analysis**, v. 34, n. 1, p. 48–55, 3 jan. 2023.

BORTOLI, S.; PINTO, E. Cianotoxinas: Características Gerais, Histórico, Legislação E Métodos De Análises. **Ecologia de reservatórios e interfaces**, p. 163–164, 2015.

BRKLJAČA, R.; GÖKER, E. S.; URBAN, S. Dereplication and chemotaxonomical studies of marine algae of the Ochrophyta and Rhodophyta phyla. **Marine Drugs**, v. 13, n. 5, p. 2714–2731, 2015.

- BRUMLEY, D. *et al.* Isolation and Characterization of Anaephenes A-C, Alkylphenols from a Filamentous Cyanobacterium (*Hormoscilla* sp., Oscillatoriales). **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 12, p. 2716–2721, 2018.
- BUEDENBENDER, L.; ASTONE, F. A.; TASDEMIR, D. Bioactive Molecular Networking for Mapping the Antimicrobial Constituents of the Baltic Brown Alga *Fucus vesiculosus*. **Marine Drugs**, v. 18, n. 6, 2020.
- 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.
- CASSIER-CHAUVAT, C.; DIVE, V.; CHAUVAT, F. Cyanobacteria: photosynthetic factories combining biodiversity, radiation resistance, and genetics to facilitate drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 4, p. 1359–1364, 2017.
- CHEN, K. *et al.* Development of an accurate and high-throughput methodology for structural comprehension of chlorophylls derivatives. (II) Dephytylated derivatives. **Journal of Chromatography A**, v. 1412, p. 90–99, 2015.
- CHEN, Y.; KIRCHMAIR, J. Cheminformatics in Natural Product-based Drug Discovery. **Molecular Informatics**, v. 39, n. 12, p. 1–16, 2020.
- CHILCZUK, T. *et al.* Hapalindoles from the Cyanobacterium *Hapalosiphon* spp. inhibit T Cell Proliferation. **Planta Medica**, v. 86, n. 2, p. 96–103, 2020.
- CHLIPALA, G. E.; MO, S.; ORJALA, J. Chemodiversity in Freshwater and Terrestrial Cyanobacteria - A Source for Drug Discovery. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 11, p. 1654–1673, 2011.
- CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 9, p. 4660–4702, 2021.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N. Leishmania Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, but Is There an End? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. September, p. 1–14, 2019.
- COSTA, M. *et al.* Structure of hierridin c, synthesis of hierridins b and c, and evidence for prevalent alkylresorcinol biosynthesis in picocyanobacteria. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 2, p. 393–402, 2019.

CRNKOVIC, C. M. *et al.* Calothrixamides A and B from the Cultured Cyanobacterium *Calothrix* sp. UIC 10520. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 9, p. 2083–2090, 2018.

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

DAMAZIO, C. Cianobactérias em esteiras microbianas coliformes da lagoa Pitanguinha, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Paleontologia**, v. 9, n. 1, p. 165–170, 2006.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, 1986.

DIAS, T.; GAUDÊNCIO, S. P.; PEREIRA, F. A computer-driven approach to discover natural product leads for methicillin-resistant staphylococcus aureus infection therapy †. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, 2019.

DIXIT, R. B.; SUSEELA, M. R. Cyanobacteria: Potential candidates for drug discovery. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 947–961, 2013.

DOGO, C. R. *et al.* Inflammatory effects of the toxic cyanobacterium *Geitlerinema amphibium*. **Toxicon**, v. 58, n. 6–7, p. 464–470, 2011.

DÜHRKOP, K. *et al.* SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. **Nature Methods**, v. 16, n. 4, p. 299–302, 18 abr. 2019.

ERB, M.; KLIEBENSTEIN, D. J. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy<sup>1</sup>[OPEN]. **Plant Physiology**, v. 184, n. 1, p. 39–52, 2020.

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

FEWER, D. P. *et al.* New Structural Variants of Aeruginosin Produced by the Toxic Bloom Forming Cyanobacterium *Nodularia spumigena*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–10, 2013.



- FIDOR, A. *et al.* Nostoc edaphicum CCNP1411 from the Baltic Sea—A new producer of nostocyclopeptides. **Marine Drugs**, v. 18, n. 9, 2020.
- FIDOR, A.; KONKEL, R.; MAZUR-MARZEC, H. Bioactive peptides produced by cyanobacteria of the genus nostoc: A review. **Marine Drugs**, v. 17, n. 10, p. 1–16, 2019.
- GALLEGOS, D. A. *et al.* Jizanpeptins, Cyanobacterial Protease Inhibitors from a *Symploca* sp. Cyanobacterium Collected in the Red Sea. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 6, p. 1417–1425, 2018.
- GAO, Y. L. *et al.* Molecular networking as a dereplication strategy for monitoring metabolites of natural product treated cancer cells. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, n. S1, p. 0–3, 2020.
- GAUDÊNCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: Racing to speed up the natural products discovery process. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 6, p. 779–810, 2015.
- GORDON, R. Skin cancer: An overview of epidemiology and risk factors. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 29, n. 3, p. 160–169, 2013.
- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.
- GUNASEKERA, S. P. *et al.* Molassamide, a depsipeptide serine protease inhibitor from the marine cyanobacterium *Dichothrix utahensis*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 3, p. 459–462, 2010.
- HE, X. *et al.* Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment. **Harmful Algae**, v. 54, p. 174–193, 2016.
- HENTSCHKE, G. S. *et al.* *Komarekiella atlantica* gen. Et sp. nov. (nostocaceae, cyanobacteria): A new subaerial taxon from the Atlantic rainforest and Kauai, Hawaii. **Fottea**, v. 17, n. 2, p. 178–190, 2017.
- HU, G.; QIU, M. Machine learning-assisted structure annotation of natural products based on MS and NMR data. **Natural Product Reports**, v. 352, n. 9121, p. 21–26, 2023.
- HUANG, I. S.; ZIMBA, P. V. Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology. **Harmful Algae**, v. 83, n. February, p. 42–94, 2019.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J. M.; RENAULT, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 1, p. 55–95, 2017.

IWASAKI, A.; TADENUMA, T.; *et al.* Biseokeaniamides A, B, and C, Sterol O-Acyltransferase Inhibitors from an Okeania sp. Marine Cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 4, p. 1161–1166, 2017.

IWASAKI, A.; SHIOTA, I.; *et al.* Kohamamides A, B, and C, Cyclic Depsipeptides from an Okeania sp. Marine Cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 6, p. 1948–1952, 2017.

IWASAKI, A. *et al.* Hoshinoamides A and B, Acyclic Lipopeptides from the Marine Cyanobacterium *Caldora penicillata*. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 11, p. 2545–2552, 2018.

JACINAVICIUS, F. R. *et al.* Manual para cultivo de cianobactérias. **Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo Instituto de Botânica**, v. 1, p. 32, 2013.

\_\_\_\_. Effect of ultraviolet radiation on the metabolomic profiles of potentially toxic cyanobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 1, p. 1–16, 2021.

JAIN, S. *et al.* Cyanobacteria as efficient producers of mycosporine-like amino acids. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 715–727, 2017.

JIANG, W. *et al.* A New Lyngbyatoxin from the Hawaiian Cyanobacterium *Moorea producens*. **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2748–2759, maio 2014.

JONES, M. R. *et al.* CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. **Water Research**, v. 196, p. 117017, 2021.

KANAMORI, Y. *et al.* Izenamides A and B, Statine-Containing Depsipeptides, and an Analogue from a Marine Cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 7, p. 1673–1681, 2018.

KANG, H. S. *et al.* Merocyclophanes A and B, antiproliferative cyclophanes from the cultured terrestrial Cyanobacterium *Nostoc* sp. **Phytochemistry**, v. 79, p. 109–115, 2012.

KANG, H. S.; KRUNIC, A.; ORJALA, J. Sanctolide A, a 14-membered PK-NRP hybrid macrolide from the cultured cyanobacterium *Oscillatoria sancta* (SAG 74.79). **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 28, p. 3563–3567, 2012a.

- \_\_\_\_. Stigonemapeptin, an Ahp-containing depsipeptide with elastase inhibitory activity from the bloom-forming freshwater cyanobacterium *Stigonema* sp. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 807–811, 2012b.
- KHOR, G. H. *et al.* **A Review on Di Methyl Thiazoldiphenyl-Tetrazoliumbromide (MTT) Assay in Cell Viability Research Journal of Applied Sciences**, 2017.
- KIND, T.; FIEHN, O. Strategies for dereplication of natural compounds using high-resolution tandem mass spectrometry. **Phytochemistry Letters**, v. 21, p. 313–319, 2017.
- KINNEL, R. B. *et al.* A Maldiisotopic Approach to Discover Natural Products: Cryptomaldamide, a Hybrid Tripeptide from the Marine Cyanobacterium *Moorea producens*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 5, p. 1514–1521, 2017.
- KOMÁREK, J. *et al.* Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, n. 4, p. 295–335, 2014.
- \_\_\_\_. Quo vadis, taxonomy of cyanobacteria (2019). **Fottea**, v. 20, n. 1, p. 104–110, 2020.
- KUST, A. *et al.* Discovery of a Pederin Family Compound in a Nonsymbiotic Bloom-Forming Cyanobacterium. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 5, p. 1123–1129, 2018.
- LEVERT, A. *et al.* Structures and Activities of Tiahuramides A-C, Cyclic Depsipeptides from a Tahitian Collection of the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 6, p. 1301–1310, 2018.
- LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: End of era or an endless frontier? **Biomeditsinskaya Khimiya**, v. 57, n. 2, p. 148–160, 2011.
- LIU, Y.; PETERSON, D. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of ...**, v. 69, n. 2, p. 581–93, 1997.
- LODIN-FRIEDMAN, A.; CARMELI, S. Metabolites from microcystis aeruginosa bloom material collected at a water reservoir near Kibbutz Hafetz Haim, Israel. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1196–1200, 2013.
- LUESCH, H. *et al.* Isolation of Dolastatin 10 from the Marine Cyanobacterium *Symploca* Species VP642 and Total Stereochemistry and Biological Evaluation

of Its Analogue Symplostatin 1. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 7, p. 907–910, 1 jul. 2001.

MAEDA, H. A. Evolutionary diversification of primary metabolism and its contribution to plant chemical diversity. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. July, p. 1–8, 2019.

MAHER, S.; JJUNJU, F. P. M.; TAYLOR, S. Colloquium: 100 years of mass spectrometry: Perspectives and future trends. **Reviews of Modern Physics**, v. 87, n. 1, p. 113–135, 2015.

MAY, D. S. *et al.* Merocyclophanes C and D from the Cultured Freshwater Cyanobacterium *Nostoc* sp. (UIC 10110). **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 4, p. 1073–1080, abr. 2017.

\_\_\_\_. Ribocyclophanes A-E, Glycosylated Cyclophanes with Antiproliferative Activity from Two Cultured Terrestrial Cyanobacteria. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 3, p. 572–578, 2018.

MAZARD, S. *et al.* Tiny microbes with a big impact: The role of cyanobacteria and their metabolites in shaping our future. **Marine Drugs**, v. 14, n. 5, 1 maio 2016.

MCCLOUD, T. G. High throughput extraction of plant, marine and fungal specimens for preservation of biologically active molecules. **Molecules**, v. 15, n. 7, p. 4526–4563, 2010.

MENDONÇA, D. B. D. *et al.* Nitro-Heterocyclic compounds induce apoptosis-like effects in *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 25, p. 1–9, 2019.

METCALF, J. S. *et al.* Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1115–1120, ago. 2002.

MOHIMANI, H. *et al.* Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2018.

MOREIRA, C.; VASCONCELOS, V.; ANTUNES, A. Phylogeny and biogeography of cyanobacteria and their produced toxins. **Marine Drugs**, v. 11, n. 11, p. 4350–4369, 2013.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.
- NAMAN, C. B.; ALMALITI, J.; *et al.* Discovery and Synthesis of Caracolamide A, an Ion Channel Modulating Dichlorovinylidene Containing Phenethylamide from a Panamanian Marine Cyanobacterium cf. *Symploca* Species. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 8, p. 2328–2334, 2017.
- NAMAN, C. B.; RATTAN, R.; *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, mar. 2017.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.
- NIEDERMEYER, T. H. ORST J. Anti-infective Natural Products from Cyanobacteria. **Planta medica**, v. 81, n. 15, p. 1309–1325, 2015.
- NIELSEN, M. C.; JIANG, S. C. Can cyanotoxins penetrate human skin during water recreation to cause negative health effects? **Harmful Algae**, v. 98, 1 set. 2020.
- NOVOTNY, N. R.; CAPLEY, E. N.; STENSON, A. C. Fact or artifact: The representativeness of ESI-MS for complex natural organic mixtures. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 4, p. 316–326, 2014.
- OLIVON, F. *et al.* MZmine 2 Data-Preprocessing to Enhance Molecular Networking Reliability. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 15, p. 7836–7840, 1 ago. 2017.
- ORDÓÑEZ-ROBLES, M.; SANTOS-BENEIT, F.; MARTÍN, J. F. Unraveling nutritional regulation of tacrolimus biosynthesis in *Streptomyces tsukubaensis* through omic approaches. **Antibiotics**, v. 7, n. 2, p. 1–19, 2018.
- OZAKI, K. *et al.* Isolation and Total Synthesis of Mabuniamide, a Lipopeptide from an *Okeania* sp. Marine Cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 10, p. 2907–2915, 2019.

PETITBOIS, J. G. *et al.* Serinolamides and Lyngbyabellins from an *Okeania* sp. Cyanobacterium Collected from the Red Sea. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 10, p. 2708–2715, 2017.

PHYO, M. Y. *et al.* Trikoramide A, a Prenylated Cyanobactin from the Marine Cyanobacterium *Symploca hydroides*. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 12, p. 3482–3488, 27 dez. 2019.

PILON, A. C. *et al.* NuBBEDB: An updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

PORTO, V. B. G. *et al.* Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* associated with Hodgkin's lymphoma. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 10, p. 788–789, 2022.

PYE, C. R. *et al.* Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 22, p. 5601–5606, 30 maio 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.

RAJA, R. *et al.* Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 394–405, 2016.

RAJABI, S. *et al.* *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 2015.

REHER, R. *et al.* Native metabolomics identifies the rivulariapeptolide family of protease inhibitors. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2022.

SAHA, S. *et al.* Discovery of Unusual Cyanobacterial Tryptophan-Containing Anabaenopeptins by MS/MS-Based Molecular Networking. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 17, 2020.

SANCHEZ, L. M. *et al.* Almiramides A-C: Discovery and development of a new class of leishmaniasis lead compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4187–4197, 2010.

SANTAMARIA, G. *et al.* Evolution and regulation of microbial secondary metabolism. **eLife**, v. 11, p. 1–27, 2022.

- SANT'ANNA, C. L. *et al.* Lista de Cyanobacteria do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 11, n. suppl 1, p. 455–495, 2011.
- SANT'ANNA, C. L. A. *et al.* Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, v. 126, n. April, p. 251–265, 2008.
- SANTEN, J. A. VAN *et al.* The Natural Products Atlas: An Open Access Knowledge Base for Microbial Natural Products Discovery. **ACS Central Science**, v. 5, n. 11, p. 1824–1833, 2019.
- SANZ, M.; SALINAS, R. K.; PINTO, E. Namalides B and C and Spumigins K-N from the Cultured Freshwater Cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 9, p. 2492–2501, 2017.
- SAYED, A. M. *et al.* Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 630–657, 2020.
- SCHOPF, J. W. Fossil evidence of Archaean life. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1470, p. 869–885, jun. 2006.
- SCHORN, M. A. *et al.* A community resource for paired genomic and metabolomic data mining. **Nature Chemical Biology**, v. 17, n. 4, p. 363–368, 2021.
- SCHOUTEN, S. *et al.* Endosymbiotic heterocystous cyanobacteria synthesize different heterocyst glycolipids than free-living heterocystous cyanobacteria. **Phytochemistry**, v. 85, p. 115–121, 2013.
- SENDER, P. D.; SIEVERS, E. L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 631–637, 2012.
- SHAO, C. L. *et al.* Bastimolide B, an Antimalarial 24-Membered Marine Macrolide Possessing a tert-Butyl Group. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 1, p. 211–215, 2018.
- STEINBECK, C.; KUHN, S. NMRShiftDB - Compound identification and structure elucidation support through a free community-built web database. **Phytochemistry**, v. 65, n. 19, p. 2711–2717, out. 2004.
- STEWART, A. K. *et al.* Metabolomics-Guided Discovery of Microginin Peptides from Cultures of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 2, p. 349–355, 2018.

STRUNECKÝ, O. *et al.* A revision of the genus *Geitlerinema* and a description of the genus *Anagnostidinema* gen. nov. (Oscillatoriophyceae, Cyanobacteria). **Fottea**, v. 17, n. 1, p. 114–126, 2017.

SUEYOSHI, K. *et al.* Ypaoamides B and C, Linear Lipopeptides from an *Okeania* sp. Marine Cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 4, p. 1103–1107, 2018.

SUMNER, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, 2007.

TAORI, K.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Kempopeptins A and B, serine protease inhibitors with different selectivity profiles from a marine cyanobacterium, *Lyngbya* sp. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1625–1629, 2008.

TAWFIKE, A. F.; VIEGELMANN, C.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomics and dereplication strategies in natural products. **Methods in Molecular Biology**, v. 1055, p. 227–244, 2013.

VACCARINO, M. A.; JOHANSEN, J. R. *Brasilonema angustatum* sp. nov. (nostocales), a new filamentous cyanobacterial species from the hawaiian islands. **Journal of Phycology**, v. 48, n. 5, p. 1178–1186, 2012.

VETTER, I. *et al.* Venomics: A new paradigm for natural products-based drug discovery. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 15–28, 2011.

VISHNIVETSKAYA, T. A. Viable Cyanobacteria and Green Algae from the Permafrost Darkness. p. 73–84, 2009.

WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

WIBOWO, M. *et al.* Using UHPLC-MS profiling for the discovery of new dihydro- $\beta$ -agarofurans from Australian Celastraceae plant extracts. **Molecules**, v. 24, n. 5, 2019.

WILSON, B. A. P. *et al.* **Creating and screening natural product libraries** **Natural Product Reports** Royal Society of Chemistry, , 1 jul. 2020.

YANG, J. Y. *et al.* Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686–1699, 27 set. 2013.



YU, H. B. *et al.* Cytotoxic Microcolin Lipopeptides from the Marine Cyanobacterium *Moorea producens*. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 9, p. 2608–2619, 2019.

ZAINUDDIN, E. N. *et al.* Lyngbyazothrins A-D, antimicrobial cyclic undecapeptides from the cultured cyanobacterium *Lyngbya* sp. (Journal of Natural Products (2009) 72, (1373)). **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 2080, 2009.

ZAKI, S. *et al.* Discovery of microcystin-producing *Anagnostidinema pseudacutissimum* from cryopreserved Antarctic cyanobacterial mats. **Harmful Algae**, v. 93, n. March, p. 101800, 2020.

ZUBYK, H. L.; COX, G.; WRIGHT, G. D. Antibiotic dereplication using the antibiotic resistance platform. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2019, n. 152, 1 out. 2019.



## 7. APÊNDICE

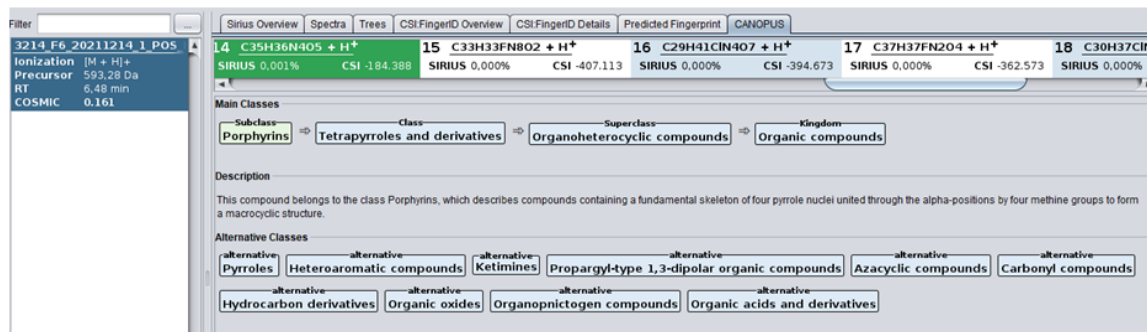
**AP. 1** - Link de acesso para a rede molecular construída pela ferramenta *Molecular Networking* na plataforma do GNPS: (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=235afd8987f94189be273e46ecc0376e>).

**AP. 2** – Local de coleta das linhagens de cianobactérias analisadas neste estudo.

<b>Código</b>	<b>Gênero/espécie</b>	<b>Local de coleta</b>
CCIBt3320	<i>Calothrix</i> sp.	23°20'S, 45°09'W
CCIBt3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>	25°04'12"S, 47°55'27"W
CCIBt3265	<i>Desertifilum tharense</i>	18°59'00"S, 56°39'35"W
CCIBt3214	<i>Anagnostidinema amphibium</i>	23°47'S, 46°35'W
CCIBt3338	<i>Leptolyngbya</i> sp.	21°59'46"S, 47°25'33"W
CCIBt3496	<i>Myxosarcina</i> sp.	24°26'S, 47°04'W
CCIBt3307	<i>Komarekiella atlantica</i>	23°20'S, 45°09'W
CCIBt3329	<i>Nostoc</i> sp.	21°59'46"S, 47°25'33"W
CCIBt3275	<i>Desertifilum tharense</i>	18°59'00"S, 56°39'35"W

**AP. 3** - Resultados do SIRIUS/CANOPUS indicando a classe química da *feature* analisada.

**AP. 3.1** - *Feature* de  $m/z$  593,2780  $[M+H]^+$  apontando-a como uma porfirina.



Filter: 3214 F6\_20211214\_1\_POS

Ionization:  $[M+H]^+$   
Precursor: 593.28 Da  
RT: 6.48 min  
COSMIC: 0.161

Peak	Formula	SIRIUS	CSI
14	C <sub>35</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> + H <sup>+</sup>	0.001%	-184.388
15	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + H <sup>+</sup>	0.000%	-407.113
16	C <sub>29</sub> H <sub>41</sub> CIN <sub>4</sub> O <sub>7</sub> + H <sup>+</sup>	0.000%	-394.673
17	C <sub>37</sub> H <sub>37</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + H <sup>+</sup>	0.000%	-362.573
18	C <sub>30</sub> H <sub>37</sub> CIN	0.000%	

**Main Classes**

Subclass: Porphyryns → Class: Tetrapyrroles and derivatives → Superclass: Organoheterocyclic compounds → Kingdom: Organic compounds

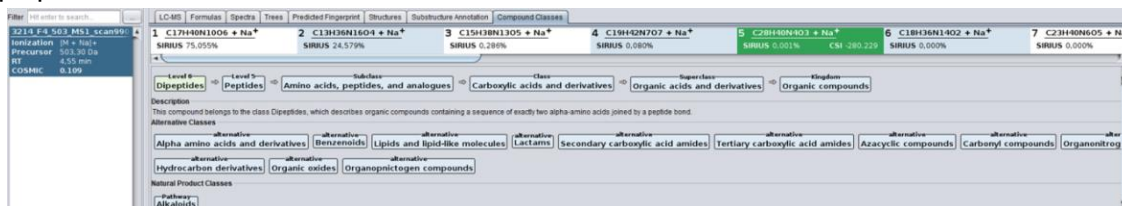
**Description**

This compound belongs to the class Porphyryns, which describes compounds containing a fundamental skeleton of four pyrrole nuclei united through the alpha-positions by four methine groups to form a macrocyclic structure.

**Alternative Classes**

Pyroles, Heteroaromatic compounds, Ketimines, Propargyl-type 1,3-dipolar organic compounds, Azacyclic compounds, Carbonyl compounds, Hydrocarbon derivatives, Organic oxides, Organopnictogen compounds, Organic acids and derivatives

**AP. 3.2** - *Feature* de  $m/z$  501,2833  $[M+Na]^+$  apontando-a como um depsi-peptídeo.



Filter: 3214 F6\_20211214\_1\_POS

Ionization:  $[M+Na]^+$   
Precursor: 503.30 Da  
RT: 6.55 min  
COSMIC: 0.169

Peak	Formula	SIRIUS	CSI
1	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub> + Na <sup>+</sup>	75.055%	
2	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>16</sub> O <sub>4</sub> + Na <sup>+</sup>	24.579%	
3	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>11</sub> O <sub>5</sub> + Na <sup>+</sup>	0.289%	
4	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> + Na <sup>+</sup>	0.089%	
5	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> MnO <sub>3</sub> + Na <sup>+</sup>	0.001%	-280.220
6	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>11</sub> O <sub>2</sub> + Na <sup>+</sup>	0.009%	
7	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> + Na <sup>+</sup>	0.000%	

**Level 6**

Dipeptides → Peptides → Amino acids, peptides, and analogues → Carboxylic acids and derivatives → Organic acids and derivatives → Organic compounds

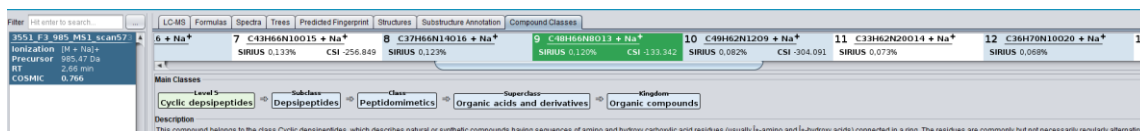
**Description**

This compound belongs to the class Dipeptides, which describes organic compounds containing a sequence of exactly two alpha-amino acids joined by a peptide bond.

**Alternative Classes**

Alpha amino acids and derivatives, Benzeneoids, Lipids and lipid-like molecules, Lactams, Secondary carboxylic acid amides, Tertiary carboxylic acid amides, Azacyclic compounds, Carbonyl compounds, Organonitrogens, Hydrocarbon derivatives, Organic oxides, Organopnictogen compounds

**AP. 3.3** - *Feature* de  $m/z$  985,4664  $[M+Na]^+$  apontando-a como um peptídeo cíclico.



Filter: 3214 F6\_20211214\_1\_POS

Ionization:  $[M+Na]^+$   
Precursor: 985.47 Da  
RT: 2.56 min  
COSMIC: 0.766

Peak	Formula	SIRIUS	CSI
6	Na <sup>+</sup>		
7	C <sub>31</sub> H <sub>56</sub> N <sub>10</sub> O <sub>15</sub> + Na <sup>+</sup>	0.133%	-256.849
8	C <sub>37</sub> H <sub>66</sub> N <sub>11</sub> O <sub>16</sub> + Na <sup>+</sup>	0.123%	
9	C <sub>48</sub> H <sub>68</sub> MnO <sub>13</sub> + Na <sup>+</sup>	0.126%	-333.342
10	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>12</sub> O <sub>9</sub> + Na <sup>+</sup>	0.082%	
11	C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> N <sub>20</sub> O <sub>14</sub> + Na <sup>+</sup>	0.073%	-304.091
12	C <sub>38</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>20</sub> + Na <sup>+</sup>	0.058%	
13	SH		

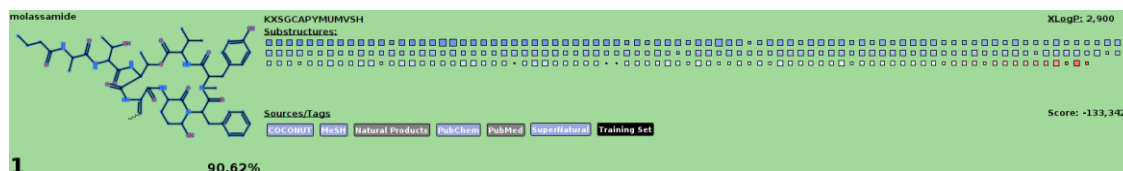
**Level 5**

Cyclic depsi-peptides → Depsi-peptides → Peptidomimetics → Organic acids and derivatives → Organic compounds

**Description**

This compound belongs to the class Cyclic depsi-peptides, which describes natural or synthetic compounds having sequences of amino and hydroxy carboxylic acid residues (usually L-amino and L-hydroxy acids) connected in a ring. The residues are commonly but not necessarily regularly alternating.

**AP. 3.4** - Predição de estrutura para a *feature* de  $m/z$  985,4664  $[M+Na]^+$  proveniente da linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551 indicando 90,62% de similaridade com o peptídeo molassamida. Destacadas em azul as subestruturas da molécula cuja similaridade é alta em relação à molassamida, e em vermelho as subestruturas pouco ou não similares segundo o perfil de fragmentação MS/MS.



**AP. 3.5** - *Feature* de  $m/z$  383,2150  $[M+K]^+$  apontando-a como um alcalóide.

Filter: 10 order by search  
3307\_F3\_383\_MS1\_scan75  
Ionization: ES+ MS2  
Precursor: 383.21 Da  
RT: 2.62 min  
COSMIC: 0.999

LC-MS Formulas Spectra Trees Predicted Fingerprint Structures Substructure Annotation Compound Classes

1	2	3	4	5	6
C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + K <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + K <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O + K <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> + K <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> + K <sup>+</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> + K <sup>+</sup>
SIRIUS 99.851%	SIRIUS 0.247%	CSI -124.838 SIRIUS 0.002%	SIRIUS 0.000%	SIRIUS 0.000%	SIRIUS 0.000%

Main Classes  
Level 6: Alpha amino acids and derivatives  
Level 5: Amino acids and derivatives  
Subclass: Amino acids, peptides, and analogues  
Class: Carboxylic acids and derivatives  
Superclass: Organic acids and derivatives  
Kingdom: Organic compounds

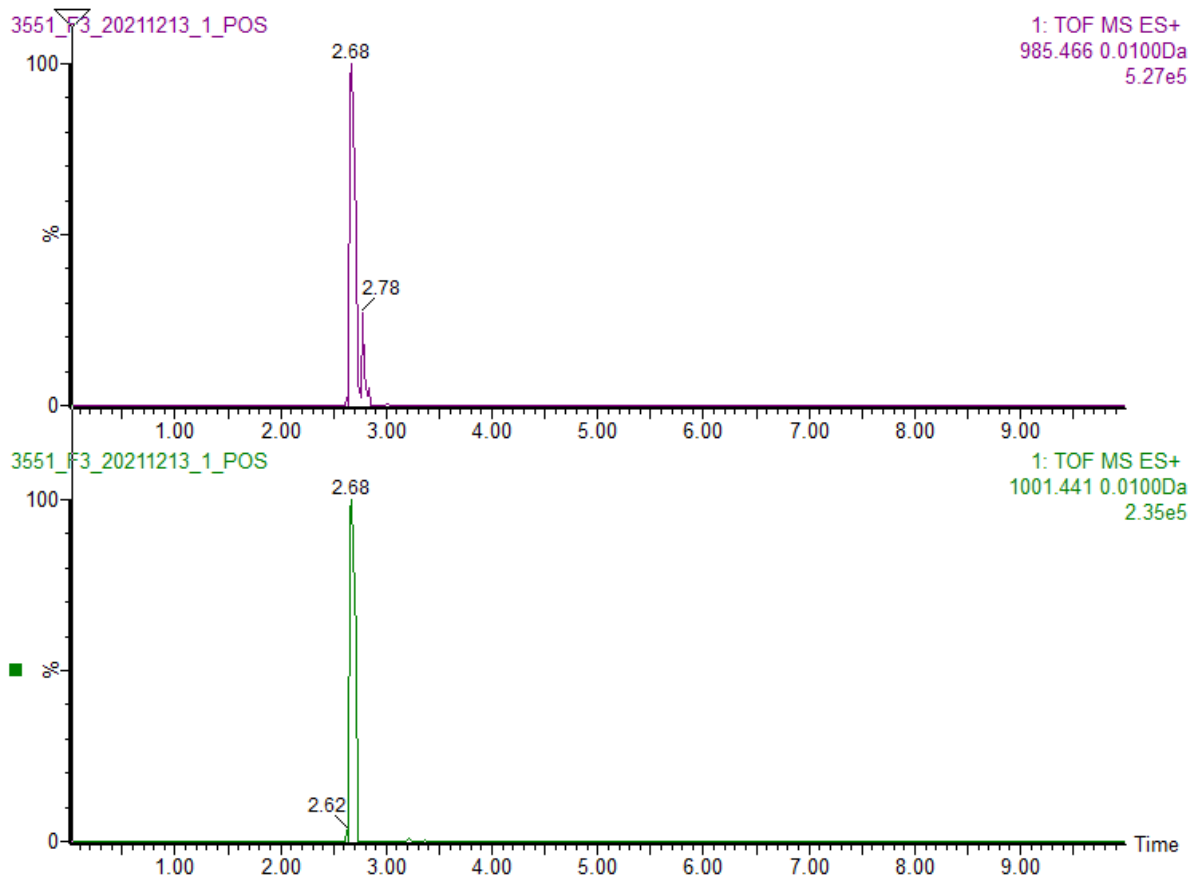
Description  
This compound belongs to the class Alpha amino acids and derivatives, which describes amino acids in which the amino group is attached to the carbon atom immediately adjacent to the carboxylate group (alpha carbon), or a derivative thereof.

Alternative Classes  
Heterocyclic fatty acids, Amino acids, Carboxylic acids, Organic 1,3-dipolar compounds, Azacyclic compounds, Carbonyl compounds, Monoalkylamines, Organic zwitterions, Hydrocarbon derivatives, Organic oxides

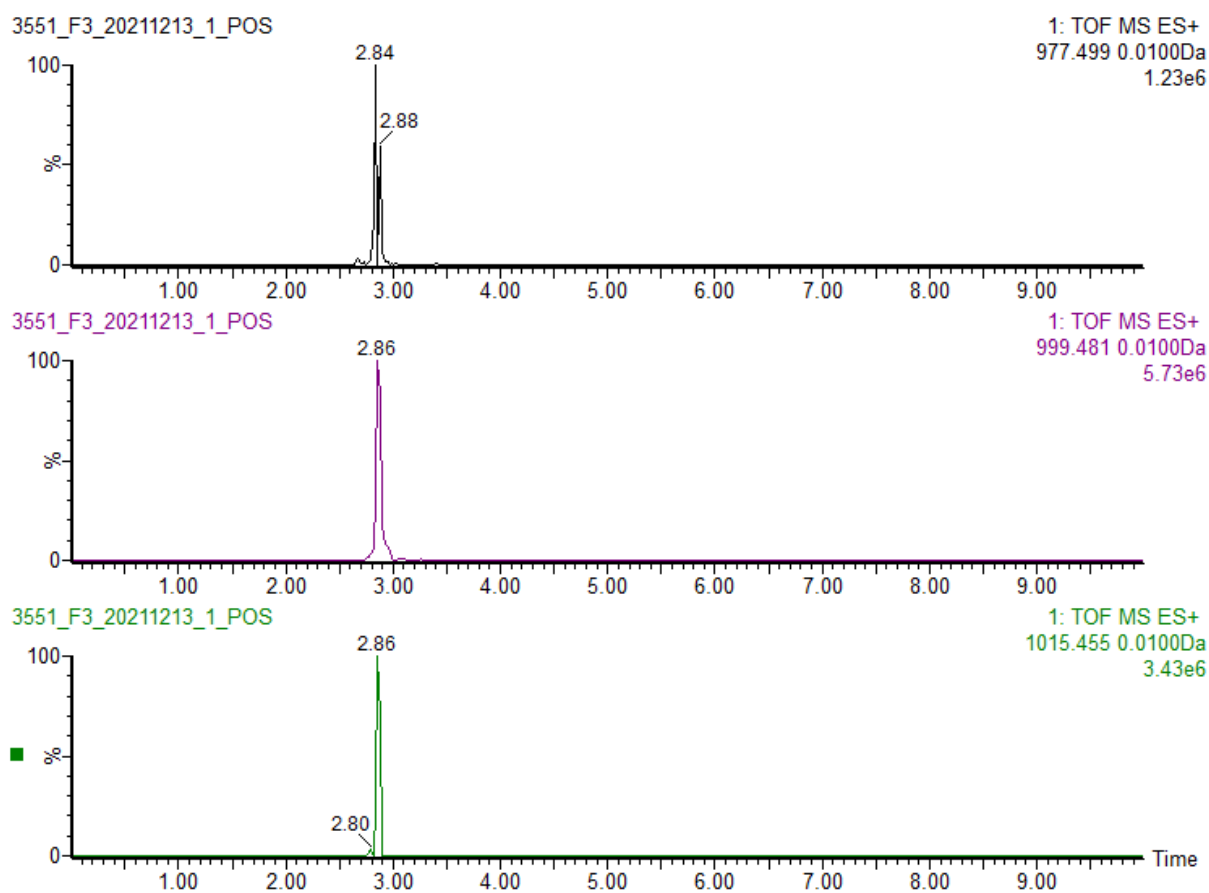
Natural Product Classes  
Alkaloids

**AP. 4 -Cromatogramas**

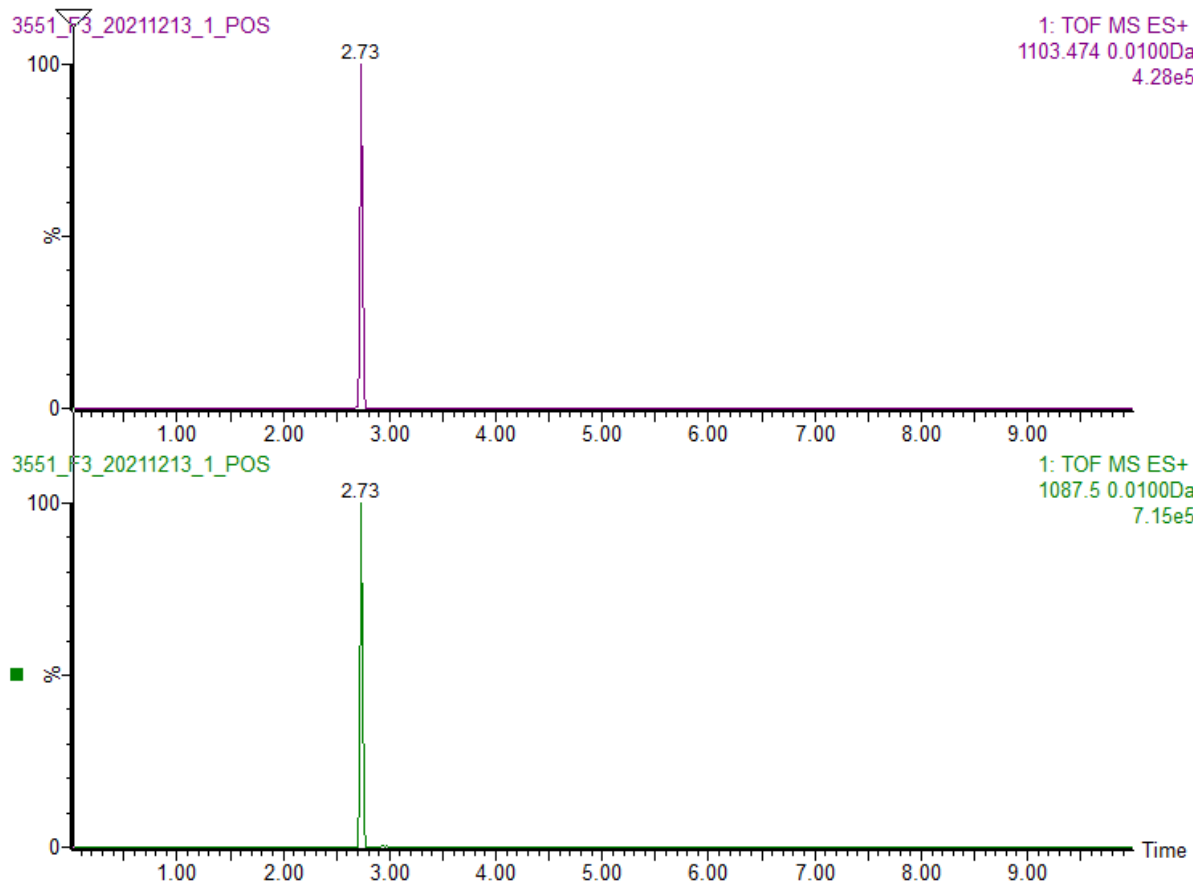
**AP. 4.1** -Cromatograma das *features* de  $m/z$  985,4664  $[M+Na]^+$  (acima) e do íon  $m/z$  1001,4407  $[M+K]^+$  (abaixo), ambos adutos referentes à possível molassamida detectada na fração F3 da linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551.



**AP. 4.2** -Cromatogramas das *features* de  $m/z$  977,4991  $[M+H]^+$  (acima),  $m/z$  999,4811  $[M+Na]^+$  (meio) e  $m/z$  1015,4553  $[M+K]^+$  (abaixo), adutos, referentes à possível análogo inédito da molassamida detectada na fração F3 da linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551.

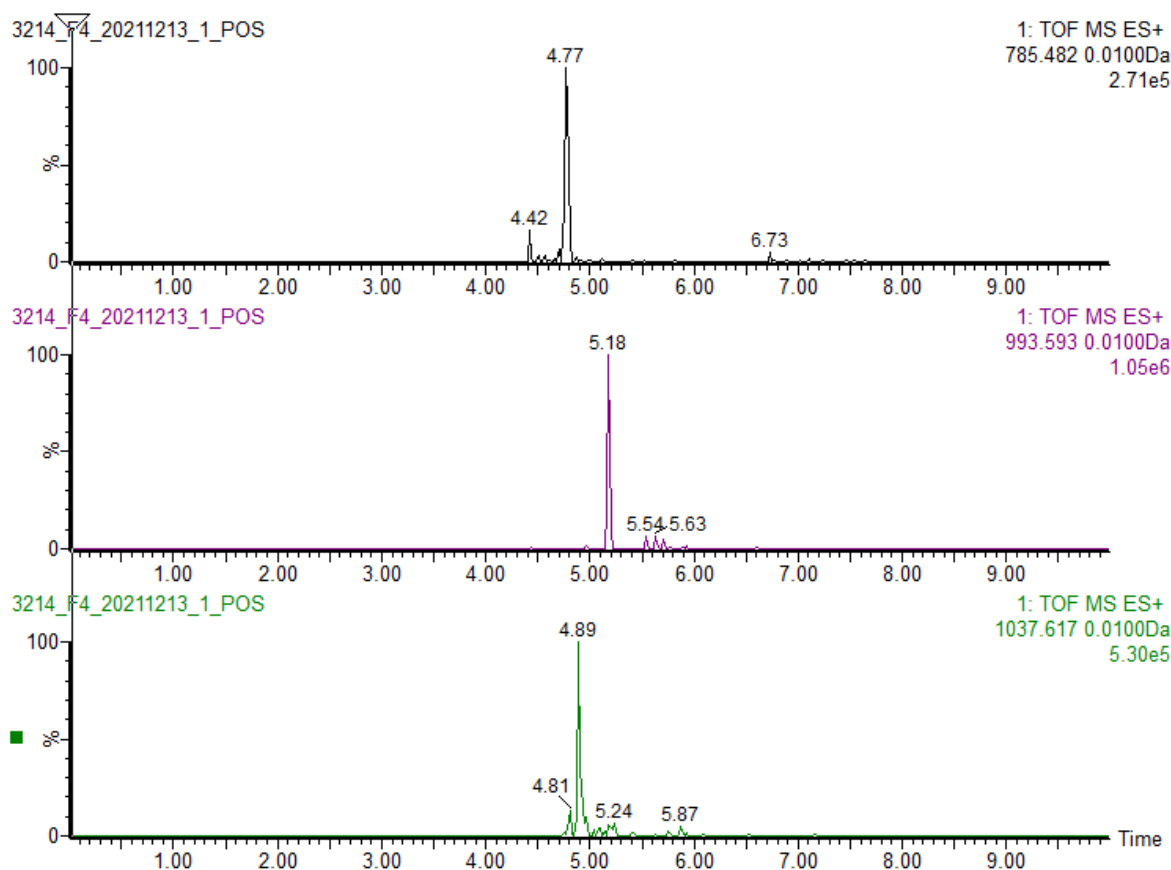


**AP. 4.3** -Cromatogramas das *features* de  $m/z$  1087,5001 [M+Na]<sup>+</sup> (abaixo) e  $m/z$  1103,4742 [M+K]<sup>+</sup> (acima), adutos referentes à possível análogo inédito da molassamida detectada na fração F3 da linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551.

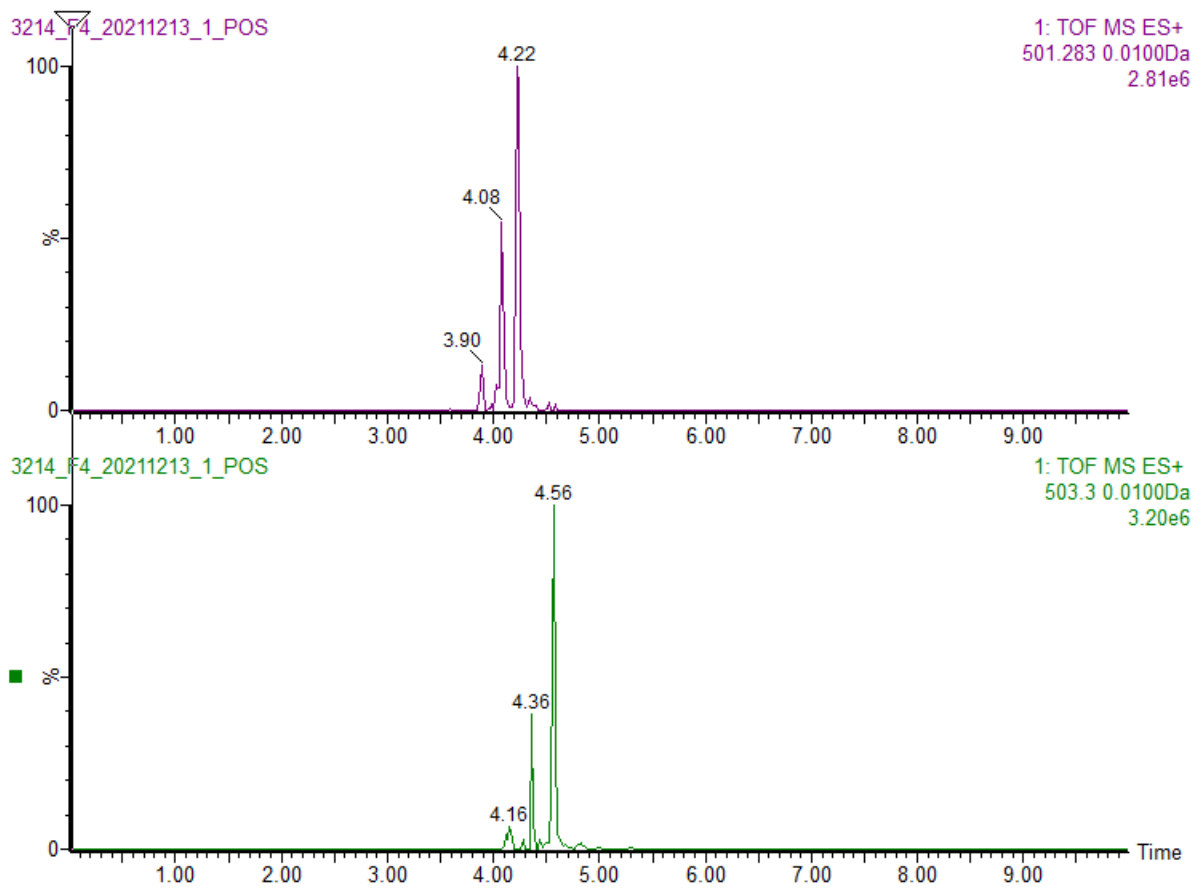




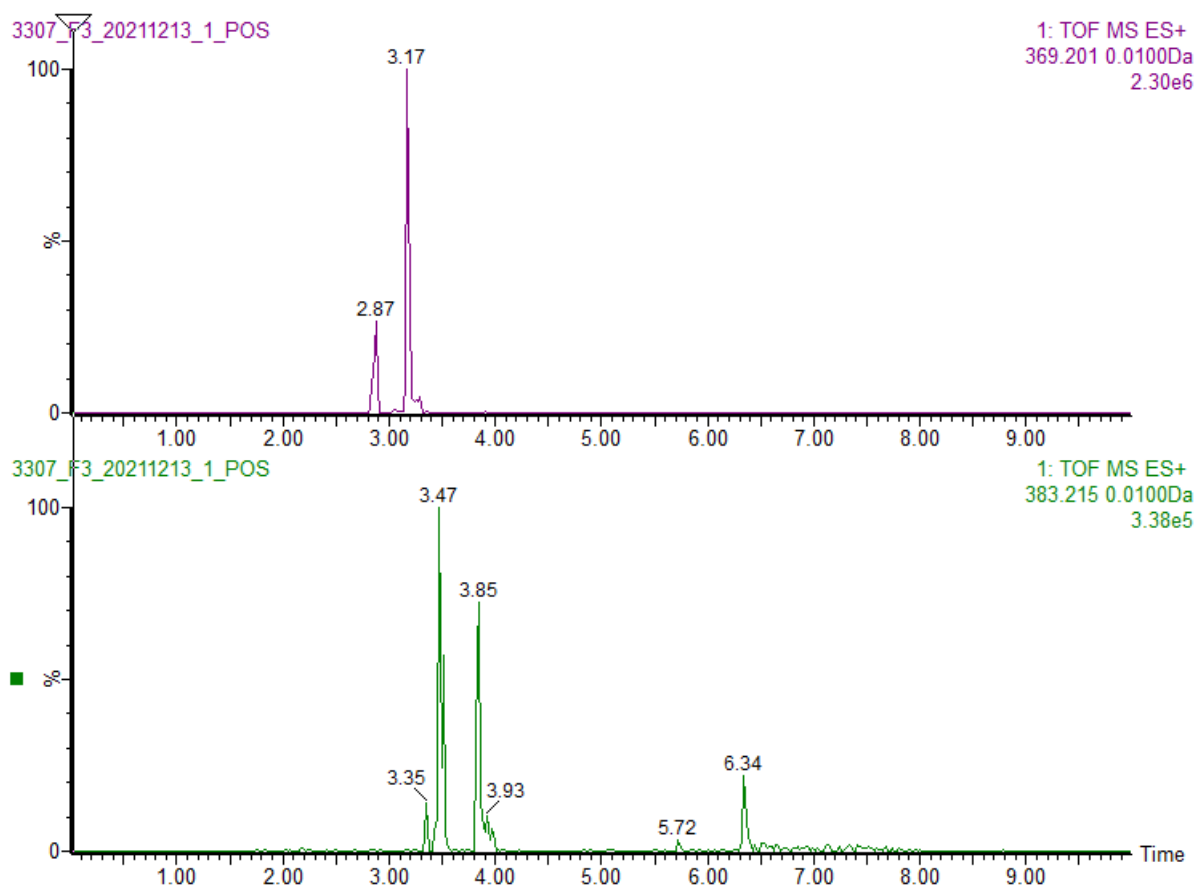
**AP. 4.4** - Cromatogramas das *features* de  $m/z$  785,4816  $[M+Na]^+$  (acima),  $m/z$  993,5931  $[M+Na]^+$  (meio), e  $m/z$  1037,6769  $[M+Na]^+$  (abaixo) presentes na fração F4 da linhagem *Anagnostidinium amphibium* CCIBt3214. referentes às *features* apontadas pela ferramenta DAFdiscovery como possíveis correlacionadas pela atividade de citotoxicidade aguda contra *Artemia salina*.



**AP. 4.5** -Cromatogramas das *features* de  $m/z$  501,2833  $[M+Na]^+$  (acima), e  $m/z$  503,2996  $[M+Na]^+$  (abaixo), presentes no extrato e fração F4 da linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 referentes às *features* apontadas pela ferramenta DAFdiscovery como possíveis correlacionadas pela atividade de citotoxicidade aguda contra *Artemia salina*.

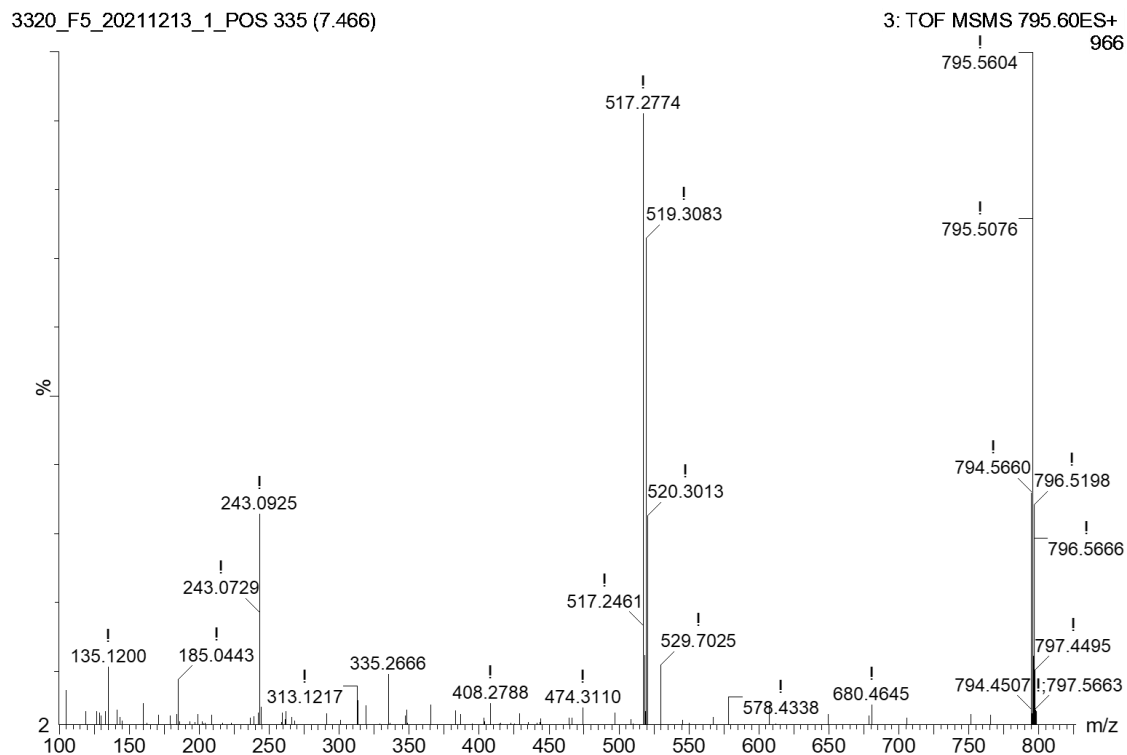


**AP. 4.6** - Cromatogramas das *features* de  $m/z$  369,2006  $[M+K]^+$  (acima), e  $m/z$  383,2150  $[M+K]^+$  (abaixo), detectadas no extrato e frações da linhagem *Komarekiella atlantica* CCIBt3307.



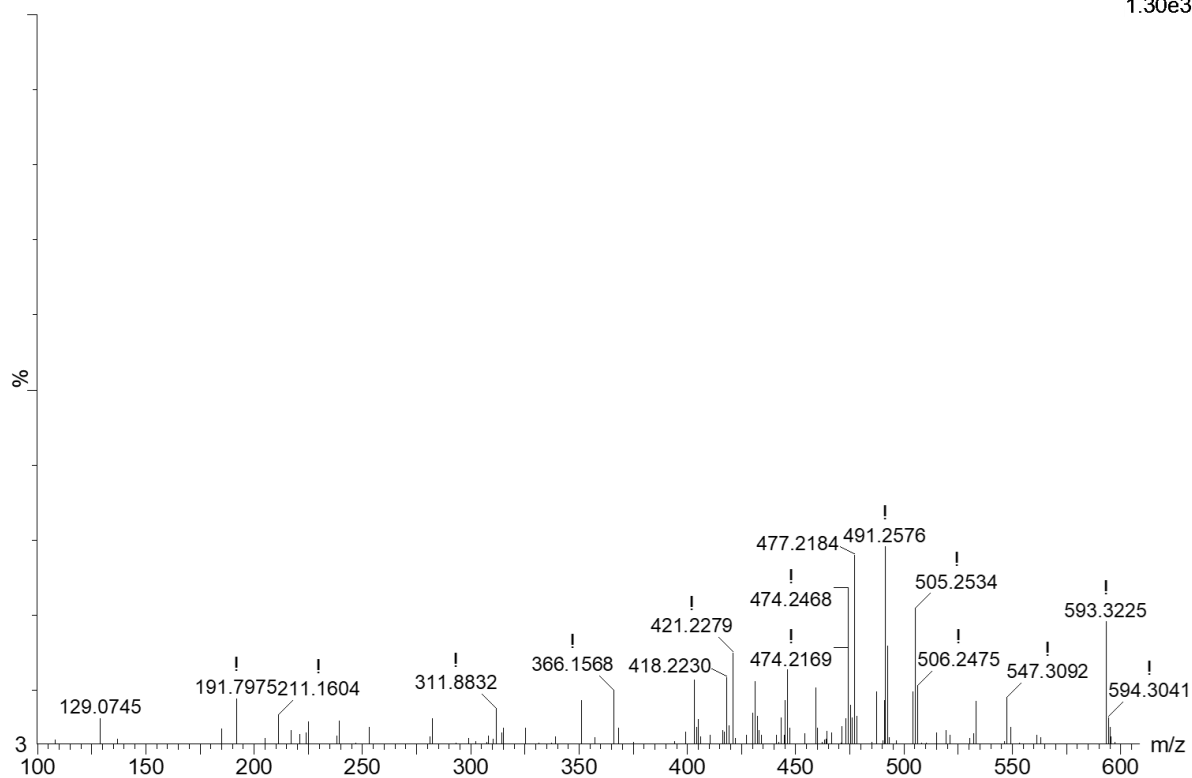
**AP.5 - Espectros MS/MS de fragmentação**

**AP. 5.1** - Perfil de fragmentação da *feature* de  $m/z$  795,5041 [M+Na]<sup>+</sup> referente ao glicolípido MGDG (18:3/18:4) cuja fórmula molecular é C<sub>45</sub>H<sub>72</sub>O<sub>10</sub>Na<sup>+</sup> detectada no extrato e frações da linhagem *Calothrix* sp. CCIBt3320.



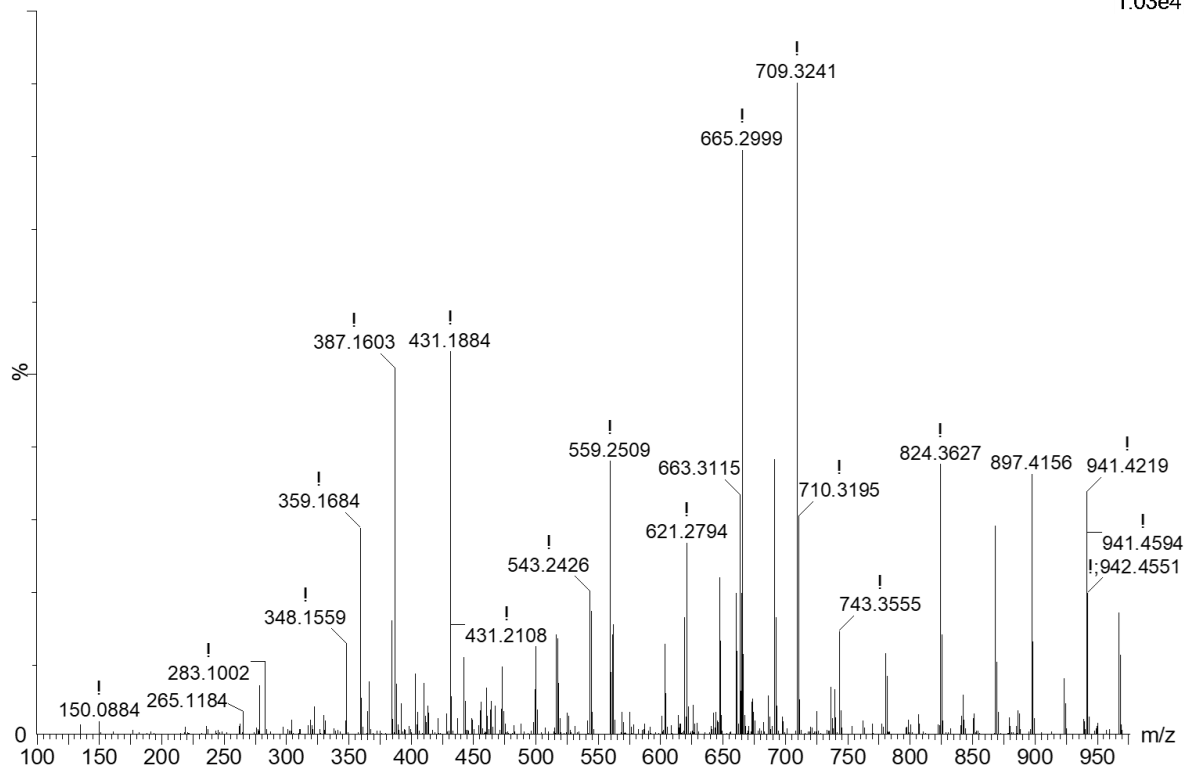
**AP. 5.2** – Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  593,2780  $[M+H]^+$  referente ao feoforbídeo A cuja fórmula molecular é  $C_{35}H_{37}N_4O_5^+$  detectada no extrato e frações da linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214.

3214\_F6\_20211213\_1\_POS 271 (6.442)

4: TOF MSMS 593.33ES+  
1.30e3

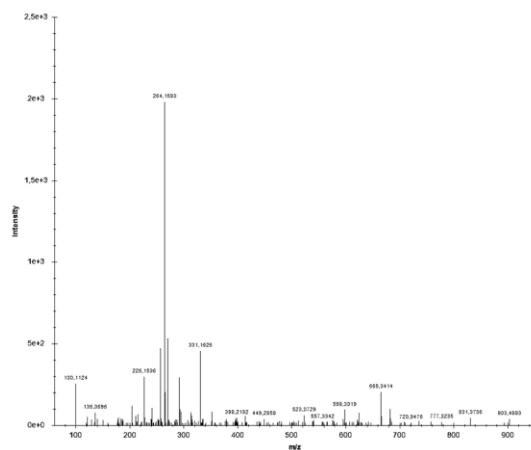
**AP. 5.3** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  985,4672  $[M+Na]^+$  referente à possível molécula molassamida de fórmula molecular  $C_{48}H_{66}N_8O_{13}Na^+$  detectada no extrato e fração F3 da linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551.

3551\_F3\_20211214\_1\_POS 149 (2.660)

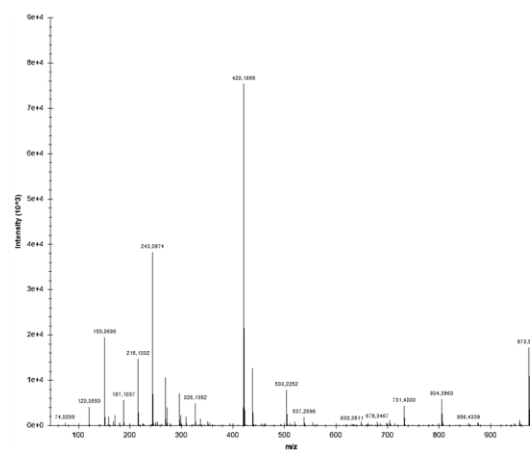
2: TOF MSMS 985.62ES+  
1.03e4

**AP. 5.4** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  991,5152  $[M+H]^+$  referente à possível análogo da molécula molassamida de fórmula molecular  $C_{50}H_{70}N_8O_{13}^+$  detectada em extratos e frações da linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551, e o espectro de fragmentação da kempopeptina a da base de dados GNPS.

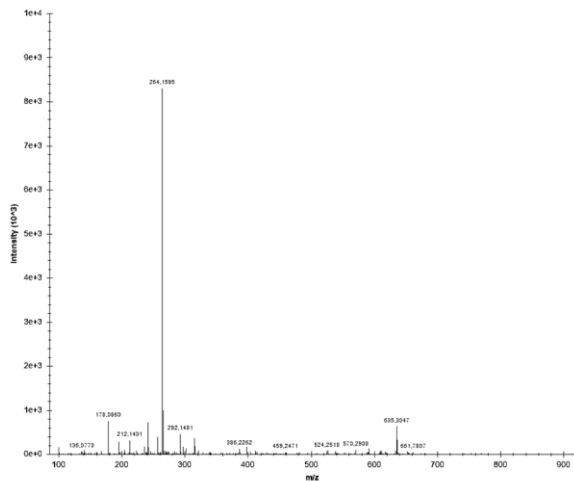
MS/MS do íon de  $m/z$  991,5152  $[M+H]^+$  -  $C_{50}H_{70}N_8O_{13}^+$



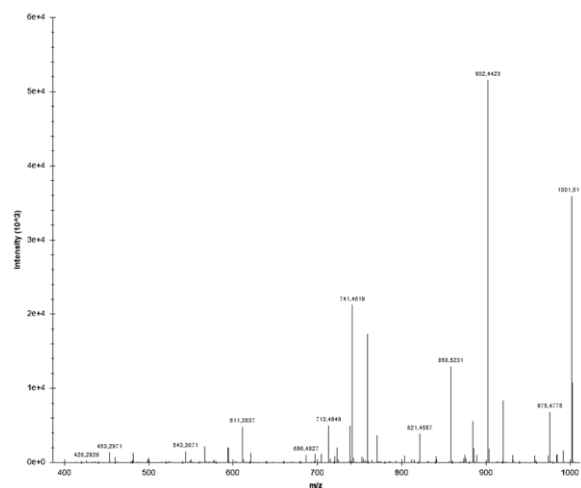
MS/MS da kempopeptina A obtida da base do GNPS



**AP. 5.5** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  961,5047  $[M+H]^+$  referente à possível análogo da molécula molassamida de fórmula molecular  $C_{49}H_{68}N_8O_{12}^+$  detectada em extratos e frações da linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551, e o espectro de fragmentação da micropeptina 996 a da base de dados GNPS.

MS/MS do íon de  $m/z$  961,5047  $[M+H]^+$  -  $C_{49}H_{68}N_8O_{12}^+$ 

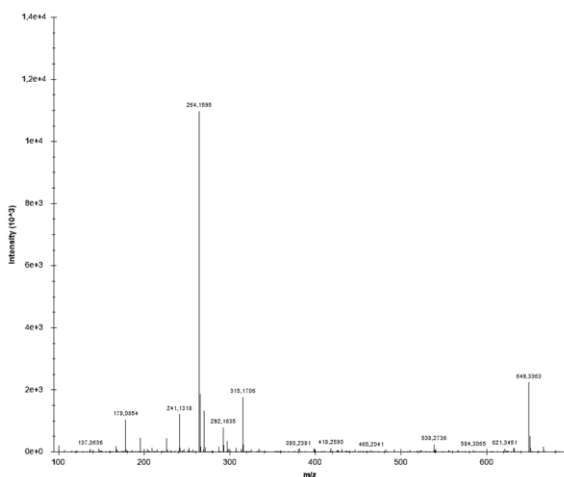
MS/MS da micropeptina 996 obtida da base do GNPS



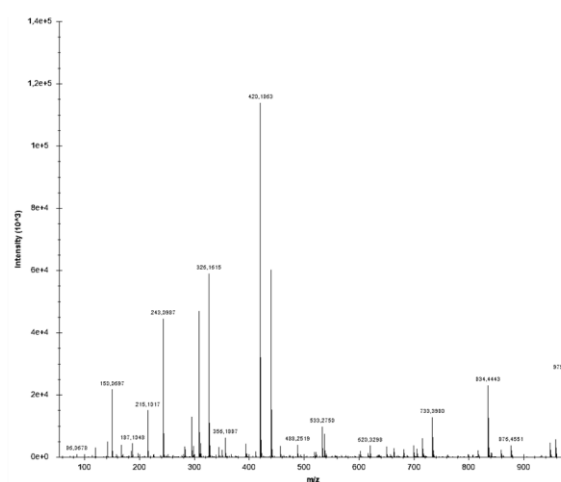


**AP. 5.6** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  975, 5198  $[M+H]^+$  referente à possível análogo da molécula molassamida de fórmula molecular  $C_{50}H_{70}N_8O_{12}^+$  detectada em extratos e frações da linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551, e o espectro de fragmentação da loggerpeptina A da base de dados GNPS.

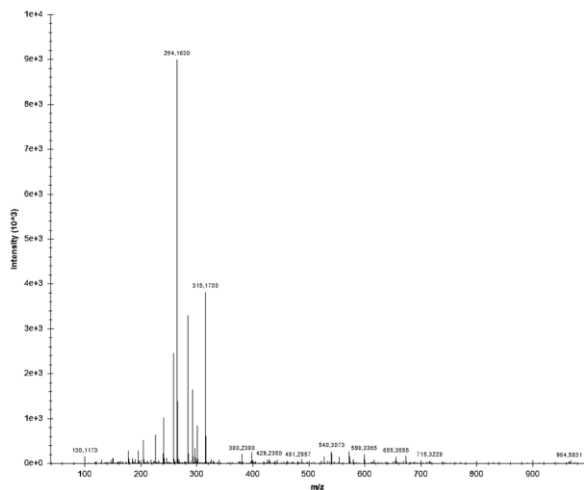
MS/MS do íon de  $m/z$  975,5198  $[M+H]^+$  -  $C_{50}H_{70}N_8O_{12}^+$



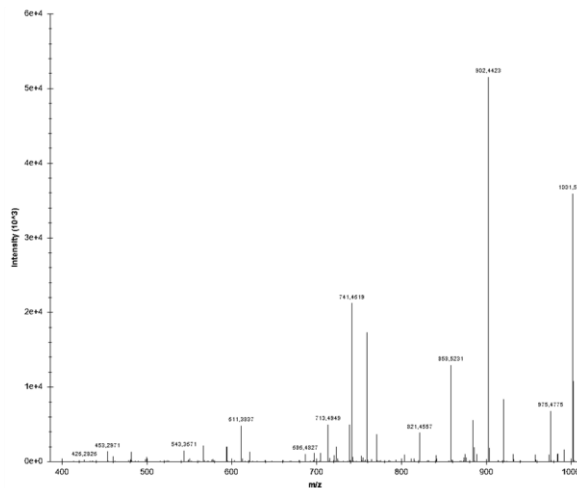
MS/MS da loggerpeptina A obtida da base do GNPS



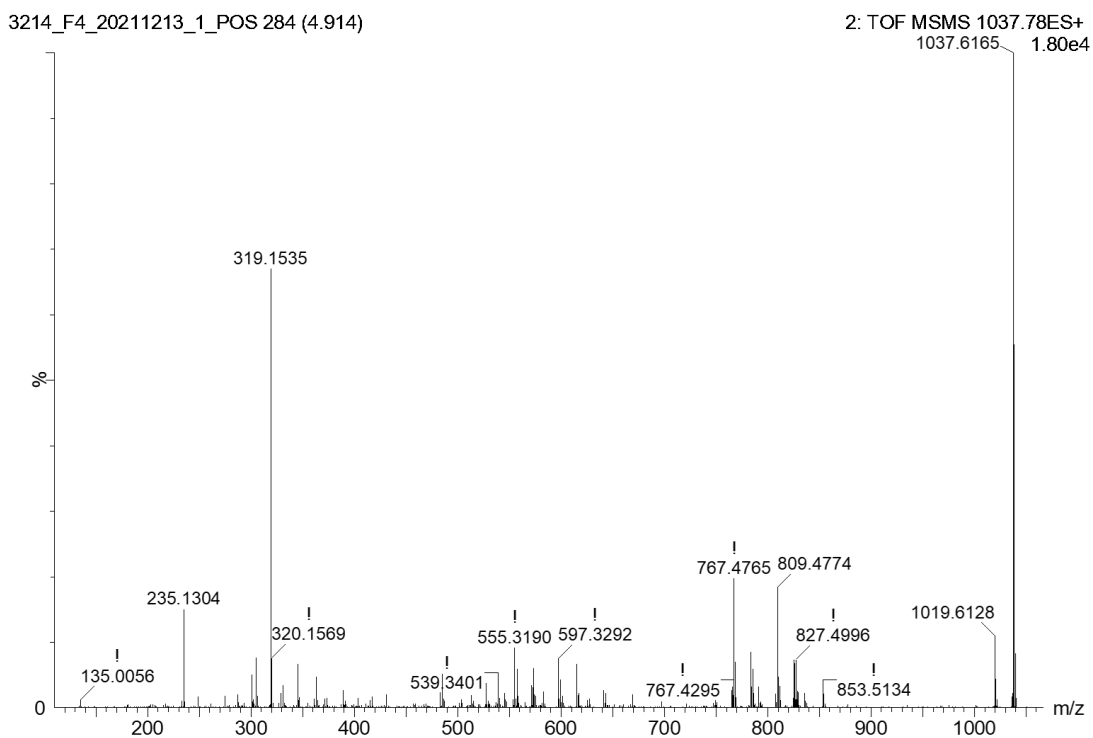
**AP. 5.7** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  1007,5459  $[M+H]^+$  referente à possível análogo da molécula molassamida de fórmula molecular  $C_{51}H_{74}N_8O_{13}^+$  detectada em extratos e frações da linhagem *Brasilonema octagenarum* CCIBt3551, e o espectro de fragmentação da micropeptina 996 da base de dados GNPS.

MS/MS do íon de  $m/z$  1007,5459  $[M+H]^+$  -  $C_{51}H_{74}N_8O_{13}^+$ 

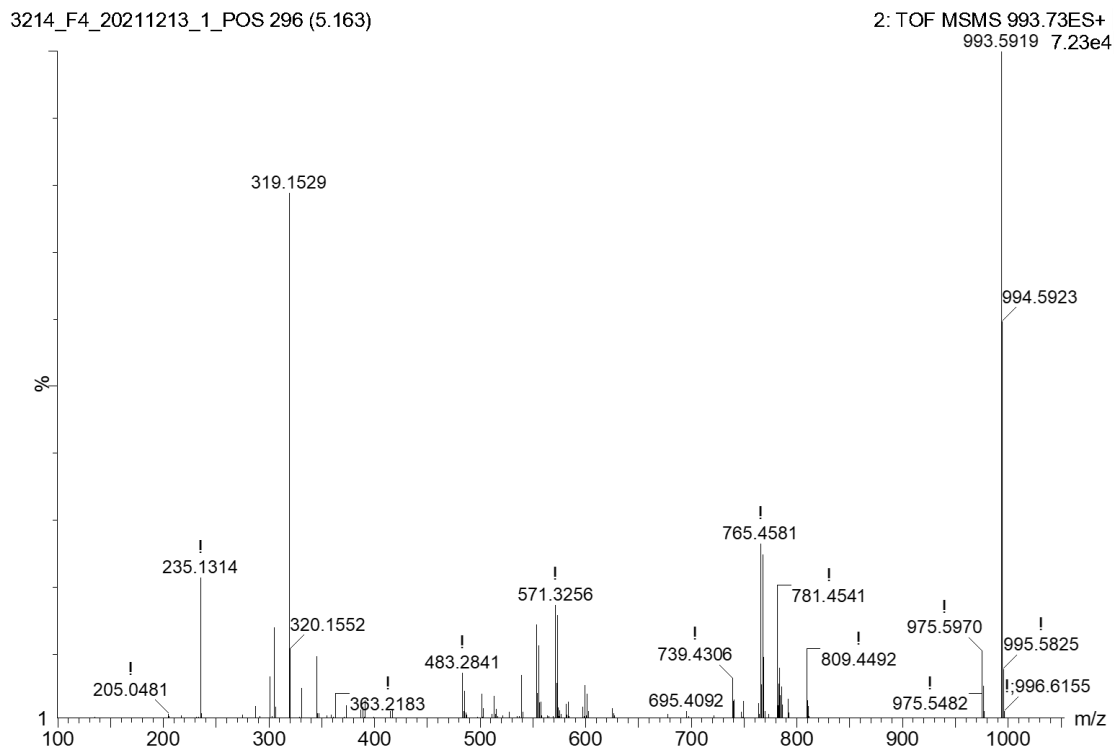
MS/MS da micropeptina 996 obtida da base do GNPS



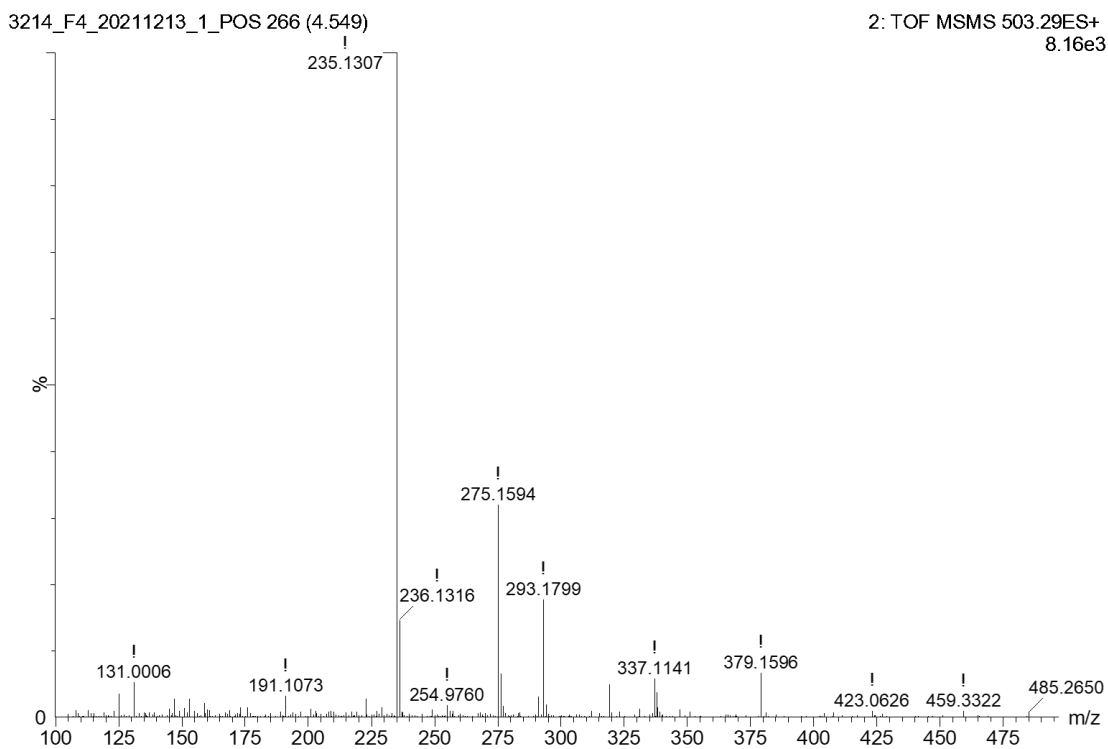
**AP. 5.8** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  1037,6169  $[M+Na]^+$  de fórmula molecular  $C_{53}H_{86}N_6O_{13}Na^+$  detectada no extrato e frações F3 e F4 da linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 referente aquela apontada pela ferramenta DAFdiscovery como possível correlacionada pela bioatividade observada no ensaio de citotoxicidade aguda contra *Artemia salina*.



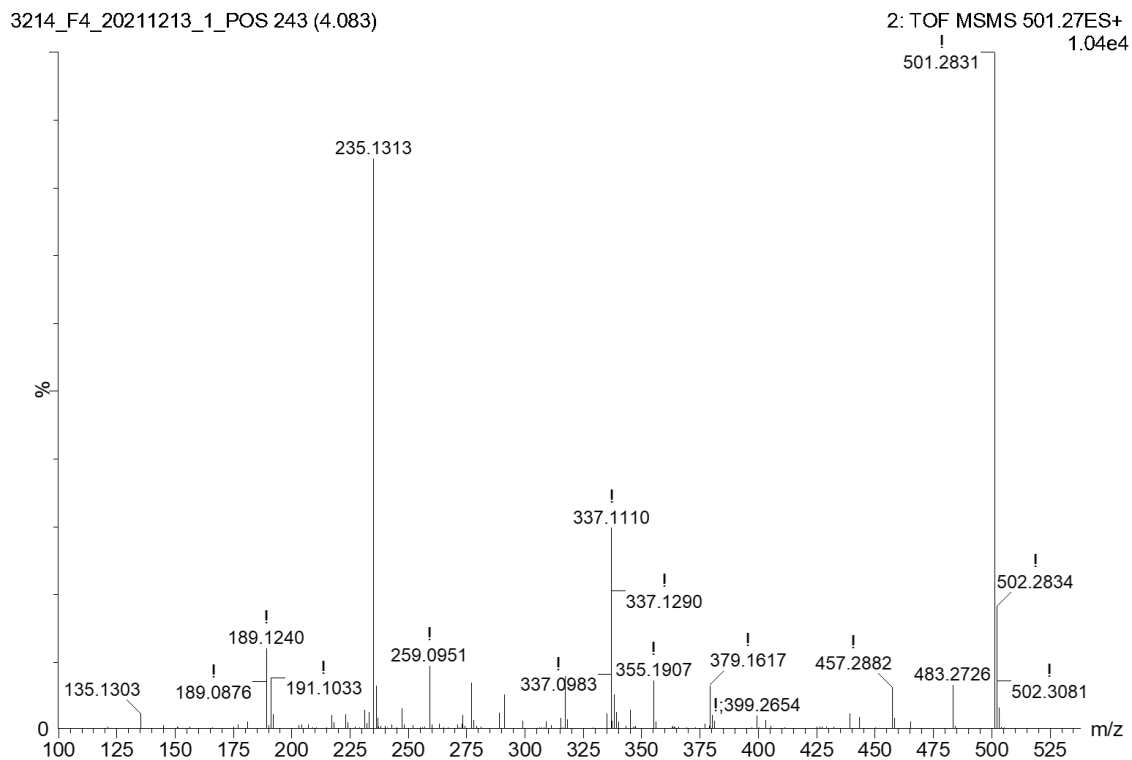
**AP. 5.9** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  993,5931  $[M+Na]^+$  de fórmula molecular  $C_{51}H_{82}N_6O_{12}Na^+$  detectada nas frações F3, F4 e F5 da linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 referente aquela apontada pela ferramenta DAFdiscovery como possível correlacionada pela bioatividade observada no ensaio de citotoxicidade aguda contra *Artemia salina*.



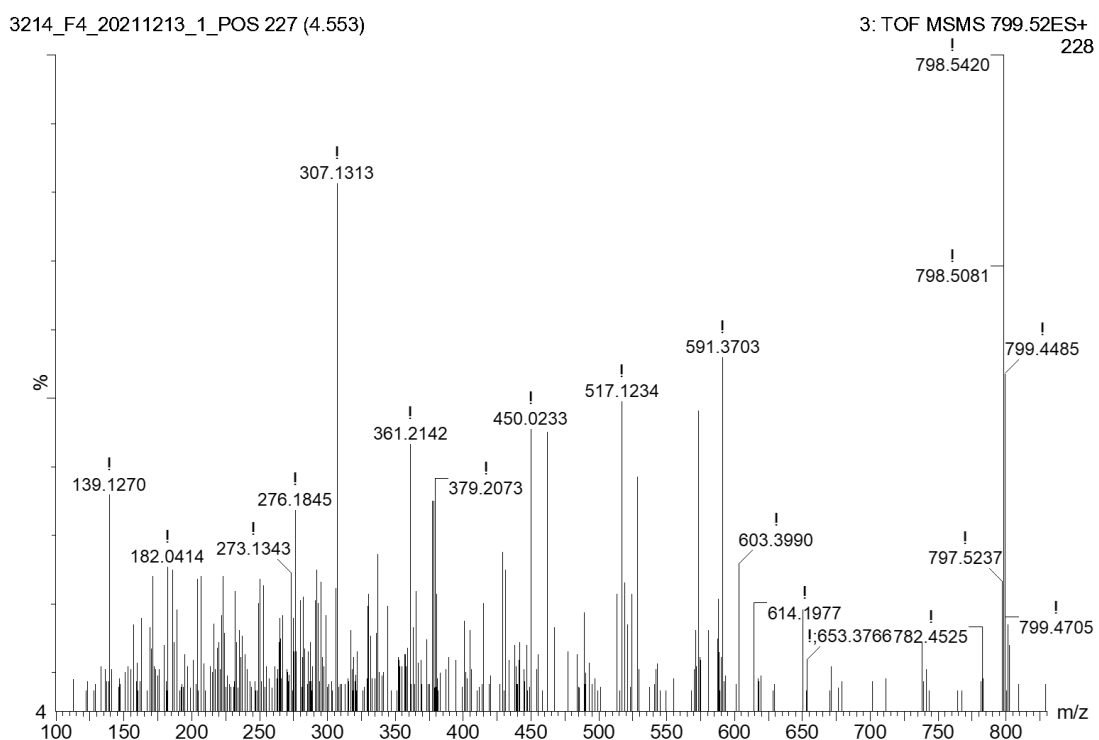
**AP. 5.10** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  503,2996  $[M+Na]^+$  de fórmula molecular  $C_{28}H_{40}N_4O_3Na^+$  detectado na fração F4 da linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 referente aquela apontada pela ferramenta DAFdiscovery como possível correlacionada pela bioatividade observada no ensaio de citotoxicidade aguda contra *Artemia salina*.



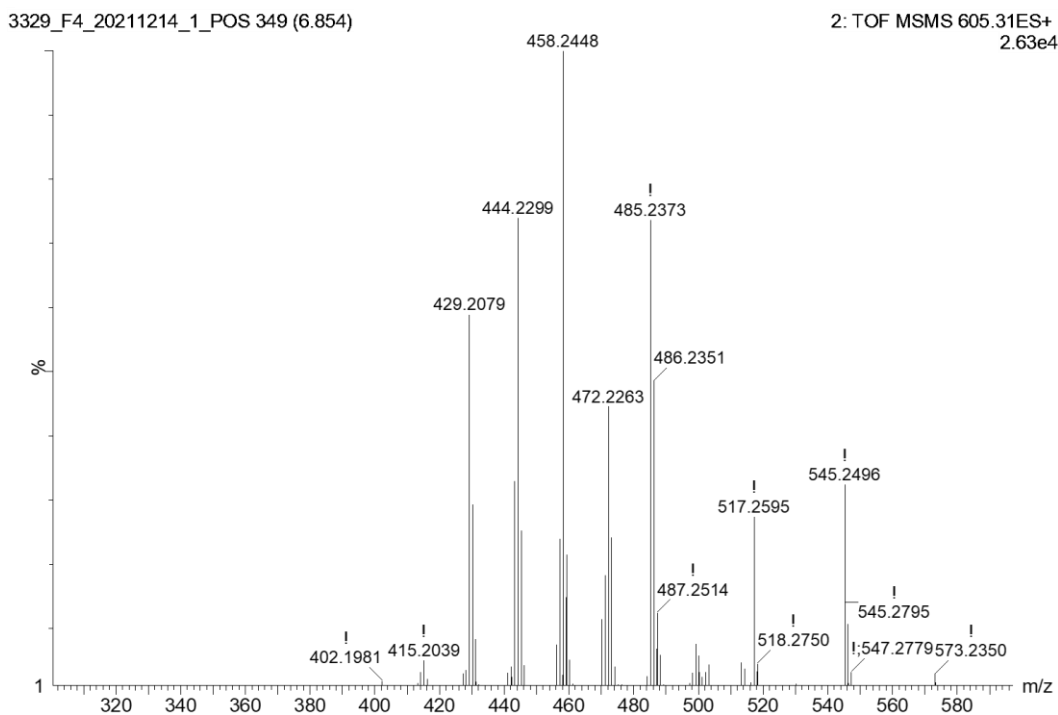
**AP. 5.11** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  501,2833  $[M+Na]^+$  de fórmula molecular  $C_{28}H_{38}N_4O_3Na^+$  detectada no extrato e nas frações F3 e F4 da linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214 referente aquelas apontada pela ferramenta DAFdiscovery como possível correlacionada pela bioatividade observada no ensaio de citotoxicidade aguda contra *Artemia salina*.



**AP. 5.12** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  799,4594  $[M+Na]^+$  de fórmula molecular  $C_{39}H_{64}N_6O_{10}Na^+$  detectada nas amostras da linhagem *Anagnostidinema amphibium* CCIBt3214.

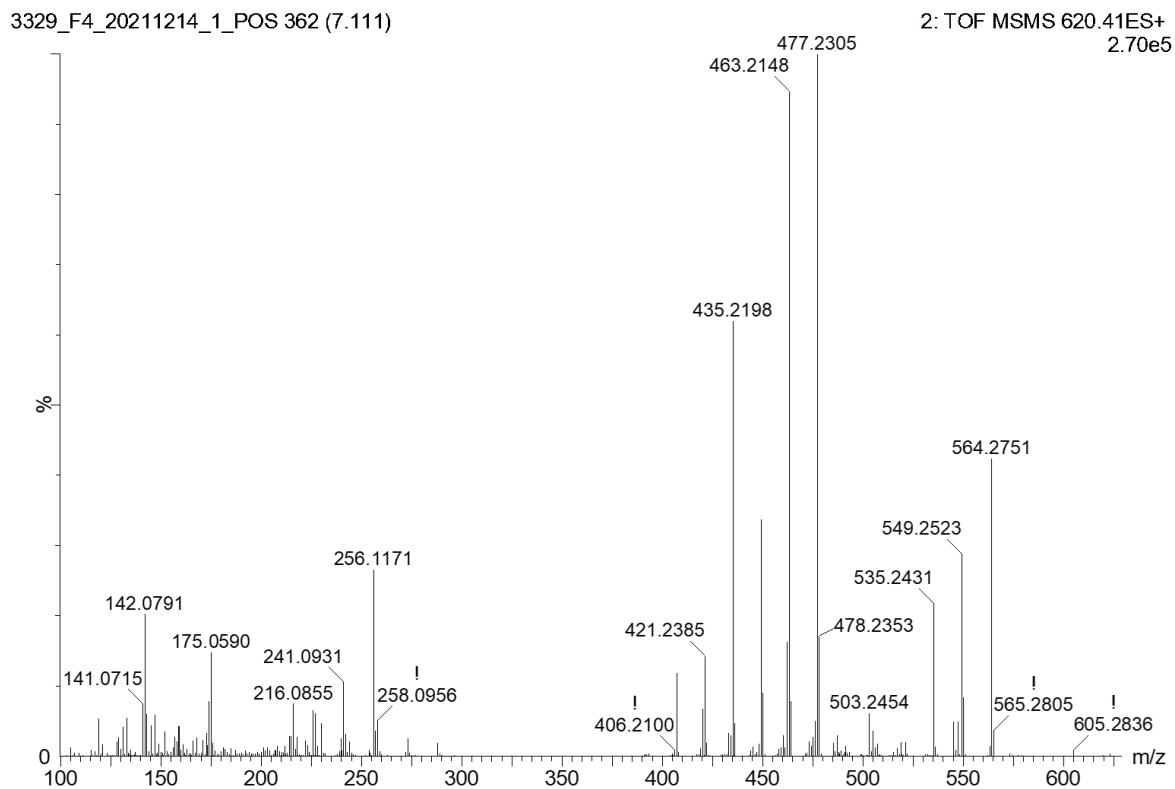


**AP. 5.13** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  605,2793 [M-H<sub>2</sub>O] de fórmula molecular C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> detectada nas amostras analisadas da linhagem *Nostoc* sp. CCIBt3329 e apontada pela ferramenta DAFdiscovery como possivelmente correlacionada pela bioatividade observada no ensaio de antiproliferativo *in vitro* contra células de melanoma humano.





**AP. 5.14** - Espectro MS/MS da *feature* de 620,3799 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> de fórmula molecular C<sub>35</sub>H<sub>51</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> detectada nas amostras analisadas da linhagem *Nostoc* sp. CCIBt3329 e apontada pela ferramenta DAFdiscovery como possivelmente correlacionada pela bioatividade observada no ensaio de antiproliferativo *in vitro* contra células de melanoma humano.



**AP. 5.15** - Espectro MS/MS da *feature* de  $m/z$  730,4814  $[M]^+$  de fórmula molecular  $C_{35}H_{68}N_7O_5PS$  detectada nas amostras analisadas da linhagem *Nostoc* sp. CCIBt3329 e apontada pela ferramenta DAFdiscovery como possivelmente correlacionada pela bioatividade observada no ensaio de antiproliferativo *in vitro* contra células de melanoma humano.

