



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Análise lipídica de microalgas utilizadas na alimentação de moluscos
bivalves**

Vinícius Mikio Suzuki

Trabalho de Conclusão de Curso ao curso de Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Claudio Manoel Rodrigues de Melo

Florianópolis – SC

Novembro/2025

Análise lipídica de microalgas utilizadas na alimentação de moluscos bivalves

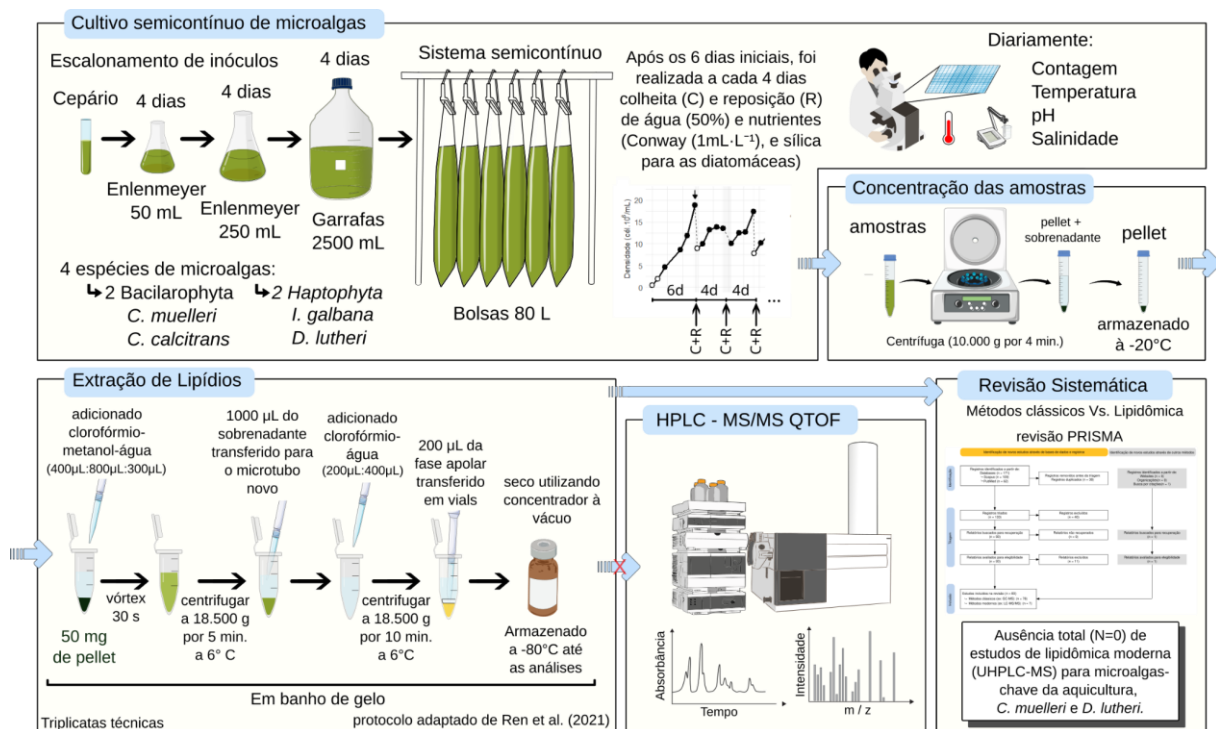
Vinicius Mikio Suzuki^{1*}; Claudio Manoel Rodrigues de Melo²

⁽¹⁾ Acadêmico do curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa Postal 476, CEP 8840-900, Florianópolis-SC, Brasil.

⁽²⁾ Professor do Depto. de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa Postal 476, CEP 8840-900, Florianópolis-SC, Brasil.

*Autor Correspondente - e-mail: vinicius.suzuki@grad.ufsc.br

Resumo gráfico



Resumo

O objetivo inicial foi caracterizar o perfil lipídico de quatro espécies de microalgas (*Chaetoceros muelleri*, *C. calcitrans*, *Isochrysis galbana* e *Diacronema lutheri*) utilizadas na alimentação de moluscos bivalves no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC), visando otimizar a nutrição e compreender o valor molecular da dieta. A metodologia previa o cultivo em sistema semicontínuo e subsequente análise por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UHPLC - Q-TOF MS). Contudo, esta etapa analítica para a caracterização do perfil lipídico foi inviabilizada por dificuldades técnicas, como a contaminação persistente da coluna. Diante dessa falha na obtenção de dados primários, a pesquisa foi reestruturada para uma revisão crítica da literatura, que mapeou metodologias de análise (clássica vs. moderna) e identificou uma lacuna no conhecimento. Ressalta-se que o detalhamento metodológico da etapa experimental e os resultados parciais foram preservados e encontram-se descritos integralmente no Apêndice B. A principal conclusão desta revisão (83 publicações) é a ausência completa (N = 0) de estudos de lipidômica moderna (LC-MS) para as espécies *C. muelleri* e *D. lutheri*. Esta descoberta demonstra que o conhecimento sobre estas

espécies está restrito à composição de ácidos graxos obtida por métodos clássicos. A análise lipidômica proposta originalmente, uma vez superados os desafios técnicos, permanece como uma etapa relevante para suprir esta lacuna, fornecendo insights sobre a estrutura intacta dos lipídios e otimizando o manejo nutricional na aquicultura de moluscos bivalves.

Palavras-chave: Lipidômica, Microalgas, Moluscos Bivalves, Aquicultura, UHPLC-MS

Lipid analysis of microalgae used in the diet of bivalve molluscs

Abstract

The initial objective was to characterise the lipid profile of four microalgae species (*Chaetoceros muelleri*, *C. calcitrans*, *Isochrysis galbana* and *Diacronema lutheri*) used in the feeding of bivalve molluscs at the Laboratory of Marine Molluscs (LMM/UFSC), aiming to optimize nutrition and understand the molecular value of the diet. The proposed methodology involved cultivation in a semi-continuous system and subsequent analysis by Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (UHPLC - Q-TOF MS). However, this analytical step for lipid profile characterization was impeded by technical difficulties, such as persistent column contamination. Faced with this failure to obtain primary data, the research was restructured into a critical literature review, which mapped analytical methodologies (classical vs. modern) and identified a knowledge gap. It is noteworthy that the methodological detailing of the experimental stage and partial results were preserved and are fully described in Appendix B. The main conclusion of this review (83 publications) is the complete absence (N = 0) of modern lipidomics studies (LC-MS) for the species *C. muelleri* and *D. lutheri*. This discovery demonstrates that current knowledge of these species is restricted to fatty acid composition obtained by classical methods. The originally proposed lipidomic analysis, once the technical challenges are overcome, remains an unprecedented and fundamental step to address this gap, providing insights into the intact structure of lipids and optimising nutritional management in bivalve mollusc aquaculture.

Key-words: Lipidomics, Microalgae, Bivalve Molluscs, Aquaculture, UHPLC-MS

Introdução

Microalgas na Aquicultura de Moluscos Bivalves

A utilização de microalgas vem sendo muito estudada em diversos setores, como: em suplementos na alimentação humana (Matos, 2017; Čmiková et al., 2024), em compostos para a indústria de cosméticos (Yarkent; Gürlek; Oncel, 2020; De Luca et al., 2021; Rosa et al., 2025) e farmacológicos (Khavari et al., 2021; Hassan et al., 2022), para a fabricação de biocombustíveis (Olabi et al., 2022; Hoang et al., 2023), para o tratamento de efluentes (Dai; Wang, 2024; Kundu; Dutta; Bhattacharya, 2024), para a captura e armazenamento de carbono (Daneshvar et al., 2022; Nguyen et al., 2023; Tripathi et al., 2023), como bioinsumos para utilização na agricultura (Gonçalves et al., 2023; Gama et al., 2025) e na alimentação e suplementação animal (Souza; Bastos; Santos, 2021; Mavrommatis et al., 2023), especialmente na aquicultura (Ansari et al., 2021; Ma; Hu, 2024).

No cultivo de moluscos bivalves, a produção de juvenis em laboratório é fundamental para manter a sustentabilidade da cadeia produtiva sem impactar os bancos naturais (Helm; Bourne, 2004). Para isso, um dos principais desafios é a produção de microalgas (Bodenstein; Waguespack; Robinson, 2025; Matias; Rato; Joaquim, 2025), que são alimentos vivos indispensáveis na dieta dos moluscos, pois são essenciais na nutrição durante todas as etapas de vida destes organismos. Desta forma, um dos principais esforços de um laboratório que produz formas jovens de moluscos bivalves (sementes ou *spats*) é manter a qualidade da produção das microalgas.

No Brasil, a produção de moluscos bivalves ocorre, principalmente, no estado de Santa Catarina. Em 2022, segundo o Boletim da Aquicultura nas Águas da União (Oliveira; Arnaud, 2023), cerca de 98,1% da produção nacional de moluscos em águas da União é desenvolvida no estado. As principais espécies produzidas no país são o mexilhão (*Perna perna*) e a ostra do Pacífico (*Magallana gigas*), e em menor escala, as ostras nativas (*Crassostrea gasar* e *C. rhizophorae*) e vieiras (*Nodipecten nodosus*). Historicamente, o Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) consolidou-se como um elo fundamental na cadeia produtiva, atuando como a via para o desenvolvimento e a transferência do pacote tecnológico de produção de sementes, o que permitiu superar o gargalo da obtenção de juvenis da espécie exótica *Crassostrea gigas* (De Andrade, 2016).

Atualmente no LMM, um mix de até quatro espécies de microalgas é diariamente ofertado para alimentação dos animais, sendo duas espécies de diatomáceas (*Bacillariophyta*), *Chaetoceros muelleri* Lemmermann 1898 e *C. calcitrans* (Paulsen) H.Takano 1968; e duas espécies de microalgas flageladas (*Haptophyta*), *Isochrysis galbana* Parke 1949 e *Diacronema lutheri* (Droop) Bendif & Véron 2011. Para serem utilizadas como alimento, essas espécies devem apresentar diversas características, como: tamanho de célula adequado, produtividade suficiente de biomassa, perfil nutricional adequado para os animais, o qual inclui a ausência de toxinas (Guedes; Malcata, 2012; Sampollo et al., 2024) e palatabilidade para bivalves (Liao et al., 2017).

Importância dos Lipídios e Ácidos Graxos na Nutrição

Em um estudo clássico, foi demonstrado que mais de 70% da variância no crescimento de larvas de *M. gigas* e *Mytilus galloprovincialis* pode ser explicada pela nutrição (His et al., 1989). Os lipídios são considerados a principal fonte de energia das larvas de moluscos bivalves, seguida por proteínas e em menor contribuição, os carboidratos (Marshall; McKinley; Pearce, 2010).

O principal foco de análises no ambiente marinho é conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (no inglês, PUFA), especialmente os de cadeia longa como o ômega-3, ômega-6, como os ácido linoleico (LA) e ácido α -linolênico (ALA), e por consequência seus derivados, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA). Estes lipídios são abundantemente encontrados na base da teia trófica marinha (Colombo et al., 2017) e são essenciais para a saúde e sobrevivência não só humana, mas também da vida terrestre e aquática (Arnold et al., 2015). Os PUFAs são responsáveis pela manutenção da estrutura e funcionalidade das membranas celulares, além de serem precursores bioquímicos de vertebrados, invertebrados e plantas (Parrish, 2009).

Esse papel estrutural é mais evidente no estágio de pós-larva (spat), uma das fases mais delicadas e com maior mortalidade da produção. Um estudo focado em juvenis de *Mytilus edulis* ilustra este ponto crítico: Laudicella et al. (2020b) demonstraram que a dieta rica em PUFA induziu uma "profunda remodelação" nas espécies moleculares dos lipídios de membrana do spat. A hipótese levantada foi que um desequilíbrio nessas membranas afeta a capacidade de aclimatação do animal, podendo ser uma causa direta da alta mortalidade pós-transferência (Laudicella et al., 2020b).

Além da nutrição basal, a análise detalhada dos lipídios (lipidômica) tem permitido identificar novos biomarcadores de saúde dos bivalves, permitindo desvendar a adaptação destes organismos às mudanças climáticas e a estressores abióticos (Rey et al., 2022). Uma revisão de Laudicella et al. (2020a) destaca que biomarcadores lipídicos são aplicados para avaliar a qualidade reprodutiva (gametas e ovos) e, promissora, para estudar interações com patógenos, como bactérias do gênero *Vibrio*, abrindo caminho para um manejo sanitário mais eficaz.

Apesar de encontrados genes para a síntese *de novo* de PUFA em diversos animais, inclusive no filo Mollusca (Kabeya et al., 2018), a distribuição dos genes desaturase ω e elongase, necessários para a biosíntese de PUFAs, não é uniforme e varia de espécie para espécie. Um exemplo disso, é a espécie *M. gigas* que não parece apresentar genes desaturase ω em sua constituição gênica (Monroig; Kabeya, 2018). Além disso, experimentos realizados com acetato e ácidos graxos radioativos também sugerem que juvenis de *M. gigas* não são capazes de sintetizar PUFAs em quantidades suficientes para o desenvolvimento e manutenção do metabolismo, e por isso, são considerados essenciais para esses animais (Zhukova, 2019).

As concentrações e misturas ideais de microalgas ofertadas para formas jovens de diferentes espécies de moluscos são frequentemente objetos de pesquisa (Brown; Robert, 2002; Rico-Villa et al., 2006; Marquez et al., 2019; Gomes et al., 2024). Porém, não somente os

valores de lipídios, mas também de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, são bastante dependentes das condições de cultivos. Fatores bióticos como a genética e os abióticos a luz, o fotoperíodo, a temperatura, o pH, a quantidade de dióxido de carbono dissolvido e a salinidade influenciam na qualidade das microalgas como alimento, que também podem ser alterados em situações de estresse, como por exemplo, quando há a escassez de algum nutriente (Brown et al., 1997; Hu, 2013; Koller; Muhr; Braunegg, 2014).

Relevância Local e Plasticidade Fenotípica: A Necessidade de um Padrão de Referência do LMM

A justificativa para a análise lipidômica das cepas nas condições de cultivo locais fundamenta-se na alta plasticidade fenotípica das microalgas. A composição bioquímica destas espécies não é uma característica fixa, mas uma resposta dinâmica ao ambiente de cultivo. Fatores abióticos modulam diretamente o metabolismo algal (Hu, 2013).

Uma revisão sistemática sobre o tema confirma que o estresse ambiental pode alterar profundamente a alocação de carbono entre as classes de lipídios (Suparmaniam et al., 2023). A fase de cultivo, por exemplo, pode induzir o acúmulo de lipídios de reserva, como os triacilgliceróis (TAGs) em detrimento de lipídios estruturais de membrana, alterando o valor nutricional da dieta ofertada.

Neste contexto, a análise lipidômica proposta originalmente visava caracterizar o perfil bioquímico real das cepas sob as condições específicas de manejo do laboratório. O estabelecimento de um padrão de referência local permitiria ao LMM:

- Tomar decisões baseadas em dados qualitativos e quantitativos sobre a dieta ofertada;
- Diagnosticar problemas futuros, correlacionando, por exemplo, o desempenho larval a mudanças no perfil lipídico das microalgas; e
- Servir como fonte de dados para futuros trabalhos de nutrição, permitindo correlacionar o perfil lipídico detalhado com o desempenho zootécnico (crescimento e sobrevivência) das larvas e sementes de bivalves.

Abordagens Analíticas: Perfil de Ácidos Graxos vs. Lipidômica

Apesar de avanços no conhecimento nutricional, a maior parte do conhecimento em áreas aplicadas, como a aquicultura, ainda se apoia majoritariamente em métodos clássicos, como a análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa (Nguyen; Ramli; Kee, 2017). Embora a análise do perfil de ácidos graxos seja uma ferramenta robusta para quantificar a composição de ácidos graxos (Khoury et al., 2018), ele não consegue identificar a estrutura molecular intacta

dos lipídios como métodos de lipidômica, informação crucial para compreender a função fisiológica e bioativa da molécula (Wang; Han, 2014).

Lipidômica é a área que estuda e analisa os lipídios de forma sistêmica e suas interações (Wenk, 2005). Han e Gross (2022) consideram que nos últimos 20 anos o desenvolvimento das tecnologias de lipidômica melhoraram significativamente devido à caracterização extensa das estruturas das classes de lipídios conhecidas. O desenvolvimento de inúmeros avanços relacionados à quantificação e ao estudo funcional de lipídios em sistemas biológicos, bem como o progresso na área de bioinformática, têm facilitado o processamento de dados em tempo real. O aperfeiçoamento da espectrometria de massas (MS) e a sua combinação com métodos cromatográficos permitem obter um entendimento muito mais aprofundado na área da lipidômica (Jurowski et al., 2017).

Objetivos

O objetivo inicial deste trabalho foi caracterizar o perfil lipídico das quatro espécies de microalgas (*C. muelleri*, *C. calcitrans*, *I. galbana* e *D. lutheri*) utilizadas na alimentação de moluscos bivalves no LMM, visando otimizar a nutrição e compreender o valor molecular da dieta. A metodologia previa o cultivo em sistema semicontínuo e subsequente análise por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UHPLC - Q-TOF MS) para quantificar as quantidades relativas de ácidos graxos essenciais e lipídios intactos.

Contudo, a etapa analítica experimental não pôde ser concluída (ver Seção de Reestruturação), levando à redefinição do trabalho para uma revisão sistemática.

Desta forma, os objetivos específicos do presente trabalho reestruturado são:

1. Mapear as abordagens analíticas disponíveis na literatura científica para a caracterização lipídica das quatro espécies estudadas, comparando a prevalência de Métodos Clássicos *versus* Métodos Modernos;
2. Diagnosticar o estado da arte do conhecimento sobre estas espécies, verificando a existência ou a escassez de dados lipidômicos detalhados;
3. Demonstrar as vantagens da identificação de lipídios intactos (lipidômica) frente à análise clássica de ácidos graxos.

Reestruturação Metodológica e Desafios Técnicos

Planejamento Experimental Original: Cultivo e Análise

O delineamento experimental foi estruturado em duas etapas consecutivas: a produção de biomassa em sistema semicontínuo e a caracterização lipidômica via espectrometria de massas de alta resolução.

Na etapa biológica, as quatro espécies de microalgas (*Chaetoceros muelleri*, *C. calcitrans*, *Isochrysis galbana* e *Diacronema lutheri*) foram cultivadas utilizando o meio Conway (Walne, 1966), com suplementação de silicato para as diatomáceas. O sistema de produção foi escalonado a partir de culturas de estoque até bolsas plásticas de 80 L (volume útil), operando em regime semicontínuo. Os parâmetros abióticos, incluindo irradiância, temperatura, pH e salinidade, foram monitorados diariamente para garantir condições padronizadas de crescimento.

Para a caracterização química, estabeleceu-se um protocolo de extração de lipídios totais em batelada, adaptado de Ren et al. (2021), utilizando o sistema de solventes clorofórmio/metanol/água. A análise analítica foi projetada em sistema UHPLC-Q-TOF MS utilizando coluna de fase reversa e gradiente de eluição otimizado para lipídios intactos, conforme detalhado integralmente no Apêndice B.

Dificuldades na Validação Analítica e Redefinição do Estudo

A biomassa obtida na etapa de cultivo foi processada para a subsequente análise do perfil lipídico por UHPLC-MS, conforme descrito na metodologia. Contudo, durante a fase de desenvolvimento e validação do método analítico no equipamento análises em cromatógrafo líquido de ultra desempenho (UHPLC, Agilent 1290, Agilent Technologies, CA, EUA) conectada a um espectrômetro de massa Quadrupole Time-of-Flight (Agilent 6545XT Q-TOF MS), foram encontradas dificuldades técnicas que impediram a obtenção de dados reprodutíveis e confiáveis. A contaminação persistente da coluna inviabilizou a análise do perfil lipídico das amostras de microalgas dentro do cronograma estabelecido para este trabalho.

Dada a impossibilidade de gerar dados experimentais primários validados para a discussão nutricional, optou-se por reestruturar o trabalho centralmente. A seção a seguir apresenta uma revisão da literatura científica sobre a análise de lipídios de microalgas por UHPLC-MS. Importante destacar que, contudo, visando o registro dos protocolos de cultivo e analíticos desenvolvidos, o detalhamento metodológico da etapa experimental, bem como os dados parciais de crescimento algal e as dificuldades técnicas enfrentadas, foram preservados e encontram-se descritos integralmente no Apêndice B.

Metodologia Da Revisão Sistemática

Delimitação da Revisão (Framework PRISMA)

Foi conduzida uma revisão crítica seguindo uma abordagem sistemática inspirada no framework PRISMA (Page et al., 2021). O objetivo foi mapear e comparar a literatura existente sobre a análise lipídica de quatro espécies de microalgas utilizadas no LMM: *C. muelleri*, *C. calcitrans*, *I. galbana* e *D. lutheri*.

Fontes de Dados e Estratégia de Busca

As buscas foram realizadas em novembro de 2025 nas bases Scopus (como fonte primária) e PubMed (como fonte complementar). As estratégias de busca completas, incluindo os filtros aplicados, estão detalhadas no Apêndice A (Tabela A1).

As buscas foram desenhadas para identificar estudos que utilizaram duas abordagens analíticas distintas: a análise do perfil de ácidos graxos (FAP), que quantifica os ácidos graxos individuais (tipicamente por GC após derivatização em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs)), denominada nesta revisão como 'Método Clássico'; e a análise lipídômica, que identifica as moléculas lipídicas intactas (comumente por LC-MS/MS), definida aqui como 'Método Moderno'. Para a busca focada na abordagem clássica de FAP, aplicou-se um filtro temporal (publicados desde 2016) na base Scopus (Tabela A1), visando capturar as práticas de quantificação mais recentes.

Triagem e Elegibilidade

Os registros identificados (N = 171 brutos e N = 133 após remoção de registros duplicados) passaram por um processo de triagem em três fases. Os artigos foram avaliados sob dois critérios principais de inclusão: 1) o estudo deveria analisar o perfil lipídico ou de ácidos graxos de pelo menos uma das quatro microalgas de interesse (*C. muelleri*, *C. calcitrans*, *I. galbana*, *D. lutheri*); e 2) o texto completo deveria estar disponível. Foram considerados critérios de exclusão: estudos focados em macroalgas ou outras microalgas; revisões da literatura; estudos teóricos ou de modelagem sem apresentação de dados analíticos primários; e artigos duplicados já excluídos na etapa inicial. Na Fase 1, títulos e resumos foram avaliados (N = 93 artigos elegíveis). Na Fase 2, os textos completos foram lidos para confirmar a elegibilidade e categorizar os estudos metodologicamente, resultando em 82 artigos incluídos (76 Clássicos; 6 Modernos).

Na Fase 3, foram empregadas buscas complementares, incluindo o rastreamento de citações e buscas manuais no Google Scholar, para verificar as lacunas de literatura

identificadas. Esta verificação identificou um estudo adicional, que foi incluído, elevando o número total da revisão para 83 estudos (76 Clássicos; 7 Modernos).

Resultados e Discussão

O processo de seleção dos estudos, detalhado na seção anterior e ilustrado visualmente pelo fluxograma PRISMA (Figura 1), resultou na inclusão de 83 estudos relevantes. Estes foram divididos em 76 estudos de "Métodos Clássicos" e 7 de "Métodos Modernos".

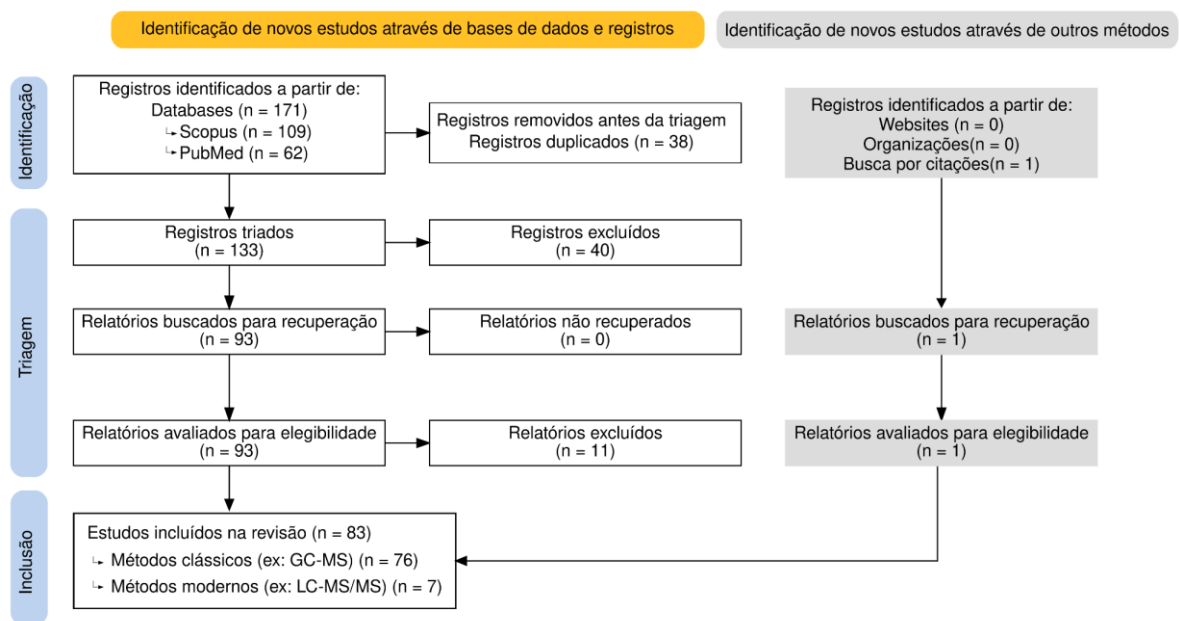


Figura 1. Fluxograma do processo de seleção dos estudos, adaptado do framework PRISMA1 (Page et al., 2021).

A Lacuna Quantitativa: O Desequilíbrio de Publicações

A primeira constatação relevante desta revisão é a lacuna quantitativa de publicações. Ao mapear os 83 estudos pelas quatro espécies de microalgas de interesse do LMM (Tabela 2), emerge um claro desequilíbrio no número de artigos publicados entre os métodos de análises.

Tabela 2. Distribuição dos estudos de perfil lipídico incluídos na revisão por espécie de microalga e método analítico. A lacuna completa de estudos (N=0) para *C. muelleri* e *D. lutheri* nos métodos modernos (Lipidômica) é o principal achado.

Espécie de Microalga	Métodos Clássicos (Análise do Perfil de Ácidos Graxos)	Métodos Modernos (Lipidômica)	Total por Espécie
<i>Chaetoceros muelleri</i>	N = 16	N = 0	N = 16
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	N = 20	N = 2	N = 22
<i>Isochrysis galbana</i>	N = 57	N = 5	N = 64
<i>Diacronema lutheri</i> ou <i>Pavlova lutheri</i>	N = 12	N = 0	N = 12
Total por Método	N = 105	N = 7	N = 114*

*Nota: O número total de entradas (114) é superior ao número de estudos incluídos (83), pois alguns estudos analisaram múltiplas espécies.

Esta discrepância reflete, fundamentalmente, a adequação de cada método a diferentes objetivos de pesquisa. Historicamente, o interesse da aquicultura no valor nutricional das microalgas focou-se na quantificação de ácidos graxos totais, especialmente PUFA's como EPA e DHA (Cheng et al., 2020). Para este objetivo, a cromatografia gasosa e seus hifenados são a ferramenta ideal, sendo uma técnica robusta, padronizada e de custo acessível (Nguyen; Ramli; Kee, 2017).

A Lipidômica (métodos modernos), por sua vez, é a ferramenta adequada para uma pergunta mais complexa: Como a estrutura molecular intacta do lipídio afeta o valor nutricional, a bioatividade e a fisiologia do animal que o consome? Essa análise pode caracterizar a estrutura molecular intacta dos lipídios (ex.: TAGs vs. MGDGs) e levar à descoberta de lipídios bioativos e à elucidação de mecanismos fisiológicos (Da Costa et al., 2016). O uso de métodos modernos é expressivamente menor (N = 7) pois, além de sua alta complexidade técnica e analítica, ela responde a uma pergunta que o campo da nutrição em aquicultura apenas recentemente começou a explorar em profundidade (Roques et al., 2020).

Como demonstrado na Tabela 2, existe uma ausência completa (N = 0) de estudos de lipidômica para *C. muelleri* e *D. lutheri*, duas das espécies mais comumente utilizadas na produção de juvenis de ostras (Rivero-Rodríguez; Beaumont; Lora-Vilchis, 2007). O conhecimento científico sobre o perfil lipídico destas espécies, cruciais para a dieta de bivalves no LMM, baseia-se predominantemente em métodos clássicos de cromatografia gasosa. Esta lacuna de dados é particularmente relevante no contexto apontado por Ma e Hu (2024), onde a

escolha de espécies na aquicultura muitas vezes se baseia na experiência prática do produtor, e não em dados quantitativos detalhados, como os que a lipidômica moderna poderia fornecer.

A Lacuna Qualitativa: O Valor da Estrutura Intacta dos Lipídios

A lacuna de (N = 0) para *C. muelleri* e *D. lutheri* significa que o conhecimento sobre a composição lipídica destas espécies está restrito ao que os métodos de FAP podem analisar: a composição de ácidos graxos. No entanto, este método exige a transesterificação, um processo que modifica a molécula de lipídio original para analisar apenas seus componentes (os ácidos graxos) (Nguyen; Ramli; Kee, 2017).

Para entender o que é perdido quando a molécula intacta é destruída, foram analisados os sete estudos de "métodos modernos" incluídos nesta revisão. Os achados destes estudos, focados em *I. galbana* e *C. calcitrans*, estão resumidos no Apêndice A (Tabela A2) e revelam pelo menos três tipos de informação nutricional e fisiológica que são não detectáveis pelos métodos clássicos:

1. A Diferença entre lipídeos com função de reserva energética (TAG) e estruturais (Glicolipídios): A análise de FAP informa quanto DHA existe, mas não onde ele está localizado. A lipidômica moderna, por sua vez, diferencia se os ácidos graxos estão armazenados como reserva de energia (Triacilgliceróis, TAGs) ou se fazem parte de lipídios estruturais essenciais (como os glicolipídios Monogalactosil- e Digalactosil-Diacilglicerol, MGDG e DGDG, do cloroplasto). Huang et al. (2017), por exemplo, usaram UPLC-Q-TOF-MS para mostrar que *I. galbana* sob estresse térmico ativamente aumentou MGDG/DGDG (membranas de qualidade) e reduziu TAGs (reserva energética), indicando um mecanismo de adaptação saudável que a metodologia de FAP, focada apenas no inventário total de ácidos graxos, não detectaria.

2. A descoberta de bioatividade ligada à estrutura intacta: Vários estudos revelaram que a função bioativa (ex.: anti-inflamatória) não vem de um ácido graxo isolado, mas da molécula intacta. De Los Reyes et al. (2016) demonstraram que a alta atividade anti-inflamatória em *I. galbana* estava ligada às frações de MGDG e DGDG intactas. Azizan et al. (2020) e Moreira et al. (2025) encontraram correlações semelhantes para *C. calcitrans*, ligando a bioatividade anti-inflamatória a espécies moleculares específicas, como isômeros de HEPE e glicolipídios intactos (MGDG/DGDG), respectivamente, que os métodos de FAP, ao destruir a molécula, não possui resolução para distinguir.

3. Descoberta de moléculas além do perfil de ácidos graxos: A análise do perfil de ácidos graxos é, por definição, limitada a um inventário de ácidos graxos conhecidos e clivados de suas moléculas de origem. Em contraste, a análise lipidômica permitiu a descoberta de compostos inteiramente novos, como as galactosilceramidas "Isogalbamides A-C" (de Los Reyes et al., 2016) e 11 novos glicerofosfolipídios (Ahamad Bustamam et al., 2021) em *I. galbana*. Além da descoberta de novas estruturas, a abordagem lipidômica é crucial por identificar precursores e moléculas de sinalização, como o Diacilglicerol (DAG). Zhong et al. (2022) identificaram o DAG como vital para a regulação do crescimento em *I. galbana*, mas este é um intermediário metabólico que a metodologia de FAP, focada nos ésteres metílicos (FAMES), não permite detectar.

Portanto, a lacuna (N = 0) para *C. muelleri* e *D. lutheri* é crítica. O conhecimento atual sobre elas, baseado em análise de FAP, responde apenas pela quantidade de ácidos graxos, mas não fornece dados sobre como eles estão dispostos (TAGs, MGDGs, PEs). Desconhece-se a configuração molecular exata de suas reservas energéticas (espécies de TAGs), seu potencial bioativo anti-inflamatório e nutricional ou quais moléculas de sinalização produzem, informações cruciais para otimizar a dieta de larvas de bivalves.

Limitações deste Trabalho

Este estudo apresenta limitações metodológicas em duas frentes: na execução experimental e na subsequente revisão de literatura.

A primeira limitação refere-se à etapa de produção de biomassa. A manutenção de culturas estáveis em sistema semicontínuo mostrou-se um desafio significativo. Conforme detalhado nos resultados parciais apresentados no Apêndice B, a contaminação por protozoários (*Euplotes* spp.) levou ao descarte de 50% das bolsas de cultivo (13/26). Esta instabilidade introduziu uma variabilidade nas condições de crescimento que, somada às falhas na etapa cromatográfica, inviabilizou a obtenção de um perfil lipídico representativo para as cepas do laboratório

A segunda limitação, na etapa analítica, foi a falha que impediu a obtenção de dados primários. Conforme detalhado, dificuldades técnicas como a contaminação persistente da coluna de UHPLC inviabilizaram a geração de dados lipídicos reprodutíveis.

Finalmente, a terceira limitação refere-se à própria revisão de literatura que substituiu a análise experimental. Esta revisão foi uma reestruturação necessária do trabalho após a falha analítica. Embora tenha sido suficiente para atingir o seu novo objetivo, mapear as

metodologias (GC vs. LC-MS) e identificar a lacuna de (N = 0) para duas das quatro espécies, o seu escopo é, por definição, limitado. A busca foi focada intencionalmente apenas nas quatro espécies de microalgas utilizadas no LMM e, portanto, não deve ser considerada uma revisão exaustiva de todo o campo da lipidômica de microalgas.

Considerações Finais

A principal conclusão deste estudo é a identificação, nas bases científicas consultadas, da ausência de registros (N=0) de dados de lipidômica baseada em espectrometria de massas para *Chaetoceros muelleri* e *Diacronema lutheri*. O conhecimento disponível sobre estas espécies, que compõem a base do atual protocolo alimentar no LMM, restringe-se predominantemente à composição de ácidos graxos, o que limita a compreensão detalhada sobre a estrutura molecular e a funcionalidade biológica dos lipídios intactos.

Essa lacuna na literatura reforça a pertinência da investigação originalmente proposta. Embora a execução analítica não tenha sido concluída, os protocolos de cultivo e os desafios técnicos documentados no Apêndice B sinalizam as etapas metodológicas que necessitam de aprimoramento, evidenciando que a caracterização molecular detalhada destas cepas locais permanece como uma oportunidade de pesquisa em aberto.

Sugere-se, portanto, que trabalhos futuros considerem a validação de métodos de LC-MS para estas microalgas. O estabelecimento de um perfil lipidômico de referência constitui um aprimoramento metodológico para o laboratório. Considerando que a produção de sementes se encontra consolidada, a eventual incorporação desta ferramenta analítica poderá auxiliar no diagnóstico de variações na qualidade da dieta e complementar os métodos tradicionais de manejo nutricional.

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao Prof. Claudio Manoel Rodrigues de Melo, pela valiosa orientação, conselhos e disponibilidade. Meu reconhecimento se estende ao Laboratório de Moluscos Marinhos, pelo fundamental apoio estrutural, e a todo o corpo técnico, docentes e colaboradores, pelo suporte e ensinamentos compartilhados ao longo destes dois anos, em especial ao Seu Chico e a Jaque, que nunca mediram esforços para me auxiliar, sempre com enorme paciência para sanar minhas constantes dúvidas. Por fim, registro minha profunda gratidão à minha família, pelo incentivo e paciência indispensáveis nesta jornada. Aos amigos, sem os quais este trabalho não seria possível, minha eterna gratidão, mesmo que eu seja péssimo em demonstrá-la.

Glossário

ALA – Ácido α -Linolênico	MS – Espectrometria de Massas
ANOVA – Análise de Variância	MS/MS – Espectrometria de Massas em Tandem
ARA – Ácido Araquidônico	NAGly – N-Aciliglicina
<i>C. calcitrans</i> – <i>Chaetoceros calcitrans</i>	PA – Ácido Fosfatídico
<i>C. muelleri</i> – <i>Chaetoceros muelleri</i>	PC – Fosfatidilcolina
Cer – Ceramida	PCA – Análise de Componentes Principais
DAG – Diacilglicerol	PE – Fosfatidiletanolamina
DDA – Análise Dependente de Dados	PG – Fosfatidilglicerol
DGCC – Diacilglicerol Carboxietilcolina	PI – Fosfatidilinositol
DGDG – Digalactosil Diacilglicerol	PL – Fosfolipídio
DGTS – Diacilglicerol Trimetil-Homoserina	PRISMA – Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-análises (do inglês, <i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>)
DHA – Ácido Docosahexaenóico	PUFA – Ácido Graxo Poli-insaturado
<i>D. lutheri</i> – <i>Diacronema lutheri</i>	Q-TOF – Quadrupolo-Tempo de Voo
EPA – Ácido Eicosapentaenóico	QTOF MS – Espectrometria de Massas Quadrupolo-Tempo de Voo
ESI – Ionização por <i>Electrospray</i>	SL – Esfingolipídio
GC-FAME – Cromatografia Gasosa de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos	SQDG – Sulfoquinovosil Diacilglicerol
GSL – Glicosfingolipídio	TAG – Triacilglicerol
HexCer – Hexosilceramida	UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
<i>I. galbana</i> – <i>Isochrysis galbana</i>	UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência
LA – Ácido Linoleico	
LC-MS – Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas	
LMM – Laboratório de Moluscos Marinhos	
LPC – Lisofosfatidilcolina	
LPE – Lisofosfatidiletanolamina	
MGDG – Monogalactosil Diacilglicerol	
MGMG – Monogalactosil Monoglicerol	

Referências

AHAMAD BUSTAMAM, M. S. A. *et al.* Complementary Analytical Platforms of NMR Spectroscopy and LCMS Analysis in the Metabolite Profiling of *Isochrysis galbana*. **Marine Drugs**, v. 19, n. 3, 2021.

ALSENANI, F. *et al.* Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 12, p. 1834–1841, 2020.

ANSARI, Faiz Ahmad *et al.* Improving the feasibility of aquaculture feed by using microalgae. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 32, p. 43234–43257, ago. 2021.

ARNOLD, Walter *et al.* Ecophysiology of Omega Fatty Acids: A Lid for Every Jar. **Physiology**, v. 30, n. 3, p. 232–240, maio 2015.

AZIZAN, Awanis *et al.* Mass Spectrometry-Based Metabolomics Combined with Quantitative Analysis of the Microalgal Diatom (*Chaetoceros calcitrans*). **Marine drugs**, v. 18, n. 8, 30 jul. 2020.

BODENSTEIN, Sarah; WAGUESPACK, Sarah; ROBINSON, Elizabeth M. Simulating microalgae production to evaluate oyster hatchery efficiency. **Journal of Applied Phycology**, 16 maio 2025.

BROWN, M. R. *et al.* Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, n. 1–4, p. 315–331, maio 1997.

BROWN, Malcolm; ROBERT, René. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, v. 207, n. 3–4, p. 289–309, maio 2002.

CHENG, Pengfei *et al.* Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements. **Algal Research**, v. 51, p. 102076, 1 out. 2020.

ČMIKOVÁ, Natália *et al.* Characterization of Selected Microalgae Species as Potential Sources of Nutrients and Antioxidants. **Foods**, v. 13, n. 13, p. 2160, 8 jul. 2024.

COLOMBO, Stefanie M. *et al.* A fundamental dichotomy in long-chain polyunsaturated fatty acid abundance between and within marine and terrestrial ecosystems. **Environmental Reviews**, v. 25, n. 2, p. 163–174, jun. 2017.

DA COSTA, Elisabete *et al.* Lipidomic Approaches towards Deciphering Glycolipids from Microalgae as a Reservoir of Bioactive Lipids. **Marine Drugs**, v. 14, n. 5, p. 101, maio 2016.

DAI, Chenming; WANG, Feifei. Potential applications of microalgae–bacteria consortia in wastewater treatment and biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 393, p. 130019, fev. 2024.

DANESHVAR, Ehsan *et al.* Biologically-mediated carbon capture and utilization by microalgae towards sustainable CO₂ biofixation and biomass valorization – A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 427, p. 130884, jan. 2022.

DE ANDRADE, Gilberto José Pereira Onofre. Maricultura em Santa Catarina: a cadeia produtiva gerada pelo esforço coordenado de pesquisa, extensão e desenvolvimento tecnológico. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 13, n. 24, p. 204, 23 dez. 2016.

DE LOS REYES, C. *et al.* Molecular Characterization and Anti-inflammatory Activity of Galactosylglycerides and Galactosylceramides from the Microalga *Isochrysis galbana*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 46, p. 8783–8794, 2016.

DE LUCA, Maria *et al.* Lipids from Microalgae for Cosmetic Applications. **Cosmetics**, v. 8, n. 2, p. 52, 17 jun. 2021.

GAMA, Rafael Carvalho Nogueira Da *et al.* Microalgae bioinputs as disruptive technology for a sustainable agriculture: A systematic and bibliometric review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 13, n. 2, p. 116034, abr. 2025.

GOMES, Hugo Moreira *et al.* Effect of diet on larval settlement, growth, and spat survival of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 52, n. 4, p. 521–535, 31 ago. 2024.

GONÇALVES, João *et al.* Microalgae as Biofertilizers: A Sustainable Way to Improve Soil Fertility and Plant Growth. **Sustainability**, v. 15, n. 16, p. 12413, 15 ago. 2023.

GUEDES, A. Catarina; MALCATA, F. Xavie. Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. *In*: MUCHLISIN, Zainal (Org.). **Aquaculture**. [S.l.]: InTech, 2012.

GUILLARD, Robert R. L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *In*: SMITH, Walter L.; CHANLEY, Matoira H. (Orgs.). **Culture of Marine Invertebrate**

Animals: Proceedings — 1st Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals Greenport. Boston, MA: Springer US, 1975. p. 29–60.

HAN, Xianlin; GROSS, Richard W. The foundations and development of lipidomics. **Journal of Lipid Research**, v. 63, n. 2, p. 100164, fev. 2022.

HASSAN, Saqib *et al.* Identification and characterization of the novel bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria for pharmaceutical and nutraceutical applications. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 999–1029, set. 2022.

HELM, Michael M.; BOURNE, Neil. **Hatchery culture of bivalves: a practical manual.** Rome: Alessandro Lovatelli, 2004.

HIS, E.; ROBERT, R.; DINET, A. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. **Marine Biology**, v. 100, n. 4, p. 455–463, mar. 1989.

HOANG, Anh Tuan *et al.* Biofuel production from microalgae: challenges and chances. **Phytochemistry Reviews**, v. 22, n. 4, p. 1089–1126, ago. 2023.

HU, Qiang. Environmental Effects on Cell Composition. *In*: RICHMOND, Amos; HU, Qiang (Orgs.). **Handbook of Microalgal Culture**. 1. ed. [S.l.]: Wiley, 2013. p. 114–122.

HUANG, L. *et al.* Effect of high temperature on the lipid composition of *Isochrysis galbana* Parke in logarithmic phase. **Aquaculture International**, v. 25, n. 1, p. 327–339, 2017.

JUROWSKI, Kamil *et al.* Analytical Techniques in Lipidomics: State of the Art. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 418–437, 3 set. 2017.

KABEYA, Naoki *et al.* Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals. **Science Advances**, v. 4, n. 5, p. eaar6849, 4 maio 2018.

KHAVARI, Fatemeh *et al.* Microalgae: therapeutic potentials and applications. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 5, p. 4757–4765, maio 2021.

KOLLER, Martin; MUHR, Alexander; BRAUNEGG, Gerhart. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52–63, out. 2014.

KHOURY, Spiro *et al.* Quantification of Lipids: Model, Reality, and Compromise. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, p. 174, dez. 2018.

KUNDU, Pritha; DUTTA, Nalok; BHATTACHARYA, Sayan. Application of microalgae in wastewater treatment with special reference to emerging contaminants: a step towards sustainability. **Frontiers in Analytical Science**, v. 4, p. 1513153, 23 dez. 2024.

LAUDICELLA, Vincenzo A. *et al.* Application of lipidomics in bivalve aquaculture, a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 678–702, 2020a.

LAUDICELLA, Vincenzo Alessandro *et al.* Lipidomics analysis of juveniles' blue mussels (*Mytilus edulis* L. 1758), a key economic and ecological species. **PloS one**, v. 15, n. 2, p. e0223031, 2020b.

- LIAO, Kai *et al.* qPCR analysis of bivalve larvae feeding preferences when grazing on mixed microalgal diets. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0180730, 29 jun. 2017.
- MA, Mingyang; HU, Qiang. Microalgae as feed sources and feed additives for sustainable aquaculture: Prospects and challenges. **Reviews in Aquaculture**, v. 16, n. 2, p. 818–835, mar. 2024.
- MARQUEZ, A. *et al.* Microalgae diet for juveniles of *Spondylus limbatus*. **Aquaculture International**, v. 27, n. 1, p. 323–335, fev. 2019.
- MARSHALL, Robert; MCKINLEY, Scott; PEARCE, Christopher M. Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. **Reviews in Aquaculture**, v. 2, n. 1, p. 33–55, mar. 2010.
- MAVROMMATIS, Alexandros *et al.* Microalgae as a Sustainable Source of Antioxidants in Animal Nutrition, Health and Livestock Development. **Antioxidants**, v. 12, n. 10, p. 1882, 19 out. 2023.
- MATIAS, Domitília; RATO, Ana; JOAQUIM, Sandra. Aquaculture of Bivalves. *In*: GONÇALVES PEREIRA, Rui Pedro (Ed.). **Volume 3: Aquaculture and Living Resource Management**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2025. p. 87–104.
- MATOS, Ângelo Paggi. The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 94, n. 11, p. 1333–1350, nov. 2017.
- MONROIG, Óscar; KABEYA, Naoki. Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. **Fisheries Science**, v. 84, n. 6, p. 911–928, nov. 2018.
- MOREIRA, Ana S. P. *et al.* Unlocking biochemical profile of *Chaetoceros calcitrans*, *Cylindrotheca fusiformis*, and *Nannofrustulum shiloi* (Bacillariophyta) for nutritional and added-value applications. **Algal Research**, v. 89, p. 104080, jul. 2025.
- NGUYEN, Hoa Thien Do; RAMLI, Anita; KEE, Lam Man. A Review on Methods Used in Analysis of Microalgae Lipid Composition. **Journal of the Japan Institute of Energy**, v. 96, n. 12, p. 532–537, 2017.
- NGUYEN, Luong N. *et al.* Microalgae-based carbon capture and utilization: A critical review on current system developments and biomass utilization. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 216–238, 17 jan. 2023.
- OLABI, A. G. *et al.* Emerging Technologies for Enhancing Microalgae Biofuel Production: Recent Progress, Barriers, and Limitations. **Fermentation**, v. 8, n. 11, p. 649, 17 nov. 2022.
- OLIVEIRA, Carlos Eduardo Do Nascimento (Ed.); ARNAUD, Juliane Da Silva (Ed.). **Boletim da Aquicultura em Águas da União – 2022: Relatório Anual de Produção - RAP**: Boletim da Aquicultura em Águas da União. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2023.

Disponível em: <https://www.gov.br/mpa/pt-br/assuntos/aquicultura/boletim-da-aquicultura-em-aguas-da-uniao-2013-2022-site_compressed.pdf>.

PAGE, Matthew J. *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 372, p. n71, 29 mar. 2021.

PARRISH, Christopher C. Essential fatty acids in aquatic food webs. *In*: KAINZ, Martin; BRETT, Michael T.; ARTS, Michael T. (Orgs.). **Lipids in Aquatic Ecosystems**. New York, NY: Springer New York, 2009. p. 309–326.

REN, Xiaojie *et al.* Optimization of a novel lipid extraction process from microalgae. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 20221, 12 out. 2021.

REY, Felisa *et al.* Applications of lipidomics in marine organisms: progress, challenges and future perspectives. **Molecular Omics**, v. 18, n. 5, p. 357–386, 2022.

RICO-VILLA, B. *et al.* Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture**, v. 256, n. 1–4, p. 377–388, jun. 2006.

RÍOS CASTRO, Natalí *et al.* Evaluation of bacterial strains to improve the productivity of microalgae used in bivalve hatcheries in Peru. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 53, n. 1, p. 95–105, 2022.

RIVERO-RODRÍGUEZ, Susana; BEAUMONT, Andy R.; LORA-VILCHIS, María Concepción. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid

profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. **Aquaculture**, v. 263, n. 1, p. 199–210, 6 mar. 2007.

ROQUES, Simon *et al.* Metabolomics and fish nutrition: a review in the context of sustainable feed development. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 1, p. 261–282, 2020.

ROSA, Gonçalo P. *et al.* Antiaging Potential of Lipophilic Extracts of *Caulerpa prolifera*. **Marine Drugs**, v. 23, n. 2, p. 83, 14 fev. 2025.

SAMPOLLO, Leslie T. *et al.* Assessing new microalgae species as potential feed for bivalve spat in nursery culture. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 59, n. 3, p. 574–596, 2024.

SOUZA, Camilla Mariane Menezes; BASTOS, Taís Silvino; SANTOS, Marley Conceição Dos. Microalgae use in animal nutrition. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e53101622986, 6 dez. 2021.

SUPARMANIAM, Uganeeswary *et al.* Influence of environmental stress on microalgae growth and lipid profile: a systematic review. **Phytochemistry Reviews**, v. 22, n. 4, p. 879–901, 1 ago. 2023.

TRIPATHI, Shweta *et al.* Carbon capture, storage, and usage with microalgae: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 21, n. 4, p. 2085–2128, ago. 2023.

WALNE, Peter Richard. **Experiments in the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L.** London: H.M.S.O., 1966.

WANG, Miao; HAN, Xianlin. Multi-dimensional Mass Spectrometry-based Shotgun Lipidomics. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1198, p. 203–220, 2014.

WENK, Markus R. The emerging field of lipidomics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 7, p. 594–610, 1 jul. 2005.

YARKENT, Çağla; GÜRLEK, Ceren; ONCEL, Suphi S. Potential of microalgal compounds in trending natural cosmetics: A review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 17, p. 100304, set. 2020.

ZHONG, Y. *et al.* Isolation of Chloroplasts from Marine Microalga *Isochrysis galbana* Parke for Their Lipid Composition Analysis. **Journal of Ocean University of China**, v. 21, n. 1, p. 225–235, 2022.

ZHUKOVA, Natalia V. Fatty Acids of Marine Mollusks: Impact of Diet, Bacterial Symbiosis and Biosynthetic Potential. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 857, 11 dez. 2019.

Apêndice A

Tabela A1. Detalhamento das estratégias de busca nas bases de dados Scopus e PubMed.

Base de Dados	Estratégia de Busca (String)	Filtros Aplicados	Data da Busca	Resultados (N)
Scopus	TITLE-ABS-KEY(("Chaetoceros muelleri" OR "C. muelleri" OR "Chaetoceros calcitrans" OR "C. calcitrans" OR "Isochrysis galbana" OR "I. galbana" OR "Pavlova lutheri" OR "D. lutheri") AND (lipid OR lipidomics OR "fatty acid") AND ("UHPLC-MS" OR "LC-MS" OR "lipidomic" OR "mass spectrometry"))	Nenhum	03.nov.2025	31
Scopus	TITLE-ABS-KEY(("Chaetoceros muelleri" OR "C. muelleri" OR "Chaetoceros calcitrans" OR "C. calcitrans" OR "Isochrysis galbana" OR "I. galbana" OR "Pavlova lutheri" OR "D. lutheri") AND ("fatty acid profile" OR "GC-FAME" OR "gas chromatography"))	Últimos 10 anos	03.nov.2025	78
PubMed	("Chaetoceros muelleri" OR "C. muelleri" OR "Chaetoceros calcitrans" OR "C. calcitrans" OR "Isochrysis galbana" OR "I. galbana" OR "Pavlova lutheri" OR "D. lutheri") AND (lipidomics OR "UHPLC-MS" OR "LC-MS" OR "mass spectrometry")	Nenhum	03.nov.2025	31
PubMed	("Chaetoceros muelleri" OR "C. muelleri" OR "Chaetoceros calcitrans" OR "C. calcitrans" OR "Isochrysis galbana" OR "I. galbana" OR "Pavlova lutheri" OR "D. lutheri") AND ("fatty acid profile" OR "GC-FAME" OR "gas chromatography")	Nenhum	03.nov.2025	31
Total Bruto				171

Tabela A2. Resumo dos estudos de Métodos Modernos (lipidômica) incluídos na revisão: achados lipidômicos e implicações fisiológicas não detectáveis pelo Métodos Clássicos (Análise do Perfil de Ácidos Graxos)

Estudo (Autor, Ano)	Espécie	Condição Experimental Investigada	Classe(s) de Lipídios-Chave Analisada(s)	Achado Lipidômico Específico	Principal Achado Fisiológico (Não detectável por GC)
(Ahamad Bustamam et al., 2021)	<i>I. galbana</i>	Otimização do solvente de extração para obtenção de uma ampla gama de metabólitos em altas concentrações.	AG, Carotenoides, Fosfolipídios, Esfingolipídios, TAG	Descoberta e identificação de 11 novos glicerofosfolipídios, principalmente Fosfatidiletanolaminas (PEs), utilizando a técnica de Molecular Networking.	Acúmulo maciço de espécies de TAGs específicas na fase estacionária, indicando armazenamento de energia, enquanto a proporção dos lipídios de membrana foram preservados.
(Alsenani et al., 2020)	<i>I. galbana</i>	Produção de Compostos Bioativos Antimicrobianos (contra bactérias Gram-positivas) a partir de algas. Triagem de diversos métodos e solventes de extração para otimizar a obtenção de compostos bioativos.	AG (C16:0, C18:1, C18:2n6, C18:3n3, ALA, EPA, DHA), TAG, outros Compostos (Pheo a)	Identificação e separação de compostos bioativos. Crucial para identificar a forma molecular (TAG) em que os ácidos graxos se encontravam.	Os ácidos graxos ativos (Linoleico, Oleico e DHA) estavam presentes principalmente na forma de Triacilgliceróis (TAG). A análise conjunta detectou outros bioativos (Pheo a) que o método clássico não abrange.
(Azizan et al., 2020)	<i>C. calcitrans</i>	Caracterização do perfil metabólico de <i>C. calcitrans</i> cultivadas em sistema batch e no final da fase exponencial/início da fase estacionária. O estudo também investigou a influência de cinco diferentes solventes de extração na obtenção dos metabólitos bioativos.	54 metabólitos, incluindo: AG (C16:0, C18:1, C18:2n6, C18:3n3 (ALA), ARA, EPA, DHA), DAG, TAG, MGDG, DGDG, SQDG, DGTS, DGCC, PA, PE, PG, PI, SL, Pheo a	Perfil metabólico de alta resolução. Diferenciação precisa de espécies isobáricas (TAGs/DAGs) através de MS/MS.	Correlação de metabólitos específicos (ex: 15-HEPE e 5-HEPE) com atividades antioxidante e anti-inflamatória, revelando os principais contribuintes para estas bioatividades.
(De Los Reyes et al., 2016)	<i>I. galbana</i>	Teste de atividade anti-inflamatória in vitro, avaliando a capacidade dos lipídios isolados de inibir a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α em macrófagos THP-1 estimulados por lipopolissacarídeo (LPS).	Glicosilglicerídeos: MGDGs, DGDGs, e Glicosilceramidas: Isogalbamides A-C	Descoberta estrutural de moléculas raras e novas galactosilceramidas (Isogalbamides A-C). Revelou a coexistência de isômeros estruturais ($\beta\beta$ -DGDGs).	As frações de MGDG e DGDG (incluindo isômeros raros) demonstraram alta atividade anti-inflamatória (inibição de TNF- α). Esta função está ligada à estrutura polar intacta, uma correlação que o FAP não estabelece.

Tabela A2. (Continuação)

Estudo (Autor, Ano)	Espécie	Condição Experimental Investigada	Classe(s) de Lipídios-Chave Analisada(s)	Achado Lipidômico Específico	Principal Achado Fisiológico (Invisível ao GC)
(Huang et al., 2017)	<i>I. galbana</i>	O estudo investigou o impacto do estresse térmico (35 °C vs. 20 °C) nos lipídios de <i>I. galbana</i> , simulando condições de superaquecimento frequentemente encontradas em larviculturas de bivalves e que afetam a qualidade nutricional da alga.	SQDG e lyso-SQDG, MGDG e lyso-MGDG, DGDG e lyso-DGDG, DGCC e lyso-DGCC, TAG, DHA	O método permitiu o perfil global (polar/neutro) e a identificação de espécies moleculares específicas, incluindo a localização do grupo acil graxo em TAG.	A 35°C, o valor nutricional aumentou. O LC-MS revelou o mecanismo: a alga ativamente investiu em membranas de qualidade (aumento de MGDG, DGDG, SQDG) e reduziu lipídios de reserva (TAGs) e de degradação (liso-lipídios), indicando crescimento saudável, não estresse.
(Moreira et al., 2025)	<i>C. calcitrans</i>	O estudo focou na caracterização detalhada do perfil bioquímico de biomassa de diatomáceas produzida industrialmente em fotobiorreatores externos. As culturas foram mantidas monoalgais e cultivadas durante a estação do verão.	A lipidômica revelou um total de 325 espécies lipídicas. Entre elas: MGDG, MGMG, DGDG, DGMG, SQDG, PC, LPC, PE, LPE, PI, PG, LPG, DGTS, MGTS, DGCC, MGCC, DAG, TAG, Cer, HexCer, SL, NAGly, NAGlySer, NAOrn.	O método permitiu a identificação de lipídios no nível da espécie molecular (a estrutura R1/R2 exata). Isso é crucial para caracterizar o perfil completo e descobrir novos lipídios polares e complexos com potencial bioativo.	O LC-MS revelou "impressões digitais" lipídicas espécie-específicas. Ele identificou a estrutura molecular exata (ex: DGDG 16:2_20:5) e descobriu lipídios raros (BMP, SL, CoQ9) que o GC não detecta. Crucialmente, ligou espécies polares específicas (ex: DGDG 34:5, PC 40:10) a funções bioativas (anti-inflamatórias)
(Zhong et al., 2022)	<i>I. galbana</i>	O estudo focou na otimização de uma abordagem de isolamento de cloroplastos a partir de <i>I. galbana</i> para entender a composição lipídica dos cloroplastos em comparação com a célula inteira (whole-cell)	DGDG, MGDG, SQDG, DAG, TAG, PL, GSL, Cer, e lipídios de betaína.	UHPLC-QE-MS foi utilizado para determinar a composição lipídica dos cloroplastos. A análise detalhada permitiu a identificação das cadeias graxas específicas R1/R2 (a estrutura completa do lipídio).	Composição detalhada do cloroplasto (56,6% Glicolipídios). Identificou a espécie molecular 22:6/18:4-DAG, um Diacilglicerol que atua como molécula de sinalização que regula o crescimento.

Apêndice B: Relatório Técnico da Etapa Experimental

Este apêndice descreve a metodologia e os resultados parciais da etapa experimental originalmente prevista. Devido às falhas técnicas descritas no corpo principal do trabalho, estes dados não foram utilizados para as conclusões, servindo aqui como registro dos parâmetros de cultivo e dos desafios de implementação da técnica de UHPLC-MS.

Material e Métodos

O trabalho foi estruturado em duas etapas principais para determinar o valor nutricional das microalgas cultivadas no LMM para a alimentação dos moluscos bivalves em laboratório.

A primeira etapa, executada conforme o planejado, consistiu no cultivo e obtenção de biomassa de quatro espécies de microalgas (*C. muelleri*, *C. calcitrans*, *I. galbana* e *D. lutheri*) em sistema semicontínuo.

A etapa subsequente consistiu na extração dos lipídios totais da biomassa obtida. O delineamento analítico, conforme o protocolo detalhado a seguir, previa a caracterização desse perfil lipídico por meio de Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Quadrupole Time-of-Flight (UHPLC-QTOF MS/MS).

Cultivo de microalgas

O cultivo das microalgas foi realizado em um sistema semicontínuo entre maio e julho de 2025, utilizando cepas das quatro espécies utilizadas no LMM, *C. muelleri* (BMAK 99) e *C. calcitrans* (Algasul); *I. galbana* (CCMP1324) e *D. lutheri* (CCMP459). Os inóculos foram preparados a partir das cepas mantidas em câmara de germinação com fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro. Nas etapas seguintes de multiplicação de inóculo, foram utilizados recipientes com volumes crescentes a cada fase, de meio F/2 de Guillard (1975) autoclavado a 121 °C por 30 min, ocupando metade da capacidade de cada recipiente, com iluminação artificial com fotoperíodo de 24-0h, radiação fotossinteticamente ativa (PAR) média de $127,71 \pm 2,77 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$ (foto radiômetro Delta OHM HD2102.1, Itália) e aeração enriquecida com CO₂. No sistema semicontínuo, utilizou-se água do mar filtrada (0,22 µm) e tratada com luz UV, com adição de meio Conway (1 mL·L⁻¹) (Walne, 1966) em bolsas plásticas com volume útil de 80 L, além de solução de silicato de sódio para as diatomáceas (0,055 g·L⁻¹). Os cultivos semicontínuos foram submetidos a iluminação artificial e fotoperíodo de 24-0h, com PAR média de $105,23 \pm 28,1 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$, obtida a partir de seis pontos de medições em cada bolsa (n = 3) divididos igualmente entre as alturas 0,3 m e 1,8 m do piso, e aeração enriquecida com CO₂.

O aumento de escala do inóculo das microalgas foi realizado em 4 etapas, com variação de 4 dias entre elas, respectivamente. 1) As culturas foram iniciadas em erlenmeyers de 100 mL por 4 dias; e em seguida, 2) escalonadas em erlenmeyers de 500 mL por mais 4 dias; que posteriormente, 3) foram utilizadas para inocular garrafas de borosilicato de 5 L; onde foram cultivadas por outros 4 dias, e por fim, 4) empregadas como inóculos para as bolsas de 100 L (volume útil de 80 L) no sistema semicontínuo (*Ver Resumo Gráfico*). Nessas bolsas, em razão da fase “lag” do crescimento populacional, a primeira colheita foi realizada após 6 dias de cultivo, na qual aproximadamente 50% do volume de cultivo foi colhido; as colheitas seguintes foram realizadas a cada 4 dias. Após cada colheita realizou-se a reposição com água do mar filtrada e esterilizada por UV e meio Conway ($1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$).

Durante o cultivo, foram retiradas amostras de 50 mL diariamente para acompanhamento da curva de crescimento, por meio de contagens diretas em microscópio utilizando uma câmara de Neubauer, além da medição da temperatura, pH (pHmetro Alfakit, Brasil) e salinidade (refratômetro de salinidade) da água. Se fossem detectadas contaminações por protozoários, os cultivos eram imediatamente descartados. Das 26 bolsas inoculadas ao longo do experimento, apenas 13 foram consideradas aptas para coleta de amostras para análise lipídica, pois muitos cultivos apresentaram contaminações nas fases iniciais de cultivo.

Após as contagens diárias, foram retirados aproximadamente 0,5 L das culturas para concentração sem reposição de água ou nutrientes. Essas amostras foram centrifugadas (a 7500 rpm ou aproximadamente 10.000 g por 4 min.) e alocadas em tubos de 15 mL, os quais foram identificados com etiquetas e armazenados em -20°C até a extração e análise de lipídios. Para extração e análise foram escolhidos quatro cultivos, um de cada espécie, que apresentaram um crescimento populacional esperado e nas datas em que a densidade de células era maior sem apresentar nenhum sinal de contaminação.

Extração de Lipídios

A extração de lipídios foi feita em batelada através de adaptação do protocolo descrito por Ren et al. (2021). Foi feita a extração da amostra do dia da primeira colheita do melhor cultivo de cada espécie. Primeiramente, foram pesados 50 mg de pellet de cada espécie de microalga, adicionada uma mistura de clorofórmio/metanol/água (400:800:300, v/v/v), e agitadas em vórtex por 30s entre cada adição de solvente, tudo mantido em banho de gelo durante todo o procedimento. As amostras foram centrifugadas a 13.200 rpm por 5 min. (aproximadamente 18.500 g), em centrífuga refrigerada a 6°C . Então, foram separados 1000 μL dos sobrenadantes em microtubos novos, adicionados mais 400 μL de água e 200 μL de

clorofórmio, e centrifugados novamente a 13.200 rpm dessa vez por 10 min., em centrífuga refrigerada a 6°C. Após observado a formação de três fases, foram pipetadas 200 µL da fase apolar em *vials* e secos utilizando um concentrador à vácuo. Foram feitas triplicatas técnicas.

Análise UHPLC-Q-TOF MS

O delineamento experimental planejado previa análises em um sistema de cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (UHPLC, Agilent 1290, Agilent Technologies, CA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas Quadrupole Time-of-Flight (QTOF MS, Agilent 6545XT).

Para a preparação da amostra, o extrato lipídico seco seria ressuspensionado em um volume conhecido de isopropanol/acetonitrila/água (450/40/10, v/v/v) antes da injeção de 2 µL no sistema. A separação cromatográfica seria realizada utilizando uma coluna de fase reversa ZORBAX Eclipse plus C18 (Agilent, 50 mm x 2.1 mm, 1.8 µm).

As fases móveis seriam compostas por (A) Acetonitrila/água (300:200, v/v) e (B) isopropanol/acetonitrila/água (450:40:10, v/v/v), ambas contendo um aditivo para otimizar a ionização, como 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio. A eluição seguiria um gradiente linear iniciando com 15% de B, aumentando para 99% de B em 20 minutos, sendo mantido em 99% de B por 1 minuto, voltando a concentração de B inicial em gradiente linear em 10 min, com 3 minutos de protocolo de limpeza para evitar contaminações nas análises seguintes. A taxa de fluxo da bomba binária seria de 0,3 mL/min e a coluna seria mantida a 45 °C.

Os espectros de massa seriam adquiridos em modos de ionização por electrospray (ESI) positivo e negativo, na faixa de m/z 100-1700, para abranger diferentes classes de lipídios. As condições da fonte ESI seriam definidas com tensão do capilar (VCap) de 3500 V, temperatura do gás de secagem (Drying Gas) de 320 °C com fluxo de 8,0 L/min, e temperatura do gás de nebulização (Sheath Gas) de 350 °C. O equipamento seria operado em modo MS seguido de MS/MS automático (Data-Dependent Acquisition - DDA) para obter espectros de fragmentação dos íons mais abundantes, permitindo a identificação estrutural.

Processamento de Dados e Análise Estatística

Todos os arquivos de dados brutos LC-MS seriam exportados e analisados utilizando o software MassHunter Workstation (Agilent). A identificação preliminar dos lipídios seria baseada na massa precisa (m/z) e no tempo de retenção. Os espectros MS/MS seriam comparados com bibliotecas espectrais e bancos de dados públicos, como o LIPID MAPS (<https://lipidmaps.org/>).

A análise de componentes principais não supervisionada (PCA) seria usada para obter uma visão geral da variância intrínseca dos metabólitos entre os tratamentos, sendo os gráficos gerados pelo pacote ggplot2 no ambiente estatístico R (Rstudio, <http://www.r-project.org/>).

Para os lipídios tentativamente identificados e que apresentassem diferenças visuais no PCA, os dados de intensidade do sinal (abundância) seriam analisados via análise de variância (ANOVA), e quando houvesse diferença estatística significativa ($p < 0,05$), seria aplicado o teste de Tukey para separação das médias.

Resultado e Discussão

Cultivos semicontínuos de microalgas problemas com contaminação

A etapa de cultivo semicontínuo resultou em perfis de crescimento distintos entre as espécies de microalgas, e o monitoramento revelou a ocorrência de contaminação, um fator que comprometeu a estabilidade das culturas. O acompanhamento da densidade celular, essencial para o manejo do sistema e para a validação da condição da cultura antes dos ciclos de colheita e reposição, é apresentado na Figura B1.

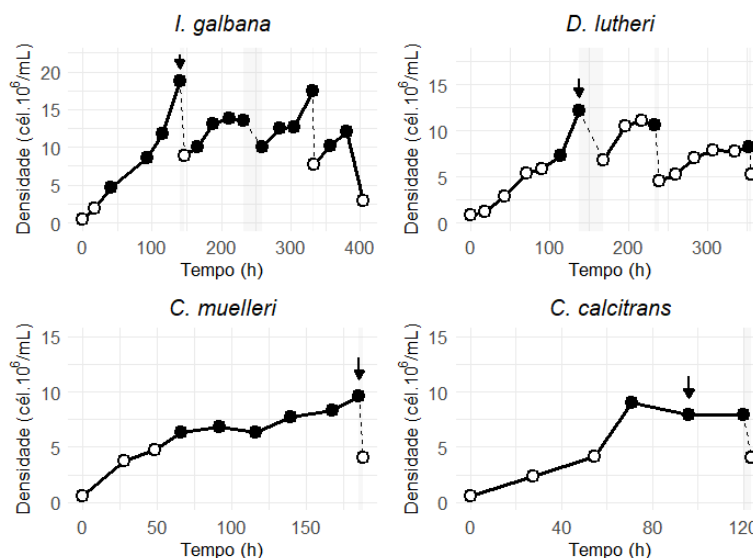


Figura B1. Densidade celular (número de células por mL) ao longo do tempo de cultivo (h) para as espécies estudadas. Tempo de coletas é indicado pelos pontos cheios. O tempo de coletas das amostras utilizadas na lipidômica é indicado pelas setas. A colheita e troca de água parcial (50%) entre as contagens é indicada pelas linhas pontilhadas e regiões destacada no gráfico (cinzas).

Os cultivos foram conduzidos em dois períodos distintos: *I. galbana* e *C. calcitrans* em maio de 2025 e *D. lutheri* e *C. muelleri* em julho de 2025. A análise estatística confirmou que as temperaturas médias do cultivo em maio foram significativamente maiores (Teste de Tukey,

$p < 0,05$) do que as registradas em julho, refletindo as condições ambientais da época (Tabela 1).

Tabela B1. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (média \pm desvio-padrão), pH e Salinidade média dos cultivos de microalgas. Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$) entre as espécies.

Espécie de microalgas	Temperatura média ($^{\circ}\text{C}$)	pH médio	Salinidade média
<i>I. galbana</i>	23,0 \pm 0,4 ^a	7,59 \pm 0,23 ^a	36,3 \pm 0,3 ^a
<i>D. lutheri</i>	21,9 \pm 0,6 ^b	8,99 \pm 0,79 ^b	33,4 \pm 0,5 ^b
<i>C. muelleri</i>	21,8 \pm 0,5 ^b	7,59 \pm 0,23 ^{ac}	36,3 \pm 0,3 ^b
<i>C. calcitrans</i>	23,4 \pm 0,5 ^a	8,62 \pm 0,05 ^{bc}	- [†]

[†]A salinidade do cultivo da *C. calcitrans* não foi medida em nenhum momento por falha operacional.

Pode-se observar que as microalgas flageladas possuem um rendimento maior de células em um mesmo período de tempo comparadas às diatomáceas (Figura B1) e completaram mais ciclos de colheita antes de se observar contaminações por protozoários. O cultivo para a espécie *I. galbana* teve a maior contagem de células entre os quatro cultivos escolhidos, com $18,8 \times 10^6$ cél. mL^{-1} . Segundo dados do LMM, no período entre nov. de 2023 e jul. de 2024, a duração média de cultivo para bolsas contendo *I. galbana* foi de 19,85 dias e de 21,12 dias para *D. lutheri*, enquanto para bolsas contendo *C. muelleri*, a média foi de 16,07 dias.

O principal motivo do colapso das populações é a contaminação por protozoários do gênero *Euplotes spp.* A ocorrência de predadores é um grande problema em cultivos comerciais abertos, sendo reportados o colapso dos tanques em 2 a 5 dias após a detecção de predadores (Ríos Castro et al., 2022), sendo também observados colapsos em tempos semelhantes em condições de laboratório não estéreis.