



Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde



**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA MICROALGA *Conticribra
weissflogii* PARA INFECÇÕES CAUSADAS POR *Acinetobacter baumannii***

Carolina da Silva Canielles

Rio Grande, 2023



Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde



APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA MICROALGA *Conticribra weissflogii* PARA INFECÇÕES CAUSADAS POR *Acinetobacter baumannii*

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dr^a. Daniela Fernandes Ramos

Coorientador: Dr. Fábio Roselet

Carolina da Silva Canielles

Rio Grande, 2023

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA MICROALGA *Conticribra weissflogii* PARA INFECÇÕES CAUSADAS POR *Acinetobacter baumannii*

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabiano Lopes Thompson – UFRJ Externo

Dra. Priscila Cristina Bartolomeu Halicki – UCF University of C. Florida Externo

Prof. Dr. Flávio Manoel Rodrigues da Silva Júnior – FURG

Dra. Marcelle Oliveira Garcia – FURG (Suplente)

Orientadora: Prof.^a Dra. Daniela Fernandes Ramos

Coorientador: Dr. Fábio Roselet

Agradecimentos

Aos meus filhos Felipe e Rafael que são minha maior motivação, pelo carinho e compreensão. Mesmo com as ausências o amor sempre esteve presente.

Aos meus pais, que são meu maior exemplo, que apoiam e vibram em todas as minhas etapas acadêmicas.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Daniela por todo apoio incondicional, por sempre me incentivar e estimular. Pelos momentos de amizade e muito aprendizado, serei eternamente grata.

Ao meu coorientador, Dr Fábio pelo apoio e conhecimentos transmitidos ao longo da trajetória do doutorado.

A todo grupo do NUDEFA, pelas trocas pelo apoio e pela amizade, foram meu suporte acadêmico nos últimos 4 anos.

A FURG e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade de estudar e crescer profissionalmente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Resumo

Na última década foi visto um aumento significativo na resistência de bactérias patogênicas a agentes antimicrobianos. Em consequência, a resistência antimicrobiana se tornou um desafio para a saúde pública global e reflete em risco à saúde e à segurança dos pacientes aumentando as taxas de morbimortalidade. Dentre as bactérias patogênicas prioritárias descritas, destaca-se a bactéria *Acinetobacter baumannii*, conhecida por sua capacidade de causar infecções nosocomiais graves. Grande parte dos antimicrobianos disponíveis no mercado foram obtidos a partir de fontes naturais. Atualmente, estudos com produtos naturais marinhos, especialmente oriundos de microalgas, tornaram-se atrativos devido a diversidade de metabólitos secundários com bioatividade comprovada, representando fonte promissora de produtos com atividade terapêutica. Diante disso, o presente trabalho avaliou o perfil metabolômico da microalga *Conticribra weissflogii* e a atividade antimicrobiana de extratos desta diatomácea amplamente empregada na aquacultura, sobre cepas de *A. baumannii*. O cultivo da biomassa foi realizado em escala laboratorial em condições controladas a fim de promover a produção de metabólitos secundários. Os extratos foram preparados a partir de diferentes solventes, metanol, acetona, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio e hexano. As análises dos grupos funcionais majoritários da biomassa e em cada extrato foi realizada pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear de H de alta resolução com giro no ângulo mágico (^1H HR-MAS NMR) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H -RMN). A atividade antimicrobiana, foi avaliada através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), e da avaliação da interação do extrato bioativo com antibióticos, além do potencial anti-biofilme do mesmo. Através destes ensaios foi possível identificar que o extrato em hexano foi o único com atividade frente *A. baumannii* com CMI de 0,4 mg/mL e cujo componente majoritário foram os ácidos graxos, também, prevalentemente identificados nas análises de ^1H HR-MAS NMR. Além disso, o extrato foi significativamente ativo inibindo e destruindo os biofilmes bacterianos, sendo indiferente a dois fármacos antimicrobianos já utilizados na terapia, e com potencial indutor de estresse oxidativo, o que poderia estar associado a composição majoritariamente lipídica destes extratos e da própria microalga. Portanto, tendo em vista a carência de alternativas terapêuticas no combate a essas cepas resistentes, este estudo evidenciou uma importante estratégia para identificar novas opções de compostos candidatos a produto para o tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes, tais como *A. baumannii*.

Palavras-chave: Biofilme; Resistência; *Acinetobacter baumannii*; antimicrobianos; microalgas; diatomáceas; biotecnologia marinha.

Abstract

The last decade has seen a significant increase in the resistance of pathogenic bacteria to antimicrobial agents. As a result, antimicrobial resistance has become a challenge for global public health and reflects a risk to the health and safety of patients, increasing morbidity and mortality rates. Among the priority pathogenic bacteria described, the bacterium *Acinetobacter baumannii* stands out, known for its ability to cause serious nosocomial complications. Most of the antimicrobials available on the market were obtained from natural sources. Currently, studies with marine natural products, especially from microalgae, have become attractive due to the diversity of secondary metabolites with proven bioactivity, representing a promising source of products with therapeutic activity. Therefore, the present work evaluated the metabolomic profile of the microalgae *Conticribra weissflogii* and the antimicrobial activity of extracts of this diatom widely used in aquaculture, on strains of *Acinetobacter baumannii*. Biomass cultivation was carried out on a laboratory scale under controlled conditions in order to promote the production of secondary metabolites. The extracts were prepared from different solvents, methanol, acetone, ethyl acetate, dichloromethane, chloroform and hexane. The analyzes of the major functional groups of the biomass and in each extract were performed using the technique of high-resolution ^1H Nuclear Magnetic Resonance with magic angle rotation (^1H HR-MAS NMR) and Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (^1H -NMR). The antimicrobial activity was evaluated by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and evaluating the interaction of the bioactive extract with antibiotics, in addition to its anti-biofilm potential. Through these assays, it was possible to identify that the extract in hexane was the only one with activity against *A. baumannii* with a MIC of 0.4 mg/mL and whose major component was the fatty acids, also prevalently identified in the ^1H HR-MAS analyses. NMR. Furthermore, the extract was significantly active in inhibiting and destroying bacterial biofilms, being indifferent to two antimicrobial drugs already used in therapy, and with potential to induce oxidative stress, which could be associated with the mostly lipid composition of these extracts and the microalgae themselves. Therefore, in view of the lack of therapeutic alternatives to combat these resistant strains, this study showed an important strategy to identify new options for candidate compounds for the treatment of infections caused by resistant microorganisms, such as *A. baumannii*.

Keywords: Biofilm; Resistance; *Acinetobacter baumannii*; antimicrobials; microalgae; diatoms; marine biotechnology.

Lista de tabelas

Capítulo I

Table 1. Assignment of main resonances of marine microalgae by ^1H HR-MAS NMR (400 MHz).	35
--	----

Capítulo II

Tabela 1. Atividade antimicrobiana, pela determinação da Concentração mínima inibitória – CMI, dos extratos de <i>C. weissflogii</i> frente a cepa padrão de <i>A. baumannii</i> (ATCC 19606) através de ensaio de determinação da CMI (expressa em mg/mL). Extratos que não apresentaram atividades a 0,8 mg/mL foram considerados inativos.	50
---	----

Tabela 2. Concentração Mínima inibitória e perfil de sensibilidade dos isolados avaliados frente a três classes de antibióticos e ao extrato em hexano de <i>C. weissflogii</i> (mg/mL)	51
--	----

Tabela 3. Concentração em que o extrato de <i>C. wessflogii</i> foi capaz de manter a viabilidade de 50% das células (IC_{50}) – fibroblastos (VERO) -, após 24 horas de incubação, expressas em mg/mL	52
--	----

Tabela 4. Índice de seletividade (IS) calculado através da razão entre concentração inibitória de cada extrato de <i>C. weissflogii</i> obtida pelo ensaio de citotoxicidade (IC_{50}) em células VERO e frente a cepa padrão de <i>A. baumannii</i> (CMI) ($\text{IC}_{50}/\text{CMI}$). ND: Não determinado, pela inatividade do extrato frente a espécie <i>A. baumannii</i>	52
--	----

Tabela 5. Concentração mínima inibitória (CMI) e do índice de concentração inibitória fractionada (FICI) do extrato em hexano de <i>Conticribra weissflogii</i> associado a ciprofloxacina e amicacina frente a <i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 19606).	53
--	----

Lista de figuras

Capítulo I

- Figure 1.** ^1H HR-MAS NMR spectra (400 MHz, CDCl_3) of the microalgae *N. oceanica* (A), *C. muelleri* (B), and *C. weissflogii* (C). In blue, types of hydrogens of polyunsaturated fatty acids are indicated. 33
- Figure 2.** ^1H HR-MAS NMR spectra (400 MHz, D_2O) of the microalgae *N. oceanica* (A), *C. muelleri* (B), and *C. weissflogii* (C). In blue, the metabolites identified are indicated. 34
- Figure 3.** ^1H HR-MAS NMR spectra (400 MHz, MeOD) of the microalgae *N. oceanica* (A), *C. muelleri* (B) and *C. weissflogii* (C). In blue, the metabolites or types of hydrogens identified are indicated. 35

Capítulo II

- Figura 1.** Rendimento de cada extrato de *C. weissflogii* preparados através de ultrasonicação, conforme metodologia proposta por Borges et al. (2016) (expresso em %). 48
- Figura 2.** Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de extratos de *C. weissflogii*: (A) Hexano; (B) Clorofórmio; (C) Acetato de Etila; (D) Diclorometano; (E) Acetona. 49
- Figura 3.** Potencial antioxidante dos extratos de *C. weissflogii* (expressos em %) usando o método proposto por Amado et al. (2009). 50
- Figura 4.** Resultados obtidos nos ensaios utilizando diferentes concentrações do extrato em hexano de *Conticribra weissflogii* na inibição da formação de biofilme (a) e na destruição de biofilmes pré-formados (b) de *Acinetobacter baumannii*. * representa os grupos com significância utilizando ANOVA de uma via com Bonferroni como pós-teste ($p < 0,05$), todos avaliados em relação ao controle. ... 54

Lista de abreviaturas e siglas

ALA – ácido α -linolênico

ABAP – 2,2'- azobis-(2-metilpropanoamidina)

CIF – concentração inibitória fracionária

CMI – oncentração mínima inibitória

CFU – unidades formadoras de colônias

CoCl₂ – cloreto de cobalto

CuSO₄ – sulfato de cobre

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – dimetilsulfóxido

DO – densidade ótica

DHA -ácido docosa-hexaenoico

EMA - estação marinha de aquacultura

EPA – ácido Eicosapentaenoico

ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*

FF – fluorescência líquida

FeCl₃ – cloreto férrico

FICI – índice de Concentração Inibitória Fracionária

FURG – Universidade Federal do Rio Grande

H₂DCFDA – diacetato de diclorodihidrofluoresceína

HEPES – ácido (hidroxietil) piperazina etanosulfônico

¹H HR-MAS NMR – ressonância magnética nuclear de ¹H de alta resolução com giro no ângulo mágico

IC₅₀ – concentração capaz de manter a viabilidade de 50% das células

IO – Instituto de Oceanografia

IS – índice de seletividade

KCl – cloreto de potássio

MnCl₂ – cloreto de manganês

Na₂MoO₄ – molibdato de amônio

NaClO – hipoclorito de Sódio

NaNO₃ - nitrato de sódio

RMN – espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

NUDEFA – Núcleo de Desenvolvimento de Novos Fármacos

NUPEMM – Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica

MDR – resistência a múltiplas drogas

MgCl₂ – cloreto de magnésio

OMS – organização Mundial da Saúde

pH – potencial hidrogeniônico

PCR – reação da Cadeia da Polimerase

PUFA - poli unsaturated fatty acid

ROS “reactive oxygen species”

ZnSO₄ – sulfato de Zinco

Sumário

Introdução	12
Revisão bibliográfica	13
Produtos naturais	13
Evolução da Farmacologia Marinha	14
Microalgas	15
<i>Conticriba weissflogii</i>	16
Cultivo de microalgas	17
Biotecnologia de microalgas, compostos bioativos e atividade biológica ..	18
Gênero <i>Acinetobacter</i>	20
<i>Acinetobacter baumannii</i>	22
Resistência antimicrobiana	23
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
Capítulos	28
Capítulo I	29
Capítulo II	40
Conclusões	67
Referências	68

1 **Introdução**

2 Na última década testemunhou-se o aumento do problema da resistência
3 de bactérias patogênicas a agentes antibacterianos representando uma ameaça
4 no controle destas infecções. *Acinetobacter baumannii* está na lista de agentes
5 prioritários que representam a maior ameaça para a saúde humana, já alertado
6 desde 2017 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com o intuito de que
7 novas estratégias de pesquisa e desenvolvimento fossem traçadas devido à
8 escassez de alternativas terapêuticas a essas cepas resistentes tornando
9 importante o desenvolvimento de novas drogas.

10 O Brasil estabeleceu através da Rede Nacional de Pesquisa Marinha
11 (BIOTECMAR), uma estratégia nacional ao incentivo e fortalecimento de estudos
12 *in vitro*, que validem a utilização de metabólitos oriundos de sistemas de
13 aquacultura como insumos para utilização industrial, inclusive, farmacológica.
14 Estudos provenientes de microalgas tornaram-se atrativos devido a diversidade
15 de metabólitos secundários que apresentam bioatividade comprovada.

16 Dentre as microalgas mais estudadas, podemos destacar as
17 diatomáceas, com atividade antibacteriana já relatada. A diatomácea *Conticriba*
18 *weissflogii* produzida em larga escala na nossa região, apresenta em sua
19 biomassa grande quantidade de lipídios com potencial para estudos de
20 bioprospecção de metabólitos com atividade antibacteriana.

21 Portanto, a bioprospecção de metabólitos produzidos por microalgas
22 marinhas são uma alternativa na produção massiva de compostos
23 biologicamente ativos, que possam ser inseridos na produção de novos
24 fármacos para o tratamento de doenças de elevada morbi-mortalidade a nível
25 nacional e internacional.

Revisão bibliográfica

Produtos naturais

A natureza é uma incrível fonte de diversidade química e compostos bioativos possuem propriedades farmacológicas únicas. O uso de produtos naturais como produtos de uso farmacológico vem sendo descrito ao longo da história sob a forma de medicamentos tradicionais, remédios e óleos, com muitos desses produtos bioativos ainda não identificados (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; MARTINS et al., 2018). Hoje, mais de 50% dos medicamentos comercializados são extraídos de fontes ou produzidos usando um produto natural como modelo ou material de partida (KANASE; SINGH, 2018; NEWMAN; CRAGG, 2016).

A utilização farmacológica de produtos naturais já revelou mais de 1 milhão de entidades químicas que atuam como moléculas protótipos de fármacos. Historicamente, pode-se exemplificar o isolamento da morfina, oriundo de alcaloide de papoulas (*Papaver somniferum*) identificada em 1803 e da penicilina, oriunda do fungo *Penicillium notatum* e descoberta por Alexander Fleming em 1929, que são, até hoje produtos farmacologicamente úteis (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; MARTINS et al., 2014).

Maior diversidade e complexidade química, especificidade bioquímica, eficiência e interação com alvos biológicos são algumas vantagens que os produtos naturais apresentam em relação aos produtos sintéticos. Entre 1981 e 2019, cerca de 70% de todas as drogas usadas como antimicrobianos (incluindo compostos antibacterianos, antivirais, antiparasitários e antifúngicos), foram desenvolvidos a partir de fontes naturais ou derivados desta. Porém, a descoberta de novas drogas está ameaçada devido a diversos fatores, dentre eles o surgimento de microorganismos resistentes e os custos para o desenvolvimento de antimicrobianos que giram na faixa de bilhões de dólares (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Das 12 classes antibacterianas, nove são derivadas de um modelo de produto natural e as arquiteturas moleculares dos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos), poliketídicos (tetraciclina), fenilpropanóides (cloranfenicol), aminoglicosídeos (estreptomicina), macrolídeos (eritromicina), glicopeptídeos (vancomicina), mais recentemente, os

lipopeptídeos (daptomicina) e glicilciclinas (tigeciclina) também (FENICAL, 2010; SOTO, 2018). Nesse sentido, a natureza é uma importante fonte de moléculas com potencial para desenvolvimento de novos produtos farmacológicos (POWERS, 2004; SOTO, 2018).

Ainda que as plantas, as primeiras fontes de produtos naturais exploradas e sempre se apresentaram como uma ótima fonte para novas descobertas, o ambiente marinho ainda que menos explorado, também possui um histórico de descobertas e, organismos marinhos já ofereceram produtos com atividades farmacológicas antimicrobiana, citotóxica, anticâncer, antidiabética, antifúngica, anticoagulante, anti-inflamatória (BHOWMICK et al., 2020; CARVALHO; PEREIRA, 2014; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; GUL; HAMANN, 2005; HABBU et al., 2016; MAYER; HAMANN, 2005; SCHINKE et al., 2017; SOTO, 2018)

Evolução da Farmacologia Marinha

O ambiente marinho é responsável pela cobertura de 71% da superfície da Terra e oferece cerca de 300 vezes mais espaço habitável do que o ambiente terrestre e sua evolução biológica antecedeu a superfície terrestre em milhões de anos, o que lhe confere abundância de biodiversidade, e o torna promissor a compreensão e investigação desse ecossistema, ainda que pouco explorado, especialmente na descoberta de agentes farmacológicos (HABBU et al., 2016; KANASE; SINGH, 2018; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Produtos marinhos vem sendo descobertos ao longo das últimas décadas, sendo alguns destes produtos com estruturas químicas únicas e sem precedentes em fontes naturais terrestres. Entre esses produtos, vale ressaltar que 33% foram isolados de esponjas, 25% de algas, 18% de celenterados e 24% de outros invertebrados (BENOIST et al., 2020; BERDI, 2005; DESRIAC et al., 2020; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; GARCÍA-DAVIS et al., 2020; SABDANINGSIH et al., 2020).

Um estudo pioneiro realizado na década de 50 com produtos marinhos foi o isolamento de nucleosídeos com atividade antiviral e anticâncer da esponja caribenha *Tethyacrypta* (BERGMANN; FEENEYZ, 1950) Mais tarde, análogos sintéticos destes nucleosídeos levaram ao desenvolvimento do agente

anticâncer Ara-C, ou Citarabira, utilizado principalmente em neoplasias de células sanguíneas brancas, como a leucemia, e do agente antiviral Ara-A, ou Vidarabina, especialmente ativo contra vírus herpes simplex e vírus da varicela zoster. (KIJJOA; SAWANGWONG, 2004). Ambos se encontram atualmente no mercado.

De 2008 até 2013, 188 produtos naturais foram identificados de organismos marinhos apenas em oceanos profundos, incluindo entre eles microrganismos, esponjas, briozoários, moluscos e cordados. Dentre estas moléculas, com as mais diversas estruturas químicas, 75% mostraram-se bioativas, agindo principalmente sobre diversas linhagens de células tumorais humanas (SKROPETA; WEI, 2014). Até 2019, segundo o *Pipeline* Clínico de Farmacologia Marinha apresentava 9 medicamentos derivados do mar aprovados: para o vírus Herpes Simplex, vidarabina (Vira-A®, aprovado pelo FDA em 1976); para o câncer, citarabina (Cytosar - U®, Depocyt®, aprovado pelo FDA 1969); já citados anteriormente e também: para dor, ziconotida (Prialt®, aprovado pela FDA em 2004); para hipertrigliceridemia, ésteres etílicos de ácido ômega-3 (Lovaza®, FDA-aprovado 2004); e para o câncer, mesilato de eribulina (Halaven®, aprovado pelo FDA 2010), brentuximabe vedotina (Adcetris®, aprovado pelo FDA 2011), trabectedina (Yondelis®, Aprovado pela UE em 2008, aprovado pelo FDA em 2015), plitidepsina (Aplidine®) aprovado na Austrália em 2018 e polatuzumab vedotin (POLIVY®, aprovado pelo FDA 2019). A pesquisa também apresentou que haviam 31 compostos derivados do mar em ensaios clínicos ativos: 5 compostos derivados do mar estavam na Fase III, 13 compostos na Fase II, e pelo menos 9 compostos na Fase I (MIETHKE et al., 2021).

Microalgas

As microalgas são organismos unicelulares autotróficos que transformam dióxido de carbono, hidrogênio e nitrogênio em carboidratos, lipídios e proteínas (OLAIZOLA, 2003; SAVAGE, 2011). Filogeneticamente, são compostas de espécies procarióticas ou eucarióticas, antigas ou mais recentes, conforme o período em que surgiram no planeta (OHSE et al., 2008).

Elas combinam típicas propriedades de plantas superiores (fotossíntese aeróbica eficiente e simplicidade de requisitos nutricionais) com atributos biotecnológicos característicos de células microbianas (crescimento rápido em cultura líquida e capacidade para acumular ou secretar alguns metabólitos). O cultivo de microalgas ganhou grande impulso devido à sua capacidade de produzir metabólitos de alto valor, alta eficiência fotossintética e natureza versátil (DE FREITAS COELHO et al., 2019). Esta combinação, representa a base da biotecnologia de microalgas e apresenta um aumento no interesse devido as potenciais aplicações comerciais nas áreas de nutrição, saúde humana e animal, tratamento de águas residuais e produção de energia (BORGES et al., 2011; CAMPOS; BARBARINO; LOURENÇO, 2010; DE JESUS RAPOSO et al., 2013)

As microalgas apresentam uma composição média de 5 a 50% de proteína, 20 a 40% de carboidratos e 10 a 30% de lipídeos. Todos esses valores se referem ao percentual da biomassa seca. Além disso, existem outros elementos presentes em menores quantidades, como pigmentos (1%), vitaminas e sais minerais. Muitos desses elementos presentes em baixas concentrações têm alto preço de mercado, pois apresentam ações terapêuticas no combate a doenças e são usados como nutracêuticos, ou elementos para cosméticos (ARRIADA; ABREU, 2014).

Dentre as microalgas, podemos destacar as diatomáceas (classe *Bacillariophyceae*) *Conticribra weissflogii* e *Chaetoceros muelleri*, que se encontram em todos os ambientes aquáticos (LOURENÇO, 2006; DE FREITAS COELHO et al., 2019). São o grupo mais representativo em nano e microfitoplâncton marinho com uma alta diversidade, tornando-se únicas em termos de evolução, estrutura e atividades metabólicas (GONÇALVES-ARAUJO et al., 2012; MACHADO et al., 2014; WANG et al., 2014; MALVIYA et al., 2016; MARELLA et al., 2020; MARTIN-JÉZÉQUEL et al., 2000). A microalga *Nannochloropsis oculata* é uma microalga verde unicelular pertencente às *Eutigmatophyceae* também possui alta diversidade, com alto teor lipídico, é uma espécie promissora para a produção de biodiesel e também é usado como alimento vivo na aquicultura, devido ao seu cultivo fácil e rápido (WEI et al., 2013).

Conticribra weissflogii

A diatomácea *Conticribra weissflogii* antes classificada como *Thalassiosira weissflogii* é uma espécie eurhialina que possui altas taxas de crescimento e tolerância a variações de temperatura, luz e nutrientes (COUTO

et al., 2021; STACHURA-SUCHOPLES; WILLIAMS, 2009; VELLA et al., 2019). Apresenta altas taxas de fixação de carbono, assim como uma alta eficiência fotossintética (BORGES et al., 2007). Ela é onipresente e frequentemente dominante na biomassa fito planctônica em áreas estuarinas e costeiras de todo o mundo (MACHADO et al., 2014) .

C. weissflogii se destaca pela sua alta capacidade de acumular lipídeos e é usada na aquicultura como fonte de alimentação de crustáceos (COUTO et al., 2021; GARCÍA et al., 2012). O seu conteúdo lipídico vem sendo analisado, principalmente como fonte de ácidos graxos para copépodes (KLEIN et al., 2005). Já foi estudado o potencial para produção de lipídeos (ARAUJO et al., 2011; ISHIDA et al., 2000; VIRGINIA ARMBRUST et al., 2004). Devido à alta produtividade e acumulação de lipídeos, as diatomáceas representam uma possível fonte para combustíveis e ácidos graxos (PULZ et al., 2004). Esses ácidos graxos possuem grande potencial comercial ao serem incorporados em alimentos, rações, cosméticos e fármacos (BOROWITZKA, 2013).

As diatomáceas desenvolveram sistemas precisos para combater bactérias patogênicas. Alguns dos compostos mais estudados de algas marinhas com atividade antibacteriana, os ácidos graxos, atuam contra bactérias, inibindo sua cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa nas membranas celulares (SOTO, 2018) .

Cultivo de microalgas

A história da utilização de microalgas se remete há séculos, porém o cultivo comercial de microalgas teve início no século vinte (OLAIZOLA, 2003). E a produção em escala industrial se iniciou na Alemanha durante a Segunda Guerra Mundial, como fonte acessível de proteínas e com o início do cultivo massivo das diatomáceas, que mostravam a capacidade de acumular grandes quantidades de lipídeos em certas condições de cultivo (OLAIZOLA, 2003).

O crescimento das microalgas é resultado de interações biológicas, físicas e químicas que ocorrem entre elas e o ambiente (DERNER, 2006). A composição bioquímica das microalgas varia de acordo com a espécie, fase de crescimento e condições de cultivo (ARRIADA; ABREU, 2014). Sendo assim, podem interferir no metabolismo das células e consequentemente na síntese dos compostos de interesse (LOURENÇO, 2006).

As microalgas exibem uma significativa plasticidade ecológica, pela capacidade de se adaptar às mudanças nas condições ambientais extremas, como a temperatura, luz, pH, salinidade e umidade, que descreve sua distribuição mundial (SANTHOSH et al., 2016). Condições estressantes para o crescimento das microalgas, como excesso ou falta de luz, poucos nutrientes e temperaturas extremas, podem ser empregadas para produzir algum desses elementos em maior quantidade (ARRIADA; ABREU, 2014; LOURENÇO, 2006).

Sendo as microalgas consideradas uma fonte rica de diversos componentes de interesse comercial é importante destacar que a viabilidade da sua produção depende de vários fatores, como por exemplo os custos de meios de cultivo (COUTO et al., 2021). O cultivo de microalgas é um dos fatores considerados limitadores de uma produção em escala industrial economicamente viável (CHEN et al., 2015) e é necessário desenvolver modos de operação de baixo custo que possam aumentar a produção de biomassa (ou uma molécula alvo escolhida) e, assim, reduzir os custos de cultivo (COUTO et al., 2021; DE FREITAS COÊLHO et al., 2019).

Biotecnologia de microalgas, compostos bioativos e atividade biológica

A biotecnologia marinha tem como objetivo desenvolver métodos para a produção de produtos originados de macro e microrganismos marinhos, os quais podem contribuir para a saúde humana, para a indústria de alimentos e para a produção de energia (WIJFFELS, 2008). Entre os muitos compostos bioativos conhecidos por serem produzidos por microalgas estão vitaminas, lipídios, pigmentos, lipídios e polissacarídeos (DE FREITAS COÊLHO et al., 2019). A biotecnologia marinha ainda é um campo emergente no Brasil e inclui a exploração de produtos microbianos marinhos, aquicultura, metabolômicas, isolamento de compostos biologicamente ativos, identificação de aglomerados de genes biossintéticos de microrganismos simbióticos, investigação de doenças invertebradas causadas por microrganismos marinhos potencialmente patogênicos e desenvolvimento de compostos antincrustantes (THOMPSON et al., 2018).

Diversas espécies de microalgas destacam-se por apresentar características de interesse para a indústria farmacêutica, algumas microalgas

produzem compostos bioativos como antioxidantes e antibióticos. Também são usados como suplementos nutricionais para o consumo humano, devido aos elevados teores de proteínas, polissacarídeos e os conteúdos de vitaminas (HARUN et al., 2010).

Exemplos notáveis incluem o desenvolvimento de drogas antitrombóticas e antimetastáticas de organismos marinhos (DE MOURA et al., 2018; GOMES et al., 2015; KOZLOWSKI et al., 2011; MOURÃO, 2015; TOVAR et al., 2016), elucidação do efeito antimalárico de polissacarídeos sulfatados marinhos (MARQUES et al., 2016), atividades enzimáticas (proteolítica e fosfolipase A2), inibitórias (proteases metálica, cisteína e serina) e hemaglutinantes foram determinadas a partir de zoantídeos (GUARNIERI et al., 2018) e isolamento de um dipeptídeo anti-biofilme de fungos marinhos (SCOPEL et al., 2013). Também foram divulgados isolados microbianos de esponjas com atividade antimicrobiana contra importantes patógenos humanos (RUA et al., 2014). A indústria brasileira está se conscientizando do grande potencial da biodiversidade marinha em produzir produtos úteis (THOMPSON et al., 2018).

Produtos farmacêuticos de microalgas possuem alto valor, mas sua comercialização ainda está muito recente. As microalgas possuem um grande potencial genético para vários agentes bioativos. Esta capacidade comprovada para produzir compostos coloca esses microrganismos no centro das atenções biotecnológicas para aplicações e comercialização, como por exemplo na indústria farmacêutica. As algas também foram verificadas como fontes precursoras de vitaminas, como ácido ascórbico, riboflavina e tocoferol (SHARMA; SHARMA, 2017)

A busca por compostos bioativos a partir de microalgas vêm se tornando cada vez mais promissora, acompanhado da introdução crescente de espécies cultivadas a nível comercial, facilitando e viabilizando a obtenção destas moléculas de interesse. A manutenção controlada e a produção de microalgas são um fator essencial para explorá-las como uma fonte economicamente viável de importantes produtos (BORGES et al., 2011; COUTO et al., 2021).

Os compostos bioativos que são geralmente metabolitos secundários, incluem vários tipos de substâncias que variam a partir de ácidos orgânicos,

carboidratos, aminoácidos e peptídeos, vitaminas, substâncias de crescimento, antibióticos e enzimas (NEWMAN; CRAGG, 2016)

O estudo do metabolismo secundário em microalgas foi desenvolvido a partir do isolamento e do reconhecimento de produtos químicos bioativos, através da pesquisa sobre a sua biossíntese e o estudo dos mecanismos de controle fisiológicos envolvidos. Os compostos formados na fase de produção do metabolismo secundário são geralmente constituídos de diferentes componentes intermediários que são acumulados nas células das microalgas ou no meio de cultura durante seu período de crescimento e são precursores do metabolismo primário (CHU, 2012).

Microalgas como as diatomáceas desenvolveram sistemas precisos para combater bactérias patogênicas que coexistem no ambiente marinho. Sendo a secreção de metabólitos secundários um desses sistemas(SOTO, 2018). Devido a sua versatilidade e capacidade de adaptação a diferentes ambientes, tornou as algas candidatas ideais para a formulação de compostos antimicrobianos com alta eficácia e de formas econômicas. Os seus metabólitos podem exibir atividade antimicrobiana substancial contra uma ampla gama de bactérias, incluindo cepas multirresistentes, tornando-os fontes promissoras de compostos antimicrobianos (BHOWMICK et al., 2020).

As propriedades antibacterianas exibidas por diferentes metabólitos das algas não dependem apenas dos vários solventes usados, mas também dos métodos de extração ou diferentes frações utilizadas. Alguns dos metabólitos já estão bem caracterizados, e alguns ainda precisam ser investigadas exaustivamente. Estudos elucidaram o mecanismo de atividade antibacteriana desses metabólitos e os prováveis locais nas células bacterianas onde eles tendem a interagir (BHOWMICK et al., 2020; DA ROSA et al., 2023; ROTTER et al., 2021; THOMPSON et al., 2018).

Gênero *Acinetobacter*

A história do gênero *Acinetobacter* remonta ao início do século 20, quando Beijerinck, um microbiologista holandês, em 1911 descreveu um organismo chamado *Micrococcus calcoaceticus* que foi isolado do solo por enriquecimento em meio mínimo contendo acetato de cálcio (PELEG et al., 2008).

A atual designação de gênero, *Acinetobacter*, foi proposto inicialmente por Brisou e Pre'vot em 1954 para separar os microrganismos móveis e não móveis, do gênero *Achromobacter*. Somente em 1968 essa designação de gênero se tornou mais amplamente aceita. Baumann et al. (1968) concluíram que as diferentes espécies listadas pertenciam a um único gênero, para o qual o nome *Acinetobacter* foi proposto, e não foi possível subclassificar mais espécies diferentes com base nas características fenotípicas (PELEG et al. 2008).

Em 1971 a classificação oficial do gênero *Acinetobacter* foi aprovada pelo *Sub-committee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria* (LESSEL, 1971). Na edição de 1974 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, o gênero *Acinetobacter* foi listado, com a descrição de uma única espécie, *Acinetobacter calcoaceticus*. Existiam descritas até 1986 no *Approved List of Bacterial Names* somente duas espécies, *A. calcoaceticus* e *A. lwoffii* (PELEG et al. 2008).

Em 1986, Bouvet e Grimont com base em estudos de hibridização de DNA distinguiram 12 grupos ou genoespécies de DNA (hibridização), alguns dos quais receberam nomes formais de espécies, incluindo *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii* e *A. lwoffii* (BOUVET; GRIMONT, 1986). Com as novas pesquisas taxonômicas e o surgimento de novas espécies foi proposto que membros do gênero seriam então classificados dentro da família *Moraxellaceae*, que inclui *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* e organismos relacionados (PELEG et al. 2008).

Hoje, o gênero *Acinetobacter* pertence à família *Moraxellaceae*, à classe *Grammaproteobacteria* e ordem *Pseudomonadales*. O gênero abriga 63 espécies com nomenclatura válida e oito espécies sem nomenclatura válida, descritas na Lista de nomes de procariotos com Nomenclatura Permanente (List of Prokaryotic names with Standing in nomenclature – LPSN) vinte espécies são categorizadas como patógenos e encontradas em seres humanos (SHIN; PARK, 2017). Nos últimos cinco anos, várias espécies novas de *Acinetobacter* de origem humana foram descritas: *A. seifertii*, *A. variabilis*, *A. proteolyticus*, *A. vivianii* e *A. modestus*, o que indica a possível descoberta de mais espécies de *Acinetobacter* causadoras de doenças no futuro (SHIN; PARK, 2017).

Dentre as espécies de *Acinetobacter* que são agentes causadores comuns de infecções humanas em hospitais, destaca-se *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*. *A. baumannii* forma um complexo de *A. baumannii* com *A. nosocomialis* e *A. pittii*, responsável pela maioria (90-95%) de infecções clinicamente significativas (SHIN; PARK, 2017).

O complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii*(ACB) foi um termo proposto por Gerner-Smid et al (1991) para representar um grupo de quatro espécies homólogas, que não podem ser diferenciadas a partir de testes fenotípicos de rotina (NEMEC et al. 2011).O que não é o ideal do ponto de vista clínico, pois atualmente o complexo abriga cinco espécies de importância clínica e uma espécie ambiental (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

Entre as espécies de *Acinetobacter*, *Acinetobacter baumannii* é o membro mais importante associado à infecções adquirida no hospital em todo o mundo (LIN et al. 2014).

Acinetobacter baumannii

Acinetobacter baumannii é um coccobacilo gram-negativo, oxidase-negativo, não móvel, não fermentativo e aeróbico. Já foi considerado um patógeno de baixo grau e, atualmente é reconhecido como um patógeno oportunista, é uma das causas significativas de infecções nosocomiais e é de crescente importância na comunidade médica (KRZYŚCIAK et al. 2017). As infecções por *Acinetobacter baumannii* são mais prevalentes em pacientes hospitalizados, porém a frequência de infecções por *A. baumannii* adquiridas na comunidade têm aumentado gradualmente (LEE et al. 2017a; LIN et al. 2014). A maioria das infecções por *A. baumannii* ocorre em pacientes críticos na unidade de terapia intensiva (UTI) e representa até 20% das infecções em UTIs em todo o mundo (FOURNIER; RICHET, 2006a).

Este patógeno apresenta capacidade de sobrevivência por longo período de tempo em ambiente hospitalar, facilitando sua disseminação entre a equipe médica, pacientes imunocomprometidos, idosos, neonatos com baixo peso, pacientes com câncer e queimaduras, pacientes que passaram por cirurgia e que estão em prologado tempo de internação (WONG et al. 2017).

Os sítios de infecção mais comuns de *A. baumannii* são o trato respiratório inferior, trato urinário, corrente sanguínea, pele e tecidos moles e os principais fatores de risco incluem procedimentos invasivos, tais como o uso de ventilação mecânica, cateter venoso central ou cateter urinário, e uso prévio de antibióticos de amplo espectro (FOURNIER; RICHET, 2006; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; PEREZ et al. 2007).

Nas últimas duas décadas teve sua importância clínica ressaltada devido ao surgimento de grandes infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e a emergência de abrangentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos por estes microrganismos (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; PEREZ et al., 2007; WATKINS; BONOMO, 2020). Devido a sua excepcional capacidade de adaptação a condições ambientais prejudiciais, *A. baumannii* desenvolve rapidamente resistência a antimicrobianos (KYRIAKIDIS et al., 2021; MCCONNELL; ACTIS; PACHÓN, 2013).

Devido à prevalência de infecções e surtos causados por *A. baumannii* resistente a múltiplos fármacos, poucos antibióticos são eficazes no tratamento de infecções causadas por este patógeno. Para superar este problema, o conhecimento da patogênese e dos mecanismos de resistência a antibióticos de *A. baumannii* são importantes (KURIHARA et al. 2020; LEE et al. 2017; NOCERA et al. 2021).

Várias cepas de *A. baumannii* são altamente resistentes à maioria dos antibióticos disponíveis clinicamente (LIN et al. 2014). *A. baumannii* possui vários mecanismos de resistência, incluindo β -lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, bombas de efluxo, defeitos de permeabilidade e modificações nos locais de destino. O acúmulo de vários mecanismos de resistência em *A. baumannii* diminuiu gradualmente o número de classes de antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções por *A. baumannii* na prática clínica (LEE et al. 2017).

Resistência antimicrobiana

De acordo com OMS a resistência antimicrobiana é um desafio para a saúde pública global. (WHO 2014). Vários patógenos resistentes a antibióticos

foram identificados como causas de infecções graves em pacientes hospitalizados (MULVEY; SIMOR, 2009).

Os organismos resistentes a antibióticos parecem ser biologicamente adequados e capazes de causar infecções graves e potencialmente fatais, difíceis de gerenciar porque as opções de tratamento se tornaram limitadas. Esses organismos são tipicamente resistentes a múltiplas classes de agentes antimicrobianos e, portanto, são chamados de organismos multirresistentes (MULVEY; SIMOR, 2009). A resistência antimicrobiana é um fenômeno natural em microrganismos, mas pode ser acelerada pela pressão seletiva do uso de agentes antimicrobianos (O'Neill 2014).

O uso persistente de antibióticos, automedicação e exposição a infecções em hospitais provocou o surgimento de bactérias multirresistentes responsáveis por 15,5% de infecções hospitalares no mundo (MULANI et al. 2019; PENDLETON; GORMAN; GILMORE, 2013; RICE, 2008). As infecções causadas por organismos resistentes a antimicrobianos estão quase sempre associadas ao aumento da mortalidade atribuível, permanência hospitalar prolongada e custos excessivos (MULVEY; SIMOR, 2009). Estratégias para reduzir a resistência antimicrobiana devem considerar o papel e o efeito de muitos fatores, incluindo os mecanismos de resistência, espécies de microrganismos, o antimicrobiano específico, bem como o cenário e o contexto (HOLMES et al. 2016).

Em 2017 a OMS publicou uma lista de “agentes patogênicos prioritários” com o objetivo de orientar e promover pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. Nela destacam-se os patógenos do grupo “ESKAPE”, contra as quais são urgentemente necessários novos antibióticos. O termo “ESKAPE” abrange seis dos patógenos com crescente resistência e virulência a múltiplas drogas: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* (RICE, 2008). Os patógenos “ESKAPE” são responsáveis pela maioria das infecções nosocomiais e são capazes de “escapar” da ação biocida dos agentes antimicrobianos (HOWARD et al. 2012; MULANI et al. 2019; RICE, 2008).

Acinetobacter baumannii tem quase todos os mecanismos de resistência bacteriana. Todas as lactamases da classe β foram detectadas em *A. baumannii* e a frequência de isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenem é muito alta. Além disso, quase todos os *A. baumannii* contêm enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e muitas bombas de efluxo responsáveis pela resistência a vários antibióticos clinicamente importantes foram identificadas em *A. baumannii*. Devido a essas habilidades, os antibióticos disponíveis para tratar infecções por *A. baumannii* são significativamente limitados. A colistina é usada como tratamento antibiótico de último recurso, devido à sua taxa de resistência relativamente baixa. No entanto, o surgimento de cepas de *A. baumannii* resistentes à colistina aumentou mundialmente com o aumento do uso de colistina (KYRIAKIDIS et al. 2021; LABARCA et al. 2016)

A terapia antimicrobiana geral para tratar eficazmente as infecções envolve o uso de antibióticos isoladamente ou em combinação. A análise das listas de antibióticos recomendadas nas diretrizes do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) revelou que muitos antibióticos sugeridos contra os patógenos ESKAPE desde 2010 foram excluídos. Portanto, é imperativo encontrar maneiras alternativas de tratar infecções, especialmente aquelas causadas por patógenos do ESKAPE (MULANI et al., 2019).

Os mecanismos de resistência a múltiplas drogas exibidos pelo ESKAPE são amplamente agrupados em três categorias: inativação do medicamento comumente por uma clivagem irreversível catalisada por uma enzima, modificação do local de destino onde o antibiótico pode se ligar, acúmulo reduzido do medicamento devido à permeabilidade reduzida ou por aumento do efluxo da droga (SIRIJAN SANTAJIT; NITAYA INDRAWATTANA, 2016). Eles também são capazes de formar biofilmes que impedem fisicamente as células de resposta imune do hospedeiro, bem como antibióticos para inibir o patógeno. Além disso, os biofilmes protegem células adormecidas especializadas, chamadas células persistentes, tolerantes a antibióticos que causam infecções recalcitrantes difíceis de tratar (LEWIS, 2007).

Embora exista atividade aumentada de antibióticos quando usados em combinação contra patógenos *in vitro*, existem estudos limitados demonstrando o mesmo *in vivo* e alguns dentre aqueles se mostraram desvantajosos. Se a

monoterapia seleciona um espectro estreito de resistência, uma combinação de dois ou mais antibióticos seleciona um amplo espectro de resistência, derrotando completamente o objetivo da terapia combinada (Vestergaard et al. 2016). Certas combinações destinadas a tratar infecções tendem a ter o efeito oposto, resultando em danos muito piores (Fallah, 2018). Um antibiótico pode levar à indução de um mecanismo de resistência contra um segundo antibiótico administrado em combinação, levando a efeito antagônico. As bactérias ESKAPE tendem a se tornar resistentes a um ou ambos os antibióticos usados em combinação a cada ano que passa, devido não apenas à seleção natural de cepas resistentes, mas também à transferência horizontal de genes dessas cepas sensíveis (Mulani et al., 2019).

O desenvolvimento de novas terapêuticas para tratar infecções resistentes a medicamentos, especialmente aquelas causadas por patógenos do ESKAPE, é uma real necessidade (Mulani et al. 2019). Uma razão para o número limitado de novos antibióticos é que as fontes tradicionais desses produtos foram cuidadosamente avaliadas a ponto de praticamente todos os compostos antibacterianos promissores terem sido identificados. Estudos estão explorando outras fontes inexploradas de produtos, como o ambiente marinho e bactérias que vivem em condições precárias (Marston et al. 2016).

483

484 **Objetivo geral**

485 Caracterizar os extratos da microalga *Conticribra weissflogii* e avaliar a atividade
486 antimicrobiana sobre cepas de *Acinetobacter baumannii*.

487

488 **Objetivos específicos**

489 - Utilizar o sistema de aquacultura para produção de biomassa da microalga
490 *Conticribra weissflogii*;

491 - Estimular a produção de metabólitos secundários bioativos através de
492 modificações nos métodos de cultivo da microalga *Conticribra weissflogii*;

493 - Produzir os extratos da microalga *Conticribra weissflogii*;

494 - Caracterizar os metabólitos da microalga *Conticribra weissflogii*;

495 - Avaliar a bioatividade dos extratos da microalga *Conticribra weissflogii* frente a
496 *A. baumannii* em suspensão e em biofilme;

497 - Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de *Conticribra weissflogii*;

498 - Avaliar citotoxicidade dos extratos de *Conticribra weissflogii* em células animais
499 isoladas.

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510 **Capítulos**

511 O trabalho foi organizado na forma de 2 capítulos, onde o **Capítulo I** trata
512 de um artigo já publicado, enquanto o **Capítulo II** apresenta um manuscrito, a
513 ser modificado e, posteriormente submetido. As metodologias utilizadas para
514 execução desse trabalho estarão apresentadas de acordo com os trabalhos em
515 cada capítulo.

516 O **Capítulo I** apresenta os resultados obtidos no artigo “Application of ^1H
517 HR-MAS-NMR-Based Metabolite Fingerprinting of Marine Microalgae”, que
518 avaliou a caracterização através da técnica de ^1H HR-MAS-NMR dos principais
519 metabólitos de três espécies de microalgas com aplicações importantes na
520 indústria de alimentos e combustíveis, bem como com promissor potencial no
521 contexto do desenvolvimento de alternativas farmacológicas. E, o **Capítulo II**,
522 apresenta um manuscrito, cujo objetivo foi avaliar a bioatividade dos extratos
523 produzidos através da biomassa da diatomácea *C. weissflogii* frente a cepas de
524 *A. baumannii*.

525 Este trabalho além de caracterizar pela primeira vez o perfil químico da
526 diatomácea *C. weissflogii* também avaliou pela primeira vez a bioatividade frente
527 a *A. baumannii* destacando assim os metabólitos produzidos a partir de
528 microalgas como possível fonte promissora para o desenvolvimento de
529 alternativas no combate a importantes patógenos bacterianos.

530

531

532

533

534

535

536

537

Capítulo I

O artigo foi publicado na revista *Metabolites* em janeiro de 2023 (Fator de impacto: 5,581).

Article

Application of ^1H HR-MAS NMR-based Metabolite Fingerprinting of Marine Microalgae

Carolina da Silva Canielles Caprara ¹, Tatiane Ksyvickas Mathias ², Maria de Fátima C. Santos ², Marcelo G. M. D'Oca ², Caroline Da R. M. D'Oca ², Fabio Roselet ³, Paulo Cesar Abreu ^{3†} and Daniela Fernandes Ramos ^{1,*}

†This work is dedicated to the memory of our dear colleague and mentor, Professor Paulo Cesar Abreu, who passed away on July 19, 2022.

¹ Laboratório de Desenvolvimento de Novos Fármacos (LADEFA), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul 96200-400, Brazil; carolina.caprara@anhanguera.com (C.S.C.C.); daniferamos@gmail.com (D.F.R.)

² NMR Laboratory, NMR Center, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81530-900, PR, Brazil; tatimathias2103@gmail.com (T.K.M.); mfc.s.rmn@gmail.com (M.F.C.S.); marcelodoca@ufpr.br (M.G.M.D.); carolinedoca@ufpr.br (C.R.M.D.)

³ Laboratório de Produção de Microalgas (LPM), Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (FURG) - Rio Grande, Rio Grande do Sul 96210-030, Brazil; fabio.roselet@furg.br (F.R.); docpca@furg.br (P.C.A.)

* Correspondence: daniferamos@gmail.com; Tel.: + 55 53 3237-4634; Núcleo de Desenvolvimento de Novos Fármacos - NUDEFA, Rua General Osório, s/nº, Campus Saúde, 2º andar. Rio Grande, Rio Grande do Sul - Brazil. CEP: 96.200-400;

Abstract: Natural products from the marine environment as well as microalgae, have been known for the complexity of the metabolites they produce due to their adaptability to different environmental conditions, which has been an inexhaustible source of several bioactive properties, such as antioxidant, anti-tumor, and antimicrobial. This study aims to characterize the main metabolites of three species of microalgae (*Nannochloropsis oceanica*, *Chaetoceros muelleri*, and *Conticribra weissflogii*), which have important applications in the biofuel and nutrition industries, by ¹H High-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (¹H HR-MAS NMR), a method which is non-destructive, is highly reproducible, and requires minimal sample preparation. Even though the three species were found in the same ecosystem and a superior production of lipid compounds was observed, important differences were identified in relation to the production of specialized metabolites. These distinct properties favor the use of these compounds as leaders in the development of new bioactive compounds, especially against environmental, human, and animal pathogens (One Health), and demonstrate their potential in the development of alternatives for aquaculture.

Keywords: microalgae; coastal products; HR-MAS NMR; metabolomics; biotechnology; bioactivity

1. Introduction

Oceans cover 70% of the planet's surface and contain about 97% of its water [1]. Marine and coastal environments cover a diverse spectrum of habitats, from shallow coral reefs to deep hydrothermal vents, and are home to an enormous diversity of species, from micro- to macro-organisms. This species diversity is translated into unique metabolic abilities to ensure survival in harsh marine conditions [2]. Compared to terrestrial environments, marine and coastal environments favor the production of natural products, as approximately 28,500 marine natural products were identified by the end of 2016, many with a high degree of structural novelty [3].

Microalgae are unicellular organisms that convert carbon dioxide, light, water, and macro- and micronutrients into biomass, mainly carbohydrates, lipids, proteins, and pigments. Recent research estimated a diversity of 72,500 species of algae, of which 39% are yet to be described [4]. Microalgae live in close relation with bacteria and predators; therefore, microalgae have developed several chemical defense mechanisms [3]. They are adapted to a wide range of environmental conditions, which influence the production of metabolites [5], which are a potential source of marine natural products [6].

Potential advantages of using microalgae as a raw material for various purposes in biotechnology include its ability to synthesize and accumulate large amounts of neutral lipids. These lipids are composed of a large percentage of polyunsaturated fatty acids that are important for the diet of other aquatic organisms and for human health [7]. Furthermore, fatty acids have great commercial potential when incorporated into food, animal feed, cosmetics, and pharmaceutical products [8]. Products from marine organisms have shown many interesting activities, such as antimicrobial, cytotoxic, anticancer, antidiabetic, antifungal,

Citation: Caprara, C.S.C.; Mathias, T.K.; Santos, M.F.C.; D'Oca, M.G.; D'Oca, C.R.M.; Roselet, F.; Abreu, P.C.; Ramos, D.F.

Application of ¹H HR-MAS NMR based metabolite fingerprinting of marine microalgae. *Metabolites* 2023, 12, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editors: Fan Zhang, Fei Gan

Received: 05 January 2023

Revised: 22 January 2023

Accepted: 24 January 2023

Published: date



Copyright: © 2023 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

anticoagulant, anti-inflammatory, and other pharmacological activities [9–11].

Interest in the biotechnological potential of microalgae has increased due to their high production rates and their production of several valuable substances [12]. The cultivation of microalgae has gained great momentum among researchers in recent decades due to their ability to produce valuable metabolites, remarkable photosynthetic efficiency, and versatile nature [13]. In Brazil, the government has promoted a national strategy to encourage and strengthen in vitro studies that validate the use of metabolites produced by microalgae and other marine organisms in different aquaculture systems. The biomass produced will be used as a raw material for the production of many biomolecules used in the food and pharmaceutical industries [14]. In this scenario, we highlight *Nannochloropsis oceanica*, a unicellular microalga that belongs to the class Eustigmatophyceae that has high biotechnological potential due to its massive lipid production [15–18] and the diatoms of the genus *Chaetoceros* and *Conticribra*, which are among the most cultivated diatoms for larviculture [19]. Diatoms belong to a large group of microalgae and are among the most abundant classes in marine environments [20]. The microalgae *Chaetoceros muelleri* is used due to its fatty acid profile, and the diatom *Conticribra (Thalassiosira) weissflogii* is an euryhaline species [21] and has high carbon fixation rates, as well as excellent photosynthetic efficiency. Both have been used as a model in physiological studies of photosynthesis [22,23]. The lipid content of *C. weissflogii* was analyzed, mainly as a source of fatty acids for copepods [24].

The methodologies commonly used to study the chemical profile of microalgae are laborious and require extraction with organic solvents. An alternative that has been used to directly investigate the chemical composition of microalgae preserving the integrity of the compounds is the High-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy (HR-MAS NMR) [25–27]. The HR-MAS NMR has been used for investigations based on the fingerprints or metabolomic profiles of biofluids [27], herbal medicines [28,29], foods [30], and microalgae [31]. This technique allows the analysis of semi-solid samples that are characterized by inhomogeneity and restricted molecular motion with spectral resolution similar to the solution-state NMR [25,26]. This happens due to the molecular mobility in the swollen samples, which is associated with fast spinning around of the so-called “magic angle” ($\theta = 54.74^\circ$). As a result, line broadening is drastically reduced due to dipole coupling and chemical shift anisotropy (CSA) [26]. The main advantage of the HR-MAS NMR is that it allows the identification of the metabolic profile under conditions similar to the natural chemical environment of the compounds with the same spectral resolution of NMR solution.

Several studies have demonstrated the abundance of primary metabolites produced by microalgae; these metabolites include lipids, fatty acids, amino acids, and some sugars. However, there are few studies that investigate the complex characterization of marine microalgae, especially through more robust tools, and that enable fast, easy, non-destructive, and unbiased screening such as ^1H NMR-based metabolomics [32–35].

Carotenoids, polyphenols, and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have gained prominence among the bioactive compounds produced by microalgae [36–38], which have been widely proposed for biotechnological use in the area of food, fertilizers, bioenergy, cosmetics, pharmaceuticals, and industries in general [39].

In this way, the aim of the present study was to evaluate the spectral profiles of microalgae *N. oceanica*, *C. muelleri*, and *C. weissflogii* microalgae in polar and non-polar solvents by ^1H HR-MAS NMR to provide a more comprehensive investigation of these microalgae that can contribute to the targeting of applications in several areas.

2. Materials and Methods

2.1. Microalgae Cultivation

The microalgae used in this study, namely *Nannochloropsis oceanica* Suda and Miyashita 2002 (Eustigmatophyceae), *Chaetoceros muelleri* Lemmermann 1898 (Mediophyceae), and *Conticribra weissflogii* (Grunow) Stachura-Suchoples and D.M. Williams 2009 (Mediophyceae), were obtained from the collection of the Laboratory of Microalgae Production from the Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande (FURG/Brazil). The microalgae were cultivated in natural seawater (salinity 28), which was measured using a hand-held salinity

refractometer (ATAGO, Bellevue, WA, USA). The seawater was first filtered by a sand filter. Next, it was further filtered through a 1.0 μm polypropylene filter cartridge, disinfected with sodium hypochlorite 12% (NaClO , 0.15 mL L^{-1}) for 24 h, and then neutralized with ascorbic acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, 30 mg L^{-1}). Batch culture technique was employed, using Guillard's medium [32], composed of sodium nitrate (NaNO_3 , 75 mg L^{-1}), sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 mg L^{-1}), EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.36 mg L^{-1}), ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.15 mg L^{-1}), cupric sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01 mg L^{-1}), zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 mg L^{-1}), cobalt chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 mg L^{-1}), manganese chloride ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.18 mg L^{-1}), sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.006 mg L^{-1}), thiamine ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$, 0.1 mg L^{-1}), cyanocobalamin ($\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$, 0.0005 mg L^{-1}), and biotin ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, 0.0005 mg L^{-1}). Diatoms were supplemented with sodium silicate ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 30 mg L^{-1}). All chemicals were analytical grade (Dinâmica, Indaiatuba, São Paulo, Brazil). The microalgae were cultured in a 330 L bubble column acrylic photobioreactor (0.5 m diameter, 1.5 m height), and kept indoors under controlled conditions (23 $^\circ\text{C}$, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and a light period of 16h L: 8h D). The culture growth was monitored daily by counting the cell abundance using an improved Neubauer hemocytometer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Baden-Württemberg, Germany), and cultivation was maintained for 12 days until the stationary phase was reached.

2.2. Biomass Harvesting

The microalgae were harvested by flocculation using Flopam FO 4800 SH, an organic synthetic polyacrylamide-based polymer [34]. The flocculant was prepared by adding 3.3 g of polymer to 3.3 L of deionized water and by mixing at 300 rpm until dissolution (ca. 1 h). Then, the flocculant solution was poured into the photobioreactor. Concurrently, the microalgae suspension was mixed intensively (100 rpm) for 5 min to allow uniform flocculant dispersal, followed by gentler mixing (20 rpm) for 15 min to allow floc formation. The flocculated biomass settled within 10 min and was collected after the supernatant was siphoned. The biomass was further dewatered by centrifugation (2,527 g) at 4 $^\circ\text{C}$ for 5 min, and then dried at 60 $^\circ\text{C}$ for 24 h.

2.3. Sample Preparation for ^1H HR-MAS NMR

An amount of 10 mg of dried marine microalgae was inserted into the zirconia rotor (50 μL), then 40 μL of deuterated solvent was added, homogenized, and packed. The solvents used were chloroform (CDCl_3) and methanol (CD_3OD), both at 0.05% of TMS, and water (D_2O) at 0.01% of TMSP.

2.4. Acquisition of ^1H HR-MAS NMR Spectra

The ^1H HR-MAS NMR spectra were acquired on a Bruker AVANCE 400 NMR spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany), which was operated at 9.4 T, with observation of the ^1H core at 400.13 MHz, and which was equipped with a quadrinuclear probe ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$) at a high resolution with 4mm magic angle ($\theta = 54.74^\circ$) rotation and field gradient in the magic angle direction. The ^1H HR-MAS NMR spectra were acquired with the *zgpr* pulse sequence, a recycle delay (D1) of 1.0 s, and 64 transients and 64k points (TD) distributed in a spectral window of 8012.820 Hz, resulting in time acquisition (AQ) of 4.01 s and a temperature of 298 K. During acquisition, the samples were rotated at a speed of 5 KHz around the magic angle.

The 1D and 2D NMR spectra were obtained at 298 K in a AVANCE III NMR spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) which operated at 14.7 T (^1H at 600.13 MHz and ^{13}C at 150.92 MHz) and was equipped with a TCI CryoProbe Prodigy 5 inverse detection probe with a z-gradient. Tuning (matching and tuning) for ^1H and ^{13}C and adjustment of the homogeneity of the magnetic field spatially (shimming) were performed for each analysis.

2.5. Sample Preparation and Acquisition of 1D and 2D NMR Spectra

To support NMR chemical shift assignments, experiments of 1D and 2D NMR in solution with *N. oceanica*, *C. muelleri*, and *C. weissflogii* were also performed. For this purpose, 100.0 ± 1.0 mg of each sample was submitted to extraction directly in 1 mL of CDCl_3 , D_2O , and

CD₃OD sonicated and subsequently centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. After this procedure, 600 μ L of the extracts were added to 5 mm tubes for further analyses. Direct and long-range ¹H–¹³C NMR correlations were acquired on a Bruker Avance III 600 NMR spectrometer operating at 14.1 T and observing ¹H and ¹³C at 600.13 and 150.92 MHz, respectively. The spectrometer was equipped with a 5 mm inverse detection four-channel probe (¹H, ¹³C, ¹⁵N and ³¹P) with z-gradient. One-bond and long-range ¹H–¹³C correlations from HSQC and HMBC NMR experiments were optimized for average coupling constants ¹J_(H,C) and ^{LR}J_(H,C) of 140 and 8 Hz, respectively.

3. Results

Initially, the metabolite fingerprinting of the marine microalgae *N. oceanica*, *C. muelleri*, and *C. weissflogii* were explored by ¹H HR-MAS NMR. Due to restricted and low molecular motion conditions of semi-solid samples such as microalgae, several anisotropic trends such dipolar interactions, magnetic susceptibility, and chemical shift anisotropy affect T2 relaxation, producing a line-broadening of signals, low signal-to-noise ratio, and low resolution in the NMR spectra. The high spinning rates of the samples, which occur at a magical angle ($\theta = 54.74^\circ$), minimize the line-broadening effects coming from dipolar interactions. Additionally, the HR-MAS technique is applied in swollen samples, employing suitable NMR solvents, which provide sufficient molecular motions in order to improve spectral resolution. In this sense, to have a more comprehensive view of the mobility of microalgal compounds, ¹H HR-MAS NMR spectra were recorded directly from samples by employing 40 μ L of chloroform, methanol, or water as solvents (Figures 1-3) without sample pretreatment steps and then preventing changes in the chemical compositions during extraction and isolation procedures.

According to the ¹H HR-MAS NMR spectra of marine microalgae *C. muelleri*, *C. weissflogii*, and *N. oceanica* analyzed in deuterated chloroform (Figure 1), it was possible to observe that the three species of microalgae presented a similar chemical profile because they are constituted of mono- or polyunsaturated fatty acids. From the amplification of the region between δ_H 5.40–0.50, characteristic signals of vinylic hydrogens were observed at δ_H 5.40–5.30 (*m*), bis-allylic at δ_H 2.81 (*m*), α -C=O in δ_H 2.34 *t* ($J = 7.5$ Hz), allylic at δ_H 2.06 (*m*), β -C=O in δ_H 1.62 (*m*), methylene at δ_H 1.35–1.25(*m*), and methyls at δ_H 0.87 (*m*). Only for the microalgae *N. oceanica*, a triplet at δ_H 0.98 ($J = 7.0$ Hz) relative to methyl hydrogens of type ω -3 was observed.

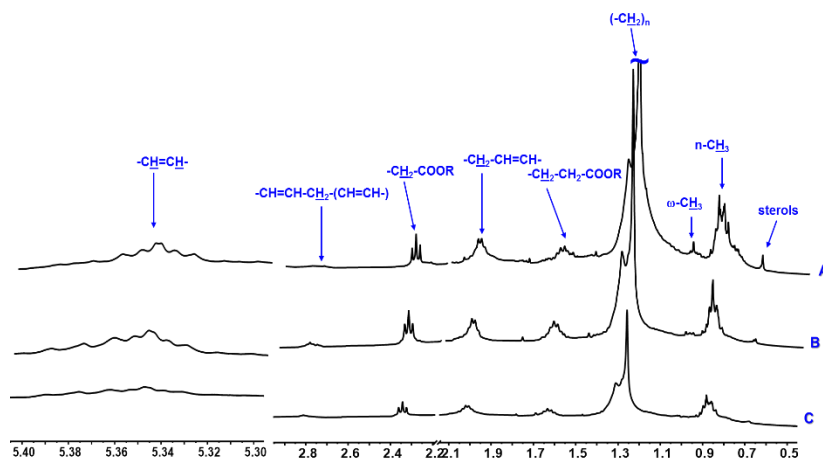


Figure 1. ¹H HR-MAS NMR spectra (400 MHz, CDCl₃) of the microalgae *N. oceanica* (A), *C. muelleri* (B), and *C. weissflogii* (C). In blue, types of hydrogens of polyunsaturated fatty acids are indicated.

The spectral profile acquired directly from dried marine microalgae samples using deuterated water (or D₂O) as the solvent seemed to be more complex, with several signals overlapped; thus, it was difficult to clearly identify the signals from the chemical compounds (Figure 2). The entire signal assignments of *C. muelleri*, *C. weissflogii*, and *N. oceanica* were confirmed based on 2D NMR experiments, which were performed in solution state (Figures S1–S13), as well as previously reported data [35]. From these spectra, it was possible to identify eight chemical compounds,

including amino acids and organic acids. Regarding amino acids, a doublet at δ_H 1.47 ($J=7.2$ Hz) was observed for the methyl hydrogen of alanine for the microalgae *N. oceanica* and *C. weissflogii*. On the other hand, for *C. muelleri*, a broad singlet at δ_H 1.49 was observed due to the lower spectral resolution for this microalga. The three microalgae presented a singlet at δ_H 3.59 relative to the methine hydrogen of glycine.

In the three microalgae, typical relative signals of hydrogens from the para-substituted aromatic ring of tyrosine were observed. However, for *N. oceanica*, these signals presented with higher spectral resolution because a two doublet was observed at δ_H 6.89 ($J=8.1$ Hz) and 7.19 ($J=8.1$ Hz). Furthermore, it was also observed that only *C. weissflogii* presented a singlet at δ_H 8.23 with respect to the N-H hydrogen of the tripeptide cysteine amino acid, glutathione. Furthermore, organic acids have also been identified. A doublet at δ_H 1.33 ($J= 6.7$ Hz) was observed for the methyl lactate hydrogens for the three microalgae, and a singlet was observed at δ_H 2.40 for the succinate methylene hydrogens only for Figure 2. A singlet at δ_H 3.20 with respect to the methyl hydrogens of the choline was observed for the three microalgae in question. A signal at δ_H 8.47 (s) was also observed relative to the methynic hydrogen of the formate only for *N. oceanica*. The attributions of these metabolites in comparison with the literature [35] are presented in Table 1.

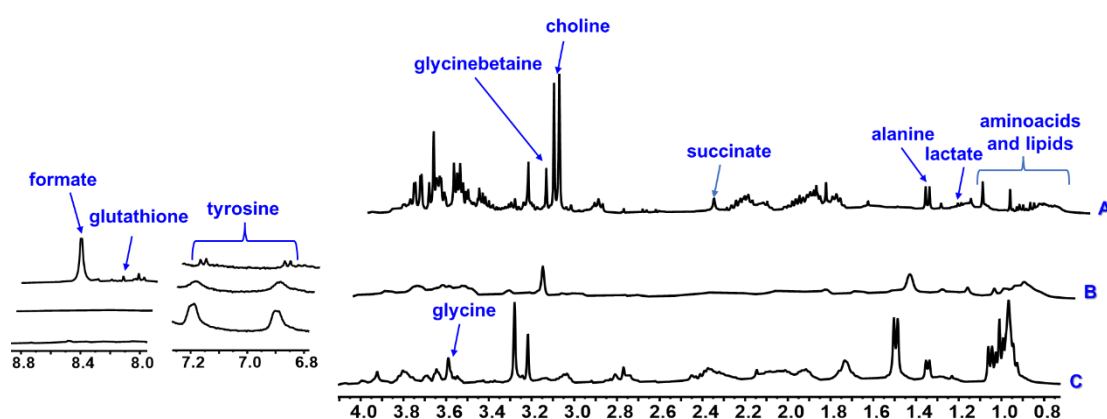


Figure 2. ^1H HR-MAS NMR spectra (400 MHz, D_2O) of the microalgae *N. oceanica* (A), *C. muelleri* (B), and *C. weissflogii* (C). In blue, the metabolites identified are indicated.

From the spectra acquired employing methanol, it was possible to identify a greater number of compounds from different classes, indicating that methanol promoted greater molecular mobility. In addition, it was observed that with this solvent, the spectral profiles presented a better spectral resolution. Thus, signals were observed in the regions of aliphatic hydrogens, amino acids, sugars, and aromatics (Figure 3). The attributions of these metabolites by 1D and 2D NMR and in comparison with the literature [35,40,41] are presented in Table 1.

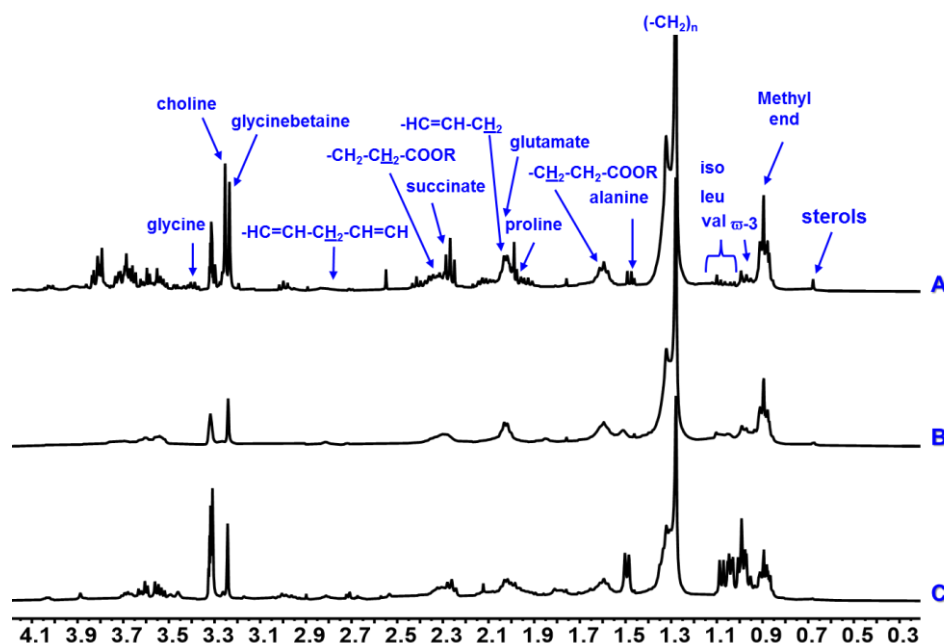


Figure 3. ^1H HR-MAS NMR spectra (400 MHz, MeOD) of the microalgae *N. oceanica* (A), *C. muelleri* (B) and *C. weissflogii* (C). In blue, the metabolites or types of hydrogens identified are indicated.

Table 1. Assignment of main resonances of marine microalgae by ^1H HR-MAS NMR (400 MHz).

Class	Compound	δ_{H} mult. (J in Hz)	CDCl_3			D_2O			CD_3OD		
			N. O	C. M	C. W	N. O	C. M	C. W	N. O	C. M	C. W
Amino Acids	Isoleucine	0.95 <i>t</i> (7.0), 1.02 <i>d</i> (7.0)	-	-	-	x	x	x	x	x	x
	Leucine	0.99 <i>m</i>	-	-	-	x	x	x	x	x	x
	Valine	1.02 <i>d</i> (7.0), 1.07 <i>d</i> (7.0)	-	-	-	x	x	x	x	x	x
	Alanine	1.48 <i>d</i> (7.0)	-	-	-	x	x	x	x	x	x
	Proline	1.97-2.07 <i>m</i>	-	-	-	-	-	-	x	x	x
	Glutamate	2.08 <i>m</i> , 2.14 <i>m</i> , 2.35 <i>m</i>	-	-	-	-	-	-	x	x	x
	Choline	3.20 <i>s</i>	-	-	-	x	x	x	x	x	x
	Glycinebetaine	3.26 <i>s</i>	-	-	-	x	x	x	x	x	x
	Glycine	3.59 <i>s</i>	-	-	-	x	x	x	x	x	x
	Phenylalanine	7.24 <i>m</i> , 7.30 <i>m</i> , 7.34 <i>m</i>	-	-	-	x	x	x	x	-	x
	Histidine	7.24 <i>m</i> , 8.13 <i>s</i>	-	-	-	-	-	-	x	-	x
	Tyrosine	6.89 <i>d</i> (8.1), 7.19 <i>d</i> (8.1)	-	-	-	x	x	x	x	x	x
	Glutathione	8.23 <i>s</i>	-	-	-	x	x	x	-	-	-
Organic acids	Lactate	1.33 <i>d</i> (6.7)	-	-	-	x	x	x	-	-	-
	Succinate	2.30 <i>s</i>	-	-	-	x	-	x	x	x	x
	Formate	8.47 <i>s</i>	-	-	-	x	-	-	x	-	-
Monounsaturated Fatty acids	Sterols	0.73 <i>m</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x
	Methylic	0.89 <i>m</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x
	Methylenic	1.35-1.25 <i>m</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x
	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}$ R	1.59 <i>m</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x

	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$ R	2.34 <i>m</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x
	Methylic ω -3	0.98 <i>t</i> (7.0)	x	-	-	-	-	-	x	-	-
	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$ R	1.62 <i>m</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x
	Allylic	2.06 <i>m</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x
PUFAs	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$ R	2.34 <i>m</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x
	bis-allylic	2.81 <i>m</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x
	Vinylic	5.40-5.30 <i>m</i>	x	x	x	-	-	-	x	x	x

796

797 N.O—*N. oceanica*; C.M—*C. muelleri*; C. W—*C. weissflogii*. (δ) Chemical shift in ppm. x – Indicates the presence
798 of the metabolite.

799 4. Discussion

800 In this study, the spectra revealed the presence of different classes of metabolites
801 including amino acids and mono- and polyunsaturated fatty acids and organic acids. In addition,
802 13 amino acids were identified in at least one of the samples evaluated using water or methanol
803 as solvents in spectral regions compatible with the description in the literature, ranging 0.50 –
804 8.50 ppm [35,42]. The choice of solvent used to swell the samples showed great importance for
805 identifying the compounds present in the microalgae matrix. Spectra recorded with the addition
806 of methanol and water, for example, were able to increase molecular mobility and, thus, result in
807 more defined and resolved signals that identified more compounds than chloroform, with amino
808 acids and organic acids emerging in the spectra. However, monounsaturated fatty acids and
809 PUFAs were identified more frequently with chloroform.

810 Some compounds seem to be characteristic markers according to the species of
811 microalgae analyzed, with *N. oceanica* showing the greatest diversity of compounds, followed by
812 *C. weissflogii* and *C. muelleri*. We emphasize that, unlike other species of the genus
813 *Nannochloropsis*, *N. oceanica* has been described as having mostly lipids and proteins, which
814 represent approximately half of the dry weight of the biomass, according to Zanella and Vianello
815 (2020). This genus of microalgae has high photosynthetic efficiency and can convert carbon
816 dioxide to storage lipids mainly in the form of triacylglycerols and to the ω -3 long-chain
817 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid (EPA) [17]. Interestingly, *N. oceanica* was the
818 only coastal species evaluated that presented, at 8.47s, a characteristic peak of formate. Inhibition
819 of the folate biosynthetic pathway, which may have formate as a product, has been proposed as
820 a promising target for the development of several antimicrobial compounds with cytotoxic
821 activity against tumor cells, for example [43–45]. In addition, formate can act as a by-product of
822 anaerobic fermentation of some bacterial species and interfere, as a secondary metabolite, in
823 different pathophysiological conditions.

824 With regard to fatty acids, which are already widely recognized as important metabolites
825 present and biotechnologically important in microalgae of the genus *Nannochloropsis*, and EPA
826 and PUFAs [37,42], which are the major fatty acids in *N. oceanica*, only this microalgae presented
827 omega-3 fatty acids (ω -3), and this metabolite is referenced by many authors as beneficial to
828 human and animal health, as well as in the pharmaceutical, food, environmental, and cosmetic
829 industries [17,42].

830 On the other hand, recent studies have proposed that α -linolenic acid (ALA), EPA, and
831 docosahexaenoic acid (DHA) are major bioactive compounds in different species of the genus
832 *Chaetoceros* [46].

833 Surprisingly, among the evaluated polyunsaturated fatty acids in the metabolomics
834 analyses for *C. muelleri*, only methylic ω -3 (0.98 *t*) was not identified, contrary to the findings of
835 Ramos et al (2022), which identified potential antibacterial activity in extracts of different
836 polarities which contained this metabolite through ^1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR)
837 analysis.

To the best of our knowledge, this is the first study that characterizes metabolites through assays with ^1H HR-MAS NMR of *C. weissflogii*, which is a model species for environmental studies and in the development of energy and feed supplements for animals [47,48]. Since before its reclassification (previously known as *Thalassiosira weissflogii*) [48,49], this species has demonstrated important cytotoxic and immunomodulatory bioactivity related to the presence of polysaccharides, as well as the important production of metabolites that are toxic against different microorganisms; for example, it interferes with *quorum sensing* and the adhesion and formation of bacterial biofilms [47,50,51].

Therefore, metabolomics studies of species belonging to coastal ecosystems—such as microalgae, which suffer intensely from abiotic factors such as constant changes due to seasonal heat input and thermal stratification, as well as ecosystem variations—are increasingly necessary. Such studies are necessary in order to understand specific responses of organisms to abiotic stressors and the organism–environment interactions and between the communities that constitute this niche [52].

In this sense and in corroboration with the objectives of the Brazilian Biotecmar [14] strategy, innovative, technological strategies are necessary to favor marine biotechnology as a whole. These strategies would aid in the understanding of the impacts of each individual that comprises this ecosystem on the biosphere, the monitoring of the impacts of environmental disturbances, and the use of bioactive metabolites for the development of therapeutic products in favor of sustainable development and the maintenance of One Health.

5. Conclusions

The fingerprinting approach of coastal microalgae by HR-MAS NMR proved to be an interesting tool to identify metabolites with minimal sample preparation that may contribute to future investigations of unpublished compounds or little explored compounds, which can contribute to the development of biotechnological products. Marine microalgae, such as the diatom *Conticribra weissflogii*, the major chemical composition of which has been described for the first time in this study, have highlighted as a fundamental element in the food chains of aquatic ecosystems, in addition to its use in the production of food and new drugs. In addition, our study allowed us to identify different metabolite profiles among the three evaluated species, evidencing the possibility of these marine microalgae to act as raw materials for bioactive compounds applied to *One Health*, the food industry, animal production, and cosmetics. Lastly, the results demonstrate that methanol was the best solvent; however, it must be noted that the choice in the solvent depends on the type of compound ones wants to extract.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1. ^1H - ^{13}C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Conticribra weissflogii* (^1H and ^{13}C , 600 and 150 MHz, D_2O) – regions A, B, and C; Figure S2. Ampliation from ^1H - ^{13}C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Conticribra weissflogii* (^1H and ^{13}C , 600 and 150 MHz, D_2O) – region A; Figure S3. Ampliation from ^1H - ^{13}C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Conticribra weissflogii* (^1H and ^{13}C , 600 and 150 MHz, D_2O) – region B; Figure S4. Ampliation from ^1H - ^{13}C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Conticribra weissflogii* (^1H and ^{13}C , 600 and 150 MHz, D_2O) – region C; Figure S5. ^1H - ^{13}C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Chaetoceros muelleri* (^1H and ^{13}C , 600.13 and 150.92 MHz, CD_3OD) – regions A, B, and C; Figure S6. Ampliation from ^1H - ^{13}C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Chaetoceros muelleri* (^1H and ^{13}C , 600.13 and 150.92 MHz, CD_3OD) – region A; Figure S7. Ampliation from ^1H - ^{13}C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Chaetoceros muelleri* (^1H and ^{13}C , 600.13 and 150.92 MHz, CD_3OD) – region B; Figure S8. Ampliation from ^1H - ^{13}C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Chaetoceros muelleri* (^1H and ^{13}C , 600.13 and 150.92 MHz, CD_3OD) – region C; Figure S9. ^1H - ^{13}C long-distance correlation map HMBC NMR experiment acquired from *Chaetoceros muelleri* (^1H and ^{13}C , 600.13 and 150.92 MHz, CD_3OD); Figure S10. ^1H - ^{13}C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Nannochloropsis oceanica* (^1H and ^{13}C , 600.13 and 150.92 MHz, CD_3OD) – regions A, B, and C; Figure S11. Ampliation from ^1H - ^{13}C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Nannochloropsis oceanica*

(¹H and ¹³C, 600.13 and 150.92 MHz, CD₃OD) – region A; Figure S12. Ampliation from ¹H-¹³C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Nannochloropsis oceanica* (¹H and ¹³C, 600.13 and 150.92 MHz, CD₃OD) – region B; Figure S13. Ampliation from ¹H-¹³C one-bond correlation map from multiplicity edited HSQC NMR experiment acquired from *Nannochloropsis oceanica* (¹H and ¹³C, 600.13 and 150.92 MHz, CD₃OD) – region C.

Author Contributions: Conceptualization, C.R. M. D. and D. F. R.; methodology, C. S. C. C., T. K. M., and M. F. C. S.; formal analysis, M. G. M. D.; investigation, C. S. C. C., M. F. C. S., and F. R.; resources, D. F. R. and P. C. A.; data curation, M. G. M. D.; writing—original draft preparation, C. S. C. C., and M.F. C. S.; writing—review and editing, C. S. C. C., M. F. C. S., M. G. M. D., C. R. M. D., and F. R.; supervision and project administration, C. R. M. D., D. F. R., and P. C. A.; funding acquisition, D. F. R.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number 428243/2018-5 and Research Productivity, Grant number 305921/2019-3.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in Figures 1, 2, and 3, Table 1, and Figures S1–S4 in the Supplementary Material.

Acknowledgments: This work is dedicated to the memory of our dear colleague and mentor, Professor Paulo Cesar Abreu, who passed away on July 19, 2022. During his career, he made a notable contribution to research on microalgae, biofuels, and metabolites of commercial interest. Furthermore, the authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose (REDE-TB), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Altmann, K.H. Drugs from the oceans: Marine natural products as leads for drug discovery. *Chimia* **2017**, *71*, 646–651. <https://doi.org/10.2533/chimia.2017.646>.
2. Martins, A.; Vieira, H.; Gaspar, H.; Santos, S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 1066–1101. <https://doi.org/10.3390/md12021066>.
3. Blunt, J.W.; Carroll, A.R.; Copp, B.R.; Davis, R.A.; Keyzers, R.A.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *34*, 235–294. <https://doi.org/10.1039/c7np00052a>.
4. Guiry, M.D. How many species of algae are there? *J. Phycol.* **2012**, *48*, 1057–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>.
5. Hopes, A.; Mock, T. Evolution of Microalgae and Their Adaptations in Different Marine Ecosystems. In *eLS* (pp. 1–9). Wiley. **2015**. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0023744>.
6. Lauritano, C.; Ferrante, M.I.; Rogato, A. Marine Natural Products from Microalgae: An -Omics Overview. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 269. <https://doi.org/10.3390/md17050269>.
7. Matos, Â.P. The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. *JAOCS J. Am. Oil Chem. Soc.* **2017**, *94*, 1333–1350. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-3050-7>.
8. Borowitzka, M.A. High-value products from microalgae-their development and commercialization. *J. Appl. Phycol.* **2013**, *25*, 743–756. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>.
9. Gul, W.; Hamann, M.T. Indole alkaloid marine natural products: An established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases. *Life Sci.* **2005**, *78*, 442–453. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.007>.
10. Habbu, P.; Warad, V.; Shastri, R.; Madagundi, S.; Kulkarni, V.H. Antimicrobial metabolites from marine microorganisms. *Chin. J. Nat. Med.* **2016**, *14*, 101–116. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)60003-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)60003-1).
11. Mayer, A.M.S.; Rodríguez, A.D.; Taglialatela-Scafati, O.; Fusetani, N. Marine pharmacology in 2009–2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotazoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2510–2573. <https://doi.org/10.3390/md11072510>.
12. Roselet, F.; Vandamme, D.; Muylaert, K.; Abreu, P.C. Harvesting of microalgae for biomass production. In *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*; Springer, Singapore. **2019**. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_10.

13. de Freitas Coêlho, D.; Tundisi, L.L.; Cerqueira, K.S.; da Silva Rodrigues, J.R.; Mazzola, P.G.; Tambourgi, E.B.; de Souza, R.R. Microalgae: Cultivation aspects and bioactive compounds. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2019**, *62*, e19180343. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180343>.
14. Thompson, F.; Krüger, R.; Thompson, C.C.; Berlinck, R.G.S.; Coutinho, R.; Landell, M.F.; Pavão, M.; Mourão, P.A.S.; Salles, A.; Negri, N.; et al. Marine Biotechnology in Brazil: Recent Developments and Its Potential for Innovation. *Front. Mar. Sci.* **2018**, *5*, 236. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00236>.
15. Radakovits, R.; Jinkerson, R.E.; Fuerstenberg, S.I.; Tae, H.; Settlege, R.E.; Boore, J.L.; Posewitz, M.C. Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 686. <https://doi.org/10.1038/ncomms1688>.
16. Al-Hoqani, U.; Young, R.; Purton, S. The biotechnological potential of *Nannochloropsis*. *Perspect. Phycol.* **2017**, *4*, 1–15. <https://doi.org/10.1127/pip/2016/0065>.
17. Ma, X.N.; Chen, T.P.; Yang, B.; Liu, J.; Chen, F. Lipid production from *Nannochloropsis*. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 61. <https://doi.org/10.3390/md14040061>.
18. Ben-Sheleg, A.; Khozin-Godberg, I.; Yaakov, B.; Vonshak, A. Characterization of *nannochloropsis oceanica* rose bengal mutants sheds light on acclimation mechanisms to high light when grown in low temperature. *Plant Cell Physiol.* **2021**, *62*, 1478–1493. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab094>.
19. Guedes, A.C.; Malcata, F. Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. In *Aquaculture*; IntechOpen: London, UK, 2012. <https://doi.org/10.5772/30576>.
20. Seródio, J.; Lavaud, J. Diatoms and Their Ecological Importance. In *Life Below Water. Encyclopedia of the UN Sustainable Development Goals*; Leal Filho, W., Azul, A.M., Brandli, L., Lange Salvia, A., Wall, T., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2020. Available online: https://doi.org/10.1007/978-3-319-71064-8_12-1.
21. Radchenko, I.G.; Il'yash, L.V. Growth and photosynthetic activity of diatom *Thalassiosira weissflogii* at decreasing salinity. *Biol. Bull.* **2006**, *33*, 242–247. <https://doi.org/10.1134/S106235900603006X>.
22. Halac, S.R.; Villafañe, V.E.; Helbling, E.W. Temperature benefits the photosynthetic performance of the diatoms *Chaetoceros gracilis* and *Thalassiosira weissflogii* when exposed to UVR. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2010**, *101*, 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.07.003>.
23. Antal, T.K.; Osipov, V.; Matorin, D.N.; Rubin, A.B. Membrane potential is involved in regulation of photosynthetic reactions in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2011**, *102*, 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.11.005>.
24. Klein Breteler, W.C.M.; Schogt, N.; Rampen, S. Effect of diatom nutrient limitation on copepod development: Role of essential lipids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2005**, *291*, 125–133. <https://doi.org/10.3354/meps291125>.
25. Farooq, H.; Courtier-Murias, D.; Soong, R.; Bermel, W.; Kingery, W.M.; Simpson, A.J. HR-MAS NMR Spectroscopy: A Practical Guide for Natural Samples. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 3013–3031.
26. Keifer, P.A.; Baltusis, L.; Rice, D.M.; Tymiak, A.A.; Shoolery, J.N. A comparison of NMR spectra obtained for solid-phase-synthesis resins using conventional high-resolution, magic-angle-spinning, and high-resolution magic-angle-spinning probes. *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *119*, 65–75. <https://doi.org/10.1006/jmra.1996.0052>.
27. Lindon, J.C.; Beckonert, O.P.; Holmes, E.; Nicholson, J.K. High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy: Application to biomedical studies. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *55*, 79–100. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2008.11.004>.
28. Dutra, L.M.; da Conceição Santos, A.D.; Lourenço, A.V.F.; Nagata, N.; Heiden, G.; Campos, F.R.; Barison, A. 1H HR-MAS NMR and chemometric methods for discrimination and classification of *Baccharis* (Asteraceae): A proposal for quality control of *Baccharis trimera*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *184*, 113200. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113200>.
29. Ali, S.; Rech, K.S.; Badshah, G.; Soares, F.L.F.; Barison, A. 1H HR-MAS NMR-Based Metabolomic Fingerprinting to Distinguish Morphological Similarities and Metabolic Profiles of *Maytenus ilicifolia*, a Brazilian Medicinal Plant. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 1707–1714. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01094>.
30. da Conceição Santos, A.D.; Fonseca, F.A.; Dutra, L.M.; de Fátima Costa Santos, M.; Menezes, L.R.A.; Campos, F.R.; Nagata, N.; Ayub, R.; Barison, A. 1H HR-MAS NMR-based metabolomics study of different persimmon cultivars (*Diospyros kaki*) during fruit development. *Food Chem.* **2018**, *239*, 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.133>.
31. Chauton, M.S.; Størseth, T.R.; Krane, J. High-resolution magic angle spinning NMR analysis of whole cells of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) and comparison with 13C-NMR and distortionless enhancement by polarization transfer 13C-NMR analysis of lipophilic extracts. *J. Phycol.* **2004**, *40*, 611–618. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03134.x>.
32. Couto, C.; Hernández, C.P.; Alves Sobrinho, R.C.M.; Mendes, C.R.B.; Roselet, F.; Abreu, P.C. Optimization of a low-cost fertilizer-based medium for large-scale cultivation of the coastal diatom *Conticribra weissflogii* using response surface methodology and its effects on biomass composition. *J. Appl. Phycol.* **2021**, *33*, 2767–2781. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02519-8>.
33. Kubelka, B.G.; Roselet, F.; Pinto, W.T.; Abreu, P.C. The action of small bubbles in increasing light exposure and production of the marine microalga *Nannochloropsis oceanica* in massive culture systems. *Algal Res.* **2018**, *35*, 569–576. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.030>.
34. Roselet, F.; Vandamme, D.; Roselet, M.; Muylaert, K.; Abreu, P.C. Effects of pH, Salinity, Biomass Concentration, and Algal Organic Matter on Flocculant Efficiency of Synthetic Versus Natural Polymers for Harvesting Microalgae Biomass. *Bioenergy Res.* **2017**, *10*, 427–437. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9806-3>.
35. Martínez-Bisbal, M.C.; Carbó Mestre, N.; Martínez-Máñez, R.; Bauzá, J.; Alcañiz Fillol, M. Microalgae degradation follow up by voltammetric electronic tongue, impedance spectroscopy and NMR spectroscopy. *Sens. Actuators B Chem.* **2019**, *281*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.069>.

36. Sathasivam, R.; Radhakrishnan, R.; Hashem, A.; Abd_Allah, E.F. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi J. Biol. Sci.* **2019**, *26*, 709–722. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>.
37. Zanella, L.; Vianello, F. Microalgae of the genus *Nannochloropsis*: Chemical composition and functional implications for human nutrition. *J. Funct. Foods* **2020**, *68*, 103919. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103919>.
38. Hughes, A.H.; Magot, F.; Tawfike, A.F.; Rad-Menéndez, C.; Thomas, N.; Young, L.C.; Stucchi, L.; Carettoni, D.; Stanley, M.S.; Edrada-Ebel, R.; et al. Exploring the chemical space of macro-and micro-algae using comparative metabolomics. *Microorganisms* **2021**, *9*, 311. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020311>.
39. Park, Y.H.; Han, S.-I.; Oh, B.; Kim, H.S.; Jeon, M.S.; Kim, S.; Choi, Y.-E. Microalgal secondary metabolite productions as a component of biorefinery: A review. *Bioresour. Technol.* **2022**, *344 Pt A*, 126206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126206>.
40. Abreu, A.C.; Molina-Miras, A.; Aguilera-Saéz, L.M.; López-Rosales, L.; Cerón-García, M.D.C.; Sánchez-Mirón, A.; Olmo-García, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; García-Camacho, F.; Molina-Grima, E.; et al. Production of Amphidinols and Other Bioproducts of Interest by the Marine Microalga *Amphidinium carterae* Unraveled by Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics Approach Coupled to Multivariate Data Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 9667–9682. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02821>.
41. Ma, N.L.; Aziz, A.; Teh, K.Y.; Lam, S.S.; Cha, T.S. Metabolites Re-programming and Physiological Changes Induced in *Scenedesmus regularis* under Nitrate Treatment. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9746. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27894-0>.
42. Azizan, A.; Bustamam, M.S.A.; Maulidiani, M.; Shaari, K.; Ismail, I.S.; Nagao, N.; Abas, F. Metabolite profiling of the microalgal diatom *chaetoceros calcitrans* and correlation with antioxidant and nitric oxide inhibitory Activities via ¹H NMR-Based Metabolomics. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 154. <https://doi.org/10.3390/md16050154>.
43. Crable, B.R.; Plugge, C.M.; McInerney, M.J.; Stams, A.J.M. Formate formation and formate conversion in biological fuels production. *Enzym. Res.* **2011**, *2011*, 532536. <https://doi.org/10.4061/2011/532536>.
44. Pietzke, M.; Meiser, J.; Vazquez, A. Formate metabolism in health and disease. *Mol. Metab.* **2020**, *33*, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.05.012>.
45. Eadsforth, T.C.; Gardiner, M.; Maluf, F.V.; McElroy, S.; James, D.; Frearson, J.; Gray, D.; Hunter, W.N. Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* N⁵,N¹⁰-methylene tetrahydrofolate dehydrogenase-cyclohydrolase as a potential antibacterial drug target. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035973>.
46. Ramos, D.F.; Bartolomeu Halicki, P.C.; da Silva Caniellas Caprara, C.; Borges, P.; da D'Oca, C.R.M.; de Santos, M.F.C.; D'Oca, M.G.M.; Roselet, F.; Almeida da Silva, P.E.; Abreu, P.C. Chemical Profile and Antimicrobial Activity of the Marine Diatom *Chaetoceros muelleri*. *Chem. Biodivers.* **2022**, *19*, e202100846. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100846>.
47. Sonnenschein, E.C.; Syit, D.A.; Grossart, H.P.; Ullrich, M.S. Chemotaxis of *Marinobacter adhaerens* and its impact on attachment to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 6900–6907. <https://doi.org/10.1128/AEM.01790-12>.
48. Li, L.; Wang, H.; Wang, S.; Xu, Y.; Liang, H.; Liu, H.; Sonnenschein, E.C. The Draft Genome of the Centric Diatom *Conticribra weissflogii* (Coscinodiscophyceae, Ochrophyta). *Protist* **2021**, *172*, 125845. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2021.125845>.
49. Stachura-Suchoples, K.; Williams, D.M. Description of *Conticribra tricircularis*, a new genus and species of Thalassiosirales, with a discussion on its relationship to other continuous cribra species of *Thalassiosira* Cleve (Bacillariophyta) and its freshwater origin. *Eur. J. Phycol.* **2009**, *44*, 477–486. <https://doi.org/10.1080/09670260903225431>.
50. Ribalet, F.; Intertaglia, L.; Lebaron, P.; Casotti, R. Differential effect of three polyunsaturated aldehydes on marine bacterial isolates. *Aquat. Toxicol.* **2008**, *86*, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.11.005>.
51. Rizzi, J.; Moro, T.R.; Winnischofer, S.M.B.; Colusse, G.A.; Tamiello, C.S.; Trombetta-Lima, M.; Noleto, G.R.; Dolga, A.M.; Duarte, M.E.R.; Nosedá, M.D. Chemical structure and biological activity of the (1 → 3)-linked β-D-glucan isolated from marine diatom *Conticribra weissflogii*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *224*, 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.147>.
52. Barrera-Alba, J.J.; Abreu, P.C.; Tenenbaum, D.R. Seasonal and inter-annual variability in phytoplankton over a 22-year period in a tropical coastal region in the southwestern Atlantic Ocean. *Cont. Shelf Res.* **2019**, *176*, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2019.02.011>.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Capítulo II

O manuscrito será adequado as sugestões da banca, formatado e traduzido para a língua inglesa, para ser submetido na revista Biofouling (Fatos de Impacto:3,797) .

Avaliação da biotividade de diferentes extratos da diatomácea *Conticribra weissflogii* frente a cepas de *Acinetobacter baumannii*

Carolina da Silva Canielles Caprara ¹, Marcelo G. M. D'Oca ², Caroline Da R. M. D'Oca ², Fabio Roselet ³, Paulo Cesar Abreu ^{3†} and Daniela Fernandes Ramos ^{1,*}

¹ Laboratório de Desenvolvimento de Novos Fármacos (LADEFA), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Rio Grande do Sul 96200-400, Brazil; carolina.caprara@anhanguera.com (C.S.C.C.); daniferamos@gmail.com (D.F.R.)

² NMR Laboratory, NMR Center, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81530-900, PR, Brazil; tatimathias2103@gmail.com (T.K.M.); mfc.srmn@gmail.com (M.F.C.S.); marcelodoca@ufpr.br (M.G.M.D.); carolinedoca@ufpr.br (C.R.M.D.)

³ Laboratório de Produção de Microalgas (LPM), Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (FURG) - Rio Grande, Rio Grande do Sul 96210-030, Brazil; fabio.roselet@furg.br (F.R.); docpca@furg.br (P.C.A.)

* Correspondence: daniferamos@gmail.com; Tel.: + 55 53 3237-4634; Núcleo de Desenvolvimento de Novos Fármacos - NUDEFA, Rua General Osório, s/nº, Campus Saúde, 2º andar. Rio Grande, Rio Grande do Sul - Brazil. CEP: 96.200-400;

INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii, um cocobacilo gram-negativo não fermentador, já foi considerado um patógeno de baixa patogenicidade e atualmente é reconhecido como um patógeno oportunista, responsável pelas principais causas de infecções hospitalares e adquiridas na comunidade (GOPAL et al. 2014; KRZYŚCIAK et al. 2017; PELEG et al. 2008)

A maioria das infecções por *A. baumannii* ocorre em pacientes em estado grave na unidade de terapia intensiva (UTI) representando até 35% das infecções em UTIs em todo o mundo (FOURNIER et al. 2006; LEE et al. 2017; SKARIYACHAN et al., 2019). A capacidade de formação de biofilme por *A. baumannii* é considerado um dos principais fatores de virulência (THUMMEEPK et al. 2016) e pode ocorrer em superfícies, dispositivos hospitalares, entrando em contato com pacientes suscetíveis e causando surtos de pneumonia associada à ventilação mecânica, meningite, bacteremia, infecções do trato urinário e epitelial. Conforme Halicki et al., essas infecções são de difícil tratamento e como resultado podemos ter o surgimento de cepas multirresistentes (MDR) (FOURNIER; RICHET, 2006; HALICKI et al. 2020; KYRIAKIDIS et al. 2021; LEE et al. 2017b)

De fato, a OMS identificou a resistência antimicrobiana como um dos três problemas mais importantes enfrentados pela saúde humana (HOWARD et al. 2012; TACCONELLI et al. 2018). Em 2017, foi divulgada pela OMS uma lista prioritária de patógenos que ameaçam a saúde humana e *A. baumannii* foi classificado como um dos principais patógenos críticos para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos o que o torna uma ameaça global em ambientes de saúde (LEE et al. 2017; TACCONELLI et al. 2018)

Os produtos naturais representam uma fonte de mais de um milhão de compostos químicos que serviram de protótipos para novos medicamentos. O ambiente marinho, que responde por aproximadamente metade da biodiversidade global, contém uma rica fonte de metabólitos estruturalmente diversos e biologicamente ativos (HABBU et al. 2016). Produtos de organismos marinhos apresentam diversas propriedades bioativas interessantes, como antimicrobiana, citotóxica, anticancerígena, antidiabética, antifúngica, anticoagulante, anti-inflamatória dentre outras atividades farmacológicas (CARVALHO; PEREIRA, 2014; GUL et al. 2005; HABBU et al. 2016; HAMIDI et al. 2016; KARAMAN et al. 2003; LAURITANO et al. 2018; MAYER; HAMANN, 2005; QI et al. 2016)

As microalgas são organismos autotróficos unicelulares que transformam dióxido de carbono, hidrogênio e nitrogênio em carboidratos, lipídios e proteínas (OLAIZOLA, 2003; SAVAGE, 2011). Elas são a base das cadeias alimentares aquáticas e colonizaram quase todos os ecossistemas, desde ambientes temperados até extremos, como ambientes frios/quentes, e fontes hidrotermais (MANSOUR et al. 2005). As microalgas estão adaptadas para viver em ambientes muito diferentes e apresentam uma enorme diversidade bioquímica e genética, representando assim uma excelente fonte de novos produtos naturais com possíveis aplicações em diversos setores biotecnológicos (OLAIZOLA, 2003; RABIEE et al. 2021).

Uma das potenciais vantagens do uso de microalgas como matéria-prima para diversos fins em biotecnologia incluem sua capacidade de sintetizar e acumular grandes quantidades de lipídeos (MANSOUR et al., 2005). Entre as diatomáceas de interesse biotecnológico podemos destacar a diatomácea *Conticribra weissflogii* (*Thalassiosira weissflogii*), uma espécie eurhialina que possui altas taxas de fixação de carbono, e eficiência fotossintética (BORGES et al., 2011, 2007; RADCHENKO; IL'YASH, 2006). *C. weissflogii* se sobressai por apresentar altas taxas de crescimento e alta capacidade de acúmulo de lipídeos (COUTO et al., 2021; GARCÍA et al., 2012). Esses lipídeos são compostos por uma grande porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados que são importantes para a dieta de outros organismos aquáticos e para a saúde humana, possuem assim grande potencial comercial, podendo ser incorporados em medicamentos, cosméticos e alimentos, (BOROWITZKA, 2013; COUTO et al. 2021; MANSOUR et al. 2005)

Portanto, tendo em vista a falta de alternativas terapêuticas no combate às cepas resistentes, e considerando a necessidade urgente de desenvolver novos compostos bioativos frente aos patógenos prioritários, este estudo visa contribuir para a identificação de novos compostos candidatos ao tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*.

METODOLOGIA

Cultivo da microalga

A cepa da microalga foi proveniente do Laboratório de Produção de Microalgas, do Instituto de Oceanografia (IO - FURG), e cadastrada com o código THAL WEIS-1. Basicamente, o cultivo foi realizado usando água salgada natural, bombeada a 200 m da Praia do Cassino, em frente à Estação Marinha de Aquacultura (EMA). Esta água é tratada, primeiro por filtração em filtro de areia e, depois, em filtro de cartucho de polipropileno com poro de 1 μm . Após filtração, a esterilização foi realizada com hipoclorito de sódio 12% (NaClO , $0,15 \text{ mL}^{-1}$) por 24h e neutralizada com ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, 30 mg. L^{-1}).

Os cultivos foram realizados em escala laboratorial e a microalga *Conticribra wessflogii* foi cultivada em meio f/2 composto por nitrato de sódio (NaNO_3 , 75 mg/L), fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 mg/L), metassilicato de sódio ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 30 mg/L), cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $3,5 \text{ mg/L}$), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0,0098 \text{ mg/L}$), sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,022 \text{ mg/L}$), cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0,01 \text{ mg/L}$), cloreto de manganês ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,18 \text{ mg/L}$), molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,0063 \text{ mg/L}$), EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $4,36 \text{ mg/L}$), Tiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$, $0,1 \text{ mg/L}$), biotina ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$, $0,0005 \text{ mg/L}$) e cianocobalamina ($\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$, $0,0005 \text{ mg/L}$). O pH do meio foi ajustado para 8. O cultivo foi realizado em carboys plásticos de 20 L, em laboratório com condições controladas, temperatura de 23°C , salinidade 28, com intensidade luminosa de $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoper\u00edodo de 12/12h e aera\u00e7\u00e3o constante. O cultivo foi monitorado diariamente, diretamente, por contagem celular (c\u00e9lulas/mL) em c\u00e2mara de Neubauer. Ou, indiretamente por medi\u00e7\u00e3o da densidade \u00f3tica no comprimento de onda de 750 nm em espectrofot\u00f4metro e, em seguida, convertida em densidade celular por regress\u00e3o linear. Ap\u00f3s 7 dias, no final da curva de crescimento ela foi coletada por centrifuga\u00e7\u00e3o. E, ap\u00f3s a concentra\u00e7\u00e3o a biomassa foi seca em estufa \u00e0 60°C .

Produ\u00e7\u00e3o dos extratos e determina\u00e7\u00e3o do rendimento

Os extratos foram preparados conforme AZIZAN et al. (2018) e BORGES et al. (2016). Resumidamente, cada biomassa (1g) foi dissolvida em 15 ml de cada solvente ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Et}$, C_6H_{14} , CH_3OH , CH_2Cl_2 , $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, CHCl_3) e ap\u00f3s,

colocados em banho de ultrassom (ElmaSonic®) por 20 minutos (40Hz), com intervalo de 20 minutos entre elas (2x) à temperatura ambiente. Após a extração, foram centrifugados por 2min a 3000 rpm e filtrados em papel de filtro (Whatman nº1), o solvente foi evaporado em rotaevaporador (R210 Buchi®) utilizando temperaturas entre 40 e 60°C. Por fim todos os resíduos de solvente foram evaporados por 24h usando um dessecador com sílica acoplado a uma bomba de vácuo. O rendimento foi determinado pelas diferenças de peso seco antes e depois do processo (expresso em %). Os extratos foram armazenados a -20°C até a realização dos ensaios posteriores. Para avaliar a atividade antimicrobiana, os extratos foram suspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção de concentrações entre 20 e 50 mg/mL e armazenados a 4°C.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)

Para realizar a análise de RMN ¹H de *C. weissflogii*, as amostras foram preparadas por dissolução de 10 mg de extratos secos em 500 µL de CDCl₃ (0.05% TMS) e transferidas para tubo de RMN de 5 mm. As análises de ¹H NMR foram realizadas no espectrômetro Bruker AVANCE 400 NMR, operando a 9,4 T, observando o núcleo ¹H a 400,13 MHz. A aquisição dos espectros foi realizada com sequência de pulso 30, 16 ou 64 zg varreduras dependendo da presença de baixa intensidade de sinal nas amostras, atraso de reciclagem de 1,0 s (D1), 64k pontos (TD) distribuídos em uma janela espectral de 8012,820 Hz, resultando em tempo de aquisição (AQ) de 4,09 a uma temperatura de 298 K.

Avaliação da Atividade Biológica

Seleção dos Isolados

Os 5 isolados de *A. baumannii* estudadas, com diferentes perfis de sensibilidade, foram provenientes do banco de cepas do Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), além disso, a cepa de referência *A. baumannii* ATCC 19606 também foi incluída nos experimentos. A identificação das cepas foi realizada previamente pela técnica de Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) através da amplificação do gene blaOXA-51-like, específico para *A. baumannii* conforme previamente descrito por Halicki *et al.* (2019).

Avaliação da atividade antimicrobiana

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos, foram utilizadas cepas de *A. baumannii*, conforme recomendado pelo CLSI (2015) onde foi definida a concentração mínima capaz de inibir o crescimento microbiano (CMI). Resumidamente, 50 µL dos extratos foram adicionados ao caldo Muller Hilton (Himedia) e diluições seriadas dos extratos foram realizadas para atingir as concentrações finais que variaram de 0,006 a 0,8 mg/mL. Em seguida, foram adicionados 50µL de um inóculo bacteriano preparado a partir de uma suspensão bacteriana preparada em solução de NaCl 0,85% e posteriormente

diluída em Muller Hilton, obtendo-se a concentração descrita em CLSI (2015) - 5×10^5 CFU/mL, por poço. A atividade antibacteriana foi determinada após incubação a 37° C por 24h usando resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona) como indicador de viabilidade celular. Meio sem suspensão bacteriana foi usado como controle negativo, como controle positivo foi usado meio com inóculo bacteriano e ceftazidima, ciprofloxacina e amicacina foram usadas como compostos de referência. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Como critério de eleição, foram selecionados os extratos bioativos para seguimento dos experimentos.

Avaliação de Sinergismo por método de microdiluição em caldo: Checkerboard

Para avaliar o efeito combinado do extrato com antimicrobianos foi utilizado o método de microdiluição em caldo utilizando resazurina como indicador de viabilidade celular, conforme Bellio (2021) com algumas modificações. Simplificadamente, foram realizadas combinações de diferentes concentrações dos extratos bioativos *versus* antibiótico, em microplacas de 96 poços, e, esta combinação foi exposta a um inóculo bacteriano previamente preparado em Muller Hinton (5×10^5 CFU/mL/poço), após 24 horas de incubação em aerobiose (37°C), foi definida a menor concentração necessária dos dois compostos testes (antibióticos, extrato bruto) em combinação para inibir o crescimento do microrganismo, sendo esta definida como a concentração fracional inibitória (*Fractional Inhibitory Concentration* - FIC).

Partindo destes resultados e da CMI de cada compostos isoladamente, foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (*Fractional Inhibitory Concentration Index* – FICI), cuja fórmula está descrita a seguir e permitiu a interpretação da ação combinada, segundo Odds (2003), classificando-a em quatro grupos: $FICI \leq 0.5$, indica sinergismo entre os compostos; $0.5 < FICI \leq 1$, indica efeito aditivo entre os compostos, $1 < FICI \leq 2$, indica indiferença entre os compostos e, $FICI > 2$, indica antagonismo entre os compostos avaliados (ODDS, 2003).

$FICI = FICA + FICB = FICI$, onde $FICA$ = CMI do composto A em combinação / CMI do composto A sozinho e $FICB$ = CMI do composto B em combinação / CMI do composto B sozinho.

Atividade anti-biofilme

A atividade anti-biofilme foi avaliada por ensaios de inibição e destruição de biofilme conforme Halicki, *et al.* (2019). Brevemente, para avaliar a interferência dos extratos na capacidade dos isolados formarem biofilmes bacterianos, cada isolado (1×10^6 CFU/mL) foi exposto a concentrações de extratos de *C. weissflogii* por 24 horas a 37°C e, após lavagens sucessivas (PBS 1x), fixação dos biofilmes formados (metanol 100%) e, finalmente, coloração dos

mesmos utilizando cristal-violeta (0,4%), e, logo após eluição dos biofilmes, em etanol 100% foi realizada a leitura da densidade ótica (620nm) utilizando Thermo Plate TPreader BioTek™ Elx800™. A partir dos resultados obtidos com as leituras, foi avaliada a capacidade de cada isolado formar biofilme (após a exposição ao tratamento com extratos) em relação ao seu controle, sendo estes resultados expressos em porcentagem. Por outro lado, para avaliação da capacidade dos extratos em causar destruição dos biofilmes pré-formados, inicialmente foi induzida a formação do biofilme bacteriano de cada isolado, onde uma suspensão contendo 1×10^6 CFU/mL foi preparada em meio Muller Hinton enriquecido com glicose 0,2% e distribuída em placas de poliestireno de 96 poços, a qual foi submetida a incubação por 24h a 37°C em aerobiose. Após o período de incubação, diferentes concentrações do extrato foram adicionadas e as placas incubadas nas mesmas condições por 24h. Finalmente, as placas foram lavadas, os biofilmes fixados, corados e eluídos, conforme já descrito e as densidades óticas obtidas. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Citotoxicidade e Determinação do Índice de seletividade

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em células aderidas da linhagem VERO, através de ensaios em placas de 96 poços (SNEWIN et al. 1999), utilizando resazurina como indicador de viabilidade celular.

Em uma microplaca de 96 poços, 200 µL de uma suspensão de células foram cultivados em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell Embriolife) e 1% de solução antibiótico + antifúngico (Sigma-Aldrich), e mantido por 24 horas a 37 ° C em uma atmosfera umidificada com 5% CO₂, em uma concentração de $3,4 \times 10^5$ células / mL (SNEWIN et al. 1999). Após esse período, as células aderidas foram expostas a uma série de diluições para cada extrato, em meio DMEM, nas concentrações finais de 0,8 a 0,006 mg/mL, e a placa foi novamente incubada durante a noite. Em seguida, 30 µl de resazurina 0,01% foram adicionados e depois a fluorescência foi medida a 620nm (Pavan et al. 2010). A porcentagem de inibição dos tratamentos foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $(100 - (\text{Densidade ótica de células expostas} / \text{Densidade ótica de células não expostas}) \times 100)$ bem como a determinação de IC₅₀ (concentração de um composto capaz de manter a viabilidade de 50% das células). Além disso, o índice de seletividade (IS) dos compostos foi também calculado com base nos resultados de CMI e IC₅₀, onde $IS = IC_{50}/CMI$. Quanto maior o IS, menos tóxico o composto é para a célula. Valores iguais ou superiores a 10 são considerados promissores no desenvolvimento de um novo fármaco (ORME, 2001; SNEWIN et al. 1999).

Avaliação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Foi realizada a determinação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS “*Reactive Oxygen Species*”) das amostras (extratos) conforme a metodologia proposta por Amado, *et al.* (2009). Resumidamente em uma placa de 96 poços pipetou-se 10 µL de cada solução de amostra diluída, em DMSO, de forma a obter as seguintes concentrações no teste: 0,4, 0,2 e 0,1 mg/mL, em quatro réplicas independentes. Os brancos foram preparados transferindo o mesmo volume de solvente utilizado para dissolver a amostra (DMSO), com e sem ABAP (2,2'- azobis-(2-metilpropanoamidina) e com e sem H₂DCF (diacetato de 2',7'-dicloro-hidro-fluoresceína). O tampão reação (127 µL), contendo 30 mM de HEPES (pH 7,2), 200 mM de KCl e 1 mM de MgCl₂ foi adicionado às amostras. Após, 7,5 µL de ABAP 10 mM foram adicionados a dois poços de cada amostra, enquanto o mesmo volume de água Milli-Q foi adicionado aos poços remanescentes. Imediatamente antes da leitura da placa foram adicionados 10 µL de H₂DCF.

O diacetato de 2',7'-dicloro-hidro-fluoresceína (H₂DCF-DA Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), foi previamente clivado através de hidrólise alcalina por 30 minutos, resultando no produto deacetilado H₂DCF. As microplacas foram lidas em um leitor de fluorescência programado para manter a temperatura em 37 °C a fim de induzir a termólise do ABAP. Após, o H₂DCF não fluorescente é oxidado pelos ROS ao composto fluorescente DCF, que é detectado nos comprimentos de onda 485 nm e 520 nm (excitação e emissão, respectivamente) por 60 minutos.

Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo a produção de fluorescência total calculada de acordo com as seguintes equações:

ABAP(%) = $(\Delta_{\text{Branco}} - \Delta_{\text{amostra}}) / \Delta_{\text{Branco}} \times 100$ onde,

Δ_{Branco} = NF branco com ABAP – NF branco sem ABAP e,

Δ_{Amostra} = NF amostra com ABAP – NF branco sem ABAP e,

NF (fluorescência líquida) = fluorescência com H₂DCF – fluorescência sem H₂DCF

Análise estatística

Os dados foram processados segundo valores médios e desvio padrão, utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, utilizados para análise estatística. Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos e as análises estatísticas foram contruídos utilizando o software GraphPad Prism 7.05.

RESULTADOS

Produção e Extração de microalgas

Após a produção dos extratos com diferentes solventes, foi obtido o rendimento de cada extrato conforme a Figura 1. Neste estudo, o extrato em metanol (CH_3OH) obteve o maior rendimento seguido pelos extratos em clorofórmio (CHCl_3), diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt) e acetona ($\text{CH}_3)_2\text{CO}$), o extrato em hexano apresentou o menor rendimento.

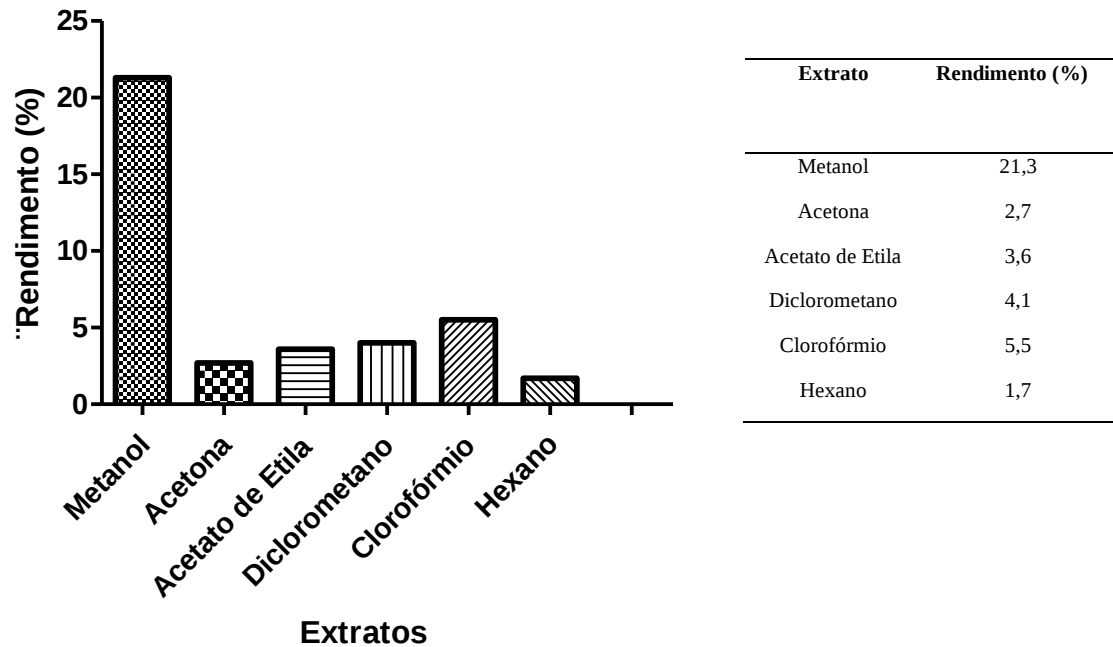


Figura 1. Rendimento de cada extrato de *C.wessflogii* preparados através de ultrasonicação, conforme metodologia proposta por Borges *et al.* (2016) (expresso em %).

Perfil dos metabólitos produzidos

A extração de metabólitos é uma etapa fundamental no fluxo de trabalho de um estudo metabolômico. Sendo fundamental a escolha dos solventes utilizados para a extração, pois o objetivo principal desta etapa é extrair o maior espectro possível de estruturas químicas dos metabólitos. O perfil dos compostos presentes nos diferentes extratos de *C.weissflogii*, utilizando diferentes solventes, foi posteriormente determinado por ^1H -RMN, conforme cromatogramas da Figura 2.

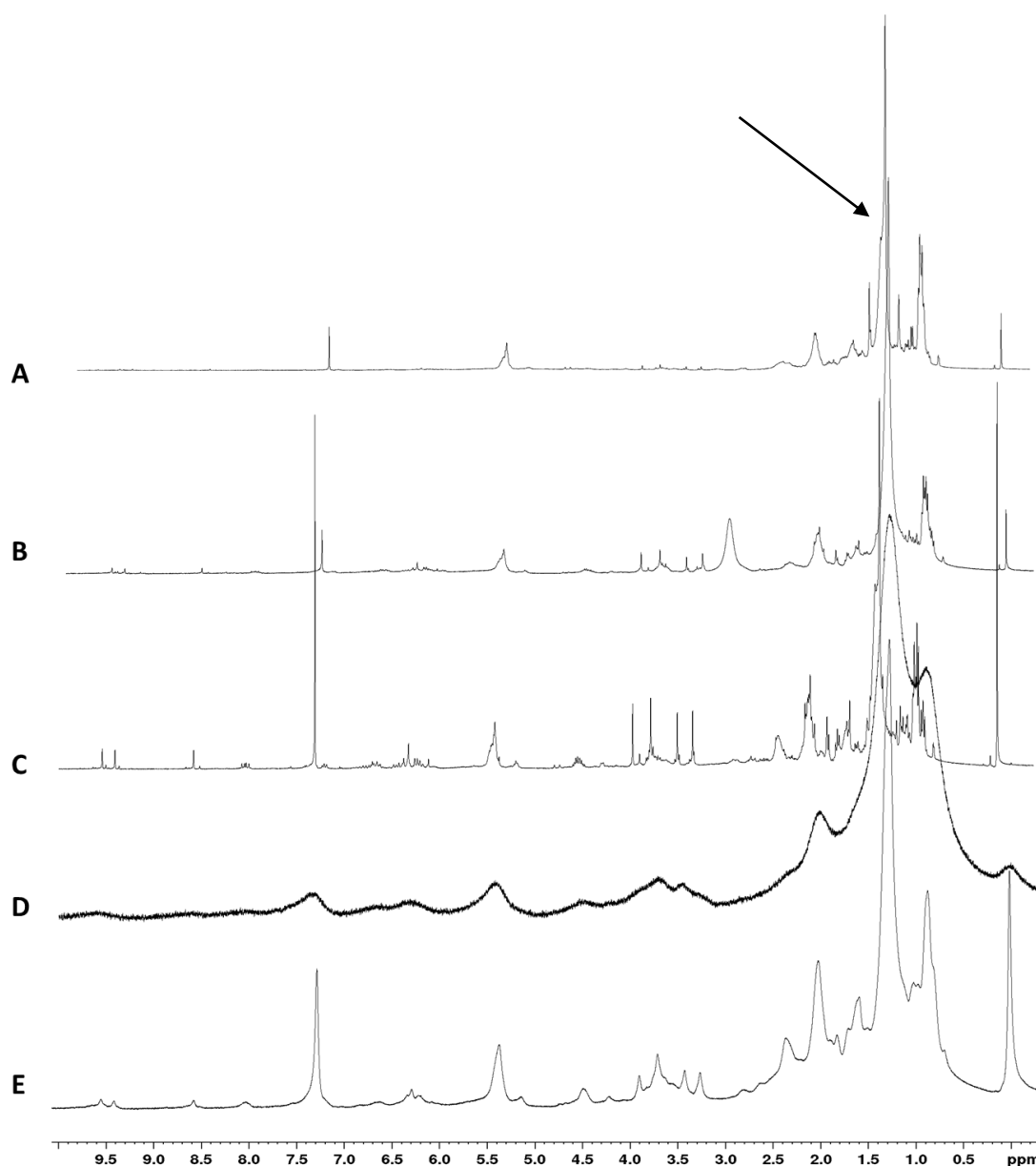


Figura 2. Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de extratos de *C. wessflogii*: (A) Hexano; (B) Clorofórmio; (C) Acetato de Etila; (D) Diclorometano; (E) Acetona.

De acordo com os espectros de ^1H RMN foi possível observar que os espectros apresentam um perfil semelhante. O extrato em hexano apresentou picos relativos a ácidos graxos (entre 0,9 e 2,3).

Avaliação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Existe um grande interesse nas microalgas por apresentarem potencial antioxidante, além disso, o dano oxidativo poderia estar relacionado ao alto teor lipídico da microalga, o que pode estar relacionado à peroxidação lipídica, que tem sido um importante fenômeno de inibição celular bacteriana (SANSONE;

BRUNET, 2019a). Desta forma, a capacidade antioxidante total de *C. weissflogii* foi avaliada pelo método proposto por Amado et al. (2009) e os resultados estão apresentados na figura 3.

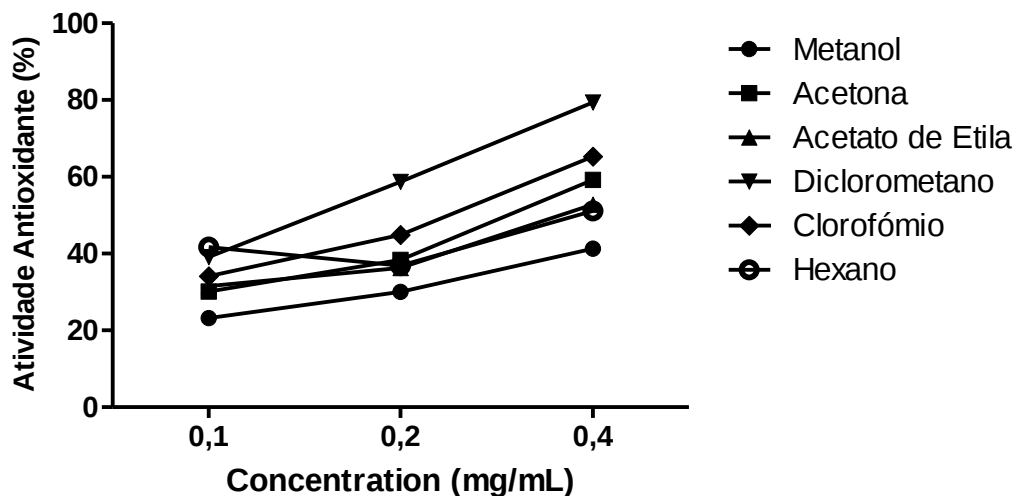


Figura 3. Potencial antioxidante dos extratos de *C. weissflogii* (expressos em %) usando o método proposto por Amado et al. (2009).

Os resultados encontrados sugerem que os extratos em hexano e em metanol foram os que apresentaram menor potencial antioxidante e que na concentração de 0,4mg/mL, o extrato em hexano foi capaz de neutralizar apenas 51% dos radicais peroxilas, gerados pela termodecomposição do reagente ABAP, responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio produzidas, em relação ao controle sem exposição ao extrato, enquanto extratos mais polares como o diclorometanico, por exemplo, neutralizaram até 79% dos radicais, evidenciando seu potencial antioxidante.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos produzidos pela microalga *C. weissflogii* frente a cepas de *A. baumannii* foi determinada através do método de microdiluição, de acordo com CLSI (2015), usando resazurina como indicador de viabilidade celular. A CMI foi considerada como a concentração mais baixa de um extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano conforme apresentado na tabela 1

Tabela 1. Atividade antimicrobiana, pela determinação da Concentração mínima inibitória – CMI, dos extratos de *C. weissflogii* frente a cepa padrão de *A. baumannii* ATCC 19606 através de ensaio de determinação da CMI (expressa em mg/mL). Extratos que não apresentaram atividades a 0,8 mg/mL foram considerados inativos.

1433

1434

Extrato	CMI frente a <i>A. baumannii</i>
Água	Inativo
Metanol	Inativo
Acetona	Inativo
Acetato de Etila	Inativo
Diclorometano	Inativo
Clorofórmio	Inativo
Hexano	0,4

1435

1436

1437

1438

1439

1440

1441

1442

1443

1444

1445

A Tabela 2 apresenta os resultados da CMI do extrato em hexano de *C. weissflogii* frente a cinco isolados clínicos e para a cepa padrão ATCC 19606, bem como o perfil de sensibilidade de cada isolado. Analisando os resultados, podemos observar que o extrato em hexano apresentou melhor atividade frente ao isolado clínico 1, com CMI de 0,2mg/mL, enquanto frente a cepa padrão e os isolados clínicos 2 e 5 apresentaram CMI de 0,4 mg/mL. Interessantemente, o isolado 5 que pode ser considerado multidroga resistente, uma vez que apresenta resistência a três classes de antibióticos testadas, foi sensível a atividade do extrato em hexano de *C. weissflogii*. Por outro lado, dois isolados (3 e 4) não foram susceptíveis a nenhuma das concentrações do extrato avaliada.

1446

1447

1448

Tabela 2. Concentração Mínima inibitória e perfil de sensibilidade dos isolados avaliados frente a três classes de antibióticos e ao extrato em hexano de *C. weissflogii* (mg/mL)

Isolado Clínico	Extrato hexânico	Amicacina	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Perfil de sensibilidade aos antibióticos
1	0,2	0,016	>0,032	>0,032	R
2	0,4	0,032	>0,032	>0,032	R
3	Inativo	0,032	>0,032	>0,032	R
4	Inativo	0,016	>0,032	0,008	R
5	0,4	0,064	>0,032	>0,032	MDR
ATCC	0,4	0,004	>0,032	0,0005	S

1449

1450

1451

1452

1453

1454

Pontos de corte dos antibióticos em relação a sensibilidade (S) e resistência (R): são considerados sensíveis isolados que expostos a amicacina apresentem CMI $\leq 0,016$ e resistentes, com CMI $\geq 0,064$; para ceftazidima: sensível com CMI $\leq 0,008$ e resistente com CMI $\geq 0,032$; e ciprofloxacina, sensível com CMI $\leq 0,001$ e resistente com CMI $\geq 0,004$. São considerados microrganismos multidroga resistentes (MDR) aqueles resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos testados.

1455

1456

Citotoxicidade e Determinação do Índice de seletividade

Foram avaliadas, as citotoxicidades dos extratos frente a células animais isoladas, sendo possível observar que a linhagem de fibroblastos manteve 50% da viabilidade quando exposto a diferentes concentrações dos diferentes extratos produzidos (entre 0,8 e 0,17 mg/mL), conforme apresentado na Tabela 3. O extrato que apresentou maior toxicidade (menor IC₅₀) foi o em acetona, o qual, também, não apresentou atividade frente *A. baumannii*.

Tabela 3. Concentração em que o extrato de *C. wessflogii* foi capaz de manter a viabilidade de 50% das células (IC₅₀) – fibroblastos (VERO) -, após 24 horas de incubação, expressas em mg/mL.

Extratos	IC ₅₀ frente a linhagem celular VERO
Metanol	>0,8
Acetona	0,17
Acetato de etila	>0,8
Diclorometano	0,66
Cloroformio	>0,8
Hexano	>0,8

A partir destes resultados foi avaliado o Índice de seletividade (IS), obtendo-se os resultados apresentados a seguir na tabela 4.

Tabela 4. Índice de seletividade (IS) calculado através da razão entre concentração inibitória de cada extrato de *C. weissflogii* obtida pelo ensaio de citotoxicidade (IC₅₀) em células VERO e frente a cepa padrão de *A. baumannii* (CMI) (IC₅₀/CMI). ND: Não determinado, pela inatividade do extrato frente a espécie *A. baumannii*.

Extratos de <i>Conticribra weissflogii</i>	IS (IC ₅₀ / CMI)
Metanol	ND
Acetona	ND
Acetato de Etila	ND
Diclorometano	ND
Cloroformio	ND
Hexano	>2

Considerando que todos os extratos foram inativos frente a cepa ATCC utilizada nesse estudo, foi possível avaliar o índice de seletividade apenas para

o extrato em hexano, o qual, parece estar dentro dos parâmetros aceitáveis como farmacologicamente seguros, segundo o proposto por (ORME, 2001).

Desta forma, os ensaios que se seguem foram realizados apenas com o extrato em hexano, garantindo a atividade antimicrobiana e mantendo a viabilidade celular, o que favorece seu uso tanto como potencial candidato a fármaco, para administração oral ou de uso tópico, para o tratamento das infecções causadas por *A. baumannii* mas também como biocida para o tratamento de superfícies hospitalares potencialmente contaminadas.

Avaliação de Sinergismo por método de microdiluição em caldo: checkerboard

Considerando a atividade antimicrobiana encontrada para isolados clínicos resistentes aos principais fármacos utilizados na terapia de infecções causadas por *A. baumannii*, decidiu-se avaliar sua interação com dois desses importantes fármacos utilizando a técnica de *checkerboard*. A tabela 5 apresenta os resultados, demonstrando que não houve associação sinérgica entre o extrato em hexano e amicacina ou ciprofloxacina, porém, concentrações consideravelmente menores de extrato (0,05mg/mL) mantem a atividade da ciprofloxacina frente a cepa padrão de *A. baumannii*, demonstrando a falta de antagonismo e, conseqüentemente, a possibilidade de utilizar o extrato em uma terapia combinada sem prejuízo para os fármacos já disponíveis para o tratamento.

Tabela 5. Concentração mínima inibitória (CMI) e do índice de concentração inibitória fractionada (FICI) do extrato em hexano de *Conticribra weissflogii* associado a ciprofloxacina e amicacina frente *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.

Composto	CMI (mg/mL)	CIP		AMI	
		CMI CW combinado/ CIP combinado (mg/mL)	FICI ^a (interação)	CMI CW combinado/ AMI combinado (mg/mL)	FICI ^a (interação)
CW hexano	0,4				
CIP	0,0005	0,05/0,0005	1,125(I)	0,4/0,004	2 (I)
AMI	0,004				

^a índice de concentração inibitória fractionada. FICI ≤ 0.5: sinergismo (S); 0.5 < FICI ≤ 4: indiferença (I); FICI >4: antagonismo. CW: Extrato hexano de *Conticribra weissflogii*; CIP: ciprofloxacina; AMI: amicacina; CMI: concentração mínima inibitória.

Atividade anti-biofilme

Considerando o potencial que *A. baumannii* tem em formar biofilmes microbianos, e que isso tem influenciado diretamente no seu *status* enquanto microrganismos resistentes, bem como, têm classificado essa bactéria como de difícil erradicação no ambiente hospitalar, esse estudo avaliou a atividade que o extrato em hexano poderia exercer na formação dessa estrutura polissacarídica, bem como, na destruição de estruturas pré-formadas, cujos resultados estão apresentados na Figura 4.

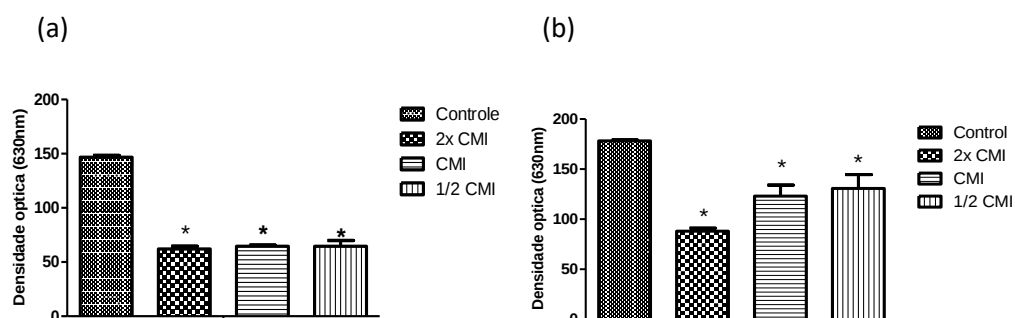


Figura 4. Resultados obtidos nos ensaios utilizando diferentes concentrações do extrato em hexano de *Conticribra weissflogii* na inibição da formação de biofilme (a) e na destruição de biofilmes pré-formados (b) de *Acinetobacter baumannii*. * representa os grupos com significância utilizando ANOVA de uma via com Bonferroni como pós-teste ($p < 0,05$), todos avaliados em relação ao controle.

Considerando que a cepa padrão de *A. baumannii* é forte produtora de biofilme, todas as concentrações avaliadas (0,2, 0,4 e 0,8 mg/mL) foram capazes de reduzir significativamente, em até 57%, a formação de biofilme após 24hs de exposição ($p < 0,0001$). Somado a isso, as mesmas concentrações foram capazes de destruir o biofilme bacteriano em até 50% ($p < 0,0008$), quando comparado ao controle sem exposição.

DISCUSSÃO

Nesse estudo, foi avaliado pela primeira vez a atividade antimicrobiana de extratos da microalga *Conticribra weissflogii* frente *Acinetobacter baumannii*. Desta forma, diferentes extratos foram produzidos a fim de avaliar diversos metabólitos de diferentes polaridades em relação a atividade anti-*Acinetobacter*, obtendo-se atividade antimicrobiana apenas no extrato mais apolar avaliado (extrato em hexano), o qual foi também o que apresentou menor rendimento durante o preparo.

Além disso, os isolados utilizados no estudo eram resistentes a duas ou mais classes de antimicrobianos e, mesmo assim, o extrato em hexano

apresentou atividade a três destes e a uma cepa padrão ATCC, com concentrações que variaram de 0,4 a 0,2mg/mL. Além disso, o extrato em hexano apresentou valor de IC₅₀ superior a 0,8mg/ml quando testado com células VERO, demonstrando que estes constituintes contribuem para a atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e com baixa toxicidade em células isoladas.

O índice de seletividade (IS) de novos compostos reflete a segurança farmacológica destes, para dar continuidade as próximas etapas de desenvolvimento de um novo fármaco, sendo que valores iguais ou superiores a 10 são considerados promissores. Mesmo obtendo-se um IS superior a 2 para o extrato em hexano, uma vez que não foi possível determinar especificamente o IC₅₀. Portanto, acreditamos que futuros experimentos, aumentando as concentrações avaliadas e isolando o(s) princípio(s) ativo(s), poderão favorecer a estimativa deste índice, uma vez que bioatividades de extratos brutos tendem a ser o conjunto sinérgico ou antagônico de diferentes substâncias que ao serem isoladas poderão ter sua atividade potencializada ou reduzida (BELLIO et al. 2021).

A diatomácea *C. weissfloggi* já havia sido caracterizada anteriormente por nosso grupo, através de ensaios com ¹H HR-MAS- NMR, demonstrando um perfil constituído por ácidos graxos mono e poliinsaturados (CAPRARA et al. 2023), podendo eles serem os responsáveis por conferir a atividade antibacteriana do extrato, uma vez que os compostos lipídicos também foram evidenciados em nosso estudo, através das análises de ¹H-RMN do extrato em hexano.

Estudos anteriores, tem evidenciado que ácidos graxos de cadeia curta tem apresentado espectro de atividade associado a Gram negativas, e que ésteres de sacarose, bem como a isomeria e insaturação poderiam aumentar a atividade frente a esses microrganismos (MCGAW et al. 2002; RAMOS et al. 2022), mesmo assim, mais estudos, são necessários afim de elucidar os mecanismos pelos quais esses ácidos graxos atuam frente a esses patógenos, uma vez que tem sido evidenciado que isoladamente esses ácidos graxos parecem perder a atividade que apresentavam quando estavam presentes como componentes majoritários de extratos de plantas e organismos marinhos (ALVES et al. 2020)

Diferentes autores têm proposto que a combinação de diversos compostos fitoquímicos e extratos de produtos naturais contendo alta concentração de lipídeos, podem não só atuar em sinergismos com antibióticos, como reduzir significativamente os valores das concentrações mínimas inibitórias dos mesmos, provavelmente, pelo aumento da permeabilidade aos antimicrobianos promovida pela sua interação com os ácidos graxos (DESBOIS et al., 2008; DESBOIS; LAWLOR, 2013; FINDLAY et al. 1984).

O potencial antioxidante já amplamente descrito entre as microalgas (SANSONE; BRUNET, 2019), foi avaliado, estabelecendo uma relação de dose-dependência para estabelecimento do fenômeno. Além disso, os resultados demonstram que quanto maior a polaridade do extrato menor o potencial antioxidante deles. Cabe destacar que o extrato em hexano apresentou características mais pró-oxidantes podendo ser esse um dos mecanismos relacionados a atividade antibacteriana do extrato (DESBOIS et al. 2008; MCGAW et al. 2002).

A formação de biofilmes pode ser fonte de infecções nosocomiais e se tornar um impedimento para o tratamento de várias doenças. Sendo o desenvolvimento de substâncias que apresentem não somente propriedade antimicrobianas, mas que também atuem contra biofilmes de suma importância. Em nosso estudo foi avaliada o potencial de inibição e destruição de biofilme. O extrato em hexano foi capaz de inibir e destruir a formação de biofilme de *A. baumannii*. Estudos têm proposto que ácidos graxos como os ésteres de sacarose podem atuar como surfactantes não iônicos, o que poderia ter colaborado para a excelente atividade anti-biofilme encontrada em nosso estudo (CASILLAS-VARGAS et al. 2021; YOON et al. 2015; ZANG et al. 2021)

Nicol et al. (2018) avaliaram lipídeos potenciais inibidores do mecanismo de regulação da expressão gênica em resposta a densidade populacional no *quórum sensing* em *A. baumannii*, demonstrando um potencial inibidor da formação de biofilme de 38% e 24%, para cada ácido graxo respectivamente, além de reduzir drasticamente a motilidade do microrganismo, mesmo sem interferir diretamente no crescimento microbiano quando as células estavam suspensas (NICOL et al. 2018)

Outra questão bastante importante, relacionada diretamente ao aumento de morbi-mortalidade das infecções causadas por *A. baumannii* é sua capacidade de emergir como um patógeno resistente a diversos antibióticos, porém, um estudo recente (NICOL et al., 2018) destacou que os ácidos graxos exógenos parecem atuar reduzindo as taxas de desenvolvimento de resistência em *A. baumannii*, corroborando com o papel dos extratos apolares, ricos em ácidos graxos com potencial frente a patógenos hospitalares, e atuando em diversos mecanismos relacionados a sua manutenção como prioritários e críticos pela organização mundial da saúde (GOPAL et al. 2014; KRZYŚCIAK et al. 2017; PELEG et al. 2008)

Finalmente considerando o potencial patogênico de *A. baumannii* sendo a produção de biofilme um dos principais mecanismos de resistência especialmente em infecções nosocomiais, o uso desses compostos, para a inibição da produção de biofilme ou destruição dele, como um potencial candidato a fármaco ou agente biocida poderia favorecer a redução de casos graves. Além disso, são escassos os estudos que avaliam e validam novos compostos biocidas que possam contribuir para a eliminação destes

microrganismos em superfícies abióticas tais como respiradores, cateteres e outros.

Sendo assim, considerando que as microalgas são excelentes produtoras de lipídeos e com os resultados obtidos em nosso estudo, consideramos que a diatomácea *C.weisfloggii* pode ser considerada como uma possível fonte promissora para o desenvolvimento de alternativas, principalmente no combate a essas estruturas dos biofilmes.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. et al. **Antimicrobial lipids from plants and marine organisms: An overview of the current state-of-the-art and future prospects. Antibiotics** MDPI AG, , 1 ago. 2020.
- AMIGUET, V. T. et al. Antibacterial properties of a glycolipid-rich extract and active principle from Nunavik collections of the macroalgae *Fucus evanescens* C. Agardh (Fucaceae). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 745–749, set. 2011.
- ARAUJO, G. S. et al. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5248–5250, 2011.
- ARRIADA, A. A.; ABREU, P. C. **NANNOCHLOROPSIS OCULATA GROWTH IN PRODUCED WATER: AN ALTERNATIVE FOR MASSIVE MICROALGAE BIOMASS PRODUCTION. Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, 2014.
- AZIZAN, A. et al. Metabolite profiling of the microalgal diatom *Chaetoceros calcitrans* and correlation with antioxidant and nitric oxide inhibitory Activities via ¹H NMR-Based Metabolomics. **Marine Drugs**, 2018.
- BELLIO, P. et al. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. **MethodsX**, v. 8, 1 jan. 2021.
- BENOIST, L. et al. In-Depth in silico search for cuttlefish (*Sepia officinalis*) antimicrobial peptides following bacterial challenge of haemocytes. **Marine Drugs**, v. 18, n. 9, 2020.
- BERDI, J. J. 58(1): 1–26, 2005. **Journal of Antibiotics. Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2005.
- BERGMANN, W.; FEENEYZ, R. J. Communications to the Editor The Isolation of a New Thymine Pentoside from Sponges. **72**, n. 1, p. 2809–2810, 1950.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 148–165, 1996.
- BHOWMICK, S. et al. Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. **Biotechnology Advances**, v. 43, n. November 2019, 2020.
- BORGES, L. et al. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 10, p. 4449–4454, 2011.
- BORGES, L. et al. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. **Aquaculture Reports**, 2016.
- BORGES, L. DO V. et al. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de

um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. **Atlântica (Rio Grande)**, v. 29, n. 1, p. 35–46, 2007.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743–756, 2013.

BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp., *Acinetobacter haemolyticus* sp., *Acinetobacter johnsonii* sp., and *Acinetobacter junii* sp. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 228–240, 1986.

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. DE O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 2, p. 339–347, 2010.

CAPRARA, C. DA S. C. et al. Application of 1H HR-MAS NMR-Based Metabolite Fingerprinting of Marine Microalgae. **Metabolites**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2023.

CARVALHO, L. G.; PEREIRA, L. Review of marine algae as source of bioactive metabolites: A marine biotechnology approach. **Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology**, n. April, p. 195–227, 2014.

CASILLAS-VARGAS, G. et al. **Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents**. **Progress in Lipid Research** Elsevier Ltd, , 1 abr. 2021.

CHEN, H. et al. Microalgal biofuel revisited: An informatics-based analysis of developments to date and future prospects. **Applied Energy**, v. 155, p. 585–598, 2015.

COUTO, C. et al. Optimization of a low-cost fertilizer-based medium for large-scale cultivation of the coastal diatom *Conticribra weissflogii* using response surface methodology and its effects on biomass composition. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 5, p. 2767–2781, 1 out. 2021.

DA ROSA, M. D. H. et al. **Macroalgae and Microalgae Biomass as Feedstock for Products Applied to Bioenergy and Food Industry: A Brief Review**. **Energies** MDPI, 1 fev. 2023.

DE FREITAS COÊLHO, D. et al. Microalgae: Cultivation aspects and bioactive compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

DE JESUS RAPOSO, M. F.; DE MORAIS, R. M. S. C.; DE MORAIS, A. M. M. B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life Sciences**, v. 93, n. 15, p. 479–486, 2013.

DE MOURA, R. R. et al. Microwave-Assisted Extraction of Lipids from Wet Microalgae Paste: A Quick and Efficient Method. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2018.

DERNER, R. B. Efeito de fontes de Carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. p. 158, 2006.

DESBOIS, A. P. et al. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 755–764, dez. 2008.

DESBOIS, A. P.; LAWLOR, K. C. Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. **Marine Drugs**, v. 11, n. 11, p. 4544–4557, 2013.

DESRIAC, F. et al. Alterins Produced by Oyster-Associated *Pseudoalteromonas* Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. **Marine Drugs**, v. 18, n. 12, 1 dez. 2020.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. **A Historical overview of natural products in drug discovery**. **Metabolites**, 2012.

FALLAH, K. N. **The Effects of Combination Antibiotic Therapy on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus***. [s.l: s.n.].

FENICAL, DR. C. C. H. AND PROF. W. Antibacterials from the Sea. **Bone**, v. 23, n. 1, 2010.

FINDLAY, J. A.; PATIL, A. D. **ANTIBACTERIAL CONSTITUENTS OF THE DIATOM NAVICULA DELOGNEI** *Journal of Natural Products Val.* [s.l: s.n.].

FOURNIER, P. E.; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 5, p. 692–699, 2006.

FOURNIER, P. E.; RICHET, H. **The Epidemiology and Control of *Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities** Downloaded from *Clinical Infectious Diseases*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/>>.

GARCÍA, N. et al. Efecto de la salinidad en el crecimiento y composición química de la diatomea *Thalassiosira weissflogii* en tres fases de cultivo. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 40, n. 2, p. 435–440, 2012.

GARCÍA-DAVIS, S. et al. Antimycobacterial activity of laurinterol and aplysin from *Laurencia johnstonii*. **Marine Drugs**, v. 18, n. 6, 1 jun. 2020.

GOMES, A. M. et al. Antitumor properties of a new non-anticoagulant heparin analog from the mollusk *Nodipecten nodosus*: Effect on P-selectin, heparanase, metastasis and cellular recruitment. **Glycobiology**, v. 25, n. 4, p. 386–393, 2015.

1770 GONÇALVES-ARAUJO, R. et al. Brazil-Malvinas confluence: Effects of
1771 environmental variability on phytoplankton community structure. **Journal of**
1772 **Plankton Research**, v. 34, n. 5, p. 399–415, 2012.

1773 GOPAL, R. et al. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric
1774 peptides against multidrug-resistant *acinetobacter baumannii* strains.
1775 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1622–1629, mar.
1776 2014.

1777 GUARNIERI, M. C. et al. Zoanthid mucus as new source of useful biologically
1778 active proteins. **Toxicon**, v. 143, p. 96–107, 2018.

1779 GUL, W.; HAMANN, M. T. Indole alkaloid marine natural products: An established
1780 source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic,
1781 neurological and other diseases. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 442–453, 2005.

1782 HABBU, P. et al. **Antimicrobial metabolites from marine microorganisms.**
1783 **Chinese Journal of Natural Medicines**, 2016.

1784 HALICKI, P. C. B. et al. Antibiofilm Potential of Arenecarbaldehyde 2-
1785 Pyridinylhydrazone Derivatives Against *Acinetobacter baumannii*. **Microbial**
1786 **Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2019.

1787 HALICKI, P. C. B. et al. Antibiofilm Potential of Arenecarbaldehyde 2-
1788 Pyridinylhydrazone Derivatives against *Acinetobacter baumannii*. **Microbial**
1789 **Drug Resistance**, v. 26, n. 12, p. 1429–1436, 1 dez. 2020.

1790 HAMIDI, M. et al. Recent Patents and Discovery of Anti-inflammatory Agents from
1791 Marine Source. **Marine Drugs**, v. 14, n. 1, p. 1–20, 2016.

1792 HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the
1793 mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews**
1794 **Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91–102, 2018.

1795 HARUN, R. et al. **Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety**
1796 **of consumer products. Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2010.

1797 HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial
1798 resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176–187, 2016.

1799 HOWARD, A. et al. *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic
1800 pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 5, 2012.

1801 ISHIDA, Y. et al. A highly CO₂-tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1,
1802 enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. **Fisheries Science**, v.
1803 66, n. 4, p. 655–659, 2000.

1804 KANASE, H. R.; SINGH, K. N. M. Marine pharmacology: Potential, challenges,
1805 and future in India. **Journal of Medical Sciences (Taiwan)**, v. 38, n. 2, p. 49–
1806 53, 2018.

- KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2–3, p. 231–235, 2003.
- KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. **Marine Drugs**, v. 2, n. 2, p. 73–82, 2004.
- KLEIN BRETELER, W. C. M.; SCHOGT, N.; RAMPEN, S. Effect of diatom nutrient limitation on copepod development: Role of essential lipids. **Marine Ecology Progress Series**, v. 291, p. 125–133, 2005.
- KOZLOWSKI, E. O.; PAVAO, M. S. G.; BORSIG, L. Ascidian dermatan sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, n. 9, p. 1807–1815, 2011.
- KRZYŚCIAK, P. et al. *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility. **Apmis**, v. 125, n. 11, p. 1017–1026, 2017.
- KURIHARA, M. N. L. et al. **Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: a global problem in healthcare settings**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* NLM (Medline), 2020.
- KYRIAKIDIS, I. et al. ***Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms**. *Pathogens* MDPI AG, 1 mar. 2021.
- LABARCA, J. A. et al. **Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America**. *Critical Reviews in Microbiology* Taylor and Francis Ltd, 3 mar. 2016.
- LAURITANO, C. et al. First identification of marine diatoms with anti-tuberculosis activity. **Scientific Reports**, 2018.
- LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. MAR, 2017.
- LESSEL, E. F. International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria: Minutes of the Meeting, 11 August 1970. Room Constitution C, Maria-Isabel Hotel, Mexico City, Mexico. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, n. 2, p. 213–214, 1971.
- LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 48–56, 2007.
- LIN, M. F. et al. Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii* adeAB genes and its correlation with tigecycline susceptibility. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.
- MACHADO, A. A. DE S. et al. Effects of zinc on in vivo fluorescence, chlorophyll a and growth of the diatom *Conticribra weissflogii* (*Thalassiosirales*,

1846 *Thalassiosiraceae*). **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 9, n. 4, p.
1847 278–287, 2014.

1848 MALVIYA, S. et al. Insights into global diatom distribution and diversity in the
1849 world's ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**
1850 **United States of America**, v. 113, n. 11, p. E1516–E1525, 15 mar. 2016.

1851 MANSOUR, M. P. et al. Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase
1852 microalgae: Applications and unusual C24-C28 polyunsaturated fatty acids.
1853 **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 4, p. 287–300, 2005.

1854 MARELLA, T. K.; TIWARI, A. Marine diatom *Thalassiosira weissflogii* based
1855 biorefinery for co-production of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin.
1856 **Bioresource Technology**, v. 307, 1 jul. 2020.

1857 MARQUES, J. et al. Marine organism sulfated polysaccharides exhibiting
1858 significant antimalarial activity and inhibition of red blood cell invasion by
1859 Plasmodium. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–14, 2016.

1860 MARSTON, H. D. et al. Antimicrobial resistance. **JAMA - Journal of the**
1861 **American Medical Association**, v. 316, n. 11, p. 1193–1204, 2016.

1862 MARTIN-JÉZÉQUEL, V.; HILDEBRAND, M.; BRZEZINSKI, M. A. Avance-
1863 Jocelinedavila. **Journal Phycology**, v. 36, n. May, p. 821–840, 2000.

1864 MARTINS, A. et al. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and
1865 cosmeceutical industries: Tips for success. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1066–
1866 1101, 2014.

1867 MARTINS, R. M. et al. Macroalgae extracts from Antarctica have antimicrobial
1868 and anticancer potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, 8 mar. 2018.

1869 MAYER, A. M. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001-2002: Marine
1870 compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic,
1871 antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal,
1872 antituberculosis, and antiviral activities; Affecting the cardiovas. **Comparative**
1873 **Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 140, n.
1874 3–4, p. 265–286, 2005.

1875 MCCONNELL, M. J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: Human
1876 infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS**
1877 **Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 130–155, 2013.

1878 MCGAW, L. J.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. **Antibacterial effects of fatty**
1879 **acids and related compounds from plants. South African Journal of Botany**
1880 **National Research Foundation**.2002.

1881 MIETHKE, M. et al. **Towards the sustainable discovery and development of**
1882 **new antibiotics. Nature Reviews Chemistry** Nature Research, 1 out. 2021.

1883 MOURÃO, P. A. S. Perspective on the use of sulfated polysaccharides from
1884 marine organisms as a source of new antithrombotic drugs. **Marine Drugs**, v. 13,
1885 n. 5, p. 2770–2784, 2015.

1886 MULANI, M. S. et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the
1887 era of antimicrobial resistance: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n.
1888 APR, 2019.

1889 MULVEY, M. R.; SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: How
1890 concerned should we be? **Cmaj**, v. 180, n. 4, p. 408–415, 2009.

1891 NEMEC, A. et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter*
1892 *calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of
1893 *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter genomic* species 3) and
1894 *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter genomic* species
1895 13TU). **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 393–404, 2011.

1896 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs**
1897 **from 1981 to 2014**. **Journal of Natural Products**, 2016.

1898 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over
1899 the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural**
1900 **Products**, v. 83, p. 770–803, 2020.

1901 NICOL, M. et al. Unsaturated fatty acids affect quorum sensing communication
1902 system and inhibit motility and biofilm formation of *Acinetobacter baumannii*.
1903 **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 10 jan. 2018.

1904 NOCERA, F. P.; ATTILI, A. R.; DE MARTINO, L. ***Acinetobacter baumannii*: Its**
1905 **clinical significance in human and veterinary medicine**. **PathogensMDPI**
1906 **AG**, 1 fev. 2021.

1907 ODDS, F. C. **Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts**
1908 **between them**. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** Oxford University
1909 **Press**, 1 jul. 2003.

1910 OHSE, S. et al. Crescimento de microalgas em sistema autotrófi co estacionário
1911 **Resumo Introdução**. **Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 7–18, 2008.

1912 OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: From the
1913 test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 459–
1914 466, 2003.

1915 ORME, I. **Search for new drugs for treatment of tuberculosis**. **Antimicrobial**
1916 **Agents and Chemotherapy**, 2001.

1917 PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*:
1918 Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n.
1919 3, p. 538–582, 2008.

1920 PENDLETON, J. N.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Clinical relevance of the
1921 ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 3, p.
1922 297–308, 2013.

1923 PEREZ, F. et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.
1924 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3471–3484, 2007.

1925 POWERS, J. H. Antimicrobial drug development - The past, the present, and the
 1926 future. **Clinical Microbiology and Infection, Supplement**, v. 10, n. 4, p. 23–31,
 1927 2004.

1928 PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae.
 1929 **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

1930 QI, L. et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and
 1931 biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in**
 1932 **Microbiology**, v. 7, n. APR, 12 abr. 2016.

1933 RABIEE, N. et al. **Diatoms with invaluable applications in nanotechnology,**
 1934 **biotechnology, and biomedicine: Recent advances.** **ACS Biomaterials**
 1935 **Science and Engineering**American Chemical Society, 12 jul. 2021.

1936 RADCHENKO, I. G.; IL'YASH, L. V. Growth and photosynthetic activity of diatom
 1937 *Thalassiosira weissflogii* at decreasing salinity. **Biology Bulletin**, v. 33, n. 3, p.
 1938 242–247, 2006.

1939 RAMOS, D. F. et al. Chemical Profile and Antimicrobial Activity of the Marine
 1940 Diatom *Chaetoceros muelleri*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 19, n. 5, 1 maio
 1941 2022.

1942 RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial
 1943 pathogens: No ESKAPE. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079–
 1944 1081, 2008.

1945 ROTTER, A. et al. **The Essentials of Marine Biotechnology.** **Frontiers in**
 1946 **Marine Science**Frontiers Media S.A., 16 mar. 2021.

1947 RUA, C. P. J. et al. Diversity and antimicrobial potential of culturable heterotrophic
 1948 bacteria associated with the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*.
 1949 **PeerJ**, v. 2014, n. 1, p. 1–14, 2014.

1950 SABDANINGSIH, A. et al. A new citrinin derivative from the Indonesian Marine
 1951 Sponge-Associated Fungus *Penicillium citrinum*. **Marine Drugs**, v. 18, n. 4, 1 abr.
 1952 2020.

1953 SANSONE, C.; BRUNET, C. Promises and challenges of microalgal antioxidant
 1954 production. **Antioxidants**, v. 8, n. 7, 2019.

1955 SANTHOSH, S.; DHANDAPANI, R.; HEMALATHA, N. Bioactive compounds
 1956 from Microalgae and its different applications- a review. **Advances in Applied**
 1957 **Science Research**, v. 7, n. 4, p. 153–158, 2016.

1958 SAVAGE, N. The scum solution. **Nature**, p. 5–6, 2011.

1959 SCHINKE, C. et al. Antibacterial Compounds from Marine Bacteria, 2010-2015.
 1960 **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 4, p. 1215–1228, 2017.

1961 SCOPEL, M. et al. Dipeptide cis-cyclo(Leucyl-Tyrosyl) produced by sponge
 1962 associated *Penicillium* sp. F37 inhibits biofilm formation of the pathogenic

- 1963 Staphylococcus epidermidis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.
1964 23, n. 3, p. 624–626, 2013.
- 1965 SHARMA, N.; SHARMA, P. JOURNAL OF ADVANCES IN PLANT BIOLOGY
1966 Review Industrial and Biotechnological Applications of Algae: A Review. n. 1,
1967 2017.
- 1968 SHIN, B.; PARK, W. Antibiotic resistance of pathogenic *Acinetobacter* species
1969 and emerging combination therapy. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 11, p.
1970 837–849, 2017.
- 1971 SIRIJAN SANTAJIT; NITAYA INDRAWATTANA. Mechanisms of antimicrobial
1972 resistance in Pasteurellaceae. **PBioMed Research International**, v. 2016, n.
1973 1155, p. 1–8, 2016.
- 1974 SKARIYACHAN, S. et al. **Recent perspectives on the virulent factors and**
1975 **treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Critical**
1976 **Reviews in Microbiology** Taylor and Francis Ltd, , 2019.
- 1977 SKROPETA, D.; WEI, L. Recent advances in deep-sea natural products. **Natural**
1978 **Product Reports**, v. 31, n. 8, p. 999–1025, 2014.
- 1979 SNEWIN, V. A. et al. Assessment of immunity to mycobacterial infection with
1980 luciferase reporter constructs. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4586–
1981 4593, 1999.
- 1982 SOTO, S. M. **The Sea as a Source of Antibiotics**. [s.l.: s.n.]. v. 04
- 1983 STACHURA-SUCHOPLES, K.; WILLIAMS, D. M. Description of *Conticribra*
1984 *tricircularis*, a new genus and species of *Thalassiosirales*, with a discussion on
1985 its relationship to other continuous *cribra* species of *Thalassiosira* Cleve
1986 (*Bacillariophyta*) and its freshwater origin. **European Journal of Phycology**, v.
1987 44, n. 4, p. 477–486, 2009.
- 1988 TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics:
1989 the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet**
1990 **Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 1 mar. 2018.
- 1991 THOMPSON, F. et al. Marine Biotechnology in Brazil: Recent Developments and
1992 Its Potential for Innovation. **Frontiers in Marine Science**, 2018.
- 1993 THUMMEEPK, R. et al. Distribution of virulence genes involved in biofilm
1994 formation in multi-drug resistant *acinetobacter Baumannii* clinical isolates.
1995 **International Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 121–129, 2016.
- 1996 TOVAR, A. M. F. et al. Structural and haemostatic features of pharmaceutical
1997 heparins from different animal sources: Challenges to define thresholds
1998 separating distinct drugs. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–12, 2016.
- 1999 VELLA, F. M. et al. Annual outdoor cultivation of the diatom *Thalassiosira*
2000 *weissflogii*: productivity, limits and perspectives. **Algal Research**, v. 42, n. May,
2001 p. 101553, 2019.

2002 VESTERGAARD, M. et al. Antibiotic combination therapy can select for broad-
2003 spectrum multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **International**
2004 **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 1, p. 48–55, 2016.

2005 VIRGINIA ARMBRUST, E. et al. **The Genome of the Diatom *Thalassiosira***
2006 ***Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism**. [s.l: s.n.]. Disponível em:
2007 <<http://science.sciencemag.org/>>.

2008 WATKINS, R. R.; BONOMO, R. A. **Overview: The Ongoing Threat of**
2009 **Antimicrobial Resistance**. **Infectious Disease Clinics of North America** W.B.
2010 Saunders,, 1 dez. 2020.

2011 WIJFFELS, R. H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology.
2012 **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 26–31, 2008.

2013 WONG, D. et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter*
2014 infections: A century of challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1,
2015 p. 409–447, 2017.

2016 YOON, B. K. et al. Spectrum of Membrane Morphological Responses to
2017 Antibacterial Fatty Acids and Related Surfactants. **Langmuir**, v. 31, n. 37, p.
2018 10223–10232, 22 set. 2015.

2019 ZANG, M. et al. The Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Evolution of
2020 *Acinetobacter baumannii* Drug Resistance. 2021.

2021

2022

2023

2024

2025

2026

2027

2028

2029

2030

2031

2032

2033

Conclusões

- Os metabólitos da diatomácea *C. weissflogi* foram caracterizados através de ensaios ^1H HR-MAS NMR demonstrando um perfil constituído principalmente por ácidos graxos mono e poliinsaturados;
- Nesse estudo foram obtidos 6 extratos a partir da biomassa da diatomácea *C. weissflogii*, sendo o extrato em hexano o que teve o menor rendimento (1,7%).
- O extrato em hexano através de análises de e ^1H -RMN também demonstrou um perfil majoritariamente constituído por lipídeos;
- O extrato em hexano foi o único extrato ativo frente a cepas *A. baumannii* apresentando CMI de 0,2 a 0,4mg/mL;
- O extrato em hexano foi significativamente ativo inibindo e destruindo biofilmes bacterianos e foi indiferente a dois antimicrobianos já utilizados na terapia;
- O extrato ativo demonstrou características pró-oxidantes, diferentemente dos mais polares onde observou-se atividade anti-oxidante de até 79%;
- Os resultados do estudo mostraram que os metabólitos da diatomácea *C. weissflogii* podem ser considerados uma possível fonte para o desenvolvimento de alternativas no combate a importantes patógenos, especialmente, em infecções nosocomiais, onde poderia auxiliar reduzindo, significativamente, a manutenção destes microrganismos em biofilmes.

Referências

- ALVES, E. et al. **Antimicrobial lipids from plants and marine organisms: An overview of the current state-of-the-art and future prospects. Antibiotics** MDPI AG, 1 ago. 2020.
- AMIGUET, V. T. et al. Antibacterial properties of a glycolipid-rich extract and active principle from Nunavik collections of the macroalgae *Fucus evanescens* C. Agardh (Fucaceae). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 745–749, set. 2011.
- ARAUJO, G. S. et al. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5248–5250, 2011.
- ARRIADA, A. A.; ABREU, P. C. NANNOCHLOROPSIS OCULATA GROWTH IN PRODUCED WATER: AN ALTERNATIVE FOR MASSIVE MICROALGAE BIOMASS PRODUCTION. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, 2014.
- AZIZAN, A. et al. Metabolite profiling of the microalgal diatom chaetoceros calcitrans and correlation with antioxidant and nitric oxide inhibitory Activities via 1H NMR-Based Metabolomics. **Marine Drugs**, 2018.
- BELLIO, P. et al. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. **MethodsX**, v. 8, 1 jan. 2021.
- BENOIST, L. et al. In-Depth in silico search for cuttlefish (*Sepia officinalis*) antimicrobial peptides following bacterial challenge of haemocytes. **Marine Drugs**, v. 18, n. 9, 2020.
- BERDI, J. J. 58(1): 1–26, 2005. **Journal of Antibiotics. Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2005.
- BERGMANN, W.; FEENEYZ, R. J. Communications to the Editor The Isolation of a New Thymine Pentoside from Sponges. **72**, n. 1, p. 2809–2810, 1950.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 148–165, 1996.
- BHOWMICK, S. et al. Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. **Biotechnology Advances**, v. 43, n. November 2019, 2020.
- BORGES, L. et al. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 10, p. 4449–4454, 2011.
- BORGES, L. et al. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. **Aquaculture Reports**, 2016.
- BORGES, L. DO V. et al. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de

2101 um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. **Atlântica (Rio Grande)**, v. 29, n. 1,
2102 p. 35–46, 2007.

2103 BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development
2104 and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743–756,
2105 2013.

2106 BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter*
2107 with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter*
2108 *haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii*
2109 sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and
2110 *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36,
2111 n. 2, p. 228–240, 1986.

2112 CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. DE O. Crescimento e
2113 composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos
2114 estanques. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 2, p. 339–347, 2010.

2115 CAPRARA, C. DA S. C. et al. Application of 1H HR-MAS NMR-Based Metabolite
2116 Fingerprinting of Marine Microalgae. **Metabolites**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2023.

2117 CARVALHO, L. G.; PEREIRA, L. Review of marine algae as source of bioactive
2118 metabolites: A marine biotechnology approach. **Marine Algae: Biodiversity,**
2119 **Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology**, n. April, p. 195–
2120 227, 2014.

2121 CASILLAS-VARGAS, G. et al. **Antibacterial fatty acids: An update of possible**
2122 **mechanisms of action and implications in the development of the next-**
2123 **generation of antibacterial agents.** **Progress in Lipid Research** Elsevier Ltd, ,
2124 1 abr. 2021.

2125 CHEN, H. et al. Microalgal biofuel revisited: An informatics-based analysis of
2126 developments to date and future prospects. **Applied Energy**, v. 155, p. 585–598,
2127 2015.

2128 COUTO, C. et al. Optimization of a low-cost fertilizer-based medium for large-
2129 scale cultivation of the coastal diatom *Conticribra weissflogii* using response
2130 surface methodology and its effects on biomass composition. **Journal of Applied**
2131 **Phycology**, v. 33, n. 5, p. 2767–2781, 1 out. 2021.

2132 DA ROSA, M. D. H. et al. **Macroalgae and Microalgae Biomass as Feedstock**
2133 **for Products Applied to Bioenergy and Food Industry: A Brief Review.**
2134 **Energies** MDPI, , 1 fev. 2023.

2135 DE FREITAS COÊLHO, D. et al. Microalgae: Cultivation aspects and bioactive
2136 compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

2137 DE JESUS RAPOSO, M. F.; DE MORAIS, R. M. S. C.; DE MORAIS, A. M. M. B.
2138 Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life**
2139 **Sciences**, v. 93, n. 15, p. 479–486, 2013.

2140 DE MOURA, R. R. et al. Microwave-Assisted Extraction of Lipids from Wet
2141 Microalgae Paste: A Quick and Efficient Method. **European Journal of Lipid**
2142 **Science and Technology**, 2018.

2143 DERNER, R. B. Efeito de fontes de Carbono no crescimento e na composição
2144 bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com
2145 ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. p. 158, 2006.

2146 DESBOIS, A. P. et al. Isolation and structural characterisation of two antibacterial
2147 free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. **Applied**
2148 **Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 755–764, dez. 2008.

2149 DESBOIS, A. P.; LAWLOR, K. C. Antibacterial activity of long-chain
2150 polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus*
2151 *aureus*. **Marine Drugs**, v. 11, n. 11, p. 4544–4557, 2013.

2152 DESRIAC, F. et al. Alterins Produced by Oyster-Associated *Pseudoalteromonas*
2153 Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. **Marine Drugs**, v.
2154 18, n. 12, 1 dez. 2020.

2155 DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. **A Historical overview of natural**
2156 **products in drug discovery**. **Metabolites**, 2012.

2157 FALLAH, K. N. **The Effects of Combination Antibiotic Therapy on Methicillin-**
2158 **Resistant *Staphylococcus aureus***. [s.l: s.n.].

2159 FENICAL, DR. C. C. H. AND PROF. W. Antibacterials from the Sea. **Bone**, v. 23,
2160 n. 1, 2010.

2161 FINDLAY, J. A.; PATIL, A. D. **ANTIBACTERIAL CONSTITUENTS OF THE**
2162 **DIATOM NAVICULA DELOGNEI** **Journal of Natural Products Val**. [s.l: s.n.].

2163 FOURNIER, P. E.; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter*
2164 *baumannii* in health care facilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 5, p.
2165 692–699, 2006.

2166 FOURNIER, P. E.; RICHET, H. **The Epidemiology and Control of**
2167 ***Acinetobacter baumannii* in Health Care Facilities** **Downloaded from** **Clinical**
2168 **Infectious Diseases**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/>>.

2169 GARCÍA, N. et al. Efecto de la salinidad en el crecimiento y composición química
2170 de la diatomea *Thalassiosira weissflogii* en tres fases de cultivo. **Latin American**
2171 **Journal of Aquatic Research**, v. 40, n. 2, p. 435–440, 2012.

2172 GARCÍA-DAVIS, S. et al. Antimycobacterial activity of laurinterol and aplysin from
2173 *Laurencia johnstonii*. **Marine Drugs**, v. 18, n. 6, 1 jun. 2020.

2174 GOMES, A. M. et al. Antitumor properties of a new non-anticoagulant heparin
2175 analog from the mollusk *Nodipecten nodosus*: Effect on P-selectin, heparanase,
2176 metastasis and cellular recruitment. **Glycobiology**, v. 25, n. 4, p. 386–393, 2015.

2177 GONÇALVES-ARAUJO, R. et al. Brazil-Malvinas confluence: Effects of
2178 environmental variability on phytoplankton community structure. **Journal of**
2179 **Plankton Research**, v. 34, n. 5, p. 399–415, 2012.

2180 GOPAL, R. et al. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric
2181 peptides against multidrug-resistant *acinetobacter baumannii* strains.
2182 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1622–1629, mar.
2183 2014.

2184 GUARNIERI, M. C. et al. Zoanthid mucus as new source of useful biologically
2185 active proteins. **Toxicon**, v. 143, p. 96–107, 2018.

2186 GUL, W.; HAMANN, M. T. Indole alkaloid marine natural products: An established
2187 source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic,
2188 neurological and other diseases. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 442–453, 2005.

2189 HABBU, P. et al. **Antimicrobial metabolites from marine microorganisms.**
2190 **Chinese Journal of Natural Medicines**, 2016.

2191 HALICKI, P. C. B. et al. Antibiofilm Potential of Arenecarbaldehyde 2-
2192 Pyridinylhydrazone Derivatives Against *Acinetobacter baumannii*. **Microbial**
2193 **Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2019.

2194 HALICKI, P. C. B. et al. Antibiofilm Potential of Arenecarbaldehyde 2-
2195 Pyridinylhydrazone Derivatives against *Acinetobacter baumannii*. **Microbial**
2196 **Drug Resistance**, v. 26, n. 12, p. 1429–1436, 1 dez. 2020.

2197 HAMIDI, M. et al. Recent Patents and Discovery of Anti-inflammatory Agents from
2198 Marine Source. **Marine Drugs**, v. 14, n. 1, p. 1–20, 2016.

2199 HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the
2200 mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews**
2201 **Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91–102, 2018.

2202 HARUN, R. et al. **Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety**
2203 **of consumer products. Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2010.

2204 HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial
2205 resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176–187, 2016.

2206 HOWARD, A. et al. *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic
2207 pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 5, 2012.

2208 ISHIDA, Y. et al. A highly CO₂-tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1,
2209 enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. **Fisheries Science**, v.
2210 66, n. 4, p. 655–659, 2000.

2211 KANASE, H. R.; SINGH, K. N. M. Marine pharmacology: Potential, challenges,
2212 and future in India. **Journal of Medical Sciences (Taiwan)**, v. 38, n. 2, p. 49–
2213 53, 2018.

- 2214 KARAMAN, I. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of
2215 *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2–3, p. 231–
2216 235, 2003.
- 2217 KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. **Marine**
2218 **Drugs**, v. 2, n. 2, p. 73–82, 2004.
- 2219 KLEIN BRETELER, W. C. M.; SCHOGT, N.; RAMPEN, S. Effect of diatom
2220 nutrient limitation on copepod development: Role of essential lipids. **Marine**
2221 **Ecology Progress Series**, v. 291, p. 125–133, 2005.
- 2222 KOZLOWSKI, E. O.; PAVAO, M. S. G.; BORSIG, L. Ascidian dermatan sulfates
2223 attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin.
2224 **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, n. 9, p. 1807–1815, 2011.
- 2225 KRZYŚCIAK, P. et al. *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired
2226 infection: biofilm production and drug susceptibility. **Apmis**, v. 125, n. 11, p.
2227 1017–1026, 2017.
- 2228 KURIHARA, M. N. L. et al. **Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii***
2229 **outbreaks: a global problem in healthcare settings**. **Revista da Sociedade**
2230 **Brasileira de Medicina Tropical** NLM (Medline), 2020.
- 2231 KYRIAKIDIS, I. et al. ***Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance**
2232 **mechanisms**. **Pathogens** MDPI AG, 1 mar. 2021.
- 2233 LABARCA, J. A. et al. **Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa***
2234 **and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America**.
2235 **Critical Reviews in Microbiology** Taylor and Francis Ltda, 3 mar. 2016.
- 2236 LAURITANO, C. et al. First identification of marine diatoms with anti-tuberculosis
2237 activity. **Scientific Reports**, 2018.
- 2238 LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic
2239 resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in**
2240 **Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. MAR, 2017a.
- 2241 LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic
2242 resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in**
2243 **Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. MAR, 13 mar. 2017b.
- 2244 LESSEL, E. F. International Committee on Nomenclature of Bacteria
2245 Subcommittee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria: Minutes of the
2246 Meeting, 11 August 1970. Room Constitution C, Maria-Isabel Hotel, Mexico City,
2247 Mexico. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, n. 2, p. 213–
2248 214, 1971.
- 2249 LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews**
2250 **Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 48–56, 2007.
- 2251 LIN, M. F. et al. Role of the BaeSR two-component system in the regulation of
2252 *Acinetobacter baumannii* adeAB genes and its correlation with tigecycline
2253 susceptibility. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.

- 2254 MACHADO, A. A. DE S. et al. Effects of zinc on in vivo fluorescence, chlorophyll
2255 a and growth of the diatom *Conticribra weissflogii* (Thalassiosirales,
2256 Thalassiosiraceae). **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 9, n. 4, p.
2257 278–287, 2014.
- 2258 MALVIYA, S. et al. Insights into global diatom distribution and diversity in the
2259 world's ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**
2260 **United States of America**, v. 113, n. 11, p. E1516–E1525, 15 mar. 2016.
- 2261 MANSOUR, M. P. et al. Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase
2262 microalgae: Applications and unusual C24-C28 polyunsaturated fatty acids.
2263 **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 4, p. 287–300, 2005.
- 2264 MARELLA, T. K.; TIWARI, A. Marine diatom *Thalassiosira weissflogii* based
2265 biorefinery for co-production of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin.
2266 **Bioresource Technology**, v. 307, 1 jul. 2020.
- 2267 MARQUES, J. et al. Marine organism sulfated polysaccharides exhibiting
2268 significant antimalarial activity and inhibition of red blood cell invasion by
2269 Plasmodium. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–14, 2016.
- 2270 MARSTON, H. D. et al. Antimicrobial resistance. **JAMA - Journal of the**
2271 **American Medical Association**, v. 316, n. 11, p. 1193–1204, 2016.
- 2272 MARTIN-JÉZÉQUEL, V.; HILDEBRAND, M.; BRZEZINSKI, M. A. Avance-
2273 Joclinedavila. **Journal Phycology**, v. 36, n. May, p. 821–840, 2000.
- 2274 MARTINS, A. et al. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and
2275 cosmeceutical industries: Tips for success. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1066–
2276 1101, 2014.
- 2277 MARTINS, R. M. et al. Macroalgae extracts from Antarctica have antimicrobial
2278 and anticancer potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, 8 mar. 2018.
- 2279 MAYER, A. M. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001-2002: Marine
2280 compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic,
2281 antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal,
2282 antituberculosis, and antiviral activities; Affecting the cardiovas. **Comparative**
2283 **Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 140, n.
2284 3–4, p. 265–286, 2005.
- 2285 MCCONNELL, M. J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: Human
2286 infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS**
2287 **Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 130–155, 2013.
- 2288 MCGAW, L. J.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. **Antibacterial effects of fatty**
2289 **acids and related compounds from plants**. **South African Journal of**
2290 **Botany**National Research Foundation, 2002.
- 2291 MIETHKE, M. et al. **Towards the sustainable discovery and development of**
2292 **new antibiotics**. **Nature Reviews Chemistry**Nature Research, 1 out. 2021.

2293 MOURÃO, P. A. S. Perspective on the use of sulfated polysaccharides from
 2294 marine organisms as a source of new antithrombotic drugs. **Marine Drugs**, v. 13,
 2295 n. 5, p. 2770–2784, 2015.

2296 MULANI, M. S. et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the
 2297 era of antimicrobial resistance: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n.
 2298 APR, 2019.

2299 MULVEY, M. R.; SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: How
 2300 concerned should we be? **Cmaj**, v. 180, n. 4, p. 408–415, 2009.

2301 NEMEC, A. et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter*
 2302 *calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of
 2303 *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter genomic* species 3) and
 2304 *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter genomic* species
 2305 13TU). **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 393–404, 2011.

2306 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs**
 2307 **from 1981 to 2014. Journal of Natural Products**, 2016.

2308 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over
 2309 the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural**
 2310 **Products**, v. 83, p. 770–803, 2020.

2311 NICOL, M. et al. Unsaturated fatty acids affect quorum sensing communication
 2312 system and inhibit motility and biofilm formation of *Acinetobacter baumannii*.
 2313 **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 10 jan. 2018.

2314 NOCERA, F. P.; ATTILI, A. R.; DE MARTINO, L. ***Acinetobacter baumannii*: Its**
 2315 **clinical significance in human and veterinary medicine. PathogensMDPI**
 2316 **AG**, , 1 fev. 2021.

2317 ODDS, F. C. **Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts**
 2318 **between them. Journal of Antimicrobial Chemotherapy** Oxford University
 2319 **Press**, 1 jul. 2003.

2320 OHSE, S. et al. Crescimento de microalgas em sistema autotrófi co estacionário
 2321 Resumo Introdução. **Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 7–18, 2008.

2322 OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: From the
 2323 test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 459–
 2324 466, 2003.

2325 ORME, I. **Search for new drugs for treatment of tuberculosis. Antimicrobial**
 2326 **Agents and Chemotherapy**, 2001.

2327 PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*:
 2328 Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n.
 2329 3, p. 538–582, 2008.

2330 PENDLETON, J. N.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Clinical relevance of the
 2331 ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 3, p.
 2332 297–308, 2013.

2333 PEREZ, F. et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.
 2334 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3471–3484, 2007.

2335 POWERS, J. H. Antimicrobial drug development - The past, the present, and the
 2336 future. **Clinical Microbiology and Infection, Supplement**, v. 10, n. 4, p. 23–31,
 2337 2004.

2338 PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae.
 2339 **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

2340 QI, L. et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and
 2341 biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in**
 2342 **Microbiology**, v. 7, n. APR, 12 abr. 2016.

2343 RABIEE, N. et al. **Diatoms with invaluable applications in nanotechnology,**
 2344 **biotechnology, and biomedicine: Recent advances. ACS Biomaterials**
 2345 **Science and Engineering** American Chemical Society, 12 jul. 2021.

2346 RADCHENKO, I. G.; IL'YASH, L. V. Growth and photosynthetic activity of diatom
 2347 *Thalassiosira weissflogii* at decreasing salinity. **Biology Bulletin**, v. 33, n. 3, p.
 2348 242–247, 2006.

2349 RAMOS, D. F. et al. Chemical Profile and Antimicrobial Activity of the Marine
 2350 Diatom *Chaetoceros muelleri*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 19, n. 5, 1 maio
 2351 2022.

2352 RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial
 2353 pathogens: No ESKAPE. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079–
 2354 1081, 2008.

2355 ROTTER, A. et al. **The Essentials of Marine Biotechnology. Frontiers in**
 2356 **Marine Science** Frontiers Media S.A., 16 mar. 2021.

2357 RUA, C. P. J. et al. Diversity and antimicrobial potential of culturable heterotrophic
 2358 bacteria associated with the endemic marine sponge *Arenosclera brasiliensis*.
 2359 **PeerJ**, v. 2014, n. 1, p. 1–14, 2014.

2360 SABDANINGSIH, A. et al. A new citrinin derivative from the Indonesian Marine
 2361 Sponge-Associated Fungus *Penicillium citrinum*. **Marine Drugs**, v. 18, n. 4, 1 abr.
 2362 2020.

2363 SANSONE, C.; BRUNET, C. Promises and challenges of microalgal antioxidant
 2364 production. **Antioxidants**, v. 8, n. 7, 2019.

2365 SANTHOSH, S.; DHANDAPANI, R.; HEMALATHA, N. Bioactive compounds
 2366 from Microalgae and its different applications- a review. **Advances in Applied**
 2367 **Science Research**, v. 7, n. 4, p. 153–158, 2016.

2368 SAVAGE, N. The scum solution. **Nature**, p. 5–6, 2011.

2369 SCHINKE, C. et al. Antibacterial Compounds from Marine Bacteria, 2010-2015.
 2370 **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 4, p. 1215–1228, 2017.

SCOPEL, M. et al. Dipeptide cis-cyclo (Leucyl-Tyrosyl) produced by sponge associated *Penicillium* sp. F37 inhibits biofilm formation of the pathogenic *Staphylococcus epidermidis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 3, p. 624–626, 2013.

SHARMA, N.; SHARMA, P. JOURNAL OF ADVANCES IN PLANT BIOLOGY Review Industrial and Biotechnological Applications of Algae: A Review. n. 1, 2017.

SHIN, B.; PARK, W. Antibiotic resistance of pathogenic *Acinetobacter* species and emerging combination therapy. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 837–849, 2017.

SIRIJAN SANTAJIT; NITAYA INDRAWATTANA. Mechanisms of antimicrobial resistance in Pasteurellaceae. **PBioMed Research International**, v. 2016, n. 1155, p. 1–8, 2016.

SKARIYACHAN, S. et al. **Recent perspectives on the virulent factors and treatment options for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii***. **Critical Reviews in Microbiology** Taylor and Francis Ltd, , 2019.

SKROPETA, D.; WEI, L. Recent advances in deep-sea natural products. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 8, p. 999–1025, 2014.

SNEWIN, V. A. et al. Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4586–4593, 1999.

SOTO, S. M. **The Sea as a Source of Antibiotics**. [s.l.: s.n.]. v. 04

STACHURA-SUCHOPLES, K.; WILLIAMS, D. M. Description of *Conticribra trircularis*, a new genus and species of Thalassiosirales, with a discussion on its relationship to other continuous *cribra* species of *Thalassiosira* Cleve (Bacillariophyta) and its freshwater origin. **European Journal of Phycology**, v. 44, n. 4, p. 477–486, 2009.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 1 mar. 2018.

THOMPSON, F. et al. Marine Biotechnology in Brazil: Recent Developments and Its Potential for Innovation. **Frontiers in Marine Science**, 2018.

THUMMEEPK, R. et al. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *acinetobacter Baumannii* clinical isolates. **International Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 121–129, 2016.

TOVAR, A. M. F. et al. Structural and haemostatic features of pharmaceutical heparins from different animal sources: Challenges to define thresholds separating distinct drugs. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–12, 2016.

VELLA, F. M. et al. Annual outdoor cultivation of the diatom *Thalassiosira weissflogii*: productivity, limits and perspectives. **Algal Research**, v. 42, n. May, p. 101553, 2019.

VESTERGAARD, M. et al. Antibiotic combination therapy can select for broad-spectrum multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 1, p. 48–55, 2016.

VIRGINIA ARMBRUST, E. et al. **The Genome of the Diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/>>.

WATKINS, R. R.; BONOMO, R. A. **Overview: The Ongoing Threat of Antimicrobial Resistance**. **Infectious Disease Clinics of North America** W.B. Saunders, , 1 dez. 2020.

WIJFFELS, R. H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 26–31, 2008.

WONG, D. et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: A century of challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 409–447, 2017.

YOON, B. K. et al. Spectrum of Membrane Morphological Responses to Antibacterial Fatty Acids and Related Surfactants. **Langmuir**, v. 31, n. 37, p. 10223–10232, 22 set. 2015.

ZANG, M. et al. The Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Evolution of *Acinetobacter baumannii* Drug Resistance. 2021.

Clique ou toque aqui para inserir o texto.