



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Cláudia Marlene Bauer

**Otimização da produção de fucoxantina pela diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* -
Análise computacional associada a cultivos *in vitro***

Florianópolis
2020

Cláudia Marlene Bauer

**Otimização da produção de fucoxantina pela diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* -
Análise computacional associada a cultivos *in vitro***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Coorientador: Prof. Dr. Miguel Rocha

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bauer, Cláudia Marlene

Otimização da produção de fucoxantina pela diatomácea
Phaeodactylum tricornutum - Análise computacional
associada a cultivos in vitro / Cláudia Marlene Bauer ;
orientador, Marcelo Maraschin, coorientador, Miguel Rocha,
2020.

81 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,
2020.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Fucoxantina. 3.
Phaeodactylum tricornutum. 4. Bioinformática. 5. Cultivos
in vitro. I. Maraschin, Marcelo. II. Rocha, Miguel. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Cláudia Marlene Bauer

Título: Otimização da produção de fucoxantina pela diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* - Análise computacional associada a cultivos *in vitro*

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Leonardo Rubi Rörig, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof(a). Zenilda Laurita Bouzon, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rodolfo Moresco, Dr.
Universidade do Vale do Itajaí

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Biotecnologia e Biociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Marcelo Maraschin, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado aos meus pais Karin e Othmar.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Othmar e Karin e à minha família pelo amor e pelo apoio.

As minhas amigas Eva Regina de Oliveira Rodrigues e Fernanda Ramlov pelo carinho e pelo tempo que temos caminhado juntas.

Ao professor Marcelo Maraschin pelos ensinamentos e pela orientação gentil.

As minhas queridas amigas e companheiras de trabalho, Caroline Schmitz, Carolina Herrera, Rafaela Gordo Correa e Daniela Sousa Coelho.

Ao professor Miguel Rocha e sua equipe pela acolhida em Portugal e suas orientações.

Ao professor Leonardo Rubi Rörig e equipe do LAFIC pela parceria.

Aos meus colegas do LMBV.

Muito Obrigada!

RESUMO

Apesar dos desenvolvimentos da síntese química, a importância do estudo e utilização de produtos naturais é inquestionável, em parte devido aos efeitos nem sempre seguros dos compostos sintéticos e ao tempo necessário à comprovação de sua eficácia, que elevam os custos de produção. Neste contexto, organismos marinhos são alvos crescentes de estudos na procura por compostos bioativos, visto serem os oceanos ambientes pouco explorados do ponto de vista da investigação científica e da prospecção de biomoléculas. Neste contexto, este estudo se volta à produção de fucoxantina, um oxicarotenoide com importantes atividades biológicas relatadas, e.g., termogênica e antitumoral, pela microalga marinha *Phaeodactylum tricorutum*, uma espécie reconhecida por seu potencial de produção deste metabólito secundário. Para realização deste trabalho, fez-se uso de ferramentas de bioinformática, a fim de possibilitar a simulação de fenótipos *in silico*, bem como de técnicas de cultivo *in vitro*, visando a busca por elicitores à produção otimizada de fucoxantina, além da obtenção deste carotenoide com alto grau de pureza. Em uma primeira etapa (Capítulo I), uma revisão na literatura do estado da arte à produção de fucoxantina por *P. tricorutum* revelou que são poucos os dados disponíveis no que se refere ao efeito de nutrientes, principalmente N e P, na produção daquele oxicarotenoide e na captação de carbono. Ainda com relação ao metabolismo, as vias responsáveis pela carotenogênese não encontram-se totalmente elucidadas. Na segunda etapa do estudo (Capítulo II), fez-se uso de ferramentas computacionais à construção de modelos metabólicos otimizados à obtenção do pigmento de interesse. Dois modelos computacionais para o metabolismo de *P. tricorutum* foram identificados e posteriormente aprimorados, através de pesquisa por reações das vias responsáveis pela carotenogênese, seguido da simulação de fenótipos utilizando *software* dedicado. Como resultado das simulações, dezesseis enzimas-chave dos metabolismos de N, da glicólise e da fotossíntese foram detectadas, cuja regulação resulta no potencial incremento da biossíntese de fucoxantina na espécie. Na terceira etapa do estudo (Capítulo III), buscou-se aplicar *in vitro* as condições apontadas pelo modelo *in silico* para aumento da biomassa, i.e., aplicação de ureia, que resultou em aumento na produção de biomassa (43%) na maior concentração de ureia testada (10mM), e um aumento na produção de fucoxantina (35%) na menor concentração de ureia (0,44mM). Além disto, uma busca por inibidores das enzimas detectadas nos modelos computacionais de simulação fenotípica foi realizada, seguido da análise de seus efeitos na biossíntese de fucoxantina em sistemas de cultivo celular de *P. tricorutum*. Dos inibidores testados, e.g., prednisolona (0,26mM), piruvato de sódio (0,5mM), piridoxal (62µM), carbonato de dietila (1mM), EDTA dissódico (0,5mM), sulfato de cobre (0,5mM), fosfato de potássio (2,5mM), sulfato de amônio (0,5mM) e quercetina (0,1mM), somente os dois últimos estimularam a síntese de fucoxantina em 106% e 89% a mais que o controle respectivamente. Numa abordagem complementar, testes à biossíntese de fucoxantina foram conduzidos, considerando-se a exposição dos cultivos celulares à radiação na faixa do azul. Os valores de radiação utilizados (60, 120 e 60 µmol ftons m⁻² s⁻¹) para radiações nas faixas branco, branco e azul e somente azul, respectivamente, não estimularam a biossíntese de fucoxantina. Como etapa subsequente do estudo, buscando obter fucoxantina isolada e com alto grau de pureza, utilizou-se a técnica de cromatografia em coluna aberta de sílica, recuperando e purificando o pigmento a partir de biomassa microalgal com maior valor de rendimento, consoante à indicação dos modelos metabólicos desenvolvidos *in silico*. Foi possível recuperar após este processo 24,77 mg.g⁻¹ MS de fucoxantina, valor que corresponde a 62% da fucoxantina disponível nos extratos brutos de *P. tricorutum* cultivados com sulfato de amônio (0,5mM). Os resultados concordam qualitativamente com os modelos metabólicos em pelo menos uma das concentrações testadas para o aumento da biomassa com utilização de ureia como fonte de nitrogênio. Foi também possível aumentar a produção de fucoxantina

em *P. triornutum* quando do fornecimento de ureia e sulfato de amônio respectivamente. Desta forma, os modelos computacionais aqui utilizados trouxeram resultados positivos para maior produção de fucoxantina em *P. triornutum*. Também foi possível purificar a fucoxantina de extratos brutos de *P. triornutum* através das técnicas cromatográficas aqui utilizadas obtendo-se valores significativos com relação a outros encontrados na literatura para esta microalga.

Palavras-chave: Microalgas, *Phaeodactylum triornutum*, fucoxantina, bioinformática, *in silico*, *in vitro*, cromatografia.

ABSTRACT

Despite the developments of chemical synthesis, the importance of the study and use of natural products is of utmost importance, partly due to the side effects of synthetic compounds and also to the time needed to prove their efficacy, which increase production costs. In this context, marine organisms are an increasing target of studies in the search for bioactive compounds, since the oceans are poorly exploited from the point of view of scientific research and biomolecule prospection. In this context, this study turns to the production of fucoxanthin, an oxycarotenoid with important biological activities reported, e.g., thermogenic and antitumoral, by the marine microalga *Phaeodactylum tricornerutum*, a species recognized for its potential of production of that secondary metabolite. In order to perform this work, bioinformatics tools were adopted to simulate *in silico* phenotypes with superior amounts of fucoxanthin, in connection with *in vitro* cell cultures, aiming to identify elicitor compounds of the fucoxanthin biosynthesis pathway. In a first step (Chapter I), a review of literature regarding the state of the art on the production of fucoxanthin by *P. tricornerutum* has revealed that few data are available for the effect of nutrients, mainly nitrogen and phosphorus, on the production of that pigment and carbon assimilation. Also with regard to metabolism, the carotenogenic pathways are still not well known. In the second stage (Chapter II), computational tools were used to construct optimized metabolic models to obtain the pigment of interest. Two computational models for the metabolism of *P. tricornerutum* were identified and later improved through research on the pathways responsible for carotenogenesis, followed by phenotype simulation using dedicate software for phenotype simulation. As a result, sixteen key enzymes of N metabolism, glycolysis, and photosynthesis were detected, with potential to increase the biosynthesis of fucoxanthin in the species through its regulation. In the third stage of the study (Chapter III), *in vitro* conditions were simulated in order to increase biomass, i.e., application of urea, which resulted in an increase in the production of biomass (43%) with the highest concentration of urea tested (10mM), and an increase in the production of fucoxanthin (35%) with the lowest concentration of urea (0.44mM). In addition, a search for enzyme inhibitors detected in the phenotype simulations of the computational models was carried out, followed by the analysis of their effects on fucoxanthin biosynthesis in *P. tricornerutum* cell cultures. Of the inhibitors tested, i.e., prednisolone (0.26mM), sodium pyruvate (0.5mM), pyridoxal (62 μ M), diethyl carbonate (1mM), disodium EDTA (0.5mM), copper sulfate (0.5mM), potassium phosphate (2.5mM), ammonium sulfate (0.5mM) and quercetin (0.1mM), only the last two stimulated the synthesis of fucoxanthin, i.e., 106% and 89% more than control respectively. In a complementary approach, tests for fucoxanthin biosynthesis were conducted, considering the exposure of cell cultures to radiation in the blue band. The radiation values used (60, 120 and 60 μ mol photons m⁻² s⁻¹) for radiation at white, white and blue and only blue bands, respectively, did not stimulate fucoxanthin biosynthesis. As a subsequent stage of this study, seeking to obtain isolated fucoxanthin with a high degree of purity, the technique of silica open column chromatography was used, recovering and purifying the pigment from microalgal biomass with higher yield, according the indication of metabolic models developed *in silico*. It was possible to recover after this process 24.77 mg.g⁻¹ DM fucoxanthin, a value that corresponds to 62% of the fucoxanthin available in the crude extracts of *P. tricornerutum* grown with ammonium sulfate (0.5mM). The results agree qualitatively with the metabolic models in at least one of the concentrations tested to increase biomass using urea as a nitrogen source. It was also possible to increase the production of fucoxanthin in *P. tricornerutum* using urea and ammonium sulphate, respectively. Thus, the computational models used in this study brought positive results for greater production of fucoxanthin in *P. tricornerutum*. It was also possible to purify fucoxanthin from crude extracts

of *P. tricornutum* by means of the chromatographic techniques used here, obtaining significant values in relation to others found in the literature for this microalgae.

Key-words: Microalgae, *Phaeodactylum tricornutum*, fucoxanthin, bioinformatics, *in silico*, *in vitro*, chromatography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Curva de crescimento de células de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2. As culturas celulares (n=3) foram cultivadas à 21°C, fotoperíodo de 12h, irradiância de fótons de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lâmpadas fluorescentes (36W) e injeção constante de ar atmosférico. 49
- Figura 2- Densidade celular (células $\text{mL}^{-1} \times 10^{-6}$) dos cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2 suplementado com ureia (0,44, 5 e 10mM) com e sem a adição de sulfato de níquel 0,01mM (n=3). 55
- Figura 3- Peso total de biomassa seca por litro dos cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2, suplementado com 3 concentrações de ureia (0,44, 5 e 10mM) com e sem a adição de sulfato de níquel 0,01mM. A biomassa foi recuperada no sétimo dia de cultivo por centrifugação, seguida de liofilização (n=3, p<0,05). 56
- Figura 4- Conteúdo de fucoxantina (mg/g MS) nos cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* no 7º dia de cultivo (fase exponencial), em meio de cultura f/2 suplementado com 3 concentrações de ureia (0,44, 5 e 10mM) com e sem a adição de sulfato de níquel 0,01mM (n=3, P<0,05). 57
- Figura 5- Densidade celular (células $\times \text{mL}^{-1} \times 10^{-6}$) dos cultivos (n=3) de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2 suplementados com piridoxal-5-fosfato (62 μM), carbonato de dietila (1mM), piruvato de sódio (0,5mM), sulfato de amônio (0,5mM), cloreto de manganês (0,5mM), sulfato de cobre (0,5mM), EDTA dissódico (0,5mM), quercetina (0,1mM), prednisolona (0,26mM) e fosfato de potássio(2,5mM). 60
- Figura 6- Peso total de biomassa seca por litro de cultivo nos cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2 suplementados com piridoxal-5-fosfato (62 μM), carbonato de dietila (1mM), piruvato de sódio (0,5mM), sulfato de amônio (0,5mM), cloreto de manganês (0,5mM), sulfato de cobre (0,5mM), EDTA dissódico (0,5mM), quercetina (0,1mM), prednisolona (0,26mM) e fosfato de potássio (2,5mM). A biomassa foi recuperada no sétimo dia de cultivo por centrifugação, seguida de liofilização (n=3, p<0,05). 61
- Figura 7- Conteúdo de fucoxantina (mg/g MS) de células de *Phaeodactylum tricornutum* (7º dia de cultivo, fase exponencial), cultivadas em meio de cultura f/2 contendo piridoxal-5-fosfato (62 μM), carbonato de dietila (1mM), piruvato de sódio (0,5mM), sulfato de amônio (0,5mM), cloreto de manganês (0,5mM), sulfato de cobre (0,5mM), EDTA dissódico (0,5mM), quercetina (0,1mM), prednisolona (0,26mM) e fosfato de potássio

(2,5mM). A biomassa foi recuperada por centrifugação, seguida de liofilização (n=3, p<0,05)..... 62

Figura 8- Densidade celular (células x mL⁻¹ x 10⁻⁶) dos cultivos (n=4) de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2 expostos à luz fluorescente (36W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹, controle), luz azul tipo LED (14.4W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹)+luz fluorescente (36W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹) e luz azul tipo LED (14.4W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹)(n=4)..... 64

Figura 9- Peso total de biomassa seca por litro dos cultivos (n = 4) de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2 expostos à luz fluorescente (36W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹ - controle), luz azul tipo LED (14.4W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹) + luz fluorescente (36W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹) e luz azul tipo LED (14.4W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹). A biomassa celular foi recuperada no sétimo dia de cultivo por centrifugação, seguida de liofilização..... 65

Figura 10- Conteúdo de fucoxantina (mg/g MS) nos cultivos (n = 4) de *Phaeodactylum tricornutum* no 7º dia de cultivo (fase exponencial) em meio de cultura f/2 tratados expostos à luz fluorescente (36 W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹- controle), luz azul tipo LED (14.4 W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹) + luz fluorescente (36 W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹) e luz azul tipo LED (14.4 W, 60 μmol fotons m⁻² s⁻¹). A biomassa celular foi recuperada no sétimo dia de cultivo por centrifugação, seguida de liofilização. 66

Figura 11– Cromatogramas (CLAE-DAD) a) da amostra de fucoxantina purificada e b) padrão analítico, com tempos de retenção de 2,7 min em 450 nm. 68

Figura 12- Espectros de massas de fucoxantina a) padrão analítico, b) padrão analítico com fragmentação da massa 637,33 m/z, c) amostra purificada e d) amostra purificada com a fragmentação da massa 637,33 m/z. São mostrados em destaque (setas) os picos de íons do padrão analítico e da amostra purificada com m/z semelhantes. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–Enzimas responsáveis pela catálise de reações que, segundo os modelos computacionais investigados, aumentam a biossíntese de fucoxantina quando inibidas, potenciais inibidores dessas enzimas que foram identificados junto à base de dados BRENDA e os respectivos modelos metabólicos <i>in silico</i>	52
Tabela 2–Potenciais inibidores identificados junto à base de dados BRENDA e as respectivas enzimas chave selecionadas de acordo com os modelos computacionais a fim de aumentar a biossíntese de fucoxantina.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPI	Atmospheric Pressure Photoionization
ATP	Trifosfato de adenosina
BRENDA	The Comprehensive Enzyme Information System
CHCl₃	clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	ácido eicosapentaenóico
FBA	análise de fluxo metabólico
g	grama
G3P	glyceraldeído 3-fosfato
GGDP	geranilgeranil difosfato
IPP	isopentenil difosfato
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LED	light-emitting diode
MAE	extração assistida por microondas
MeOH	metanol
MEP	metileritritol 4-fosfate
min	minutos
mL	mililitro
mmol	milimol
MS	matéria seca
N	nitrogênio
NR	nitrito redutase
OAA	ácido oxaloacético
PBRs	fotobiorreatores
PLE	extração líquida pressurizada
PSY	fitoeno sintase
SFE	extração com fluido supercrítico
UAE	extração assistida por ultrassom
UV-vis	ultravioleta-visível
v	volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Objetivos.....	19
1.1.1	Objetivo Geral	19
1.1.2	Objetivos Específicos	19
2	CAPÍTULO I – Produção <i>In vitro</i> de Fucoxantina pela Diatomácea <i>Phaeodactylum tricornutum</i>.....	20
2.1	Introdução	21
2.2	Biossíntese de fucoxantina e metabolismo de diatomáceas	22
2.2.1	Estratégias de cultivo	23
2.3	Elicitores e produção <i>in vitro</i> de fucoxantina em cultivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	24
2.3.1	Condições de luz.....	24
2.4	Fucoxantina – Extração, purificação e estabilidade	25
2.5	Ferramentas computacionais	27
2.6	Considerações finais	28
2.7	Referências Bibliográficas.....	30
3	CAPÍTULO II – Predições <i>In Silico</i> para a Produção de Fucoxantina pela Diatomácea <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	35
3.1	Introdução	36
3.1.1	Métodos	36
3.1.2	Resultados e Discussão.....	37
3.1.3	Conclusões.....	38
3.2	Refêrencias Bibliográficas.....	40
4	CAPÍTULO III – Produção, Recuperação e Purificação de Fucoxantina de Cultivos <i>In vitro</i> de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	41
4.1	Introdução	41
4.1.1	Materiais e Métodos	41

4.1.1.1	<i>Cepa, manutenção dos cultivos e preparação das amostras.....</i>	41
4.1.1.2	<i>Experimentos</i>	42
4.1.1.3	<i>Condições de cultivo estabelecidas com o auxílio de ferramentas computacionais</i>	42
4.1.1.4	<i>Cultivos in vitro com ureia e NiSO₄.....</i>	43
4.1.1.5	<i>Elicitando cultivos de <i>P. tricornutum</i> com inibidores enzimáticos</i>	44
4.1.1.6	<i>Cultivos in vitro com aplicação de radiação na faixa do azul.....</i>	45
4.1.1.7	<i>Recuperação da biomassa e extração de fucoxantina.....</i>	46
4.1.1.8	<i>Obtendo a fucoxantina purificada.....</i>	46
4.1.1.9	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</i>	47
4.1.1.10	<i>Espectrometria de Massas.....</i>	48
4.1.1.11	<i>Análises estatísticas.....</i>	48
4.1.2	<i>Resultados e Discussão.....</i>	49
4.1.2.1	<i>Curva de crescimento dos cultivos para a recuperação de biomassa</i>	49
4.1.2.2	<i>Condições de cultivo estabelecidas com o auxílio de ferramentas computacionais</i>	50
4.1.2.3	<i>Cultivos <i>in vitro</i> elicitados com ureia e NiSO₄.....</i>	54
4.1.2.4	<i>Cultivos <i>in vitro</i> com os inibidores para enzimas chave no aumento da biossíntese de fucoxantina</i>	59
4.1.2.5	<i>Cultivos <i>in vitro</i> com aplicação de radiação na faixa do azul.....</i>	63
4.1.2.6	<i>Obtenção de fucoxantina purificada (cromatografia em coluna aberta, CLAE e espectrometria de massas).....</i>	66
4.2	<i>Conclusão</i>	71
4.3	<i>Referências Bibliográficas.....</i>	72
5	CONCLUSÃO GERAL	77
6	AGRADECIMENTOS	77
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais acompanham as civilizações desde os seus primórdios. Intuitivamente ou instintivamente a humanidade tem procurado por soluções para suas enfermidades na natureza. Algumas civilizações, como a chinesa, desenvolveram de tal forma o uso de espécies e preparados vegetais que ainda hoje representam um desafio no que se refere ao entendimento de seus mecanismos de ação (Viegas et al., 2006). É esta busca pelo conhecimento do arsenal químico da natureza que colocou o homem no desenvolvimento da síntese química de compostos bioativos, a química sintética, gerando um declínio nos investimentos em pesquisas de produtos naturais por parte da indústria farmacêutica no período pós-guerra. Tal período foi de grande prosperidade para os fármacos sintéticos, impulsionando a fitoquímica ao estudo dos metabólitos secundários (Viegas et al., 2006).

A química sintética trouxe valiosas contribuições à sociedade e, com certeza, o continuará fazendo. Todavia, muitas soluções trazem também colateralidades, como por exemplo, os efeitos adversos de drogas sintéticas que não mimetizam corretamente a sua contraparte natural, além dos custos nem sempre compensatórios a sua produção. Isto conduz, em parte, a uma revalorização dos produtos de origem natural. Afinal, desvendar a diversidade molecular da natureza em nível laboratorial significa alcançar milhões de anos de conhecimento evolutivo encerrado em nossas espécies, no que se refere a adaptações ambientais e defesas contra predadores (Viegas et al., 2006). Neste contexto, a investigação de produtos de origem natural continua tendo sua importância, seja como modelos na busca de novos fármacos ou na sua utilização *in natura*.

O ambiente marinho encerra uma enorme e ainda pouquíssimo explorada biodiversidade, trazendo a promessa de albergar compostos com estruturas químicas diferenciadas em relação aos encontrados em ecossistemas terrestres. Uma ampla variedade de carotenoides é encontrada nas espécies terrestres e marinhas, aonde pequenas diferenças nas estruturas químicas desses compostos desempenham um papel crucial no que se refere às atividades biológicas observadas. No ambiente marinho são encontrados carotenoides já identificados em plantas, além de outros que ocorrem somente em algas, a exemplo da fucoxantina, com diversas propriedades bioativas já identificadas. Por serem totalmente distintos do ambiente terrestre, os ecossistemas marinhos são fontes de moléculas que a natureza selecionou ao longo de milhões de anos. Além disto, há que se mencionar as

respostas adaptativas das espécies marinhas à poluição e seus efeitos sobre o metaboloma destas, uma vez que ao longo dos séculos as zonas costeiras têm sido depositárias de toda espécie de rejeitos antrópicos. Embora os compostos bioativos marinhos possam ser relativamente inexplorados do ponto de vista da investigação científica, os organismos que os produzem (e.g., corais, esponjas e algas) não são novidade para diversas civilizações, principalmente aquelas de regiões costeiras que os utilizam há milênios.

A produção em larga escala de microalgas teve início nos anos sessenta, no Japão, com o cultivo de *Chlorella* sp. como aditivo alimentar. Em 2004, a indústria já produzia 7000 toneladas de matéria seca daquela espécie, anualmente. O consumo humano de microalgas é restrito a poucas espécies, onde *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella* dominam o mercado (Brennan et al., 2010). Dos pigmentos encontrados em microalgas, os carotenoides têm sido os mais explorados comercialmente, comparativamente às outras duas classes de pigmentos: as clorofilas e as ficobilinas (Lourenço, 2006). De outra forma, com relação aos fármacos, o peptídeo conotoxina MVIIA (Ziconotide[®]), isolado do caracol marinho *Conus magus*, foi o primeiro metabólito de origem marinha liberado pelo FDA (Food and Drug Administration - USA), em 2004, para tratamento da dor crônica severa (Barreiro & Bolzani, 2009).

Estima-se que o mercado global de carotenoides alcançou 1,24 bilhão de dólares em 2016, e deverá aumentar para 1,53 bilhão até 2021, com uma taxa de crescimento anual de 3,78% naquele período. Embora uma pequena porção de carotenoides seja obtida naturalmente de plantas ou algas, atualmente, a maior parte destes compostos provém de síntese química (Sathasivam & Ki, 2018). As microalgas apresentam uma alternativa neste cenário para driblar os efeitos adversos dos produtos sintéticos. Outra vantagem das microalgas, justamente por serem microrganismos, é a facilidade de serem cultivadas *in vitro*, apresentando rápido crescimento e produção uniforme de biomassa. Estudos relatam que microalgas têm rendimento superior na produção de carotenoides em comparação às plantas e macroalgas (Kim et al., 2012a), com potencial para a produção a nível industrial.

Com o desenvolvimento da biologia molecular e o sequenciamento gênico de diversas espécies, muitos dados se tornaram disponíveis para serem processados. As ferramentas *in silico* são grandes aliadas nesta etapa. No presente trabalho, a bioinformática representa uma abordagem racional ao desenvolvimento de sistema de produção otimizado de um composto bioativo, neste caso a fucoxantina, por permitir realizar simulações *in silico*

com base no conhecimento disponível do metabolismo e genética de dada espécie. Até o momento, bancos de dados públicos ainda carecem de dados sobre genes e enzimas envolvidos nas vias de carotenogênese de algas (Sathasivam & Ki, 2018).

Este trabalho visa identificar alvos bioquímicos que possam causar aumento na biossíntese de fucoxantina pela microalga *Phaeodactylum tricornutum*, combinando as competências em bioinformática da equipe da Universidade do Minho (Braga, Portugal), sob a supervisão do Prof. Dr. Miguel Rocha (Departamento de Informática), com a capacidade de geração de dados bioquímicos e estudos metabolômicos da equipe da UFSC. Assim, ferramentas de bioinformática associadas a estratégias de cultivos *in vitro* e de análises bioquímicas foram adotadas. Em etapa final, objetiva-se recuperar o composto bioativo de interesse da biomassa microalgal, através do uso de técnicas cromatográficas, com elevado grau de pureza e apto a ser comercializado.

Neste trabalho, utilizamos o termo elicitor para designar os compostos que são aplicados aos sistemas *in vitro* com a finalidade de promover maior biossíntese de um metabólito, que neste caso é a fucoxantina. Neste sentido o termo elicitor na forma aqui utilizada concorda com Namdeo, 2007, que define o termo como uma substância que, introduzida em pequenas concentrações em um sistema de células vivas inicia ou melhora a biossíntese de compostos específicos.

Inicialmente, fez-se uma extensa revisão bibliográfica sobre o estado da arte no que concerne à produção de fucoxantina pela microalga *P. tricornutum*. Posteriormente, pelo uso de ferramentas de bioinformática, foi realizado um aprimoramento de modelos computacionais pré-existentes à espécie em estudo, seguido da utilização dos mesmos para efeitos de simulações *in silico* com direcionamento à produção de fucoxantina. Numa terceira etapa, na tentativa de validar bioquimicamente os resultados obtidos *in silico*, compostos inibidores de enzimas-chave de vias metabólicas envolvidas na carotenogênese apontadas pelos modelos computacionais foram avaliados, concomitante à quantificação de fucoxantina nos cultivos celulares de *P. tricornutum*.

Por fim, cultivos celulares associados ao tratamento elicitor mais promissor da biossíntese de fucoxantina foram conduzidos, visando a geração de biomassa microalgal à extração, recuperação, purificação e quantificação daquele oxicarotenoide via técnicas

cromatográficas (i.e., coluna aberta de sílica gel e cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE) e de espectrometria de massas, visando um sistema de produção de fucoxantina como padrão analítico em pequena escala.

Assim, este trabalho divide-se em 3 capítulos. Os capítulos 1 e 2 são apresentados em forma resumida, devido a questões relacionadas à direitos autorais. O capítulo 1 faz uma extensa revisão bibliográfica sobre a produção e biossíntese de fucoxantina pela microalga *P. tricornutum* podendo ser acessado em <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817901-7.00008-3>. O capítulo 2 descreve como foram utilizadas ferramentas de bioinformática para predizer potenciais condições que possam aumentar a produção de fucoxantina pela diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*, assim como alguns resultados obtidos *in silico* são comentados podendo ser acessado em https://doi.org/10.1007/978-3-319-98702-6_17. O capítulo 3 detalha como foram aplicadas *in vitro*, as soluções obtidas pelo uso das ferramentas computacionais exploradas no capítulo 2 para aumentar a produção de fucoxantina pela microalga *P. tricornutum*. Ainda neste capítulo descreve-se o uso de técnicas cromatográficas e espectrométricas utilizadas à obtenção de fucoxantina purificada.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a síntese *in silico* e *in vitro* de fucoxantina pela microalga *Phaeodactylum tricornutum*.

1.1.2 Objetivos Específicos

Capítulo I

- a. Elaborar uma revisão bibliográfica referente às informações sobre o estado da arte da produção de fucoxantina pela microalga *P. tricornutum*.

Capítulo II

- b. Otimizar modelos metabólicos computacionais à simulação da síntese de fucoxantina por *P. tricornutum*, através da adição de vias biossintéticas derivadas de pesquisas em bases de dados virtuais;
- c. Analisar os modelos metabólitos otimizados em software dedicado (Optflux) à simulação de fenótipos.

Capítulo III

- d. Identificar potenciais elicitores à biossíntese de fucoxantina por *P. tricornutum*;
- e. Identificar na literatura inibidores das enzimas apontadas pelos modelos metabólicos *in silico* como relevantes à otimização da síntese de fucoxantina;
- f. Determinar a curva de crescimento *in vitro* de *P. tricornutum*;
- g. Determinar *in vitro* o efeito dos potenciais inibidores enzimáticos selecionados sobre a produção de biomassa microalgal e biossíntese de fucoxantina;
- h. Determinar *in vitro* o efeito de radiação azul nos cultivos à biossíntese de fucoxantina por *P. tricornutum*;
- i. Purificar o composto fucoxantina a partir de culturas celulares otimizadas quanto à biossíntese daquele pigmento.

2 CAPÍTULO I – PRODUÇÃO *IN VITRO* DE FUCOXANTINA PELA DIATOMÁCEA *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

Este capítulo faz uma revisão bibliográfica com relação a biossíntese e obtenção de fucoxantina a partir do cultivo *in vitro* de *Phaeodactylum tricorutum*. Esta revisão foi publicada como um capítulo de livro e pode ser acessada em <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817901-7.00008-3>. Abaixo são mostrados o título original, autores, data da publicação e identificador DOI.



Studies in Natural Products Chemistry

Volume 63, 2019, Pages 211-242



Chapter 8 - *In vitro* fucoxanthin production by the *Phaeodactylum tricorutum* diatom

C.M. Bauer ^a, C. Schmitz ^a, R.G. Corrêa ^b, C.M. Herrera ^a, F. Ramlov ^a, E.R. Oliveira ^a, A. Pizzato ^a, L.A.C. Varela ^a, D.Q. Cabral ^a, R.A. Yunes ^a, R.G. Lopes ^c, H. Cella ^c, M. Rocha ^d, L.R. Rorig ^b, R.B. Derner ^c, P.C. Abreu ^a, M. Maraschin ^a ✉

- ^a Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil
- ^b Phycology Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil
- ^c Algae Cultivation Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil
- ^d Biological Engineering Centre, Engineering School, University of Minho, Braga, Portugal
- ^e Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, Brazil

Available online 14 November 2019.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817901-7.00008-3>

2.1 INTRODUÇÃO

A microalga *Phaeodactylum tricornutum*, uma diatomácea penada primeiramente identificada por Knut Harald Bohlin em 1897, é reconhecida como uma espécie marinha (Guiry & Guiry, 2017) e foi uma das duas primeiras diatomáceas que tiveram seu genoma sequenciado (Bowler et al., 2008), o que serviu para modelar sistemas utilizados em investigações genéticas e bioquímicas.

Dentre os principais compostos com alto valor econômico produzidos por esta microalga pode-se destacar o ácido eicosapentaenóico (EPA) (Chen et al., 2017, Gao et al., 2017, Wu et al., 2016) e o pigmento fucoxantina (Gao et al., 2017, Gómez-Loredo et al., 2016, Alipanah et al., 2015), os quais apresentam diversas atividades biológicas importantes.

Fucoxantina é um pigmento oxicarotenoide produzido por macro e microalgas no ambiente marinho. Algumas espécies como *Saccharina japonica*, *Undaria pinnatifida* e *Sargassum fusiforme* são fontes industriais de fucoxantina (Xiao et al., 2012). Outras espécies como *Isochrysis galbana*, *Himantalia elongata*, *Sargassum horneri*, *Kjellmaniella crassifolia*, *Alaria crassifolia*, *Stephanocystis hakodatensis*, *Myagropsis myagroides* e *Dictyota coriacea* são relatadas como fontes potenciais deste pigmento (Kim et al., 2012b, Xiao et al., 2012, Heo et al., 2010).

Em organismos fotoautotróficos, a fucoxantina desempenha um importante papel na captação de luz formando juntamente com as clorofilas os complexos antena localizados nos tilacoides (Sachindra et al., 2007, Dambek et al., 2012).

Em microalgas, a concentração de fucoxantina pode chegar a 26,6 mg por grama de biomassa seca (Gómez-Loredo et al., 2016, Kim et al., 2012a, Eilers et al., 2016, Petrushkina et al., 2017), sendo que na microalga *P. tricornutum* conteúdos em torno de 15 mg por grama de biomassa seca têm sido relatados (Kim et al., 2012a).

Até o ano de 2018 não havia registros da produção comercial de fucoxantina por microalgas. Naquele ano, a empresa israelense Algatechnologies Ltd. lançou no mercado o produto patenteado Fucovital®, composto de uma oleoresina com 3% de fucoxantina produzida e extraída de uma cepa de *P. tricornutum* em sistemas fechados sob luz natural (<https://www.prnewswire.com/news-releases/algatech-launches-fucovital-a-fucoxanthin-from-microalgae-300658942.html> - acessado em 6 de Junho, 2018). A seguir, algumas características desta espécie com relação à produção de fucoxantina, e.g., metabolismo, condições de cultivo, nutrientes, radiação, temperatura, pH e aeração são destacadas, além dos

processos de coleta da biomassa, extração e purificação do pigmento. Finalmente, devido aos avanços da bioinformática, alguns dos estudos mais recentes que podem ser úteis em aplicações visando a produção de fucoxantina nessa espécie também são enfatizados.

2.2 BIOSÍNTESE DE FUCOXANTINA E METABOLISMO DE DIATOMÁCEAS

Diversos estudos relativos ao metabolismo de diatomáceas vêm realocando vias metabólicas e processos regulatórios e descobrindo ciclos e vias que se pensava inexistentes em diatomáceas como, por exemplo, a presença do ciclo da ureia (Matsuda et al., 2017, Gruber et al., 2017).

P. tricornutum faz uso da via metileritritol 4-fosfato (MEP) nos plastídios para a síntese de isoprenoides a partir do gliceraldeído 3-fosfato (G3P) e piruvato, formando 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (Huang et al., 2017). A partir deste ponto, ocorre a formação de alguns intermediários que levam à síntese de fitoeno catalizada pela fitoeno sintase (PSY), uma enzima regulatória associada às vias biossintéticas de carotenoides e xantofilas. A enzima PSY é encontrada em organismos fotossintéticos e é considerada uma enzima chave na biossíntese de carotenoides, sendo portanto, um alvo molecular à engenharia metabólica de *P. tricornutum*. Kadono et al., 2015 reportaram um aumento proporcional de carotenoides com transcritos da enzima PSY na cepa NR1A-0065 de *P. tricornutum*. Eilers et al., 2016 obtiveram incremento do teor de fucoxantina de 1.8 vez em cepas de *P. tricornutum* transformadas com cópias adicionais de genes responsáveis pela síntese de PSY.

Devido a sua localização e função na captação de luz, a biossíntese de fucoxantina está relacionada à fotoproteção e ao ciclo das xantofilas (Huang et al., 2017). Além disso, em função das rápidas e constantes mudanças das condições de luz sob a água, diatomáceas desenvolveram estratégias para otimizar a captação de energia luminosa. Estes organismos apresentam mecanismos de proteção do aparato fotossintético, sendo o ciclo das xantofilas um importante componente deste (Ragni et al., 2007, Anning et al., 2000, Nymark et al., 2009), aonde a violaxantina se converte em zeaxantina e subsequentemente a diadinoxantina (Lohr & Wilhelm, 1999, Lavaud et al., 2012).

A via de biossíntese da fucoxantina ainda não é completamente elucidada, mas duas hipóteses são atualmente discutidas (Lohr & Wilhelm, 1999, Dambek et al., 2012). Numa primeira abordagem, conforme Lohr & Wilhelm, 1999, a partir da violaxantina ocorre a formação de diadinoxantina que dará origem à fucoxantina. De outra forma na hipótese de

Dambek et al., 2012 a violaxantina será convertida à neoxantina, a qual formará a fucoxantina.

2.2.1 Estratégias de cultivo

Cepas não modificadas de *P. tricornutum* podem crescer sob condições fotoautotróficas e mixotróficas, em sistemas abertos e fechados, sob luz natural ou artificial. Além disto, expressam vias de biossíntese de fucoxantina de forma eficiente sob diversos tipos de elicitores ou fatores estressantes como, por exemplo, condições alteradas de radiação e aporte de nutrientes (Gao et al., 2017, Gómez-Loredo et al., 2016).

Atualmente, o procedimento mais comum para cultivar *P. tricornutum* à produção de fucoxantina considera o uso de condições de crescimento autotrófico em fotobiorreatores (PBRs). Os fotobiorreatores típicos usados nesses sistemas de cultivo incluem frascos de vidro, cilindros e painéis planos, fotobiorreatores de coluna de bolhas e do tipo *air lift*, com maiores teores de fucoxantina observados na fase de crescimento, em torno do oitavo dia de cultivo (Gao et al., 2017, Gómez-Loredo et al., 2016).

Estas estratégias de cultivo foram detalhadas e organizadas em material suplementar e podem ser acessadas por completo em <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817901-7.00008-3>.

Cultivos heterotróficos microalgais têm mostrado grande potencial como sistemas de produção de compostos com alto valor econômico como pigmentos (Cerón-García et al., 2006). No entanto, cepas não modificadas de *P. tricornutum* são incapazes de crescer em condições heterotróficas, uma vez que diatomáceas são espécies fotoautotróficas obrigatórias (Cerón-García et al., 2006, Hamilton et al., 2016). Neste contexto, a engenharia metabólica tem sido considerada uma ferramenta poderosa à superação desses limites. A primeira modificação genética da microalga *P. tricornutum* foi descrita por Zaslavskaja et al., 2001, envolvendo a produção de uma cepa transgênica heterotrófica.

Com relação aos meios de cultivo, observa-se que o meio de cultura f/2 tem sido o meio mais utilizado para *P. tricornutum*, com algumas pequenas modificações em sua composição em alguns estudos (Alipanah et al., 2015, Kim et al., 2012a, Peng et al., 2011, Xiao et al., 2012, Kawee-ai et al., 2013, Anning et al., 2000, Nogueira et al., 2015). No que

tange à temperatura, a microalga cresce bem a 20°C (Jiang et al., 2004), desacelerando seu crescimento sob condições térmicas mais altas ou mais baixas (Nogueira et al., 2015, Jiang et al., 2004). Com relação à irradiância, a produção de fucoxantina em cultivos de *P. tricornutum* tem sido realizada sob uma amplitude de valores, e.g., 13.5, 30, 40 e 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Kim et al., 2012a, Kim et al., 2012b, Eilers et al., 2016, Kawee-ai et al., 2013, Ragni et al., 2017, Domingues et al., 2012, Peng et al., 2011, Gómez-Loredo et al., 2016). No entanto, a definição de uma condição ótima de irradiância à biossíntese de fucoxantina torna-se difícil quando da comparação das condições experimentais descritas na literatura, devido à variação destas. Por fim, culturas de *P. tricornutum* parecem produzir fucoxantina em maiores quantidades sob sistemas aerados, comparativamente aos sistemas em agitação sem aeração (Gómez-Loredo et al., 2016).

2.3 ELICITORES E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE FUCOXANTINA EM CULTIVOS DE *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

Como descrito anteriormente, é reconhecido o fato de que a biossíntese de carotenoides sofre variações consoante aos fatores ambientais aos quais as células estão expostas. Assim, o efeito dos elicitores na biossíntese daquele oxicarotenoide é um alvo biotecnológico recorrente, sendo que fatores como deficiências nutricionais (nitrogênio e ferro, por exemplo) e os efeitos reguladores da luz (intensidade, frequência e tempo de exposição) têm sido investigados (Lavaud et al., 2012, Coesel et al., 2008, Allen et al., 2008).

2.3.1 Condições de luz

Organismos fotossintéticos desenvolveram estratégias de proteção às variações e excesso de luz. Duas destas estratégias, muitas vezes utilizadas como sinônimos, são a fotoadaptação e a fotoaclimatação. No entanto, fotoaclimatação pode ser pensada como alterações no fenótipo em resposta a variáveis ambientais que ocorrem durante o ciclo de vida da célula. Por sua vez, o termo fotoadaptação é mais utilizado para alterações no genótipo que ocorrem em escala evolucionária (Falkowski & Roche, 1991).

Fotoaclimação

No processo de fotoaclimação as células usualmente promovem ajustes na quantidade de pigmentos associados ao processo fotossintético. Células aclimatadas em altas irradiâncias geralmente apresentam baixos conteúdos de fucoxantina, em contraste a outros pigmentos envolvidos na fotoproteção (Dubinski & Stambler, 2009). Assim, pode-se dividir os tipos de pigmentos em dois grupos: *i*) os que atuam como captadores de luz para os fotossistemas e *ii*) aqueles que atuam como fotoprotetores. Isto é especialmente importante quando se pretende quantificar os carotenoides em determinada espécie, uma vez que o conteúdo de carotenoides totais pode se manter constante em diversas condições de luz, em contraste com cada um dos carotenoides em particular que são diferentemente afetados pelas condições de luz.

Foto-adaptação

Diatomáceas estão especialmente sujeitas a mudanças no espectro de luz solar por flutuarem em diversas profundidades na água, notadamente quanto as radiações nas regiões do azul e do vermelho (Wagner et al., 2006). Coesel et al., 2008 reportam que especialmente a luz azul controla a expressão de vários genes, inclusive aquele que codifica para a PSY. Ainda, Costa et al., 2013 reportam uma diminuição nos conteúdos de fucoxantina, diadinoxantina e clorofila *c* quando células de *P. tricornutum* foram expostas à luz vermelha.

2.4 FUCOXANTINA – EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ESTABILIDADE

O interesse na fucoxantina (i.e, éster do ácido acético [(1*S*, 3*R*)-3-hidroxi-4-[(3*E*, 5*E*, 7*E*, 9*E*, 11*E*, 13*E*, 15*E*)-18-[(1*S*, 4*S*, 6*R*)-4-hidroxi-2, 2, 6-trimetil-7-oxabicyclo[4. 1. 0]heptan-1-il]-3, 7, 12, 16-tetrametil-17-oxooctadeca-1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15-octaenilidene]-3, 5, 5-trimetilciclohexil] – C₄₂H₅₈O₆, massa molar = 658,920 g.mol⁻¹), baseia-se principalmente em suas atividades farmacológicas como, por exemplo, antitumoral (Hosokawa et al., 1999), antidiabética e anti-obesidade (Maeda et al., 2007), anti-inflamatória e antioxidante (Shiratori et al., 2005, Pangestuti et al., 2011, D’Orazio et al., 2012, Xia et al., 2013). Por não ser uma molécula completamente apolar, mas apresentar uma natureza mais lipofílica, os processos de

extração de fucoxantina geralmente usam solventes orgânicos como acetona, etanol, metanol e suas misturas.

A acetona tem sido o solvente mais utilizado na extração de pigmentos marinhos, mas para extração de fucoxantina a partir de microalgas melhores resultados de recuperação do pigmento têm sido obtidos com o uso de metanol e etanol (Kim et al., 2012a, Butnariu, 2016, Xia, 2013).

Além do uso de solventes orgânicos, os protocolos de extração de fucoxantina adotam diferentes técnicas, como a extração líquida pressurizada (PLE), extração por solvente assistida por microondas (MAE), extração assistida por ultrassom (EAU) (Gilbert-López et al., 2017) e extração com fluido supercrítico (SFE). No entanto, a grande maioria dos estudos simplesmente emprega uma extração sólido-líquido convencional, preferencialmente biomassa liofilizada macerada em nitrogênio líquido antes da extração mecânica com organosolvente sob agitação.

Estudos recentes em nosso laboratório (dados não publicados) mostraram ser possível recuperar a partir de biomassa seca de *P. tricornutum* (1g, peso seco) até 104.21 mg de carotenoides totais e 34.24 mg de fucoxantina, por extração exaustiva com metanol. Neste caso, a biomassa pré-liofilizada foi submetida à extração por cinco vezes, sob agitação, em temperatura ambiente (~28°C) até que a absorbância dos extratos ($\lambda=450\text{nm}$) se mostrou desprezível em relação à primeira extração (nesta situação, a cor da biomassa também pode ser utilizada como parâmetro quando esta adquire tons mais esbranquiçados). Carotenoides totais foram determinados por espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis) enquanto a fucoxantina foi identificada e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por comparação dos tempos de retenção e curva-padrão do padrão comercial adquirido, sob as mesmas condições experimentais. De interesse, ressalta-se que um dos trabalhos de referência em extração de fucoxantina de *P. tricornutum* reporta um valor de 15.71 mg fucoxantina por grama de biomassa seca utilizando etanol como solvente (Kim et al., 2012a). Uma das razões para um maior valor de fucoxantina obtida em nosso experimento pode ser o fato de que as extrações foram conduzidas exaustivamente.

Sabe-se que os fatores mais críticos à estabilidade dos carotenoides, portanto da fucoxantina, são a exposição ao oxigênio, luz, altas temperaturas e meio ácido, pois o

pigmento pode ser alterado por oxidação enzimática e isomerização geométrica (Britton et al., 2004). A estabilidade dos extratos de carotenoides de *P. tricornutum*, em metanol e em óleo vegetal, neste caso óleo de canola, bem como de amostras de fucoxantina purificadas foi avaliada por nosso grupo de pesquisa. Verificou-se que por pelo menos 90 dias todas as amostras mostraram-se estáveis sob condições de armazenamento abaixo de -20°C (dados não publicados). Por outro lado, as amostras liofilizadas e conservadas à temperatura ambiente (28°C) apresentaram degradação antes de 30 dias de armazenamento, diferindo dos extratos e de fucoxantina purificada, ambos em metanol e óleo vegetal, armazenados a temperatura ambiente, os quais apresentaram-se estáveis. Pode-se, portanto, inferir que os óleos vegetais e solventes orgânicos exercem um efeito protetor nos carotenoides e fucoxantina dos extratos de *P. tricornutum*.

Para recuperar a fucoxantina purificada, um método eficiente de separação adotado é a cromatografia em coluna aberta de sílica gel, tendo *n*-hexano/acetona como eluentes (Xia et al., 2013). Ao longo da eluição com *n*-hexano/acetona, uma fase mais apolar que a fase estacionária de sílica, os pigmentos são recuperados na seguinte ordem: β -caroteno, clorofila *a*, diatoxantina, diadinoxantina, *cis*-fucoxantina, *trans*-fucoxantina e clorofila *c* (Xia et al., 2013).

Alguns protocolos de extração foram sumarizados e são mostrados em material suplementar disponível em <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817901-7.00008-3>.

2.5 FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS

O genoma sequenciado da microalga *P. tricornutum* permitiu o desenvolvimento de ferramentas na área de bioinformática úteis para predições *in silico* em diversas condições de cultivo. Uma ferramenta *in silico* importante para análise de vias bioquímicas é a análise de fluxo metabólico (FBA). Esta ferramenta permite a análise do fluxo de metabólitos por meio de uma reconstrução da rede metabólica na escala do genoma, que contém todas as reações metabólicas e genes conhecidos que codificam cada enzima para um organismo, possibilitando assim prever a taxa de crescimento de um organismo ou a taxa de produção de um determinado metabólito de interesse biotecnológico (Orth et al., 2010). No presente estudo

são destacados os dois modelos metabólicos recentemente publicados para a diatomácea *P. tricornutum*, um deles desenvolvido por Kim et al., 2016 e o outro por Levering et al., 2016.

O modelo publicado por Kim et al., 2016, permite a simulação do fluxo metabólico de *P. tricornutum* sob condições autotróficas, mixotróficas e heterotróficas tendo validado alguns resultados com dados experimentais. Com relação à produção de fucoxantina, este modelo contém 19 reações, considerando a via do metileritritol 4-fosfato, onde piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (G3P) são precursores de geranylgeranyl difosfato (GGDP). Este modelo foi acrescentado com mais 30 reações para a via dos carotenoides que levam a produção de fucoxantina (Bauer et al., 2018), as quais foram pesquisadas nas bases de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg>) e DiatomCyc (<http://www.diatomcyc.org>). O modelo foi submetido ao software OptFlux (Rocha et al., 2010) para simulações de fenótipos e cepas modificadas *in silico*.

Na publicação de Levering et al., 2016, dois modelos estão disponíveis, sendo um mais completo com relação às vias relacionadas ao metabolismo de lipídios. Os dois modelos já trazem as vias conhecidas para a carotenogênese e a biossíntese de fucoxantina.

Alguns resultados prévios deste trabalho podem ser encontrados em material suplementar disponível em <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817901-7.00008-3>.

2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista do exposto, pode-se ter uma idéia das possíveis condições que contribuem para melhorar a produção de fucoxantina em cultivos de células de *P. tricornutum*.

Até o momento, as cepas do tipo selvagem não são capazes de crescer em meio de cultura contendo carbono orgânico, de modo que as culturas de cepas do tipo selvagem precisam ser pensadas em termos de sistemas de cultivo autotróficos ou mixotróficos à produção de biomassa e fucoxantina. Por sua vez, a engenharia genética pode ser muito promissora para trazer uma solução nessa direção, através da construção de novas linhagens de *P. tricornutum* com produção otimizada daquele oxicarotenoide. Neste contexto, a bioinformática é grande aliada porque permite a simulação *in silico* das cepas modificadas

geneticamente, em momentos anteriores aos experimentos *in vitro*, buscando validar bioquimicamente os fenótipos gerados nos modelos *in silico*.

Finalmente, levando em consideração o volume de informações e previsões obtidas pela anotação do genoma, uma série de estudos feitos *in silico* reivindica validação experimental, i.e., bioquímica, para que novos resultados biotecnológicos possam surgir.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIPANAH, L, ROHLOFF, J, WINGE, P, BONES, A, BREMBU, T. **Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*.** *J.Exp.Bot.* 66: 6281–6296, 2015.
- ALLEN, A E, LAROCHE, J, MAHESWARI, U, LOMMER, M, SCHAUER, N, LOPEZ, P J, FINAZZI, G, FERNIE, A R, BOWLER, C. **Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum* to iron starvation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 10438–10443, 2008.
- ALLEN, A E, DUPONT, C L, et al. **Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms.** *Nature* 473(7346): 203-207, 2011.
- ANNING, T, MACINTYRE, H L, PRATT, S M, SAMMES, P J, GIBB, S, GEIDER, R J. **Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*.** *Limnol. Oceanogr.* 45: 1807–1817, 2000.
- BAUER, C M, VILAÇA, P, RAMLOV, F, OLIVEIRA, E R, CABRAL, D Q, SCHMITZ, C, CORRÊA, R G, ROCHA, M, MARASCHIN, M. **In silico predictions for fucoxanthin production by the diatom *Phaeodactylum tricorutum*.** *Practical Applications of Computational Biology and Bioinformatics, 12th International Conference - Advances in intelligent systems and computing* 803: 139-148, 2018.
- BOWLER, C, ALLEN, A E, BADGER, J H, GRIMWOOD, J, JABBARI, K, KUO, A, MAHESWARI, U, MARTENS, C, MAUMUS, F, OTILLAR, R P, RAYKO, E, SALAMOV, A, VANDEPOELE, K, BESZTERI, B, GRUBER, A, HEIJDE, M, KATINKA, M, MOCK, T, VALENTIN, K, VERRET, F, BERGES, J A, BROWNLEE, C, CADORET, J P, CHIOVITTI, A, CHOI, C J, COESEL, S, MARTINO, A D, DETTER, J C, DURKIN, C, FALCIATORE, A, FOURNET, J, HARUTA, M, HUYSMAN, M J J, JENKINS, B D, JIROUTOVA, K, JORGENSEN, R E, JOUBERT, Y, KAPLAN, A, KROGER, N, KROTH, P G, ROCHE, J L, LINDQUIST, E, LOMMER, M, MARTIN-JÉZÉQUEL, V, LOPEZ, P J, LUCAS, S, MANGOGNA, M, MCGINNIS, K, MEDLIN, L K, MONTSANT, M P O L, SECQ, NAPOLI, C, OBORNIK, M, PARKER, M S, PETIT, J L, PORCEL, B M, POULSEN, N, ROBISON, M, RYCHLEWSKI, L, RYNEARSON, T A, SCHMUTZ, J, SHAPIRO, H, SIAUT, M, STANLEY, M, SUSSMAN, M R, TAYLOR, A R, VARDI, A, DASSOW, V, VYVERMAN, W, WILLIS, A, WYRWICZ, L S, ROKHSAR, D S, WEISSENBACH, J, ARMBRUST, E V, GREEN, B R, PEER, Y V, GRIGORIEV, I V. **The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes.** *Nature* 456: 239–244, 2008.
- BRITTON, G, KHACHIK, F, IN: BRITTON, G, LIAAEN-JENSEN, S, PFANDER, H (Eds.). **Carotenoids.** Birkhäuser-Basel 5, pp. 45–65, 2004.
- BUTNARIU, M. **Methods of analysis (extraction, separation, identification and quantification) of carotenoids from natural products.** *J. Ecosyst. Ecography* 6: 193, 2016.

- CERÓN-GARCÍA, M C, CAMACHO, F G, MIRON, A S, SEVILLA, J F, CHISTI, Y, GRIMA, E M, **Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources.** *Microbiol. Biotechnol.* 16: 689–694, 2006.
- CHEN, B, WAN, C, MEHMOOD, M A, CHANG, J S, BAI, F, ZHAO, X. **The diversity of CO₂⁻ concentrating mechanisms in marine diatoms as inferred from their genetic content.** *Bioresour. Technol.* 244: 198–1206, 2017.
- COESEL, S, OBORNÍK, M, VARELA, J, FALCIATORE, A, BOWLER, C. **Evolutionary origins and functions of the carotenoid biosynthetic pathway in marine diatoms.** *PLoS One* 3: e2896, 2008.
- COSTA, B S, JUNGANDREAS, A, JAKOB, T, WEISHEIT, W, MITTAG, M, WILHELM, C. **Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.** *J. Exp. Bot.* 64: 483–493, 2013.
- DAMBEK, M, EILERS, U, BREITENBACH, J, STEIGER, S, BÜCHEL, C, SANDMANN, G. **Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricornutum*.** *J. Exp. Bot.* 63: 5607–5612, 2012.
- DOMINGUES, N, MATOS, A R, SILVA, J M, CARTAXANA, P. **Response of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to photooxidative stress resulting from high light exposure.** *PLoS One* 7: e38162, 2012.
- D'ORAZIO, N, GEMELLO, E, GAMMONE, M A, GIROLAMO, M, FICONERI, C, RICCONI, G. **Fucoxantin: a treasure from the sea.** *Mar. Drugs* 10: 604–616, 2012.
- DUBINSKY, Z, STAMBLER, N. **Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications.** *Aquat. Microb. Ecol.* 56: 163–176, 2009.
- EILERS, U, BIKOULIS, A, BREITENBACH, J, BÜCHEL, C, SANDMAN, G. **Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornutum*.** *J. Appl. Phycol.* 28: 123–129, 2016.
- FALKOWSKI, P G, LA ROCHE, J. **Acclimation to spectral irradiance in algae.** *J. phycol.* 27 (1) 8–14, 1991.
- GAO, B, CHEN, A, ZHANG, W, LI, A, ZHANG, C. **Co-Production of lipids, eicosapentaenoic acid, fucoxanthin, and chrysolaminarin by *Phaeodactylum tricornutum* cultured in a flat-plate photobioreactor under varying nitrogen conditions.** *J. Ocean Univ. China* 16(5): 916–924, 2017.
- GILBERT-LÓPEZ, B, BARRANCO, A, HERRERO, M, CIFUENTES, A, IBÁÑEZ, E. **Development of new green processes for the recovery of bioactives from *Phaeodactylum tricornutum*.** *Food Res. Int.* 99: 1056–1065, 2017.
- GÓMEZ-LOREDO, A, BENAVIDES, J, RITO-PALOMARES, M. J. **Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* cultures at different light and agitation conditions.** *Appl. Phycol.* 28: 849–860, 2016.

GRUBER, A, KROTH, P G. **Intracellular metabolic pathway distribution in diatoms and tools for genome-enabled experimental diatom research.** *Philos. Trans. R. Soc. B* 372: 20160402, 2017.

GUIRY, M D em GUIRY, M D & GUIRY, G M. **AlgaeBase.** *World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.* <http://www.algaebase.org>. Acessado em 1 de dezembro de 2017.

HAMILTON, M, POWERS, S, NAPIER, J, SAYANOVA, S. **Heterotrophic production of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids by trophically converted marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*.** *Mar. Drugs*: 14, 53, 2016.

HEO, S J, YOON, W J, KIM, K N, AHN, G N, KANG, M, KANG, D H, AFFAN, A, OH, C, YOUNG, W K, JEON, Y J. **Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages.** *FoodChem.Toxicol.* 48: 2045–2051, 2010.

HUANG, J J, LIN, S, XU, W, CHEUNG, P C K. **Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton.** *Biotechnol. Adv.* 35: 597–618, 2017.

JIANG, H, GAO, K. **Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae).** *J. Phycol.* 40: 651–654, 2004.

KADONO, T, MIYAGAWA-YAMAGUCHI, A, KIRA, N, TOMARU, Y, OKAMI, T, YOSHIMATSU, T, HOU, L, OHAMA, T, FUKUNAGA, K, OKAUCHI, M, YAMAGUCHI, H, OHNISHI, K, FALCIATORE, A, ADACHI, M. **Characterization of marine diatom-infecting virus promoters in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*.** *Sci.Rep.* 5: 18708, 2015.

KAWEE-AI, A, KUNTIYA, A, KIM, S M. **Anticholinesterase and antioxidant activities of fucoxanthin purified from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*.** *Nat. Prod. Commun.* 8: 1381–1386, 2013.

KIM, S M **A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalgae *Phaeodactylum tricornutum*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166: 1843-18, 2012a.

KIM, S M, KANG, S W, KWON, O N, CHUNG, D, PAN, C. **Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: characterization of extraction for commercial application.** *J Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55: 477–483, 2012b.

KIM, J, FABRIS, M, BAART, G, KIM, M K, GOOSSENS, A, VYVERMAN, W, FALKOWSKI, P G, LUN, D, S. **Flux balance analysis of primary metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.** *Plant J.* 85: 161–176, 2016.

LAVAUD, J, MATERNA, A C, STURM, S, VUGRINEC, S, KROTH, P G. **Silencing of the violaxanthin de-epoxidase gene in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* reduces diatoxanthin synthesis and non-photochemical quenching.** *PLoSOne* 7: e36806, 2012.

LEVERING, J, BRODDRICK, J, DUPONT, C L, PEERS, G, BEERI, K, MAYERS, J, GALLINA, A A, ALLEN, A E, PALSSON, B O, ZENGLER, K. **Genome-scale model reveals metabolic basis of biomass partitioning in a model diatom.** *PLoSOne* 11: e0155038, 2016.

LOHR, M, WILHELM, C. **Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 8784–8789, 1999.

MAEDA, H, HOSOKAWA, M, SASHIMA, T, MIYASHITA, K. **Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-A^y Mice.** *J. Agric. Food Chem.* 55: 7701–7706, 2007.

MATSUDA, Y, HOPKINSON, B, M, NAKAJIMA, K, DUPONT, C L, TSUJI, Y. **Mechanisms of carbon dioxide acquisition and CO₂ sensing in marine diatoms: a gateway to carbon metabolism.** *Philos. Trans. R. Soc. B* 372: 20160403, 2017.

NOGUEIRA, D P K, SILVA, A F, ARAÚJO, O Q F, CHALOUB, R M. **Impact of temperature and light intensity on triacylglycerol accumulation in marine microalgae.** *Biomass Bioenergy* 72: 280–287, 2015.

NYMARK, M, VALLE, K C, HANCKE, K, WINGE, P, ANDRESEN, K, JOHNSEN, G, BONES, A M, BREMBU, T. **An integrated analysis of molecular acclimation to high light in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*.** *PLoSOne* 3: 1–19, 2009.

ORTH, J D, THIELE, I, PALSSON, B, Ø. **What is flux balance analysis?** *Nat. Biotechnol.* 28: 245–248, 2010.

PANGESTUTI, R, KIM, S K. **Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae.** *Funct. Foods* 3: 255–266, 2011.

PENG, J, YUAN, J P, WU, C F, WANG, J H. **Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health.** *Mar.drugs* 9: 1806–1828, 2011.

PETRUSHKINA, M, GUSEV, E, SOROKIN, B, ZOTKO, N, MAMAEVA, A, FILIMONOVA, A, KULIKOVSKIY, M, MALTZEV, Y, YANPOLSKY, I, GUGLYA, E, VINOKUROV, V, NAMSARAEV, Z, KUZMIN, D. **Fucoxanthin production by heterokont microalgae.** *AlgalRes.* 24: 387–393, 2017.

RAGNI, M, D'ALCALÀ, M R. **Circadian variability in the photobiology of *Phaeodactylum tricornutum*: pigment content.** *J. Plankton Res.* 29: 141–156, 2007.

ROCHA, I, MAIA, P, EVANGELISTA, P, VILAÇA, P, SOARES, S, PINTO, J, P, NIELSEN, P, PATIL, K, R, FERREIRA, E C, ROCHA, M. **OptFlux: an open-source software platform for *in silico* metabolic engineering.** *BMC Syst. Biol.* 4, 45, 2010.

SACHINDRA, N M, SATO, E, MAEDA, H, HOSOKAWA, M, NIWANO, Y, KOHNO, M, MIYASHITA, K. **Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites.** *Agric.FoodChem* 55: 8516–8522, 2007.

- SHIRATORI, K, OHGAMI, K, ILIEVA, I, JINA, X H, KOYAMAB, Y, MIYASHITAC, K, YOSHIDAA, K, KASEA, S, OHNO, S. **Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo.** *Exp. Eye Res.* 81: 422–428, 2005.
- WAGNER, H, JAKOB, T, WILHELM, C. **Balancing the energy flow from captured light to biomass under fluctuating light conditions.** *New Phytol.* 169: 95–108, 2006.
- WEYMAN, P D, BEERI, K, LEFEBVRE, S C, RIVERA, J, MCCARTHY, J K, HEUBERGER, A L, PEERS, G, ALLEN, A E, DUPONT, C L. **Inactivation of *Phaeodactylum tricornutum* urease gene using transcription activator-like effector nuclease-based targeted mutagenesis.** *Plant Biotechnology Journal* 13: 460-470, 2015.
- WU, H, LI, T, WANG, G, DAI, S, HE, H, XIANG, W. **A comparative analysis of fatty acid composition and fucoxanthin content in six *Phaeodactylum tricornutum* strains from different origins.** *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 34: 391–398, 2016.
- XIA, S, WANG, K, WAN, L, LI, A, HU, Q, ZHANG, C. **Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*.** *Mar. Drugs.* 11: 2667–2681, 2013.
- XIAO, X, SI, X, YUAN, Z, XU, X, LI, G. **Isolation of fucoxanthin from edible brown algae by microwave-assisted extraction coupled with high-speed countercurrent chromatography.** *J.Sep.Sci.* 35: 2313–2317, 2012.
- ZASLAVSKAIA, L A, LIPPMEIER, J C, SHIH, C, EHRHARDT, D, GROSSMAN, A R. **Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering.** *Science* 292: 2073–2075, 2001.

3 CAPÍTULO II – PREDIÇÕES *IN SILICO* PARA A PRODUÇÃO DE FUCOXANTINA PELA DIATOMÁCEA *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

Este capítulo descreve o uso de ferramentas de bioinformática à análise preditiva de potenciais fatores que possam aumentar a produção de fucoxantina pela diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*. Alguns resultados derivados dos modelos *in silico* são apresentados e comentados. Este trabalho foi apresentado na 12ª Conferência Internacional sobre Aplicações Práticas de Biologia Computacional e Bioinformática, sendo disponível pela primeira vez *online* em 17 de agosto de 2018, e pode ser acessado em https://doi.org/10.1007/978-3-319-98702-6_17. Abaixo, título original, autores, data da publicação e identificador DOI.

In Silico* Predictions for Fucoxanthin Production by the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum

Claudia M. Bauer¹(✉), Paulo Vilaça², Fernanda Ramlov¹,
Eva Regina de Oliveira¹, Débora Q. Cabral¹, Caroline Schmitz¹,
Rafaela Gordo Corrêa³, Miguel Rocha⁴, and Marcelo Maraschin¹

¹ Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory,
Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil
clamonab@gmail.com

² Silico Life Lda., Braga, Portugal

³ Laboratory of Phycology, Federal University of Santa Catarina,
Florianópolis, Brazil

⁴ Centre Biological Engineering, School of Engineering,
University of Minho, Braga, Portugal
mrocha@di.uminho.pt

© Springer Nature Switzerland AG 2019
F. Fdez-Riverola et al. (Eds.): PACBB 2018, AISC 803, pp. 139–148, 2019.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-98702-6_17

3.1 INTRODUÇÃO

Dois modelos metabólicos baseados no genoma da microalga *P. triornutum* foram publicados em 2016 (Kim et al., 2016, Levering et al., 2016). O modelo publicado por Kim et al., previu fluxos intracelulares sob condições de crescimento autotrófico, mixotrófico e heterotrófico, contendo 849 reações e 587 metabólitos distribuídos em cinco compartimentos, isto é, citosol, matriz mitocondrial, estroma e lúmen do cloroplasto e peroxissomo. No que diz respeito à produção de fucoxantina, este modelo não possui as reações da via metabólica metileritritol 4-fosfato (MEP) que leva à produção de fucoxantina. Um segundo estudo (Levering et al., 2016) desenvolveu dois modelos metabólicos, em que um deles compreende uma gama mais completa de metabolismo lipídico, sendo que ambos contêm as reações de biossíntese de fucoxantina.

Este trabalho fez uso de dois modelos metabólicos (Kim et al., 2016, Levering et al., 2016), a fim de prever formas de aumentar a produção de fucoxantina, usando a análise de fluxo metabólico (FBA). Os resultados obtidos pelos dois modelos são comparados e discutidos.

3.1.1 Métodos

Primeiramente, o modelo disponibilizado por Kim et al., 2016 foi completado com 31 reações responsáveis pela via de biossíntese dos carotenoides. Estas foram pesquisadas em dois bancos de dados, i.e., Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg>) e DiatomCyc (<http://www.diatomcyc.org>) e adicionadas a este modelo para concluir a via metabólica do metileritritol 4-fosfato (MEP). A vias pesquisadas podem ser acessadas em https://doi.org/10.1007/978-3-319-98702-6_17.

O modelo modificado foi carregado no software OptFlux (Rocha et al., 2010) para realizar simulações *in silico*. Foram feitas simulações com relação ao suprimento de carbono inorgânico (CO_2 e HCO_3^-) e nitrogênio (ureia e NO_3^-). Posteriormente, o modelo de Levering et al., 2016, também foi utilizado no OptFlux para simulação de fenótipos e otimização da produção de fucoxantina como anteriormente.

De forma genérica, pode-se considerar duas formas de abordar a produção de fucoxantina, isto é, através do aumento da produção de biomassa e, portanto, também de fucoxantina, garantindo que sua produção seja acoplada à biomassa, ou ainda elicitando as células para direcionar seu metabolismo à produção de fucoxantina. Assim, simulações de fenótipo são realizadas principalmente para obter incrementos de biomassa, utilizando meios de cultivo otimizados, com combinações de diversas fontes de carbono e nitrogênio. Por outro lado, algoritmos de otimização para cepas modificadas são usados para identificar formas de aprimorar a biossíntese da fucoxantina via modificações genéticas.

Para realizar as simulações de fenótipos e a otimização de cepas modificadas, os parâmetros para a produção de biomassa e fucoxantina foram estabelecidos por meio de uma simulação com as condições originais dos modelos metabólicos supracitados em relação às reações a serem restringidas posteriormente. Estas condições estão disponíveis em https://doi.org/10.1007/978-3-319-98702-6_17.

3.1.2 Resultados e Discussão

Os resultados das simulações para o aumento de biomassa foram quase idênticos para ambos os modelos e estão disponíveis na íntegra em https://doi.org/10.1007/978-3-319-98702-6_17. O fluxo de biomassa aumentou substancialmente com o fornecimento duplicado de carbono inorgânico, ou seja, 67%, 33% e 100% para CO_2 , HCO_3^- e $\text{CO}_2+\text{HCO}_3^-$, respectivamente, e 77% para o dobro do aporte de ureia. O metabolismo da ureia libera $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ e CO_2 , sendo o excedente de CO_2 possivelmente o responsável pelo aumento da biomassa. Nas condições simuladas, sem alteração no aporte de fósforo, os resultados apontam para um limite na absorção de NO_3^- , em torno de $0,15 \text{ mmol g MS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Kim et al., 2016) e $0,21 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Levering et al., 2016), já que acima destes valores o fluxo de biomassa não apresentou alteração.

De acordo com os resultados dos modelos estudados, é possível aumentar a produção de biomassa fornecendo nitrogênio e carbono inorgânico, sendo os melhores resultados obtidos quando da combinação de CO_2 e HCO_3^- , ou ainda com a suplementação do meio de cultura com nitrogênio na forma orgânica, i.e., ureia. O incremento no fluxo de

biomassa decorrente das alterações no aporte de carbono e nitrogênio foi numericamente equivalente nos dois modelos testados. Ao contrário dos metazoários que utilizam o ciclo da ureia para excretar nitrogênio, as diatomáceas utilizam esta via para sintetizar compostos nitrogenados (Allen et al., 2011). Assim, neste trabalho foi possível aumentar não só a biomassa microalgal, mas também a produção de fucoxantina com o aporte de ureia.

Os resultados selecionados da otimização de cepas modificadas de *P. tricornutum* à produção de fucoxantina no *software* OptFlux podem ser acessados em https://doi.org/10.1007/978-3-319-98702-6_17. Nos dois modelos submetidos, o fluxo de fucoxantina em cepas não modificadas (i.e., controle) retornou valores muito baixos comparativamente às cepas modificadas. De fato, para o primeiro modelo (Kim et al., 2016) nenhuma produção de fucoxantina foi observada sem a otimização das vias metabólicas. Como as otimizações retornam inúmeras soluções possíveis, neste trabalho destacamos algumas delas para futuros ensaios *in vitro*. Desconsiderando as reações de transporte, os melhores resultados à biossíntese de fucoxantina nos dois modelos foram direcionados para inibir as reações das enzimas nitrito redutase (NR) (EC 1.7.7.1), glutamina sintase (GS) (EC 6.3.1.2) e glutamato sintase (GOGAT) (EC 1.4.7.1) todas elas ocorrendo em ambiente de plastídios. Para o modelo de Kim et al., 2016, inibir a piruvato-fosfato dikinase (PPDK) (EC 2.7.9.1), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3Pd) (EC 1.2.1.12) e triose-fosfato isomerase (TPI) (EC 5.3.1.1) também foram consideradas boas soluções. NR, bem como GS e GOGAT estão envolvidas na biossíntese de aminoácidos e a inibição das reações por elas catalisadas resulta em maior poder redutor livre nos plastídios à biossíntese de fucoxantina. A inibição da PPDK, por sua vez, impede a síntese de fosfoenolpiruvato (PEP), disponibilizando maior quantidade de piruvato livre à via do metileritritol 4-fosfato (MEP). A G3Pd e a TPI, por sua vez, uma vez inibidas, impedem o catabolismo do G3P disponibilizando mais G3P livre à via do MEP. Estes são precursores importantes na biossíntese da fucoxantina.

3.1.3 Conclusões

Para os dois modelos metabólicos testados *in silico*, o incremento da biomassa de *P. tricornutum* foi observado em praticamente todas as fontes de nutrientes simuladas, com exceção para o NO_3^- . Os melhores resultados foram obtidos com a combinação de

$\text{CO}_2 + \text{HCO}_3^-$ e também com ureia. Com relação as cepas modificadas à otimização da produção de fucoxantina simuladas no OptFlux, alguns dos melhores resultados selecionados apontam para enzimas envolvidas no metabolismo da assimilação de piruvato, um precursor da via do MEP e enzimas relacionadas a biossíntese de aminoácidos.

3.2 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KIM, J, FABRIS, M, BAART, G, et al. **Flux balance analysis of primary metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.** *Plant J* 85(1): 161–176, 2016.

LEVERING, J, BRODDRICK, J, et al. **Genome-scale model reveals metabolic basis of biomass partitioning in a model diatom.** *PLoS One* 11(5): e0155038, 2016.

ROCHA, I, MAIA, P, et al. **Optflux: an open-source software platform for *in silico* metabolic engineering.** *BMC Sys Biol* 4, 45, 2010.

ALLEN, A E, DUPONT, C L, et al. **Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms.** *Nature* 473(7346): 203-207, 2011.

4 CAPÍTULO III – PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FUCOXANTINA DE CULTIVOS *IN VITRO* DE *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

4.1 INTRODUÇÃO

As ferramentas computacionais exploradas no capítulo anterior foram utilizadas para a escolha de determinadas condições de cultivos com potencial para aumentar a produção de fucoxantina pela microalga *P. tricornutum*, tanto por um aumento na produção de biomassa, como por um direcionamento do metabolismo da microalga para maior biossíntese daquele metabólito secundário. Adicionalmente, por se tratar de uma espécie autotrófica, algumas modificações nas condições de iluminação também foram testadas visando a radiação no comprimento de onda na faixa da radiação azul. Por fim, o tratamento que melhor resultou no aumento da produção de fucoxantina foi repetido na intenção de obter biomassa em quantidade suficiente à purificação de fucoxantina, fazendo-se uso de técnicas cromatográficas.

4.1.1 Materiais e Métodos

Os procedimentos relativos aos cultivos *in vitro*, preparação de amostras, extração de metabólitos e as técnicas cromatográficas foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil).

4.1.1.1 Cepa, manutenção dos cultivos e preparação das amostras

Para os cultivos *in vitro*, foi utilizada a cepa de *P. tricornutum*, CCAP1055/1, da coleção do Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAFIC-UFSC), gentilmente fornecida pelo Prof. Leonardo R. Rörig (CCB-UFSC).

Os cultivos da microalga foram mantidos em erlenmeyers (500 mL) contendo 400 mL de meio de cultura *f/2* (Guillard, 1975) formulado com água marinha natural filtrada e autoclavada, em câmaras de cultivo à 21°C, ciclo de luz de 12h e irradiância de 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes (36 w). A agitação dos cultivos foi

proporcionada por injeção constante de ar atmosférico. Inicialmente determinou-se a curva de crescimento nas condições descritas acima, de modo a identificar-se o melhor momento de recuperação da biomassa dos cultivos. Os cultivos foram renovados semanalmente (7/7 dias), utilizando 20% do volume do inóculo a cada subcultivo.

As amostras de *P. tricornutum* foram coletadas por centrifugação (10 min, 4000 rpm), dessalinizadas por imersão breve (5 min) em solução de formato de amônio (0,5 M, 3v), seguida por centrifugação (10 min, 4000 rpm, 4°C) e recuperação da biomassa. As amostras foram lavadas em água destilada (3v), centrifugadas (10 min, 4000 rpm, 4°C) e o sobrenadante foi descartado novamente. As amostras de biomassa dessalinizadas foram armazenadas a -80 ° C e posteriormente liofilizadas.

4.1.1.2 Experimentos

Os experimentos foram conduzidos sob as mesmas condições experimentais à manutenção das culturas celulares descritas acima, porém com a utilização de frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 200 mL de cultura. A cada dois dias, começando no primeiro dia dos experimentos, alíquotas (1 mL) dos cultivos foram coletadas, sempre no mesmo período, para contagem de células em câmara de Neubauer e determinação do pH e salinidade do meio de cultura. Considerando que diversos estudos apontam para o final da fase de crescimento exponencial como o momento de maior acúmulo de fucoxantina em cultivos de *P. tricornutum* (Carreto & Catoggio, 1976, Gómez-Loredo et al., 2016, Wang et al., 2012 e Gao et al., 2017) e também que a partir do 8º dia de cultivo foi observada a senescência das culturas celulares, amostras de biomassa de *P. tricornutum* foram coletadas para análise no 7º dia. O experimento com radiância foi realizado com quatro repetições e todos os demais experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata.

4.1.1.3 Condições de cultivo estabelecidas com o auxílio de ferramentas computacionais

Os dois modelos computacionais explorados no capítulo anterior (Kim et al., 2016 e Levering et al., 2016), este último modificado por Bauer et al., 2018 para as vias de biossíntese de carotenoides, foram processados no software OptFlux (Rocha et al., 2010), buscando

identificar potenciais fatores que possam aumentar a produção de biomassa de *P. tricornutum*. Além disto, através da simulação de cepas modificadas *in silico* objetivou-se um aumento na biossíntese de fucoxantina por aquele microrganismo.

Para simulações de fenótipos visando a maior produção de biomassa, os resultados obtidos de Bauer et al., 2018 mostraram que uma entrada de ureia ($1,5\text{mmol gMS}^{-1} \text{h}^{-1}$) pode melhorar significativamente a produção de biomassa de *P. tricornutum*. Assim, este composto foi escolhido para suplementação de nutrientes nos cultivos *in vitro* para produção de biomassa por causa de seu baixo custo e acessibilidade. Para otimização da produção de fucoxantina por cepas modificadas, alguns dos resultados retornados pelo software OptFlux, ou seja, reações a serem inibidas em cultivos *in vitro*, a fim de estimular a biossíntese da fucoxantina, foram selecionados e são mostrados na tabela 1.

Para inibir essas reações metabólicas no intuito de simular uma cepa modificada, potenciais inibidores das enzimas responsáveis pelas reações metabólicas identificadas *in silico* foram pesquisados no banco de dados BRENDA (tabela 1) e aplicados aos cultivos *in vitro*. Estes inibidores foram preferencialmente selecionados, quando possível, para atender a critérios de baixo custo, acessibilidade e baixa toxicidade. As demais etapas experimentais são detalhadas abaixo.

4.1.1.4 Cultivos *in vitro* com ureia e NiSO_4

Com base nos resultados *in silico* apontarem a ureia como um nutriente potencial para o aumento da biomassa de *P. tricornutum* e também considerando relatos na literatura (Yongmanitchai et al., 1991, Nur et al., 2019 e Anto et al., 2019) indicando aumentos relevantes da biomassa algal com a suplementação do meio de cultura com aquela forma nitrogenada em concentrações entre 5 e 20mM, três doses desta fonte de N foram escolhidas e testadas neste trabalho: 0,44 mM, 5 mM e 10 mM, e aplicadas aos cultivos já no primeiro dia do experimento. Nos cultivos que receberam ureia, o meio f/2 foi formulado sem a adição de NaNO_3 . A menor concentração de ureia utilizada (0,44mM) traz o mesmo equivalente em nitrogênio que o meio de cultura controle, contendo nitrogênio em sua forma oxidada, i.e., NaNO_3 . Portanto, a menor dose de ureia testada (0,44 mM) serviu como um referencial para

verificar se as eventuais diferenças de efeitos de tratamentos relacionam-se ao composto ureia especificamente, em vez de um simples aumento no fornecimento de nitrogênio. Além disso, estudos (Rees & Bekheet, 1982, Syrett & Peplinska, 1988) relatam a influência positiva do sulfato de níquel (NiSO_4) na dose de 0,01 mM sobre a assimilação da ureia por *P. tricornutum*. Assim, os efeitos dos tratamentos com ureia também foram avaliados considerando-se a suplementação ou não do meio de cultura com NiSO_4 (0,01 mM).

Os cultivos foram preparados utilizando-se como inóculo um volume de 20% dos cultivos repicados semanalmente e cada unidade experimental (frasco erlenmyer, 250 mL) recebeu 200 mL de cultura celular de *P. tricornutum*. As condições experimentais, variáveis analisadas nos cultivos e a recuperação da biomassa microalgal foram realizados conforme especificado nos itens 4.1.1.1 e 4.1.1.2, em triplicata.

4.1.1.5 Elicitando cultivos de *P. tricornutum* com inibidores enzimáticos

As enzimas são responsáveis por uma diversidade de reações que abrangem desde a captação e transporte de nutrientes até a conversão dos metabólitos nos espaços inter e intra-celulares. Como os eventos no metabolismo são encadeados, a supressão de uma única reação metabólica pode fazer com que uma célula reorganize seu metabolismo de forma a continuar funcional. Neste processo, não é incomum que células e organismos acumulem determinadas substâncias que muitas vezes são de interesse biotecnológico. Experimentalmente, para ser mais efetivo, este processo não deve ser feito de forma aleatória. Deve ser aplicado de forma racional, a partir de conhecimentos já obtidos ou destes gerados, e de preferência para a espécie de interesse.

Assim, nos modelos computacionais aqui utilizados, o metabolismo do organismo em questão, i.e., *P. tricornutum* é processado matematicamente, onde uma matriz matemática é construída com as reações metabólicas conhecidas e hipotéticas para a espécie. Esta matriz contém as reações, os metabólitos envolvidos e suas quantidades, i.e. estequiometria das reações, permitindo ao software uma análise quantitativa do fluxo de metabólitos. Ainda, para aproximar ao máximo o modelo metabólico *in silico* do que ocorre no organismo *in vivo*, os modelos computacionais definem alguns limites, como por exemplo, o de uma composição mínima para a estrutura da biomassa do organismo em termos de aminoácidos, pigmentos,

lipídios, açúcares, ácidos nucleicos e *pool* de ATP, e um limite máximo para a captação de nutrientes. Neste trabalho adotou-se limites máximos para a captação de CO_2 ($1,3 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{h}^{-1}$), HCO_3^- ($0,65 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{h}^{-1}$) e NO_3^- ($308,94 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{h}^{-1}$), números estes que são baseados em dados experimentais obtidos para a espécie em questão ou ainda de espécies afins (Kim et al., 2016, Levering et al., 2016).

Uma vez definidas estas condições, os modelos metabólicos *in silico* apontaram enzimas-chave para a otimização da biossíntese de fucoxantina em *P. tricornutum*. Assim, eventuais compostos inibidores e suas concentrações para as respectivas enzimas foram determinados de acordo com informações obtidas do banco de dados BRENDA (Tabela 1), a saber: piridoxal-5-fosfato ($62 \mu\text{M}$), carbonato de dietila (1 mM), piruvato de sódio ($0,5 \text{ mM}$), sulfato de amônio ($0,5 \text{ mM}$), cloreto de manganês ($0,5 \text{ mM}$), sulfato de cobre ($0,5 \text{ mM}$), EDTA dissódico ($0,5 \text{ mM}$), quercetina ($0,1 \text{ mM}$), prednisolona ($0,26 \text{ mM}$) e fosfato de potássio ($2,5 \text{ mM}$). Os cultivos foram preparados e conduzidos conforme descrito acima (item 4.1.1.2), em triplicata, sendo que os potenciais inibidores foram aplicados no primeiro dia do experimento.

4.1.1.6 Cultivos *in vitro* com aplicação de radiação na faixa do azul

Os cultivos celulares foram preparados e conduzidos conforme acima descrito (itens 4.1.1.1 e 4.1.1.2). Três condições de radiação foram testadas em câmaras de cultivo à 21°C , ciclo de luz de 12h e agitação dos cultivos proporcionada por injeção constante de ar atmosférico. Os cultivos do grupo controle receberam irradiância ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de lâmpadas fluorescentes (36W). Um segundo lote recebeu irradiância ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de lâmpadas fluorescentes (36W) associada com a irradiância de lâmpadas do tipo LED (14.4W) (light-emitting diode) ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) na cor azul e um terceiro lote recebeu somente a irradiância de lâmpadas do tipo LED (14.4W) ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) na cor azul. Cada tratamento foi realizado com quatro repetições. O espectro de radiação da luz azul abrange os comprimentos de onda de 475-555nm e foi medido com sensor quântico submersível (US-SQS/L, H. Walz, Effeltrich, Germany) acoplado ao quantômetro LI-1500 (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA).

As amostras de *P. tricornutum* foram coletadas por centrifugação (10 min, 4000 rpm), dessalinizadas por imersão breve (5 min) em solução de formato de amônio (0,5 M, 3v), seguida por centrifugação (10 min, 4000 rpm, 4°C) e recuperação da biomassa. As amostras foram lavadas em água destilada (3v), centrifugadas (10 min, 4000 rpm, 4°C) e o sobrenadante foi descartado novamente. As amostras de biomassa dessalinizadas foram armazenadas a -80 ° C e posteriormente liofilizadas.

4.1.1.7 Recuperação da biomassa e extração de fucoxantina

As células da microalga foram coletadas do meio de cultura por centrifugação, dessalinizadas, liofilizadas e pesadas para a determinação da biomassa seca total produzida após sete dias de cultivo. A fim de obter o extrato carotenóidico bruto, a biomassa total de cada tratamento (valores entre 111 e 170 mg de biomassa seca) foi submetida a extrações em MeOH assistidas com homogeneizador (Ultra Turrax). Foram realizadas várias extrações em 10 ml de MeOH por 1 min até que a biomassa de cada tratamento apresentou uma coloração esbranquiçada no final das extrações. Os extratos foram centrifugados (4000 rpm, 10 min, 4°C) e os sobrenadantes recuperados para posterior análise cromatográfica da fucoxantina. O teor de fucoxantina foi calculado proporcionalmente a quantidade de biomassa seca utilizada.

4.1.1.8 Obtendo a fucoxantina purificada

0,5 gramas de biomassa liofilizada, oriunda de cultivos de *P. tricornutum* em meio de cultura suplementado com sulfato de amônio 0,5 mM foi submetido a protocolo de extração exaustiva como descrito a seguir.

A biomassa (0.5g) foi submetida a extrações em MeOH assistidas com homogeneizador (Ultra Turrax). Foram realizadas várias extrações em 10 mL de MeOH por 1 min até a biomassa apresentar uma coloração esbranquiçada no final das extrações. A cada extração os extratos foram centrifugados (4000 rpm, 10 min, 4°C), o sobrenadante recuperado e a biomassa novamente submetida a extração em MeOH (10 mL). Após um total de 15 extrações, os extratos recuperados foram reunidos e concentrados em rotaevaporador (55°C,

45 rpm), seguido da ressolubilização em acetato de etila (10 mL) para uma etapa prévia de purificação líquido-líquido em funil de separação.

No funil de separação, armazenado em ambiente refrigerado (1h, 4°C), a amostra acima recuperada foi lavada três vezes em solução (100 mL) de acetato de etila e água (1:1, v/v). A cada etapa deste processo observou-se um sistema trifásico onde a fase inferior foi descartada. Ao final do processo somente a fase superior foi recuperada e concentrada em rotaevaporador (55°C, 45 rpm), seguido por fluxo de nitrogênio gasoso até o volume de 1 mL para subsequente análise por cromatografia em coluna aberta de sílica gel.

Para a obtenção da fração enriquecida em fucoxantina, seguiu-se o protocolo de Hosokawa et al., (1999), com algumas modificações. O extrato (1mL) acima obtido após a etapa de pré-purificação foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (30 cm³), previamente equilibrada com 3 volumes de *n*-hexano. Os extratos foram eluídos com solução de CHCl₃:MeOH:H₂O (65:25:4, v/v/v), recuperando-se a fração de cor acastanhada. Sequencialmente, uma segunda separação cromatográfica da fração de interesse foi realizada sobre a mesma fase estacionária, porém com eluição com solução de *n*-hexano: acetona (7:3, v/v), recuperando-se a segunda fração que apresenta a tonalidade vermelho-laranja.

A fração acima recuperada, rica em fucoxantina, foi reduzida em seu volume via completa evaporação dos solventes sob fluxo de nitrogênio gasoso, seguida de ressuspensão em MeOH para posterior análise por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e espectrometria de massas.

4.1.1.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Alíquotas (10 µL) de cada extrato bruto e amostras purificadas de fucoxantina foram injetadas em um cromatógrafo líquido (RP-Thermo Scientific Ultimate 3000RS Dual System), equipado com uma coluna de fase reversa C18 (Vydac 201TP54, 250 mm x 4,6 mm Ø interno, 30°C), pré-coluna (Vydac 218GK54, 5 µm) e detector espectrofotométrico de UV-vis operando a 450 nm. MeOH:acetonitrila (90:10, v/v) foi usado como fase móvel, a 1 mL.min⁻¹. A identificação e quantificação da fucoxantina foram realizadas através da comparação com o

tempo de retenção do padrão analítico (fucoxantina, Sigma-Aldrich, MO - EUA), nas mesmas condições experimentais. A quantificação da fucoxantina foi realizada utilizando-se uma curva padrão interna (1 - 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $y = 0,566x$; $r^2 = 0,99$, *all-trans*-fucoxantina > 95,0% pureza - CLAE, Sigma-Aldrich, MO, EUA), considerando a área do pico de interesse para o cálculo da concentração do analito. Os valores apresentados representam a média de três injeções sequenciais por amostra, sendo expressos em mg de fucoxantina/g de biomassa seca.

4.1.1.10 Espectrometria de Massas

A confirmação da identidade da fucoxantina foi feita por injeção direta da amostra purificada e do padrão analítico comercial de fucoxantina (*all-trans*-fucoxantina, Sigma-Aldrich, MO, EUA), em espectrômetro de massa (micrOTOF-QII - Bruker Daltonics), equipado com fonte APPI (Atmospheric Pressure Photoionization), operando em modo positivo, e analisador com triplo quadrupolo. A identidade da molécula foi avaliada através de comparação da massa molecular e fragmentação do padrão com a massa molecular e fragmentação da amostra purificada. Uma amplitude espectral de m/z 50 a 3000 foi considerada à aquisição dos dados. Os demais parâmetros utilizados foram: nebulizador, 2.5 bar; fluxo contínuo de N_2 (2 L/min, 180°C). O processamento e a análise dos dados utilizaram o *software* Bruker Compass DataAnalysis 4.0.

4.1.1.11 Análises estatísticas

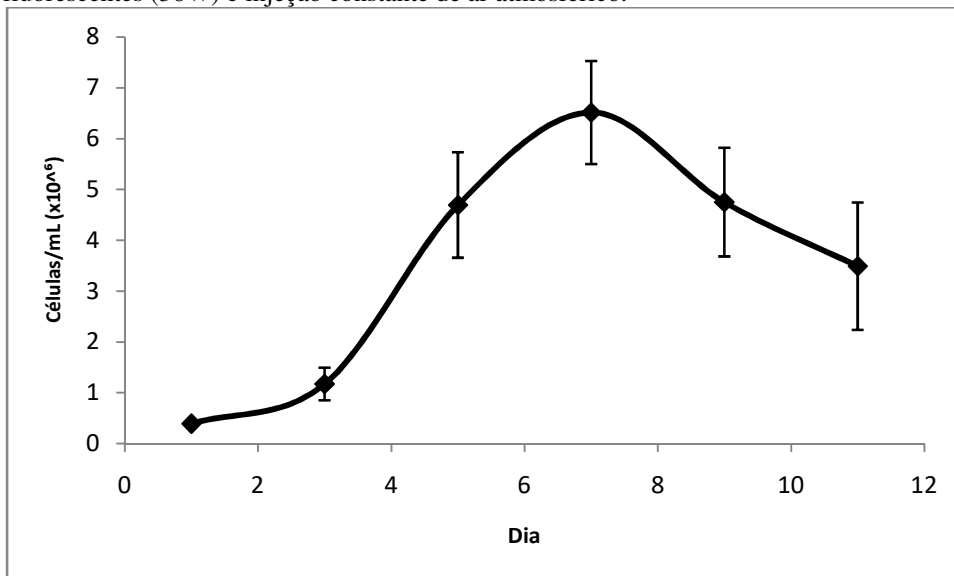
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido pelo teste de comparação múltipla *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$), quando apropriado. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.

4.1.2 Resultados e Discussão

4.1.2.1 Curva de crescimento dos cultivos para a recuperação de biomassa

Vários estudos apontam para o final da fase de crescimento exponencial como o tempo de maior acúmulo de fucoxantina em culturas de células de *P. tricornutum* (Carreto & Catoggio, 1976, Gómez-Loredo et al., 2016, Wang et al., 2018 e Gao et al., 2017). Assim, para determinar o perfil de densidade celular da cepa cultivada e sua relação com a biossíntese e acúmulo de fucoxantina, foi determinada a curva de crescimento *in vitro* para a espécie. A Fig. 1 mostra o incremento da biomassa celular de *P. tricornutum*, revelando uma fase inicial de 48h e um crescimento celular máximo, com base na densidade celular, no sétimo dia de cultura, ou seja, no final da fase exponencial. Assim, os resultados indicam uma fase de crescimento exponencial de *P. tricornutum* do 3º ao 7º dia, seguida de uma diminuição na densidade celular no dia 8, indicando a senescência das culturas (Fig. 1).

Figura 1- Curva de crescimento de células de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2. As culturas celulares (n=3) foram cultivadas à 21°C, fotoperíodo de 12h, irradiância de fótons de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lâmpadas fluorescentes (36W) e injeção constante de ar atmosférico.



Com base na curva de crescimento acima referida, a manutenção das culturas celulares em todos os experimentos subsequentes considerou a coleta do inóculo celular na fase

exponencial do crescimento celular, i.e., dia 7, bem como a recuperação da biomassa para análise e extração da fucoxantina.

4.1.2.2 Condições de cultivo estabelecidas com o auxílio de ferramentas computacionais

Como resultado dos dois modelos computacionais (Levering et al., 2016 e Kim et al., 2016 modificados por Bauer et al., 2018) processados - OptFlux (Rocha et al., 2010), foi possível prever condições a serem aplicadas aos cultivos *in vitro* de *P. tricornutum* com potencial de incremento da produção da biomassa e da biossíntese e o acúmulo de fucoxantina.

Resultados obtidos a partir dos modelos computacionais deste estudo, demonstraram que o aporte de ureia ($1.5 \text{ mmol gMS}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em culturas de *P. tricornutum* pode aumentar a produção de biomassa em pelo menos 77%. A ureia é um nutriente de baixo custo disponível comercialmente e seu papel na fisiologia de *P. tricornutum* foi discutido em vários estudos sobre a captação e metabolismo de N (Rees & Bekheet, 1982, Allen et al., 2006, Obata et al., 2013, Levitan et al., 2015 e Remmers et al., 2018). Portanto, esse nutriente foi escolhido para ser adicionado às culturas de células de *P. tricornutum* para investigar e, eventualmente, validar os resultados do modelo metabólico *in silico* quanto ao seu efeito na produção de biomassa por essa microalga.

Ao submeter os modelos metabólicos *in silico* ao software OptFlux, este retorna várias possíveis soluções que possam aumentar a biossíntese de fucoxantina pela microalga *P. tricornutum*. Nestas soluções o software OptFlux indicou algumas reações metabólicas que, uma vez suprimidas, provocam um aumento na biossíntese de fucoxantina. Devido a complexidade do metabolismo associada a diversidade biológica, não há como prever ao certo de que forma a supressão destas reações metabólicas podem afetar o metabolismo e o crescimento normal da célula. No entanto, trabalhos nesta área têm se preocupado em utilizar as informações obtidas *in silico* de forma racional, como por exemplo, analisar o quanto um gene ou via metabólica a ser suprimida é essencial ou não ao metabolismo normal de uma célula ou organismo, a fim de selecionar e aprimorar as previsões obtidas *in silico* (Lee et al., 2005, Park et al., 2007). Ainda, a definição de alguns limites baseados em dados experimentais, como por exemplo para a captação dos compostos de carbono e nitrogênio e

para a transferência de ATP (Kim et al., 2016, Levering et al., 2016), são adotados para os modelos computacionais. Conforme descrito anteriormente, para este trabalho foram adotados limites máximos para a captação de CO_2 ($1,3 \text{ mmol gMS}^{-1}\text{h}^{-1}$), HCO_3^- ($0,65 \text{ mmol gMS}^{-1}\text{h}^{-1}$) e NO_3^- ($308,94 \text{ mmol gMS}^{-1}\text{h}^{-1}$).

Na prática, pensou-se em duas formas de testar estas soluções. Uma delas através da modificação genética da cepa para que a mesma não reproduza as reações metabólicas indicadas pelos modelos. De outra forma, inibindo-se as enzimas responsáveis por estas reações é possível, hipoteticamente, otimizar a biossíntese e o acúmulo de fucoxantina nos cultivos celulares. A modificação genética inibiria totalmente as reações previstas pelos modelos metabólicos, o que pode ser fatal às células em casos de reações essenciais ao metabolismo da mesma. Neste trabalho buscou-se interferir negativamente nestas reações, buscando possíveis inibidores das enzimas responsáveis por essas reações, inibindo em alguma extensão, mas não suprimindo completamente os eventos catalíticos apontados pelos modelos.

Assim, para inibir as reações metabólicas resultantes das simulações *in silico* via software OptFlux à otimização da biossíntese de fucoxantina, potenciais inibidores enzimáticos foram identificados junto à base de dados BRENDA (Tabela 1). Tais compostos foram subsequentemente adicionados ao meio de cultura, com o intuito de investigar-se o efeito elicitor destes sobre o metabolismo de carotenoides de *P. tricornutum*, validando bioquimicamente os resultados derivados dos modelos *in silico*, no que se refere à otimização da biossíntese da fucoxantina.

Tabela 1—Enzimas responsáveis pela catálise de reações que, segundo os modelos computacionais investigados, aumentam a biossíntese de fucoxantina quando inibidas, potenciais inibidores dessas enzimas que foram identificados junto à base de dados BRENDA e os respectivos modelos metabólicos *in silico*.

<i>Número EC (do inglês Enzyme Commission Numbers)</i>	<i>Nome da enzima</i>	<i>Potencial inibidor para a atividade enzimática</i>	<i>Modelo metabólico in silico</i>
2.7.9.1	Piruvato fosfato diquinase	Piridoxal-5-fosfato, Carbonato de dietila, Piruvato de sódio	KIM et al., 2016
1.7.7.1	Nitrito redutase	Sulfato de amônio, EDTA dissódico, Piridoxal-5-fosfato	KIM et al., 2016
5.3.1.1	Triose fosfato isomerase	CuSO ₄	KIM et al., 2016
4.2.1.11	Fosfopiruvato hidratase	EDTA dissódico	KIM et al., 2016
4.1.2.13	Frutose bifosfato aldolase	Sulfato de amônio, CuSO ₄ , EDTA dissódico, MnCl ₂ , Piridoxal-5-fosfato, Piruvato de sódio	KIM et al., 2016
2.7.4.3	Adenilato quinase	EDTA dissódico	KIM et al., 2016
2.6.1.5	Tirosina transaminase	CuSO ₄ , EDTA dissódico	LEVERING et al., 2016
2.3.3.1	Citrato sintase	CuSO ₄	LEVERING et al., 2016
3.1.3.11	Frutose bifosfatase	Sulfato de amônio, EDTA dissódico	LEVERING et al., 2016
5.4.2.11 5.4.2.12	Fosfoglicerato mutase	Carbonato de dietila, EDTA dissódico	LEVERING et al., 2016
5.1.3.1	Ribulose fosfato 3-epimerase	Fosfato de potássio	LEVERING et al., 2016
4.2.1.2	Fumarato hidratase	Prednisolona	LEVERING et al., 2016
1.2.1.12	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Piridoxal-5-fosfato, Quercetina	LEVERING et al., 2016
1.2.4.1	Piruvato desidrogenase	EDTA dissódico	LEVERING et al., 2016
5.3.1.8	Manose 6-fosfato isomerase	EDTA dissódico	LEVERING et al., 2016

As enzimas selecionadas entre os melhores resultados retornados no OptFlux (Tabela 1) estão relacionadas à biossíntese de aminoácidos (nitrito redutase, tirosina transaminase), metabolismo do piruvato (piruvato fosfato diquinase e piruvato desidrogenase), glicólise (fosfopiruvato hidratase, triose fosfato isomerase, fosfoglicerato mutase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), ciclo de Krebs (citrato sintase, fumarato hidratase), ciclo de Calvin e

fixação de carbono (frutose-bifosfato aldolase, frutose bisfosfatase, ribulose fosfato 3-epimerase), interconversão de adenina nucleotídeos (adenilato quinase) e metabolismo dos açúcares nucleotídicos (manose-6-fosfato isomerase).

É difícil saber como essas reações podem interferir na biossíntese da fucoxantina, no entanto, algumas explicações possíveis podem ser pensadas. Por exemplo, enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos quando inibidas resultam em maior conteúdo de agentes redutores, como o NADPH, os quais podem ser utilizados à biossíntese de metabólitos secundários. O piruvato e o gliceraldeído 3-fosfato são os principais precursores nas vias da carotenogênese e, portanto, reações que consomem tais compostos quando inibidas resultam em maior disponibilidade de substratos à biossíntese daqueles metabólitos secundários. A manose-6-fosfato isomerase encontra-se envolvida na biossíntese de polissacarídeos de algas (Martel, 2009, Chi et al., 2018 e Aslam et al., 2018) e, uma vez inibida deixaria mais agentes redutores para o metabolismo secundário.

Os mecanismos de ação dos inibidores são muito diversos, no entanto, para ilustrar alguns desses mecanismos de ação podemos destacar alguns resultados obtidos na literatura para alguns dos potenciais inibidores selecionados. O trabalho de Phillips et al., 1983 verificou a inibição da enzima piruvato fosfato diquinase, isolada de *Bacteroides symbiosus*, na presença de piridoxal 5-fosfato (0,5mM), de forma que este causou a inativação da atividade enzimática pela inibição (50%) da capacidade de transferência de grupos fosfato da enzima. Piridoxal 5-fosfato também agiu como inibidor da atividade da enzima nitrito redutase em até 75% atuando no local de ligação da ferredoxina (Dose et al., 1997), ao passo que Butala et al., 2020 observaram atividade reduzida da enzima nitrito redutase em células de *Mycobacterium avium* cultivadas na presença de sulfato de amônio.

O composto EDTA possivelmente atua como agente quelante para cátions que são necessários para a atividade das enzimas, como no trabalho de Singh et al., 1978, em que a presença de 2mM de EDTA, inativou a enzima fosfopiruvato hidratase (99%). A possibilidade de o composto EDTA atuar como agente quelante para cátions que são indispensáveis na atividade de certas enzimas pode ser corroborado pelo trabalho de Hamada et al., 1976, que inibiu a atividade da enzima piruvato desidrogenase em torno de 40% (36µM EDTA) e 100% (360µM EDTA), sendo que a atividade da enzima foi restaurada com adição de Mg^{2+} e Ca^{2+} abundantes.

4.1.2.3 Cultivos *in vitro* elicitados com ureia e NiSO₄

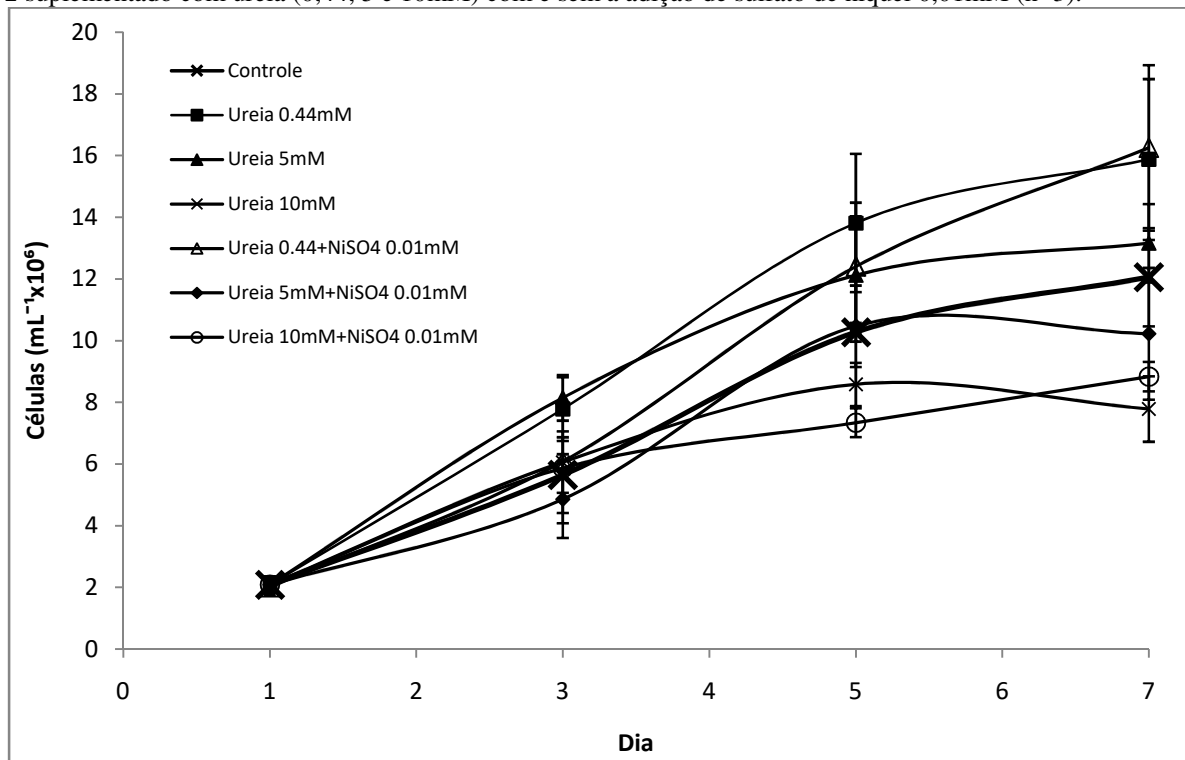
Três variáveis relacionadas à produção de biomassa e fucoxantina no sétimo dia de cultivo são aqui discutidas para o experimento de suplementação do meio de cultura com ureia e sulfato de níquel, a saber: densidade celular, peso seco total dos cultivos e acúmulo de fucoxantina por grama de biomassa seca nos cultivos.

Os resultados de densidade celular de *P. tricornutum* são mostrados na Fig. 2. Para esta variável ao longo do período de cultivo (7 dias) três tratamentos se destacam positivamente do controle, i.e., ureia 0,44mM (3^o, 5^o e 7^o dia), ureia 0,44mM+NiSO₄ (5^o e 7^o dia) e ureia 5mM (3^o e 5^o dia). Nos tratamentos que receberam suplementação com ureia 10mM com ou sem NiSO₄ observa-se uma densidade celular abaixo do cultivo controle (5^o e 7^o dia). Pode-se observar pelos resultados obtidos que concentrações mais altas de ureia (i.e., ≥5mM), afetaram negativamente a densidade celular das culturas ao passo que a concentração mais baixa (0.44mM) com ou sem NiSO₄ resultou em maior densidade celular com relação ao cultivo controle. Uma hipótese seria que, devido à produção de amônio pelo processo de metabolização da ureia por *P. tricornutum*, altos teores deste sal no meio de cultura podem ser tóxicos à microalga (Nur et al., 2019), uma vez que podem levar à produção de amônia. Além disso, o sódio é outra variável que pode influenciar a absorção de ureia em *P. tricornutum* (Rees et al., 1980). Neste estudo, os valores de salinidade nas culturas de ureia variaram de 30‰ no início das culturas a 31‰ no dia da coleta da biomassa. Curiosamente, Nur et al., 2019 determinaram *in vitro* o efeito de concentrações de ureia sobre a densidade celular e a produtividade de fucoxantina de *P. tricornutum*, em condições de salinidade de 5‰, 20‰ e 35‰ e os resultados indicaram que o crescimento celular e o conteúdo de fucoxantina mostraram-se proporcionais aos valores de salinidade testados. Isto mostra que a salinidade pode ter efeito na capacidade de utilização da ureia pela microalga mas, no entanto, a forma como isto ocorre pode ter variações quanto a espécie e cepa utilizadas.

Com relação a suplementação dos cultivos com NiSO₄ (0,01mM), os resultados obtidos não deixam claro de que forma estes tratamentos possam ter interferido na densidade celular de *P. tricornutum*, visto que, no quinto dia, o efeito da suplementação do meio de cultura com este nutriente parece ter reduzido a densidade celular com relação ao controle, independentemente da concentração de ureia utilizada. No entanto, no sétimo dia de cultivo

isto não foi observado para os tratamentos com ureia nas doses mais extremas (0,44mM e 10mM). Estudos têm demonstrado a importância do níquel no crescimento de microrganismos em culturas de células alimentadas com ureia, incluindo diatomáceas (Oliveira & Antia, 1984, Egleston & Morel, 2008 e Miazek et al., 2015), embora muito poucos tragam resultados para *P. tricornutum*. Rees & Bekheet (1982) destacam o papel do níquel em algumas espécies, incluindo *P. tricornutum*, devido à presença da enzima urease que requer níquel como cofator para o catabolismo da ureia em amônia e dióxido de carbono. Esses autores (Rees & Bekheet, 1982) obtiveram maior taxa de crescimento celular e atividades das enzimas decompositoras de ureia para *P. tricornutum* cultivadas em meio celular suplementado com ureia (5mM) e NiSO₄ (0,01mM), na presença de citrato. Como o citrato pode quelar o níquel, pode-se especular que a quantidade efetiva de níquel livre disponível ao metabolismo celular foi, de fato, inferior a 0,01mM. Portanto, eventualmente melhores resultados poderão ser alcançados, hipoteticamente, utilizando-se concentrações inferiores a 0,01mM NiSO₄, nas condições utilizadas neste estudo, onde o citrato não foi adicionado ao meio de cultura.

Figura 2- Densidade celular (células mL⁻¹ x 10⁻⁶) dos cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2 suplementado com ureia (0,44, 5 e 10mM) com e sem a adição de sulfato de níquel 0,01mM (n=3).



Ao comparar o conjunto de dados de densidade celular (Fig. 2) e o peso seco total das células (Fig. 3) no 7º dia de cultivo, fica claro que esta última variável diminuiu em função da divisão celular, pois quanto maior a densidade celular, menor o peso seco relativo das culturas. No entanto, esta relação é dependente do ritmo circadiano da microalga, podendo portanto, apresentar alterações em função do momento de coleta da biomassa. Por outro lado, o acúmulo de fucoxantina por grama de biomassa seca (Fig. 4) mostrou-se inversamente proporcional ao peso seco total das células no momento da amostragem. Os maiores valores para biossíntese e acumulação de fucoxantina por grama de biomassa de peso seco foram detectados em meios de cultura adicionados de 0,44 mM de ureia, com ou sem NiSO₄. De fato, nestas condições as culturas celulares de *P. tricornutum* produziram cerca de 35% mais fucoxantina por grama de peso seco em relação ao controle. Aqui vale ressaltar que a diferença na maior biossíntese de fucoxantina não se deve a concentração de nitrogênio em si, mas ao tipo de composto nitrogenado utilizado, i.e., ureia, uma vez que a concentração de nitrogênio (0.44mM) fornecido através da ureia corresponde à mesma recebida pelo cultivo controle através do nitrato de sódio (NaNO₃).

Figura 3- Peso total de biomassa seca por litro dos cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2, suplementado com 3 concentrações de ureia (0,44, 5 e 10mM) com e sem a adição de sulfato de níquel 0,01mM. A biomassa foi recuperada no sétimo dia de cultivo por centrifugação, seguida de liofilização (n=3, p<0,05).

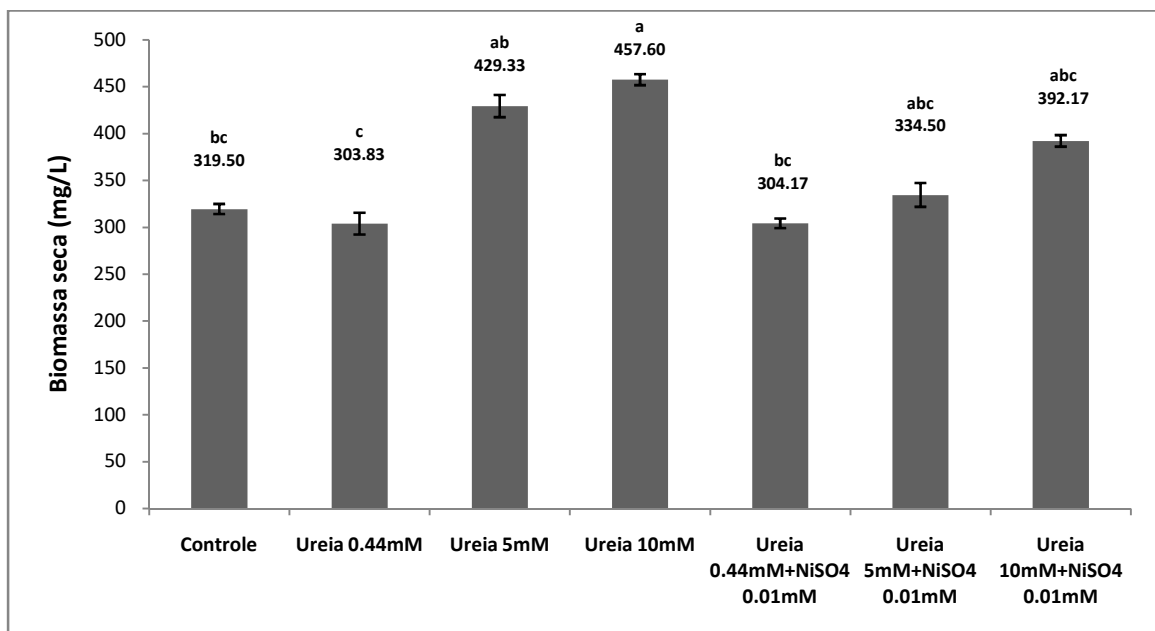
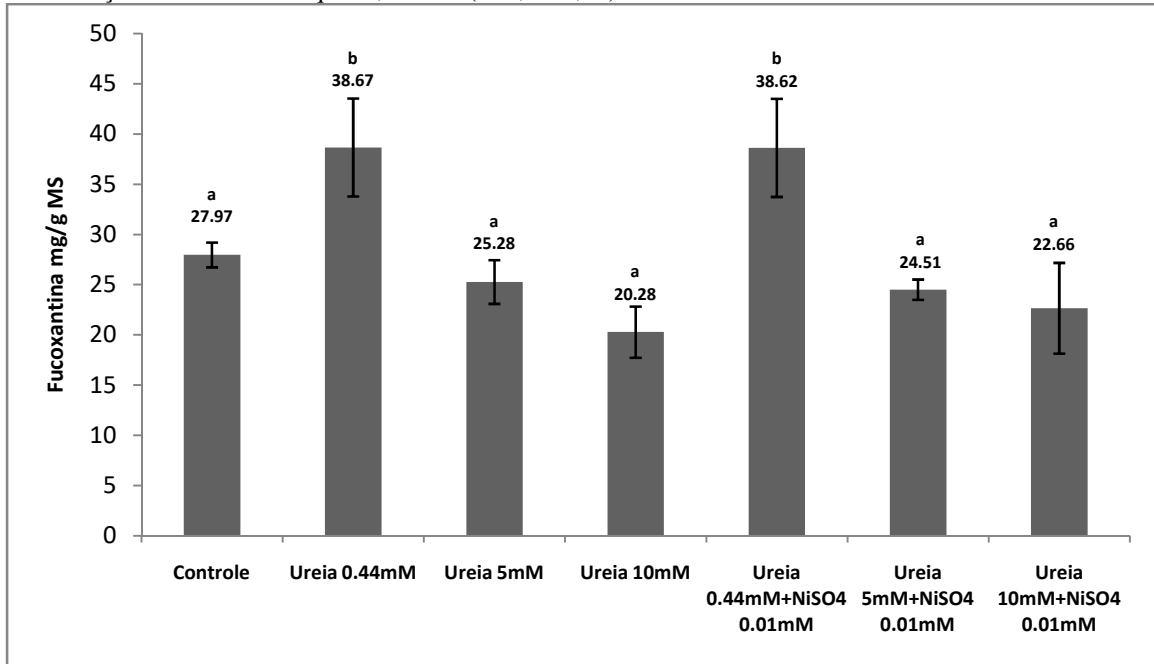


Figura 4- Conteúdo de fucoxantina (mg/g MS) nos cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* no 7º dia de cultivo (fase exponencial), em meio de cultura f/2 suplementado com 3 concentrações de ureia (0,44, 5 e 10mM) com e sem a adição de sulfato de níquel 0,01mM (n=3, P<0,05).



Também foram avaliados durante o experimento pH e salinidade. No início dos cultivos todos os tratamentos apresentaram pH 7,0. Ao longo do experimento observou-se um aumento na alcalinidade de todos os cultivos, chegando estes a pH 9,0 no final do experimento, com exceção do grupo controle que ao final do cultivo apresentou pH 10,0. A salinidade dos cultivos variou de 30‰ no primeiro dia a 31‰ no sétimo dia de cultivo.

Microalgas são capazes de crescer em diversas fontes de nitrogênio, reduzidas ou oxidadas, sendo estas principalmente na forma de amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) e ureia (Armbrust et al., 2004, Perez-Garcia et al., 2011). Embora em ambientes naturais, raramente o fitoplâncton tenha apenas um tipo de composto nitrogenado disponível, ou seja, na maioria das vezes está em contato com formas reduzidas e oxidadas de nitrogênio ao mesmo tempo, em ambientes controlados muitos estudos são feitos com a suplementação de apenas um desses tipos nitrogenados a fim de entender como estes organismos respondem a essas fontes.

Nesta esfera a maioria das microalgas têm preferência, em ordem decrescente, pelas fontes de nitrogênio na forma de NH_4^+ seguido por NO_3^- , NO_2^- e ureia, sendo que o NH_4^+ exige menor gasto energético à sua assimilação e é mais facilmente transportado pela membrana celular (Kaplan et al., 1986, Perez-Garcia et al., 2011, Glibert et al., 2016). No entanto, esta preferência pelo NH_4^+ como fonte de nitrogênio não é universal, como apontado por Glibert et al., 2016, uma vez que uma larga fração de diatomáceas pode dar preferência

por NO_3^- em ambientes frios e ricos em nutrientes. A linhagem evolutiva das diatomáceas difere de muitos outros grupos de microalgas. As diatomáceas, além de sua linhagem endossimbiótica, evoluíram em um período em que os níveis de oxigênio estavam se elevando, e ao contrário de outras microalgas, como as cianobactérias por exemplo, adquiriram a habilidade de metabolizar formas mais oxidadas de nitrogênio (Glibert et al., 2016).

A absorção de NH_4^+ , portanto de um cátion, tende a reduzir o pH das microalgas devido a liberação de íons de hidrogênio, e isto pode também estar relacionado a preferência de algumas microalgas como *P. tricornutum* por outras fontes de nitrogênio como NO_3^- e ureia (Kaplan et al., 1986, Perez-Garcia et al, 2011), pois ao contrário do que ocorre com o NH_4^+ , o NO_3^- , um ânion como fonte de nitrogênio tende a elevar o pH das culturas deixando o meio intracelular mais básico (Kaplan et al., 1986). Desta forma, o controle do pH das culturas pode ser uma boa estratégia nos casos em que o fornecimento de NH_4^+ como fonte de nitrogênio se mostrar vantajoso.

A assimilação de NH_4^+ contrasta com a de NO_3^- em diversos outros pontos. Com relação à disponibilidade e tipo da fonte nitrogenada, por exemplo, a presença de NO_3^- estimula os transportadores de NO_3^- , ao passo que os transportadores de NH_4^+ são suprimidos na presença de NH_4^+ (Glibert et al., 2016). Com relação a temperatura, a enzima nitrato redutase que reduz NO_3^- a NO_2^- tem maior atividade em baixas temperaturas, ao passo que as enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase, responsáveis pela conversão do NH_4^+ em glutamina e glutamato respectivamente, têm atividade diretamente proporcional a temperatura (Glibert et al., 2016). Espera-se desta forma que a assimilação de NO_3^- seja maior em temperaturas mais baixas e a assimilação de NH_4^+ em temperaturas mais altas (Glibert et al., 2016).

De modo geral, quando as microalgas têm à sua disposição NO_3^- e NH_4^+ no mesmo espaço de tempo, a presença de NH_4^+ suprime o transporte de NO_3^- através da membrana e diminui a atividade da enzima nitrato redutase (Glibert et al., 2016).

Diatomáceas também são capazes de crescer com ureia como única fonte de nitrogênio. O ciclo da ureia, que se acreditava ser uma característica exclusiva dos metazoários, foi completamente caracterizado em diatomáceas (Armbrust et al., 2004, Allen et al., 2006, Bowler et al., 2008, Allen et al., 2011). E se por um lado, em animais o ciclo da ureia funciona de forma a eliminar compostos nitrogenados na forma de ureia, por outro é improvável que diatomáceas excretem ureia uma vez que essas possuem a enzima urease

ativa, que tem função na hidrólise da uréia em dióxido de carbono e amônia (Armbrust et al., 2004, Bowler et al., 2008, Allen et al., 2011). Weyman et al., 2015, silenciaram o gene que codifica para a enzima urease em *P. tricornutum* e observaram um acúmulo de ureia em relação ao controle, reforçando uma hipótese de que esta espécie tem a capacidade de assimilar ureia produzida endogenamente pelo ciclo da ureia. A caracterização de um ciclo completo para a ureia em diatomáceas abre à perguntas que visam entender como e porque estas espécies fotossintetizantes possuem características metabólicas que antes se pensava existirem somente em animais ou bactérias.

4.1.2.4 Cultivos *in vitro* com os inibidores para enzimas chave no aumento da biossíntese de fucoxantina

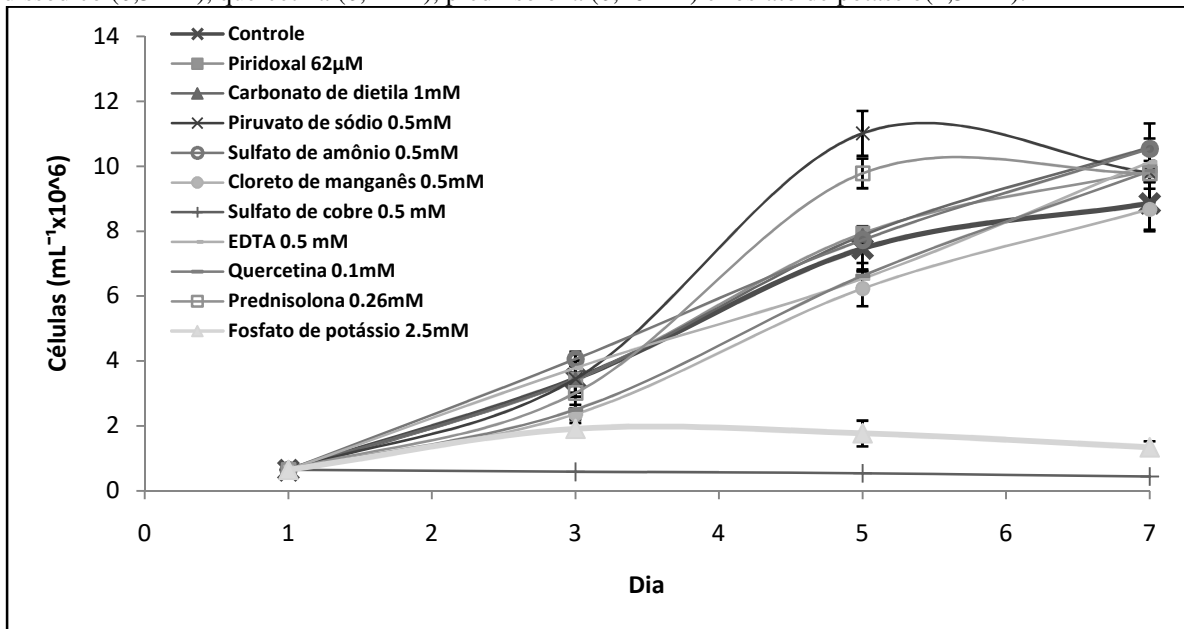
Na tabela 2 pode-se verificar os potenciais inibidores pesquisados junto à base de dados BRENDA e as respectivas enzimas a serem inibidas *in vitro*.

Tabela 2–Potenciais inibidores identificados junto à base de dados BRENDA e as respectivas enzimas chave selecionadas de acordo com os modelos computacionais a fim de aumentar a biossíntese de fucoxantina.

Potencial inibidor para a atividade enzimática	Enzimas chave
Piridoxal-5-fosfato	Piruvato fosfato diquinase Nitrito redutase Frutose bifosfato aldolase Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Carbonato de dietila	Piruvato fosfato diquinase Fosfoglicerato mutase
Piruvato de sodio	Piruvato fosfato diquinase Frutose bifosfato aldolase
Sulfato de amônio	Nitrito redutase Frutose bifosfato aldolase Frutose bifosfatase
EDTA dissódico	Nitrito redutase Fosfopiruvato hidratase Frutose bifosfato aldolase Adenilato quinase Tirosina transaminase Frutose bifosfatase Fosfoglicerato mutase Piruvato desidrogenase Manose 6-fosfato isomerase
CuSO ₄	Triose fosfato isomerase Frutose bifosfato aldolase Tirosina transaminase Citrato sintase
MnCl ₂	Frutose bifosfato aldolase
Fosfato de potássio	Ribulose fosfato 3-epimerase
Prednisolona	Fumarato hidratase
Quercetina	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

A Fig. 5 mostra o resultado do experimento para a triagem de inibidores das enzimas-chave pesquisadas, considerando os efeitos desses compostos na densidade celular *in vitro* de *P. tricornutum*. Com exceção dos tratamentos com fosfato de potássio (2,5 mM) e sulfato de cobre (0,5 mM), que se mostraram tóxicos à microalga, os outros tratamentos não afetaram negativamente o crescimento celular. Vale ressaltar que foram encontrados maiores valores de densidade celular em relação ao controle nos dias 5 e 6 de cultivo para os tratamentos com prednisolona (0,26 mM) e piruvato de sódio (0,5 mM), com subsequente queda. Da mesma forma, esse achado foi observado no sétimo dia de cultivo para piridoxal (62µM), carbonato de dietila (1mM), sulfato de amônio (0,5mM), EDTA dissódico (0,5mM) e quercetina (0,1mM) em relação ao controle. Para esses compostos, a estabilização do crescimento celular não foi observada ao final do experimento, ou seja, 7º dia, sugerindo a ausência de efeito tóxico ao metabolismo celular, bem como a possibilidade de obtenção de maiores quantidades de biomassa celular em cultivos com maior duração, ou seja, 7 dias.

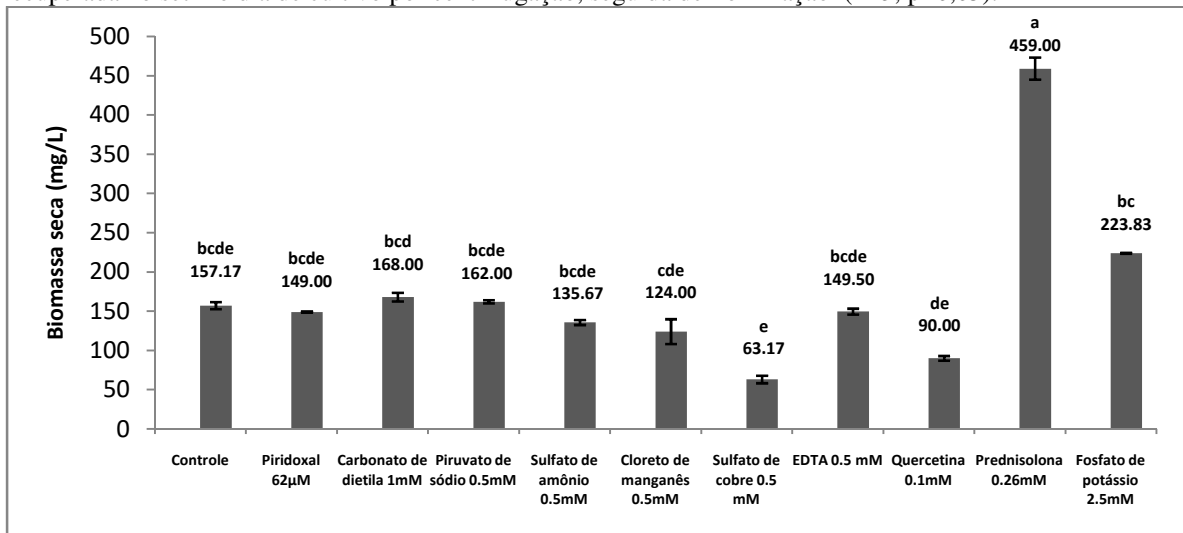
Figura 5- Densidade celular (células x mL⁻¹ x 10⁶) dos cultivos (n=3) de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2 suplementados com piridoxal-5-fosfato (62µM), carbonato de dietila (1mM), piruvato de sódio (0,5mM), sulfato de amônio (0,5mM), cloreto de manganês (0,5mM), sulfato de cobre (0,5mM), EDTA dissódico (0,5mM), quercetina (0,1mM), prednisolona (0,26mM) e fosfato de potássio(2,5mM).



A Fig. 6 apresenta os resultados para o peso seco total de biomassa de *P. tricornutum* no final do período experimental (7º dia) para os tratamentos com os inibidores enzimáticos avaliados.

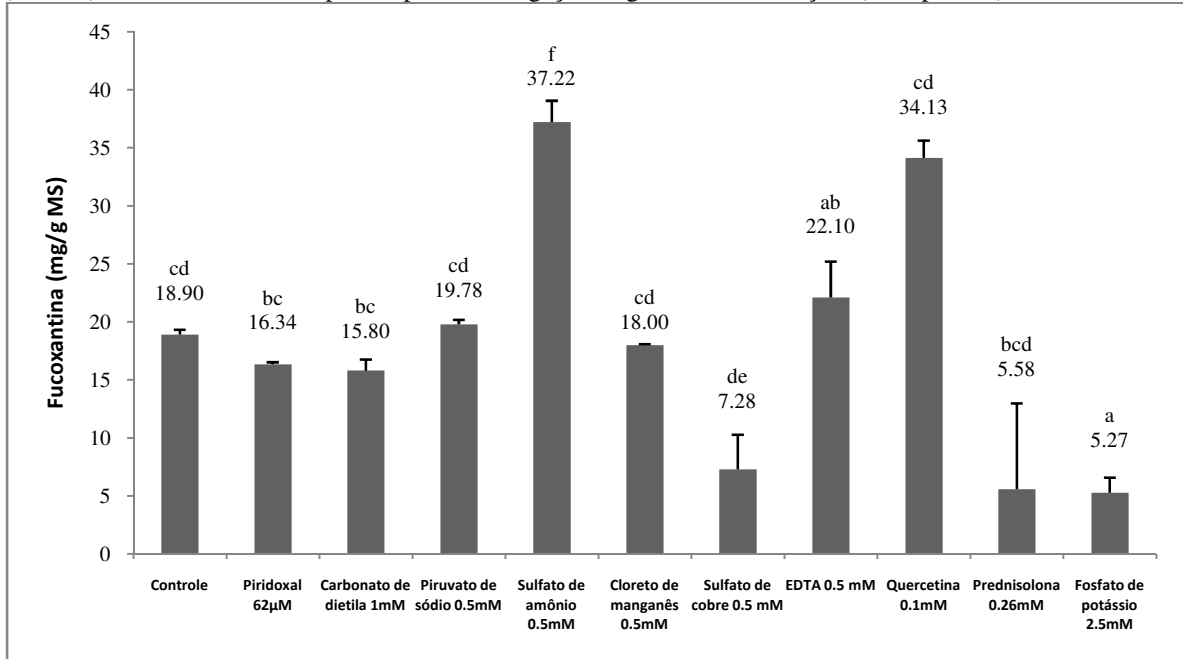
Curiosamente, apenas a prednisolona (0,26 mM) foi estatisticamente diferente do controle no que concerne àquela biomassa.

Figura 6- Peso total de biomassa seca por litro de cultivo nos cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2 suplementados com piridoxal-5-fosfato (62 μ M), carbonato de dietila (1mM), piruvato de sódio (0,5mM), sulfato de amônio (0,5mM), cloreto de manganês (0,5mM), sulfato de cobre (0,5mM), EDTA dissódico (0,5mM), quercetina (0,1mM), prednisolona (0,26mM) e fosfato de potássio (2,5mM). A biomassa foi recuperada no sétimo dia de cultivo por centrifugação, seguida de liofilização (n=3, p<0,05).



Em relação ao acúmulo de fucoxantina por grama de biomassa seca, os inibidores enzimáticos sulfato de amônio (0,5 mM) e quercetina (0,1 mM) (Fig. 7) diferiram significativamente em relação ao controle, com aumentos de 106% e 89%, respectivamente.

Figura 7- Conteúdo de fucoxantina (mg/g MS) de células de *Phaeodactylum tricornutum* (7º dia de cultivo, fase exponencial), cultivadas em meio de cultura f/2 contendo piridoxal-5-fosfato (62µM), carbonato de dietila (1mM), piruvato de sódio (0,5mM), sulfato de amônio (0,5mM), cloreto de manganês (0,5mM), sulfato de cobre (0,5mM), EDTA dissódico (0,5mM), quercetina (0,1mM), prednisolona (0,26mM) e fosfato de potássio (2,5mM). A biomassa foi recuperada por centrifugação, seguida de liofilização (n=3, p<0,05).



Com relação ao pH, todos os tratamentos apresentaram pH 7,0. Uma elevação da alcalinidade foi detectada na fase exponencial de crescimento microalgal, seguido de queda ao final da fase estacionária, exceto para os tratamentos com os inibidores cloreto de manganês (0,5mM), sulfato de cobre (0,5mM) e fosfato de potássio (2,5mM). No caso do sulfato de cobre (0,5mM) e do fosfato de potássio (2,5mM), uma acidificação do meio ao longo da cultura pode estar relacionada ao efeito tóxico observado nas células da microalga. Isto sugere a hipótese de que o cloreto de manganês possa também ser citotóxico, ainda que em menor intensidade em relação ao sulfato de cobre e ao fosfato de potássio. A salinidade dos cultivos apresentou variação de 30‰ no primeiro dia a 31‰ no sétimo dia de cultivo para quase todos os tratamentos. Foram exceção os tratamentos com piridoxal (62µM), carbonato de dietila (1mM) e piruvato de sódio (1mM) que atingiram valores mais altos (32‰, 32,5‰ e 31,5‰ respectivamente) ao final do experimento.

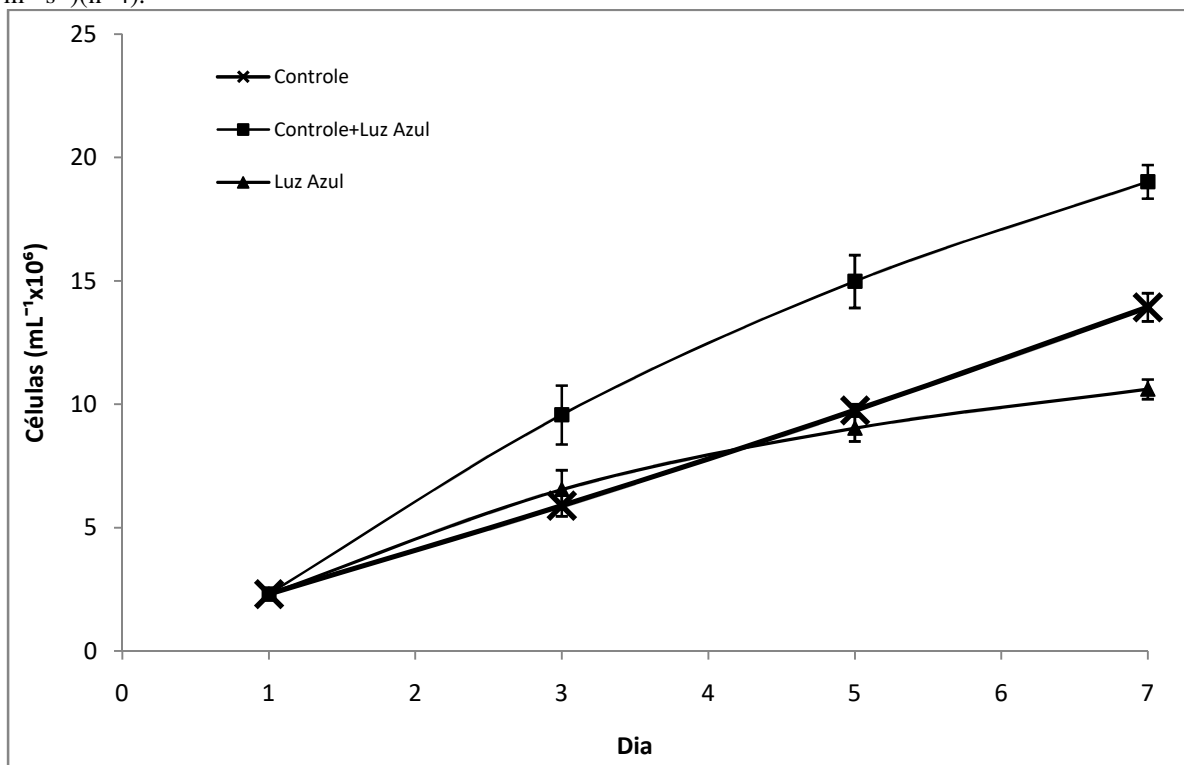
4.1.2.5 Cultivos *in vitro* com aplicação de radiação na faixa do azul

Pelo fato de ser um organismo autotrófico, o tipo de radiação luminosa é um elemento chave no desenvolvimento da microalga *P. triornutum*, influenciando diretamente na divisão e crescimento celular e síntese de pigmentos. Diversos trabalhos (Carreto & Catoggio, 1976, Wagner et al., 2006, Domingues et al., 2012, Costa et al., 2013, 2015, Gómez-Loredo et al., 2016) reportam resultados variados de incrementos na biossíntese de fucoxantina em células de *P. triornutum* sob diferentes irradiâncias, na sua maioria sob lâmpadas fluorescentes, sendo muito poucos os trabalhos com resultados na faixa do azul. Por exemplo, Gómez-Loredo et al., 2016 relatam um aumento de até 25% na síntese daquele oxicarotenoide em células irradiadas com $13,5 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, comparativamente a outros tratamentos ($9,1$, $25,9$ e $62,0 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Domingues et al., 2012 não observaram diferenças significativas na aplicação de irradiâncias baixas ($40 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em comparação a valores mais elevados ($1250 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) sobre aquela variável. Já McClure et al., 2018 obtiveram maior produção de fucoxantina em $100 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($42,8 \text{ mg g}^{-1}\text{MS}$) em comparação com $210 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($9,9 \text{ mg g}^{-1}\text{MS}$). No entanto, além do fato de que diatomáceas flutuam na coluna de água a uma certa profundidade, portanto estarem mais expostas a radiação azul (Wagner et al., 2006), alguns trabalhos reportam uma influência positiva deste tipo de radiação em genes reguladores da carotenogênese como o gene responsável pela fitoeno-sintase (Coesel et al., 2008). Porém, destaca-se que as condições de cultivo nos diversos trabalhos apresentam variações importantes em fatores como fotoperíodo, temperatura, tipo de lâmpada, cepa, meio de cultivo e aporte de nitrogênio, dificultando a análise comparativa dos resultados. Neste trabalho, definiu-se a irradiância do grupo controle (luz branca) em $60 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, condição esta sob a qual a microalga vem sendo mantida em cultivo há longo tempo (> 2 anos). Assim, foram avaliados tratamentos com luz branca ($60 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) associada à luz azul tipo LED (14.4 W , $60 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e um tratamento somente com luz azul tipo LED (14.4 W , $60 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Os resultados para a densidade celular de cultivos de *P. triornutum* são mostrados na Fig. 8. Fica claro que o tratamento com luz branca (36W , $60 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) combinado com a luz azul tipo LED (14.4W , $60 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) estimulou a divisão celular de forma mais intensa ao longo de todo o experimento. Curiosamente, o tratamento controle mostra um crescimento linear daquela variável ao longo dos sete dias de cultivo, com

densidades sempre inferiores ao tratamento com luz fluorescente associada à luz azul. Os cultivos expostos à radiação azul apresentaram densidade celular semelhante ao controle até o quinto dia, quando uma ligeira queda na densidade celular foi detectada, tornando-se mais evidente no sétimo dia de cultivo.

Figura 8- Densidade celular (células $\times \text{mL}^{-1} \times 10^6$) dos cultivos ($n=4$) de *Phaeodactylum tricornutum* em meio de cultura f/2 expostos à luz fluorescente (36W, $60 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, controle), luz azul tipo LED (14.4W, $60 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) + luz fluorescente (36W, $60 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e luz azul tipo LED (14.4W, $60 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ($n=4$).



Neste experimento, os valores de densidade celular não acompanharam, na mesma proporção, aqueles de peso seco da biomassa e de conteúdo de pigmentos, como observado no experimento anterior com ureia. No entanto, neste experimento com tipos de luzes, a análise comparativa do conjunto de dados de densidade celular (Fig. 8) e do peso seco total das células (Fig. 9) no 7º dia de cultivo, revela que esta última variável aumentou em função da divisão celular. Assim, uma relação direta entre a densidade celular e o peso seco relativo das culturas *in vitro* parece existir, indicando a possibilidade de existirem estratégias metabólicas diferentes utilizadas pelas células, consoante ao elicitor aplicado. Por outro lado, o acúmulo de fucoxantina por grama de biomassa seca (Fig. 10) mostrou-se inversamente proporcional ao peso seco total da célula e a densidade celular. Os maiores valores de biossíntese e acúmulo de fucoxantina por grama de biomassa de peso seco foram encontrados no

tratamento com a luz controle (36 W, 60 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Este tratamento, associado à radiação azul determinou a menor biossíntese de fucoxantina por grama de biomassa seca nos cultivos. Curiosamente, as culturas expostas à luz azul apresentaram conteúdos superiores daquele oxicarotenoide em relação ao tratamento com as radiações azul + fluorescente, sugerindo um possível efeito de fotoinibição para esta cepa naquelas condições, uma vez que neste tratamento as células foram expostas a uma irradiância total maior (120 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Figura 9- Peso total de biomassa seca por litro dos cultivos (n = 4) de *Phaeodactylum tricornerutum* em meio de cultura f/2 expostos à luz fluorescente (36W, 60 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - controle), luz azul tipo LED (14.4W, 60 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) + luz fluorescente (36W, 60 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e luz azul tipo LED (14.4W, 60 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A biomassa celular foi recuperada no sétimo dia de cultivo por centrifugação, seguida de liofilização.

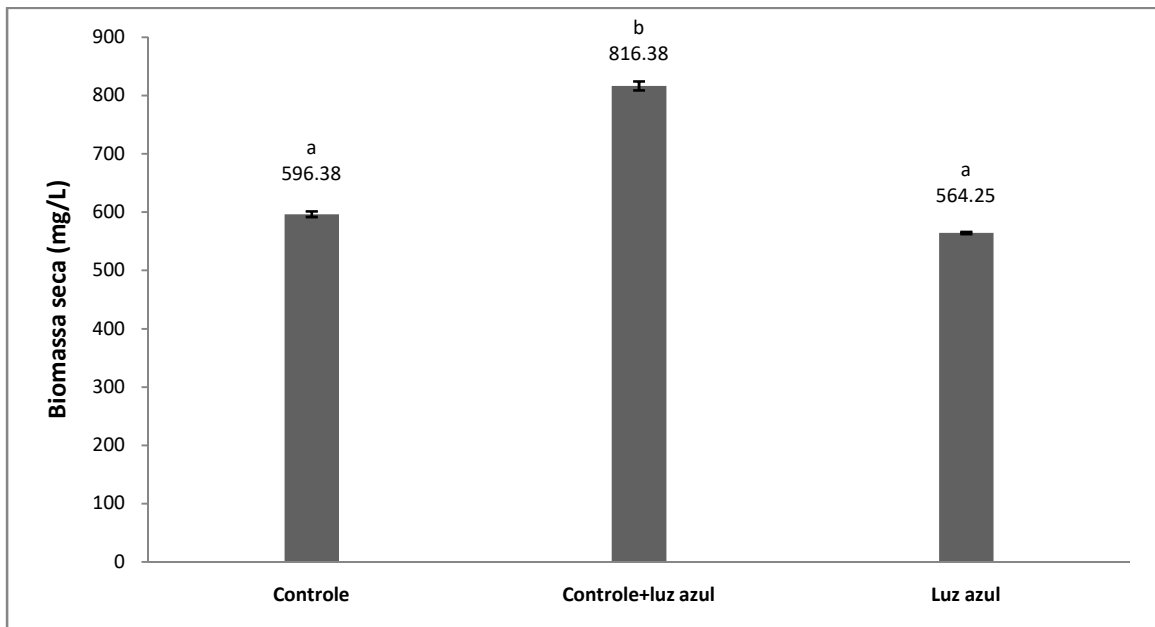
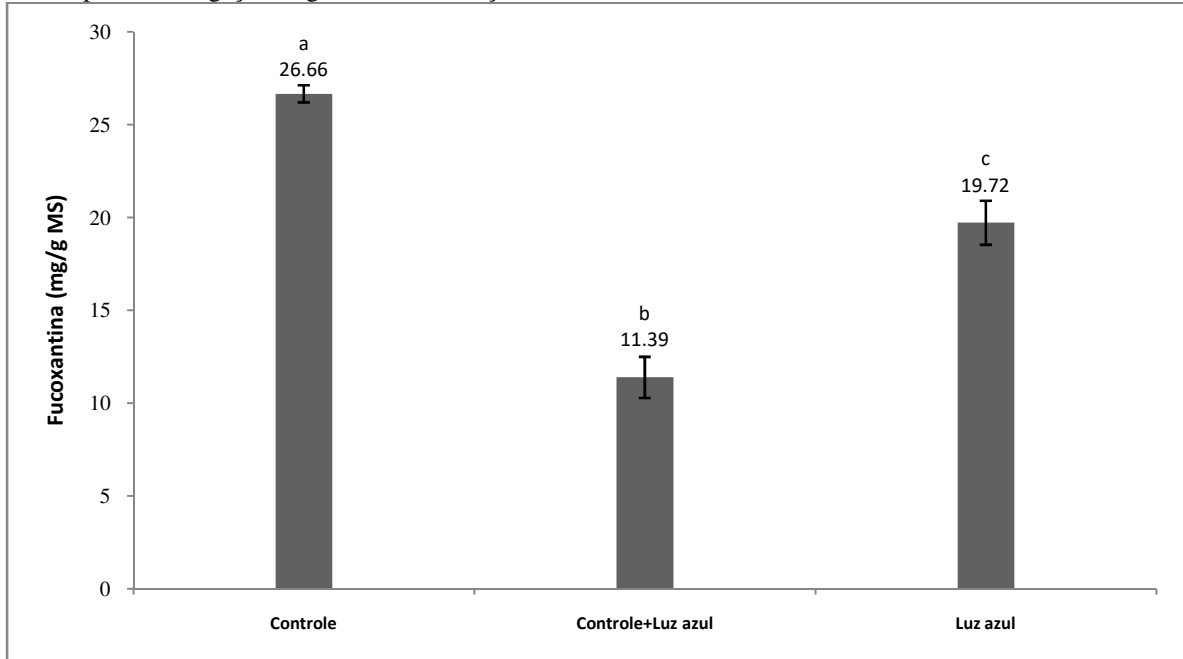


Figura 10- Conteúdo de fucoxantina (mg/g MS) nos cultivos (n = 4) de *Phaeodactylum tricornutum* no 7º dia de cultivo (fase exponencial) em meio de cultura f/2 tratados expostos à luz fluorescente (36 W, 60 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - controle), luz azul tipo LED (14.4 W, 60 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) + luz fluorescente (36 W, 60 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e luz azul tipo LED (14.4 W, 60 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A biomassa celular foi recuperada no sétimo dia de cultivo por centrifugação, seguida de liofilização.



Como nos experimentos anteriores, todos os tratamentos apresentaram pH 7,0 no início dos cultivos observando-se um aumento da alcalinidade dos mesmos que chegaram a pH 9,0 no final do experimento. Da mesma forma, a salinidade apresentou um aumento em todos os experimentos ao longo dos 7 dias de cultivo. Como no experimento com ureia, a salinidade variou de 30‰ a 31‰ nos tratamentos controle e com aplicação de luz azul.

4.1.2.6 Obtenção de fucoxantina purificada (cromatografia em coluna aberta, CLAE e espectrometria de massas)

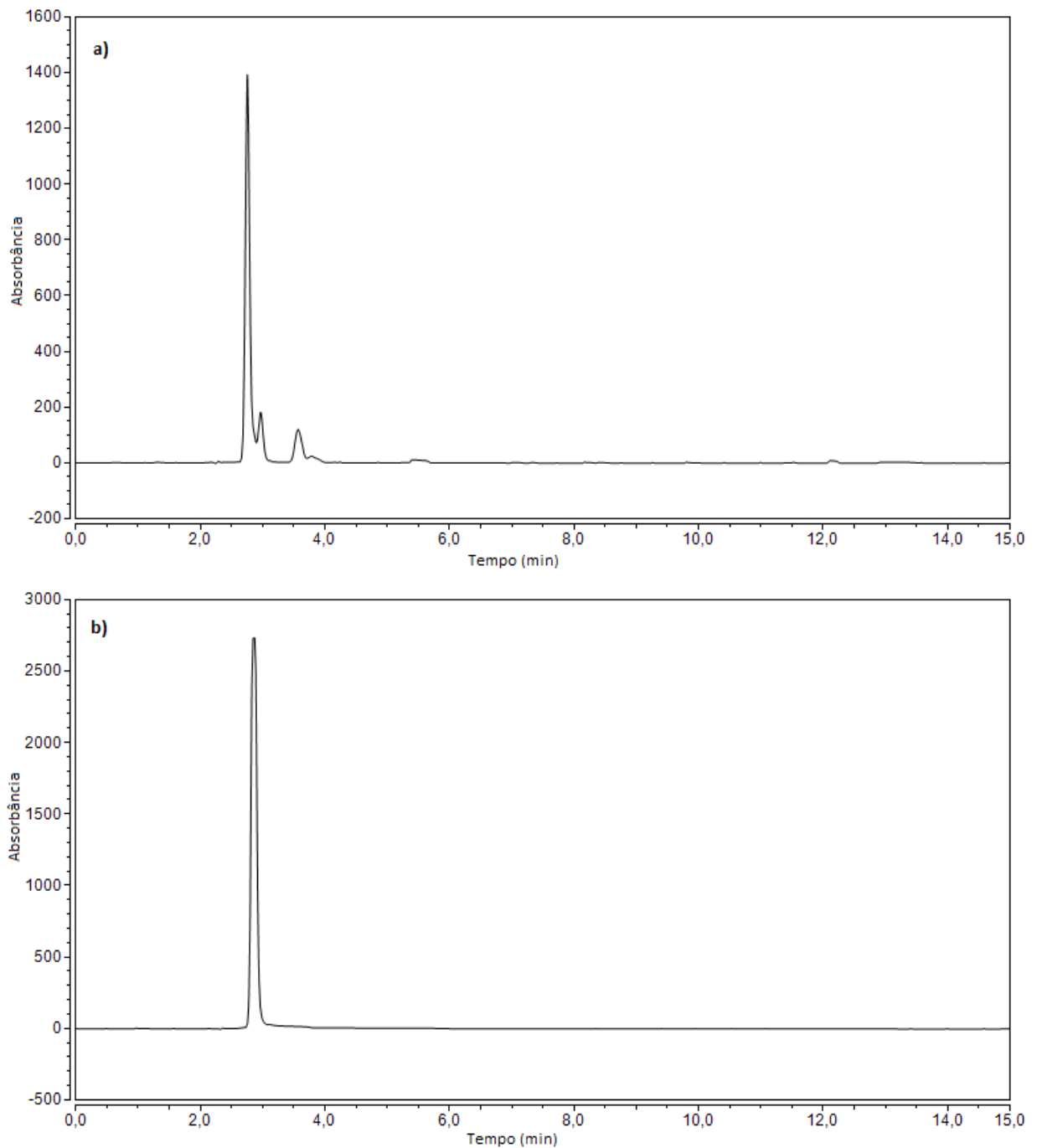
Os cultivos tratados com sulfato de amônio 0,5mM foram recuperados e 0,5 g de biomassa foram utilizados para o processo de purificação de fucoxantina. Apesar da boa solubilidade dos carotenoides em solventes orgânicos de maior apolaridade de uma forma geral (e.g., *n*-hexano), as xantofilas, como a fucoxantina, apresentam maior solubilidade em solventes menos apolares como o MeOH e o etanol, o que se deve à presença de oxigênio em suas moléculas, uma característica estrutural que lhes confere menor apolaridade em relação aos carotenos. Por este motivo, o MeOH foi utilizado como solvente de extração neste estudo. No

processo de extração exaustiva adotado (ver item 4.1.1.8), 15 extrações foram realizadas com 10 mL de MeOH, obtendo ao final um volume de extrato bruto de 150mL.

A análise dos dados cromatográficos (CLAE-DAD) do extrato bruto em MeOH revelou a produção de 39,75 mg.g⁻¹ MS de fucoxantina. O mesmo extrato, após a etapa de purificação utilizando um protocolo adaptado (Hosokawa et al., 1999), permitiu a recuperação (CLAE-DAD) de um conteúdo de fucoxantina de 24,77 mg de fucoxantina por grama de matéria seca. Assim, o método adotado permitiu um rendimento de recuperação daquela xantofila extraída dos cultivos de *P. tricornutum* de 62%. Na literatura são reportados valores bastante distintos de recuperação de fucoxantina a partir de cultivos *in vitro* de *P. tricornutum*, e.g., 8,55 mg.g⁻¹ MS (Kim et al., 2012b), 10,3 e 24,2 mg.g⁻¹ MS (Eilers et al., 2016), este último obtido de uma cepa modificada geneticamente, e 15,71 mg.g⁻¹ MS (Kim et al., 2012a) um dos valores de referência para fucoxantina detectados em cepa selvagem de *P. tricornutum*. No entanto, um trabalho se destaca neste cenário (McClure et al., 2018), onde os autores obtiveram até 59,2 mg.g⁻¹ MS de fucoxantina com adição de 1% de CO₂ e radiância de 150 μmol fotons m⁻² s⁻¹ (lâmpadas brancas tipo LED, 9W).

A quantidade de fucoxantina que foi possível purificar neste trabalho (24,77 mg.g⁻¹ MS) representa um número promissor neste cenário, podendo ainda ser melhorado através de ajustes nas condições cromatográficas, uma vez que este valor representa aproximadamente 2/3 da fucoxantina disponível na biomassa microalgal nas condições experimentais utilizadas. Na Fig. 11 é possível comparar o cromatograma (CLAE-DAD) da amostra que foi purificada em coluna aberta de sílica com o cromatograma do padrão analítico (*all-trans*-fucoxantina > 95,0% pureza-CLAE, Sigma-Aldrich, MO - EUA), tendo como evidência para a identidade da fucoxantina o mesmo tempo de retenção (2,7 min) para a amostra e o padrão analítico.

Figura 11– Cromatogramas (CLAE-DAD) a) da amostra de fucoxantina purificada e b) padrão analítico, com tempos de retenção de 2,7 min em 450 nm.

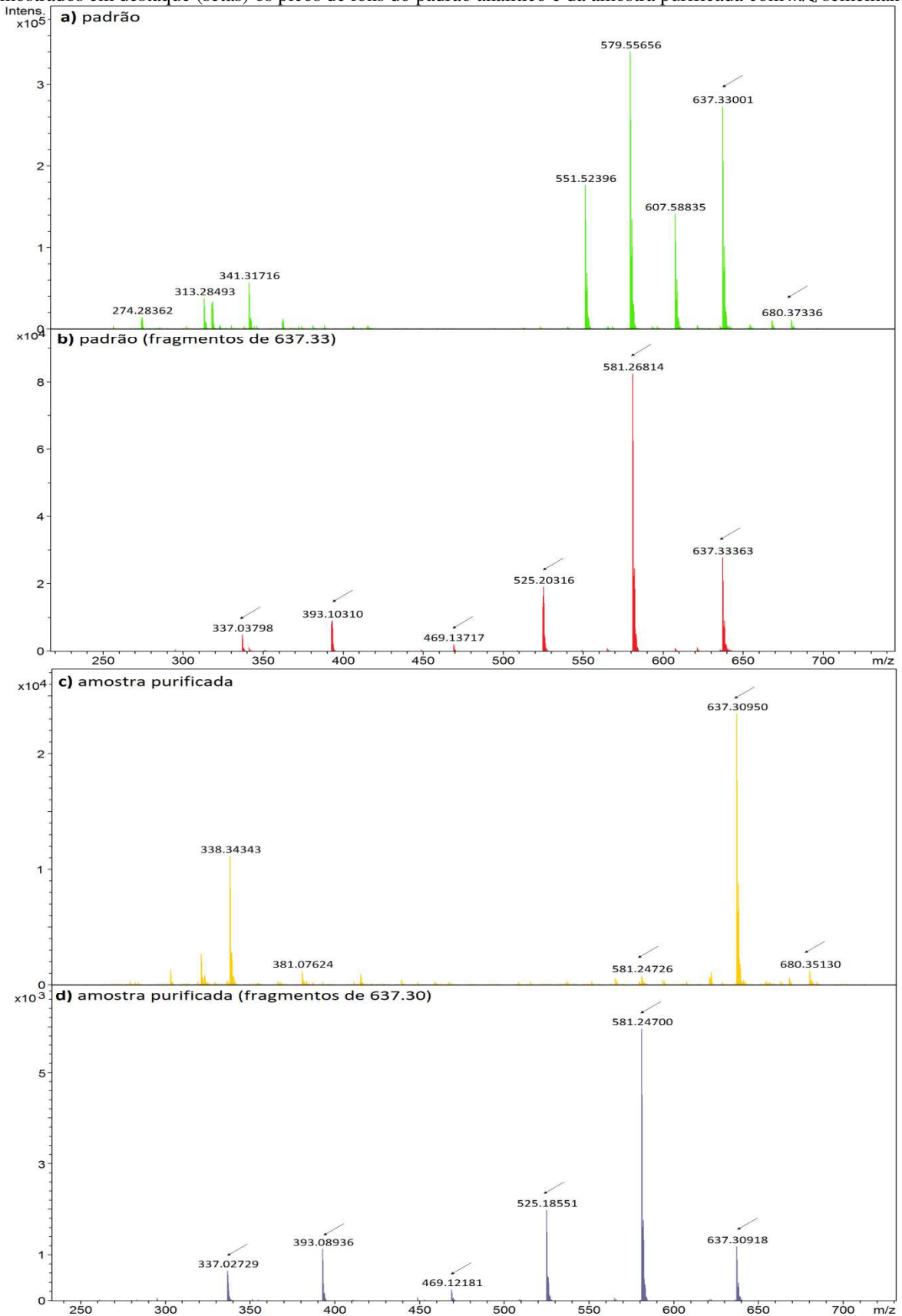


De forma recursiva, é importante destacar que as condições de cultivos observadas nos trabalhos descritos na literatura não são iguais, um fato que interfere nos valores de quantidades de fucoxantina detectados, impondo à análise comparativa dos resultados as devidas ponderações. Além disto, a suplementação do meio de cultura de *P. tricornutum* com sulfato de amônio sob outras condições experimentais, e.g., temperatura, meio de cultura,

cultivos em sistemas abertos ou à luz natural poderá, eventualmente, oferecer resultados ainda mais promissores na síntese de fucoxantina pela microalga.

A identidade do analito foi confirmada pela análise por espectrometria de massas, também de forma comparativa à amostra de padrão analítico (*all-trans*-fucoxantina > 95,0% pureza—CLAE, Sigma-Aldrich, MO - EUA). A análise comparativa dos perfis espectrais de massas do padrão analítico (Fig. 12a) e da amostra purificada (Fig. 12c) revela a presença simultânea de íons com m/z de 637,33 e 680,37/680,35. São apresentados os espectros de fragmentação do íon m/z 637,33 do padrão analítico e da amostra purificada (Fig. 12b e Fig. 12d respectivamente), demonstrando um padrão semelhante de íons de fragmentação, e.g., 637,33; 581,27/581,25; 525,20/525,18; 469,14/469,12; 393,10/393,09; e 337,03 m/z , reforçando a identidade da molécula extraída e purificada como fucoxantina.

Figura 12- Espectros de massas de fucoxantina a) padrão analítico, b) padrão analítico com fragmentação da massa 637,33 m/z, c) amostra purificada e d) amostra purificada com a fragmentação da massa 637,33 m/z. São mostrados em destaque (setas) os picos de íons do padrão analítico e da amostra purificada com m/z semelhantes.



4.2 CONCLUSÃO

Não é possível concluir com certeza que enzimas inibidas realmente proporcionaram um aumento na biossíntese da fucoxantina. Para obter essas informações, é necessário verificar se as enzimas em questão foram realmente inibidas. Além disso, supõe-se que qualquer um dos inibidores testados também possa interferir na ação de outras enzimas não-alvo. Entretanto, com relação ao uso de ureia como fonte alternativa de nitrogênio, os resultados concordam qualitativamente com os modelos metabólicos em pelo menos uma das concentrações testadas, não apenas no aumento da biomassa, mas também na biossíntese de fucoxantina. Foi possível então promover o aumento da produção de fucoxantina através de soluções fornecidas pelas ferramentas computacionais e sulfato de amônio e ureia se mostraram promissores para a produção de fucoxantina na microalga *P. triornutum* devido aos valores superiores para a biossíntese de fucoxantina obtidos. A radiação azul aqui testada não teve efeito positivo na biossíntese de fucoxantina.

É possível purificar a fucoxantina de extratos brutos de *P. triornutum* através das técnicas cromatográficas aqui utilizadas e, mesmo que o rendimento de purificação possa ainda ser melhorado, os valores aqui obtidos já estão entre os melhores valores encontrados para esta microalga.

4.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, A E, VARDI, A, BOWLER, C. **An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms.** *Current Opinion in Plant Biology* 9:264–273, 2006.

ANTO, S, KARPAGAM, R, RENUKADEVI, P, JAWAHARRAJ, K, VARALAKSHMI, P. **Biomass enhancement and bioconversion of brown marine microalgal lipid using heterogeneous catalysts mediated transesterification from biowaste derived biochar and bionanoparticle.** *Fuel* 255, 115789, 2019.

ARMBRUST, E V ET AL. **The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism.** *Science* 306(1): 79-85, 2004.

ASLAM, S N, STRAUSS, J, THOMAS, D N, MOCK, T, UNDERWOOD, G J C. **Identifying metabolic pathways for production of extracellular polymeric substances by the diatom *Fragilariopsis cylindrus* inhabiting sea ice.** *The ISME Journal* 12: 1237-1251, 2018.

BAUER, C M, VILAÇA, P, RAMLOV, F, OLIVEIRA, E R, CABRAL, D Q, SCHMITZ, C, CORRÊA, R G, ROCHA, M, MARASCHIN, M. **In silico predictions for fucoxanthin production by the diatom *Phaeodactylum tricorutum*.** *Practical Applications of Computational Biology and Bioinformatics, 12th International Conference - Advances in intelligent systems and computing* 803: 139-148, 2018.

BOWLER, C, ALLEN, A E, BADGER, J H, GRIMWOOD, J, JABBARI, K, KUO, A, MAHESWARI, U, MARTENS, C, MAUMUS, F, OTILLAR, R P, RAYKO, E, SALAMOV, A, VANDEPOELE, K, BESZTERI, B, GRUBER, A, HEIJDE, M, KATINKA, M, MOCK, T, VALENTIN, K, VERRET, F, BERGES, J A, BROWNLEE, C, CADORET, J P, CHIOVITTI, A, CHOI, C J, COESEL, S, MARTINO, A D, DETTER, J C, DURKIN, C, FALCIATORE, A, FOURNET, J, HARUTA, M, HUYSMAN, M J J, JENKINS, B D, JIROUTOVA, K, JORGENSEN, R E, JOUBERT, Y, KAPLAN, A, KROGER, N, KROTH, P G, ROCHE, J L, LINDQUIST, E, LOMMER, M, MARTIN-JÉZÉQUEL, V, LOPEZ, P J, LUCAS, S, MANGOGNA, M, MCGINNIS, K, MEDLIN, L K, MONTSANT, M P O L, SECQ, NAPOLI, C, OBORNIK, M, PARKER, M S, PETIT, J L, PORCEL, B M, POULSEN, N, ROBISON, M, RYCHLEWSKI, L, RYNEARSON, T A, SCHMUTZ, J, SHAPIRO, H, SIAUT, M, STANLEY, M, SUSSMAN, M R, TAYLOR, A R, VARDI, A, DASSOW, V, VYVERMAN, W, WILLIS, A, WYRWICZ, L S, ROKHSAR, D S, WEISSENBACH, J, ARMBRUST, E V, GREEN, B R, PEER, Y V, GRIGORIEV, I V. **The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes.** *Nature* 456: 239–244, 2008.

BUTALA, N S, FALKINHAM, J O. **Nitrate and nitrite reductase activities of *Mycobacterium avium*.** *Int J Mycobacteriol* 7: 328-31, 2018.

CARRETO, J I, CATOGGIO, J A. **Variations in pigment contents of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* during growth.** *Marine Biology* 36: 105-112, 1976.

- CHI, S, LIU, T, WANG, X, WANG, R, WANG, S, WANG, G, SHAN, G, LIU, C. **Functional genomics analysis reveals the biosynthesis pathways of important cellular components (alginate and fucoidan) of *Saccharina*.** *Curr Genet* 64: 259-273, 2018.
- COESEL, S, OBORNÍK, M, VARELA, J, et al. **Evolutionary origins and functions of the carotenoid biosynthetic pathway in marine diatoms.** *PLoS One* 3(8): e2896, 2008.
- DOMINGUES, N, MATOS, A R, SILVA, J M, CARTAXANA, P. **Response of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to photooxidative stress resulting from high light exposure.** *PloSOne* 7: e38162, 2012.
- DOSE, M M, HIRASAWA, M, KLEIS-SANFRANCISCO, S, LEW, E L, KNAFF, D B. **The ferredoxin-binding site of ferredoxin:nitrite oxireductase.** *Plant Physiol.*114: 1047-1053, 1997.
- EGLESTON, E S, MOREL, F M M. **Nickel limitation and zinc toxicity in a urea-grown diatom.** *Limnol. Oceanogr.* 53(6): 2462-2471, 2008.
- EILERS, U, BIKOULIS, A, BREITENBACH, J, BÜCHEL, C, SANDMAN, G. **Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornutum*.** *J. Appl. Phycol.* 28: 123–129, 2016.
- FREITAS, R F, PROKOPCZYK, I M, ZOTTIS, A, OLIVA, G, ANDRICOPULO, A D, TREVISAN, M T S, VILEGAS, W, SILVA, M G V, MONTANARI, C A. **Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 17: 2476-2482, 2009.
- GAO, B, CHEN, A, ZHANG, W, LI, A, ZHANG, C. **Co-Production of lipids, eicosapentaenoic acid, fucoxanthin, and chrysolaminarin by *Phaeodactylum tricornutum* cultured in a flat-plate photobioreactor under varying nitrogen conditions.** *J. Ocean Univ. China* 16(5): 916–924, 2017.
- GLIBERT P M ET AL. **Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions.** *Limnology and Oceanography* 61: 165-197, 2016.
- GÓMEZ-LOREDO, A, BENAVIDES, J, RITO-PALOMARES, M. J. **Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* cultures at different light and agitation conditions.** *Appl. Phycol.* 28: 849–860, 2016.
- GUILLARD, R R L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates.** In: Smith, W L and Chanley, M H, Eds., *Culture of Marine Invertebrate Animals*, *Plenum Press, New York* 29-60, 1975.
- HAMADA, M, HIRAOKA, T, KOIKE, K, OGASAHARA, K, KANZAKI, T, KOIKE, M. **Properties and subunit structure of pig heart.** *J. Biochem.* 79: 1273-1285, 1976.

HOSOKAWA, M, WANEZAKI, S, MIYAUCHI, K, KURIHARA, H, KOHNO, H, KAWABATA, J, ODASHIMA, S, TAKAHASHI, K. **Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HL-60.** *Food Sci. Technol. Res.* 5: 243–246, 1999.

KAPLAN, D, RICHMOND, A E, DUBINSKY, Z, AARONSON, S. **Algal nutrition.** In **Handbook of Microalgal Mass Culture.** RICHMOND, A, Ed., CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 97–115, 1986.

KIM, S M et al. **A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalgae *Phaeodactylum tricornutum*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166: 1843-18, 2012a.

KIM, S M, KANG, S W, KWON, O N, CHUNG, D, PAN, C. **Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: characterization of extraction for commercial application.** *J Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55: 477–483, 2012b.

KIM, J, FABRIS, M, BAART, G, KIM, M K, GOOSSENS, A, VYVERMAN, W, FALKOWSKI, P G, LUN. D, S. **Flux balance analysis of primary metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.** *Plant J.* 85: 161–176, 2016.

LEE S Y, LEE, D, KIM, T Y. **Systems biotechnology for strain improvement.** *Trends in Biotechnology* 23 (7): 349-358, 2005.

LEVERING, J, BRODDRICK, J, DUPONT, C L, PEERS, G, BEERI, K, MAYERS, J, GALLINA, A A, ALLEN, A E, PALSSON, B O, ZENGLER, K. **Genome-scale model reveals metabolic basis of biomass partitioning in a model diatom.** *PLoSOne* 11: e0155038, 2016.

LEVITAN, O, DINAMARCA, J, ZELZION, E, LUN, D, GUERRA, L, KIM, M, KIM, J, VANMOOY, B, BHATTACHARYA, D, FALKOWSKI, P. **Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112: 412–417, 2015.

MARTEL, C M. **Nitrogen-deficient microalgae are rich in cell-surface manose: potential implications for prey biorecognition by phagotrophic protozoa.** *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 86-89, 2009.

McCLURE, D D, LUIZ, A, GERBER, B, BARTON, G W, KAVANAGH, J M. **An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*.** *Algal Research* 29: 41-48, 2018.

MIAZEK, K, IWANEK, W, REMACLE, C, RICHEL, A, GOFFIN, D. **Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: a review.** *Int. J. Mol. Sci.* 16: 23929-23969, 2015.

NUR, M M A, SWAMINATHAM, M K, BOELEN, P, BUMA, A G J. **Sulfated exopolysaccharide production and nutrient removal by the marine diatom**

Phaeodactylum tricornutum growing on palm oil mill effluent. *Journal of Applied Phycology* 31: 2335–2348, 2019.

OBATA, T, FERNIE, A R, NUNES-NESE, A. **The central carbon and energy metabolism of marine diatoms.** *Metabolites* 3: 325-346, 2013.

OLIVEIRA, L, ANTIA, N J. **Evidence of nickel ion requirement for autotrophic growth of a marine diatom with urea serving as nitrogen source.** *British Phycological Journal* 19:2 125-134, 1984.

PARK, J H, LEE K H, KIM, T Y, LEE, S Y. **Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and *in silico* gene knockout simulation.** *Pnas* 104: (19) 7797-7802, 2007.

PEREZ-GARCIA, O, ESCALANTE, F M E, DE-BASHAN, L E, BASHAN, Y. **Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products.** *Water Research* 45: 11-36, 2011.

PHILLIPS, N F B, GOSS, N H, WOOD, H G. **Modification of pyruvate, phosphate dikinase with pyridoxal 5'-phosphate: Evidence for a catalytically critical lysine residue.** *Biochemistry* 22: 2518-2523, 1983.

REES, T A V, BEKHEET, I A. **The role of nickel in urea assimilation by algae.** *Planta* 156: 385-387, 1982.

REMMERS, I M, D'ADAMO, S, MARTENS, D E, DE VOS, R C H, MUMM, R, AMERICA, A H P, GORDEWENER, J H G, BAKKER, L V, PETERS, S A, WIJFFELS, R H, LAMERS, P P. **Orchestration of transcriptome, proteome and metabolome in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* during nitrogen limitation.** *Algal research* 35: 33-49, 2018.

ROCHA, I, MAIA, P, EVANGELISTA, P, VILAÇA, P, SOARES, S, PINTO, J, P, NIELSEN, P, PATIL, K, R, FERREIRA, E C, ROCHA, M. **OptFlux: an open-source software platform for *in silico* metabolic engineering.** *BMC Syst. Biol.* 4, 45, 2010.

SINGH R, P, SETLOW, P. **Enolase from spores and cells of *Bacillus megaterium*: Two-step purification of the enzyme and some of its properties.** *Journal of Bacteriology* 353-355, 1978.

SYRETT, P J, PEPLINSKA, A M. **The effect of nickel and nitrogen deprivation on the metabolism of urea by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.** *British Phycological Journal* 23: 4, 387-390, 1988.

YONGMANITCHAI, W, WARD, O P. **Growth of an omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions.** *Applied and environmental microbiology.* 57(2): 419–425, 1991.

WAGNER, H, JAKOB, T, WILHELM, C. **Balancing the energy flow from captured light to biomass under fluctuating light conditions.** *New Phytol.* 169: 95–108, 2006.

WANG, H, FU, R, PEI, G. **A study on lipid production of the mixotrophic microalgae *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources**, *Afr. J. Microbiol. Res.* 6: 1041–1047, 2012.

5 CONCLUSÃO GERAL

De modo geral, pode-se concluir que os modelos computacionais utilizados neste trabalho foram utilizados com sucesso uma vez que encontrou-se formas de aumentar a produção de fucoxantina na microalga, aumentando a biomassa ou provocando a biossíntese de fucoxantina.

Foi possível através deste trabalho otimizar a produção de fucoxantina através da aplicação *in vitro*, de resultados obtidos pelo uso de ferramentas computacionais bem como a recuperação de um extrato purificado rico em fucoxantina. Ainda é possível ajustar as técnicas de purificação para obter um maior rendimento na obtenção da fucoxantina e refinar a obtenção de fucoxantina com alto grau de pureza para fins comerciais.

6 AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos funcionários do Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), em especial do laboratório multiusuário de espectrometria de massas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Este estudo foi apoiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) e pelo conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq, Brasil).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARREIRO, E J, BOLZANI, V S. **Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos.** *Quím. Nova* 32(3): 679-688, 2009.

BRENNAN, L, OWENDE, P. **Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557-577, 2010.

HOSOKAWA, M, WANEZAKI, S, MIYAUCHI, K, KURIHARA, H, KOHNO, H, KAWABATA, J, ODASHIMA, S, TAKAHASHI, K. **Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HL-60,** *Food Sci. Technol. Res.* 5: 243–246, 1999.

KIM, S. M. et al. **A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalgae *Phaeodactylum tricornutum*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166: 1843-18, 2012.

LOURENÇO, S O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações.** São Carlos, RiMa, 2006.

NAMDEO, A G. **Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review.** *Pharmacognosy Reviews* 1: 69-79, 2007.

SATHASIVAM, R, KI, J. **A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries.** *Marine Drugs* 16: 26, 2018.

VIEGAS JR, C, BOLZANI, V S. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** *Quím. Nova* Vol. 29, No.2: 326-337, 2006.