

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Toxicologia



Estratégias para identificação e quantificação de aminoácidos tipo
micosporinas (MAAs) em cianobactérias e outros organismos para
aplicação em cosmética e farmacêutica

Vanessa Sofia Mendes Geraldes

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Ermani Pinto

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Toxicologia



Estratégias para identificação e quantificação de aminoácidos tipo
micosporinas (MAAs) em cianobactérias e outros organismos para
aplicação em cosmética e farmacêutica

Vanessa Sofia Mendes Geraldes

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Emani Pinto

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

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

G354e Geraldés, Vanessa
Estratégias para identificação e quantificação de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) em cianobactérias e outros organismos para aplicação em cosmética e farmacêutica / Vanessa Geraldés. -- São Paulo, 2019. 236p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Orientador: Pinto, Ernani.

1. Aminoácidos do tipo micosporinas. 2. Cianobactéria. 3. Cromatografia líquida. 4. Espectrometria de massas. 5. Cosmética. I. T. II. Pinto, Ernani, orientador.

Vanessa Sofia Mendes Geraldes

Estratégias para identificação e quantificação de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) em cianobactérias e outros organismos para aplicação em cosmética e farmacêutica

Comissão Julgadora
da
Dissertação/Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Ermani Pinto Junior
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

Ao meu avô por ter desenvolvido em mim o interesse por aprender cada vez mais
(*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Ernani Pinto do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas desta Universidade, pela confiança e incentivo;

À minha querida amiga Prof.^a Dr.^a Livia Soman de Medeiros do Laboratório de Química Bio-orgânica Otto Richard Gottlieb da Universidade de São Paulo pela co-orientação. Os seus ensinamentos e o seu apoio foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto;

À Prof. Dr.^a Marli Fiore e à sua equipe do CENA da Universidade de São Paulo pela ajuda nos processos de biossíntese dos aminoácidos do tipo micosporinas;

Ao Prof. Dr. Paul Long do King's College London pela parceria e pela ajuda em diversos pontos desta pesquisa em relação aos aminoácidos do tipo micosporinas;

À Fernanda Rios Jacinavicius pelo enorme apoio na fase final deste projeto;

Ao Felipe Dörr pela sua valiosa ajuda nos experimentos de espectrometria de massas;

Aos meus colegas do LTPNA pelos momentos de amizade e aprendizagem;

Aos meus amigos pelos momentos de conforto e descanso que partilharam comigo durante este projeto;

À Turma da Cachaça por serem a minha família no Brasil tornando os dias mais completos e animados;

À minha família pelo apoio e confiança em todos os momentos. Mesmo longe sei que sempre estarão aqui para me ajudar;

Aos meus filhos Tomás e Vasco por me fazerem esquecer o trabalho e valorizar cada momento ao vosso lado;

Ao Rui pela compreensão, companheirismo e pelo amor. Sem o teu apoio este trabalho nunca teria acontecido. Obrigada por sempre teres acreditado nas minhas capacidades e neste projeto;

Às agências de fomento, principalmente à CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

GERALDES, V. Estratégias para identificação e quantificação de aminoácidos tipo micoporinas (MAAs) em cianobactérias e outros organismos para aplicação em cosmética e farmacêutica. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os aminoácidos tipo micoporinas (MAAs) são compostos, produzidos por algumas espécies de cianobactérias e outros microorganismos, principalmente quando são expostos a radiação ultravioleta (UVR). Estes compostos, que vêm demonstrando funções fotoprotetoras e antioxidantes, têm sido pesquisados para aplicação em protetores solares e em produtos antienvhecimento. O presente estudo focou na caracterização de cianobactérias e outros organismos quanto à produção de MAAs com potencial aplicação em cosméticos. Neste estudo foram desenvolvidos diversos métodos para identificação (via HPLC-DAD-MS/HRMS), purificação (via HPLC-DAD) e quantificação de MAAs (via LC-MS/MS). Pelo método de identificação de MAAs verificou-se que, das 75 cianobactérias estudadas, 27 cepas (38%) sintetizam MAAs. A cepa *Oscillatoria* sp. CMMA 1600 produziu a maior diversidade de MAAs. 10 MAAs diferentes foram identificados incluindo um MAA de massa molecular 316 Da. Através de dados espectroscópicos obtidos via HPLC-DAD-HRMS e RMN 1D e 2D confirmou-se que se tratava da micoporina-glicina-alanina. A biossíntese natural deste composto por cianobactérias foi relatada pela primeira vez neste estudo. Quanto à quantificação de MAAs, o protocolo de extração otimizado possibilitou uma excelente recuperação dos compostos de interesse, além de ser bastante simples e não utilizar solventes poluentes. As análises via LC-MS/MS foram realizadas através de experimentos de MRM em modo positivo usando uma coluna de fase reversa. O método validado permitiu determinar e quantificar com precisão os MAAs porphyra-334, shinorina e micoporina-glicina-alanina em corridas de apenas 6 minutos, com limites de detecção inferiores a $0,005 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. Aplicando o método de LC-MS/MS realizaram experimentos de indução de MAAs através de exposição à UVR tendo-se observado um aumento da concentração de MAAs nas cepas que já sintetizam estes compostos e, outras cepas começaram a produzir pelo menos um MAA. As cepas de *S. torques-reginae* (ITEP-024 e ITEP-026) produziram a maior concentração de MAAs. A cepa ITEP-024 foi ainda exposta a diferentes radiações tendo-se observado que a UVB é que mais influencia a produção de MAAs. Neste estudo foi demonstrado o potencial das cianobactérias como produtores de MAAs que podem ser utilizados como fotoprotetores em protetores solares.

Palavras-chave: Radiação ultra-violeta; aminoácidos do tipo micoporinas; micoporina-glicina-alanina (MGA); cianobactéria; validação; quantificação; HPLC-DAD-HRMS; LC-MS/MS.

ABSTRACT

GERALDES, V. Identification and quantification methods of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria and other microorganisms for cosmetic and pharmaceutical application. Thesis (PhD in Toxicology – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019).

Mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) are UV-absorbing compounds produced by cyanobacteria and other organisms, especially upon exposure to solar ultraviolet radiation (UVR). These compounds are photoprotective and some have additional antioxidant functions useful to the natural cosmetics market. This study aims to identify MAAs-producing cyanobacteria with potential applications in cosmetics. A HPLC-DAD-MS/HRMS method for the identification of MAAs was developed. Out of the 75 cyanobacteria studied, 27 strains (38%) synthesized MAAs. *Oscillatoria* sp. CMMA 1600, from homocyte type, produced the greatest diversity of MAAs. 10 different MAAs were identified including a MAA with molecular weight of 316 Da. The chemical structure of mycosporine-glycine-alanine was confirmed by 1D/2D NMR and HRMS analyses. This compound has never been reported from a natural source. In this study, a validated LC-MS/MS quantification method for MAAs is also presented. An easy-to-handle and rapid extraction procedure was developed which uses only water and volatile additives as the extractor solvents. The LC-MS/MS method was performed using multiple reaction monitoring in positive mode with a reverse-phase column. The method enabled the accurate determination and quantification of the MAAs porphyra-334, shinorine and mycosporine-glycine-alanine in a 6 minutes running time, with limits of detection $< 0.005 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. MAAs induction experiments were performed through UVR exposure. MAAs are constitutively produced by some cyanobacteria and production was further enhanced following UV-irradiance. Other strains start to produce at least one MAA after UV-irradiance. *Sphaerospermopsis torques-reginae* strain (ITEP-024 and ITEP-026) produced the highest concentration of these photoprotective compounds. *S. torques-reginae* ITEP 024 strain was further exposed to different radiation compositions. MAAs were significantly influenced by UVB. In this study, the potential of cyanobacteria as MAA producers, that can be used as photoprotectors in sunscreens, has been demonstrated.

Key-words: Ultra-violet radiation; mycosporine-like amino acids; mycosporine glycine alanine (MGA); cyanobacteria; validation; quantification; HPLC-DAD-HRMS; LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Espectro da irradiância solar acima da atmosfera (verde) e à superfície terrestre (vermelho).
Fonte: Wikipedia ³..... 1
- Figura 2. Estrutura geral dos aminoácidos do tipo micospirinas (MAAs): A) amino-ciclohexenona;
B) amino-ciclohexenimina. Adaptado de Carreto & Carignan, 2011 ¹⁸. 3
- Figura 3. Bissíntese de MAAs, suas conversões bioquímicas e o papel proposto dos genes. Adaptado
de Carreto & Carignan 2011 ¹⁸ 9
- Figura 4. Espectro eletromagnético da radiação ultravioleta. Adaptado de D’Orazio *et al.*, 2013 ⁹⁰.
..... 13
- Figura 5. Espectro de absorção e comprimento de onda crítico para os ingredientes fotoprotetores:
(A) Porphyra-334 + Shinorina (88:12) e Metil-Serina (OH) + MAA desconhecido (84:16);
(B) Metil-Serina (OH) + MAA desconhecido (84:16) ; (C) Porphyra-334 + Shinorina (88:12);
(D) butylmethoxydibenzoylmethane (BMDM) and octylmethoxycinnamate (OMC). Fonte: de
la Coba *et al.*, 2019 ⁸⁰..... 16
- Figura 6. Mecanismos gerais de fragmentação propostos por Cardozo *et al.*, 2006 para os MAAs
analisados no estudo de espectrometria de massas de alta resolução. A-M: íons-produto
principais ¹³³ 22
- Figura 7. Cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* - aspectos gerais dos filamentos
mostrando os tricomas espiralados e o número e posição dos acinetos. Fonte: Werner *et al.*,
2012 ¹⁴³ 34
- Figura 8. Estrutura molecular dos padrões internos testados (A) 1-metil-triptofano e (B) aciclovir.46
- Figura 9. Frasco de cultura TPP com membrana de diâmetro de poro 0,22 µm utilizado para os
cultivos da cianobactéria ITEP-024. Fonte: TPP Techno Plastic Products AG, 2017 ¹⁷⁰.... 51
- Figura 10. Espectro de penetração da radiação nos frascos de cultura TPP e em frascos de vidro de
borossilicato. 51
- Figura 11. Espectro de emissão das lâmpadas de UVA e UVB. 54

Figura 12. Espectro de emissão das lâmpadas PAR.	54
Figura 13. Espectros de absorção no UV do extrato de <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024 obtido em espectrofotômetro com monitoramento entre 200-800 nm.	57
Figura 14. Cromatograma de HPLC-DAD semi-preparativo a 330 nm dos padrões de MAAs isolados do composto Helioguard 365 utilizando os eluentes (A) 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH ₄ OH), (B) H ₂ O/MeOH/ACN (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 % numa coluna analítica Luna C18 (150x4,6 mm, 5 μm) sob uma vazão de 0,5 mL.min ⁻¹ mostrando o tempo de retenção dos 3 MAAs presentes no extrato (shinorina: 4,34 min; palitina: 5,44 min; porphyra-334: 8,50 min).	58
Figura 15. Cromatograma de HPLC-DAD a 330 nm dos MAAs detectados no extrato de biomassa de ITEP-024 (shinorina: 4,34 min; palitina: 4,53; porphyra-334: 8,50 min e MAA de <i>m/z</i> 317: 13.05 min) e espectros de UV, obtidos utilizando os eluentes (A) 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH ₄ OH), (B) H ₂ O/MeOH/ACN (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 % numa coluna analítica Luna C18 (150x4,6 mm, 5 μm) sob uma vazão de 0,5 mL.min ⁻¹	59
Figura 16. Cromatograma de íons extraídos (ESI+) e espectro UV dos MAAs: 1 - shinorina C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₈ (0.0 ppm; TR 1.1 min), 2 - porphyra-334 C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₈ (-0.9 ppm; TR 2.2 min) e 3- micosporina-glicina-alanina C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₇ (0.3 ppm, TR 3.1 min) do extrato de <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024 obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH ≈2,55) e (B) ACN/H ₂ O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH ≈2.95) numa coluna analítica Synergi 4μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min ⁻¹	60
Figura 17. Espectros Full Scan (ESI +) dos MAAs: (1) - shinorina C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₈ (Erro: -0.3 ppm, mSigma 14.3), (2) - porphyra-334 C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₈ (Erro: -0.3 ppm, mSigma 24.0) and (3) - micosporina-glicina-alanina C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₇ (Erro: -0.2 ppm, mSigma 16.1) presentes no extrato de <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024, 35.3 eV, obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os	

eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. 61

Figura 18. Estrutura molecular de A – shinorina (massa exata - m/z 333.1298) e e B – porphyra-334 (massa exata - m/z 347.1454). 61

Figura 19. Espectros de UV e de Full Scan dos padrões de shinorina de m/z 333.1294 (Erro: -2.3 ppm, mSigma 12.4) e porphyra-334 de m/z 347.1441 (Erro: -2.0 ppm, mSigma 8.6) obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. 62

Figura 20. Cromatograma de íons extraídos com os tempos de eluição dos íons m/z 333.1299 (TR: 1.8 min), 347.1456 (TR: 2.7 min) e 317.1351 (TR: 3.6 min) presentes no extrato da cianobactéria ITEP-024 e dos padrões de shinorina (TR: 1.8 min) e porphyra-334 (TR: 2.7 min) obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. 63

Figura 21. Espectros de fragmentação (ESI +) dos MAAs (1) - shinorina C₁₃H₂₀N₂O₈, (2) - porphyra-334 C₁₄H₂₂N₂O₈ e (3) - micosporina-glicina-alanina C₁₃H₂₀N₂O₇ presentes na amostra de ITEP-024, 35.3 eV obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. 63

Figura 22. Espectros de fragmentação dos padrões de MAAs shinorina C₁₃H₂₀N₂O₈ e porphyra-334 C₁₄H₂₂N₂O₈, 35.3 eV obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido

fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min ⁻¹	64
Figura 23. Estrutura molecular das MAAs (A) micosporina-glicina-alanina e (B) shinorina. Fonte: Miyamoto <i>et al.</i> , 2014 ³⁷	64
Figura 24. Cromatograma de HPLC-DAD a 330 nm do extrato de ITEP-24 purificado para obtenção do composto de <i>m/z</i> 317 utilizando os eluentes (A) 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH ₄ OH), (B) H ₂ O/MeOH/ACN (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 % numa coluna semi-preparativa Luna C18 (2) (250x10,00 mm, 5 μ m) sob uma vazão de 3 mL.min ⁻¹	65
Figura 25. Ampliação da região de interesse do espectro RMN de ¹ H referente à micosporina-glicina-alanina isolada.	67
Figura 26. Espectro RMN de ¹ H referente à micosporina-glicina-alanina isolada (sinais em δ 5.3 e δ 8.6 correspondem a resíduos de água presente no solvente e ácido fórmico, respectivamente).	67
Figura 27. Espectro de COSY para a substância micosporina-glicina-alanina em CD ₃ OD (500 MHz). Correlações homonucleares ¹ H - ¹ H observadas no experimento de COSY encontram-se em destaque.....	68
Figura 28. Ampliação da região do espectro COSY para a substância micosporina-glicina-alanina em CD ₃ OD (500 MHz).	69
Figura 29. Espectro de correlação de HSQC da micosporina-glicina-alanina em CD ₃ OD (500 MHz).	70
Figura 30. Ampliação da região de carbonos coalescentes no espectro de HSQC para micosporina-glicina-alanina em CD ₃ OD (500 MHz).....	71
Figura 31. Espectro de HMBC da substância micosporina-glicina-alanina em CD ₃ OD (500 MHz). Correlações homonucleares ¹ H - ¹³ C observadas no experimento de HMBC encontram-se em destaque na figura.....	72

Figura 32. Mecanismo de fragmentação proposto para o composto de <i>m/z</i> 317.	73
Figura 33. Estrutura dos agrupamentos gênicos encontrados no banco de dados relacionados à biossíntese de MAAs em <i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i> ITEP-024 e em outras cianobactérias. Os genes biossintéticos são apresentados pela função prevista de seus produtos: EEVS (verde), <i>O</i> -metiltransferase (amarelo), enzima ATP-grasp (cinza) e enzima D-Alanina-D-Alanina ligase (azul turquesa).....	75
Figura 34. Árvore filogenética construída por inferência filogenética bayesiana com sequências concatenadas de proteínas de dezoito agrupamentos gênicos de MAAs. A linhagem de interesse encontra-se a negrito. Probabilidades posteriores estão apresentadas nos nós dos ramos.	76
Figura 35. Via biossintética proposta da micospolina-glicina-alanina.	77
Figure 36. Cromatograma de íons extraído do extrato de MAAs da cepa <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024 após a exposição à radiação PAR + UVA+UVB na presença (linha tracejada) e na ausência (linha contínua) de glifosato (2mM). 1: shinorina, 2: porphyrin-334, 3: micospolina-glicina-alanina.	78
Figura 37. Espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de micospolina-ornitina - C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₆ em <i>Nostoc</i> sp. CCIBt 3329 (0.1 ppm, 6.2 msigma; TR 2.1 min) e <i>Leptolyngbya</i> sp. LTPNA-DBG-07 (1.5 ppm, 10.5 msigma; TR 2.1 min) utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH ≈2,55) e (B) ACN/H ₂ O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH ≈2.95) numa coluna Synergi 4μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min ⁻¹	84
Figura 38. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de palitina-serina - C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₆ (-1.4 ppm, 12.7 msigma; TR 1.3 min) e hexose-bound palitina-serina - C ₁₇ H ₂₈ N ₂ O ₁₁ (-1.2 ppm; 5.1 msigma; TR 1.6 min) em <i>Nostoc</i> sp. LTPNA-DBG-72 utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH ≈2,55) e (B) ACN/H ₂ O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH ≈2.95) numa coluna Synergi	

4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹..... 86

Figura 39. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de palitina-serina - C₁₁H₁₈N₂O₆ (-0.6 ppm, 12.6 msigma; TR 1.3 min), hexose palitina-serina - C₁₇H₂₈N₂O₁₁ (-0.7 ppm; 2.9 msigma; TR 1.6 min) em), porphyra-334 - C₁₄H₂₂N₂O₈ (0.8 ppm; 14.3 msigma; TR 2.1 min), palitina-treonina - C₁₂H₂₀N₂O₆ (1.5 ppm; 1.6 msigma; TR 2.4 min) e hexose palitina-treonina - C₁₈H₃₀N₂O₁₁ (2.9 ppm; 1.9 msigma; TR 2.7 min) presentes no extrato de *Oscillatoria* sp. CMAA1600 utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹..... 88

Figura 40. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de shinorina - C₁₃H₂₁N₂O₈ (0.8 ppm, 2.7 msigma; TR 1.3 min), palitina C₁₀H₁₆N₂O₅ (1.2 ppm; 6.3 msigma; TR 1.5 min),), asterina-330 C₁₂H₂₀N₂O₆ (0.7 ppm; 2.1 msigma; TR 1.7 min), porphyra-334 - C₁₄H₂₂N₂O₈ (-0.9 ppm; 2.1 msigma; TR 2.1 min), e N-etilpalitina C₁₂H₂₀N₂O₅ (-2.2 ppm; 5.5 msigma; TR 4.0 min) presentes no extrato de *Porphyra* sp. (ESI +, 35.3 eV) utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. 89

Figura 41. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de micosporina GABA - C₁₂H₁₉NO₆ (-6.8 ppm, 9.6 msigma; TR 1.3 min), palitina C₁₀H₁₆N₂O₅ (1.7 ppm; 6.1 msigma; TR 1.5 min), porphyra-334 - C₁₄H₂₂N₂O₈ (-0.9 ppm; 62.7 msigma; TR 2.1 min), e ácido paliténico - C₁₄H₂₀N₂O₇ (2.1 ppm; 4.1 msigma; TR 3.2 min) presentes no extrato de *Amphidium* sp. (ESI +, 35.3 eV) utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹..... 90

- Figura 42. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de shinorina - $C_{13}H_{21}N_2O_8$ (0.6 ppm, 2.5 msigma; TR 1.3 min) presentes no extrato de *Plocamium brasiliense* (ESI +, 35.3 eV) utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹..... 91
- Figura 43. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS da shinorina (\pm 5 ppm) presente em diversos extratos de *S. torques-reginae* ITEP-024 sujeitos a diferentes métodos de extração conforme descrito na Tabela 6 (ESI +, 35.3 eV) utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹..... 91
- Figura 44. Comparação dos resultados de vários métodos de extração de MAAs da biomassa de ITEP-024 onde se variou a quantidade de biomassa utilizada (10 mg, 25 mg e 50 mg) e o solvente utilizado (MeOH/H₂O (1:1) e EtOH/H₂O (1:1))...... 92
- Figura 45. Comparação dos métodos de extração de biomassa de ITEP-024 onde se variou o solvente utilizado (EtOH/H₂O (1:1), H₂O e Fase móvel A - 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH₄OH))...... 93
- Figura 46. Comparação dos métodos de extração testados no extrato de *S. torques-reginae* ITEP-024 para cada MAA presente (shinorina, porphyra-334 e micosporina-glicina-alanina) onde se variou o solvente utilizado (EtOH/H₂O (1:1), H₂O e Fase móvel A - 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH₄OH))...... 93
- Figura 47. Estrutura molecular dos MAAs (A) micosporina-glicina-alanina..... 95
- Figura 48. Cromatograma de íons extraídos de uma amostra de matriz biológica (spirulina) enriquecida antes da extração com 10 μ L de uma solução de analito em um nível médio (shinorina – m/z 333: 600 μ g.mL⁻¹, porphyra-334 – m/z 347: 300 μ g.mL⁻¹, micosporina-

glicina-alanina – m/z 317: 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e 10 μL de solução padrão interno (aciclovir – m/z 226: 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. Cada composto é exibido em uma cor diferente. São apresentadas as transições correspondentes ao íon produto quantificador e qualificador. 96

Figura 49. Espectros de íons-produto dos MAAs de interesse (shinorina – m/z 333; porphyra-334 – m/z 347; micosporina-glicina-alanina – m/z 317) e do padrão interno (aciclovir – m/z 226) obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.97

Figura 50. Cromatogramas de MRM da matriz biológica (biomassa seca comercial de *Arthrospira platensis*) não dopada. Estão apresentadas as duas transições analisadas para os analitos de interesse (shinorina – m/z 333, porphyra-334 – m/z 347 e micosporina-glicina-alanina – m/z 317) obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.98

Figura 51. Cromatograma de íons extraídos do 1-metil-trptofano (m/z 219 e TR = 5,32) nas transições correspondentes aos íons produto 160 (quantificador) e 132 (qualificador) e do aciclovir (m/z 226 e TR = 4,65) nas transições correspondentes aos íons produto 152 (quantificador) e 135 (qualificador) obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. 100

Figura 52. Cromatograma de íons extraídos do padrão interno aciclovir (m/z 226) para as duas transições (135 e 152) analisadas no extrato da cianobactéria *S. torques-reginae* ITEP-024

obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH ≈2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH ≈2.95) numa coluna Synergi 4μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.
 101

Figura 53. Cromatogramas de íons extraídos dos MAAs (shinorina, porphyra-334 e micosporina-glicina-alanina) nas soluções padrão e presentes no extrato de *S. torques-reginae* ITEP-024 obtidos em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH ≈2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH ≈2.95) numa coluna Synergi 4μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. Shinorina: linha azul; porphyra-334: linha verde; micosporina-glicina-alanina: linha vermelha. Quantificador: linha contínua; qualificador: linha tracejada. 102

Figura 54. Concentração dos MAAs - shinorina (SH), porphyra-334 (P-334) e micosporina-glicina-alanina (MGA) – no extracto de *S. torques-reginae* ITEP-024 incubado por 5 h a diferentes temperaturas (-18 °C, 4 °C, 22 °C, 38 °C, 50 °C e 80 °C). Diferenças significativas foram reportados de acordo com os resultados da ANOVA de dois fatores: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$ 105

Figura 55. Cromatograma de íons extraídos do extrato de MAAs da cianobactéria *S. torques-reginae* ITEP-024, dissolvido em solvente de extração e mantido à temperatura ambiente, obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH ≈2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH ≈2.95) numa coluna Synergi 4μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. Shinorina: linha azul; porphyra-334: linha verde; micosporina-glicina-alanina: linha vermelha. 0 h: linha contínua; 48 h: linha tracejada. 106

Figura 56. Curva de correlação entre o peso seco (mg.mL⁻¹) e a densidade ótica a 750 nm numa cultura de *S. torques-reginae* ITEP-024..... 107

Figura 57. Sistemas de cultivo utilizados no ensaio experimental de otimização da produção de MAAs

– Condições de cultivo padrão (A) Dia 0 - Inoculação das culturas, (B) Dia 08, (C) Dia 18, (D) Dia 45, (E) Dia 61 - Final do experimento.	107
Figura 58. Peso seco (mg/mL) da cultura de <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024 ao longo de um experimento de 61 dias (calculado através da correlação da densidade optica com o peso seco) (n=3).	108
Figura 59. Sistemas de cultivo da cianobactéria <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024: (A) para produção de cultura em laboratório – culturas concentradas, prontas para o repique; (B) para os experimentos de otimização da produção de MAAs – culturas no início do experimento.	109
Figura 60. Concentração de MAAs (SH - shinorina, P-334 - porphyra-334 e MGA - micosporina-glicina-alanina) na cultura de <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024 ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$) ao longo de um experimento de 61 dias.....	110
Figure 61. Cromatograma de íons extraído do extrato de MAAs da cepa <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024 antes da exposição (linha contínua) e depois da exposição (linha tracejada) à radiação UVA+UVB. 1: shinorina, 2: porphyra-334, 3: micosporina-glicina-alanina.....	112
Figura 62. Concentração de MAAs (SH - shinorina, P-334 - porphyra-334 e MGA - micosporina-glicina-alanina) na cultura de <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024 ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$) antes da exposição (D0) e depois da exposição (D3) a diferentes composições de radiação.	113
Figura 63. Distribuição da concentração de MAAs nas linhagens de cianobactérias produtoras. SH – shinorina; P-334 – porphyra-334, MGA – micosporina-glicina-alanina. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão (n=3). As diferenças significativas são reportadas de acordo com os resultados obtidos pelo método t-student por comparação entre as mesmas cepas e MAAs em diferentes dias: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. DO - Dia 0, após inoculação; D3 - Dia 3, após 72 h de exposição a radiação PAR, UVA e UVB com fotoperíodo 12:12.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vários aminoácidos do tipo micosporina, seu máximo de absorção, massa molecular protonada, estrutura molecular e íons produto majoritários em modo positivo de ionização.	4
Tabela 2 – Principais íons-precusores e íons-produto propostos por Cardozo <i>et al.</i> , 2006 na Figura 6 para os MAAs palitina e shinorina ¹³³ .	22
Tabela 3 – Cepas de cianobactérias analisadas para identificação de espécies produtoras de MAAs.	30
Tabela 4 – Composição do meio líquido ASM-1 utilizado para o cultivo da cepa de cianobactéria ITEP-024.	35
Tabela 5 – Condições de cultivo das cepas de cianobactérias.	36
Tabela 6 – Métodos bibliográficos testados para a extração de MAAs.	38
Tabela 7 – Parâmetros testados para otimização do método de extração selecionado para a extração de MAAs.	39
Tabela 8 – Condições de eluição do método de separação cromatográfica de MAAs em HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio e (B) ACN/H ₂ O (8:2) + 0,1 % (v/v) ácido fórmico , numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) mantida a 30 °C, sob uma vazão de 0,4 mL.min ⁻¹ .	40
Tabela 9 – Condições de eluição do método anátilico de separação cromatográfica de MAAs selecionado em HPLC-DAD semi-preparativo utilizando os eluentes (A) 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH ₄ OH), (B) H ₂ O/MeOH/ACN (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 % numa coluna analítica Luna C18 (150x4,6 mm, 5 μ m) sob uma vazão de 0,5 mL.min ⁻¹ .	41
Tabela 10 – Condições de eluição do método cromatográfico de purificação de MAAs selecionado em HPLC-DAD semi-preparativo utilizando os eluentes (A) 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH ₄ OH), (B) H ₂ O/MeOH/ACN (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 % numa coluna semi-preparativa Luna C18 (2)	

(250x10,00 mm, 5 μ m) sob uma vazão de 3 mL.min ⁻¹	42
Tabela 11 – Parâmetros da fonte utilizados nos experimentos de espectrometria de massas.....	43
Tabela 12 –Transições selecionadas e parâmetros otimizados para as análises por MS ² . F – fragmentador; EC – energia de colisão; TR – tempo de retenção.....	44
Tabela 13 – Condições de eluição do método de separação cromatográfica de MAAs em LC-MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H ₂ O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min ⁻¹	45
Tabela 14 – Níveis da curva de calibração utilizados na validação do método de quantificação dos MAAs analisados.	48
Tabela 15 – Concentração final dos controles de qualidade (baixo, médio e alto) para cada MAA analisado.....	49
Tabela 16 – Condições de cultivo padrão definidas para os experimentos deste projeto.	53
Tabela 17 – Cianobactérias analisadas para quantificação de MAAs em experimento de indução com UVR.	56
Tabela 18 – Dados de RMN obtidos para micosporina-glicina-alanina isolada de ITEP 24 e comparação com os dados da literatura. Fonte: Miyamoto <i>et al.</i> , 2014 ³⁷ . Dados obtidos em 500 MHz (¹ H), em CD ₃ OD, unidades de <i>J</i> em Hz e deslocamento químico em ppm. ^{a)} Dados obtidos através do espectro de projeção de ¹³ C no experimento de HSQC (*) e HMBC (**).	66
Tabela 19 – Função proposta para as enzimas codificadas por <i>mysA-D</i> no aglomerado de genes biossintéticos de <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024. aa - Aminoácido.	74
Tabela 20 – Comparação baseada na similaridade protéica entre a proteína codificadora de <i>mysA</i> de <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024, três classes de enzimas de elevada similaridade para as funções propostas.....	74
Tabela 21 – Aminoácidos do tipo micosporinas encontrados nas cepas de cianobactérias analisadas e	

seus comprimentos de onda máximos (nm), tempos de retenção (TR - definidos neste estudo), massas calculadas (m/z) e fragmentos.....	79
Tabela 22 – Aminoácidos do tipo micosporinas identificados nas cepas de cianobactérias analisadas.	80
Tabela 23 – Parâmetros do método de extração de MAAs otimizado.....	94
Tabela 24 – Valores estimados de pKa dos grupos carboxílicos COOH-10 e COOH-12 representados em vermelho nas moléculas de MAAs da Figura 47.	95
Tabela 25 – Parâmetros de especificidade e selectividade para cada MAA: Fator de assimetria (As), Resolução (Rs), Tempo de retenção (TR), Precisão do tempo de retenção e Precisão do tempo de retenção inter-dia.	101
Tabela 26 – Parâmetros da curva de calibração para cada MAA: equação de regressão, coeficiente de correlação, intervalo, limite de detecção (LoD), limite de quantificação (LoQ), precisão e precisão inter-dia do tempo de retenção (TR) e efeito matriz.....	103
Tabela 27 – Precisão, exatidão e recuperação obtidas durante a validação do método de quantificação dos MAAs shinorina, porphyra-334 e micosporina-glicina-alanina. CQA: controle de qualidade alto; CQM: controle de qualidade médio; CQB: controle de qualidade baixo..	104
Tabela 28 – Aminoácidos do tipo micosporinas identificados nas cepas de cianobactérias analisadas utilizando o método de quantificação de MAAs por LC-MS/MS.	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹ H: Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio	HMBC: Espectroscopia heteronuclear de correlação entre múltiplas ligações
3-DHQ: 3-deshidroquinato	LC-MS: Espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida
4-DG: 4-desoxigadusol	LoD: Limite de detecção
A-330: Asterina-330	LoQ: Limite de quantificação
ACN: Acetonitrila	<i>m/z</i> : Razão massa-carga
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária	M: mol.L ⁻¹
As: Factor de assimetria	M-317: MAA de <i>m/z</i> 317
BPC: Cromatograma de pico base	M-MetS: Mycosporine-methylamine-serine
CC: Curva Calibração	M2G: Mycosporine-2-glycine
C: Concentração	MAAs: Aminoácidos tipo micosporinas
COSY: Espectroscopia de Correlação	MeOH: Metanol
CQ: Controle de Qualidade	MGA: micosporina-glicina-alanina
CV: Coeficiente de variação	min: Minuto
DW: dry-weight (peso seco)	MRM: Monitoramento de reações múltiplas
DAD: Detector de arranjo de díodos	MS ² : tandem MS
DHQ: Deshidroquinato	MS/MS: tandem MS
DHQS: Deshidroquinato sintase	N-EtPA: N-ethylpalythine
DPR: Desvio padrão relativo	N-MetPA: N-methylpalythine
DP: Desvio padrão	NH ₄ HCO ₂ : Formiato de amônio
EC: Energia de Colisão	NH ₄ OH: Hidróxido de amônio
ESI: Ionização por electrospray	NRPS: sintetase não ribossômica
FPS: Fator de proteção solar	O-MT: <i>O</i> -metiltransferase
HILIC: cromatografia líquida de interação hidrófila	P-334: porphyra-334
HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência	PA: Palythine
HRMS: Espectrometria de massas de alta resolução	PA-S: Palythine-serine
HSQC: Espectroscopia Heteronuclear de Coerência de Quantum Simples	

PA-T: Palythine- threonine	SH: shinorina
PAR: Radiação fotossinteticamente ativa	TFA: Ácido trifluoracético
PI: Padrão interno	THC: L-tiramina
PTFE: Politetrafluoretileno (Teflon)	TR: Tempo de retenção
QqQ: Triplo quadrupolo	UV: Ultravioleta
QTOF: Analisador quadruplo-tempo de vôo	UVA: Radiação ultravioleta A
RMN: Ressonância magnética nuclear	UVB: Radiação ultravioleta B
ROS: Espécies reativas de oxigênio	UVC: Radiação ultravioleta C
Rs: Resolução	UVR: Radiação ultravioleta
rpm: rotações por minuto	UV-Vis: ultravioleta-visível

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XXII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. RADIAÇÃO ULTRA-VIOLETA	1
1.2. CIANOBACTÉRIAS	2
1.3. AMINOÁCIDOS TIPO MICOSPORINAS	3
1.3.1. Estrutura e propriedades	3
1.3.2. Biossíntese de MAAs.....	7
1.3.3. Ocorrência e distribuição do MAAs no meio ambiente.....	10
1.3.4. Funções	11
1.3.5. Aplicação comercial dos MAAs.....	13
1.4. MÉTODOS DE ANÁLISE DE MAAS	18
1.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção no UV-Visível.....	18
1.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	18
1.4.3. Espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida.....	20
1.4.4. Validação de métodos para quantificação de MAAs em cianobactérias	23
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. REAGENTES E PADRÕES	29
3.2. CIANOBACTÉRIAS	29
3.2.1. Cepas de cianobactérias selecionadas	29
3.2.1. Manutenção dos cultivos de cianobactérias	35
3.2.2. Condições de cultivo laboratoriais.....	35
3.2.3. Análises genômica e filogenética	36

3.3. MÉTODOS DE ANÁLISE DE MAAS	38
3.3.1. Método de extração de MAAs	38
3.3.2. Método de detecção e identificação de MAAs em sistema HPLC-DAD-HRMS.....	39
3.3.3. Método de isolamento e purificação de MAAs em sistema HPLC-DAD.....	40
3.3.4. Análise via Ressonância Magnética Nuclear.....	42
3.3.5. Quantificação de MAAs em sistema LC-MS.....	43
3.3.6. Validação do método de quantificação.....	45
3.4. CULTIVOS PARA INDUÇÃO DE MAAS	51
3.4.1. Sistema de cultivo	51
3.4.1. Determinação do crescimento celular.....	52
3.4.2. Correlação entre parâmetros de crescimento para a cepa ITEP-024	52
3.4.3. Produção de MAAs nas condições de cultivo padrão	53
3.4.4. Indução de MAAs.....	53
3.4.1. Indução de MAAs na presença de inibidores da via do ácido chiquímico.....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1. SPHAEROSPERMOPSIS TORQUES-REGINAE ITEP-024 (ARTIGO – ANEXO 1)	57
4.1.1. Seleção da cianobactéria - objeto de estudo.....	57
4.1.2. Isolamento de MAAs via HPLC-DAD	58
4.1.3. Análise do extrato de <i>S. torques-reginae</i> ITEP-024 via HPLC-DAD-HRMS.....	59
4.1.4. Purificação do MAA de 316 Da via HPLC-DAD semi-preparativo	65
4.1.5. Elucidação estrutural do MAA de 316 Da.....	66
4.1.6. Análises genômica e filogenética	74
4.2. IDENTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE MAAS EM CIANOBACTÉRIAS VIA HPLC-DAD-HRMS (ARTIGO – ANEXO 2).....	79
4.3. QUANTIFICAÇÃO DE MAAS NO EXTRATO DE ITEP-024 (ARTIGO – ANEXO 3).....	91
4.3.1. Otimização do método de extração	91
4.3.2. Método de quantificação de MAAs via HPLC-MS.....	94
4.3.3. Validação do método analítico.....	98
4.4. PRODUÇÃO DE MAAS NA CEPA <i>S. TORQUES-REGINAE</i> ITEP-024	106
4.4.1. Correlação entre parâmetros de crescimento.....	106
4.4.2. Produção de MAAs nas condições de cultivo padrão	107
4.4.3. Indução de MAAs.....	111
4.5. PRODUÇÃO DE MAAS POR OUTROS MICROORGANISMOS (ARTIGO – ANEXO 3).....	114
4.5.1. Indução de MAAs.....	114
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	120

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
ANEXOS	143
ANEXO 1	144
<i>Genetic and biochemical evidence for redundant pathways leading to mycosporine-like amino acid biosynthesis in the cyanobacterium Sphaerospermopsis torques-reginae ITEP 024</i>	<i>144</i>
ANEXO 2	177
<i>Identification and distribution of mycosporine-like amino acids in Brazilian cyanobacteria by UHPLC-DAD-QTOF.</i>	<i>177</i>
ANEXO 3	206
<i>Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the quantification of mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) from cyanobacteria</i>	<i>206</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1. RADIAÇÃO ULTRA-VIOLETA

A radiação solar que chega à Terra é constituída pela radiação infravermelha (> 800 nm), visível (radiação fotossinteticamente ativa, PAR, 400-750 nm) e ultravioleta (UVR, 200-400 nm). A radiação ultravioleta divide-se em ultravioleta A (UVA, 320-400 nm), ultravioleta B (UVB, 280-320 nm) e ultravioleta C (UVC, 200-280 nm). Proporções muito pequenas de UVR contribuem para a irradiação total na superfície da Terra: 0 % de UVC (que é completamente absorvida pela camada de ozônio), menos de 1 % de UVB e menos de 7 % de UVA. No entanto, esta parte do espectro solar é altamente energética (Figura 1) ^{1,2}.

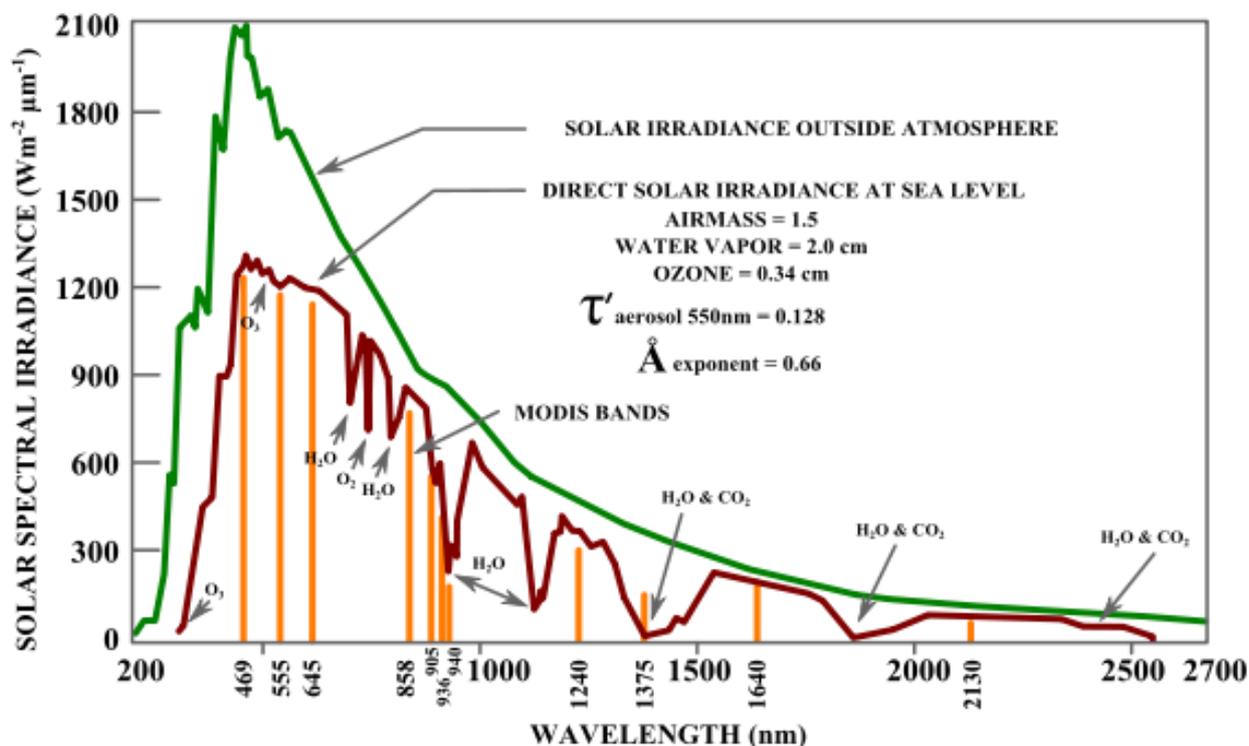


Figura 1. Espectro da irradiância solar acima da atmosfera (verde) e à superfície terrestre (vermelho). Fonte: Wikipedia ³.

Os ambientes terrestre e marinho sempre estiveram sujeitos à UVR. No entanto, com a diminuição da camada de ozônio pela emissão de poluentes atmosféricos, como clorofluorcarbonos, organoclorados e organobromados, gerou um aumento no fluxo de UVR que atinge a superfície da

Terra afetando negativamente os sistemas biológicos^{2,4-7}. Os danos causados pela exposição excessiva à UVR podem levar a uma diminuição da biomassa fotossintetizante que poderá refletir-se numa diminuição da fixação do ácido carbônico atmosférico, da biodiversidade aquática e, conseqüentemente, de toda a cadeia alimentar^{7,8}.

1.2. CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias são microorganismos procariontes unicelulares e multicelulares que apresentam grande variabilidade morfológica e podem ser encontrados em diversos ecossistemas^{9,10}. Estima-se que tenham surgido há cerca de 2,4 bilhões de anos, sendo provavelmente os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva^{11,12}. Ainda hoje desempenham um papel essencial na oxigenação da atmosfera terrestre devido à sua atividade fotossintética¹¹ e são importantes produtores de biomassa tanto nos ecossistemas aquáticos como nos terrestres, além de terem um papel importante nos ciclos biogeoquímicos¹². Como são organismos predominantemente fotoautotróficos, a luz é um dos fatores determinantes para o seu crescimento e metabolismo, sendo o seu principal pigmento de captação da luz solar a clorofila-*a*. As cianobactérias utilizam a radiação PAR para converter luz em energia química, no entanto, este processo resulta numa exposição prolongada à UVR, que pode incorrer diretamente em danos celulares devido a reações fotoquímicas, ou indiretamente através do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS)¹³. De forma a atenuar os efeitos negativos da UVR, as cianobactérias e outros organismos aquáticos desenvolveram diversas estratégias adaptativas, entre elas a movimentação vertical na coluna de água, a produção de antioxidantes, a reparação do DNA e a síntese de compostos fotoprotetores, nomeadamente os aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) e as scitoneminas^{12,14,15}.

1.3. AMINOÁCIDOS TIPO MICOSPORINAS

1.3.1. Estrutura e propriedades

Os aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs) são metabólitos secundários pequenos, incolores e solúveis em água. São moléculas altamente polares, de baixa massa molar ($< 400 \text{ g.mol}^{-1}$) e com alta absorvidade molar ($\epsilon = 28\ 100 - 50\ 000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Estes compostos são capazes de dissipar eficazmente a radiação absorvida como calor, sem a produção de ROS^{12,16-18}. Os MAAs absorvem a radiação principalmente na região UVA (320-400 nm), no entanto, alguns MAAs possuem absorção máxima na região UVB (280-320 nm), como a micosporina-glicina (310 nm). Os máximos de absorção dos MAAs conhecidos variam entre 309 e 362 nm¹⁸. Em termos estruturais, os MAAs são compostos por um anel ciclohexenona ou ciclohexenimina (Figura 2)¹⁵.

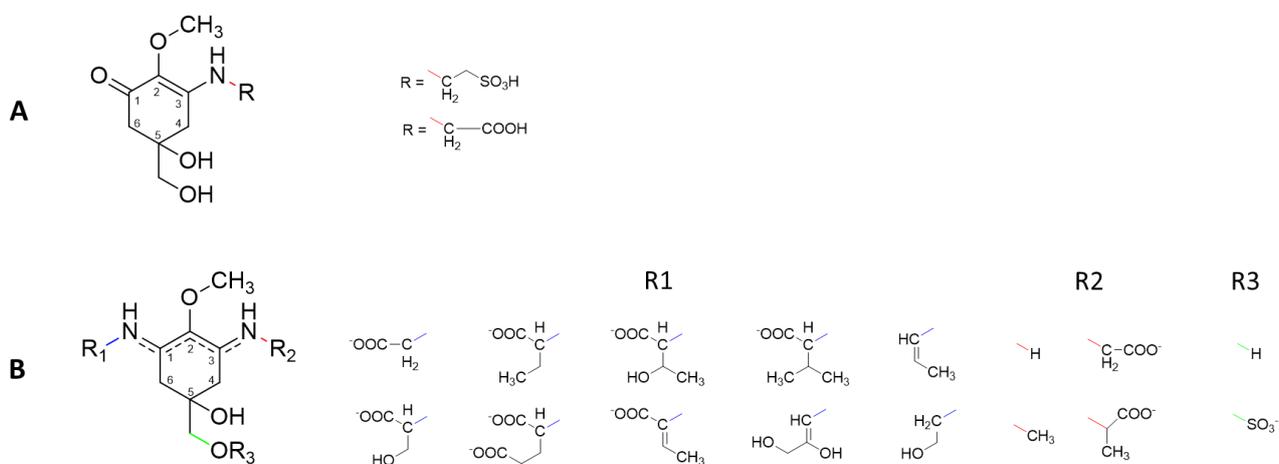
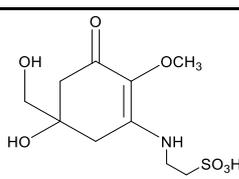
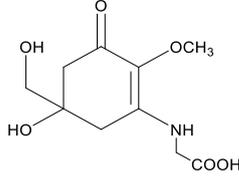
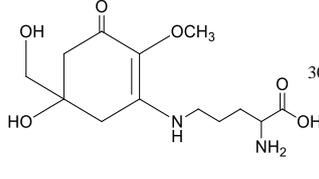
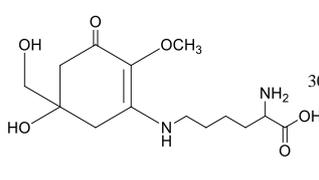
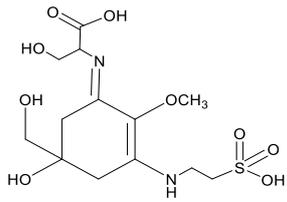
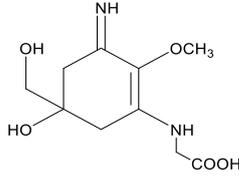


Figura 2. Estrutura geral dos aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs): A) amino-ciclohexenona; B) amino-ciclohexenimina. Adaptado de Carreto & Carignan, 2011¹⁸.

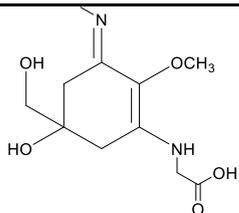
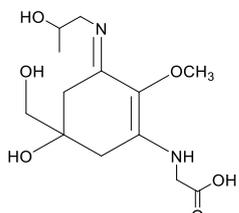
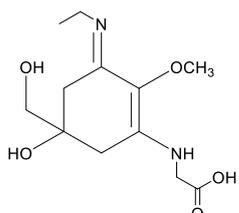
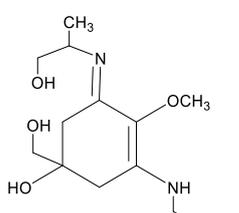
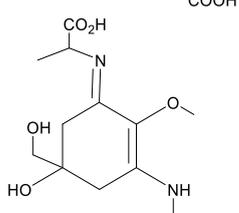
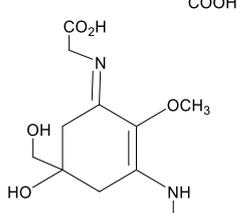
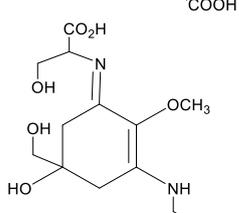
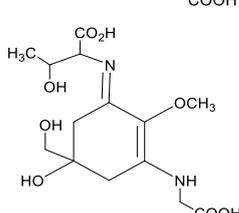
Os derivados de amino-ciclohexenona possuem a ciclohexenona conjugada com um aminoácido e incluem, por exemplo, a micosporina-glicina e a micosporina-aurina². Aqueles que são derivados de ciclohexenimina geralmente possuem um aminoácido glicina ligado na posição C-3 e outro aminoácido, um aminoálcool ou grupo amino ligado na posição C-1¹⁸. Além disso, a glicina pode ser substituída por uma metilamina¹⁹, e dentro do grupo imina podem ocorrer ligações glicosídicas ou ésteres de sulfato^{20,21}. Este grupo inclui, por exemplo, a shinorina, a porphyra-334 e a palitina². A diversidade estrutural entre MAAs é conseguida através da ligação de diferentes aminoácidos ao

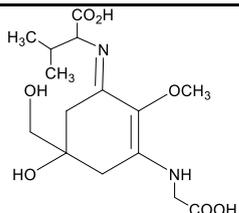
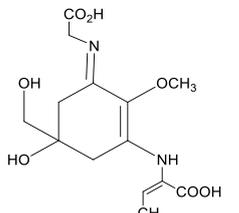
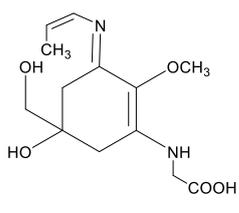
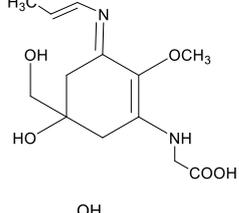
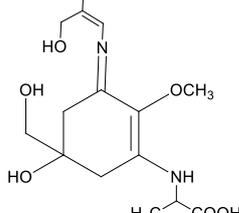
núcleo, que pode ser posteriormente modificado pela descarboxilação ou desmetilação, resultando em alterações na absorção da UVR ^{2,18}. Até ao presente mais de 33 MAAs foram relatados em vários organismos ²²⁻²⁵, para além dos seus derivados glicosilados^{21,26}. A Tabela 1 apresenta a estrutura molecular, o comprimento de onda de máximo de absorção no UV, a massa molecular protonada e os fragmentos majoritários de alguns dos MAAs conhecidos.

Tabela 1 – Vários aminoácidos do tipo micospolina, seu máximo de absorção, massa molecular protonada, estrutura molecular e iões produto majoritários em modo positivo de ionização.

MAAs	λ_{max} (nm)	[M+H] ⁺	Fragmentos	Estrutura molecular	Ref.
Mycosporine-aurine	309	296.1	57, 186, 236, 263, 277	<chem>C10H17NO7S</chem> 	27,28
Mycosporine-glycine	310	246.1	57, 85, 100, 118, 144, 171, 232	<chem>C10H15NO6</chem> 	27,29
Mycosporine-ornithine	310	303.2	191, 235, 267	<chem>C13H22N2O6</chem> 	30
Mycosporine-lysine	310	317.2	281	<chem>C14H24N2O6</chem> 	30
Catenelline	320	383.1		<chem>C13H22N2O9S</chem> 	31
Palythine	320	245.1	130, 137, 168, 186, 197, 199, 209, 230	<chem>C10H16N2O5</chem> 	27,29,32

MAAs	λ_{\max} (nm)	$[M+H]^+$	Fragmentos	Estrutura molecular	Ref.
Palythine-serine-sulfate	320	355.1			20
Palythine-serine	320	275.1	260		33
Palythine-threonine	321	289.1	172, 230, 256, 274		19
Mycosporine-methylamine-serine	325	290.1	274		33
Mycosporine-methylamine-threonine	327	304.2			34
Palythine-threonine-sulfate	330	369.1			20
Asterina-330	330	289.1	81, 124, 168, 186, 198, 209, 230, 243, 274		20,35
Mycosporine-glutamic acid-glycine	330	375.1	118, 176, 192, 228, 258, 297, 331		27,29

MAAs	λ_{\max} (nm)	$[M+H]^+$	Fragmentos	Estrutura molecular	Ref.
N-methylpalythine = Aplysiapalythine C	330	259.1			36
N-isopropanolpalythine = Aplysiapalythine A	332	303.1			36
N-ethylpalythine = Aplysiapalythine B	332	273.1			36
Palythinol	332	303.2	102, 150, 186, 199, 230, 244, 288		27,29,32,35
Mycosporine-glycine-alanine (produto de expressão heteróloga)	333	317.1	186, 214, 258, 302		37
Mycosporine-2-glycine	334	303.1	151, 164, 185, 200, 244, 288		28,38
Shinorine	334	333.1	57, 71, 137, 186, 230, 241, 255, 274, 298, 303, 318		27,29,32,35
Porphyra-334	334	347.1	186, 227, 288, 303, 332		29,32,35

MAAs	λ_{\max} (nm)	[M+H] ⁺	Fragmentos	Estrutura molecular	Ref.
Mycosporine-glycine-valine	335	345.2	116, 118, 131, 184, 198, 268, 295	<chem>C15H24N2O7</chem> 	27,29
Palythenic acid	337	329.1	138, 193, 197, 205, 237, 268, 283, 296	<chem>C14H20N2O7</chem> 	29,35,39
Usujirene (cis isomer)	357	285.1	197, 226, 241, 270, 285	<chem>C13H20N2O5</chem> 	40,41
Palythene (trans isomer)	360	285.1	139, 185, 197, 205, 223, 241	<chem>C13H20N2O5</chem> 	27,29,35
Euhalothece-362	362	331.1	213, 228, 242, 272, 316	<chem>C14H22N2O7</chem> 	38

1.3.2. Biossíntese de MAAs

Diversos estudos de longa data sugerem que a biossíntese dos MAAs ocorre pela via do ácido chiquímico^{15,42}. O 3-deshidroquinato (3-DHQ) era convertido no precursor de MAAs, 4-desoxigadusol (4-DG), formando-se posteriormente ciclohexenonas (gadusol) dando origem aos diferentes análogos de MAAs^{15,29,43}. Esta proposta biossintética é apoiada por experimentos realizados mostrando que a produção de MAAs é bloqueada após a aplicação do glifosato, um inibidor específico da via do do ácido chiquímico^{44,45}. No entanto, esta área tem sido alvo de estudos recentes e a biossíntese de MAAs pela via do ácido chiquímico tem sido questionada^{30,46-48}. A

expressão heteróloga dos *clusters* de genes biossintéticos de MAAs realizada por Balskus *et al.*, 2010 e a utilização de inibidores de via e deleção de genes por Pope *et al.*, 2015 revelaram que tanto a via da pentose-fosfato quanto a via do ácido chiquímico estão envolvidas na biossíntese de MAAs ^{46,47}. De acordo com estes autores, a biossíntese de MAAs começa com o intermediário sedoheptulose-7-fosfato (SH-7-P), produzido pela via da pentose-fosfato que é convertido em 4DG pelas enzimas deshidroquinato sintase (DHQS) YP_324358 e *O*-metiltransferase (*O*-MT) YP_324357 ^{46,47,49}. A combinação destes dois genes (DHQS e *O*-MT) apenas foi encontrada em cianobactérias com capacidade de síntese de MAAs estando ausente em espécies que não sintetizam estes compostos. Análises filogenéticas de estudos anteriores revelaram que esses dois genes foram transferidos de cianobactérias para dinoflagelados e, finalmente, para metazoários por transferência horizontal de genes ⁴⁹. Este fato vem suportar o possível envolvimento destes dois genes na biossíntese de MAAs uma vez que estes compostos também estão presentes em outros organismos e pensa-se que tenham sido passados pelas cianobactérias na linha plasmídica ^{29,50}. O 4-DG formado é, posteriormente, ligado a uma glicina através do homólogo de ATP YP_324356 (Ava_3856), uma enzima ATP-grasp, formando a micosporina-glicina. Os três genes das enzimas DHQS, *O*-MT e ATP-grasp são considerados essenciais para a biossíntese da micosporina-glicina, enquanto outros genes são necessários para produzir outros análogos de MAAs ⁵¹ (Figura 3).

O último passo na biossíntese de MAAs, como a shinorina, consiste na adição de um aminoácido à micosporina-glicina e pode ocorrer através de dois tipos de enzimas, uma sintetase não ribossômica (NRPS) YP_324355 (Ava_3855) que é codificada pelo *cluster* "Anabaena-type" ⁴⁶ ou, alternativamente, através de uma enzima D-Alanina-D-Alanina ligase codificada pelo *cluster* "Nostoc-type" ^{37,47}. No entanto, os genes responsáveis pela formação de muitos outros análogos de MAAs ainda não foram identificados, sendo esta área muito importante na engenharia genética e no desenvolvimento de protetores solares de próxima geração ⁵².

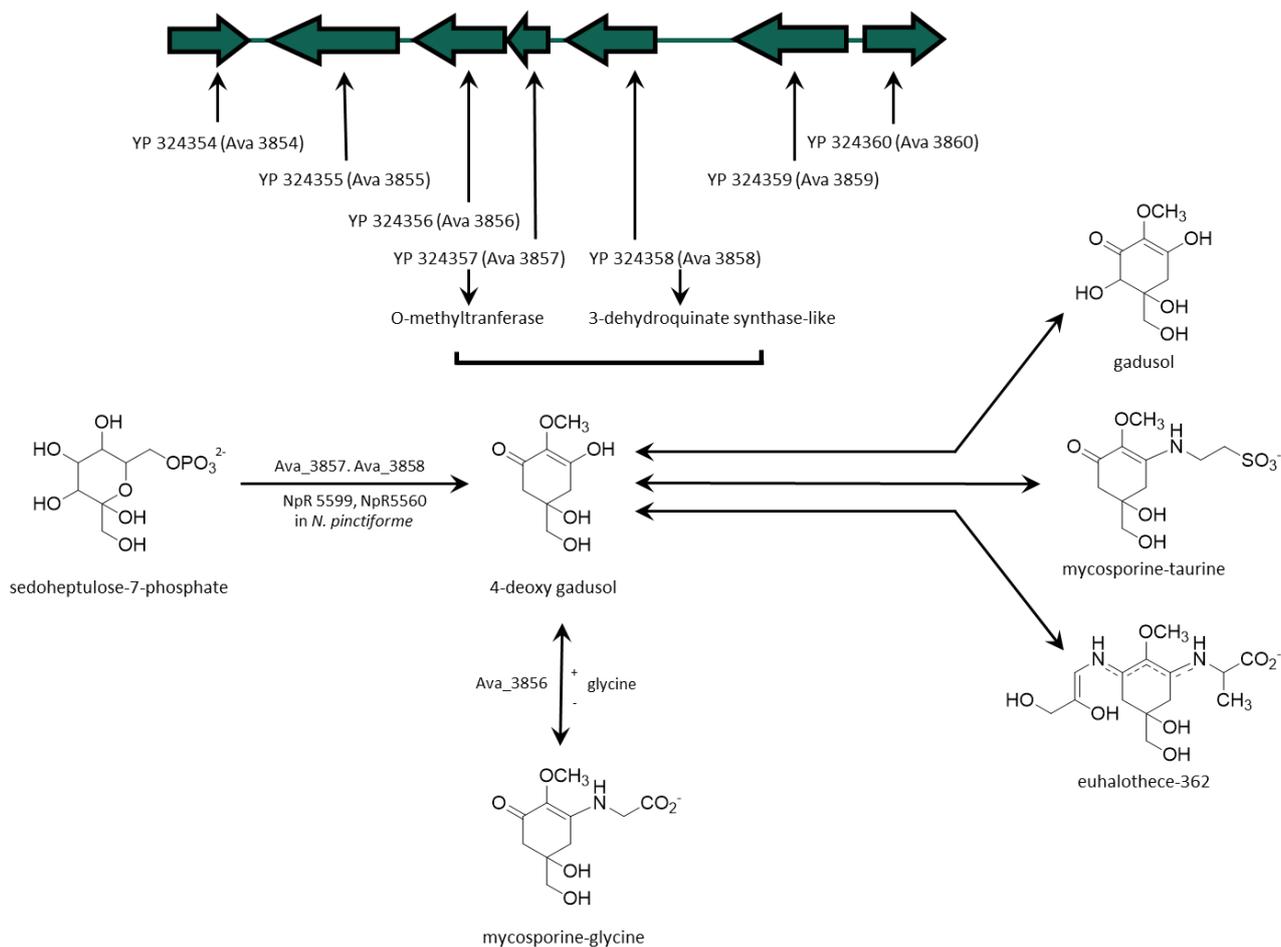


Figura 3. Bissíntese de MAAs, suas conversões bioquímicas e o papel proposto dos genes. Adaptado de Carreto & Carignan 2011¹⁸.

Geralmente, a biossíntese de MAAs não é específica para cada espécie e é influenciada por diversos fatores abióticos⁵³. Estes influenciam não só a sua concentração como também a diversidade dos MAAs presentes nos organismos. A biossíntese dos MAAs é regulada em particular pela distribuição espectral^{42,54-61} e intensidade da radiação solar^{22,42,62}. No entanto, diversos estudos demonstram que a indução dos MAAs também pode ser influenciada por outros fatores abióticos como a temperatura⁵⁶, o fotoperíodo⁵⁸, a salinidade^{45,61,63} e a concentração de nutrientes^{61,64-66}. Alguns estudos referem ainda que a condição de crescimento fotoheterotrófico também pode aumentar a produção de MAAs em cianobactérias⁶⁷.

1.3.3. Ocorrência e distribuição do MAAs no meio ambiente

Os MAAs estão amplamente distribuídos pelo meio ambiente⁶⁸. A sua presença foi detectada pela primeira vez em cianobactérias e várias espécies de corais da Grande Barreira de Corais⁶⁹. Estudos indicaram que muitos grupos taxonomicamente variados de organismos marinhos e terrestres, de latitudes tropicais a regiões polares, desenvolveram a capacidade de sintetizar, acumular e metabolizar MAAs^{12,15,18,22-25,54,70}. Os MAAs estão presentes particularmente em organismos que vivem em ambientes com elevada radiação UV. A capacidade de produção de MAAs foi observadas em bactérias heterotróficas marinhas, cianobactérias, micro e macroalgas, fungos e líquenes^{12,15,25}. Diversos estudos descrevem que os MAAs também estão presentes em diversos animais como rotíferos, artrópodes, moluscos, equinodermatas e peixes^{15,24,25,71}. Uma vez que a via do ácido chiquímico está ausente em animais, os autores que defendem esta via para a biossíntese de MAAs acreditam que estes organismos obtenham os MAAs por meio da dieta ou de simbiose, e, posteriormente, os acumulem ou intraconvertam-nos a outras formas de MAAs para funcionar como moléculas fotoprotetoras, adquirindo desta forma proteção contra a UVR^{15,16,25,72}. No entanto, Osborn *et al.*, (2015) relataram que peixes são capazes de sintetizar gadusol e que as vias análogas também ocorrem em anfíbios, répteis e aves⁷³. MAAs foram já localizados no tecido ocular, na pele, especialmente na superfície dorsal, no muco externo, nos ovos, nos tecidos reprodutivos (ovários) e no rastro digestivo de peixes de recifes de águas rasas tropicais^{15,16,73}. Como referido, a concentração e composição dos MAAs dependem de vários fatores, incluindo a dieta. Os animais carnívoros acumulam níveis de MAAs muito mais baixos que os herbívoros⁷⁴. Quanto à diversidade dos MAAs, esta varia dependendo do grupo taxonômico. Shinorina, palitina e asterina-330 são mais comuns em algas, invertebrados e cordados, respectivamente⁷⁴. Além disso, foi identificada a coexistência simultânea de vários MAAs com diferentes absorvâncias máximas nas regiões UVA e UVB. Este fenômeno permite uma fotoproteção mais eficaz do que com a presença de apenas um desses compostos. Até ao presente, a composição mais rica de MAAs foi observada no coral *Stylophora pistillata*⁷⁵.

1.3.4. Funções

O papel dos MAAs nos seres vivos ainda se encontra em discussão. A maioria dos estudos sobre MAAs está focada em sua capacidade fotoprotetora. No entanto, são metabólitos secundários multifuncionais que possuem muitas funções celulares, como atividade antioxidante, regulação osmótica, controle da reprodução, reservatórios de nitrogênio ¹⁵.

FOTOPROTEÇÃO

A função mais estudada dos MAAs é a fotoproteção ^{15,42,76,77}. Diversos estudos demonstram que os MAAs possuem eficientes propriedades de absorção da UVR, tanto na região UVA (320-400 nm) como UVB (280-320 nm). Em muitos organismos observou-se a síntese e o acúmulo destes compostos em concentrações elevadas quando expostos à UVR, tanto em ambiente natural como em condições experimentais ^{15,58,78,79}. Além disso, possuem altos coeficientes de extinção molar e resistência a vários fatores abióticos de stress o que os evidencia como compostos fotoprotetores eficientes ^{71,80-82}. Esses compostos protegem a célula devido à sua capacidade de dispersar a UVR em energia térmica que se dissipa no ambiente sem formar ROS ^{78,83}. A eficiência fotoprotetora dos MAAs depende da sua posição na célula. Estes compostos foram encontrados principalmente no citoplasma de várias espécies de cianobactérias, no entanto, em algumas espécies, os MAAs são excretados e acumulados extracelularmente, resultando em uma proteção mais efetiva contra a UVR ². A presença de MAAs em animais marinhos confirma sua função de fotoproteção não apenas para os produtores, mas também para herbívoros e carnívoros ³⁵.

ANTIOXIDANTE

Alguns MAAs podem ainda possuir funções antioxidantes, prevenindo danos celulares resultantes da produção de ROS ^{17,84-86}. Sugere-se que certos MAAs, como a micosporina-glicina e a micosporina-aurina, exibam uma forte atividade antioxidante ^{35,83,84}. A micosporina-glicina reduz efetivamente a quantidade de oxigênio singlete formado e suprime os efeitos adversos da fotossensibilização em sistemas biológicos. Sua alta eficácia antioxidante está provavelmente relacionada ao menor potencial

de redução e maior capacidade de doar elétrons para estabilizar e inativar os radicais livres⁸⁴. A asterina-330, em combinação com a palitina, também é caracterizada por uma alta atividade antioxidante, embora significativamente menor que a micosporina-glicina e ácido ascórbico. Além disso, inibe efetivamente a oxidação do β -caroteno, um indicador de proteção da peroxidação lipídica. Outras imino-micosporinas como shinorina e porphyra-334 mostram menos atividade ou sua ausência¹⁷.

PROTEÇÃO CONTRA FATORES ABIÓTICOS

Alguns estudos demonstraram que os MAAs podem aumentar a tolerância celular a fatores abióticos, como salinidade, dessecação e temperatura². Um ambiente hipersalino pode levar à desidratação das células e ao acúmulo de ROS, o que resulta na geração de estresse oxidativo. Assim, os MAAs fornecem equilíbrio osmótico para as células^{14,15,83}. Os MAAs também contribuem para o aumento da resistência dos organismos a condições em que a água se torna um fator limitante. Altas concentrações de MAAs glicosilados foram relatadas na matriz extracelular ou bainha ao redor de microorganismos. No entanto, a presença apenas dessas substâncias não oferece proteção suficiente contra o estresse hídrico⁸⁷.

OUTRAS FUNÇÕES

Além do descrito, várias outras funções são atribuídas aos MAAs. São considerados metabólitos reguladores da reprodução em invertebrados marinhos^{15,83}. Os MAAs são também considerados reservatórios de nitrogênio intracelular. As moléculas de MAA contêm um ou dois átomos de nitrogênio, que podem ser liberados quando necessário⁸³. Outra função proposta para os MAAs está relacionada com o seu papel teórico como pigmentos acessórios na fotossíntese. Assume-se que os MAAs são compostos fluorescentes que convertem os raios UV em luz utilizada para a fotossíntese, o que aumenta sua eficiência^{78,83,88}. No entanto, esta alegação ainda não foi verificada, porque os MAAs exibem uma baixa fluorescência. Além disso, o estudo de Kicklighter, *et al.*, 2011 demonstrou que alguns MAAs, tais como a asterina-330, aplysiapalythine A e aplysiapalythine B, desempenham

um papel na conectividade ecológica entre os organismos, como sinais de alarme intraespecíficos para lebres do mar (*Aplysia californica*), sugerindo que eles podem funcionar como moléculas de importância fundamental nos ecossistemas marinhos. A maior concentração de aplysiapalythine A e B foi demonstrada nas secreções defensivas e na pele desses organismos ⁸⁹.

1.3.5. Aplicação comercial dos MAAs

A pele atua como uma barreira aos efeitos nocivos da UVR e de substâncias químicas exógenas. A UVR divide-se em UVA, UVB e UVC, porém devido ao ozônio atmosférico que absorve a UVC, a UVR atmosférica é predominantemente UVA (90% –95%) e UVB (5% –10%). A UVR que penetra na pele é dependente do seu comprimento de onda. A UVA, com comprimento de onda mais longo, penetra mais profundamente na pele atingindo a derme. Por outro lado, a UVB é quase completamente absorvida pela epiderme, atingindo a derme apenas ligeiramente em comparação com a UVA (Figura 4).

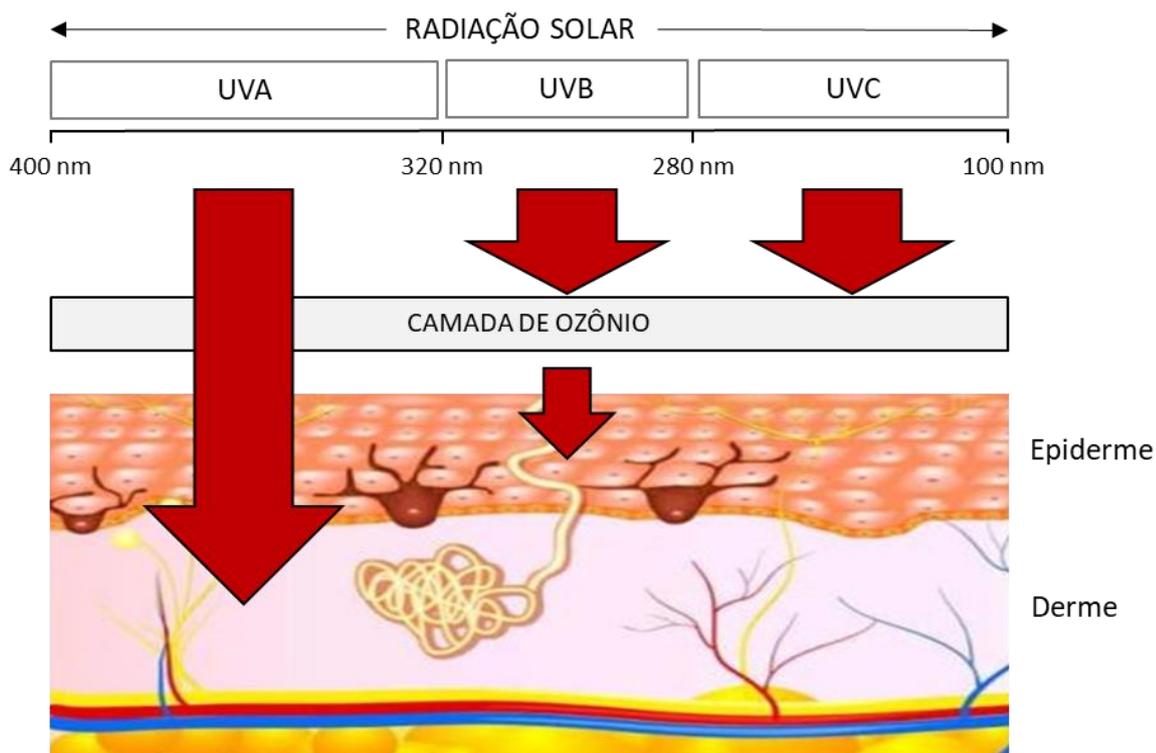


Figura 4. Espectro eletromagnético da radiação ultravioleta. Adaptado de D’Orazio *et al.*, 2013 ⁹⁰.

A UVA é eficiente na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem danificar o DNA por meio de reações fotossensibilizadoras indiretas. A UVB é diretamente absorvida pelo DNA, causando rearranjos moleculares e formando os fotoprodutos específicos⁹⁰. Os efeitos clínicos da UVB incluem eritema (queimaduras solares), pigmentação (bronzamento), edema, espessamento das dobras cutâneas, reações fototóxicas, fotossensibilidade e fotoimunossupressão⁹¹. Outros efeitos desta radiação incluem fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento, também mediados pela UVA⁹². Desta forma, o uso de protetores solares, que têm como função proteger a pele da UVR, é imprescindível no dia-a-dia, principalmente em épocas de radiação solar mais forte. Segundo Armstrong & Kricke, a proteção solar terá maior efeito se estes hábitos forem aplicados o mais cedo possível na vida⁹³. No Brasil, a maior consciencialização da população em relação aos riscos da exposição da pele ao sol impulsionou este mercado, tornando o país no segundo maior consumidor mundial destes produtos⁹⁴⁻⁹⁶. Em 2014, o país respondeu por uma fatia de aproximadamente 20% do mercado mundial e 82% do mercado na América Latina. Além dos protetores solares tradicionais este mercado aposta ainda em novos produtos, nomeadamente maquiagem e hidratantes faciais com proteção solar e produtos que aliam proteção e bronzamento⁹⁵. Estas inovações abrem espaço para a biotecnologia neste setor estimulando a área de Pesquisa & Desenvolvimento no estudo de novas formulações de produtos que apresentem mais benefícios para o consumidor.

Muitos produtos sintéticos e naturais com proteção UVR estão disponíveis no mercado. Nestes produtos são utilizados, como ingredientes fotoprotetores, filtros orgânicos (p. e. oxibenzona, avobenzona, ácido aminobenzóico) ou filtros físicos (p. e. dióxido de titânio, óxido de zinco). No entanto, os dois tipos de filtros têm problemas, pois nenhum é totalmente eficiente contra as radiações UVA e UVB, ou suficientemente estável, sendo necessária a combinação de diversos filtros⁹⁷.

Diversos estudos têm demonstrado que o uso regular de filtros orgânicos sintéticos pode afetar a saúde humana^{80,98-100}. Estes filtros estão associados a reações alérgicas ou foto-toxicidade, distúrbios

endócrinos, penetração cutânea, baixa fotoestabilidade e biodegradabilidade e falta de eficácia na proteção da pele ^{80,98-100}. Estes filtros estão também associados a problemas relacionados com a sua acumulação no organismo humano ¹⁰¹. Além disso, os filtros orgânicos não são ambientalmente sustentáveis causando um impacto negativo nos recifes de coral e outras formas de vida marinha ¹⁰². Estes filtros estão se acumulando em águas costeiras e continentais, induzindo um rápido e completo branqueamento de corais duros mesmo em concentrações extremamente baixas ⁸⁰. Este fato, levou o Havai a assinar um projeto-lei em 2018 que proíbe oficialmente alguns tipos de filtros solares, nomeadamente a oxibenzona ou octinoxato ¹⁰³.

Os filtros físicos são considerados menos agressivos para o ser humano, no entanto, também estão associados ao impacto negativo sobre o ambiente marinho ¹⁰⁴. Outra desvantagem destes filtros é o fato de criarem uma película branca e opaca quando aplicados sobre a pele, que leva o utilizador a rejeitar o produto optando por outros com maior risco para a sua saúde ¹⁰⁵. Além disso, a exposição a micro e nanopartículas desses filtros pode produzir efeitos tóxicos ⁸⁰. Devido a estes fatores, o mercado está recetivo a novas linhas de produtos de proteção solar, mais naturais, que incorporem filtros solares de alta proteção contra a UVR utilizando baixas concentrações de filtros químicos e que sejam mais benéficos para a pele e para o ambiente. A descoberta de novos agentes ativos, como os de origem marinha, é atualmente foco de intensa pesquisa ⁸⁰.

Entre os diversos compostos naturais que absorvem UVR atualmente pesquisados, estão os flavonóides como quercetina e rutina (compostos polifenólicos) presentes em morangos, uvas, maçãs e vegetais, algumas isoflavonas como a genisteína e a daidzeína, e os aminoácidos do tipo micosporinas ⁸⁰. Os MAAs destacam-se pela sua capacidade fotoprotetora contra os efeitos adversos tanto da radiação UVB como UVA ^{51,90,113}, pela alta estabilidade numa ampla faixa de temperatura e pH ^{41,53,78,80,82,106} e pelas suas propriedades antioxidantes ^{17,84,86}. de la Coba *et al.*, 2019 demonstraram que protetores solares contendo uma combinação de MAAs purificados em percentagens similares

aos filtros solares químicos (cerca de 5 %) apresentaram valores de FPS semelhantes e fornecem excelentes capacidades fotoprotetoras *in vitro* contra as principais lesões causadas pela UVR (Figura 5) ⁸⁰.

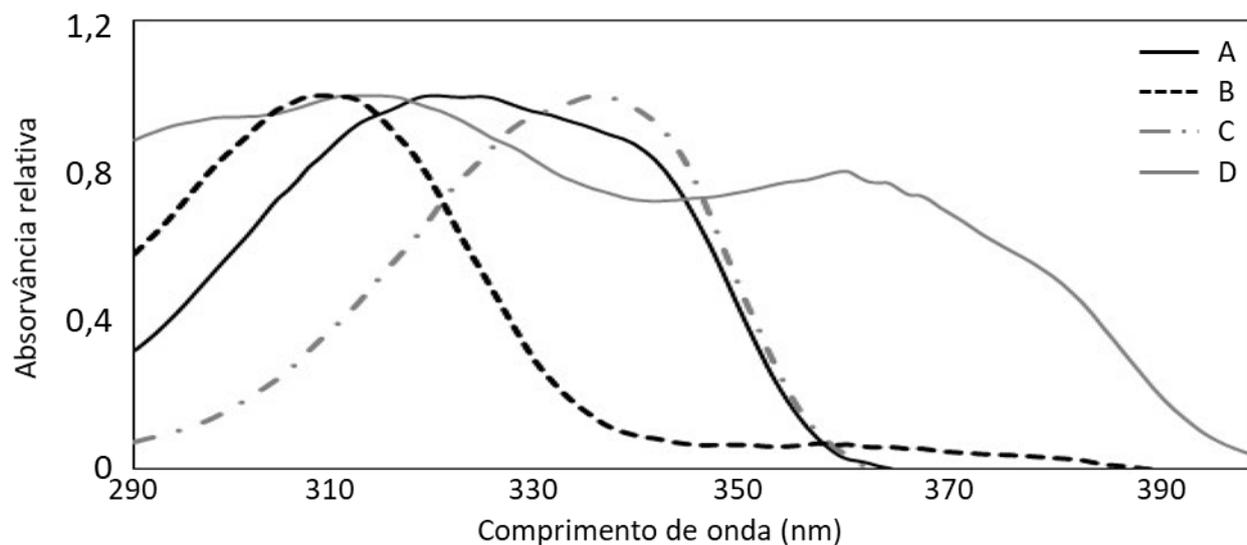


Figura 5. Espectro de absorção e comprimento de onda crítico para os ingredientes fotoprotetores: (A) Porphyra-334 + Shinorina (88:12) e Metil-Serina (OH) + MAA desconhecido (84:16); (B) Metil-Serina (OH) + MAA desconhecido (84:16) ; (C) Porphyra-334 + Shinorina (88:12); (D) butylmethoxydibenzoylmethane (BMDM) and octylmethoxycinnamate (OMC). Fonte: de la Coba *et al.*, 2019 ⁸⁰.

Outros estudos demonstraram que os MAAs micosporina-glicina, shinorina e porphyra-334 apresentam funções protetora e proliferativa quando testados em células humanas de fibroblasto após irradiação com UV ¹⁰⁷. Alguns MAAs têm também capacidade de proteger a pele humana contra o envelhecimento prematuro ¹⁰⁸. Hartman *et al.*, 2015 demonstraram recentemente que os MAAs shinorina, porphyra-334 e palitina evitam o fotoenvelhecimento inibindo a atividade da enzima colagenase por inibição competitiva ¹⁰⁹. Devido às suas características fotoprotetoras e antioxidantes naturais os MAAs têm elevado potencial biotecnológico podendo ser aplicados nas indústrias farmacêutica e cosmética, em protetores solares e em produtos para prevenção e tratamento de problemas da pele como fotodermatites, queimaduras solares, fotoenvelhecimento e câncer de pele ^{76,78,110-112}. No entanto, do ponto de vista econômico, é necessário produzir uma elevada quantidade de biomassa para produzir protetores solares apenas com MAAs, como filtro solar

exclusivo. Dependendo do organismo utilizado o rendimento de produção pode variar muito. de la Coba *et al.*, 2019 conseguiram um rendimento entre 40-50 % na purificação dos MAAs estudados ⁸⁰. Além disso, no Brasil a ANVISA exige a utilização de filtros solares específicos em fórmulas de proteção solar ¹¹³. Neste caso, a combinação de diferentes filtros solares é sempre necessária até que haja uma alteração na legislação em vigor. Assim, os MAAs podem ser bons candidatos para serem usados em conjunto com outros filtros solares comerciais.

O estudo de Colabella *et al.*, 2015 apresenta uma lista de algumas patentes existentes para a utilização de MAAs em produtos de fotoproteção ¹¹⁴. A maioria das patentes analisadas foi desenvolvida com organismos de ambientes marinhos. Nas patentes analisadas, pode-se observar um claro predomínio das algas multicelulares como fonte de protetores solares naturais. Atualmente já existem no mercado mundial algumas empresas que comercializam extratos de MAAs para a produção de produtos cosméticos com fotoproteção. Na Suíça, a Mibelle AG Biochemistry desenvolve compostos ativos naturais. O Helioguard 365 e o Noriguard são as duas matérias-primas que esta empresa comercializa que contêm MAAs (principalmente porphyra-334, shinorina e palitina) da alga vermelha *Porphyra umbilicalis* ¹¹⁵. Em França, a Gelyma, comercializa a matéria-prima Helionori que, tal como o Helioguard 365, também é composta por três MAAs (palitina, porphyra-334 e shinorina) da alga vermelha *Porphyra umbilicalis* ¹¹⁶. É importante investir esforços na exploração de MAAs em diferentes tipos de ambientes, para aumentar a diversidade de fontes disponíveis como alternativas de proteção solar com potencial aplicação industrial. Claramente, há muito trabalho ainda a ser feito, uma vez que os microorganismos unicelulares apresentam várias vantagens de produção, como a taxa de crescimento e a relativa simplicidade do cultivo que influenciam o custo da produção em escala industrial ¹¹⁴.

Outro processo que tem sido estudado para viabilizar a utilização de MAAs nos protetores solares é o desenvolvimento de análogos sintéticos. Diversos análogos de MAAs foram desenvolvidos e

testados para fins comerciais ¹¹⁷. Entretanto, a síntese total destes compostos é bastante difícil pois, apesar de serem estruturalmente pequenos, os MAAs possuem um esqueleto carbônico complexo. Alguns estudos referem que as substâncias obtidas não possuem a capacidade de absorver grandes quantidades de energia, sendo necessária a incorporação de outros grupos funcionais à molécula de modo a aumentar o seu potencial fotoprotetor ¹¹⁸. O análogo sintético da micospolina-glicina, tetra-hidropiridina ^{119,120}, foi considerado hidroliticamente e oxidativamente estável para aplicação comercial em protetores solares. Apesar disso, estes análogos sintéticos de MAAs apenas substituem os ingredientes sintéticos atualmente utilizados em produtos fotoprotetores, não satisfazendo a lacuna que existe no mercado para compostos fotoprotetores naturais.

1.4. MÉTODOS DE ANÁLISE DE MAAS

1.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção no UV-Visível

O método mais utilizado para a detecção e isolamento de MAAs é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção no UV-Visível ^{19,75,121-124}. A identificação geralmente é feita comparando o perfil dos espectros de absorção no UV (geralmente entre 310 e 340 nm) e o tempo de retenção (TR) com padrões de MAAs. Embora este método seja bastante sensível devido ao elevado coeficiente de extinção (ϵ) dos MAAs, uma das principais desvantagens é a falta de seletividade, uma vez que outros MAAs coeluinto ou mesmo compostos interferentes podem influenciar facilmente a quantificação dos compostos e este método não fornece qualquer informação em relação às características estruturais dos compostos que estão sendo quantificados ¹²⁵. Além disso, não existem padrões comerciais para estes compostos e poucos laboratórios em todo o mundo têm a capacidade de fornecer material de referência ¹²⁵. Devido a isto, a identificação e quantificação de novos MAAs para os quais não existem padrões é dificultada.

1.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica poderosa utilizada para a elucidação estrutural de substâncias orgânicas de origem sintética e natural, entre muitas outras

aplicações. Os aparelhos atuais de RMN utilizam a técnica pulsada, na qual um campo magnético é aplicado, obtendo-se os espectros de RMN de diferentes tipos de núcleos (p. e. ^1H , ^{13}C , ^{15}N)^{126,127}. Esta técnica tem sido utilizada para a identificação de aminoácidos do tipo micoporina desconhecidos^{31,36,37,128}. Os experimentos mais comuns de RMN baseiam-se na observação direta de núcleos de ^1H e ^{13}C em solução. A elevada abundância natural e elevada razão giromagnética do núcleo de ^1H possibilitam medições de alta sensibilidade e baixo tempo de aquisição para este núcleo e são responsáveis pelo vasto número de aplicações desta técnica. Os experimentos a uma dimensão (1D) revelam informações sobre o tipo e a proporção dos núcleos analisados, mas nem sempre dão informações sobre a forma como os núcleos estão ligados uns aos outros dentro da molécula. Por outro lado, os experimentos a duas dimensões (2D), homo ($^1\text{H}, ^1\text{H}$) e heteronucleares ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$; $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$), permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ou espacial entre si. Desta forma, é possível fazer um mapeamento estrutural mais preciso da molécula em estudo. No entanto, apesar das suas vantagens, o tempo necessário para executar certos experimentos 2D ainda é uma limitação¹²⁶. A seguir estão descritos alguns experimentos de RMN a duas dimensões¹²⁶:

COSY (HOMONUCLEAR CORRELATION SPECTROSCOPY) - ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO

Este experimento permite estabelecer as correlações entre os hidrogênios com acoplamentos geminais e vicinais (separados por duas ou três ligações) e assim discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN ^1H . Sinais de acoplamentos a longa distância (raramente mensuráveis no espectro 1D) também poderão ser visíveis.

HSQC (HETERONUCLEAR MULTIPLEQUANTUM COHERENCE) - ESPECTROSCOPIA HETERONUCLEAR DE COERÊNCIA DE QUANTUM SIMPLES

Esta técnica correlaciona dois espectros com núcleos distintos, sendo possível assinar os hidrogênios (^1H) ligados diretamente ao heteronúcleo (p. e. ^{13}C).

Nesta técnica os núcleos de ^1H e ^{13}C podem ser correlacionados em distâncias de até 4 ligações. Estas informações são extremamente úteis para a determinação estrutural, principalmente para estabelecer a posição de carbonos não hidrogenados.

1.4.3. Espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida

A espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC-MS) tem sido cada vez mais utilizada para avaliar a diversidade e abundância de MAAs em ambientes aquáticos¹²⁵. Esta técnica analítica apresenta maior sensibilidade que outros métodos, sendo bastante poderosa na caracterização estrutural de biomoléculas. A espectrometria de massas é capaz de fornecer informações acerca da massa precisa dos analitos e ainda informações sobre a sua fragmentação, o que é uma característica singular de cada composto. Assim, permite obter a composição elementar dos analitos em estudo tornando-se uma ferramenta essencial para a identificação e quantificação de biomoléculas. O processo de análise consiste na introdução da amostra no equipamento pelo sistema cromatográfico, os analitos são ionizados pela fonte de ionização através da perda ou do ganho de carga. Os íons gerados são então separados no analisador de acordo com suas relações massa/carga (m/z) e suas intensidades relativas são medidas no detector. A aquisição e o processamento dos dados geram os espectros de massas que são produzidos em função da intensidade de cada íon versus sua razão m/z . A espectrometria de massa em *tandem* também conhecida como MS/MS ou MS^2 é um sistema em que dois analisadores são utilizados em sequência, separados por uma câmara de colisão. A amostra é injetada, eluída e ionizada. Os íons são então separados por carga no primeiro analisador e seguem para a câmara de colisão, onde são fragmentados. Os fragmentos formados passam para o segundo espectrômetro, onde são analisados e identificados de acordo com a razão m/z . Os analisadores podem ser de baixa e alta resolução, dependendo da capacidade de separação das m/z . Os de baixa resolução, como triplo-quadrupolo (QqQ), conseguem detectar m/z com diferenças de 1 unidade de massa atômica, enquanto os de alta resolução, como o quadrupolo *time-of-flight* (QToF),

permitem obter massas moleculares com maior exatidão. As análises por MS² permitem um aumento da sensibilidade, que está relacionado à diminuição do ruído provocado por outros componentes da amostra através da possibilidade de seleção de um determinado íon gerando um ganho na relação sinal/ruído^{41,129}. O método de ionização é também um fator importante para aumentar a sensibilidade e seletividade do método analítico. Compostos polares, como os MAAs, são mais bem ionizados em fontes do tipo Ionização por *electrospray* (ESI). A espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida com ionização por *electrospray* permite distinguir os MAAs com base no seu tempo de retenção e massa molecular^{31,39,130-132}. Na Tabela 1 encontra-se a massa protonada de alguns dos MAAs conhecidos. Com uma abordagem espectral de massa, os perfis de fragmentação comuns podem eventualmente ser utilizados para examinar a diversidade estrutural dos MAAs, mesmo na ausência de padrões bem definidos¹³³.

De acordo com Cardozo *et al.*, 2006 na palitina (molécula protonada 1 - m/z 245) são observadas perdas iniciais de 15 e 44 Da originando os íons produto A e B, respectivamente (Tabela 2 e Figura 6). Além dos mecanismos envolvendo a perda inicial do radical metil, observaram-se vias em que houve eliminação neutra de água produzindo o íon produto m/z 227 (íon produto C e D). Ambos os íons produto podem perder outra molécula de água gerando o íon produto E de m/z 209. Para a shinorina (molécula protonada 2 - m/z 333), a eliminação de 15 e 44 Da gera os íons produto m/z 318 e m/z 274, respectivamente (íon produto F e G). O íon produto F sofre duas descarboxilações gerando M via íon produto G. Após a perda da cadeia lateral de G, o íon produto, comum a todas as MAAs, m/z 186 (íon produto B) pode ser observado¹³³. A caracterização espectral por massa proporciona um meio para catalogar MAAs e permite que inferências estruturais sejam feitas com base em seus padrões de fragmentação^{39,125,130,133}.

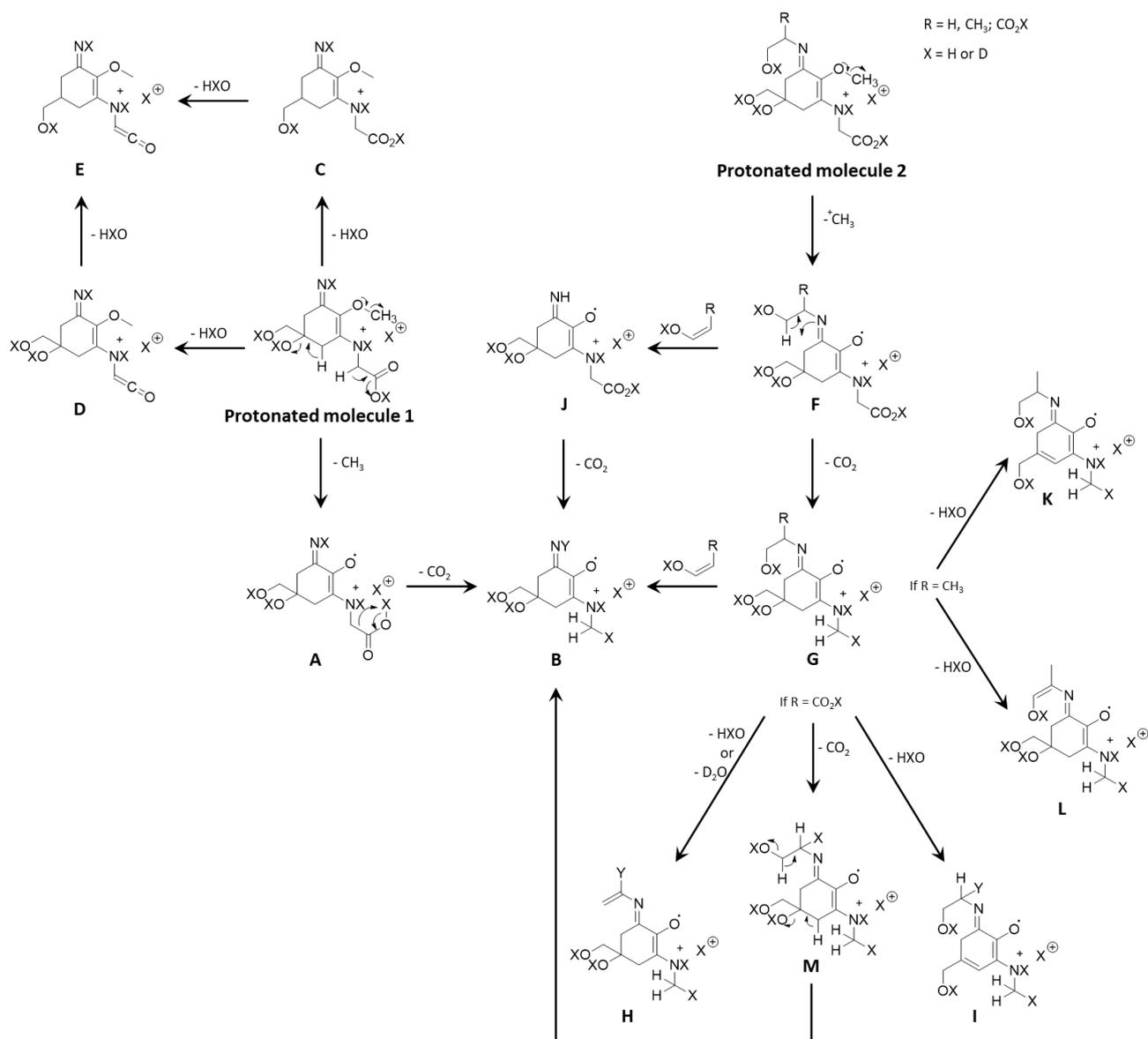


Figura 6. Mecanismos gerais de fragmentação propostos por Cardozo *et al.*, 2006 para os MAAs analisados no estudo de espectrometria de massas de alta resolução. A-M: íons-produto principais ¹³³.

Tabela 2 – Principais íons-precusores e íons-produto propostos por Cardozo *et al.*, 2006 na Figura 6 para os MAAs palitina e shinorina ¹³³.

MAA	m/z										
	Molécula protonada	A	B	C	D	E	F	G	H	I	M
Palitina	(1) 245	230	186	227	227	209					
Shinorina	(2) 333		186				318	274	212	212	230

Devido à semelhança nas suas estruturas, os MAAs geram fragmentos característicos, como os íons m/z 230 e 186. A detecção de íons produto gerados pela eliminação de 15 Da (radical metil), 44 Da (perda de CO₂) e da cadeia lateral (C-1) é bastante comum. Assim, o monitoramento destes

fragmentos usando ferramentas disponíveis via LC-MS (p.e. monitoramento de perda neutra e monitoramento de reações múltiplas - MRM) pode fornecer informações adicionais sobre a ocorrência de MAAs desconhecidos¹³³. A realização de experimentos de MRM permite que haja quantificação dos compostos de forma seletiva. Nestes experimentos é selecionada a passagem de íons com m/z específicos o que aumenta a seletividade uma vez que a probabilidade de duas moléculas gerarem íons precursores e íons produtos idênticos por MS^2 é muito baixa^{41,129}.

1.4.4. Validação de métodos para quantificação de MAAs em cianobactérias

A validação de métodos analíticos é o processo sistemático de estabelecer que um método analítico é aceitável para o propósito pretendido. Por norma, o pesquisador que desenvolve o método gera evidências sobre seletividade, linearidade, intervalo, limite de detecção e limite de quantificação, precisão e exatidão, efeito matriz, recuperação e estabilidade. O processo de desenvolvimento e validação de métodos tem um impacto direto na qualidade dos dados acima. Não existe um protocolo específico com normas definidas para a validação de métodos de quantificação de MAAs em LC-MS, no entanto, existem algumas normas nacionais e internacionais que regulam o processo de validação em métodos analíticos e que poderão servir como base para a validação deste método¹³⁴⁻¹³⁷. Chandran & Singh resumem algumas das diretrizes emitidas por diferentes agências para a validação de métodos analíticos utilizados para análise de substâncias medicamentosas na forma pura e em formulações farmacêuticas¹³⁸. Atualmente não existe nenhum método de quantificação de MAAs por LC-MS que tenha sido completamente validado. Hartmann *et al.*, 2017 desenvolveram um método para quantificação de MAAs por eletroforese capilar tendo-se baseado no guia do ICH para a validação^{134,139}. No entanto, este método tem pouca aplicabilidade, pois esta técnica não é amplamente utilizada, e geralmente leva à falta de reprodutibilidade, limitando-se a compostos altamente ionizáveis. Nesse sentido, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) é uma boa alternativa para fornecer altos níveis de sensibilidade e seletividade na análise de MAAs. Whitehead & Hedges (2002) publicaram uma abordagem quantitativa para a análise LC-MS de MAAs que permite distinguir vários MAAs conhecidos com base no seu tempo de

retenção, pesos moleculares e máximos de absorção de UV. Este método forneceu um mecanismo rápido para caracterizar e quantificar sensivelmente MAAs¹²⁵. No entanto, este método não foi validado. Em outro estudo, Hartmann *et al.*, 2015 validaram um método de quantificação de MAAs em cianobactérias usando cromatografia líquida de interação hidrófila (HILIC)³¹. Nesse trabalho foram quantificados, de forma precisa, vários analitos com tempos de retenção adequados em uma única corrida. No entanto, embora este método apresente excelentes coeficientes de correlação linear, ele desconsidera a influência da matriz biológica nas análises pois as curvas de calibração foram obtidas por diluição em série dos analitos em água. Além disso, alguns parâmetros importantes de validação, como a recuperação, não foram descritos. Em seguida, são discutidos alguns parâmetros importantes no desenvolvimento e validação de métodos analíticos e os parâmetros apresentados são baseados no guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹³⁶.

MATRIZ BIOLÓGICA

A matriz biológica consiste num material distinto de origem biológica, que pode ser amostrado e processado de modo reprodutível e no qual nenhum analito dos analitos de interesse se encontra presente. Esta matriz é utilizada para avaliar a especificidade do método bioanalítico¹³⁶.

PADRÕES INTERNOS

O padrão interno (PI) é um composto, geralmente com características estruturais similares ao analito, adicionado aos padrões de calibração e amostras em concentrações conhecidas e constantes, para facilitar a determinação do analito e compensar vários tipos de erros sistemáticos e randômicos, nomeadamente variações nas condições instrumentais ou operacionais¹³⁶.

SELETIVIDADE

A seletividade corresponde à habilidade do método de quantificação de distinguir determinado analito de outros compostos, fornecendo bandas puras, simétricas e bem resolvidas¹⁴⁰. A seletividade é

avaliada analisando se as bandas cromatográficas de cada analito estão separadas de outras bandas presentes na matriz e comparando o espectro MS² dos analitos presentes na amostra com o espectro MS² dos padrões. Não havendo picos adicionais no espectro MS² correspondente ao composto em análise sugere-se que o método é seletivo. O tipo de experimento selecionado é também um fator relevante que influencia a seletividade do método. Como referido anteriormente, a realização de experimentos de MRM permite que haja quantificação dos compostos de forma seletiva, pois a probabilidade de duas moléculas gerarem íons precursores e íons produtos idênticos por MS² é muito baixa ^{41,129}.

LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LoD) e de quantificação (LoQ) são baseados no nível de sinal/ruído. O LoD é a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente do ruído, no entanto, este não pode ser quantificado. O LoD deve ser 2 a 3 vezes superior ao ruído. O LoQ corresponde à menor concentração que é possível quantificar com valores aceitáveis de precisão e exatidão e deve ser, no mínimo, 5 vezes superior a qualquer interferência da matriz biológica no tempo de retenção do analito ¹³⁶.

CURVA DE CALIBRAÇÃO E LINEARIDADE

A curva de calibração corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a razão da área da banda cromatográfica (analito/ padrão interno) e a concentração do analito. É necessário realizar uma curva de calibração para cada analito em estudo e para cada corrida analítica ¹³⁶. Os níveis deverão contemplar o intervalo de valores esperados, desde o LoQ até 120 % da máxima concentração. O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 e o coeficiente de variação deve ser menor ou igual a 20 % em relação à concentração nominal para o LoQ e menor ou igual a 15 % para as restantes concentrações ¹³⁶. No mínimo quatro de seis níveis da curva de calibração devem cumprir com este critério, incluindo o LoQ e a maior concentração.

CONTROLES DE QUALIDADE

Os controles de qualidade (CQ) são usados para avaliar a precisão, a exatidão e a recuperação do método. Os CQs são preparados em três níveis diferentes para cada analito (CQB - baixo, CQM - médio e CQA - alto), cumprindo os seguintes critérios: CQB menor ou igual a $3 \times \text{LoQ}$, CQM aproximadamente a média entre CQB e CQA e CQA 75 a 90 % da maior concentração da curva de calibração¹³⁶. Todas as amostras deverão ser preparadas em cinco réplicas e o processo deverá ser repetido em 3 dias não consecutivos.

Precisão

A precisão corresponde à proximidade entre uma série de medidas obtidas de múltiplas amostragens de uma mesma amostra homogênea dentro de condições determinadas e é calculada pelo coeficiente de variação ou desvio padrão relativo. A precisão deve ser avaliada através da repetibilidade (precisão intra-dia) e da reprodutibilidade (precisão inter-dia)¹³⁶.

Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre a concentração medida e a concentração nominal. O coeficiente de variação para cada uma das concentrações das amostras de controle de qualidade deve ser menor ou igual a 20 % em relação à concentração nominal para o LoQ e menor ou igual a 15 % para as restantes concentrações¹³⁶.

RECUPERAÇÃO

A recuperação avalia a eficiência do método de extração dos analitos e corresponde à relação entre a concentração de cada analito nas amostras dopadas e, em seguida, sujeitas ao processo de extração e nas amostras sujeitas ao processo de extração e posteriormente dopadas. Embora seja desejável obter elevados valores de recuperação, este parâmetro não necessita de ser 100 % desde que seja consistente, preciso e reprodutivo¹³⁶.

EFEITO MATRIZ

O método de LC/MS em virtude da sua elevada seletividade quando na presença de matrizes biológicas, apresenta-se propenso a erros, uma vez que a presença de substâncias não monitoradas e que coeluem com a matriz pode afetar a detecção dos analitos de interesse comprometendo a eficiência de ionização. O efeito matriz é avaliado comparando a resposta do analito de interesse na matriz biológica após extração e na ausência da matriz biológica (em solvente) ¹⁴⁰.

ESTABILIDADE

A estabilidade visa determinar se os analitos de interesse se mantêm quimicamente inalterados numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo. As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração e nas condições de análise. Deve-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções-padrão ¹³⁶.

Desta forma, este estudo tem como foco o desenvolvimento de estratégias para a identificação, isolamento e quantificação destes compostos, que vêm demonstrando suas capacidades fotoprotetoras e antioxidantes. Estas estratégias podem ser aplicadas em cianobactérias e outros organismos, tanto cultivados em laboratório como coletados do ambiente. A pesquisa de organismos produtores de MAAs, em diversidade e abundância, será extremamente valiosa para a ciência biotecnológica pois poderá facilitar e acelerar a utilização destes compostos em protetores solares e em produtos antienvhecimento.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto consistiu em definir estratégias para identificação e quantificação de MAAs em cianobactérias e outros organismos. Para tal, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Identificar cepas de cianobactérias produtoras de MAAs.
 - Triagem de cepas antes e após exposição à radiação UV;
 - Investigação da biossíntese de MAAs em cianobactérias.
- Testar e desenvolver métodos para a obtenção de extratos de MAAs:
 - Desenvolvimento de métodos de extração e purificação de MAAs;
 - Desenvolvimento de métodos de isolamento de MAAs em HPLC-DAD.
- Desenvolver métodos de deteção, identificação e quantificação de MAAs:
 - Desenvolvimento de método de identificação de MAAs em HPLC-DAD-HRMS;
 - Elucidação estrutural de MAAs em cianobactérias;
 - Desenvolvimento e validação de métodos de quantificação de MAAs em LC-MS.
- Avaliar a possibilidade de maximizar a produção de MAAs em cepas de cianobactérias:
 - Análise do efeito da radiação UV na síntese de MAAs.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. REAGENTES E PADRÕES

Os reagentes para os meios de cultura (ácido bórico, ácido etilenodiamino tetra-acético, cloreto de cálcio, cloreto de cobalto, cloreto de magnésio, cloreto de manganês, cloreto de ferro, cloreto de sódio, cloreto de zinco, fosfato de potássio, fosfato de sódio, nitrato de sódio, sulfato de magnésio) e para as extrações (acetato de etilo, clorofórmio, diclorometano, etanol e metanol) são de grau analítico e foram adquiridos na Sigma-Aldrich. A água deionizada foi tratada pelo sistema Milli-Q da Millipore. Os solventes para as análises cromatográficas e de espectrometria de massas (acetonitrila, ácido fórmico, ácido trifluoracético, formiato de amônio, hidróxido de amônio, metanol) são de grau cromatográfico e, assim como o metanol deuterado, o 1-metil-triptofano e o aciclovir, também foram adquiridos na Sigma-Aldrich. Os padrões de shinorina, palitina e porphyrina-334 foram gentilmente cedidos pelo professor Paul Long do King's College London. O Helioguard 365[®] foi adquirido através da empresa Focus Química, revendedor de produtos Mibelle AG Biochemistry (Suíça). O pó comercial de cianobactéria *Spirulina Havaiana*[®] foi adquirido na loja de produtos naturais Mundo Verde.

3.2. CIANOBACTÉRIAS

3.2.1. Cepas de cianobactérias selecionadas

Foram selecionadas diversas cepas de cianobactérias disponíveis no Banco de Culturas de Cianobactérias do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas com o objetivo de identificar espécies produtoras de MAAs (Tabela 3). Analisou-se um total de 75 linhagens: 71 cepas do Brasil, 3 do Japão e 1 da Austrália.

Tabela 3 – Cepas de cianobactérias analisadas para identificação de espécies produtoras de MAAs.

Código da cepa	Nome	Local de isolamento
CCIBt 3106	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Reservatório Americana, 22°44'S and 47°19'W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3168	<i>Rhabdoderma</i> sp.	Reservatório Billings, 23°47'S and 46°35'W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3180	<i>Microcystis panniformis</i>	Lago da Garça - IBt, 23°38'30"S and 46°37'14"W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3194	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Reservatório Billings, 23°47'S 46°35'W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3214	<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	Reservatório Billings, 23°47'S and 46°35'W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3247	<i>Nostoc</i> sp.	Bromelia, IBt, 23°38'30"S and 46°37'14"W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3265	<i>Desertifilum tharense</i>	Salina da Ponta, 18°59'00"S and 56°39'35"W. MS, Brasil, Pantanal
CCIBt 3275	<i>Desertifilum tharense</i>	Salina da Ponta, 18°59'00"S and 56°37'26"W. MS, Brasil, Pantanal
CCIBt 3289	<i>Calothrix</i> sp.	Parque Santa Virgínia, 23°20'S and 45°09'W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3292	<i>Nostoc</i> sp.	Parque Santa Virgínia, 23°20'S and 45°09'W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3307	<i>Komarekiella atlantica</i>	Parque Santa Virgínia, 23°20'S and 45°09'W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3313	<i>Chlorogloopsis</i> sp.	Parque Santa Virgínia, 23°20'S and 45°09'W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3320	<i>Calothrix</i> sp.	Parque Santa Virgínia, 23°20'S and 45°09'W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3321	<i>Tolypothrix</i> sp.	Parque da Ilha Cardoso, 25°04'12"S and 47°55'27"W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3324	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Parque da Ilha Cardoso, 25°04'12"S and 47°55'27"W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3329	<i>Nostoc</i> sp.	Tronco de árvore, Pirassununga, 21°59'46"S and 47°25'33"W. SP, Brasil, Cerrado
CCIBt 3330	<i>Cyanosarcina</i> sp.	Pirassununga, 21°59'46"S and 47°25'33"W. SP, Brasil, Cerrado
CCIBt 3338	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Pirassununga, 21°59'46"S and 47°25'33"W. SP, Brasil, Cerrado
CCIBt 3343	<i>Dolichospermum</i> sp.	Reservatório Jaguari, 22°55'27"S and 46°25'30"W. SP, Brasil Mata Atlântica

Código da cepa	Nome	Local de isolamento
CCIBt 3454	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Reservatório Billings, 23°47'S 46°35'W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3464	<i>Scytonema</i> sp.	Parque da Ilha Cardoso, 25°04'12"S and 47°55'27"W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3496	<i>Myxosarcina</i> sp.	Estação ecológica Juréia - Itatins, 24°26'S and 47°04'W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>	Parque da Ilha Cardoso, 25°04'12"S and 47°55'27"W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3607	<i>Gloecapsa</i> sp.	Praia, 23°03'97"S and 43°50'53"W. RJ, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3626	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Tube de abastecimento de água, 23°42'28"S and 46°43'24"W. SP, Brasil Mata Atlântica
CCIBt 3172	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Reservatório Riacho Grande, 23°52'03"S and 46°63'44"W. SP, Brasil Mata Atlântica
CENA161	<i>Fischerella</i> sp.	Barragem de concreto de água de nascente, Fazenda Capuava, Piracicaba, 22°39'25"S and 47°37'24"W. SP, Brasil Mata Atlântica
CENA21	<i>Nostoc piscinale</i>	Solo de várzea da ilha de Mari-Mari, Rio Solimões, 02°45'00"S, 65°15'00"W. AM, Brasil, Amazônia
CENA543	<i>Nostoc</i> sp.	Lago da Salina 67 Mil, 19°27'42"S, 56°08'21"W. MS, Brasil, Patanal
CENA-596	<i>Nodularia spumigena</i>	Lago da Salina 67 Mil, 19°27'42"S, 56°08'21"W. MS, Brasil, Patanal
CMAA-1554	<i>Alkalinema</i> sp.	Rio Amazonas; 03°08'58"S and 58°31'11"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1556	<i>Pantalinema rosaneae</i>	Rio Amazonas; 03°08'58"S and 58°31'11"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1557	<i>Planktothrix mougeotti</i>	Rio Solimões; 03°14'34"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1598	<i>Cronbergia amazonenses</i>	Rio Solimões; 03°14'34"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1600	<i>Oscillatoria</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'34"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1601	<i>Tolypothrix</i> sp.	Rio Amazonas; 03°08'58"S and 58°31'11"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1602	<i>Amazoninema brasiliense</i>	Rio Solimões; 03°14'33"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1605	<i>Aliinostoc</i> sp.	Rio Amazonas; 03°08'58"S and 58°31'11"W. AM, Brasil, Amazônia

Código da cepa	Nome	Local de isolamento
CMAA-1606	<i>Aliinostoc</i> sp.	Rio Amazonas; 03°08'15"S and 58°29'51"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1663	<i>Tolypothrix</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'34"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1664	<i>Tolypothrix</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'33"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1668	<i>Tolypothrix</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'33"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1670	<i>Calothrix</i> sp.	Rio Amazonas; 03°08'58"S and 58°31'11"W. AM, Brasil, Amazônia
CMAA-1675	<i>Tolypothrix</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'33"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-07	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Rio Negro, 03°01'50"S and 60°09'07"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-08	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'33"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-12	<i>Tolypothrix</i> sp.	Rio Amazonas; 03°08'58.2"S and 58°31'11"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-27	<i>Aliinostoc</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'33"S and 60°00'28.6"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-28	<i>Aliinostoc</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'33"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-44	<i>Tolypothrix</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'34"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-46	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Rio Amazonas; 03°08'58"S and 58°31'11"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-52	<i>Aliinostoc</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'33"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-54	<i>Calothrix</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'33"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-55	<i>Aliinostoc</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'34"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-62	<i>Aliinostoc</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'34"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-72	<i>Nostoc</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'33"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-83	<i>Nostoc</i> sp.	Rio Negro; 03°01'50"S and 060°09'07"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-DBG-92	<i>Tolypothrix</i> sp.	Rio Amazonas; 03°08'15"S and 58°29'51"W. AM, Brasil, Amazônia

Código da cepa	Nome	Local de isolamento
LTPNA-DBG-94	<i>Nostoc</i> sp.	Rio Solimões; 03°14'34"S and 60°00'28"W. AM, Brasil, Amazônia
LTPNA-01	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Reservatório Salto Grande, 22°44'S and 47°20'W. SP, Brasil, Mata Atlântica
LTPNA-02	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Reservatório Salto Grande, 22°44'S and 47°20'W. SP, Brasil, Mata Atlântica
LTPNA-06	<i>Limnothrix redekei</i>	Reservatório Billings (Taquacetuba) 23°48'26"S; 46°37'29"W. SP, Brasil, Mata Atlântica
LTPNA-07	<i>Limnothrix redekei</i>	Reservatório Billings (Taquacetuba), 23°48'26"S; 46°37'29"W. SP, Brasil, Mata Atlântica
LTPNA-08	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Reservatório Salto Grande, 22°44'S and 47°20'W. SP, Brasil, Mata Atlântica
LTPNA-09	<i>Microcystis</i> sp.	Reservatório Salto Grande, 22°44'S and 47°20'W. SP, Brasil, Mata Atlântica
LTPNA-10	<i>Oscillatoria</i> sp.	Reservatório Billings (Taquacetuba), 23°48'26"S; 46°37'29"W. SP, Brasil, Mata Atlântica
LTPNA-10A	<i>Planktothrix mougeotti</i>	Reservatório Billings (Taquacetuba), 23°48'26"S; 46°37'29"W. SP, Brasil, Mata Atlântica
ITEP-018	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Reservatório Tabocas, 08°06'15"S and 36°13'23"W. PE, Brasil, Caatinga
ITEP 24	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	Reservatório Tapacurá, 08°02'14"S, 35°09'46"W. PE, Brasil, Caatinga
ITEP 26	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	Reservatório Tapacurá, 08°02'14"S, 35°09'46"W. PE, Brasil, Caatinga
ITEP-030	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Lago ornamental - ITEP, 8°03'32"S and 34°56'53"W. PE, Brasil, Caatinga
CYP 011K	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Lago Julius, 20°07'53"S 139°43'22"E. Austrália
NIES-299	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Lago Kasumigaura, 36°02'25"N, 140°23'39"E. Japão
NIES-99	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Lago Suwa, 36°02'54"N 138°05'03"E. Japão
NIES-478	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Lago Kasumigaura, 36°02'25"N, 140°23'39"E. Japão

As cianobactérias do LTPNA foram caracterizadas por Bortoli *et al.*, 2014¹⁴¹. As restantes cepas foram cedidas por pesquisadores parceiros do LTPNA, entre eles a Coleção de Culturas de Cianobactérias do Instituto de Botânica (CCIBt), o Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA), o Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP) e a Coleção de Microorganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da EMBRAPA. Além das cianobactérias, analisaram-se ainda organismos de três outros grupos: dinoflagelados (*Amphidinium* sp. proveniente do Banco de Microorganismos Aidar & Kutner do Instituto Oceanográfico), microalgas (*Chlorella* sp. e *Desmodesmus* sp. ROB4-G5 proveniente da coleção de culturas do CENA) e macroalgas (*Porphyrium* sp. – Nori comercial e *Plocamium brasiliense* isolado do estado de Espírito Santo).

Para o desenvolvimento dos métodos de extração e de análise, selecionou-se a cepa de cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, anteriormente designada por *Anabaena spiroides*¹⁴². A espécie *S. torques-reginae* foi reclassificada por localização filogenética baseado na sequência do gene 16S rRNA e morfologicamente, pelos acinetos esféricos que se encontram em um ou em ambos os lados do heterocisto e pela presença de tricomas espiralados ou retos quando solitários, com presença de aerótopos^{143,144} (Figura 7).

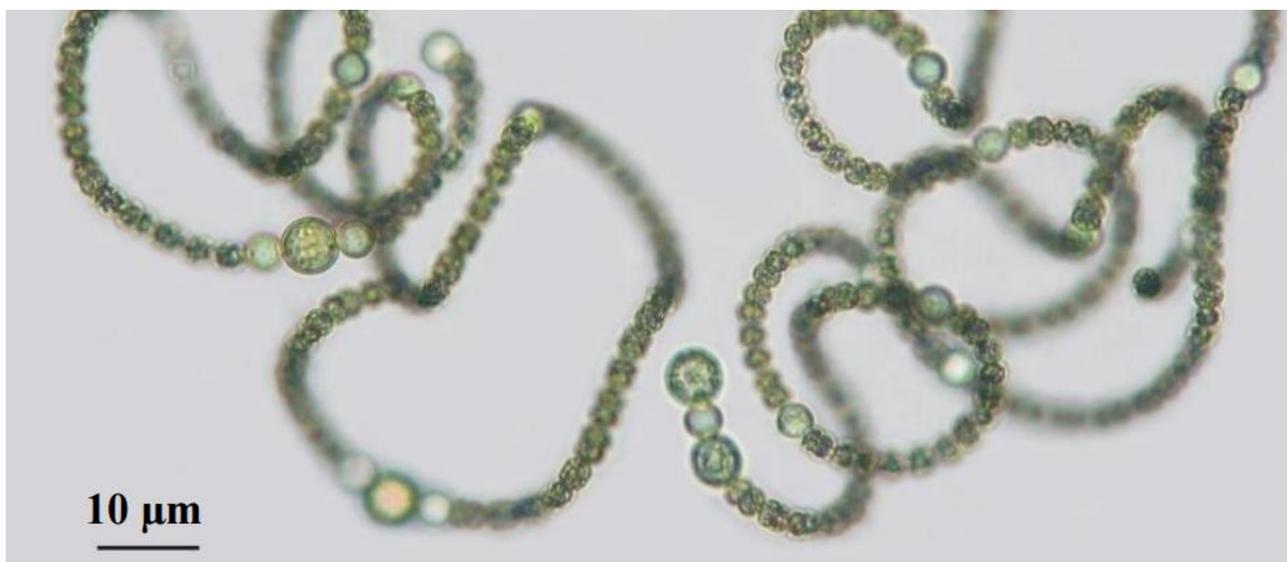


Figura 7. Cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* - aspectos gerais dos filamentos mostrando os tricomas espiralados e o número e posição dos acinetos. Fonte: Werner *et al.*, 2012¹⁴³.

3.2.1. Manutenção dos cultivos de cianobactérias

As culturas foram mantidas no Banco de Culturas em meio ASM-1 líquido (Tabela 4) ^{145,146}, em tubos de ensaio de 80 mL, pH inicial 8,0, sem aeração, temperatura de 24 ± 2 °C, com ciclos luz/escuro (12h:12h), sob baixa intensidade luminosa com luz PAR ($20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) avaliada utilizando um sensor quântico (QSL-100 Box, Biospherical Instruments Inc).

Tabela 4 – Composição do meio líquido ASM-1 utilizado para o cultivo da cepa de cianobactéria ITEP-024.

Componentes	Concentração $\mu\text{mol/L}$
NaNO ₃	2000
MgCl ₂	200
MgSO ₄	200
CaCl ₂	200
KH ₂ PO ₄	128
Na ₂ HPO ₄	100
H ₃ BO ₃	40
MnCl ₂	7
FeCl ₃	4
ZnCl ₂	2,2
CoCl ₂	0,08
CuCl ₂	0,014
EDTA.Na ₂	20

3.2.2. Condições de cultivo laboratoriais

Para produção de biomassa que permitisse a realização dos experimentos, as cepas foram cultivadas em laboratório em Erlenmeyers de 2 L. As condições de cultivo estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições de cultivo das cepas de cianobactérias.

Condições de cultivo	
Regime de crescimento	Autotrófico
Meio nutritivo	ASM-1 (2 mM de nitrogênio)
Tipo de cultivo	Batch
Temperatura	24 ± 2 °C
Radiação (Fonte de iluminação)	PAR (Luz branca fluorescente)
Intensidade luminosa	80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Fotoperíodo	12h:12h
Fonte de carbono	Aeração com ar ambiente, sem enriquecimento com CO ₂

3.2.3. Análises genômica e filogenética

Realizaram-se análise genômicas e filogenéticas para identificar a presença dos *clusters* gênicos que podem estar envolvidos na biossíntese dos MAAs na cepa *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024. A extração do DNA e sequenciamento genômico destas espécies foram realizados no âmbito de outros projetos em colaboração com o grupo da Prof.^a Dr.^a Marli Fiorde do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo ¹⁴⁷.

A cultura foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio ASM-1 por 21 dias sob 14h:10h de ciclo luz/escuro com luz fluorescente (55 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 22 ± 1 °C no laboratório do CENA. A biomassa foi coletada por centrifugação por 10 min a 7.690 g e as células foram lavadas com água ultrapura, 0,05% (p/v), Extran - solução de lavagem (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM EDTA pH 8,0 e 50% de etanol) e solução salina. O DNAg total foi isolado a partir das células utilizando o Kit AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep (Axygen Biosciences, EUA). A qualidade do DNA foi confirmada por eletroforese usando um gel de agarose a 1% (p/v), e a quantidade e pureza do gDNA foi estimada usando um Fluorímetro Qubit 2.0 (Life Technologies, EUA). Utilizou-se cerca de 1 μg de gDNA para preparar bibliotecas emparelhadas

utilizando o Kit Nextera XT Sample Prep (Illumina, EUA).

A biblioteca foi sequenciada em uma plataforma MiSeq (Illumina) usando o kit MiSeq Reagent v3 600 ciclos (Illumina) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade das leituras da sequência de Illumina bruta foi inicialmente verificada usando FastQC v0.10.1¹⁴⁸. Seqclean 1.8.10¹⁴⁹ foi usado para filtrar bases com menos de 30 pontos de Phred (qualidade da identificação das nucleobases geradas pelo sequenciamento automatizado de DNA). O sequenciamento do genoma foi realizado usando SPAdes 3.5.0¹⁵⁰ e Platanus 1.2.1¹⁵¹. O esboço do genoma foi anotado com o Prokka 1.9¹⁵². Comparou-se os *clusters* de genes já descritos e disponíveis no GenBank¹⁵³ e o genoma da cianobactéria de interesse através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)¹⁵⁴ do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Foram realizadas pesquisas em Artemis 18.0.2^{155,156} e HHpred¹⁵⁷ para a visualização das sequências genéticas, anotação automática e confirmação dos genes envolvidos na produção dos MAAs, utilizando também ferramentas BLAST. O NRSPredictor2^{158,159} foi utilizado para confirmar a ausência de peptídeo NRPS no *cluster* gênico de MAAs.

Os dezassete *clusters* gênicos de MAAs disponíveis no GenBank (*Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Cylindrospermum stagnale* PCC 7417, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212, *Cyanothece* sp. PCC 7424, *Cyanothece* sp. ATCC 51142, *Cyanothece* sp. CCY0110, *Crocospaera watsonii* WH 8501, *Fisherella muscicola* SAG 1427-1, *Fisherella* sp. PCC 9339, *Fisherella* sp. PCC 9431, *Lyngbya* sp. PCC 8106, *Mastigocoleus testarum* BC 008, *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Microcoleus chthonoplastes* PCC 7420, *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Nodularia spumigena* CCY 9414) foram alinhados com a sequência do *cluster* gênicos da cianobactéria em estudo utilizando o programa ClustalW¹⁶⁰. Os modelos evolutivos foram selecionados usando ProtTest¹⁶¹, e a árvore filogenética com genes concatenados foi construída pelo método de inferência filogenética bayesiana com o programa MrBayes¹⁶² usando quatro cadeias, duas corridas separadas e 5 000 000 gerações. A árvore filogenética foi visualizada com o programa

Figtree 1.4.2¹⁶³ e editada com o Inkscape 0.92.1¹⁶⁴.

3.3. MÉTODOS DE ANÁLISE DE MAAS

3.3.1. Método de extração de MAAs

Após pesquisa bibliográfica foram selecionados alguns métodos de extração de MAAs usados habitualmente nas análises destes compostos. No final de cada cultivo a cultura foi centrifugada durante 10 min a 10.000 rpm, 5 °C. Congelou-se a biomassa concentrada a -18 °C. Posteriormente liofilizou-se a biomassa durante 48 h. A biomassa liofilizada foi pesada e sujeita aos diferentes métodos de extração selecionados. Estes métodos foram testados de modo a verificar qual permitiria a melhor extração dos analitos de interesse (Tabela 6).

Tabela 6 – Métodos bibliográficos testados para a extração de MAAs.

Método	A	B	C	D
Solvente	MeOH/H ₂ O (1:1)	MeOH/H ₂ O (1:1)	MeOH (100%)	MeOH (100%)
Banho e ultra-som	30 min à T ambiente	30 min à T ambiente	30 min à T ambiente	30 min a 45 °C
Tempo de extração	12 h a 4 °C	12 h a 4 °C	12 h a 4 °C	30 min. (banho)
Extração líquido-líquido	Clorofórmio/MeOH/H ₂ O (7:6:3)	Acetato de etilo /MeOH/H ₂ O (7:6:3)	Clorofórmio /H ₂ O (2:1)	Clorofórmio /H ₂ O (2:1)

A: adaptado de Cardozo *et al.*, 2006¹³³, B: modificado de Cardozo *et al.*, 2006¹³³, C e D: modificados de Rastogi *et al.*, 2014⁵³.

As amostras foram analisadas em HPLC-DAD-HRMS e os resultados foram comparados tendo-se selecionado o melhor método com base nos valores de integração das bandas cromatográficas respectivas aos MAAs presentes nas amostras. O método selecionado foi posteriormente otimizado, visando-se melhor sensibilidade para análises de quantificação dos compostos via LC-MS/MS. Ajustaram-se os seguintes pontos: biomassa mínima necessária para a quantificação, solvente de extração, redução dos volumes de solvente, redução do número de passos e do tempo total de extração. Os parâmetros avaliados estão descritos na Tabela 7. Todas as extrações foram realizadas em triplicata após centrifugação e liofilização da biomassa de cianobactéria.

Tabela 7 – Parâmetros testados para otimização do método de extração selecionado para a extração de MAAs.

Parâmetros testados	
Biomassa	10; 25; 50; 100 mg
Volume total de solvente	Entre 1 e 10 mL
Solvente de extração	MeOH (100 %), MeOH/H ₂ O (1:1), EtOH/H ₂ O (1:1), H ₂ O; 0.2 % AF (pH 3,15 com NH ₄ OH), 0,1 % AF + 0.2 mM formiato de amônio (NH ₄ HCO ₂)
Tempo de sonicator	0 min; 2 min; 4 min e 5 min
Banho e ultra-som	Sem banho e ultra-som; 30 min a 45 °C; 30 min a temperatura ambiente
Tempo de extração	1 h, 4 h, 12 h
Centrifugação	10.000 rpm, 5 °C durante 15 min, 4 °C; 10.000 rpm, 5 °C durante 10 min
Secagem após extração	Sem secagem; Nitrogênio a 40 °C
Extração líquido-líquido	Sem extração líquido-líquido; Solvente: Clorofórmio, Acetato de etilo, Diclorometano; Proporções de solventes de extração (2:1), (1:1), (1:2); N.º de partições: 1 ou 2
Secagem após extração líquido-líquido	Nitrogênio, 40 °C
Preparação para análise	Solvente de ressuspensão da amostra: MeOH; ACN; MeOH/H ₂ O (1:1); ACN/H ₂ O (1:1); EtOH/H ₂ O (1:1); H ₂ O; 0.2 % AF (pH 3,15 com NH ₄ OH); ,1 % AF + 0.2 mM NH ₄ HCO ₂

3.3.2. Método de detecção e identificação de MAAs em sistema HPLC-DAD-HRMS

Para a detecção e identificação de MAAs, as amostras foram analisadas via cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS), utilizando-se um cromatógrafo líquido LC-20D (Shimadzu, Japão) com detector de arranjos de diodos (DAD) - SPD M20A em um espectrômetro com analisador do tipo quadrupolo-tempo-de-voe (QToF), MicroToF-QII (Bruker Daltonics, EUA), equipado com fonte *ESI*, operando no modo positivo de ionização, via experimentos de MS e de Auto MS/MS. Os parâmetros de funcionamento do equipamento durante as análises foram: capilar 4500 V, gás nebulizador (nitrogênio) 60 psi, fluxo de gás secante (nitrogênio) 9,0 mL/min, temperatura da fonte 200 °C. Para calibração interna do sistema

foi utilizada uma solução de formiato de sódio 10 mM em isopropanol/água (1:1 v/v). Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) (Phenomenex, EUA) mantida a 30 °C, sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. Diferentes métodos cromatográficos foram testados até optar-se pela utilização dos eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio e (B) ACN/H₂O (8:2) + 0,1 % (v/v) ácido fórmico. O gradiente de eluição encontra-se descrito na Tabela 8. O cromatograma de UV foi monitorado a 330 nm (indicativo para a maioria dos MAAs). O processamento de dados foi realizado pelo programa DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, EUA).

Tabela 8 – Condições de eluição do método de separação cromatográfica de MAAs em HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio e (B) ACN/H₂O (8:2) + 0,1 % (v/v) ácido fórmico, numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) mantida a 30 °C, sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

Tempo (min)	% Fase móvel B
0	0
2	0
6	95
7,5	95
8	0
12	0

3.3.3. Método de isolamento e purificação de MAAs em sistema HPLC-DAD

As análises de separações cromatográficas foram realizadas em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) - LC-20AT - Prominence (Shimatzu, Japão) dotado de detetor de arranjos de diodos (DAD) - SPD-M20A - e coletor de frações - FRC-10A.

MÉTODO ANALÍTICO

Para a otimização do método cromatográfico utilizaram-se os padrões de shinorina e porphyra-334. Diversos métodos cromatográficos foram testados para o isolamento de MAAs. Optou-se pela

utilização de uma coluna analítica Luna C18 (150x4,6 mm, 5 µm) (Phenomenex, EUA) sob uma vazão de 0,5 mL.min⁻¹ usando os eluentes (A) 0,2 % ácido fórmico (pH acertado a 3,15 com hidróxido de amônio - NH₄OH), (B) H₂O/MeOH/ACN (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 %. O gradiente de eluição escolhido para a separação cromatográfica dos compostos encontra-se descrito na Tabela 9.

Tabela 9 – Condições de eluição do método análico de separação cromatográfica de MAAs selecionado em HPLC-DAD semi-preparativo utilizando os eluentes (A) 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH₄OH), (B) H₂O/MeOH/ACN (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 % numa coluna analítica Luna C18 (150x4,6 mm, 5 µm) sob uma vazão de 0,5 mL.min⁻¹.

Tempo (min)	% Fase móvel B	% Fase móvel C
0	0	0
6	22	0
12	22	0
13	0	95
23	0	95
24	0	0
34	0	0

MÉTODO SEMI-PREPARATIVO

Foi desenvolvido um método para purificação dos compostos de interesse, nomeadamente do MAA detetado na cepa de *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 para posterior elucidação estrutural. Este MAA foi isolado a partir do extrato de biomassa da cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 realizando-se processos de purificação sucessivos. Procedeu-se também à purificação dos MAAs shinorine e porphyra-334 a partir da matéria-prima Helioguard 365®, uma vez que as quantidades disponíveis destes padrões mostraram não ser suficientes para todos os experimentos que se pretendia realizar. O Helioguard 365® e o extrato de biomassa foram liofilizados, redissolvidos em água deionizada e centrifugados (10.000 rpm) a 4 °C para posterior injeção. Para a purificação dos MAAs utilizou-se uma coluna semi-preparativa Luna C18 (2) (250x10,00 mm, 5 µm) (Phenomenex, EUA)

sob vazão de 3 mL.min⁻¹ usando os eluentes (A) 0,2 % (v/v) ácido fórmico (pH 3,15 com NH₄OH), (B) H₂O/MeOH/ACN (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % (v/v) - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v). O gradiente de eluição está descrito na Tabela 10.

Tabela 10 – Condições de eluição do método cromatográfico de purificação de MAAs selecionado em HPLC-DAD semi-preparativo utilizando os eluentes (A) 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH₄OH), (B) H₂O/MeOH/ACN (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 % numa coluna semi-preparativa Luna C18 (2) (250x10,00 mm, 5 µm) sob uma vazão de 3 mL.min⁻¹.

Tempo (min)	% Fase móvel B	% Fase móvel C
0	0	0
5	0	0
10	20	0
19	50	0
20	0	95
30	0	95
31	0	0
41	0	0

As bandas cromatográficas, com espectro de absorção UV característico dos MAAs, foram coletadas originando os compostos purificados. Estes foram secos em sistema de secagem a vácuo e submetidos a análise de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN).

3.3.4. Análise via Ressonância Magnética Nuclear

Para determinação estrutural do MAA desconhecido, isolado da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, este composto foi submetido à análise de ressonância magnética nuclear. Estes experimentos foram realizados no Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo - Central Analítica, em espectrômetro de RMN BRUKER DPX 500 (Bruker, EUA) operando em 500 MHz. A amostra pura (aproximadamente 2 mg) foi solubilizada em metanol deuterado (CD₃OD) e transferida para um tubo capilar de 3 mm. Foram obtidos os espectros em uma dimensão (1 D) de ¹H e espectros em duas dimensões (2 D), homo (¹H, ¹H) e heteronucleares (¹H, ¹³C)

utilizando um espectrômetro Bruker DPX 500 MHz (125 MHz para ^{13}C). Os experimentos 2 D realizados foram os seguintes: espectroscopia de Correlação (COSY), espectroscopia heteronuclear de coerência de quantum simples (HSQC) e espectroscopia heteronuclear de correlação entre múltiplas ligações (HMBC). Todos os experimentos de RMN foram realizados utilizando sequências de pulsos padrão. Os desvios químicos são relatados na escala δ em relação ao sinal residual do solvente (CD_3OD). Os espectros de RMN foram processados utilizando o software NMRPipe¹⁶⁵ e analisados utilizando o programa CcpNmr Analysis¹⁶⁶.

3.3.5. Quantificação de MAAs em sistema LC-MS

A quantificação de MAAs presentes nas amostras dos experimentos foi realizada em espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ) (6460 Triple Quad LC-MS, Agilent Technologies, EUA) equipado com fonte *ESI*, operando em modo positivo de ionização, acoplado a um cromatógrafo líquido (1260 Infinity, Agilent Technologies, EUA). Após liofilização e pesagem dopou-se cada amostra com 10 μL de padrão interno. Após 4 horas de interação entre o padrão e a biomassa, as amostras foram extraídas de acordo com o método de extração selecionado. Os extratos centrifugados foram filtrados com filtro de 0.45 μm e submetidos a análise para serem quantificados. Os parâmetros de análise foram ajustados tendo em consideração as fases móveis utilizadas e procurando maximizar a intensidade dos íons presentes (Tabela 11).

Tabela 11 – Parâmetros da fonte utilizados nos experimentos de espectrometria de massas.

Parâmetro	Valor
Temperatura do gás secante (N_2)	300 °C
Fluxo do gás secante (N_2)	12 L/min
Nebulizador	45 psi
Temperatura da fonte (N_2)	350 °C
Fluxo da fonte (N_2)	10 L/min
Voltagem capilar	3500 V
Voltagem do cone	500 V

Experimentos no modo MRM foram executados visando os estudos de quantificação de MAAs. Os espectros de MS² obtidos foram comparados com os dados da literatura e com o perfil de fragmentação dos padrões de MAAs. Os parâmetros de desempenho do espectrômetro de massa, incluindo a determinação do íon precursor e dos melhores íons produto, juntamente com as correspondentes energias de colisão e fragmentação, foram testados durante a injeção das soluções padrão. Para cada analito, as duas transições com maior abundância foram selecionadas correspondendo ao íon quantificador e ao íon qualificador. A Tabela 12 resume os parâmetros otimizados para os analitos e para o padrão interno.

Tabela 12 – Transições selecionadas e parâmetros otimizados para as análises por MS². F – fragmentador; EC – energia de colisão; TR – tempo de retenção.

Composto	Ion Precursor (m/z)	Ion Produto Quantificador (m/z)	Ion Produto Qualificador (m/z)	F (V)	EC (V)	TR (min)
Aciclovir	226	152	135	135	20	4,63
MAA desconhecida	317	214	165	100	30	3,03
Shinorina	333	186	230	100	25	1,31
Porphyra-334	347	303	186	100	25	2,22

Para a separação cromatográfica foram testadas diversas colunas tendo-se optado pela utilização de uma coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) (Phenomenex, EUA) mantida a 30 °C, sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. Este tipo de colunas é específico para retenção de compostos extremamente polares e melhoram o formato do pico para analitos ácidos¹⁶⁷. Diferentes métodos cromatográficos foram testados até optar-se pela utilização dos eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2,95). O gradiente de eluição encontra-se descrito na Tabela 13. Após os 6 min o fluxo de eluente foi direcionado para o descarte até ao final da análise. Antes de cada injeção de amostra, a agulha foi lavada com ACN/H₂O (50:50, v/v) por 5 s. O volume de injeção definido foi 10 μ L de amostra ressuspendida no eluente A, o que evitou instabilidades nos MAAs no momento da injeção e permitiu

a obtenção de bandas cromatográficas mais definidas. As análises foram realizadas utilizando o programa MassHunter Workstation B.04.01 (Agilent Technologies, EUA).

Tabela 13 – Condições de eluição do método de separação cromatográfica de MAAs em LC-MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

Tempo (min)	% Fase móvel B
0	0
2	0
6	95
7,50	95
8	0
12	0

3.3.6. Validação do método de quantificação

Uma vez que este trabalho foi desenvolvido no Brasil, e que os parâmetros de validação estabelecidos pelo órgão regulatório brasileiro (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA) são os mesmos que os definidos por outros órgãos internacionais^{134,168} este estudo baseou-se nas normas definidas pela ANVISA para a validação do método de quantificação de MAAs em cianobactérias^{136,137}. Este estudo foi focado em uma abordagem de validação interna. O método foi validado em 3 dias para os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial), exatidão, recuperação, efeito matriz e estabilidade. Além disso, a faixa de trabalho, bem como os limites de detecção e quantificação foram avaliados.

SELEÇÃO DA MATRIZ BIOLÓGICA

Neste método de validação utilizou-se como matriz biológica a biomassa seca da cianobactéria *Arthrospira platensis*, anteriormente conhecida por *Spirulina*. Esta biomassa é comercializada em pó para alimentação humana.

SELEÇÃO DOS PADRÕES INTERNOS

Um padrão interno é um composto químico adicionado à amostra em uma quantidade conhecida a fim de verificar a execução correta do método analítico. O padrão interno deve ser quimicamente estável e, tipicamente, mostrar o mesmo comportamento do analito alvo ¹³². Para a seleção do padrão interno foi realizada uma análise bibliográfica dos padrões habitualmente utilizados em estudos de quantificação de MAAs. Após análise dos padrões utilizados, testaram-se outros dois compostos, o 1-metil-triptofano e o aciclovir (Figura 8).

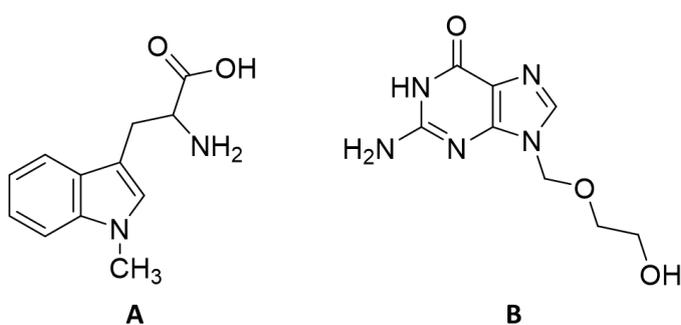


Figura 8. Estrutura molecular dos padrões internos testados (A) 1-metil-triptofano e (B) aciclovir.

Ambos os compostos foram selecionados com base na sua semelhança estrutural com os MAAs. O triptofano é um aminoácido que é sintetizado pelos mesmos precursores das MAAs numa rota paralela. O 1-metil-triptofano consiste no triptofano metilado e é um composto químico que ainda não foi reportado como um produto natural o que sugere que este não seja encontrado em nenhuma cultura de cianobactéria. O aciclovir, tal como o 1-metil-triptofano, também é um produto sintético com uma estrutura bastante semelhante aos MAAs, constituído por amins e hidroxila e valor de log *P* semelhante (compostos hidrofílicos) ¹⁶⁹. As soluções de padrão interno foram analisadas pelo método de quantificação de forma a determinar o padrão que melhor se adequa ao método selecionado.

PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

Prepararam-se soluções de trabalho dos padrões de MAAs diluindo as soluções *stock* em H₂O em diferentes concentrações para cada MAA dependendo da gama da curva de calibração: Shinorina –

100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 1200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; porphyrina-334 – 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; micosporina-glicina-alanina – 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A solução *stock* do padrão interno foi diluída em H₂O a uma concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções-estoque e de trabalho foram armazenadas a 4 °C. Antes de cada utilização, as soluções de trabalho foram colocadas à temperatura ambiente e agitadas.

ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

A especificidade e a seletividade foram determinadas pela capacidade do método distinguir os analitos de interesse de outras substâncias. Avaliou-se o tipo de experimento selecionado para a quantificação e a qualidade das bandas cromatográficas obtidas. A especificidade foi verificada através da análise de amostras reais e de soluções padrão dos analitos de interesse para determinar qualitativamente se continham quaisquer componentes de matriz que pudessem interferir com a detecção e quantificação de qualquer dos MAAs. A simetria do pico foi definida usando o fator de assimetria (As). O fator As representa um equilíbrio entre os dois lados do pico, com um As de 1,0 indicando que o pico está equilibrado. Valores < 1 indicam assimetria no lado direito do pico, enquanto valores > 1 sugerem picos com cauda alongada. No entanto, picos com As > 1,5 são aceitáveis ¹⁷⁰. A resolução (Rs) quantifica a seletividade no eixo do tempo em relação aos analitos adjacentes pela separação cromatográfica. Valores de resolução > 1,5 representam uma separação da linha de base das substâncias indicando uma boa separação cromatográfica ¹⁷¹. O tempo de retenção é um parâmetro importante para a identificação de compostos. A variabilidade na precisão do tempo de retenção foi avaliada pela análise repetida em uma sequência analítica de extratos contendo MAAs.

LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O LoD foi definido como a menor concentração de analito injetada que originou uma banda cromatográfica que produziu uma gaussiana eluindo dentro de $\pm 2\%$ do tempo médio de retenção do padrão e pelo menos três vezes superior ao nível de ruído da linha de base ao redor do pico. O LoQ

foi definido como a concentração de analito que deu origem a uma banda analítica com uma relação sinal/ruído de 10:1 em relação às interferências da matriz biológica no tempo de retenção dos analitos.

CURVA DE CALIBRAÇÃO E LINEARIDADE

De modo a determinar a gama de concentrações de MAAs sobre as quais o método de quantificação pode ser aplicado, as soluções-padrão de MAAs preparadas anteriormente foram adicionadas aos extractos de matriz biológica. Foram adicionados 10 µL da solução de padrão interno e 10 µL da solução de trabalho de MAAs nos tubos contendo 5 mg de biomassa de matriz biológica. As amostras dopadas foram extraídas com 1980 µL de solvente de extração. A linearidade foi avaliada com três repetições (n = 3) em sete níveis para a shinorina e para a micosporina-glicina-alanina e seis níveis para a porphyra-334 (Tabela 14).

Tabela 14 – Níveis da curva de calibração utilizados na validação do método de quantificação dos MAAs analisados.

	Shinorina (µg.mg ⁻¹ _{biomassa})	Porphyra-334 (µg.mg ⁻¹ _{biomassa})	Micosporina-Glicina-Alanina (µg.mg ⁻¹ _{biomassa})
Nível 1	0,20	0,10	0,05
Nível 2	0,40	0,20	0,10
Nível 3	0,80	0,60	0,20
Nível 4	1,20	0,80	0,30
Nível 5	1,60	1,20	0,40
Nível 6	2,40	1,60	0,60
Nível 7	3,20		0,80

Foi também analisado um branco (matriz isenta de analitos e de padrão interno) e um zero (matriz biológica dopada com o padrão interno). Todos os pontos foram analisados em triplicata. O método foi validado através da elaboração de curvas de calibração para cada analito e foram geradas equações de regressão linear. O coeficiente de correlação (R²) foi utilizado para avaliar a linearidade da curva de calibração para cada MAA analisado.

CONTROLES DE QUALIDADE

Os CQs foram preparados em três níveis diferentes para cada analito (baixo, médio e alto), conforme descrito na Tabela 15. Todas as amostras foram preparadas em 4 réplicas ($n = 4$) e o processo foi repetido em 3 dias não consecutivos ($n = 12$).

Tabela 15 – Concentração final dos controles de qualidade (baixo, médio e alto) para cada MAA analisado.

	Shinorina ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{biomassa}$)	Porphyra-334 ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{biomassa}$)	Micosporina-Glicina-Alanina ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{biomassa}$)
CQ baixo	0,40	0,20	0,10
CQ médio	1,20	0,60	0,30
CQ alto	2,40	1,20	0,60

Precisão

A precisão foi calculada pelo coeficiente de variação (CV), ou desvio padrão relativo (DPR):

$$CV(\%) = DPR = \frac{DP}{C_{\text{media}}} \times 100$$

Onde, DP corresponde ao desvio padrão e C_{media} à concentração média determinada. Avaliou-se a precisão através da repetibilidade (precisão intra-dia) e da reprodutibilidade dentro do laboratório (precisão inter-dia). A variabilidade na precisão do tempo de retenção foi também avaliada com a análise repetida de uma sequência analítica de extratos contendo MAAs.

Exatidão

A exatidão foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\frac{C_{\text{medida}}}{C_{\text{nominal}}} \times 100$$

Onde, C_{medida} corresponde à concentração medida e C_{nominal} corresponde à concentração nominal.

RECUPERAÇÃO

Na ausência de materiais de referência de matriz certificados, rastreáveis a padrões internacionais com um nível conhecido de incerteza, a recuperação foi realizada através da análise de matriz biológica dopada com soluções padrão dos analitos e do padrão interno antes e depois da extração:

$$\frac{C_{dopa/extrai}}{C_{extrai/dopa}}$$

Para amostras de matriz dopadas antes da extração ($C_{dopa/extrai}$), amostras de spirulina ($5,00 \pm 0,05$ mg) foram misturadas com 10 μ L de solução de trabalho dos três MAAs e 10 μ L de solução padrão interna antes da extração. As amostras dopadas foram armazenadas por 4h em temperatura ambiente para atingir o equilíbrio entre os analitos e a matriz. Posteriormente, foram extraídas com 1980 μ L de solvente de extração, de acordo com o protocolo de extração estabelecido neste trabalho. Para amostras de matriz dopadas após a extração ($C_{extrai/dopa}$), foram extraídas amostras de matriz em branco ($5,00 \pm 0,05$ mg de matriz biológica em 2000 μ L de solvente de extração). Em seguida, uma alíquota do extrato bruto (990 μ L) foi combinada com 5 μ L de solução de trabalho dos três MAAs e 5 μ L de solução de trabalho do padrão interno.

EFEITO MATRIZ

Avaliou-se o efeito matriz comparando a resposta do analito de interesse na matriz biológica após extração e na ausência da matriz biológica. O efeito matriz foi calculado como uma razão percentual das inclinações (m) de cada curva de calibração preparada nas amostras de matriz dopadas após extração e amostras dos analitos em solvente:

$$EF = \frac{m_{matriz}}{m_{solvente}}$$

As amostras dos analitos em solvente foram preparadas com soluções de trabalho não extraídas reconstituídas no eluente A.

ESTABILIDADE

A insuficiente estabilidade dos analitos durante a análise pode dar origem a desvios significativos no resultado da análise. Assim, a estabilidade das amostras reais foi verificada durante o tempo de permanência no amostrador automático. As alíquotas foram analisadas imediatamente a seguir à extração, após 4h, 8h, 12h, 24h e 48h. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente durante todo o processo.

3.4. CULTIVOS PARA INDUÇÃO DE MAAS

3.4.1. Sistema de cultivo

O sistema de cultivo selecionado para estes experimentos foi um frasco de cultura TPP estéril de 25 cm² (50 mL, TP90026 - Figura 9). Estes frascos são equipados com uma membrana de PTFE de 0,22 µm de diâmetro do poro que permite trocas gasosas estéreis através dos orifícios da tampa ¹⁷².



Figura 9. Frasco de cultura TPP com membrana de diâmetro de poro 0,22 µm utilizado para os cultivos da cianobactéria ITEP-024. Fonte: TPP Techno Plastic Products AG, 2017 ¹⁷².

Nestes frascos a razão superfície/profundidade é maximizada o que facilita a penetração da luz aumentando a concentração celular das culturas. Além disso, a eficiência de penetração da UVR, nomeadamente na região UVB, é bastante superior em comparação com frascos de vidro ou outros frascos descartáveis existentes no mercado (Figura 10).

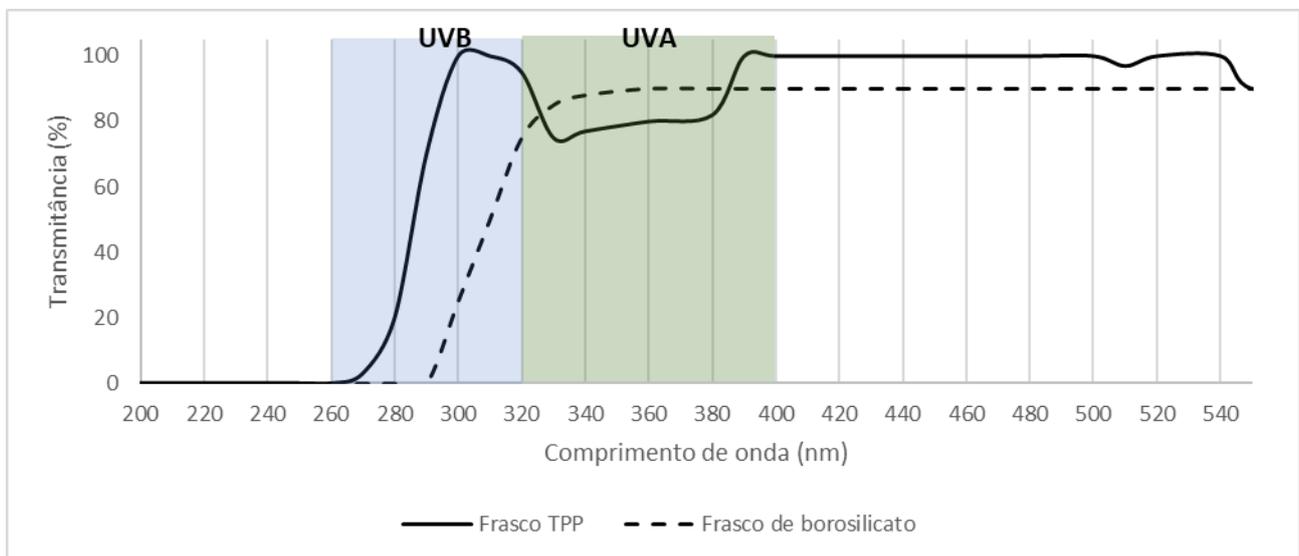


Figura 10. Espectro de penetração da radiação nos frascos de cultura TPP e em frascos de vidro de borosilicato.

3.4.1. Determinação do crescimento celular

O crescimento celular de uma cultura pode ser determinado através da sua curva de crescimento. Há cinco fases definidas para o crescimento de cianobactérias em meio líquido: a) fase de latência que é a fase que se segue à inoculação da cepa e é caracterizada por não ocorrer crescimento; b) fase exponencial que é a fase em que ocorre um aumento acentuado do número de organismos na cultura; c) fase de desaceleração em que ocorre um declínio no crescimento da cultura devido a um fator necessário para a divisão celular se ter tornado limitante; d) fase estacionária que é caracterizada por ausência de crescimento; e) fase de morte que ocorre quando o metabolismo celular já não pode ser mantido. Nos experimentos de otimização da produção de MAAs, o crescimento celular das culturas foi acompanhado através da realização de peso seco das culturas (mg/mL) utilizando filtros Sartorius Glass Microfibre Filter 13400 de diâmetro 47 mm.

O peso seco foi calculado com base na seguinte fórmula:

$$Biomassa (g/L) = \frac{P_f - P_i (mg)}{V (mL)}$$

Onde P_f é o peso final após 2 dias de secagem a 70 °C, P_i é o peso inicial e V é o volume filtrado.

Foram também realizadas análises espectrofotométricas a 750 nm. Esta análise foi realizada através da leitura direta das amostras num espectrofotómetro ultravioleta-visível (UV-Vis) Evolution 260 BIO (Thermo Scientific, EUA). Em relação determinação da produção de MAAs, as amostras foram liofilizadas e analisadas em LC-MS de acordo com os protocolos de extração e quantificação definidos neste projeto.

3.4.2. Correlação entre parâmetros de crescimento para a cepa ITEP-024

Com os dados das análises espectrofotométricas e do peso seco da cultura traçou-se uma curva de correlação entre a biomassa/ mL de cultura e a densidade ótica a 750 nm para a cepa ITEP-024. Em alguns pontos foi realizada a contagem do número de células por mL em câmara Neubauer que também permitiu traçar uma correlação entre este parâmetro e o peso seco da cultura (mg/mL).

3.4.3. Produção de MAAs nas condições de cultivo padrão

Para quantificar a produção de MAAs nas condições definidas para este estudo realizou-se um experimento no qual foi acompanhado o crescimento celular das culturas e a concentração de MAAs ao longo de um cultivo. Este estudo foi realizado nas condições definidas como padrão para os diversos experimentos que serão realizados durante este projeto (Tabela 16).

Tabela 16 – Condições de cultivo padrão definidas para os experimentos deste projeto.

Condições de cultivo padrão	
Duração do experimento	45 dias
Meio nutritivo	ASM-1 (2mM de nitrogênio)
Tipo de cultivo	Batch
Regime de crescimento	Autotrófico
Volume dos cultivos	30 mL
Temperatura	25 ± 2 °C
Fonte de iluminação (Radiação)	Lâmpadas brancas fluorescentes OSRAM L 36 W:32 Lumilux de luxe PAR
Agitação	Manual (duas vezes/dia)
Intensidade luminosa	80 ± 10 μmol.m ⁻² .s ⁻¹
Fotoperíodo	12h:12h
Salinidade	0 g/L

3.4.4. Indução de MAAs

Definidos e validados os protocolos de extração e quantificação de MAAs por LC-MS/MS em cianobactérias, realizaram-se alguns experimentos de indução destes compostos na cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 e em outras cianobactérias. O objetivo destes experimentos foi avaliar o efeito da UVR na produção dos MAAs. Para induzir a biossíntese de MAAs, as cianobactérias foram irradiadas com radiação UVA (máximo de iluminação nos 370 nm) fornecida por duas lâmpadas Philips TL -K 40W/10-R UV-A e radiação UVB (máximo de iluminação nos 290 nm) fornecida por duas lâmpadas Philips TL 40W/12 RS SLV/25 (Figura 11), além de lâmpadas de radiação PAR (máximo de iluminação nos 550 nm) (Figura 12).

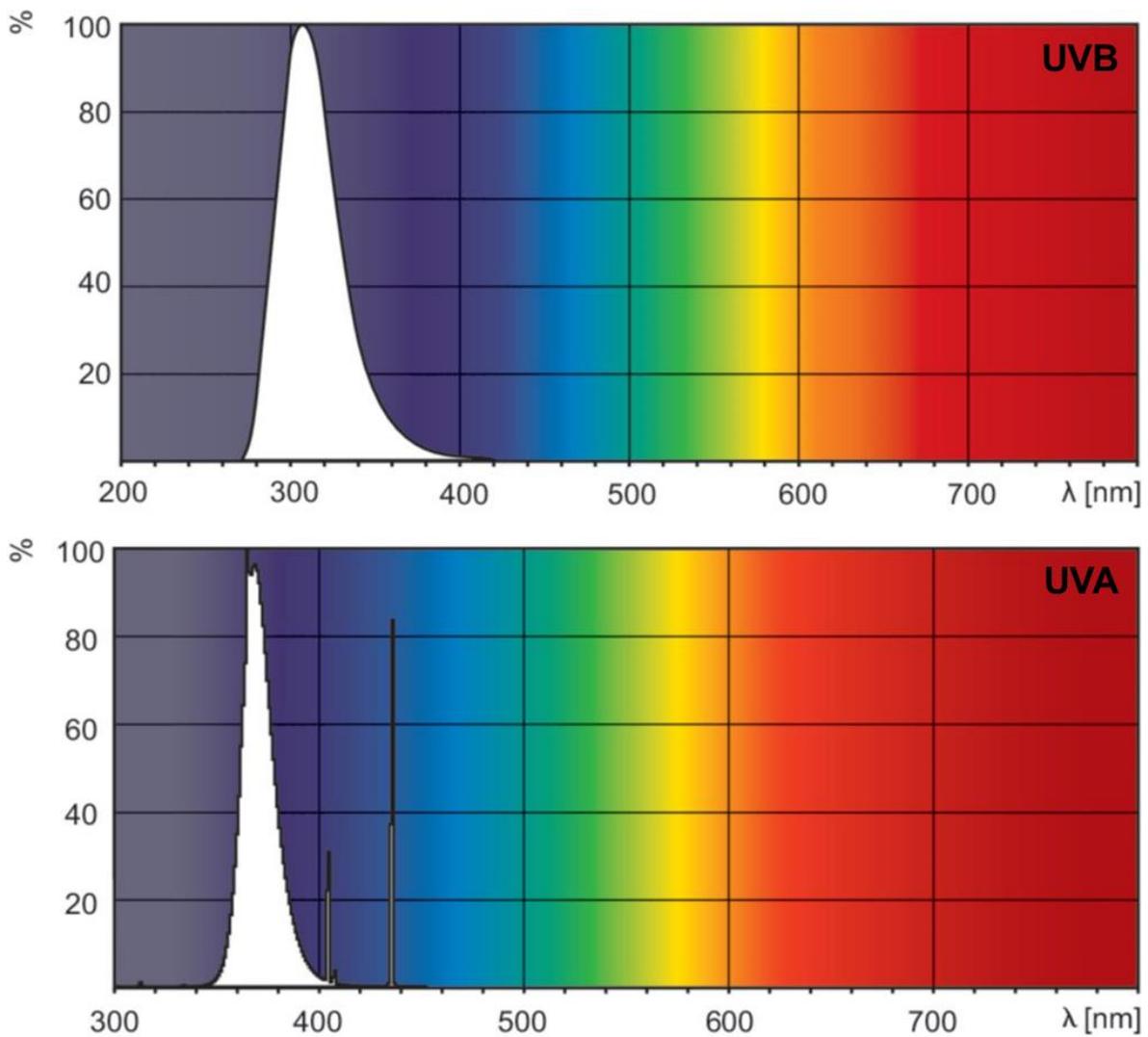


Figura 11. Espectro de emissão das lâmpadas de UVA e UVB.

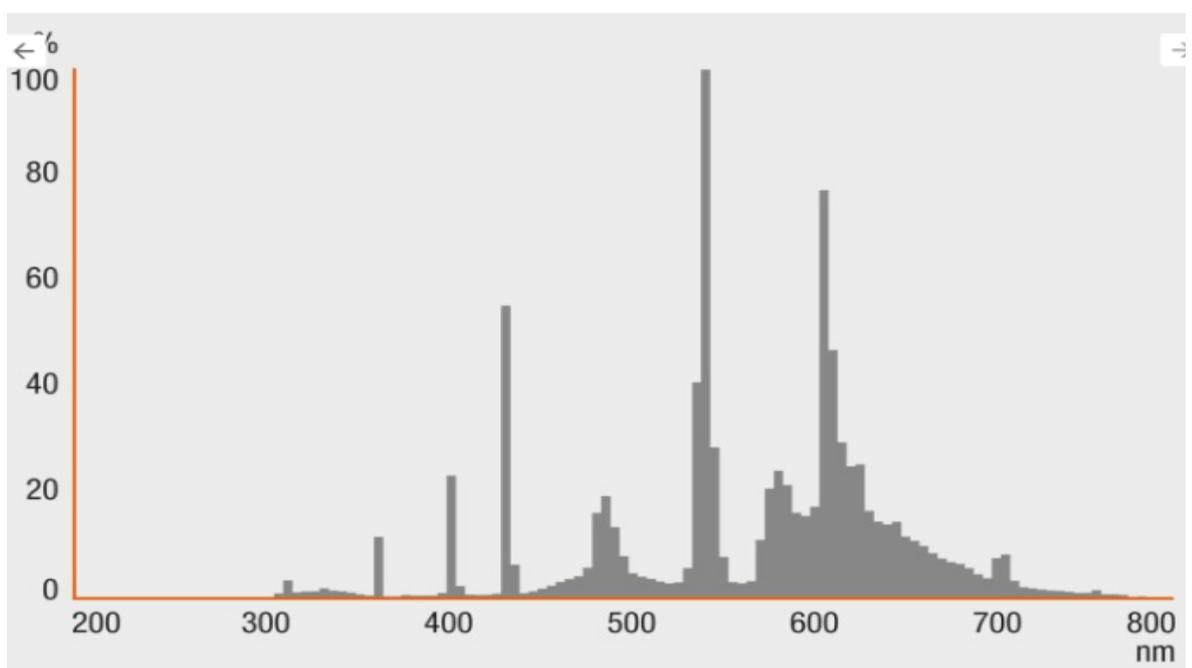


Figura 12. Espectro de emissão das lâmpadas PAR.

A concentração celular inicial e final foi registrada através da medição do peso seco das culturas. 30 ml de cultura foram irradiadas a uma distância de 40 cm das lâmpadas a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ luz:escuro (12h:12h) durante 3 dias. Alíquotas foram coletadas no início e no final do experimento para comparação de resultados através da análise em HPLC-MS.

INDUÇÃO DE MAAS NA CIANOBACTÉRIA *S. TORQUES-REGINAE* ITEP-024

Foram realizados diversos experimentos com a cianobactéria *S. torques-reginae* ITEP-024 com combinações diferentes de radiação: escuro, PAR, PAR+UVA, PAR+UVB, PAR+UVA+UVB de modo a determinar a influencia de cada região do espectro na produção dos MAAs.

3.4.1. Indução de MAAs na presença de inibidores da via do ácido chiquímico

Avaliou-se a produção de MAAs pela cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 na presença de glifosato, um inibidor da via do ácido chiquímico. A cepa foi cultivada em meio ASM-1 a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob ciclo luz:escuro (12h:12h). O cultivo foi então suplementado com glifosato (2 mM) e incubado por 24 h. Para induzir a biossíntese de MAAs, seguiu-se o método de indução de MAAs descrito (3.4.4).

INDUÇÃO DE MAAS EM OUTRAS CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS

Realizou-se um experimento de indução de MAAs com UVR em algumas das cepas disponíveis no LTPNA nas quais se detetou a presença de MAAs via HPLC-MS. Na Tabela 17 são apresentadas as cepas que foram analisadas.

Tabela 17 – Cianobactérias analisadas para quantificação de MAAs em experimento de indução com UVR.

Código da cepa	Nome	Código da cepa	Nome
CCIBt 3168	<i>Rhabdoderma</i> sp.	CCIBt 3330	<i>Cyanosarcina</i> sp.
CCIBt 3180	<i>Microcystis panniformis</i>	CCIBt 3338	<i>Leptolyngbya</i> sp.
CCIBt 3194	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CCIBt 3343	<i>Dolichospermum</i> sp.
CCIBt 3214	<i>Geitlerinema amphibium</i>	CCIBt 3464	<i>Scytonema</i> sp.
CCIBt 3247	<i>Nostoc</i> sp.	CCIBt 3496	<i>Myxosarcina</i> sp.
CCIBt 3265	<i>Desertifilum tharense</i>	CCIBt 3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>
CCIBt 3275	<i>Desertifilum tharense</i>	CCIBt 3607	<i>Gloecapsa</i> sp.
CCIBt 3289	<i>Calothrix</i> sp.	CCIBt 3626	<i>Leptolyngbya</i> sp.
CCIBt 3292	<i>Nostoc</i> sp.	CENA-21	<i>Nostoc piscinale</i>
CCIBt 3307	<i>Komarekiella atlantica</i>	CENA-543	<i>Nostoc</i> sp.
CCIBt 3313	<i>Chlorogloopsis</i> sp.	CENA-596	<i>Nodularia spumigena</i>
CCIBt 3320	<i>Calothrix</i> sp.	LTPNA-DBG-72	<i>Nostoc</i> sp.
CCIBt 3321	<i>Tolypothrix</i> sp.	ITEP 24	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>
CCIBt 3324	<i>Leptolyngbya</i> sp.	ITEP 26	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>
CCIBt 3329	<i>Nostoc</i> sp.		

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *SPHAEROSPERMOPSIS TORQUES-REGINAE* ITEP-024 (ARTIGO – ANEXO 1)

4.1.1. Seleção da cianobactéria - objeto de estudo

Em trabalhos anteriores de *screening* de perfil químico realizados no LTPNA com a cepa *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, observou-se a presença de metabólitos exibindo espectros de UV com absorção máxima nos 330 nm. Para confirmar a existência de MAAs, preparou-se um extrato aquoso desta cepa e o perfil de absorção no UV foi monitorado em espectrofotômetro com caminho óptico de 1 cm observando-se um pico bastante significativo na região do 330 nm que corresponde ao comprimento de onda padrão de absorção dos MAAs (Figura 13).

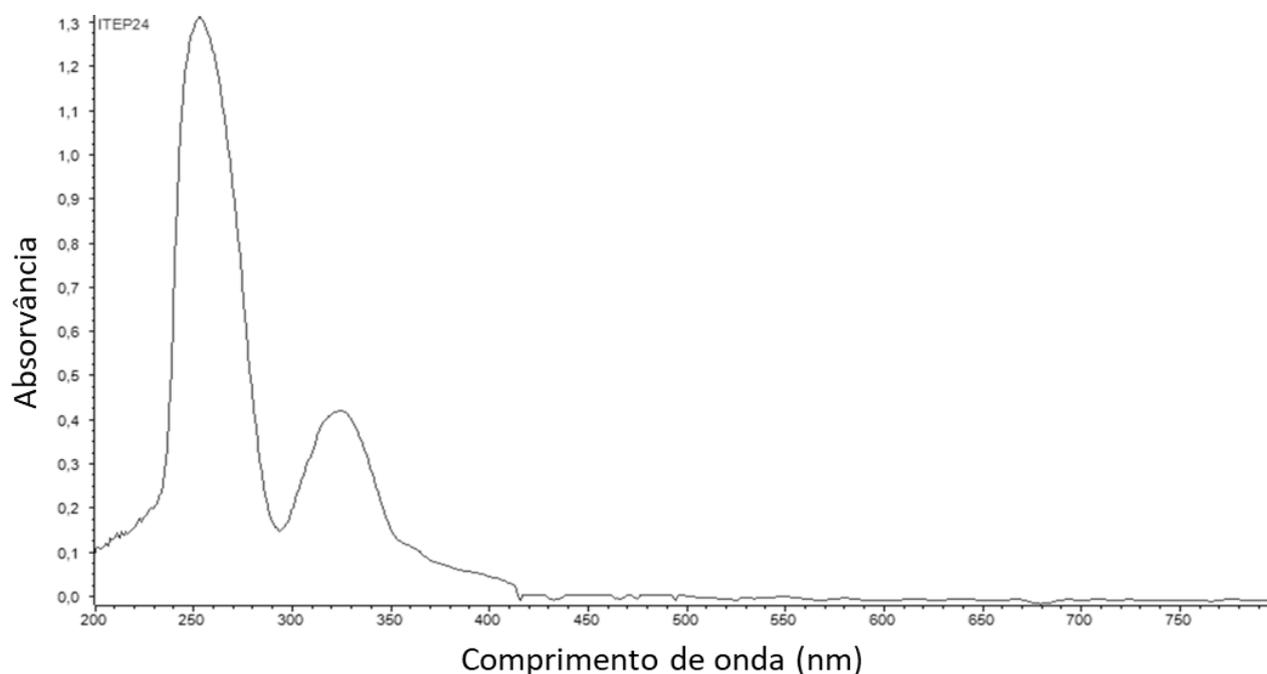


Figura 13. Espectros de absorção no UV do extrato de *S. torques-reginae* ITEP-024 obtido em espectrofotômetro com monitoramento entre 200-800 nm.

Desta forma, a cepa *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 foi selecionada como objeto de estudo deste projeto para o desenvolvimento dos métodos de extração, identificação, isolamento e quantificação de MAAs, uma vez que demonstrou produzir uma quantidade bastante significativa dos compostos de interesse nas condições de cultivo laboratoriais, ou seja, mesmo sem qualquer exposição à UVR. A cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 é uma cianobactéria filamentosa (Figura 7)

que foi isolada de um reservatório no Nordeste do Brasil ¹⁴². Esta região é conhecida pelo seu clima seco e pela alta intensidade da luz solar ¹⁷³. Isto sugere que a cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 pode estar naturalmente adaptado às condições do local de onde foi isolada ou ainda que os MAAs produzidos poderão servir para outras funções celulares e não apenas para proteção solar ⁶¹.

4.1.2. Isolamento de MAAs via HPLC-DAD

Após a realização de vários métodos cromatográficos para detecção e separação de MAAs, o que apresentou o melhor resultado foi o descrito na Tabela 9 do Capítulo 3.3.3 tendo-se obtido um cromatograma com as bandas bem resolvidas e com boa separação cromatográfica para os três padrões de MAAs disponíveis – shinorina, palitina e porphyrina-334 (Figura 14).

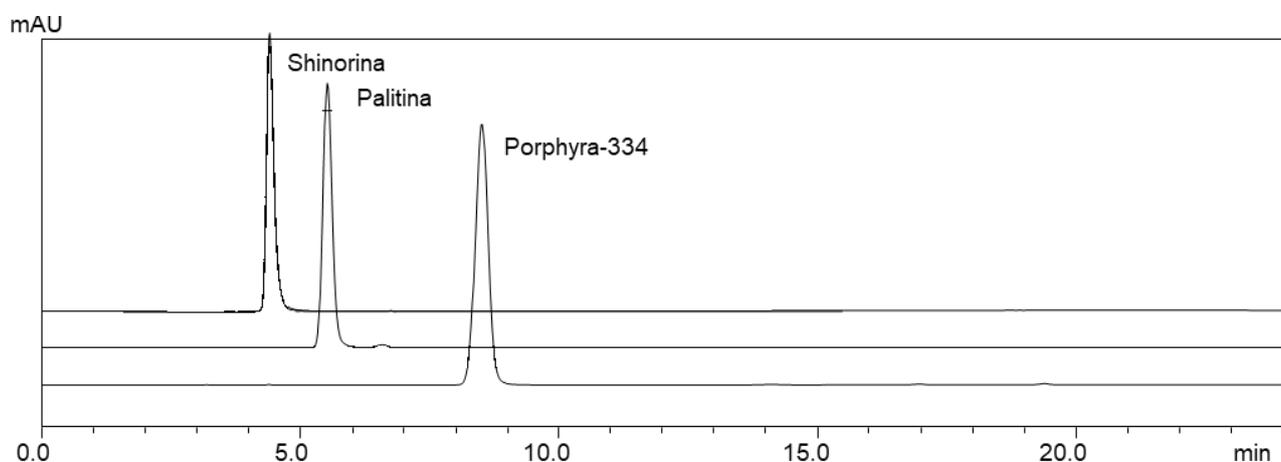


Figura 14. Cromatograma de HPLC-DAD semi-preparativo a 330 nm dos padrões de MAAs isolados do composto Helioguard 365 utilizando os eluentes (A) 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH₄OH), (B) H₂O/MeOH/ACN (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 % numa coluna analítica Luna C18 (150x4,6 mm, 5 μm) sob uma vazão de 0,5 mL.min⁻¹ mostrando o tempo de retenção dos 3 MAAs presentes no extrato (shinorina: 4,34 min; palitina: 5,44 min; porphyrina-334: 8,50 min).

Em seguida, analisou-se o extrato aquoso de ITEP-024 onde se detectou anteriormente a presença de três MAAs com pico de absorção máximo próximo dos 330 nm (Figura 15).

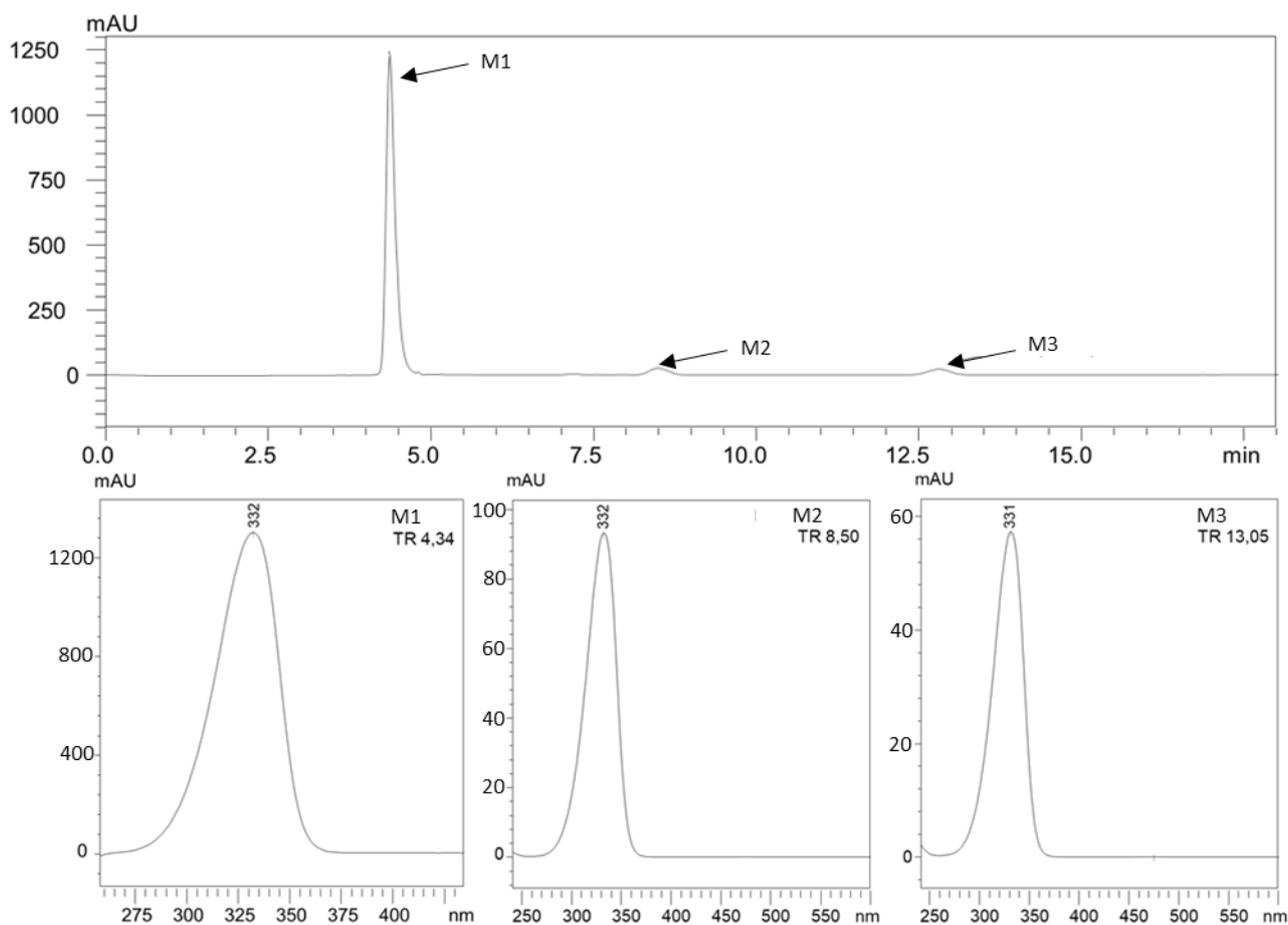


Figura 15. Cromatograma de HPLC-DAD a 330 nm dos MAAs detectados no extrato de biomassa de ITEP-024 (shinorina: 4,34 min; palitina: 4,53; porphyra-334: 8,50 min e MAA de m/z 317: 13,05 min) e espectros de UV, obtidos utilizando os eluentes (A) 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH_4OH), (B) $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{ACN}$ (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 % numa coluna analítica Luna C18 (150x4,6 mm, 5 μm) sob uma vazão de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Compararam-se os tempos de retenção (TR) dos MAAs detectados com os padrões de MAAs analisados. Os resultados sugeriram que o composto M1 com TR 4,34 poderia ser a shinorina e o composto M2 com TR 8,50 poderia ser a porphyra-334. Em relação ao composto M3 com TR 13,05, não foi possível sugerir nenhum MAA pois o seu TR é diferente do TR dos padrões disponíveis.

4.1.3. Análise do extrato de *S. torques-reginae* ITEP-024 via HPLC-DAD-HRMS

Para confirmar a identidade dos MAAs presentes na cianobactéria *S. torques-reginae* ITEP-024, analisou-se o extrato aquoso em sistema HPLC-DAD-HRMS. Mais uma vez, foram detectados os compostos com características espectroscópicas típicas da classe biossintética alvo (MAAs). O processamento de bandas cromatográficas presentes nos cromatogramas de BPC (cromatograma de

pico base) do extrato avaliado revelou a presença dos íons m/z 333.1299, 347.1456 e 317.1351, correspondentes a substâncias com absorção máxima do espectro de UV em cerca de 330 nm como pode ser visualizado nas Figura 16 e Figura 17.

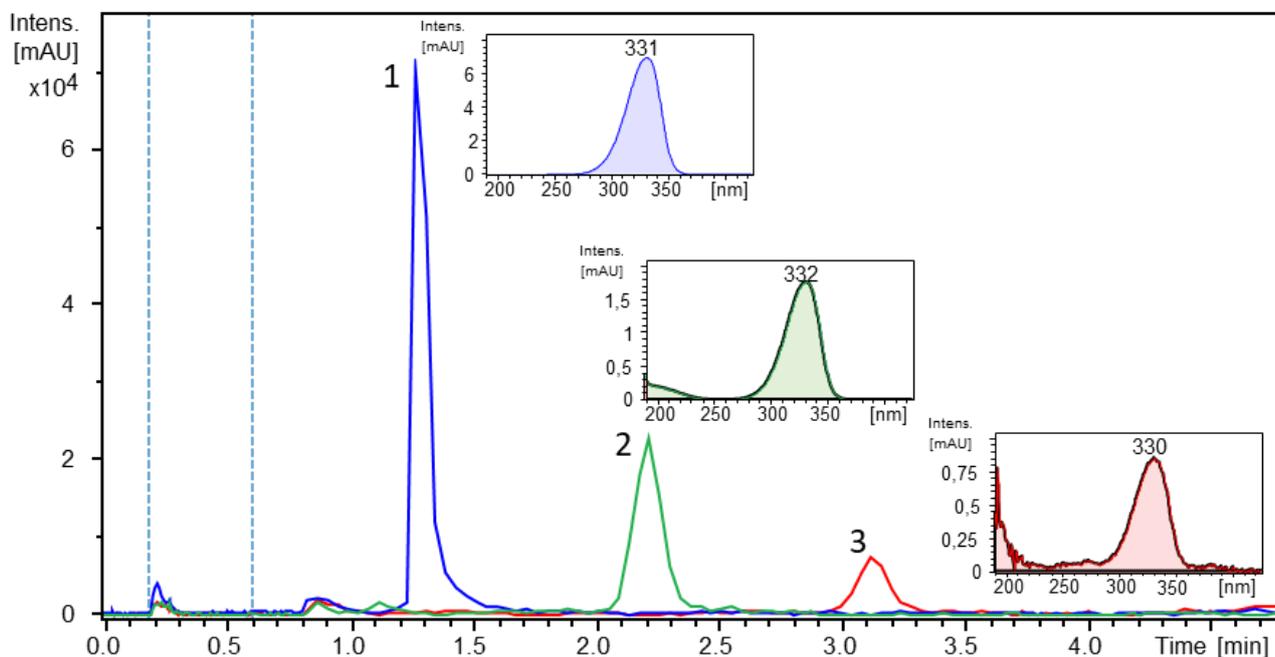


Figura 16. Cromatograma de íons extraídos (ESI+) e espectro UV dos MAAs: 1 - shinorina $C_{13}H_{20}N_2O_8$ (0.0 ppm; TR 1.1 min), 2 - porphyra-334 $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (-0.9 ppm; TR 2.2 min) e 3- micosporina-glicina-alanina $C_{13}H_{20}N_2O_7$ (0.3 ppm, TR 3.1 min) do extrato de *S. torques-reginae* ITEP-024 obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

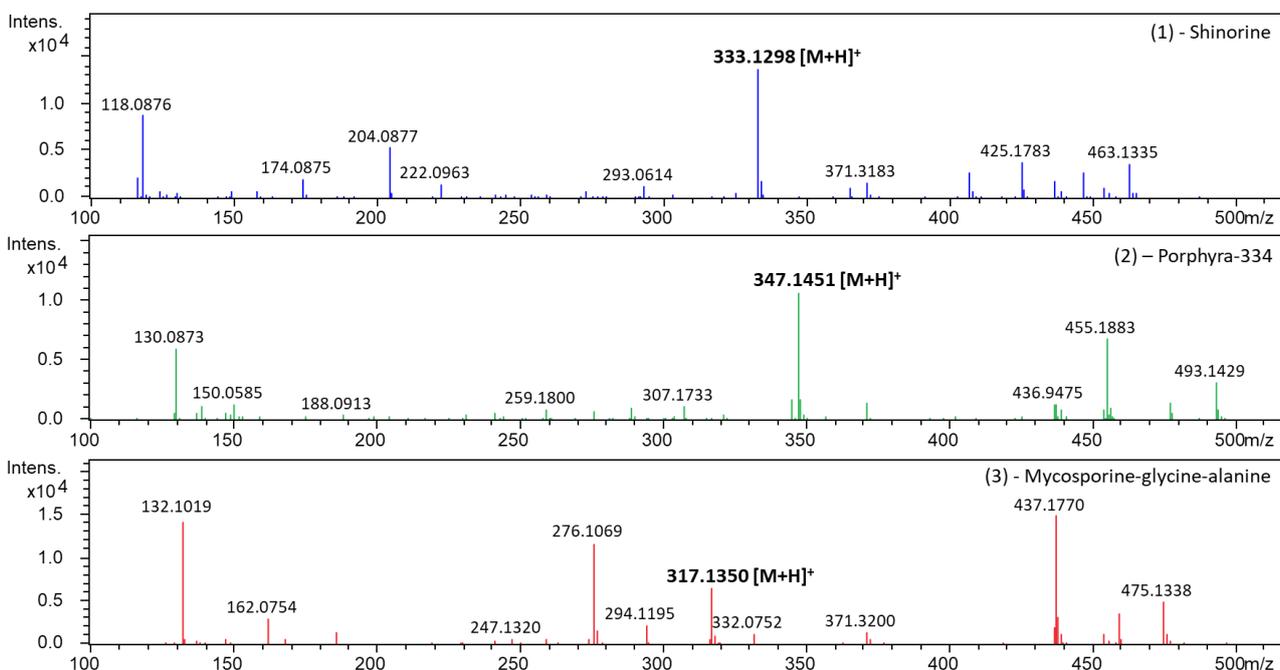


Figura 17. Espectros Full Scan (ESI +) dos MAAs: (1) - shinorina $C_{13}H_{20}N_2O_8$ (Erro: -0.3 ppm, mSigma 14.3), (2) - porphyra-334 $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (Erro: -0.3 ppm, mSigma 24.0) and (3) - micosporina-glicina-alanina $C_{13}H_{20}N_2O_7$ (Erro: -0.2 ppm, mSigma 16.1) presentes no extrato de *S. torques-reginae* ITEP-024, 35.3 eV, obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

A busca das massas acuradas detectadas em bases de dados da literatura confirmou a identificação de dois MAAs já conhecidos, a shinorina e a porphyra-334 referentes às espécies de m/z 333.1298 e 347.1451, respectivamente (Figura 18)^{174,175}.

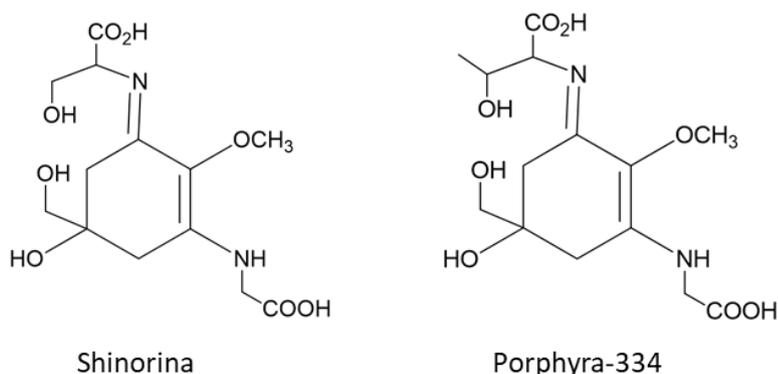


Figura 18. Estrutura molecular de A – shinorina (massa exata - m/z 333.1298) e B – porphyra-334 (massa exata - m/z 347.1454).

Tais identidades foram também confirmadas pela comparação com os padrões de MAAs em sistema HPLC-DAD-HRMS (Figura 19). Como referido anteriormente, vários estudos demonstram que estes MAAs apresentam função fotoprotetora e evitam o fotoenvelhecimento, tendo elevado potencial biotecnológico para aplicação na indústria cosmética^{107,109}.

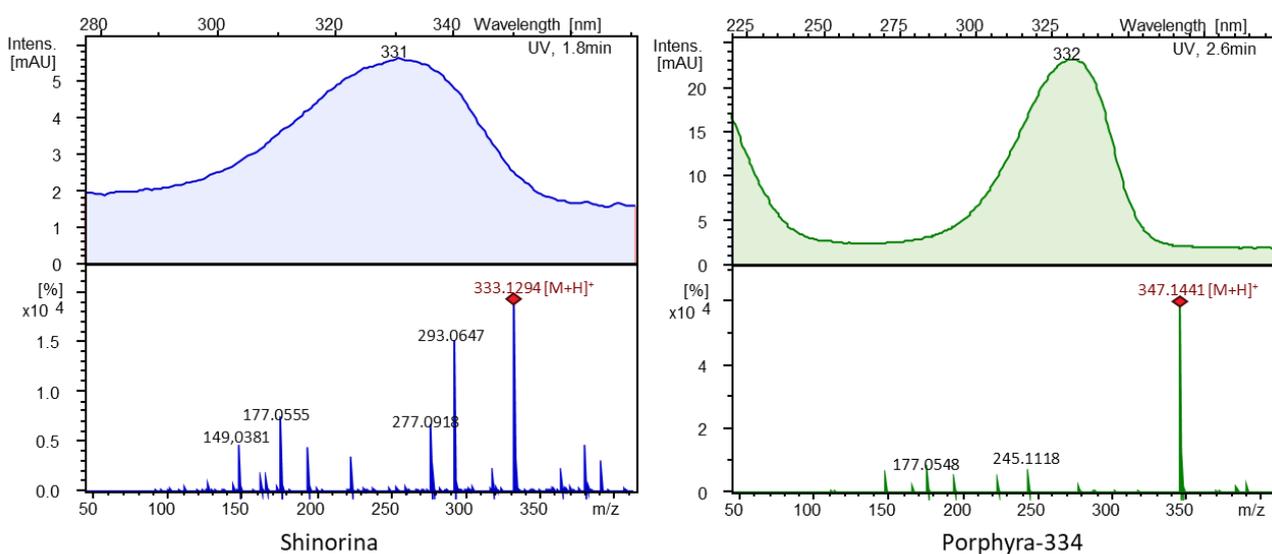


Figura 19. Espectros de UV e de Full Scan dos padrões de shinorina de m/z 333.1294 (Erro: -2.3 ppm, mSigma 12.4) e porphyra-334 de m/z 347.1441 (Erro: -2.0 ppm, mSigma 8.6) obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

Assim, observa-se a similaridade entre estes dois MAAs, presentes no extrato da cepa ITEP-024, e os padrões analisados, nomeadamente através da comparação dos perfis do espectro UV, das massas acuradas (Figura 17 e Figura 19), dos tempos de retenção visualizados nos cromatograma de íons extraídos (Figura 20) e dos perfis de fragmentação que foram compatíveis entre eles (Figura 21 e Figura 22). Além do referido, o erro (inferior a 5 ppm) e os valores de mSigma das massas acuradas destes íons indicam alta compatibilidade com a fórmula molecular dos MAAs shinorina e porphyra-334.

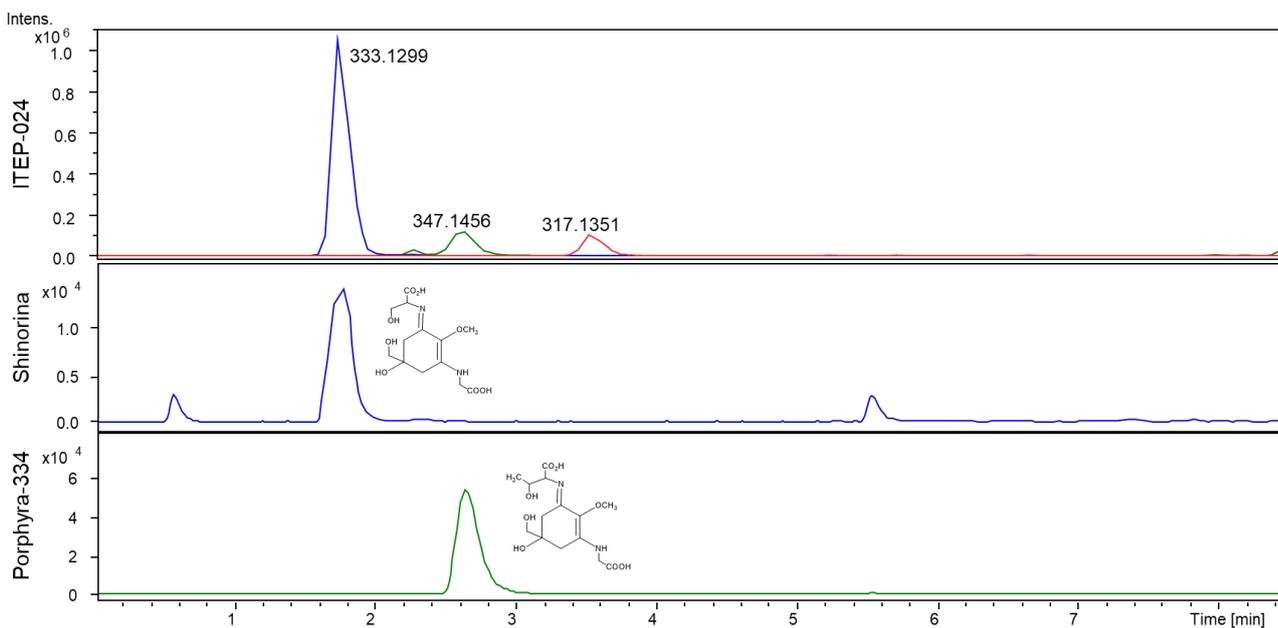


Figura 20. Cromatograma de íons extraídos com os tempos de eluição dos íons m/z 333.1299 (TR: 1.8 min), 347.1456 (TR: 2.7 min) e 317.1351 (TR: 3.6 min) presentes no extrato da cianobactéria ITEP-024 e dos padrões de shinorina (TR: 1.8 min) e porphyrin-334 (TR: 2.7 min) obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

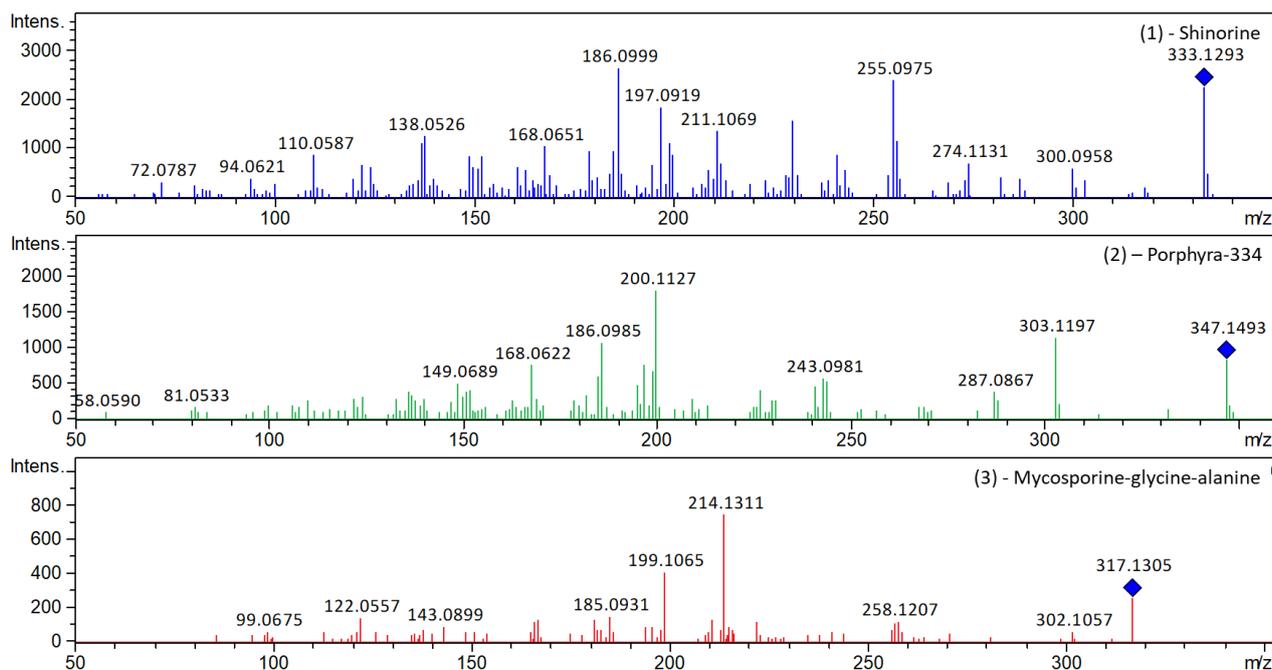


Figura 21. Espectros de fragmentação (ESI +) dos MAAs (1) - shinorina C₁₃H₂₀N₂O₈, (2) - porphyrin-334 C₁₄H₂₂N₂O₈ e (3) - micosporina-glicina-alanina C₁₃H₂₀N₂O₇ presentes na amostra de ITEP-024, 35.3 eV obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

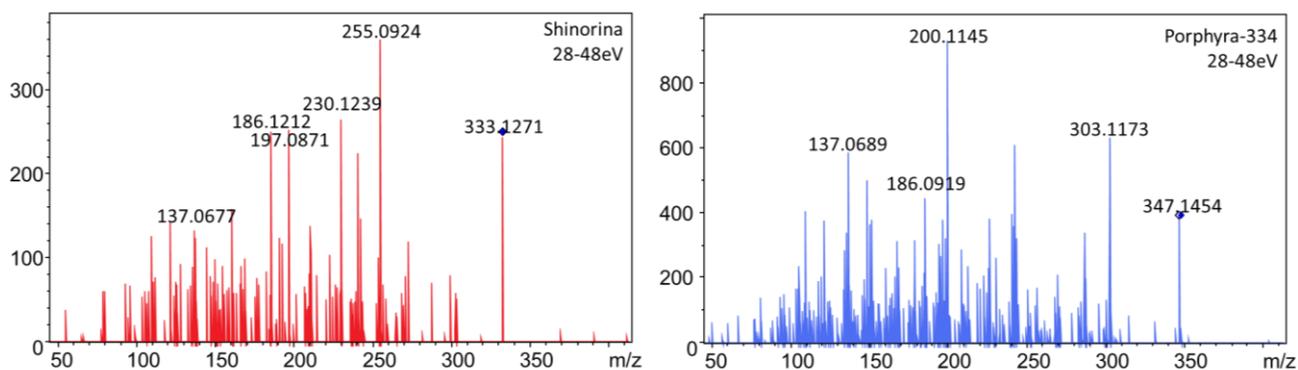


Figura 22. Espectros de fragmentação dos padrões de MAAs shinorina $C_{13}H_{20}N_2O_8$ e porphyra-334 $C_{14}H_{22}N_2O_8$, 35.3 eV obtidos via HPLC-DAD-HRMS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna analítica Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

O íon de m/z 317.1351 teve sua identidade correlacionada com a micosporina-glicina-alanina, um MAA reportado pela primeira vez em 2014, oriundo de um experimento de indução biossintética em hospedeiros heterólogos que não produzem naturalmente MAAs³⁷. De acordo com a elucidação estrutural realizada, a micosporina-glicina-alanina forma-se a partir da substituição do aminoácido serina (da shinorina) pelo aminoácido alanina (Figura 21 – (3))³⁷.

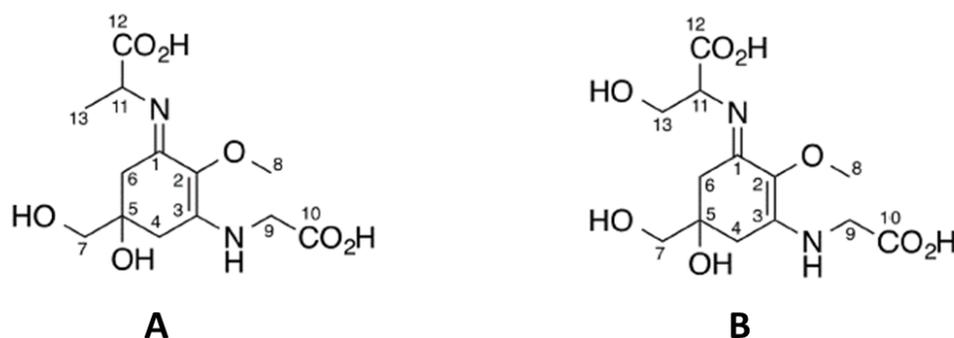


Figura 23. Estrutura molecular das MAAs (A) micosporina-glicina-alanina e (B) shinorina. Fonte: Miyamoto *et al.*, 2014³⁷.

Além do espectro de UV bastante característico aos MAAs, foi possível verificar grande semelhança no perfil de fragmentação entre o íon m/z 317.1351 (Figura 21) e os espectros dos demais MAAs encontrados no extrato de ITEP-024 (Figura 22), evidenciando que se trata de fato de um MAA, potencialmente a micosporina-glicina-alanina. Assim, iniciou-se o isolamento deste composto para

verificação da sua identidade química.

4.1.4. Purificação do MAA de 316 Da via HPLC-DAD semi-preparativo

Com o método cromatográfico estipulado (ver capítulo 4.1.2), a etapa seguinte focou na purificação do MAA de 316 Da (potencial micospolina-glicina-alanina) a partir de fracionamentos do extrato de biomassa de ITEP-024 (Figura 24). Para tal utilizou-se uma coluna semi-preparativa Luna C18 (2) (250x10,00 mm, 5 μ m) com características semelhantes à coluna analítica utilizada no isolamento dos MAAs. O método utilizado para a purificação do MAA de m/z 317 encontra-se descrito na Tabela 10 do Capítulo 3.3.3.

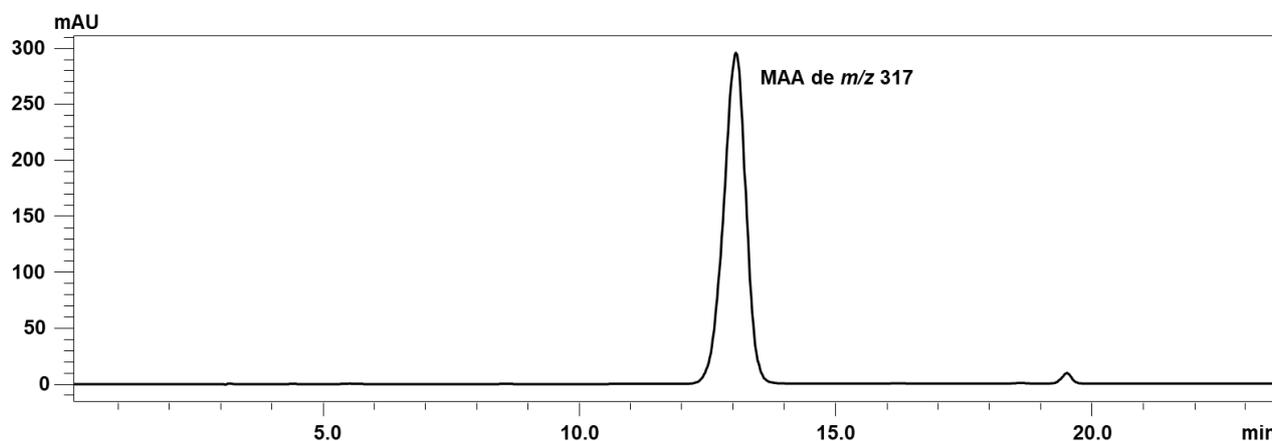


Figura 24. Cromatograma de HPLC-DAD a 330 nm do extrato de ITEP-24 purificado para obtenção do composto de m/z 317 utilizando os eluentes (A) 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH_4OH), (B) $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{ACN}$ (80:10:10) + ácido fórmico 0,2 % - pH 2,2 e (C) MeOH/ACN (1:1) + ácido fórmico 0,1 % numa coluna semi-preparativa Luna C18 (2) (250x10,00 mm, 5 μ m) sob uma vazão de 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Destaca-se que embora a cepa ITEP-024 produza três MAAs (shinorina, porphyra-334 e micospolina-glicina-alanina), a proporção de shinorina produzida por esta cepa é consideravelmente superior à dos outros MAAs, o que culminou em um rendimento baixo quanto à obtenção de micospolina-glicina-alanina. Assim, durante o período de purificação, foi possível obter 2 mg de micospolina-glicina-alanina que permitiu a realização da elucidação estrutural do composto e da validação do método de quantificação.

4.1.5. Elucidação estrutural do MAA de 316 Da

A análise dos dados de ressonância magnética nuclear (RMN) em 1 e 2 dimensões obtidos para a substância de massa molecular 316 Da, bem como a comparação com a literatura ³⁷, possibilitou a confirmação quanto à sua identidade química, tratando-se do MAA micosporina-glicina-alanina (Figura 23 - A). Os dados encontram-se resumidos e podem ser comparados através da Tabela 18, sendo a determinação estrutural da molécula discutida a seguir.

Tabela 18 – Dados de RMN obtidos para micosporina-glicina-alanina isolada de ITEP 24 e comparação com os dados da literatura. Fonte: Miyamoto *et al.*, 2014 ³⁷. Dados obtidos em 500 MHz (¹H), em CD₃OD, unidades de *J* em Hz e deslocamento químico em ppm. ^{a)} Dados obtidos através do espectro de projeção de ¹³C no experimento de HSQC (*) e HMBC (**).

Posição	Composto isolado			Miyamoto <i>et al.</i> , 2014 ³⁷	
	δ_H (mult, <i>J</i>) ^a	δ_C ^a	HMBC	δ_H (mult, <i>J</i>)	δ_C
1	-		-		160.8
2	-	122 **	-		127.4
3	-	160 **	-		162.4
4a	2.88 (d, 17.4)	34.6 *	-	2.85	34.5
4b	2.65 (d, 17.4)	34.6 *	-	2.69	
5	-	71 **	-		72.1
6a	2.95 (d, 17.3)	34.7 *	-	2.96	34.6
6b	2.73 (d, 17.3)	34.7 *	-	2.69	
7	3.49 (s)	69 *	C5, C6	3.47	69.1
8	3.66 (s)	59 *	C2	3.64	59.8
9	3.95 (s)	48 *	C3, C10	4.16	46.1
10	-	173 **	-		172.3
11	4.16 (q, 6.9)	55 *	-	4.45	53.6
12	-	174 **	-		175.0
13	1.48 (d, 6.9)	n. o.	C11, C12	1.53	19.9

De forma geral, o espectro de RMN de Hidrogênio (¹H) do MAA estudado (Figura 25), apresentou sinais de hidrogênios alifáticos metilênicos, metílicos, metínicos e oximetílicos. Como pode ser visualizado na Figura 26, nenhum outro sinal foi detectado acima da região correspondente a δ 4.5, com exceção do intenso sinal em δ 8.5, provavelmente oriundo de contaminação com ácido fórmico,

Quatro dupletos de metilenos diasterotópicos δ_H 2.88 (H₂-4a), 2.65 (H₂-4b), 2.95 (H₂-6a), 2.73 (H₂-6b) puderam ser observados com acoplamento dos núcleos H-4a e H-4b, assim como de H-6a e H-6b, ambos com constantes de acoplamento de 17 Hz. Adicionalmente, completando os demais núcleos metilênicos da estrutura, estão presentes no espectro outros dois singletos mais desblindados em δ_H 3.49 (H₂-7) e δ_H 3.95 (H₂-9), justificados por seus núcleos carbônicos conectados a heteroátomos, um singlete com integração correspondente a três hidrogênios também está presente em δ_H 3.66 (H₃-8), o que pode ser associado tipicamente a um núcleo oxi-metílico. O quadrupletto observado em δ_H 4.16 (H-11) foi atribuído ao hidrogênio metínico conectado entre a porção imino e o carbono carboxílico C-12 (δ_C 122), ao passo que o dupletto correspondente a três núcleos observado em δ_H 1.45 (H₃-13), foi compatível ao grupamento metílico vizinho, dada a constante de acoplamento em 6.9 Hz. O acoplamento entre estes núcleos foi corroborado pelas correlações homonucleares ¹H - ¹H bastante intensas entre H-11 e H-13 visualizadas no espectro de correlação (COSY) que identifica como os hidrogênios estão acoplados (Figura 27 e Figura 28). Da mesma forma, as correlações visualizadas neste experimento entre os hidrogênios diasterotópicos geminais H-4a e H-4b, bem como entre H-6a e H-6b são bastante notórias, assistindo mais uma vez à atribuição de tais sinais.

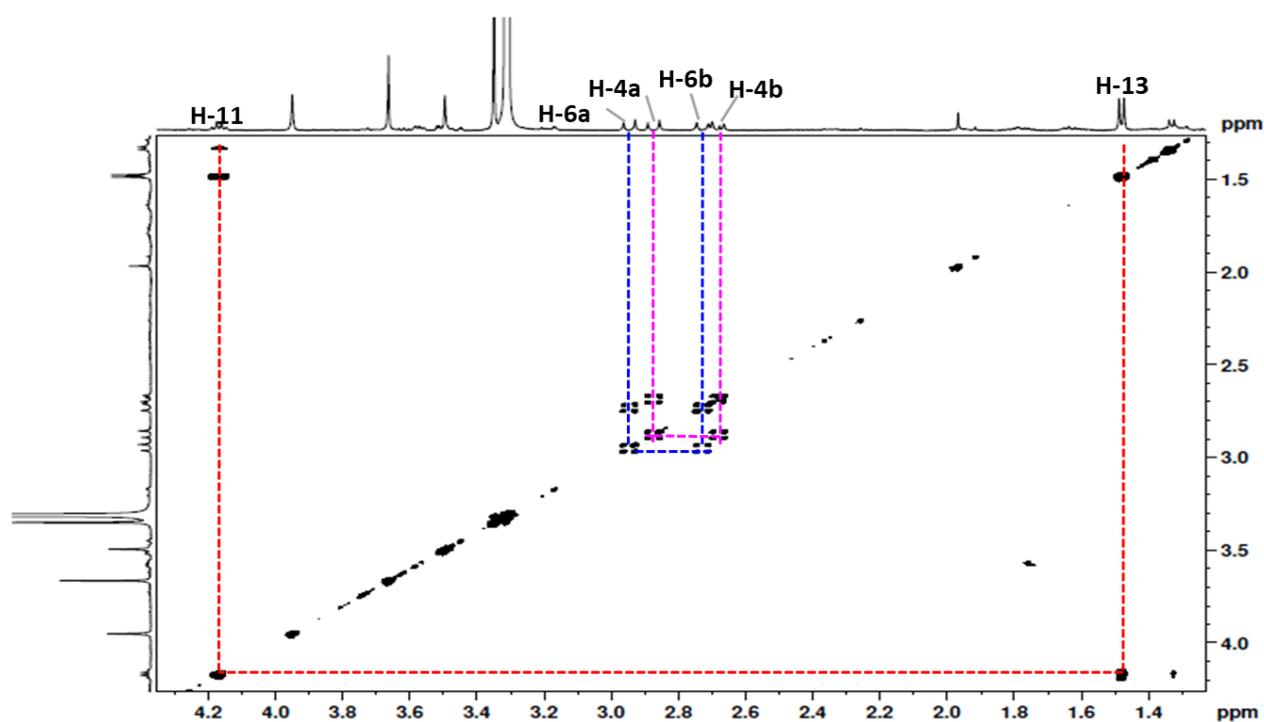


Figura 27. Espectro de COSY para a substância micosporina-glicina-alanina em CD₃OD (500 MHz). Correlações homonucleares ¹H - ¹H observadas no experimento de COSY encontram-se em destaque.

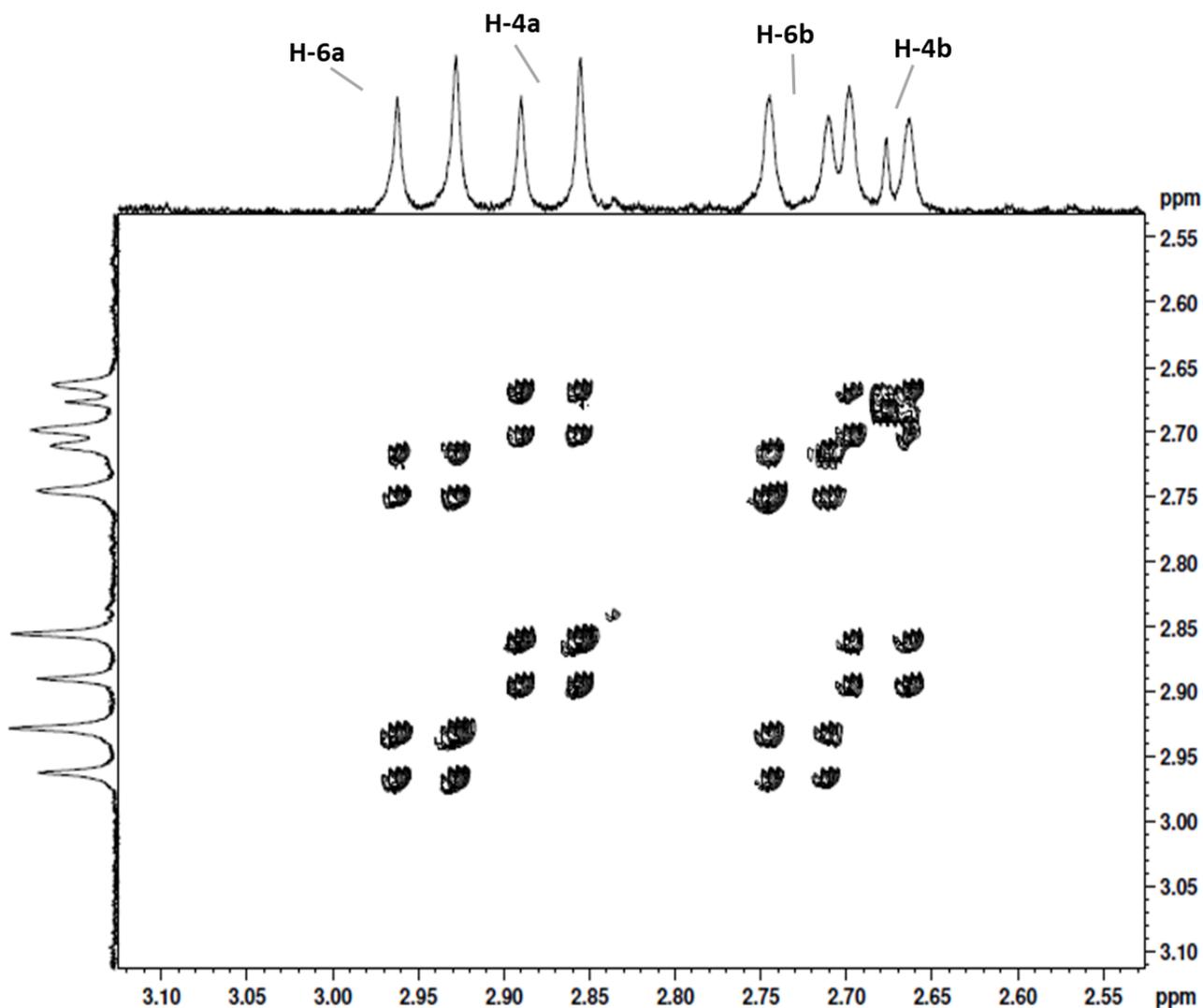


Figura 28. Ampliação da região do espectro COSY para a substância micosporina-glicina-alanina em CD₃OD (500 MHz).

Já os deslocamentos químicos atribuídos aos núcleos carbônicos do MAA (Tabela 18) foram obtidos através das projeções dos núcleos de ¹³C observadas nas correlações heteronucleares ¹H – ¹³C entre núcleos diretamente ligados apresentados no espectro heteronuclear de coerência de quantum simples HSQC) (Figura 29 e Figura 30), ou alternativamente através das projeções dos núcleos de ¹³C encontradas a partir das correlações a longa distância detectadas no espectro heteronuclear de correlação entre múltiplas ligações (HMBC) (Figura 31).

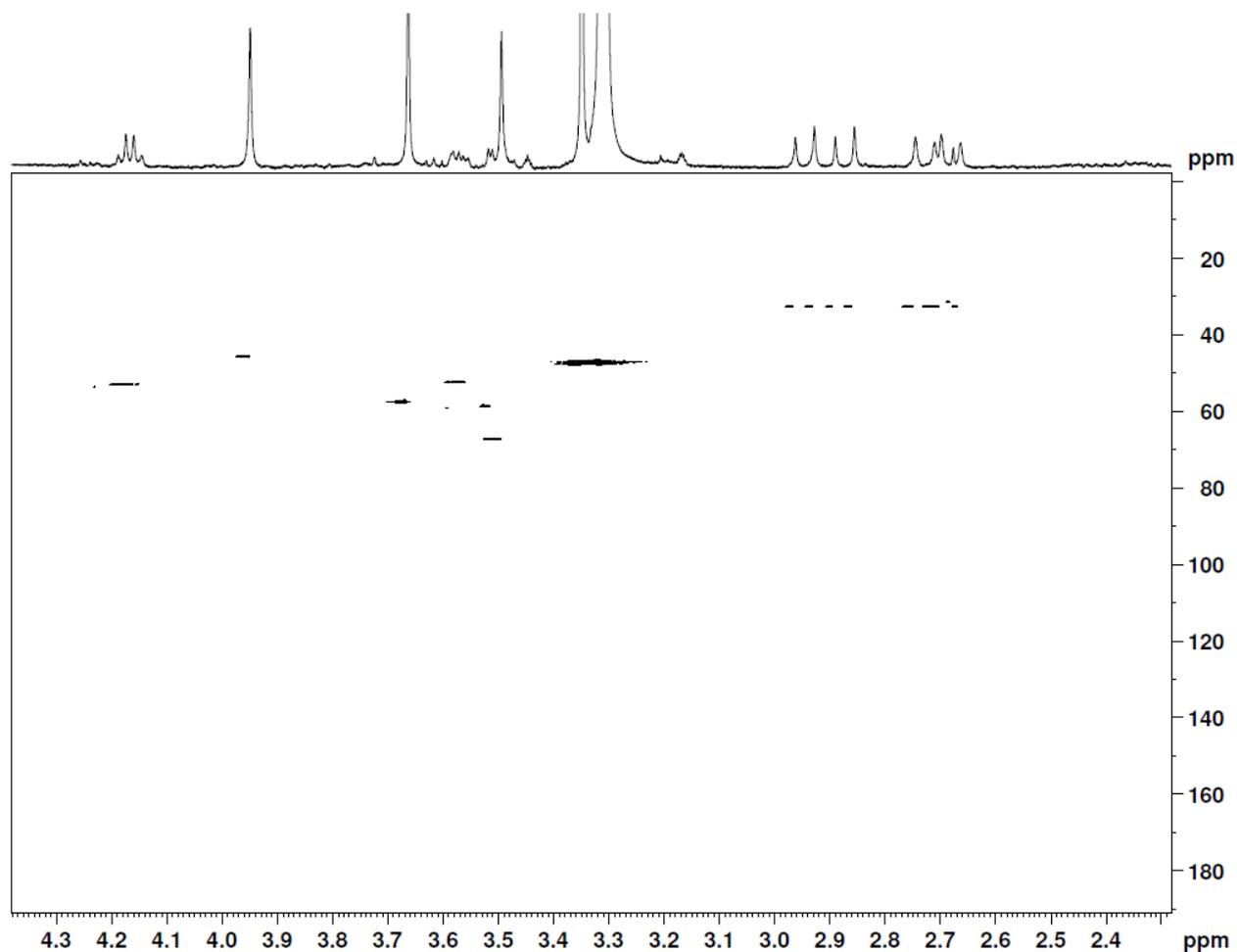


Figura 29. Espectro de correlação de HSQC da microsporina-glicina-alanina em CD₃OD (500 MHz).

Portanto, através da avaliação do espectro de HSQC, os carbonos secundários C-4, C-6, praticamente coalescentes, foram pontuados em δ_C 34.6 e δ_C 34.7, enquanto que C-7, C-9 e C-11 puderam ser atribuídos respectivamente aos sinais em δ_C 69, δ_C 48 e δ_C 55, novamente sendo coerente no que se refere a carbonos sp^3 diretamente ligados a heteroátomos.

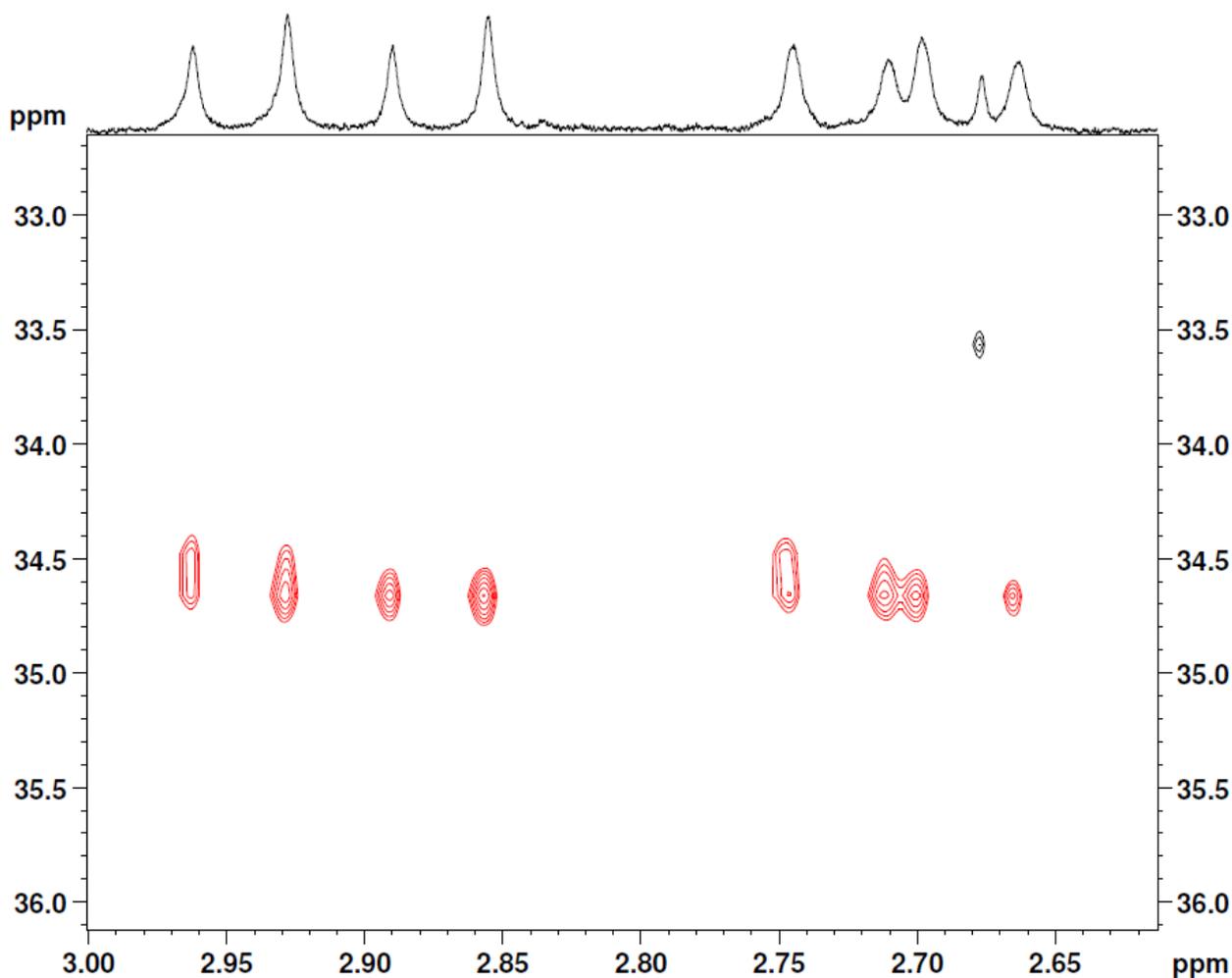


Figura 30. Ampliação da região de carbonos coalescentes no espectro de HSQC para micosporina-glicina-alanina em CD₃OD (500 MHz).

Tal como os dados do espectro de HMBC, também foram confirmadas correlações a longa distância dos prótons H-8 e H-9 com carbonos sp^2 de hidrogênios vinílicos em δ_C 122 (C-2) e δ_C 160 (C-3) respectivamente, e de H-9 com carbonos sp^2 carboxílico (derivado de unidade glicina) em δ_C 173 (C-10). Por fim, as correlações a longa distância destacadas na Figura 31, também contribuíram como ponto-chave na confirmação da porção derivada do aminoácido alanina na molécula em questão. Isto porque foram detectadas as correlações entre os hidrogênios de metila δ_H 1.48 (H-13) com o carbono carboxílico C-12 em δ_C 173 e principalmente com o núcleo carbônico terciário C-11 em δ_C 55, diretamente ligado ao grupamento imino. Deve-se destacar que os sinais visualizados na região de 1 ppm do espectro de 1H foram considerados impurezas presentes na amostra já que não foi detectada nenhuma correlação ou acoplamento desses núcleos visualizados na região de mais alto campo do espectro com nenhum dos sinais característicos da micosporina-glicina-alanina.

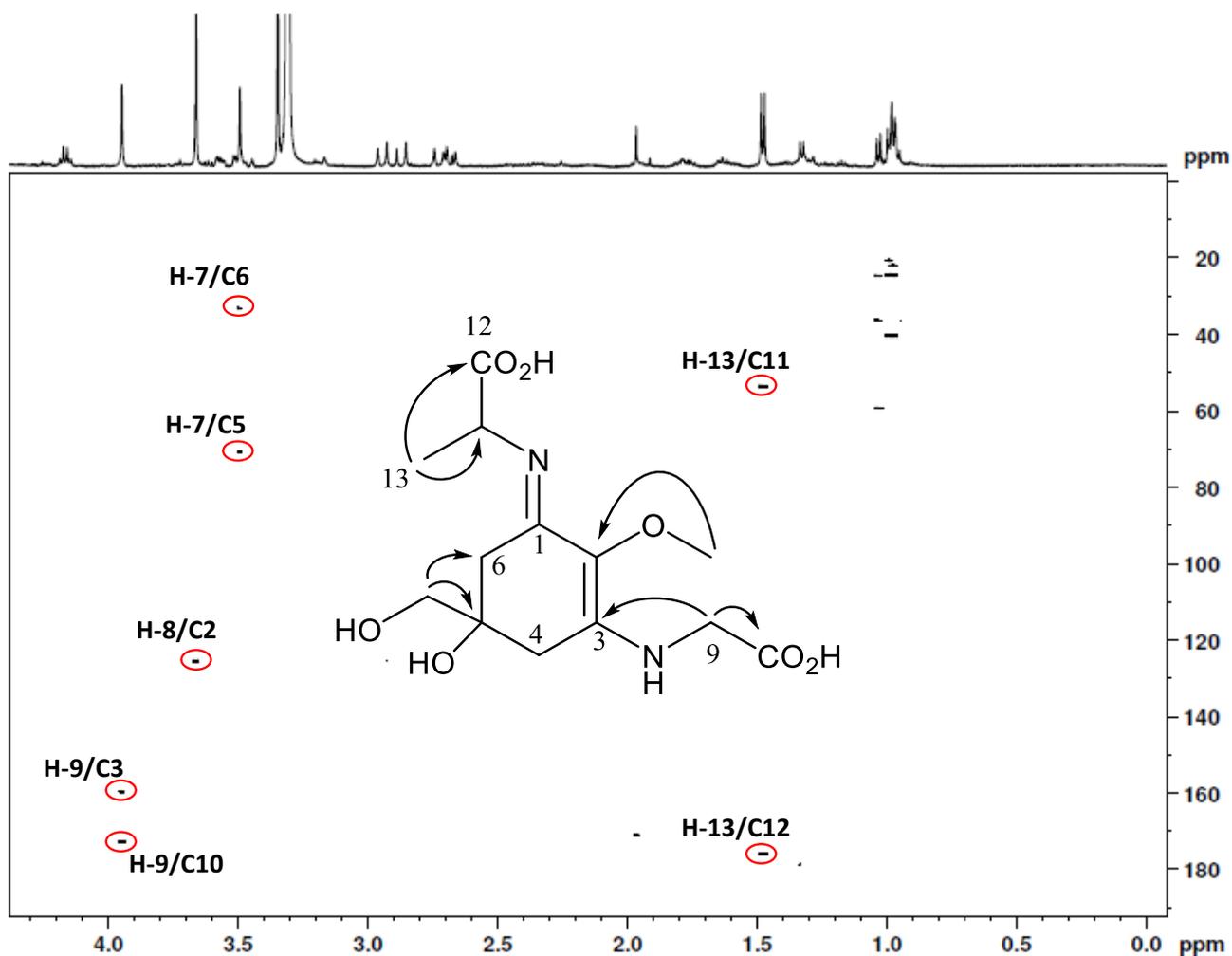


Figura 31. Espectro de HMBC da substância microsporina-glicina-alanina em CD_3OD (500 MHz). Correlações homonucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas no experimento de HMBC encontram-se em destaque na figura.

Além disso, todas as atribuições realizadas para o composto isolado como produto natural da cianobactéria *S. torques-reginae* ITEP-024, encontraram-se em conformidade com os dados espectroscópicos encontrados na literatura para o MAA quando este foi obtido por indução genética³⁷. Assim, estes resultados confirmam a produção de microsporina-glicina-alanina pela cepa de cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 sendo esta a primeira vez que este composto é descrito como produto natural em cianobactérias.

Como referido anteriormente, os dados adquiridos via execução de experimentos de íons produto (HRMS/MS), também corroboraram para a confirmação da identidade do aminoácido em questão. Como reportado por Cardozo *et al.*, 2008 tal classe biossintética apresenta um perfil de fragmentação

bastante característico, principalmente no que diz respeito à ocorrência de perdas radiculares na obtenção dos íons produtos (no modo positivo de ionização), fato menos comum quando compostos são submetidos à ionização por *eletrospray* (ESI)¹³⁰. Como esperado, o MAA isolado também apresentou tal perfil. A partir do íon protonado de m/z 317 visualizado no espectro da Figura 21, destaca-se a perda de uma metila radicalar, levando ao íon fragmento de m/z 302, bem como a ocorrência de sucessivas perdas de unidades CO₂, culminando no íon de pico base m/z 214. Por fim, este íon perde a cadeia lateral originando o íon de m/z 186, considerado o íon diagnóstico dos MAAs. Abaixo segue o mecanismo de fragmentação proposto, justificando as perdas associadas às porções derivadas de aminoácido (Figura 32).

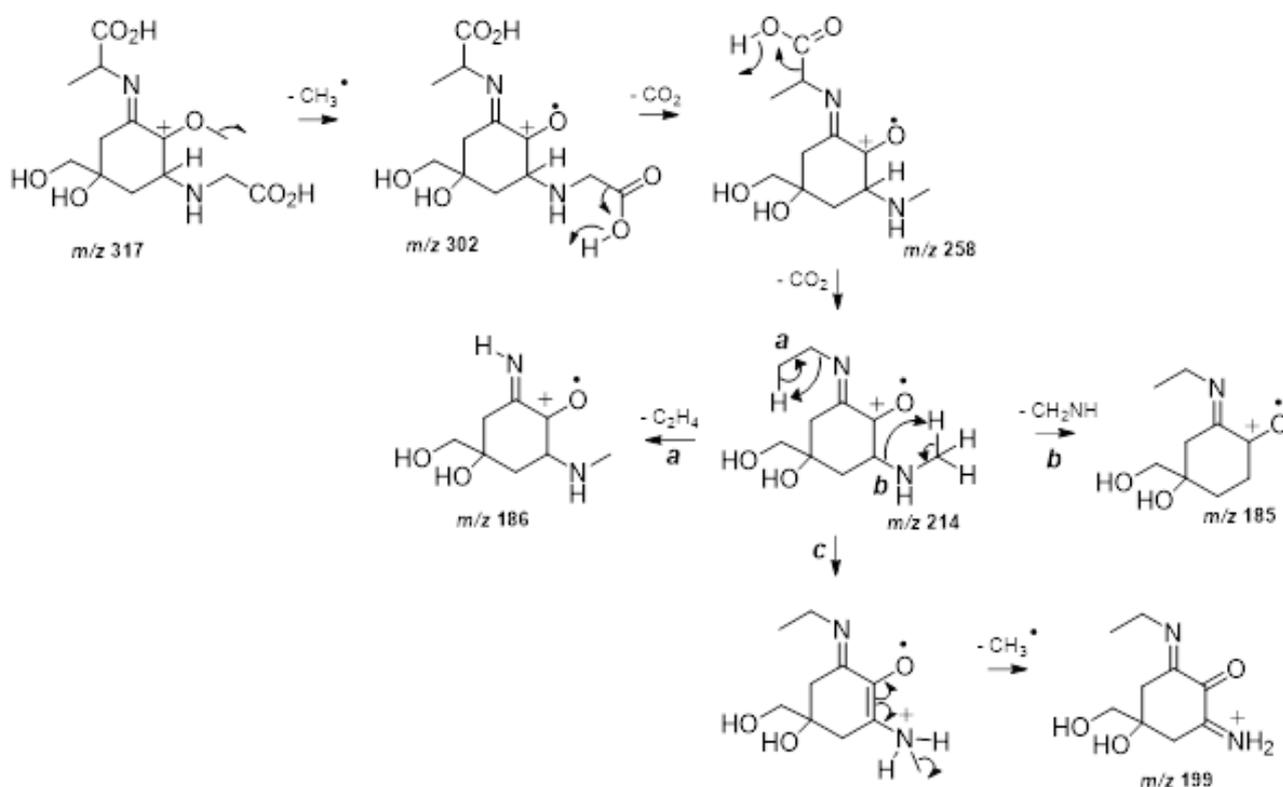


Figura 32. Mecanismo de fragmentação proposto para o composto de m/z 317.

4.1.6. Análises genômica e filogenética

Várias linhas sustentam que os MAAs são derivados da conversão da via do ácido chiquímico^{15,29,43,47}. Analisando a sequência protéica, confirma-se que o *cluster* gênico de *S. torques-reginae* ITEP-024 contém um agrupamento de quatro genes designados *mysABCD*, apoiando que esses produtos gênicos poderiam catalisar a biossíntese de MAAs. As semelhanças com as sequências disponíveis são mostradas na Tabela 19 e na Tabela 20 e a organização do *cluster* genético biossintético é apresentada na Figura 33. Todas as sequências de proteínas foram anotadas usando a plataforma de homologia HHpred e predição estrutural no MPI Bioinformatic Toolkit¹⁵⁷.

Tabela 19 – Função proposta para as enzimas codificadas por *mysA-D* no aglomerado de genes biossintéticos de *S. torques-reginae* ITEP-024. aa - Aminoácido.

Gene	aa	Função proposta	Sequência	Organismo	Similaridade	Número de acesso
<i>mysA</i>	454	3-dehydroquinate synthase	3-dehydroquinate synthase	<i>Sphaerospermopsis reniformis</i>	96.92%	GCL37085.1
<i>mysB</i>	277	Methyltransferase	SAM-dependent methyltransferase	<i>Sphaerospermopsis kisseleviana</i>	93.50%	WP 096566485.1
<i>mysC</i>	423	ATP-grasp ligase	ATP-grasp domain-containing protein	<i>Sphaerospermopsis kisseleviana</i>	94.56%	WP 096566487.1
<i>mysD</i>	340	D-alanine ligase	D-alanine—D-alanine ligase	<i>Sphaerospermopsis kisseleviana</i>	92.94%	WP 096566489.1

Tabela 20 – Comparação baseada na similaridade protéica entre a proteína codificadora de *mysA* de *S. torques-reginae* ITEP-024, três classes de enzimas de elevada similaridade para as funções propostas. aa - Aminoácido.

Enzima	aa	Função proposta	Organismo	Similaridade	Número de acesso
3-DHQS	454	3-dehydroquinate synthase	<i>Sphaerospermopsis reniformis</i>	96.92%	GCL37805.1
EEVS	432	sedoheptulose cyclase	7-phosphate <i>Sphaerospermopsis kisseleviana</i>	96.76%	WP_096572603.1
4-DGS	423	Demethyl synthase	4-deoxygadusol <i>Richelia intracellularis</i>	74.94%	AUC61936.1

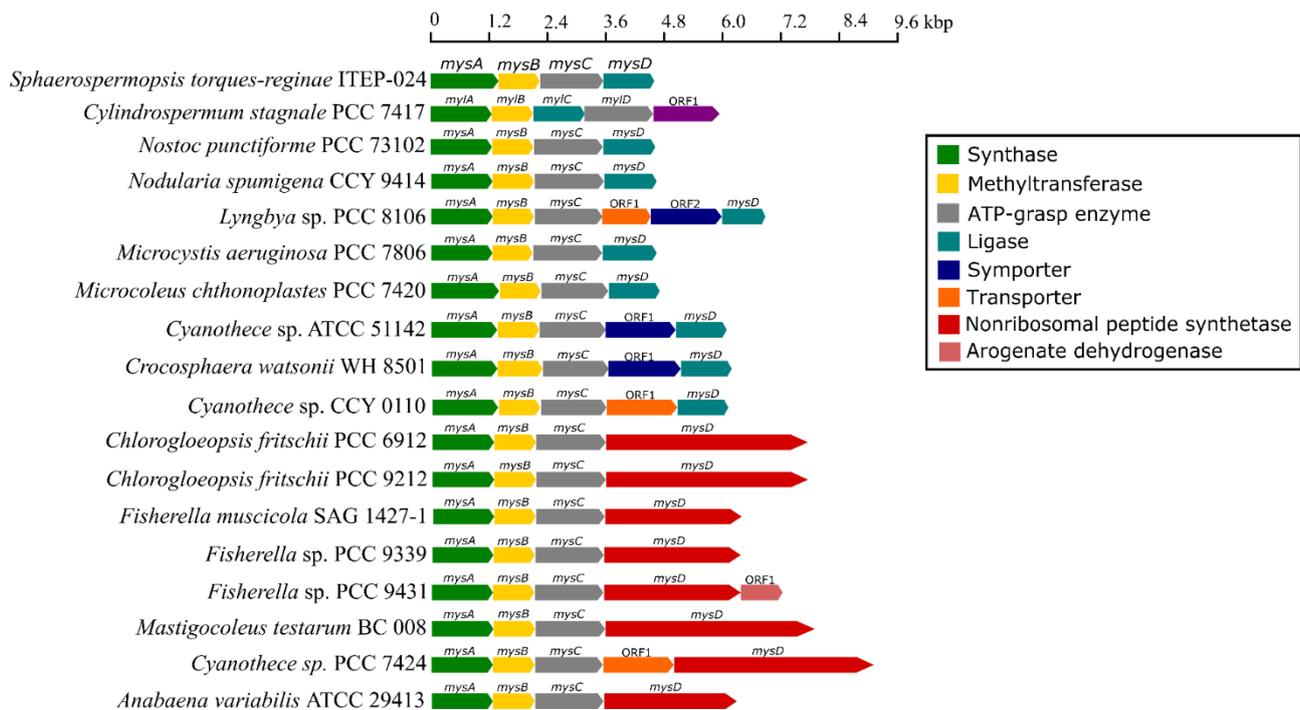


Figura 33. Estrutura dos agrupamentos gênicos encontrados no banco de dados relacionados à biossíntese de MAAs em *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 e em outras cianobactérias. Os genes biossintéticos são apresentados pela função prevista de seus produtos: EEVS (verde), *O*-metiltransferase (amarelo), enzima ATP-grasp (cinza) e enzima D-Alanina-D-Alanina ligase (azul turquesa).

A filogenia de cianobactéria corroborou com a sequência protéica do *cluster* gênico. Observando a reconstrução filogenética baseada na sequência de proteínas concatenadas do *cluster* gênico de MAAs de todas as sequências completas que se encontram disponíveis, podemos avaliar que o *cluster* gênico de *S. torques-reginae* ITEP-024 foi colocado em um terceiro ramo, separado dos outros (Figura 34). Isso pode inferir que o *cluster* gênico de MAAs da ITEP-024 é significativamente diferente do das outras cepas. As análises filogenéticas mostraram-se robustas, uma vez que todas as outras cepas que apresentaram o gene NRPS estão agrupadas em um clado separado. Em relação à presença da cepa PCC 7424 separada das outras linhagens de *Cyanothece* sugere-se que esta pode ter recebido o gene NRPS por transferência lateral.

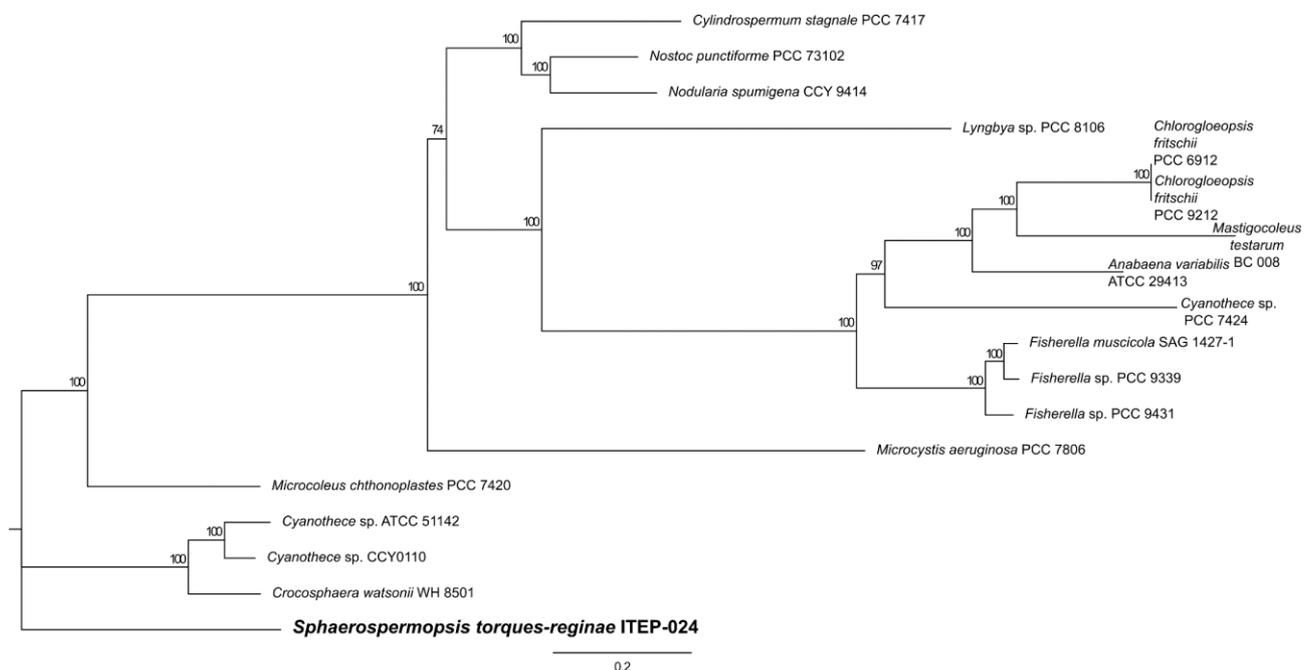


Figura 34. Árvore filogenética construída por inferência filogenética bayesiana com sequências concatenadas de proteínas de dezoito agrupamentos gênicos de MAAs. A linhagem de interesse encontra-se a negrito. Probabilidades posteriores estão apresentadas nos nós dos ramos.

Evidências bioinformáticas de que a biossíntese de MAAs prossegue pela via da pentose fosfato^{30,46-48} ganharam uma força crescente nos últimos anos, com agrupamentos de genes homólogos encontrados em diversos organismos produtores de MAAs e por dados que apoiam fortemente a biossíntese de 4-desoxigadusol (4-DG) pela conversão da enzima 2-epi-5-epivaliolona sintetase (EVS)⁷³. Com base nas análises e seguindo o esquema biossintético proposto por Balskus e Walsh⁴⁶, propôs-se que o 4-DG, é originado pela conversão de EEVS (codificada por *mysA*) e pela *O*-metiltransferase (codificada por *mysB*). O produto do terceiro gene (*mysC*) no aglomerado, uma enzima ATP-grasp, catalisa a adição de uma glicina ao grupo hidroxilo na posição C3 do 4-DG, formando-se a micosporina-glicina. O *cluster* gênico da ITEP-024 não possui o gene NRPS, codificado pelo *cluster* “Anabaena-type”. No entanto, possui um quarto gene (*mysD*), que codifica uma proteína muito semelhante a alanina ligase de cianobactérias conhecidas, apresentando-se como um *cluster* gênico de MAAs “Nostoc-type”^{37,47}. *mysD* é responsável pela adição de um aminoácido ao grupo cetona na posição C1 da micosporina-glicina para produzir micosporina-glicina-alanina ou os outros MAAs detetados na *S. torques-reginae* ITEP-024 - shinorina, porphyra-334 (Figura 35).

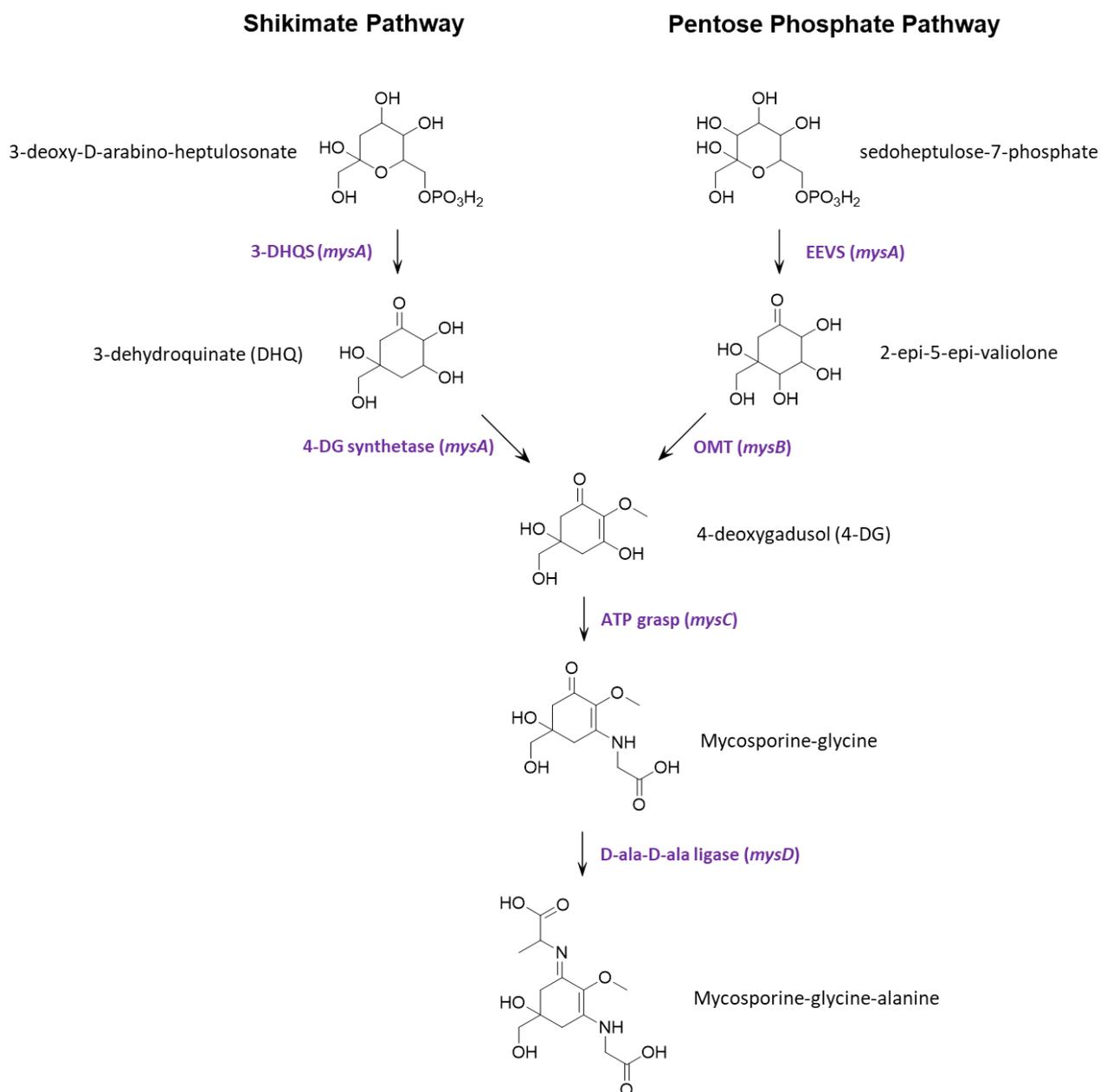


Figura 35. Via biossintética proposta da micosporina-glicina-alanina.

No entanto, nenhum estudo forneceu evidências de que os MAAs podem ser abolidos após a exclusão de qualquer gene no *cluster* da via da pentose fosfato. O requisito universal de EVS na biossintese de MAAs foi desafiado pela completa exclusão genética do gene EVS (Ava_3858) em *A. variabilis* ATCC 29413, que produz apenas shinorina^{48,176}. Após exposição à UVR, a shinorina foi produzida em níveis quase equivalentes aos da cepa selvagem, sugerindo vias alternativas para a biossintese de MAAs em *A. variabilis*. Posteriormente, usando inibidores específicos da via do ácido chiquimico, uma rota alternativa para a biossintese do MAAs foi proposta⁴⁷.

EFEITO DO GLIFOSATO NA INDUÇÃO DE MAAS

Para determinar se a via do ácido chiquímico era uma rota alternativa à biossíntese de MAA, a cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 foi cultivada na presença e na ausência do inibidor específico dessa via, o glifosato (2mM). O cromatograma de íons extraídos dos extratos MAAs de *S. torques-reginae* ITEP-024, observado após 3 dias de exposição a PAR + UVA + UVB, é apresentado na Figure 36.

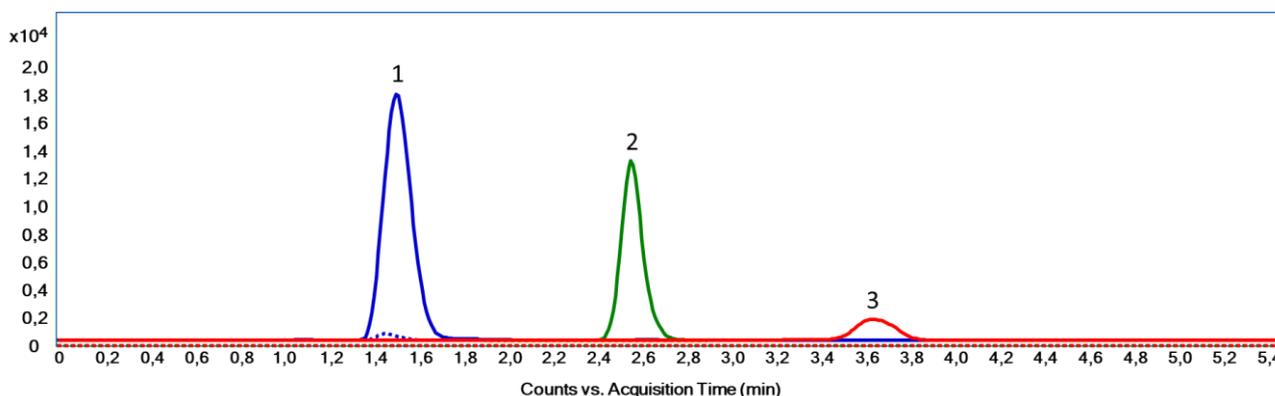


Figure 36. Cromatograma de íons extraído do extrato de MAAs da cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 após a exposição à radiação PAR + UVA+UVB na presença (linha tracejada) e na ausência (linha contínua) de glifosato (2mM). 1: shinorina, 2: porphyra-334, 3: micosporina-glicina-alanina.

O cromatograma de íons extraído mostra uma elevada produção de shinorina e uma produção moderada de porphyra-334 e micosporina-glicina-alanina (linhas contínuas) na ausência do glifosato. Em comparação, a indução biossintética de MAAs foi inibida na cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 quando cultivada na presença de 2 mM de glifosato (linhas tracejadas) não havendo compensação pela via da pentose fosfato. Usando um inibidor específico, demonstrou-se que a biossíntese de MAA ocorre em *S. torques-reginae* ITEP 024 através da via do ácido chiquímico, apoiando o estudo de Pope *et al.*, 2015 em que o uso do glifosato aboliu a biossíntese de MAA na cepa selvagem e no mutante da cianobactéria *Anabaena variabilis* ATCC 2941324 no qual foi excluído o gene EVS⁴⁷. No entanto, não se sabe se o glifosato pode estar reprimindo também os promotores dos genes produtores de MAAs da via da pentose fosfato e, esteja desta forma impedindo a biossíntese de MAAs sendo necessário mais experimentação nesta área.

4.2. IDENTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE MAAS EM CIANOBACTÉRIAS VIA HPLC-DAD-HRMS (ARTIGO – ANEXO 2)

Foi realizada uma triagem com 75 linhagens de cianobactérias (71 cepas do Brasil, 3 do Japão e 1 da Austrália) para identificar espécies produtoras de MAAs (ver Tabela 3 do capítulo 3.2.1). O método de identificação de MAAs via HPLC-DAD-HRMS foi utilizado e dez MAAs foram identificados. Os MAAs identificados com os respectivos máximos de absorção de UV, tempos de retenção, valores calculados de m/z e fragmentos são apresentados na Tabela 21, foram comparados com bases de dados e com a literatura^{174,175}.

Tabela 21 – Aminoácidos do tipo micoporinas encontrados nas cepas de cianobactérias analisadas e seus comprimentos de onda máximos (nm), tempos de retenção (TR - definidos neste estudo), massas calculadas (m/z) e fragmentos.

MAAs	λ_{max} (nm)	TR (min)	[M+H] ⁺	Fragmentos	Referências
Micosporina-glicina	310	1.2	246.0972	57, 84, 100, 117, 143, 171, 231	27
N-metilpalitina	330	2.0	259.1288	151, 171, 185, 200, 223	36
Palitina-serina	320	1.3	275.1238	172, 207, 216, 229, 242, 245, 257, 260	52
Palitina-preonina	321	2.4	289.1394	172, 230, 256, 274	19
Micosporina-ornitina	310	2.1	303.1551	116, 188, 258	30
Micosporina-glicina-alanina	333	2.9	317.1343	186, 214, 258, 302	37
Shinorina	334	1.1	333.1292	186, 230, 274, 303, 318	32
Porphyra-334	334	2.1	347.1449	186, 227, 288, 303, 332	32
Hexose palitina-serina	320	1.6	437.1766	142, 171, 207, 241, 257, 275	52
Hexose palitina-treonina	322	2.7	451.1896	91, 185, 245, 289	26

Das 75 cepas de cianobactérias brasileiras estudadas, 27 cepas (38%) sintetizaram MAAs (Tabela 22). Entre elas, 62% foram isoladas de água doce, 19% de ambiente terrestre, 11% aerofítico e 8% de água salobra/marinha.

Tabela 22 – Aminoácidos do tipo micosporinas identificados nas cepas de cianobactérias analisadas.

Código da cepa	Nome	MG	N-MePi	PiS	PiT	MO	MGA	SH	P-334	Hexose-PiS	Hexose-PiT
CCIBt 3289	<i>Calothrix</i> sp.	.	X
CCIBt 3307	<i>Komarekiella atlantica</i>	X	X	.	.
CCIBt 3329	<i>Nostoc</i> sp.	X
CCIBt 3330	<i>Cyanosarcina</i> sp.	X
CCIBt 3343	<i>Dolichospermum</i> sp.	X	.	.	.
CCIBt 3464	<i>Scytonema</i> sp.	X	X
CCIBt 3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>	.	X
CCIBt 3626	<i>Leptolyngbya</i> sp.	.	X
CENA-161	<i>Fischerella</i> sp.	X	.	.	.
CENA-596	<i>Nodularia spumigena</i>	X	X	.	.
CMAA-1600	<i>Oscillatoria</i> sp.	.	.	X	X	.	.	.	X	X	X
CMAA-1605	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.
CMAA-1606	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.
CMAA-1668	<i>Tolypothrix</i> sp.	.	.	X	X
CMAA-1670	<i>Calothrix</i> sp.	.	.	X	X
CMAA-1675	<i>Tolypothrix</i> sp.	.	X
LTPNA-DBG-07	<i>Leptolyngbya</i> sp.	X
LTPNA-DBG-27	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.

Código da cepa	Nome	MG	N-MePi	PiS	PiT	MO	MGA	SH	P-334	Hexose-PiS	Hexose-PiT
LTPNA-DBG-28	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.
LTPNA-DBG-44	<i>Tolypothrix</i> sp.	.	.	X	X
LTPNA-DBG-52	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.
LTPNA-DBG-62	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.
LTPNA-DBG-72	<i>Nostoc</i> sp.	.	.	X	X	.
LTPNA-DBG-92	<i>Tolypothrix</i> sp.	.	X
LTPNA-DBG-94	<i>Nostoc</i> sp.	.	.	.	X
ITEP-024	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	X	X	X	.	.
ITEP-064	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	X	X	X	.	.

MG – Micosporina-glicina; N-MePi – *N*-metilpalitina; PiS – Palitina-serina; PiT – Palitina-treonina; MO – Micosporina-ornitina; SH – Shinorina; P-334 – Porphyra-334; Hexose-PiS – Hexose-palitina-serina; Hexose-PiT – Hexose-palitina-treonina.

A maioria do conhecimento que se tem atualmente sobre as cianobactérias brasileiras foi adquirida em ambientes aquáticos lânticos¹⁷⁷, e apenas recentemente, as cepas de ambientes terrestres, aerofíticos e salobros/marinhos têm sido exploradas. Este estudo mostra a importância de explorar diferentes ambientes, uma vez que os MAAs foram identificados em todos os habitats analisados. O Brasil está geograficamente distribuído entre seis biomas terrestres (Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Pantanal e Pampa) e um bioma marinho (Oceano Atlântico). Apesar da alta diversidade de cianobactérias nos biomas brasileiros, as aplicações biotecnológicas e a diversidade de cianobactérias em ambientes tropicais ainda são pouco exploradas¹⁷⁷. As cianobactérias isoladas da Amazônia mostraram ser a fonte mais promissora de MAAs quando comparados aos demais biomas brasileiros. Há, no entanto, que ter em consideração que esses achados podem estar influenciados pelo número restrito de cianobactérias isoladas dos biomas remanescentes.

A maioria das espécies de cianobactérias produtoras de MAAs pode sintetizar os MAAs shinorina e porphyra-334¹⁴. Estes MAAs foram os mais comuns nas linhagens analisadas. As linhagens *Nodularia spumigena* CENA-596, *Chlorogloopsis* sp. CCIBt 3307 e as duas linhagens de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP-024 e ITEP-06) foram capazes de sintetizar estes dois compostos simultaneamente. Observou-se que a *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-026, tal como a cepa ITEP-024 também sintetiza a micosporina-glicina-alanina. Sinha *et al.*, 2003 também relataram a ocorrência desses dois MAAs em uma cepa de *Nodularia spumigena*¹⁷⁸.

Em relação à identificação morfológica, todas as cepas de *Aliinostoc*, isoladas do bioma Amazônia, sintetizaram shinorina, excepto a cepa *Aliinostoc* sp. LTPNA-DBG-55 que não foi capaz de produzir qualquer MAA. Por outro lado, nenhuma das cepas de *Microcystis* analisadas produziu MAAs. No entanto, altas concentrações de shinorina e outros MAAs já foram relatados na cianobactéria formadora de *bloom* *Microcystis aeruginosa*¹⁷⁹. Hu e colaboradores (2015) sugeriram um papel estrutural dos MAAs na bainha de *Microcystis*, e enfatizaram que sua produção é irregularmente

distribuída dentro desse gênero. Observou-se que nas cepas de *Microcystis* existentes no laboratório a bainha se encontra ausente (com exceção das linhagens CCIBt 3106 e CCIBt 3454) o que é comum acontecer em cepas deste gênero cultivadas por longos períodos em laboratório ¹⁸⁰. Esta pode ser uma das causas para não se ter detectado nenhuma MAA nas cepas de *Microcystis*. Além disso, os resultados apresentados, assim como a literatura, demonstram que as mesmas espécies de cianobactérias isoladas dos mesmos ambientes podem ou não sintetizar MAAs ⁵¹.

Embora a shinorina seja o MAA mais dominante nas cianobactérias, seguido pelo porphyra-334 ¹⁸¹, outros MAAs podem ser produzidos por cianobactérias ²⁴. Alguns gêneros promissores que produzem outros MAAs são o *Tolypothrix* e o *Calothrix*. Todas as cepas de *Tolypothrix* produtoras de MAAs foram isoladas dos rios da Amazônia e produziram palitina-serina e palitina-treonina, excepto a cepa LTPNA-DBG-92 que sintetizou uma MAA diferente: *N*-metilpalitina. Em relação às duas cepas de *Calothrix* produtoras de MAAs, uma foi isolada da Mata Atlântica e a outra da Amazônia, e ambas sintetizaram *N*-metilpalitina.

Em termos de abundância, os gêneros mais representativos para a produção de MAAs foram os que pertencem ao grupo formador de heterócitos, como *Sphaerospermopsis*, *Aliinostoc*, *Tolypothrix* e *Calothrix*. Um estudo mostrou que os MAAs podem atuar como um reservatório de nitrogênio intracelular e sua síntese é regulada pela disponibilidade de nitrogênio ¹⁸². Embora os gêneros do grupo formador de heterócitos tenham sido os mais representativos em termos de abundância de MAAs, a linhagem *Oscillatoria* sp. CMMA 1600, do tipo homócito, produziu a maior diversidade deste grupo de compostos.

Os MAAs podem ser divididos em dois grupos: imino-micosporinas e oxo-micosporinas. Neste estudo, as imino-micosporinas foram o principal grupo detectado (8 em 10 MAAs detectados). Este grupo é o mais comum em cianobactérias ¹⁴. Dentre elas, a shinorina foi o principal MAA identificado (encontrado em 12 cepas), seguido por *N*-metilpalitina (encontrado em 6 cepas). As oxo-micosporinas

aparecem exclusivamente em organismos terrestres, principalmente em fungos com apenas duas exceções: a micosporina-glicina¹⁴ e micosporina-aurina que foram encontradas em anêmonas do mar^{18,183}. A micosporina-glicina foi detectada em duas linhagens de cianobactérias: *Cyanosarcina* sp. CCIBt 3330 e *Scytonema* sp. CCIBt 3464, que também produz *N*-metilpalitina. Além disso, o presente estudo demonstrou que duas cepas de cianobactérias foram capazes de sintetizar micosporina-ornitina (Figura 37). A cepa *Nostoc* sp. CCIBt 3329 foi isolada do tronco de uma árvore e a cepa *Leptolyngbya* sp. DBG 07 foi isolada da água doce no rio Negro. Isto indicou que a micosporina-ornitina, tal como a micosporina-glicina e a micosporina-aurina, não é exclusivamente de organismos terrestres e pode ser sintetizada por organismos aquáticos.

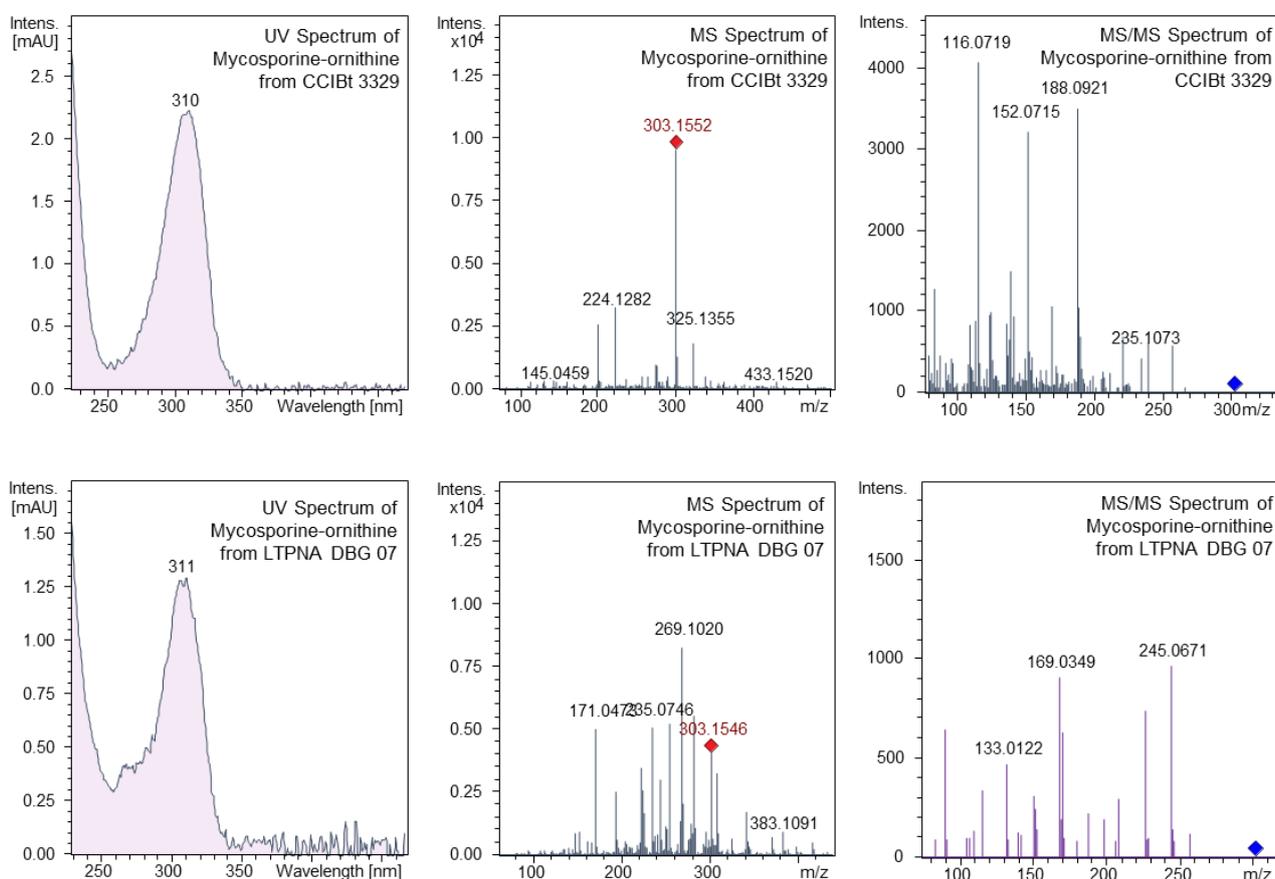


Figura 37. Espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de micosporina-ornitina - $C_{13}H_{22}N_2O_6$ em *Nostoc* sp. CCIBt 3329 (0.1 ppm, 6.2 msigma; TR 2.1 min) e *Leptolyngbya* sp. LTPNA-DBG-07 (1.5 ppm, 10.5 msigma; TR 2.1 min) utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

Dois MAAs glicosilados também foram encontrados neste estudo. Um MAA com um máximo de absorção a 320 nm e uma massa molecular de 436 Da foi identificado como um derivado de palitina-serina ligado a uma hexose. Outro MAA com máximo de absorção a 322 nm e massa molecular de 450 Da foi identificado como um derivado de palitina-treonina ligado a uma hexose^{26,52}. A hexose palitina-serina foi encontrada em duas cepas de cianobactérias, *Nostoc* sp. DBG 72 e *Oscillatoria* sp. CMAA-1600. Além disso, *Nostoc* sp. DBG 72 também sintetiza a palitina-serina (Figura 38). A hexose palitina-serina pode ser produzida pela glicosilação de palitina-serina. A hexose palitina-treonina foi encontrada apenas em *Oscillatoria* sp. CMAA-1600, que produz simultaneamente outros quatro tipos de MAAs: hexose palitina-treonina, palitina-serina, palitina-treonina e porphyrina-334 (Figura 39). Como previamente sugerido, a hexose palitina-serina pode ser produzida pela glicosilação de palitina-serina, e a hexose palitina-treonina pode ser sintetizada pela glicosilação de palitina-treonina. No entanto, Nazifi e colaboradores (2013) propuseram uma outra via biossintética para a síntese da hexose palitina-treonina²⁶. Estes autores propuseram que a glicosilação de porphyrina-334 pode gerar o MAA 508-Da, e o MAA 450-Da pode ser formado através da eliminação de uma porção de glicina do MAA 508-Da. No entanto, neste estudo o MAA 508-Da não foi detectado, sugerindo que a via proposta neste estudo deve ser a mais provável para a biossíntese de hexose palitina-treonina.

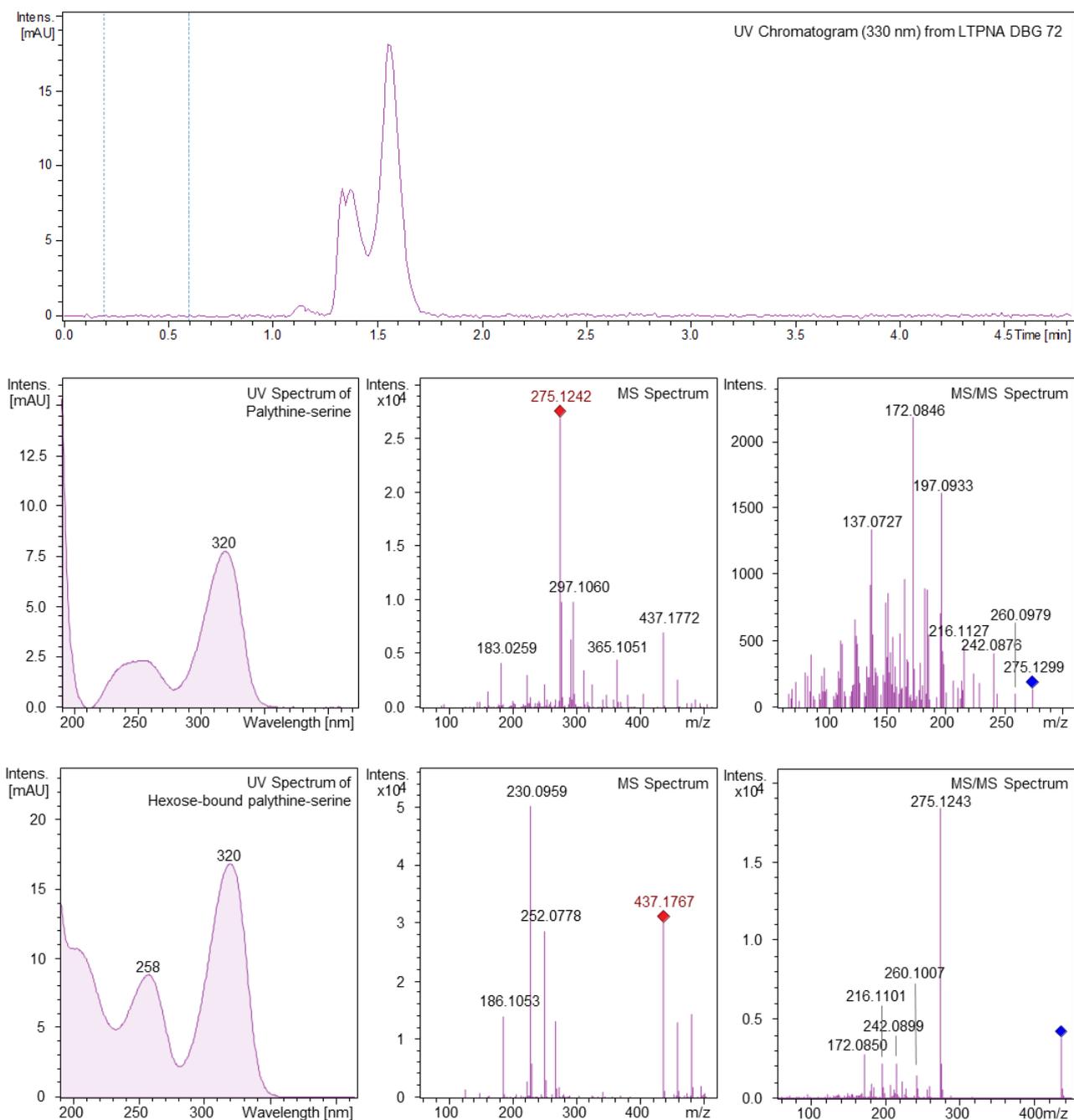
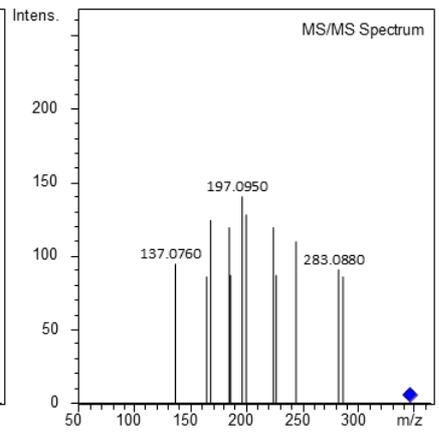
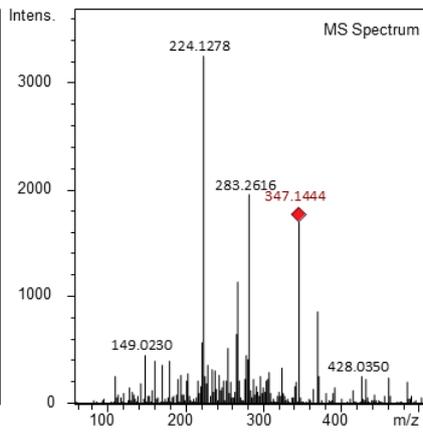
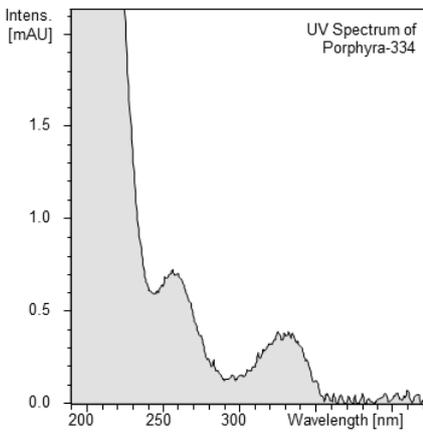
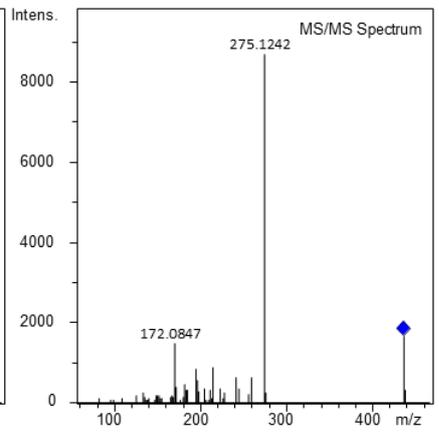
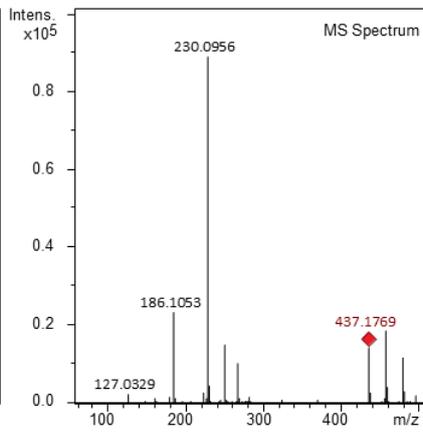
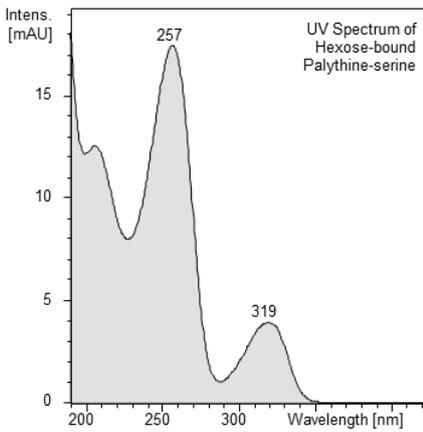
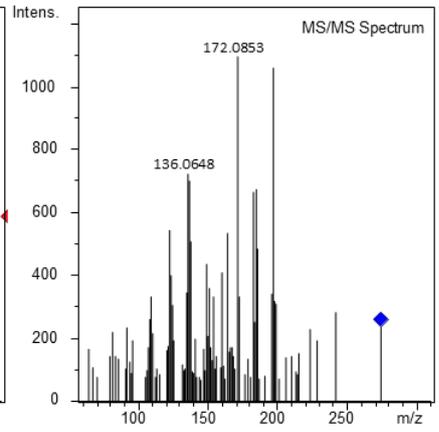
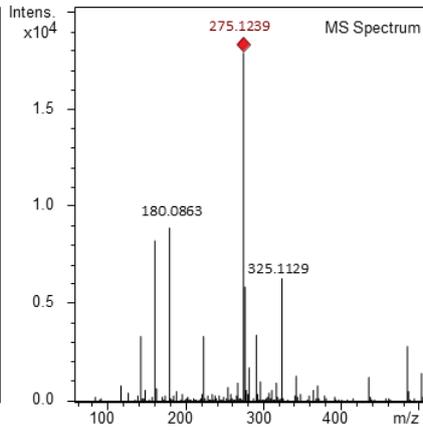
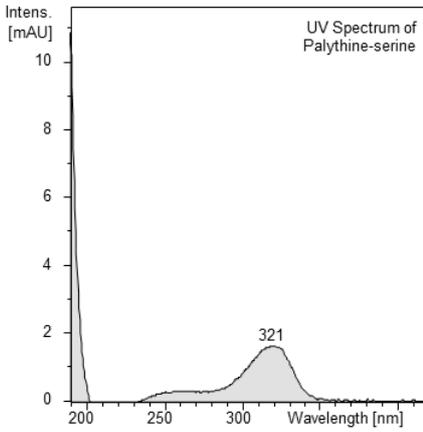
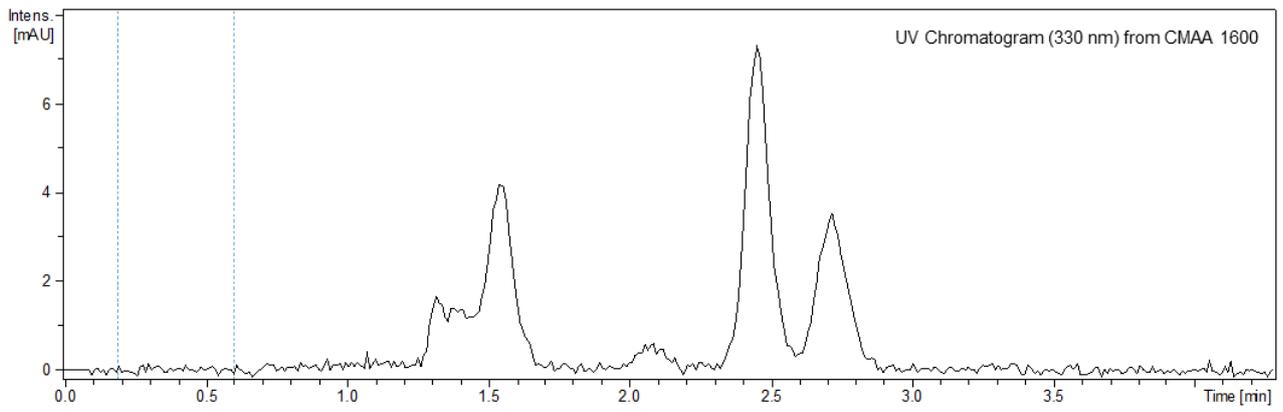


Figura 38. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de palitina-serina - $C_{11}H_{18}N_2O_6$ (-1.4 ppm, 12.7 msigma; TR 1.3 min) e hexose-bound palitina-serina - $C_{17}H_{28}N_2O_{11}$ (-1.2 ppm; 5.1 msigma; TR 1.6 min) em *Nostoc* sp. LTPNA-DBG-72 utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.



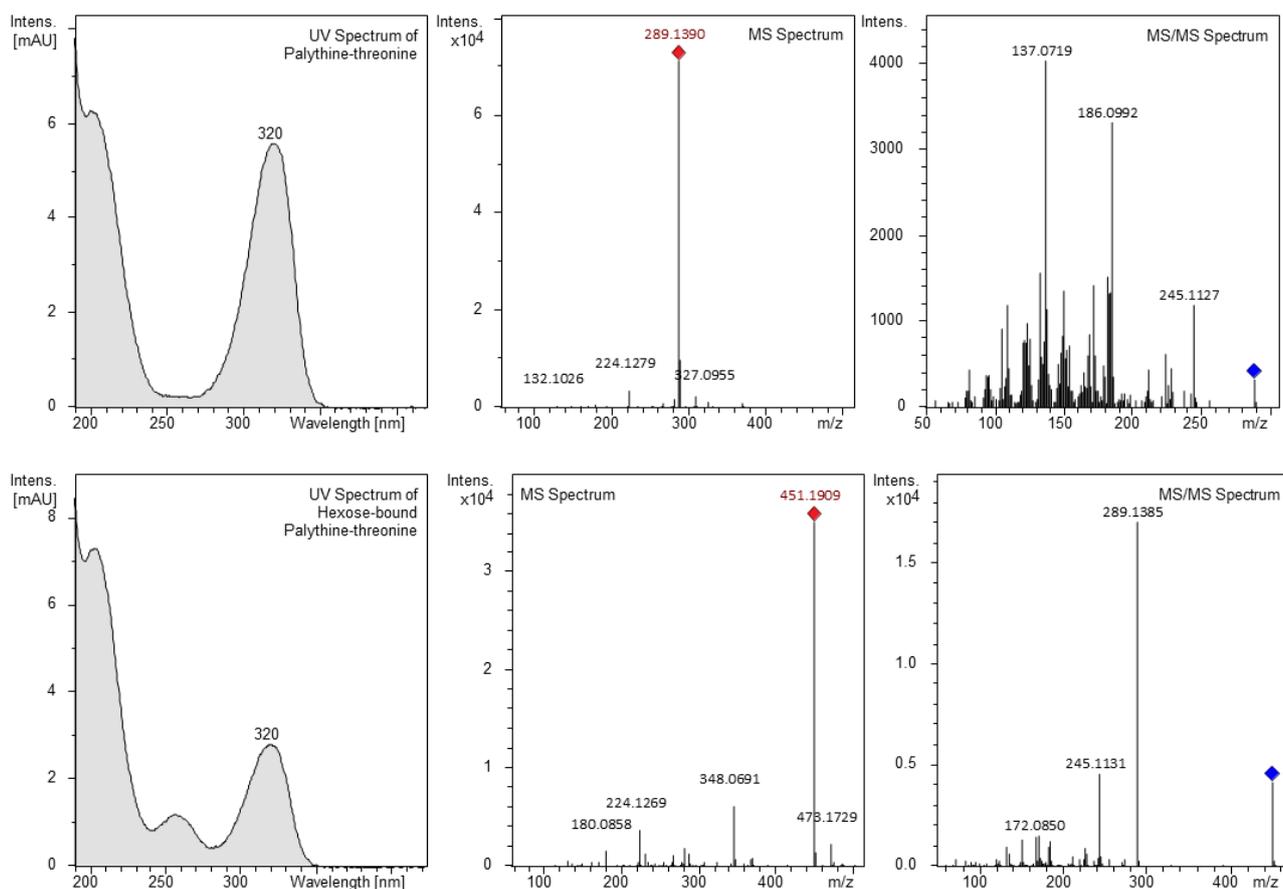


Figura 39. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de palitina-serina - $C_{11}H_{18}N_2O_6$ (-0.6 ppm, 12.6 msigma; TR 1.3 min), hexose palitina-serina - $C_{17}H_{28}N_2O_{11}$ (-0.7 ppm; 2.9 msigma; TR 1.6 min) em), porphyra-334 - $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (0.8 ppm; 14.3 msigma; TR 2.1 min), palitina-treonina - $C_{12}H_{20}N_2O_6$ (1.5 ppm; 1.6 msigma; TR 2.4 min) e hexose palitina-treonina - $C_{18}H_{30}N_2O_{11}$ (2.9 ppm; 1.9 msigma; TR 2.7 min) presentes no extrato de *Oscillatoria* sp. CMAA1600 utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2,95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

Outros organismos como dinoflagelados (*Amphidinium* sp.), microalgas (*Chlorella* sp. e *Desmodesmus* sp.) e macroalgas (*Porphyrium* sp. e *Plocamium brasiliense*) também foram testados para produção de MAAs utilizando o mesmo método HPLC-DAD-HRMS. A análise dos dados mostrou que o dinoflagelado *Amphidinium* sp. e as duas macroalgas sintetizaram diversos tipos de MAAs (Figura 40, Figura 41 e Figura 42). Estes resultados demonstraram que o método de identificação de MAAs desenvolvido em HPLC-DAD-HRMS pode ser uma ferramenta útil para a descoberta de aminoácidos do tipo micosporinas em outros grupos de organismos.

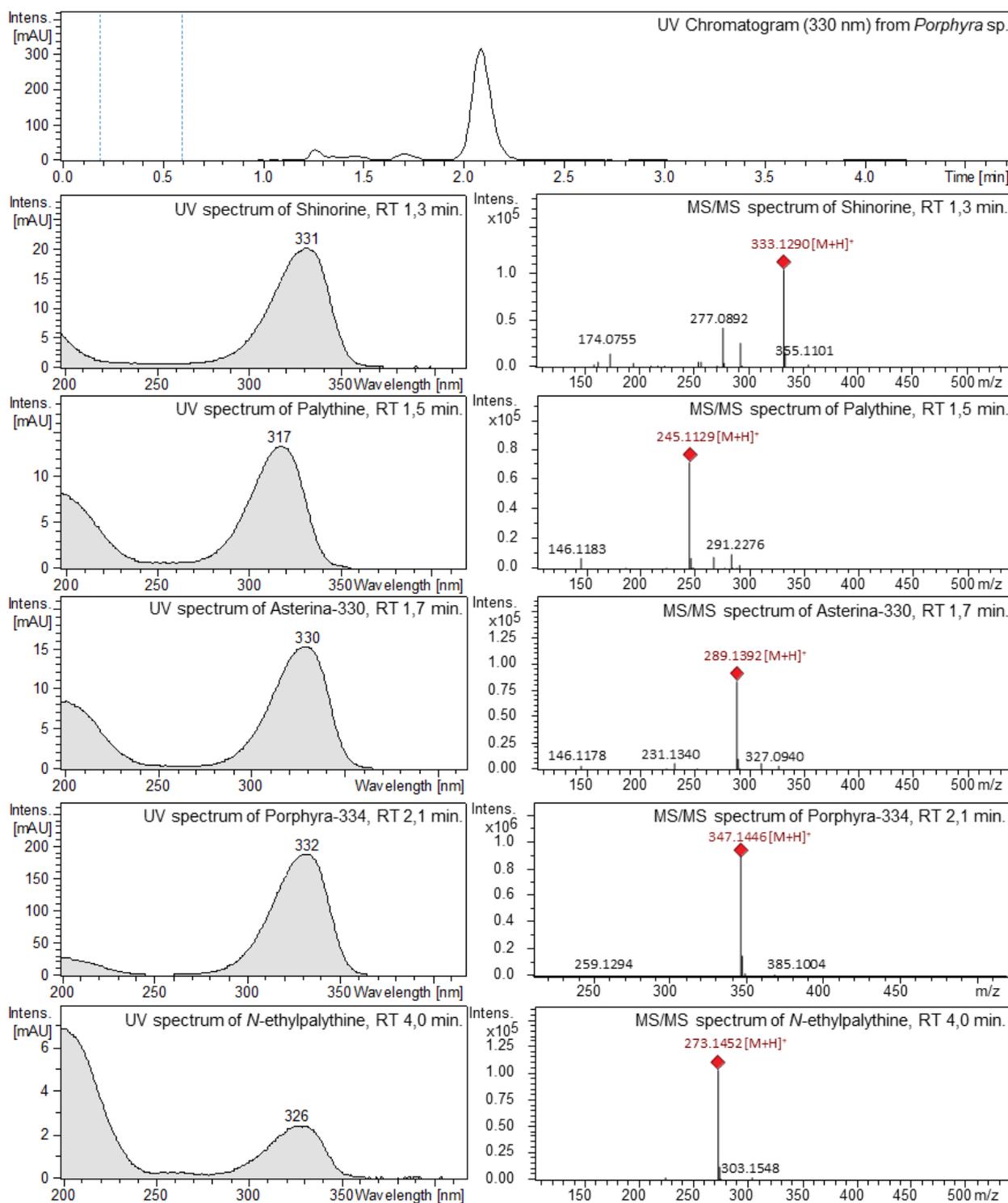


Figura 40. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de shinorina - $C_{13}H_{21}N_2O_8$ (0.8 ppm; 2.7 msigma; TR 1.3 min), palitina $C_{10}H_{16}N_2O_5$ (1.2 ppm; 6.3 msigma; TR 1.5 min),), asterina-330 $C_{12}H_{20}N_2O_6$ (0.7 ppm; 2.1 msigma; TR 1.7 min), porphyra-334 - $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (-0.9 ppm; 2.1 msigma; TR 2.1 min), e N-etilpalitina $C_{12}H_{20}N_2O_5$ (-2.2 ppm; 5.5 msigma; TR 4.0 min) presentes no extrato de *Porphyra* sp. (ESI +, 35.3 eV) utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

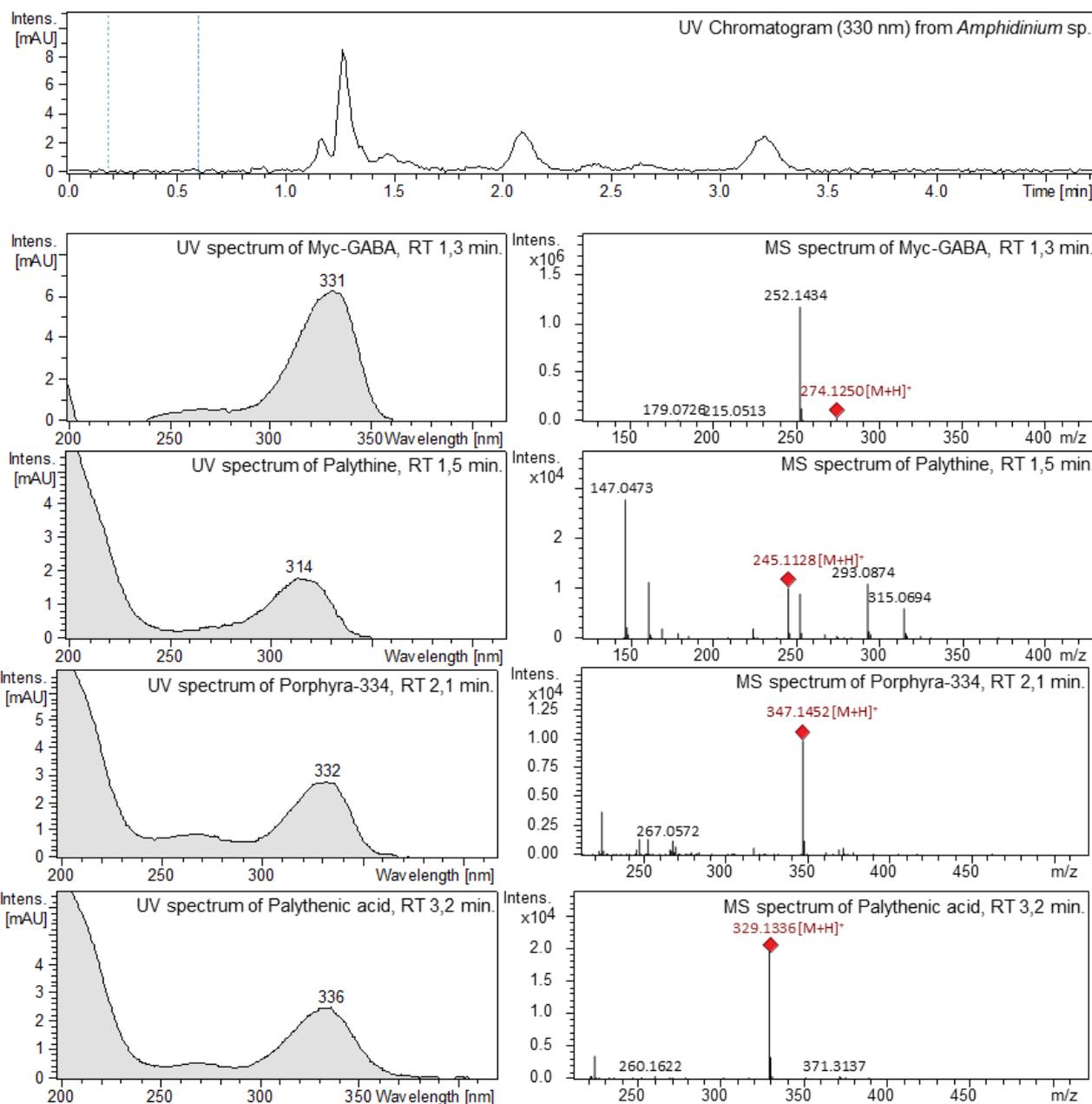


Figura 41. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de micosporina GABA - $C_{12}H_{19}NO_6$ (-6.8 ppm, 9.6 msigma; TR 1.3 min), palitina $C_{10}H_{16}N_2O_5$ (1.7 ppm; 6.1 msigma; TR 1.5 min), porphyra-334 - $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (-0.9 ppm; 62.7 msigma; TR 2.1 min), e ácido paliténico - $C_{14}H_{20}N_2O_7$ (2.1 ppm; 4.1 msigma; TR 3.2 min) presentes no extrato de *Amphidinium* sp. (ESI +, 35.3 eV) utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

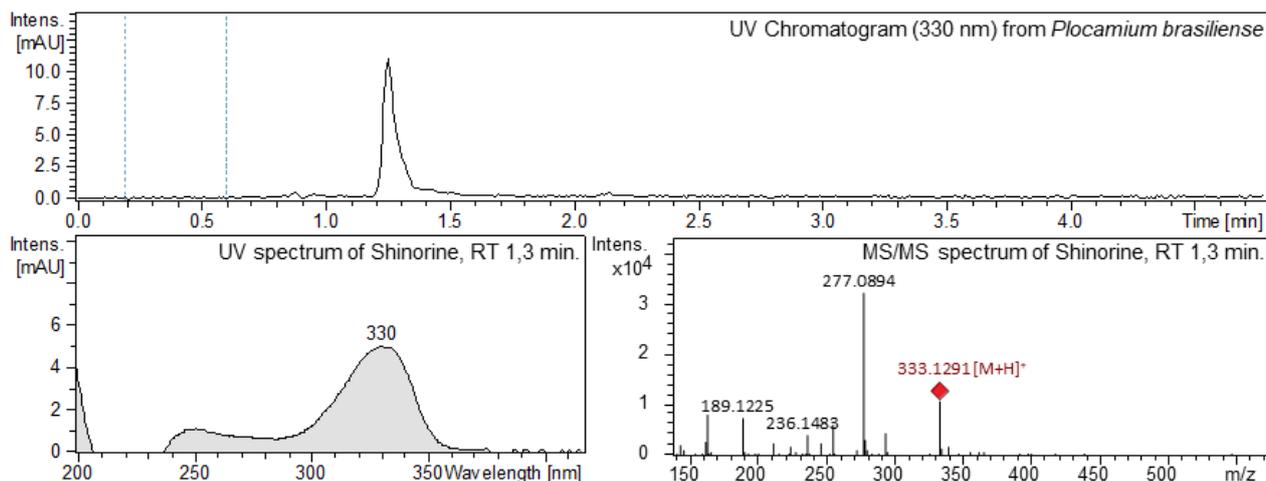


Figura 42. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS de shinorina - $C_{13}H_{21}N_2O_8$ (0.6 ppm, 2.5 msigma; TR 1.3 min) presentes no extrato de *Plocamium brasiliense* (ESI +, 35.3 eV) utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

4.3. QUANTIFICAÇÃO DE MAAS NO EXTRATO DE ITEP-024 (ARTIGO – ANEXO 3)

4.3.1. Otimização do método de extração

Foram realizados diversos testes de extração em amostras de *S. torques-reginae* ITEP-024. Após análise dos resultados obtidos em HPLC-DAD-HRMS (Figura 43) foi definido o protocolo de extração D, descrito na Tabela 6 do Capítulo 3.3.1, como aquele que seria utilizado para extração de MAAs.

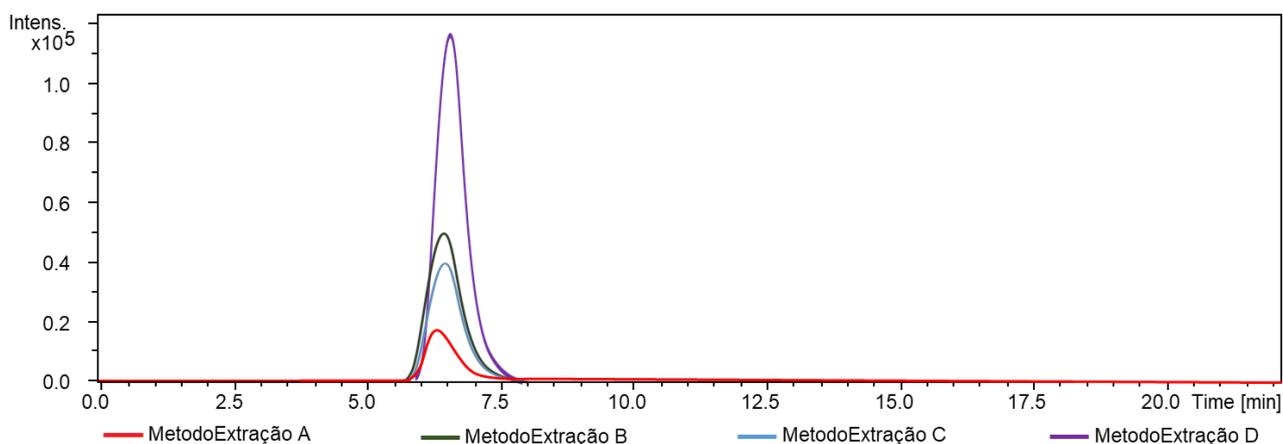


Figura 43. Cromatograma de UV (330 nm) e espectros de UV, Full Scan e MS/MS em HPLC-DAD-HRMS da shinorina (\pm 5 ppm) presente em diversos extratos de *S. torques-reginae* ITEP-024 sujeitos a diferentes métodos de extração conforme descrito na Tabela 6 (ESI +, 35.3 eV) utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v)

ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

Este método demonstrou ser o mais simples e de rápida execução em comparação aos demais métodos testados, além de permitir a melhor extração de MAAs, conforme pode ser comparado por exemplo, para as bandas cromatográficas de íons selecionados para a shinorina (o MAA presente em maior concentração na cultura de *S. torques-reginae* ITEP-024).

No entanto, este processo foi sendo melhorado ao longo do projeto, de modo a maximizar as condições de extração visando a quantificação dos MAAs, além da busca pela diminuição do impacto ambiental e os custos com solventes utilizados para o método. Assim, reduziu-se a quantidade de biomassa (mg) utilizada, o volume dos solventes utilizados e substituíram-se alguns solventes por outros menos poluentes. Na Figura 44 são apresentados os resultados de alguns dos testes realizados.

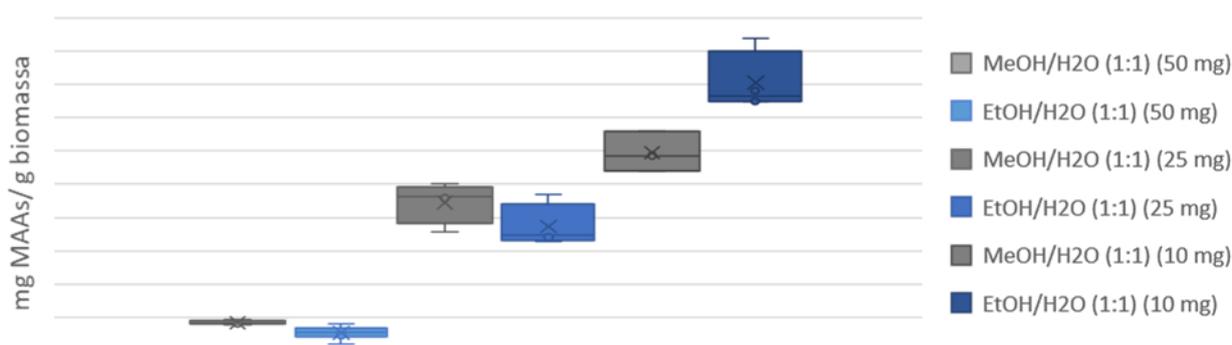


Figura 44. Comparação dos resultados de vários métodos de extração de MAAs da biomassa de ITEP-024 onde se variou a quantidade de biomassa utilizada (10 mg, 25 mg e 50 mg) e o solvente utilizado (MeOH/H₂O (1:1) e EtOH/H₂O (1:1)).

Verificou-se que quando se utiliza uma quantidade menor de biomassa, para o mesmo volume de solvente, a extração é mais eficiente. Assim, optou-se por utilizar a menor quantidade de biomassa testada, reduzindo os volumes de cultura produzidos em laboratório para a realização dos experimentos. Em relação à utilização da sonda de ultra-sonda e do banho-maria a 45 °C com ultra-som, não se observaram diferenças entre os resultados da extração na cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 (dados não apresentados). Assim, optou-se pelo método mais curto e mais simples (sem

sonda e sem banho-maria). Quanto aos solventes, quando se compararam as misturas dos solventes orgânicos (metanol e etanol) com água, também não se observaram diferenças entre os resultados. Assim, optou-se por selecionar o método com o solvente menos poluente. No entanto, após o início dos trabalhos de análise cromatográfica observou-se que todos os MAAs presentes nas amostras de ITEP-024 são bastante polares. Assim, foram testados métodos de extração com dois solventes mais polares: 100% H₂O e 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH₄OH) - Fase Móvel A utilizada nos métodos cromatográficos). Os resultados podem ser analisados na Figura 45.

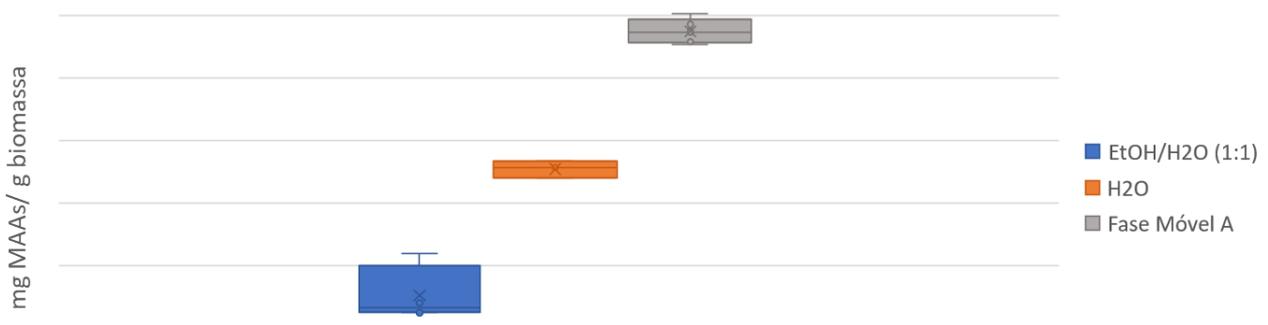


Figura 45. Comparação dos métodos de extração de biomassa de ITEP-024 onde se variou o solvente utilizado (EtOH/H₂O (1:1), H₂O e Fase móvel A - 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH₄OH).

Analisando a extração total de MAAs (Figura 45) verificou-se que esta é mais eficiente em meios mais ácidos. A utilização de um solvente com 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH₄OH) permitiu extrair uma maior quantidade de MAAs por g de biomassa. Com este método também foi possível excluir os passos de partição e secagem.

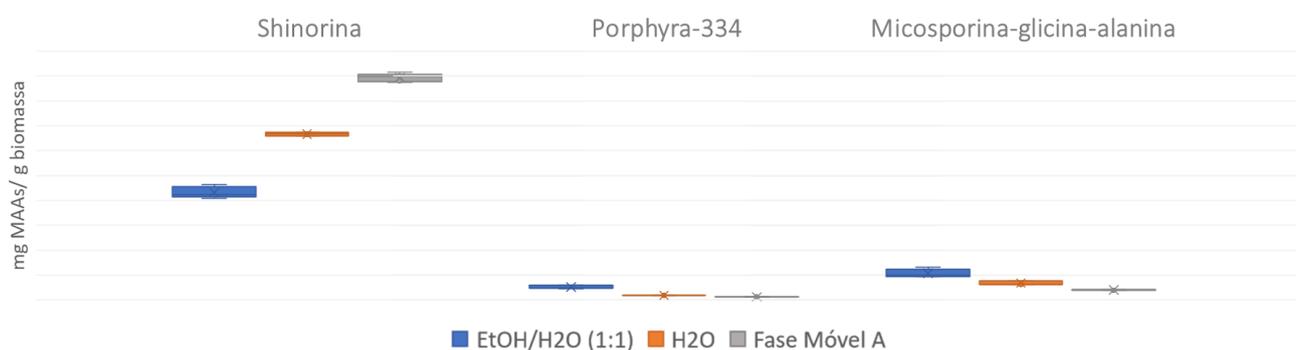


Figura 46. Comparação dos métodos de extração testados no extrato de *S. torques-reginae* ITEP-024 para cada MAA presente (shinorina, porphyrina-334 e micosporina-glicina-alanina) onde se variou o solvente utilizado (EtOH/H₂O (1:1), H₂O e Fase móvel A - 0,2 % ácido fórmico (pH 3,15 com NH₄OH).

Analisando individualmente cada MAA presente no extrato observou-se que a presença de solventes orgânicos na extração aumenta a quantidade extraída de porphyrina-334 e de micosporina-glicina-alanina. No entanto, a quantidade de shinorina extraída é bastante superior em solvente 100% aquoso acidificado, como pode ser observado no cromatograma de HPLC-DAD a 330 nm da Figura 15. Assim, optou-se pelo método com solvente acidificado visto que este extrai maior quantidade total de MAAs. A Tabela 23 resume o método de extração otimizado até ao momento.

Tabela 23 – Parâmetros do método de extração de MAAs otimizado.

Parâmetros do método de extração	
Biomassa centrifugada e liofilizada	5 mg
Solvente	0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato amônio (pH \approx 2.55)
Vol. Solvente (μL)	2000
Sonicação com sonda e banho-maria	Passo excluído
Tempo de extração	1 h à temperatura ambiente
Centrifugação	10.000 rpm, 10 min, 5 °C
Secagem após extração	Passo excluído
Partição	Passo excluído
Preparação para análise	Filtração com filtro 0.45 μ m

4.3.2. Método de quantificação de MAAs via HPLC-MS

Um método LC-MS/MS para quantificação de MAAs foi desenvolvido através de experimentos MRM. Estes experimentos monitoraram transições específicas de íons precursores e respectivos íons produtos. Para a obtenção de um método de quantificação seletivo e reprodutível foram realizados diversos testes nos quais se variaram as condições cromatográficas. Iniciaram-se os testes utilizando a coluna analítica Luna C18 (150x4,6mm, 5 μ m) (Phenomenex, EUA) que foi anteriormente utilizada nos experimentos em HPLC-DAD-HRMS. Em uma primeira fase os resultados obtidos foram bastante satisfatórios tendo-se obtido uma boa separação das bandas cromatográficas. No entanto, verificou-se posteriormente que estes resultados não eram reprodutíveis, sendo necessária nova

otimização do método cromatográfico. A instabilidade dos compostos em análise dificultou a obtenção de uma resolução cromatográfica satisfatória, sendo necessária a realização de diversos testes, não apenas com outras colunas, mas também com diferentes eluentes e gradientes de eluição.

Uma vez que os MAAs presentes nos extratos em análise são bastante hidrofílicos testou-se a utilização de eluentes mais polares variando-se também o gradiente de eluição para uma maior percentagem de solventes aquosos no início das corridas. Verificou-se que a utilização de eluentes mais ácidos com valores de pH inferiores a 3, melhorava a resolução das bandas cromatográficas. Isto deve-se aos baixos valores de pKa dos grupos carboxílicos (COOH-10 e COOH-12 - Figura 47) que tendem a ionizar-se em solução aquosa. Os valores de pKa foram estimados utilizando o programa ACE & JChem pKa calculator (Tabela 24) ¹⁸⁴.

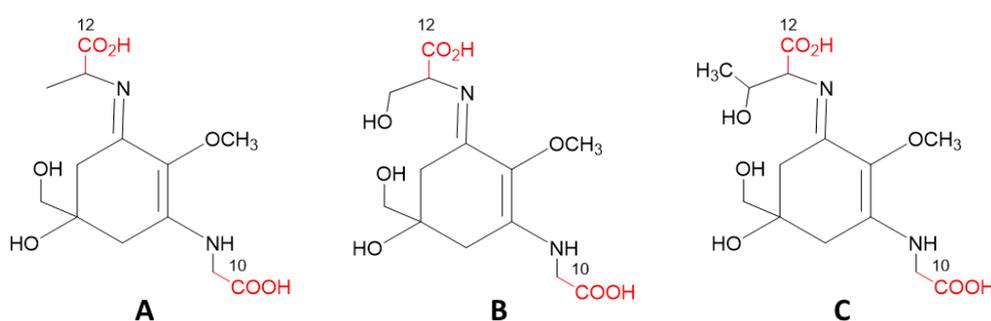


Figura 47. Estrutura molecular dos MAAs (A) micosporina-glicina-alanina, (B) shinorina e (C) porphyra-334.

Tabela 24 – Valores estimados de pKa dos grupos carboxílicos COOH-10 e COOH-12 representados em vermelho nas moléculas de MAAs da Figura 47.

Átomo	pKa (valores estimados)		
	Micosporina-Glicina-Alanina	Shinorina	Porphyra-334
COOH-10	3.9	3.7	3.7
COOH-12	3.7	3.2	3.7

Seguiram-se os testes com outras fases estacionárias: ZIC[®]-HILIC (150x2.1 mm, 5µm) e Synergi 4µ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) (Phenomenex, EUA). Após todos os processos de otimização, optou-se pela utilização da coluna Synergi 4µ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) utilizando o método

cromatográfico descrito na Tabela 13 do capítulo 3.3.5. Esta coluna foi a que produziu melhores resultados em relação à eficiência de separação e forma do pico, resultando em uma excelente separação cromatográfica em menos de 6 min (Figura 48). Esta coluna é muito estável em fases móveis 100% aquosas e fornece retenção prolongada de compostos hidrofóbicos e leve seletividade para compostos polar ¹⁶⁷. Embora tenha sido relatado que, em colunas de fase reversa, os MAAs eluem próximo ao volume morto ³¹, neste estudo a capacidade de retenção da coluna foi suficiente para separar todos os analitos de interesse. De acordo com a informação do fabricante, e após confirmação em laboratório, verificou-se que, com um fluxo de 0,4 mL.min⁻¹, o volume morto do sistema com esta coluna sai até aos 0,8 min. Assim, confirmou-se a capacidade de retenção da coluna para todos os analitos de interesse. O curto tempo de separação também permitiu economias consideráveis no uso de solventes.

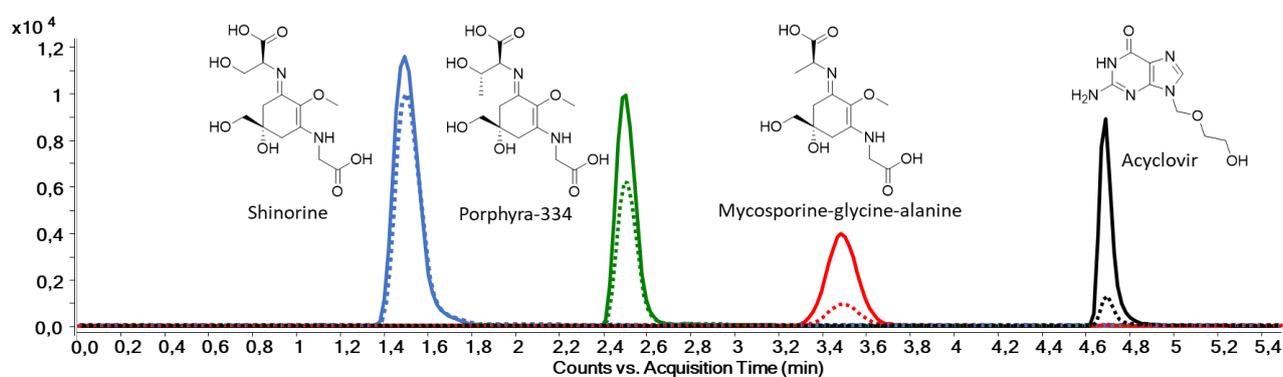


Figura 48. Cromatograma de íons extraídos de uma amostra de matriz biológica (spirulina) enriquecida antes da extração com 10 µL de uma solução de analito em um nível médio (shinorina – m/z 333: 600 µg.mL⁻¹, porphyrin-334 – m/z 347: 300 µg.mL⁻¹, micosporina-glicina-alanina – m/z 317: 150 µg .mL⁻¹) e 10 µL de solução padrão interno (aciclovir – m/z 226: 100 µg.mL⁻¹) obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH ≈2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH ≈2.95) numa coluna Synergi 4µ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. Cada composto é exibido em uma cor diferente. São apresentadas as transições correspondentes ao íon produto quantificador e qualificador.

A shinorina foi o composto que eluiu primeiro (1,49 min), seguido pela porphyrin-334 (2,50 min) e pela micosporina-glicina-alanina (3,49 min). Este tipo de fase estacionária é muito estável em fases móveis 100% aquosas e é específico para retenção de compostos extremamente polares melhorando

a resolução cromatográfica de analitos ácidos ¹⁶⁷.

As condições para a obtenção dos cromatogramas de MRM foram otimizadas a partir da seleção dos íons produtos mais intensos para cada MAA avaliado e para o padrão interno, conforme Figura 49.

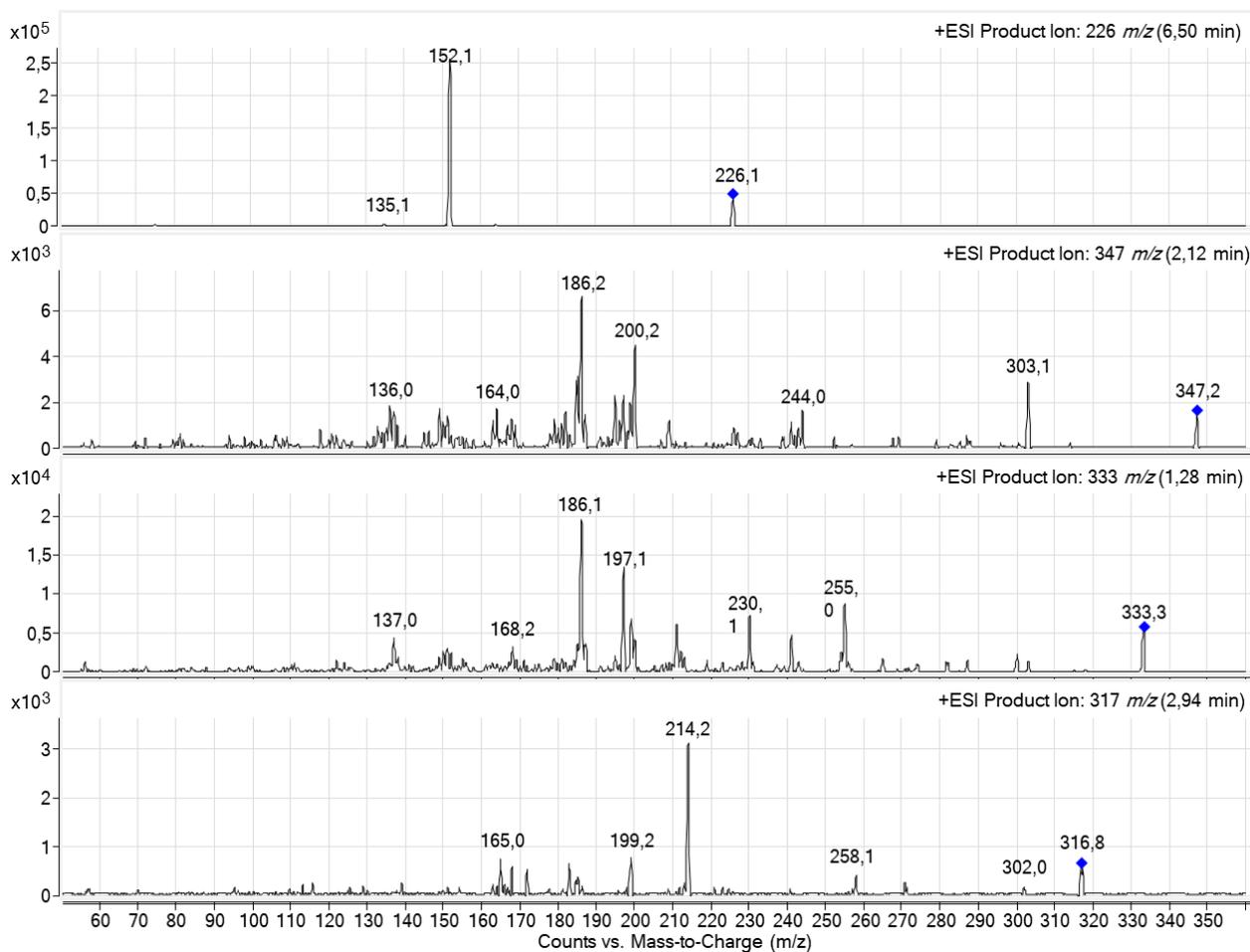


Figura 49. Espectros de íons-produto dos MAAs de interesse (shinorina – m/z 333; porphyra-334 – m/z 347; micosporina-glicina-alanina – m/z 317) e do padrão interno (aciclovir – m/z 226) obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

Após a seleção das melhores transições, otimizaram-se os parâmetros do experimento de MRM, nomeadamente energia de colisão e tensões de fragmentação, conforme apresentado na Tabela 12 do capítulo 3.3.5. As condições escolhidas foram aquelas que resultaram nos maiores valores de integração de área das bandas dos cromatogramas de MRM.

4.3.3. Validação do método analítico

O método de validação foi realizado para demonstrar que a metodologia analítica desenvolvida pode ser aplicada na quantificação de MAAs garantindo que os valores obtidos são próximos do valor presente em amostras reais¹³². Neste trabalho, avaliamos a seletividade, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial), exatidão, linearidade, recuperação, efeito matriz e estabilidade do método analítico para a quantificação de MAAs em cianobactérias. Adicionalmente, determinou-se o intervalo de trabalho e os limites de detecção e quantificação. Para a determinação dos parâmetros foram utilizados os critérios definidos pela ANVISA^{136,137}.

SELEÇÃO DA MATRIZ BIOLÓGICA

Neste método de validação utilizou-se como matriz biológica a biomassa seca comercial da cianobactéria *Arthrospira platensis*. Esta biomassa foi cuidadosamente analisada e nenhum MAA foi detetado. Também não se observaram interferências notáveis dos componentes da matriz nos tempos de retenção dos analitos de interesse (Figura 50).

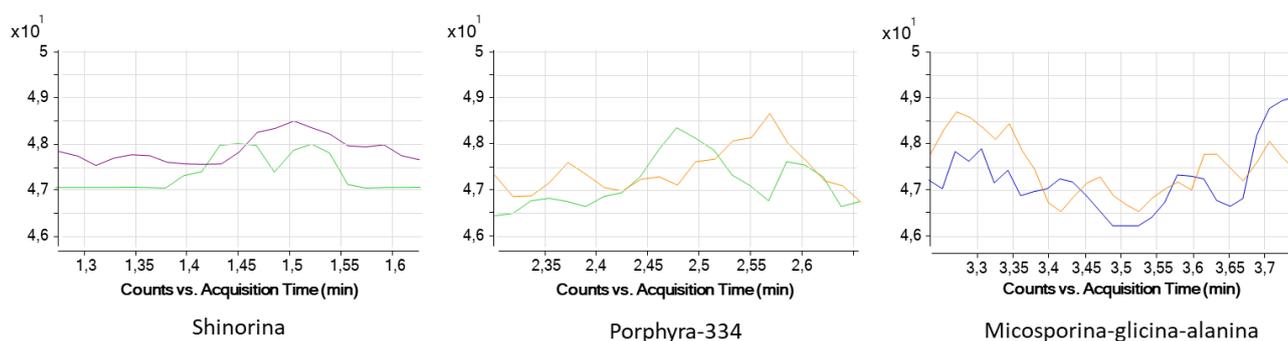


Figura 50. Cromatogramas de MRM da matriz biológica (biomassa seca comercial de *Arthrospira platensis*) não dopada. Estão apresentadas as duas transições analisadas para os analitos de interesse (shinorina – m/z 333, porphyra-334 – m/z 347 e micosporina-glicina-alanina – m/z 317) obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO

De acordo com a ANVISA, o padrão interno deverá ser um composto, geralmente com características estruturais similares ao analito, adicionado aos padrões de calibração e amostras em concentrações conhecidas e constantes, para facilitar a determinação do analito ¹³⁶. O uso de um padrão interno é importante para avaliar a reprodutibilidade e garantir uma quantificação confiável ^{125,132}. Os métodos bioanalíticos por LC-MS usam idealmente análogos estáveis dos analitos marcados isotopicamente como padrões internos, porque estes têm quase as mesmas propriedades físico-químicas e respostas quando ionizados ¹⁸⁵. Como não há MAAs estáveis marcados isotopicamente disponíveis comercialmente, em outros estudos usaram-se análogos estruturais para quantificar MAAs. Por exemplo, Whitehead & Hedges (2002) desenvolveram um método quantitativo de LC-MS para a análise de MAAs comparando-as com um padrão interno de cloridrato de L-tiramina com precisão superior a 3% ¹²⁵. Mais recentemente, Chollet-Krugler *et al.*, 2019 usaram a citosina como padrão interno para quantificar micosporina glutaminol e micosporina glutamicol, com limites de detecção de 1,41 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 4,49 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente ⁷⁰. No entanto, tanto a citosina como a tiramina são metabólitos endógenos frequentemente presentes em organismos vivos. A citosina é uma base encontrada nos ácidos nucleicos e, embora seja muito mais comum como parte do DNA e do RNA ou como parte dos seus análogos de nucleosídeo ou nucleotídeo, pode ser detectada em sua forma livre em vários organismos ^{186,187}. Por outro lado, a tiramina é uma amina-traço que ocorre naturalmente derivando do aminoácido tirosina e é amplamente encontrada em animais e plantas, incluindo espécies fitoplanctônicas ¹⁸⁸. Portanto, embora esses metabólitos possam estar presentes em pequenas quantidades, o uso desses compostos como padrão deve ser evitado. Assim, neste método testaram-se dois compostos (1-metil-triptofano e aciclovir) para serem utilizados como padrões internos (Figura 51).

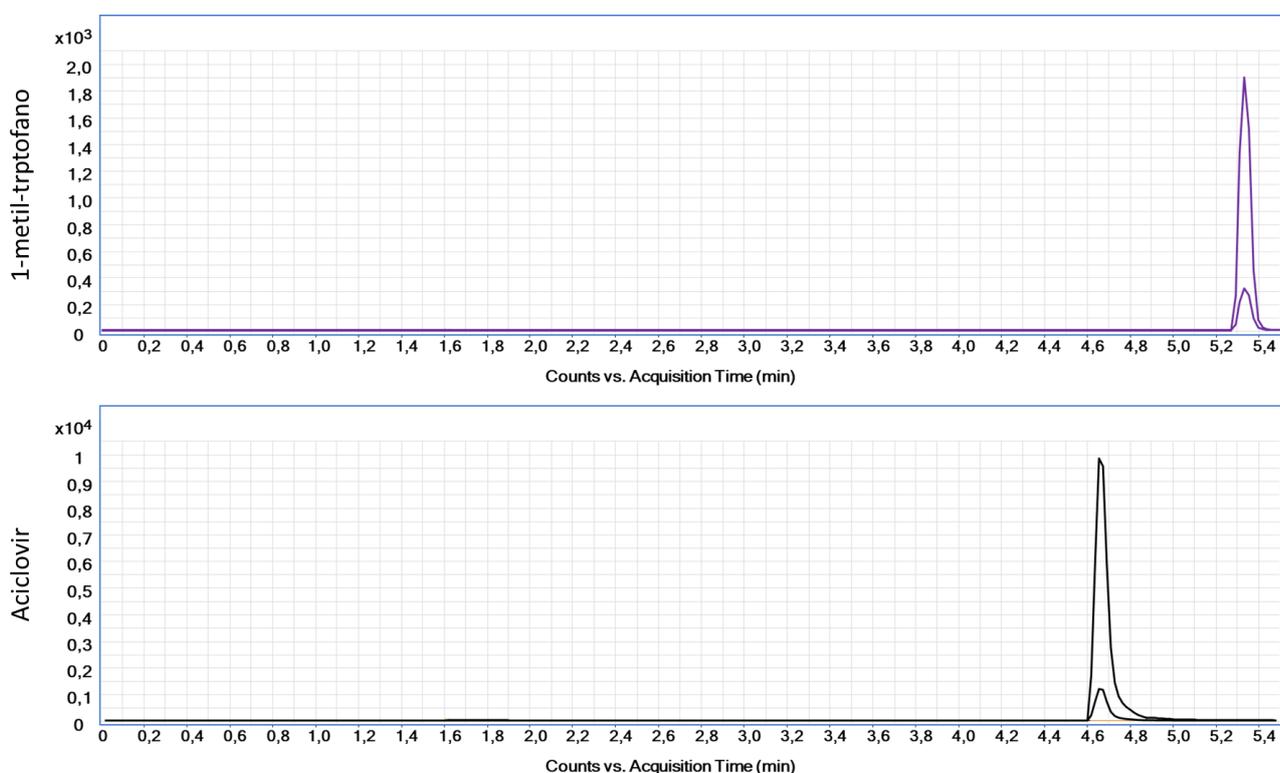


Figura 51. Cromatograma de íons extraídos do 1-metil-trptofano (m/z 219 e TR = 5,32) nas transições correspondentes aos íons produto 160 (quantificador) e 132 (qualificador) e do aciclovir (m/z 226 e TR = 4,65) nas transições correspondentes aos íons produto 152 (quantificador) e 135 (qualificador) obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

Selecionou-se o aciclovir como padrão interno para esta quantificação uma vez que, além de este composto eluir na mesma faixa de polaridade que os analitos de interesse, é um produto sintético com uma estrutura química bastante semelhante aos MAAs (constituído por aminas e hidroxila), que gerou logPs próximos aos dos MAAs, calculados usando o programa SwissADME¹⁸⁹ e confirmados experimentalmente por Meylan *et al.*, 1995 para aciclovir¹⁹⁰. Este composto apresenta transições específicas (152 e 135) e não co-elui com os MAAs que pretendemos quantificar (TR = 4,65 min) (Figura 51). Verificou-se ainda a ausência do padrão interno no extrato de ITEP 024 tendo-se confirmado que não existem interferentes no TR do aciclovir, nas transições analisadas (Figura 52).

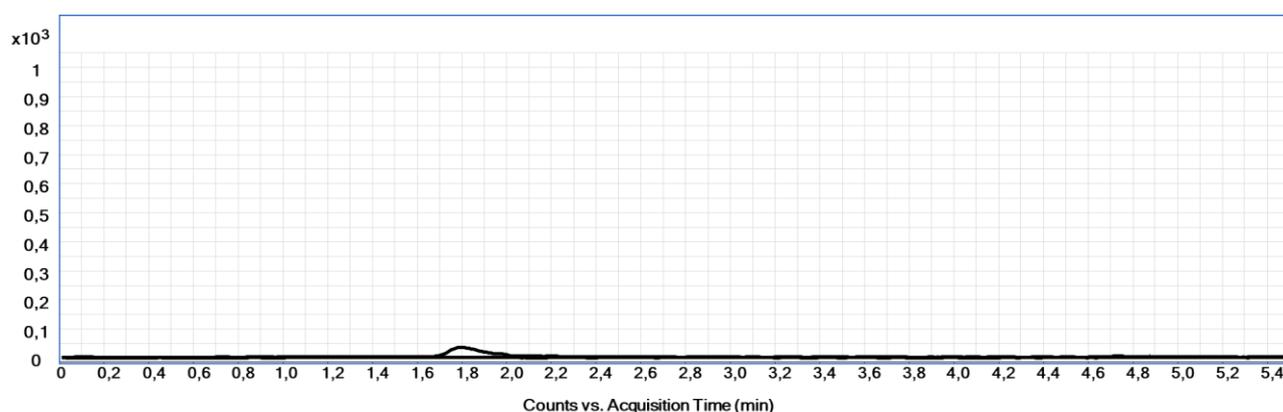


Figura 52. Cromatograma de íons extraídos do padrão interno aciclovir (m/z 226) para as duas transições (135 e 152) analisadas no extrato da cianobactéria *S. torques-reginae* ITEP-024 obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹.

ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

Elevada especificidade e seletividade podem ser alcançadas usando este método LC-MS/MS, como evidenciado a partir da análise de dados dos experimentos de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A realização de experimentos MRM permite que haja quantificação dos compostos de forma seletiva, pois é selecionada a passagem de íons com m/z específicos^{41,129}. A simetria de pico aceitável foi alcançada de acordo com os valores do fator de assimetria (As) (Tabela 25). Também foram obtidos excelentes valores de resolução (Rs) para todos os analitos, mostrando uma boa separação cromatográfica de todos os picos com sobreposição total das transições do quantificador e do qualificador (Figura 48).

Tabela 25 – Parâmetros de especificidade e selectividade para cada MAA: Fator de assimetria (As), Resolução (Rs), Tempo de retenção (TR), Precisão do tempo de retenção e Precisão do tempo de retenção inter-dia.

MAA	SH	P-334	MGA
As	1.4	1.6	1.1
Rs	2.2 (SH/P-334)	1.8 (P-334/MGA)	2.7 (MGA/ACV)
TR (min)	1.49	2.52	3.42
Precisão do TR	0.3 %	0.2 %	0.4 %
Precisão do TR inter-dia	1.0 %	0.9 %	0.5 %

Confirmou-se ainda que os tempos de retenção na matriz biológica dopada são semelhantes aos tempos de retenção dos padrões em solvente (Figura 53).

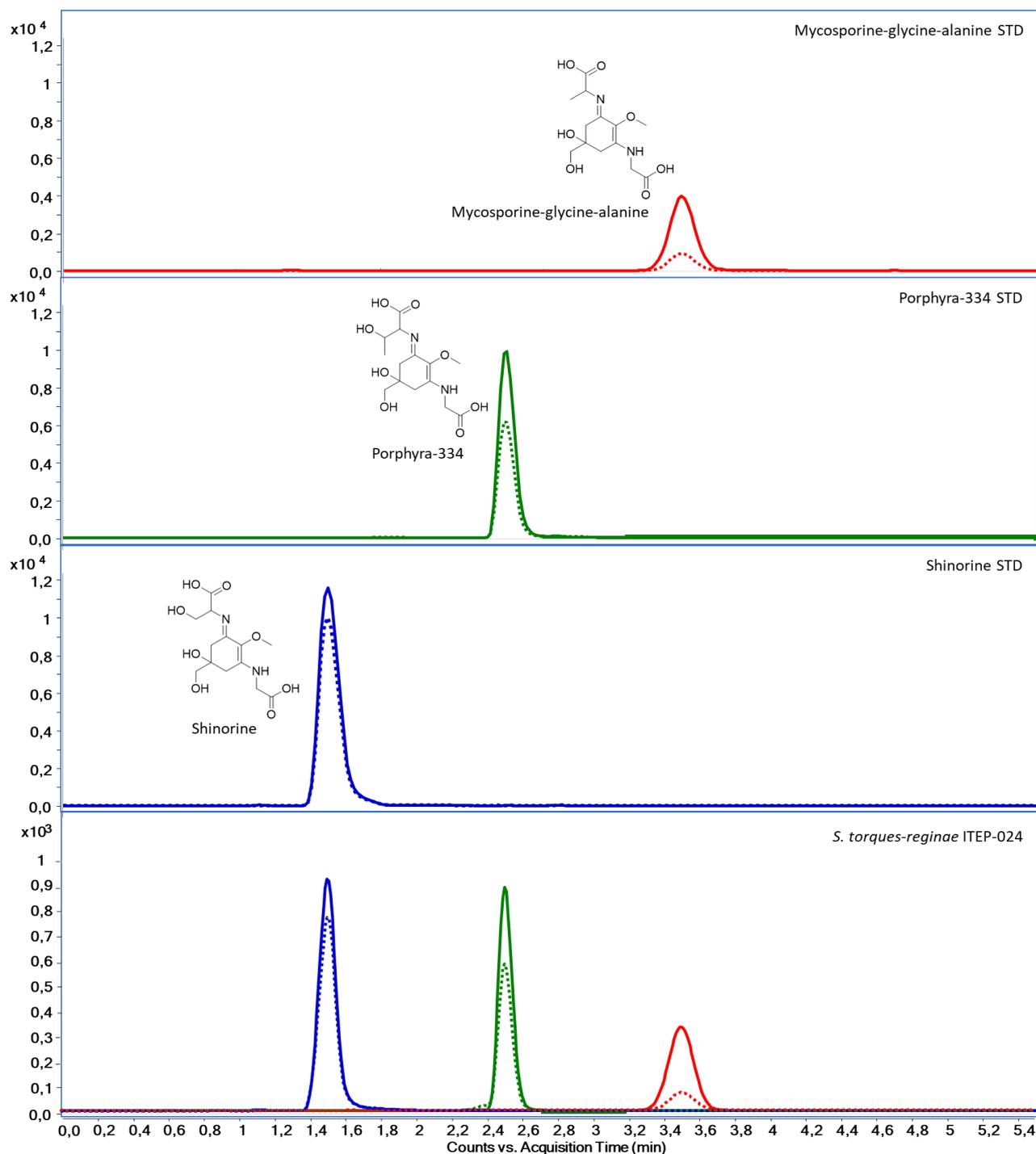


Figura 53. Cromatogramas de íons extraídos dos MAA's (shinorina, porphyra-334 e micosporina-glicina-alanina) nas soluções padrão e presentes no extrato de *S. torques-reginae* ITEP-024 obtidos em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. Shinorina: linha azul; porphyra-334: linha verde; micosporina-glicina-alanina: linha vermelha. Quantificador: linha contínua; qualificador: linha tracejada.

PRECISÃO, EXATIDÃO, LINEARIDADE, RECUPERAÇÃO, EFEITO MATRIZ

Os intervalos da curva de calibração foram definidos com base na quantidade de cada MAA presente numa amostra de *S. torques-reginae* ITEP-024 produzida nas condições normalizadas para os experimentos de quantificação. Este resultado representa o controle para os restantes experimentos. Como tal é necessário que o método analítico permita quantificar de forma correta esta concentração e as restantes concentrações esperadas durante os experimentos de indução de MAAs. É importante referir que as concentrações determinadas para as amostras controle encontram-se dentro do mesmo intervalo publicado por outros autores^{31,81,139,191}. Coeficientes de correlação aceitáveis (Shinorina $R^2 = 0,987$, porphyra-334 $R^2 = 0,988$, micosporina-glicina-alanina $R^2 = 0,994$) foram obtidos dentro de uma faixa de concentração de 0.2-3.2 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ para shinorina, 0.1-1.6 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ para porphyra-334 4, e 0.05-0.8 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ para micosporina-glicina-alanina. Todos os dados de calibração estão resumidos na Tabela 26.

Tabela 26 – Parâmetros da curva de calibração para cada MAA: equação de regressão, coeficiente de correlação, intervalo, limite de detecção (LoD), limite de quantificação (LoQ), precisão e precisão inter-dia do tempo de retenção (TR) e efeito matriz.

MAA	SH	P-334	MGA
Equação de regressão	$y = 0,7262x - 0,5909$	$y = 0,5468x - 0,3297$	$y = 0,3155x - 0,032$
Coeficiente de correlação	0,987	0,988	0,994
Intervalo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.2-3.2	0.1-1.6	0.05-0.8
LoD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.002	0.001	0.005
LoQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.2	0.1	0.05
Efeito matriz	52%	39%	51%

Os valores de LoD e LoQ foram definidos em 0.002 e 0.2 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ para shinorina, 0.001 e 0.1 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ para porphyra-334, e 0.005 e 0.05 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ para micosporina-glicina-alanina, respectivamente. Ambos se encontram acima de qualquer interferência detetada na matriz biológica. Foram obtidos excelentes resultados de recuperação para todos os analitos: shinorina 93%-102%, porphyra-334 96%-100% e micosporina-glicina-alanina 95%-102%. As taxas de efeito de matriz observadas foram de 52% para

a shinorina, 39% para a porphyra-334 e 51% para a micosporina-glicina-alanina. Estes resultados demonstraram que os componentes da matriz podem influenciar a resposta dos analitos. No entanto, aqui apresentamos um método de quantificação totalmente desenvolvido na presença da matriz (linearidade e controles de qualidade) e esta é uma das formas mais confiáveis para avaliar todos os efeitos da matriz em resultados quantitativos.

A precisão e a reprodutibilidade (precisão inter-dia) dos três MAAs apresentaram coeficientes de variação inferiores a 15% e a exatidão foi próxima a 100% (Tabela 27).

Tabela 27 – Precisão, exatidão e recuperação obtidas durante a validação do método de quantificação dos MAAs shinorina, porphyra-334 e micosporina-glicina-alanina. CQA: controle de qualidade alto; CQM: controle de qualidade médio; CQB: controle de qualidade baixo.

MAA		SH	P-334	MGA
Precisão (n=4)	CQA	5%	1%	4%
	CQM	3%	7%	1%
	CQB	10%	8%	5%
Precisão inter-dia (n=12)	CQA	8%	4%	9%
	CQM	11%	6%	12%
	CQB	10%	15%	14%
Exatidão (n=4)	CQA	98%	98%	99%
	CQM	107%	111%	102%
	CQB	107%	97%	98%
Recuperação (n=4)	CQA	102%	100%	102%
	CQM	93%	96%	95%
	CQB	97%	96%	97%

Estes resultados indicam que o método desenvolvido é preciso e exato para a quantificação dos MAAs quando a análise é realizada no mesmo laboratório (mesmo equipamento e padrões).

ESTABILIDADE

A estabilidade de extratos de *S. torques-reginae* ITEP 024 (amostras reais) foi avaliada em curtos

períodos de tempo (5 horas), em longos períodos de tempo (90 dias) e durante o período de análise (48 horas). Para estabilidade a curto prazo, os extratos de MAA de *S. torques-reginae* ITEP-024 foram incubados por 5 h em diferentes temperaturas (18 ° C, 4 ° C, 22 ° C, 38 ° C, 50 ° C e 80 ° C) (Figura 54).

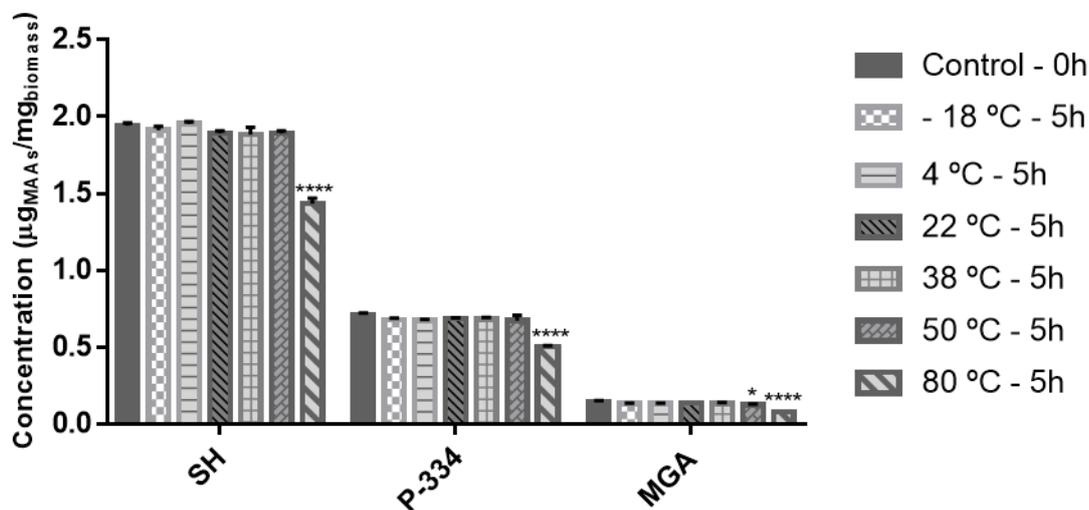


Figura 54. Concentração dos MAAs - shinorina (SH), porphyra-334 (P-334) e micosporina-glicina-alanina (MGA) – no extracto de *S. torques-reginae* ITEP-024 incubado por 5 h a diferentes temperaturas (-18 ° C, 4 ° C, 22 ° C, 38 ° C, 50 ° C e 80 ° C). Diferenças significativas foram reportados de acordo com os resultados da ANOVA de dois fatores: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$.

Todos os MAAs foram estáveis a temperaturas abaixo de 50 ° C. No entanto, a estabilidade dos MAAs diminuiu a temperaturas mais altas. Shinorina, porphyra-334 e micosporina-glicina-alanina mostraram diferenças significativas na estabilidade após a incubação a 80 ° C ($p < 0,001$). Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores^{53,80,192} e sugerem que os MAAs são altamente estáveis em diferentes faixas de temperatura. Extratos de *S. torques-reginae* ITEP-024 também foram avaliados quanto à estabilidade a longo prazo. Os resultados indicaram que os MAAs permaneceram estáveis por 90 dias a 4 ° C ($p > 0,05$). A estabilidade durante o período de análise foi determinada em extratos de *S. torques-reginae* ITEP-024 durante o seu tempo de permanência no amostrador automático do equipamento (48 horas). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante todo o processo. Os cromatogramas de íons extraídos imediatamente após a extração e 48 horas após

a extração são mostrados na Figura 55. Todos os MAAs foram considerados altamente estáveis durante o tempo de residência no amostrador automático até 48 horas ($p > 0,05$) o que sugere que não ocorre degradação das amostras durante este período.

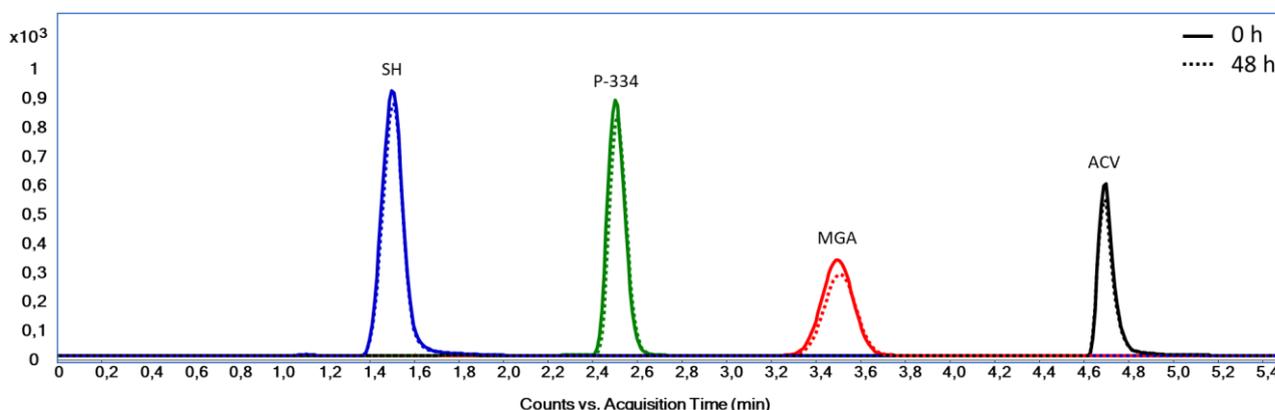


Figura 55. Cromatograma de íons extraídos do extrato de MAAs da cianobactéria *S. torques-reginae* ITEP-024, dissolvido em solvente de extração e mantido à temperatura ambiente, obtido em LC-MS/MS utilizando os eluentes (A) 0,1 % (v/v) ácido fórmico + 0,2 mM formiato de amônio (pH \approx 2,55) e (B) ACN/H₂O (9:1) + ácido fórmico 0,1 % (v/v) (pH \approx 2.95) numa coluna Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A (150 x 2,0 mm) sob uma vazão de 0,4 mL.min⁻¹. Shinorina: linha azul; porphyra-334: linha verde; micosporina-glicina-alanina: linha vermelha. 0 h: linha contínua; 48 h: linha tracejada.

Os resultados obtidos com a validação permitem confirmar que a quantificação dos três MAAs cujos padrões se encontravam disponíveis (shinorina, porphyra-334 e micosporina-glicina-alanina) é precisa e exata, obtendo-se tempos de retenção adequados em uma corrida de 6 min. O método validado fornece uma ferramenta valiosa para a rápida extração e análise de cianobactérias e outros microorganismos, permitindo a quantificação eficiente desses MAAs. Este método poderá ser melhorado futuramente e completado se mais padrões de MAAs estiverem disponíveis, realizando pequenos ajustes cromatográficos.

4.4. PRODUÇÃO DE MAAS NA CEPA *S. TORQUES-REGINAE* ITEP-024

4.4.1. Correlação entre parâmetros de crescimento

Traçou-se a curva de correlação entre o peso seco (mg/mL) e a densidade óptica a 750 nm (Figura 56) para a cultura de *S. torques-reginae* ITEP-0.24.

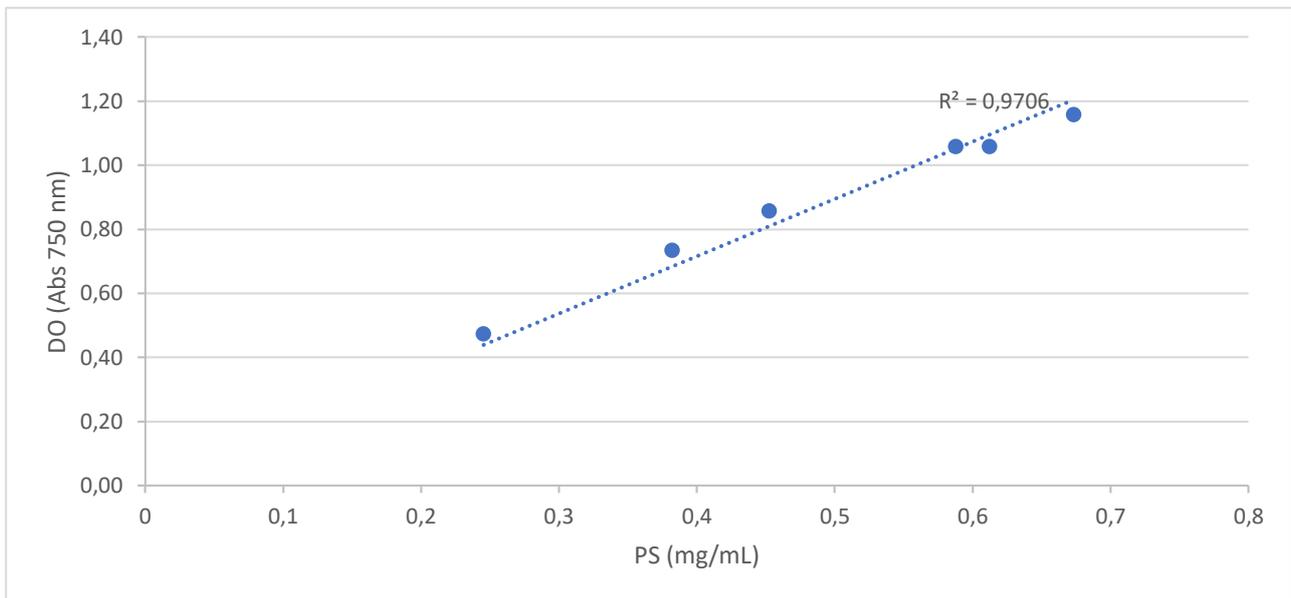


Figura 56. Curva de correlação entre o peso seco ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e a densidade ótica a 750 nm numa cultura de *S. torques-reginae* ITEP-024.

Verificou-se que a densidade ótica a 750 nm pode ser relacionada com o peso seco da ITEP-024, através da seguinte regressão linear: $PS = 1.7893 \times DO$ onde, PS é o peso seco (mg/mL) e DO é a densidade ótica a 750 nm.

4.4.2. Produção de MAAs nas condições de cultivo padrão

Após seleção da cepa de cianobactéria a utilizar nos experimentos previstos para este projeto, iniciaram-se os trabalhos de otimização do cultivo com o objetivo de maximizar a produção dos MAAs. Realizou-se um experimento de cultivo de longa duração da cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 nas condições definidas como padrão para estes testes (Figura 57).

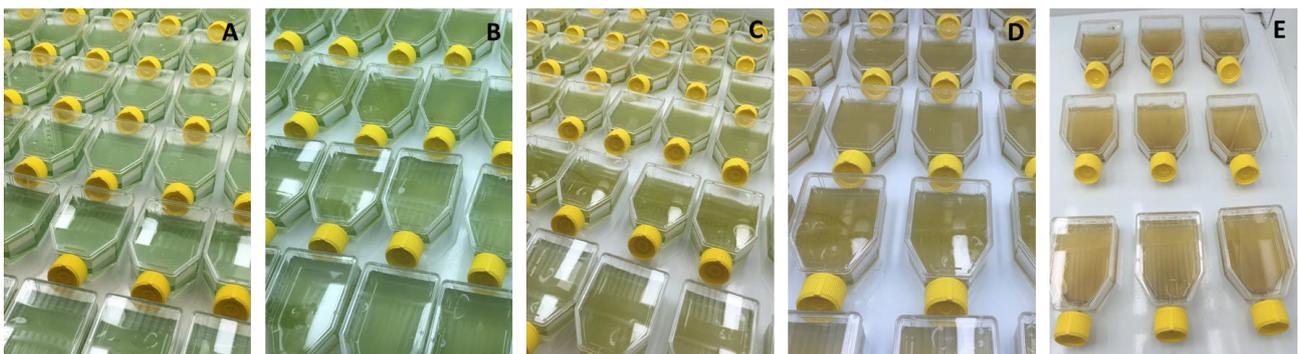


Figura 57. Sistemas de cultivo utilizados no ensaio experimental de otimização da produção de MAAs – Condições de cultivo padrão (A) Dia 0 - Inoculação das culturas, (B) Dia 08, (C) Dia 18, (D) Dia 45, (E) Dia 61 - Final do experimento.

O objetivo principal do experimento foi determinar qual a concentração inicial ideal de cultura a utilizar nos experimentos de indução de MAAs e ainda analisar a variação na produção de MAAs ao longo do cultivo ($\mu\text{g}_{\text{MAAs}}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$).

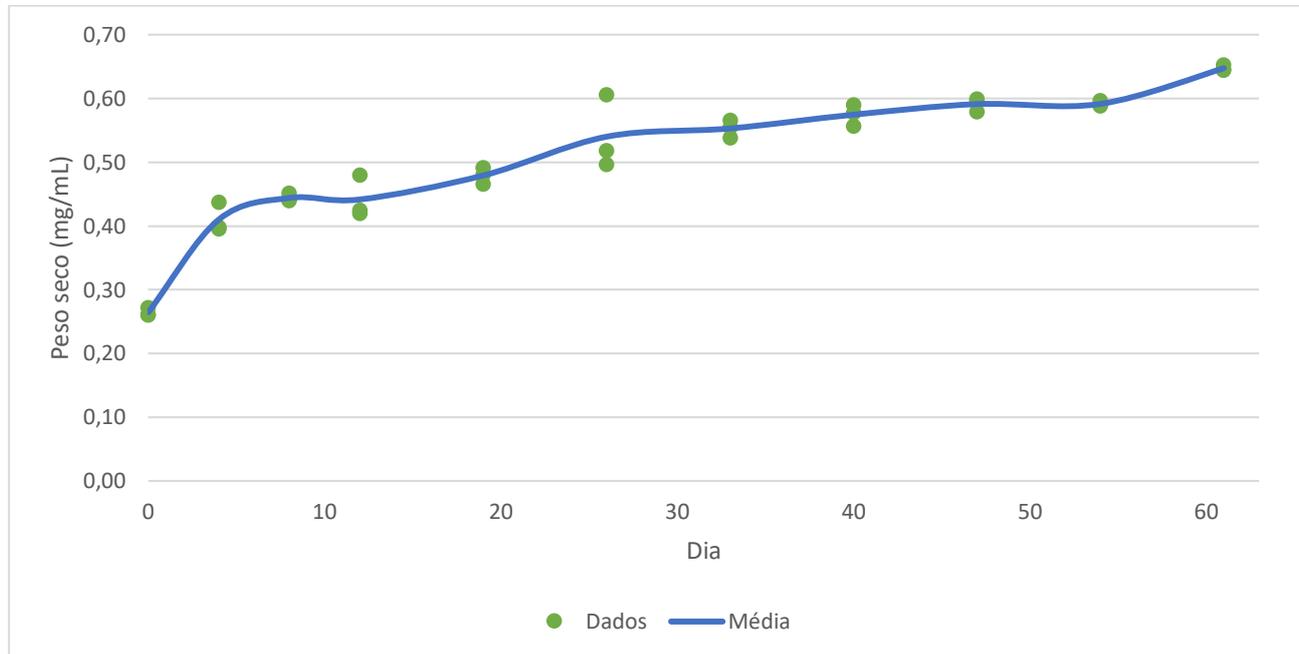


Figura 58. Peso seco (mg/mL) da cultura de *S. torques-reginae* ITEP-024 ao longo de um experimento de 61 dias (calculado através da correlação da densidade optica com o peso seco) (n=3).

O crescimento celular de uma cultura pode ser determinado através da sua curva de crescimento. Há cinco fases definidas para o crescimento de cianobactérias em meio líquido: a) fase de latência que é a fase que se segue à inoculação da cepa e é caracterizada por não ocorrer crescimento; b) fase exponencial que é a fase em que ocorre um aumento acentuado do número de organismos na cultura; c) fase de desaceleração em que ocorre um declínio no crescimento da cultura devido a um fator necessário para a divisão celular se ter tornado limitante; d) fase estacionária que é caracterizada por ausência de crescimento; e) fase de morte que ocorre quando o metabolismo celular já não pode ser mantido. Este experimento teve a duração de 61 dias. No entanto, apesar do período prolongado de experimento, não se observaram todas as fases da curva de crescimento para este tipo de culturas. Na Figura 58 apenas se observa a fase exponencial e a fase de desaceleração. A fase estacionária e a fase de morte não foram registradas. No entanto, a nível microscópico e macroscópico (Figura 57),

observaram-se alterações na cultura, nomeadamente na sua coloração que ficou mais acastanhada o que indica uma alteração nos compostos produzidos pela cultura, nomeadamente na produção de pigmentos como a clorofila-*a* e a ficocianina. Este fato aponta que a cultura se encontrava em condições estressantes uma vez que não apresentava o aspecto azul esverdeado esperado. Um dos fatores prováveis para o estado em que a cultura se encontrava foi o excesso de luminosidade a que esta foi sujeita pois a cultura foi transferida de frascos de 2 L para frascos de 30 mL nos quais a razão superfície/profundidade foi maximizada facilitando a penetração da luz (Figura 59). Assim, nos testes de variação dos fatores abióticos que se seguiram a concentração inicial da cultura foi aumentada para evitar este efeito fotoinibidor ($> 0,5 \text{ mg/mL}$).

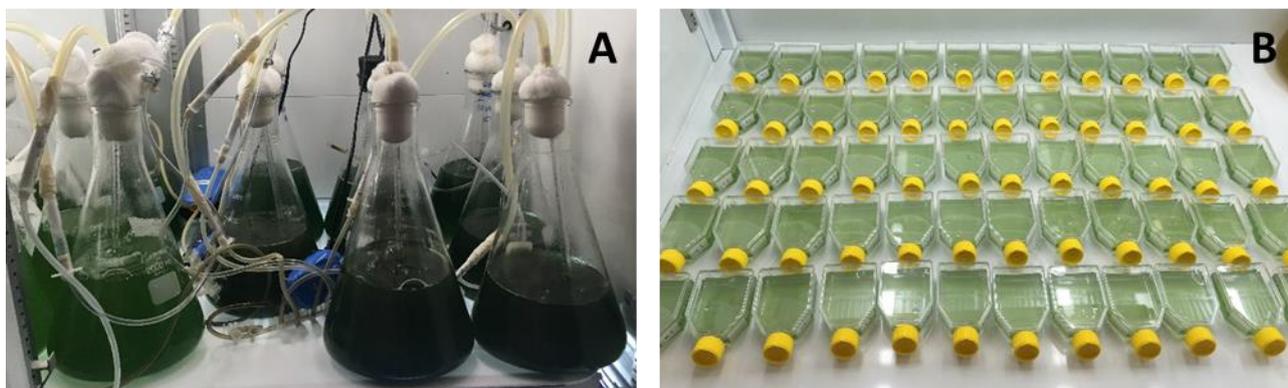


Figura 59. Sistemas de cultivo da cianobactéria *S. torques-reginae* ITEP-024: (A) para produção de cultura em laboratório – culturas concentradas, prontas para o repique; (B) para os experimentos de otimização da produção de MAAs – culturas no início do experimento.

A taxa específica de crescimento média, calculada através da diferença entre o ponto inicial e o ponto final do experimento foi de $0,006 \text{ dia}^{-1}$. Analisando apenas o período de crescimento exponencial a taxa específica de crescimento média, aumenta para $0,04 \text{ dia}^{-1}$, o que continua sendo uma taxa de crescimento bastante baixa. No entanto, tendo em consideração o objetivo principal destes experimentos que será verificar a produção de MAAs ao longo do crescimento a uma escala laboratorial, este sistema demonstrou ser o mais adequado para as condições existentes. Em produções industriais, outros fatores já conhecidos por aumentar o crescimento celular, poderão ser adicionados, como a agitação da cultura (por aeração ou por bombas), a injeção de CO_2 , etc.

Em relação à análise de MAAs, as amostras foram analisadas por LC-MS/MS para determinação da produção de MAAs em cada ponto (Figura 60). Registrou-se uma produção média de MAAs de 3,4 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$ ao longo do experimento, dos quais cerca de 68 % são shinorina, 19 % porphyra-334 e 15 % micosporina-glicina-alanina.

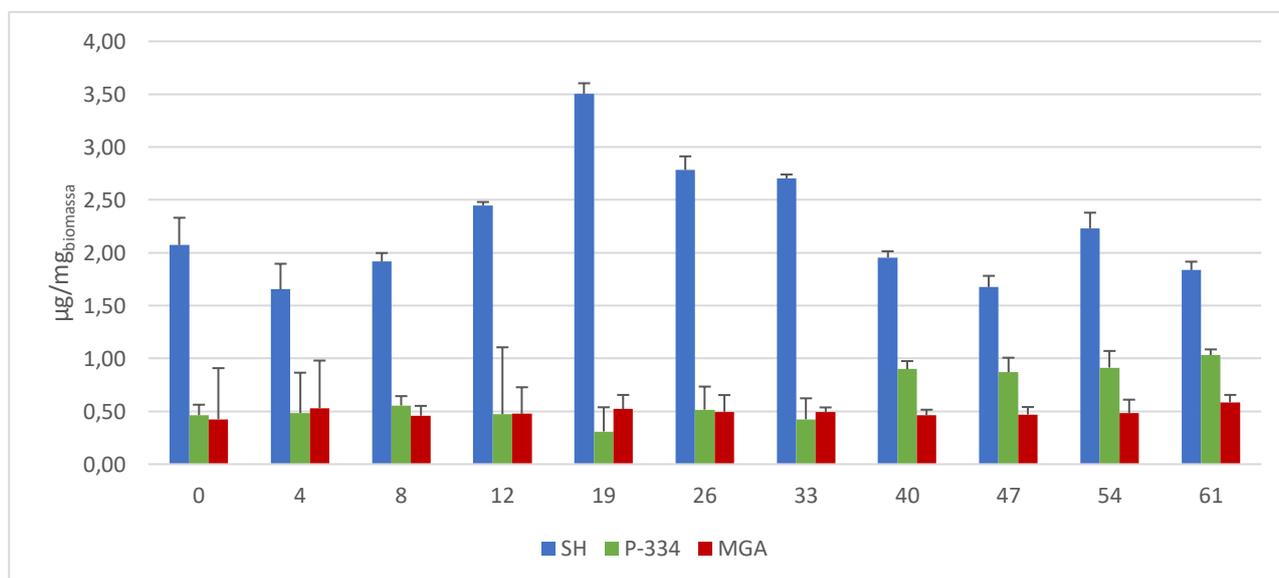


Figura 60. Concentração de MAAs (SH - shinorina, P-334 - porphyra-334 e MGA - micosporina-glicina-alanina) na cultura de *S. torques-reginae* ITEP-024 ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$) ao longo de um experimento de 61 dias.

Ao longo de todo o cultivo registraram-se variações ligeiras nos MAAs produzidos pela cultura. Observou-se uma ligeira diminuição na concentração de shinorina durante a fase exponencial (primeiros 4 dias de cultivo), no entanto, com o início da fase de desaceleração registrou-se um aumento da concentração deste MAA. Como descrito anteriormente, nesta fase o crescimento da cultura torna-se mais lento devido à existência de um fator limitante no cultivo. Assim, as células começam a armazenar metabólitos secundários, como os MAAs, que poderão ser essenciais para a sua sobrevivência futura. A partir do 19º dia observou-se uma diminuição da concentração de shinorina. Em sequência observa-se um aumento na porphyra-334 cuja concentração se manteve constante até esta data. De acordo com alguns estudos, há evidências de que a porphyra-334 pode atuar como um pigmento fotossintético acessório^{81,83,193}. Segundo Sivalingam *et al.*, 1976¹⁹³, após a excitação na faixa de UVA, a emissão de fluorescência foi observada em comprimentos de onda

próximos à absorvância da clorofila-*a*, sugerindo que, teoricamente, seria possível a transferência de energia da porphyra-334 para a clorofila-*a*. Entretanto, como referido no mesmo estudo, os MAAs são apenas fracamente fluorescentes e são geralmente mais abundantes em ambientes de alta luminosidade, nos quais a energia luminosa não é o fator limitante para a fotossíntese. Isto levou a que estes estudos não fossem continuados ⁸³. No entanto, no experimento realizado, esta fase coincide com a alteração microscópica e macroscópica observada na cultura que passou de verde azulado para uma tonalidade acastanhada o que sugere uma diminuição na produção dos pigmentos principais produzidos por esta cianobactéria (clorofila-*a* e ficocianina). O aumento na concentração da porphyra-334 pode estar diretamente relacionado com as alegações de Sivalingam *et al.*, 1976 sendo um mecanismo de defesa desta cianobactéria, que permite a continuação da realização da fotossíntese pelas células e a sua sobrevivência em condições extremas. Esta constatação não só justifica o aumento da porphyra-334 nesta fase do crescimento como também dá um novo sentido aos resultados publicados por Sivalingam *et al.*, 1976. No entanto, apesar da concentração deste composto ter duplicado, em termos absolutos o aumento foi bastante ligeiro. Assim, serão necessários mais estudo para concluir sobre a veracidade desta função da porphyra-334. Em relação à micosporina-glicina-alanina, a sua concentração manteve-se praticamente constante em todo o cultivo.

4.4.3. Indução de MAAs

EFEITO DA COMPOSIÇÃO DA RADIAÇÃO NA INDUÇÃO DE MAAS

Testou-se o efeito da radiação UV na indução da biossíntese de MAAs na cepa *S. torques-reginae* ITEP-024. O cromatograma de íons extraído do extrato de MAAs da cepa *S. torques-reginae* ITEP-024, registrado após 3 dias de exposição a UVA + UVB, é apresentado na Figure 61.

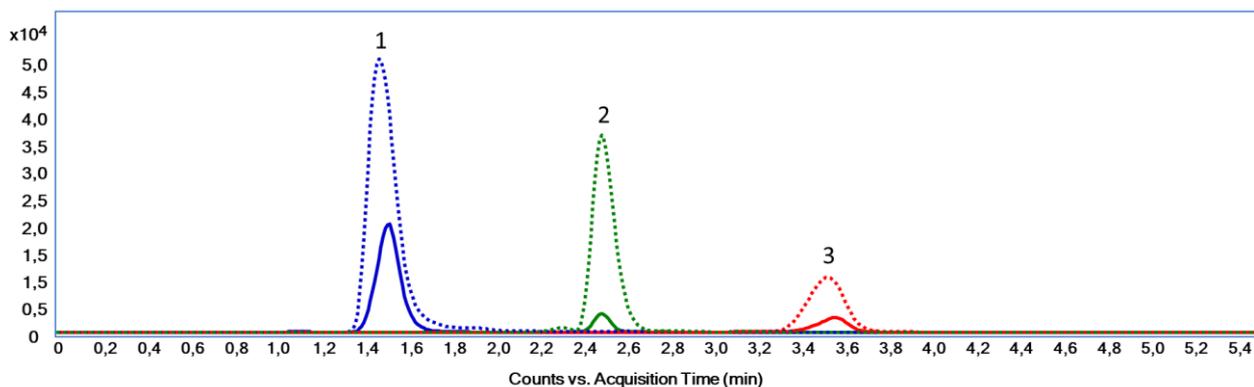


Figure 61. Cromatograma de íons extraído do extrato de MAAs da cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 antes da exposição (linha contínua) e depois da exposição (linha tracejada) à radiação UVA+UVB. 1: shinorina, 2: porphyrin-334, 3: micosporin-glycyl-L-alanine.

O cromatograma de íons extraídos após exposição a UVA + UVB durante 3 dias confirma que a radiação UV tem um papel significativo na indução de MAAs. No entanto, a cepa *S. torques reginae* ITEP-024 produz MAAs mesmo quando não é exposta à UVR (Figure 61 - linha contínua). Como referido anteriormente, este fato pode estar relacionado com uma adaptação natural desta cepa ao local de onde foi isolada que é conhecido pelo seu clima seco e pela alta intensidade da luz solar¹⁷³.

Desenvolveu-se um experimento para analisar o efeito de diferentes composições da radiação na indução da biossíntese de MAAs na cepa *S. torques reginae* ITEP-024 (Figura 62).

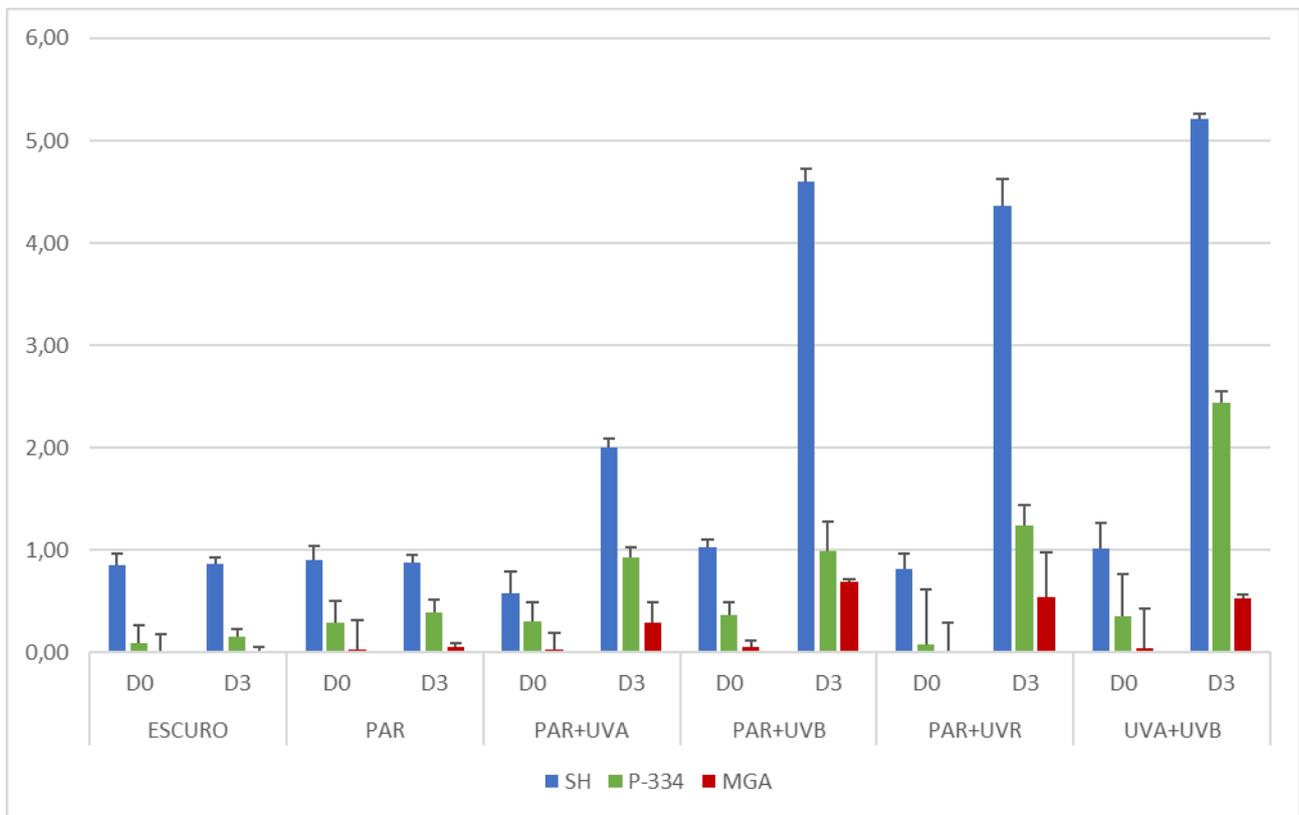


Figura 62. Concentração de MAAs (SH - shinorina, P-334 - porphyra-334 e MGA - micosporina-glicina-alanina) na cultura de *S. torques-reginae* ITEX-024 ($\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$) antes da exposição (D0) e depois da exposição (D3) a diferentes composições de radiação.

Observando a Figura 62 é possível verificar que mantendo a cultura no escuro ou exposta a radiação PAR durante 3 dias a concentração total de MAAs se mantém praticamente constante entre 1,1 e 1,3 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$. Quando a cultura é exposta a radiação PAR e UVA durante 3 dias, observa-se um aumento de todos os MAAs passando de cerca de 0,9 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$ para 3,23 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$. O mesmo se observa quando a cultura é exposta durante 3 dias a radiação PAR e UVB, no entanto, nesta situação o aumento é mais acentuado (1,4 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$ para 6,3 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$). Este resultado demonstra que a radiação UVB deverá ter uma maior influencia na produção dos MAAs do que a radiação UVA. Sinha *et al.*, 2003 relataram a presença destes MAAs em três linhagens de cianobactérias filamentosas e heterocistadas de *Nodularia* e verificaram que a radiação UVB é mais eficaz na indução de MAAs nestas cianobactérias dos que a radiação UVA e PAR ¹⁷⁸. Analisando a concentração de MAAs no experimento que combina a radiação PAR, UVA, UVB observam-se concentrações finais de MAAs idênticas às obtidas no experimento de radiação UVB e PAR. No

entanto, a concentração de MAAs no início do experimento com radiação PAR, UVA, UVB foi ligeiramente mais baixa ($0,9 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$). Assim, observa-se um aumento de aproximadamente 7 vezes a concentração total de MAAs em relação à concentração inicial. Comparando estes resultados com os obtidos no experimento que combina a radiação UVA e UVB (sem radiação PAR), observa-se que neste último experimento, apesar da concentração final de MAAs ser superior ($8,2 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{biomassa}}$), o aumento proporcional dos MAAs é menor (aproximadamente 6 vezes). Isto indica que a combinação da radiação PAR + UVA + UVB é a que gera um maior aumento na concentração total dos MAAs. No caso da shinorina, não se observam diferenças na sua concentração combinando a radiação PAR com a UVR. Assim, pensa-se que a concentração de shinorina é altamente influenciada pela radiação UVB. Por outro lado, a concentração de porphyra-334 e de micosporina-glicina-alanina é influenciada tanto pela radiação UVB como pela UVA e é bastante potenciada quando exposta em simultâneo à radiação PAR. A influência da UVA na produção de MAAs tem sido pouco explorada e deverá ser mais investigada.

4.5. PRODUÇÃO DE MAAS POR OUTROS MICROORGANISMOS (ARTIGO – ANEXO 3)

4.5.1. Indução de MAAs

Foi realizado um experimento de indução de MAAs em 29 cepas de cianobactérias disponíveis no LTPNA. O método de quantificação por LC-MS/MS validado, que se encontra descrito no capítulo 4.3, foi utilizado para rastrear MAAs nos extratos destas cepas. Na Tabela 28 são apresentadas as cepas nas quais se detetou a presença dos MAAs shinorina, porphyra-334, e/ou micosporina-glicina-alanina antes e/ou após 3 dias de indução com radiação ultravioleta.

Tabela 28 – Aminoácidos do tipo micoporinas identificados nas cepas de cianobactérias analisadas utilizando o método de quantificação de MAAs por LC-MS/MS.

Código de cepa	Nome	Dia	SH (µg/mg)	P-334 (µg/mg)	MGA (µg/mg)
CCIBt 3214	<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	D0	.	.	.
		D3	X	X	.
CCIBt 3247	Nostoc sp.	D0	.	X	.
		D3	X	4.79	X
CCIBt 3289	Calothrix sp.	D0	X	.	.
		D3	0.18	.	.
CCIBt 3292	Nostoc sp.	D0	.	.	.
		D3	X	X	.
CCIBt 3307	<i>Komarekiella atlantica</i>	D0	X	0.50	.
		D3	0.51	1.46	.
CCIBt 3320	Calothrix sp.	D0	X	X	.
		D3	X	0.31	.
CCIBt 3321	Tolypothrix sp.	D0	X	.	.
		D3	X	.	.
CCIBt 3324	<i>Leptolyngbya</i> sp.	D0	.	.	.
		D3	.	X	.
CCIBt 3343	<i>Dolichospermum</i> sp.	D0	X	.	.
		D3	0.41	.	.
CCIBt 3496	<i>Myxosarcina</i> sp.	D0	.	.	.
		D3	.	X	.
CCIBt 3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>	D0	X	.	.
		D3	X	X	.
CCIBt 3607	<i>Gloeocapsa</i> sp.	D0	.	.	.
		D3	X	X	.
CENA 543	Nostoc sp.	D0	X	.	.
		D3	X	.	.
CENA 596	<i>Nodularia spumigena</i>	D0	X	1.31	.
		D3	1.48	5.22	X
CENA 21	<i>Nostoc piscinale</i>	D0	.	.	.
		D3	.	X	.
LTPNA DBG 72	Nostoc sp.	D0	X	.	.
		D3	X	X	X
ITEP 24	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	D0	0.96	X	X
		D3	7.05	0.38	0.42
ITEP 26	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	D0	0.17	X	X
		D3	8.17	0.85	0.35

Não foram detectados shinorina, porphyra-334 ou micosporina-glicina-alanina em 11 cepas: *Microcystis aeruginosa* (CCIBt 3194), *Microcystis panniformis* (CCIBt 3180), *Rhabdoderma* sp. (CCIBt 3168), *Desertifilum tharense* (CCIBt 3265 e CCIBt75, CCIBt75) *Chlorogloeopsis* sp. (CCIBt 3313), *Nostoc* sp. (CCIBt 3329), *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3330), *Leptolyngbya* sp (CCIBt 3338 e 3626) e *Scytonema* sp. (CCIBt 3464). Embora a shinorina seja o MAA mais dominante nas cianobactérias, seguido pela porphyra-334¹⁸¹, outros MAAs podem ser produzidos por cianobactérias²⁴. Assim, no estudo realizado utilizando o método de identificação de MAAs por HPLC-DAD-HRMS, outros MAAs foram detectados em algumas destas cepas, nomeadamente nas cepas terrestres *Nostoc* sp. (CCIBt 3329), *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3330), *Leptolyngbya* sp. (CCIBt 3626) e *Scytonema* sp. (CCIBt 3464) [40].

Seis cepas de cianobactérias produziram pelo menos 1 MAA em resposta a 3 dias de exposição à UVR, sugerindo que os MAAs foram produzidos como uma resposta fotoprotetora à exposição a esta radiação, como foi demonstrado conclusivamente para outras cianobactérias anteriormente⁵⁷.

Surpreendentemente, 12 cepas produziram constitutivamente pelo menos 1 MAA (shinorine ou porphyra-334 ou micosporina-glicina-alanina) sob condições de luz ambiente, no entanto, o conteúdo de MAAs nos extratos aumentou significativamente após a exposição à UVR. As cepas nas quais os MAAs foram quantificados são apresentadas na Figura 63.

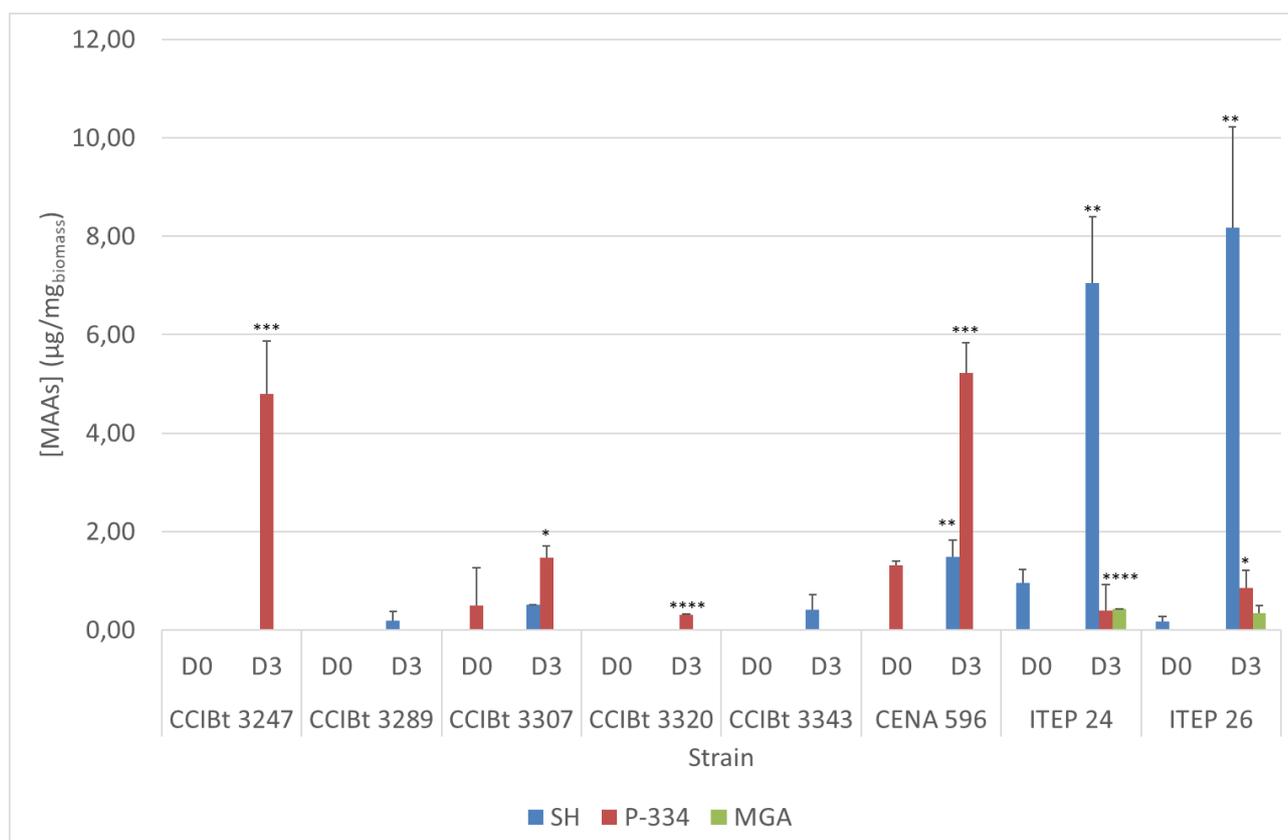


Figura 63. Distribuição da concentração de MAAs nas linhagens de cianobactérias produtoras. SH – shinorina; P-334 – porphyra-334, MGA – micosporina-glicina-alanina. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão (n=3). As diferenças significativas são reportadas de acordo com os resultados obtidos pelo método t-student por comparação entre as mesmas cepas e MAAs em diferentes dias: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001. DO - Dia 0, após inoculação; D3 - Dia 3, após 72 h de exposição a radiação PAR, UVA e UVB com fotoperíodo 12:12.

Nodularia spumigena CENA 596 produziu porphyra-334 (1,31 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) e shinorina (acima do LoD) antes da exposição à UVR. Após 72 h de indução, sua concentração aumentou significativamente para 5,22 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de porphyra-334 e 1,48 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de shinorina. Sinha *et al.*, 2003 relataram a ocorrência desses dois MAAs em uma cepa de *Nodularia spumigena* e sugeriram que sua indução pela radiação UVB pode fornecer proteção às organelas internas e outros componentes celulares sensíveis à UVR¹⁷⁸. *Komarekiella atlantica* CCIBt 3307 também produziu porphyra-334 (0,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) e shinorina (acima do LoD) em condições de luz ambiente e após exposição à UVR, sua concentração também aumentou, para 1,46 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de porphyra -334 e 0,51 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de shinorina. Por outro lado, *Dolichospermum* sp. CCIBt 3343 produziu apenas shinorina acima de LoD antes da exposição à UVR e seu conteúdo aumentou para 0,41 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ após irradiância. Um aumento

significativo na concentração de MAAs também foi observado na cepa *Nostoc* sp. (CCIBt 3247). Após 3 dias de exposição à UVR, seu conteúdo aumentou significativamente para 4,79 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. Rastogi *et al.*, 2016 relataram que a síntese de MAAs na cianobactéria *Nostoc* sp. R76DM foi altamente notável sob a radiação UVB¹⁹⁴. Os MAAs também foram constitutivos nas linhagens *Nostoc* sp. CENA 543 e LTPNA-DBG-72, mas sua concentração foi muito baixa. As cepas *Calothrix* sp. (CCIBt 3289 e CCIBt 3320) também sintetizaram MAAs acima do LoD antes da exposição à UVR e seu conteúdo aumentou levemente após indução por UVR. Hartmann *et al.*, 2015 não encontraram MAAs na cepa de *Calothrix* sp. que analisaram pelo método HILIC³¹. Além disso, no estudo de identificação de MAAs por HPLC-DAD-HRMS realizado neste trabalho, não foram encontrados shinorina e porphyra-334 em *Calothrix* sp. (CCIBt 3289). Isso sugere que o método de quantificação por LC-MS/MS usando experimentos MRM que foi desenvolvido e validado neste projeto é mais seletivo e permite detectar e quantificar MAAs mesmo em concentrações muito baixas.

Sphaerospermopsis torques-reginae ITEP-24 e ITEP-26 foram as únicas cepas que produziram os três MAAs analisados (porphyra-334, shinorina e micosporina-glicina-alanina), independentemente de as cepas terem sido expostas ou não a UVR. No entanto, após a exposição à UVR, a concentração de MAA aumentou substancialmente de 0,96 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para 7,85 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ na ITEP-024 e de 0,17 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ para 9,37 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ na ITEP-026.

Os MAAs habitualmente encontrados nas cianobactérias têm absorção máxima de UVR predominantemente no espectro UVB e a indução da biossíntese de MAA pela exposição ao UVB foi convincentemente demonstrada neste trabalho e em muitos outros estudos^{45,57,63}. Como referido no capítulo de biossíntese de MAAs, o precursor dos MAAs é o 4-desoxigadusol (4-DG), que pode ser sintetizado através da via do chiquimato e da via da pentose fosfato⁴⁷. Os genes que codificam uma desmetil-4-desoxigadusol sintase e *O*-metiltransferase, essenciais para a biossíntese de 4-DG, encontram-se habitualmente localizados dentro de um *operon* em muitas cianobactérias⁴⁸. Foi demonstrado que esse *operon* é regulado transcricionalmente por uma proteína da família LuxR sob

radiação UVB ¹⁹⁵. Uma pterina reduzida também foi proposta como fotorreceptor responsável pela indução de UVB da síntese do MAA em *Chlorogloeopsis* PCC 6912 ¹⁹⁶. No entanto, outros componentes de transdução de sinal UVB que ligam o fotorreceptor à ativação transcricional da biossíntese de MAA ainda não foram identificados. Aqui demonstramos que as cepas de *S. torques-reginae* estudadas (ITEP-024 e ITEP-026) produzem constitutivamente três MAAs bem acima do LoD dos métodos de detecção, e que as concentrações podem ser aumentadas de maneira sustentável após a indução de UVB (Figura 62 e Figura 63). Recentemente, obtivemos a sequência do genoma de *S. torques-reginae* ITEP 024. No futuro, a análise transcriptômica e proteômica dessa espécie pode fornecer informação sobre os intermediários para a sinalização pela radiação UVB.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo desenvolveram-se diversas estratégias para identificação de MAAs (via HPLC-DAD-HRMS), purificação e isolamento de MAAs (via HPLC-DAD semi-preparativo) e quantificação de MAAs (via LC-MS/MS).

Foram analisadas 75 cianobactérias por HPLC-DAD-HRMS das quais 27 cepas (38%) sintetizam MAAs. Essa triagem abrangente de cepas de cianobactérias para produção de MAAs revelou que diferentes gêneros de cianobactérias isolados de diversos biomas e ambientes são uma fonte promissora para o isolamento de MAAs. A cepa *Oscillatoria* sp. CMMA 1600 produziu a maior diversidade de MAAs, num total de 5 MAAs diferentes. Este método permitiu identificar 10 MAAs diferentes que incluíram dois MAAs glicosilados e um MAA de massa molecular 316 Da. Através dos dados espectroscópicos e de RMN 1D e 2D, confirmou-se que se tratava da micosporina-glicina-alanina. Este composto nunca foi descrito em cianobactérias tendo apenas sido isolado, em 2014, por Miyamoto a partir de um experimento de expressão de genes. Assim, esta foi a primeira vez que este composto foi descrito como produto natural. Foi desenvolvido e otimizado um método de purificação de MAAs por HPLC-DAD. Este método possibilitou o isolamento de 0,2 mg de micosporina-glicina-alanina a partir da cepa de *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024. O método HPLC-DAD-HRMS foi ainda testado em extratos de outros organismos, nomeadamente dinoflagelados, macroalgas e microalgas e demonstrou também ser aplicável em outros grupos taxonômicos. Assim, este método é uma ferramenta poderosa para identificação e triagem de diversos MAAs conhecidos e ainda não identificados em linhagens de cianobactérias e outros organismos.

Em simultâneo desenvolveu-se um método de quantificação de MAAs via LC-MS/MS. Foram realizados diversos testes para a otimização do método e posterior validação. Este método permite a identificação e quantificação dos MAAs shinorina, porphyra-334 e micosporina-glicina-alanina, e considera importantes parâmetros de validação, como especificidade, precisão, recuperação, efeito matriz e estabilidade. Definiu-se um protocolo de extração que possibilitou uma excelente recuperação dos compostos de interesse. Este protocolo consiste num processo bastante simples que

não requer a utilização de equipamentos sofisticados, além de não utilizar solventes poluentes, o que permite a sua aplicação em processos industriais. Um novo método LC-MS/MS para a quantificação de MAAs através de experimentos de MRM foi desenvolvido, fornecendo um mecanismo rápido para detectar e quantificar MAAs com base em seus pesos moleculares, tempo de retenção individual e transições de massa específicas. O método de quantificação de MAAs permitiu reduzir o tempo de análise, de 20 minutos³¹ para 6 minutos, proporcionando ainda uma economia considerável no consumo de solventes. Além disso, este método oferece um sistema fácil de usar por analistas não especialistas, interessados na identificação e quantificação de MAAs, especialmente presentes em baixas concentrações.

Usando o método de LC-MS/MS foi possível identificar MAAs em níveis acima do limite de detecção em 12 cepas de cianobactérias, mesmo em culturas cultivadas apenas com luz PAR. Os experimentos de indução de MAAs através de exposição à UVR demonstraram um aumento da concentração de MAAs nestas cepas, e outras 6 cepas de cianobactérias começaram a produzir pelo menos um MAA após a exposição à UVR. As cepas de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (ITEP-024 e ITEP-026) produziram a maior concentração de MAAs antes e após a exposição à UVR. Um nível quantitativo de expressão constitutiva de MAAs em cianobactérias nunca foi relatado anteriormente e oferece uma oportunidade futura para se estudar os mecanismos que regulam a biossíntese de MAA induzida por UVR. Foram realizadas análises genômica e filogenética da cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 tendo-se confirmado a presença dos *clusters* que codificam os genes responsáveis pela síntese de MAAs. A cepa *S. torques-reginae* ITEP-024 foi ainda exposta a diferentes composições da radiação, tendo-se observado que a radiação UVB é que mais influencia na produção de MAAs.

Assim, este estudo permitiu o desenvolvimento de ferramentas rápidas e de fácil execução para a identificação, purificação e quantificação de MAAs que permitem caracterizar cianobactérias e outros organismos quanto à sua composição em relação a estas substâncias fotoprotetoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Neale, P. J. Spectral Weighting Functions for Quantifying Effects of UV Radiation in Marine Ecosystems. *Eff. UV Radiat. Mar. Environ.* **2000**, *10*, 72.
- (2) Chrapusta, E.; Kaminski, A.; Duchnik, K.; Bober, B.; Adamski, M.; Bialczyk, J. Mycosporine-like Amino Acids: Potential Health and Beauty Ingredients. *Mar. Drugs* **2017**, *15* (10), 326.
- (3) MHz'sas. MODIS ATM solar irradiance https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MODIS_ATM_solar_irradiance.svg (accessed Jul 30, 2019).
- (4) Kerr, J. B.; McElroy, C. T. Evidence for Large Upward Trends of Ultraviolet-B Radiation Linked to Ozone Depletion. *Science* (80-.). **1993**, *262* (5136), 1032–1034.
- (5) Lubin, D.; Jensen, E. H. Effects of Clouds and Stratospheric Ozone Depletion on Ultraviolet Radiation Trends. *Nature* **1995**, *377* (6551), 710.
- (6) Tabazadeh, A.; Santee, M. L.; Danilin, M. Y.; Pumphrey, H. C.; Newman, P. A.; Hamill, P. J.; Mergenthaler, J. L. Quantifying Denitrification and Its Effect on Ozone Recovery. *Science* (80-.). **2000**, *288* (5470), 1407–1411.
- (7) Andrady, A. L.; Aucamp, P. J.; Austin, A. T.; Bais, A. F.; Ballare, C. L.; Barnes, P. W.; Bernhard, G. H.; Bornman, J. F.; Caldwell, M. M.; de Gruijl, F. R. Environmental Effects of Ozone Depletion and Its Interactions with Climate Change: 2014 Assessment Executive Summary. **2015**.
- (8) Worrest, R. C.; Häder, D. Overview of the Effects of Increased Solar UV on Aquatic Microorganisms. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65* (2), 257–259.
- (9) Stanier, R. Y.; Cohen-Bazire, G. Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **1977**, *31* (1), 225–274.
- (10) Tomitani, A.; Knoll, A. H.; Cavanaugh, C. M.; Ohno, T. The Evolutionary Diversification of Cyanobacteria: Molecular–Phylogenetic and Paleontological Perspectives. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. **2006**, *103* (14), 5442–5447.

- (11) Fischer, W. W. Biogeochemistry: Life before the Rise of Oxygen. *Nature* **2008**, *455* (7216), 1051.
- (12) Rastogi, R. P.; Sinha, R. P.; Moh, S. H.; Lee, T. K.; Kottuparambil, S.; Kim, Y.-J.; Rhee, J.-S.; Choi, E.-M.; Brown, M. T.; Häder, D.-P.; et al. Ultraviolet Radiation and Cyanobacteria. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2014**, *141*, 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.020>.
- (13) He, Y.-Y.; Häder, D.-P. Reactive Oxygen Species and UV-B: Effect on Cyanobacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1* (10), 729–736. <https://doi.org/10.1039/B110365M>.
- (14) Sinha, R. P.; Häder, D.-P. UV-Protectants in Cyanobacteria. *Plant Sci.* **2008**, *174* (3), 278–289.
- (15) Shick, J. M.; Dunlap, W. C. Mycosporine-Like Amino Acids and Related Gadusols: Biosynthesis, Accumulation, and UV-Protective Functions in Aquatic Organisms. *Annu. Rev. Physiol.* **2002**, *64* (1), 223–262. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.155802>.
- (16) Dunlap, W. C.; Shick, J. M. Ultraviolet Radiation-absorbing Mycosporine-like Amino Acids in Coral Reef Organisms: A Biochemical and Environmental Perspective. *J. Phycol.* **1998**, *34* (3), 418–430.
- (17) de la Coba, F.; Aguilera, J.; Figueroa, F. L.; de Gálvez, M. V.; Herrera-Ceballos, E. Antioxidant Activity of Mycosporine-like Amino Acids Isolated from Three Red Macroalgae and One Marine Lichen. *J. Appl. Phycol.* **2009**, *21* (2), 161–169.
- (18) Carreto, J. I.; Carignan, M. O. Mycosporine-like Amino Acids: Relevant Secondary Metabolites. Chemical and Ecological Aspects. *Mar. Drugs* **2011**, *9* (3), 387–446.
- (19) Carignan, M. O.; Cardozo, K. H. M.; Oliveira-Silva, D.; Colepicolo, P.; Carreto, J. I. Palythine–Threonine, a Major Novel Mycosporine-like Amino Acid (MAA) Isolated from the Hermatypic Coral *Pocillopora Capitata*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2009**, *94* (3), 191–200.
- (20) Won, J. J. W.; Chalker, B. E.; Rideout, J. A. Two New UV-Absorbing Compounds from

- Stylophora Pistillata: Sulfate Esters of Mycosporine-like Amino Acids. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (14), 2525–2526.
- (21) Ishihara, K.; Watanabe, R.; Uchida, H.; Suzuki, T.; Yamashita, M.; Takenaka, H.; Nazifi, E.; Matsugo, S.; Yamaba, M.; Sakamoto, T. Novel Glycosylated Mycosporine-like Amino Acid, 13-O-(β -Galactosyl)-Porphyra-334, from the Edible Cyanobacterium Nostoc Sphaericum- Protective Activity on Human Keratinocytes from UV Light. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2017**, 172, 102–108.
- (22) Carreto, J. I.; Carignan, M. O.; Daleo, G.; Marco, S. G. De. Occurrence of Mycosporine-like Amino Acids in the Red-Tide Dinoflagellate Alexandrium Excavatum: UV-Photoprotective Compounds? *J. Plankton Res.* **1990**, 12 (5), 909–921.
- (23) Hannach, G.; Sigleo, A. C. Photoinduction of UV-Absorbing Compounds in Six Species of Marine Phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1998**, 174, 207–222.
- (24) Lawrence, K. P.; Long, P. F.; Young, A. R. Mycosporine-Like Amino Acids for Skin Photoprotection. *Curr. Med. Chem.* **2017**, 25 (40), 5512–5527. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170529124237>.
- (25) Sinha, R. P.; Singh, S. P.; Häder, D.-P. Database on Mycosporines and Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) in Fungi, Cyanobacteria, Macroalgae, Phytoplankton and Animals. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2007**, 89 (1), 29–35.
- (26) Nazifi, E.; Wada, N.; Yamaba, M.; Asano, T.; Nishiuchi, T.; Matsugo, S.; Sakamoto, T. Glycosylated Porphyra-334 and Palythine-Threonine from the Terrestrial Cyanobacterium Nostoc Commune. *Mar. Drugs* **2013**, 11 (9), 3124–3154.
- (27) Shukla, V.; Kumari, R.; Patel, D. K.; Upreti, D. K. Characterization of the Diversity of Mycosporine-like Amino Acids in Lichens from High Altitude Region of Himalaya. *Amino Acids* **2016**, 48 (1), 129–136.
- (28) Stochaj, W. R.; Dunlap, W. C.; Shick, J. M. Two New UV-Absorbing Mycosporine-like Amino Acids from the Sea Anemone Anthopleura Elegantissima and the Effects of Zooxanthellae and Spectral Irradiance on Chemical Composition and Content. *Mar. Biol.*

1994, 118 (1), 149–156.

- (29) Singh, S. P.; Kumari, S.; Rastogi, R. P.; Singh, K. L.; Sinha, R. P. Mycosporine-like Amino Acids (MAAs): Chemical Structure, Biosynthesis and Significance as UV-Absorbing/Screening Compounds. *Indian J. Exp. Biol.* **2008**, 46 (1), 7–17.
- (30) Katoch, M.; Mazmouz, R.; Chau, R.; Pearson, L. A.; Pickford, R.; Neilan, B. A. Heterologous Production of Cyanobacterial Mycosporine-like Amino Acids Mycosporine-Ornithine and Mycosporine-Lysine in Escherichia Coli. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, 82 (20), 6167–6173.
- (31) Hartmann, A.; Becker, K.; Karsten, U.; Remias, D.; Ganzera, M. Analysis of Mycosporine-like Amino Acids in Selected Algae and Cyanobacteria by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and a Novel MAA from the Red Alga *Catenella Repens*. *Mar. Drugs* **2015**, 13 (10), 6291–6305.
- (32) Cardozo, K. H. M.; Marques, L. G.; Carvalho, V. M.; Carignan, M. O.; Pinto, E.; Marinho-Soriano, E.; Colepicolo, P. Analyses of Photoprotective Compounds in Red Algae from the Brazilian Coast. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, 21 (2), 202–208.
- (33) Teai, T. T.; Raharivelomanana, P.; Bianchini, J.-P.; Faure, R.; Martin, P. M. V; Cambon, A. Structure de Deux Nouvelles Iminomycosporines Isolées de *Pocillopora Eydouxi*. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (33), 5799–5800.
- (34) Won, J. J. W.; Rideout, J. A.; Chalker, B. E. Isolation and Structure of a Novel Mycosporine-like Amino Acid from the Reef-Building Corals *Pocillopora Damicornis* and *Stylophora Pistillata*. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (29), 5255–5256.
- (35) Whitehead, K.; Karentz, D.; Hedges, J. Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) in Phytoplankton, a Herbivorous Pteropod (*Limacinahelicina*), and Its Pteropod Predator (*Clioneantarctica*) in McMurdo Bay, Antarctica. *Mar. Biol.* **2001**, 139 (5), 1013–1019.
- (36) Kamio, M.; Kicklighter, C. E.; Nguyen, L.; Germann, M. W.; Derby, C. D. Isolation and Structural Elucidation of Novel Mycosporine-like Amino Acids as Alarm Cues in the Defensive Ink Secretion of the Sea Hare *Aplysia Californica*. *Helv. Chim. Acta* **2011**, 94 (6), 1012–1018.

- (37) Miyamoto, K. T.; Komatsu, M.; Ikeda, H. Discovery of Gene Cluster for Mycosporine-like Amino Acid Biosynthesis from Actinomycetales Microorganisms and Production of a Novel Mycosporine-like Amino Acid by Heterologous Expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80* (16), 5028–5036.
- (38) Volkmann, M.; Gorbushina, A. A.; Kedar, L.; Oren, A. Structure of Euhalothece-362, a Novel Red-Shifted Mycosporine-like Amino Acid, from a Halophilic Cyanobacterium (Euhalothece Sp.). *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *258* (1), 50–54.
- (39) Whitehead, K.; Hedges, J. I. Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric and Electron Impact Mass Spectrometric Characterization of Mycosporine-like Amino Acids. *Rapid Commun. mass Spectrom.* **2003**, *17* (18), 2133–2138.
- (40) Sekikawa, I. Isolation and Structure of a 357 Nm UV-Absorbing Substance, Usujirene, from the Red Alga *Palmaria Palmata* (L.) O. Kuntze. *Jpn. J. Phycol.* **1986**, *34*, 185–188.
- (41) Cardozo, K. H. M. Estudos de Compostos Fotoprotetores Da Radiação Ultravioleta Em Algas: Aminoácidos Tipo Micosporinas (MAAs), Universidade de São Paulo, 2007.
- (42) Rastogi, R. P.; Sinha, R. P.; Singh, S. P.; Häder, D.-P. Photoprotective Compounds from Marine Organisms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *37* (6), 537–558.
- (43) Portwich, A.; Garcia-Pichel, F. Biosynthetic Pathway of Mycosporines (Mycosporine-like Amino Acids) in the Cyanobacterium *Chlorogloeopsis* Sp. Strain PCC 6912. *Phycologia* **2003**, *42* (4), 384–392.
- (44) Shick, J. M.; Romaine-Lioud, S.; Romaine-Lioud, S.; Ferrier-Pagès, C.; Gattuso, J.-P. Ultraviolet-B Radiation Stimulates Shikimate Pathway-dependent Accumulation of Mycosporine-like Amino Acids in the Coral *Stylophora Pistillata* despite Decreases in Its Population of Symbiotic Dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* **1999**, *44* (7), 1667–1682.
- (45) Sinha, R. P.; Ambasht, N. K.; Sinha, J. P.; Häder, D.-P. Wavelength-Dependent Induction of a Mycosporine-like Amino Acid in a Rice-Field Cyanobacterium, *Nostoc Commune*: Role of Inhibitors and Salt Stress. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2* (2), 171–176.
- (46) Balskus, E. P.; Walsh, C. T. The Genetic and Molecular Basis for Sunscreen Biosynthesis in

Cyanobacteria. *Science* (80-.). **2010**, 329 (5999), 1653–1656.

- (47) Pope, M. A.; Spence, E.; Seralvo, V.; Gacesa, R.; Heidelberger, S.; Weston, A. J.; Dunlap, W. C.; Shick, J. M.; Long, P. F. O-Methyltransferase Is Shared between the Pentose Phosphate and Shikimate Pathways and Is Essential for Mycosporine-Like Amino Acid Biosynthesis in *Anabaena Variabilis* ATCC 29413. *ChemBioChem* **2015**, 16 (2), 320–327.
- (48) Spence, E.; Dunlap, W. C.; Shick, J. M.; Long, P. F. Redundant Pathways of Sunscreen Biosynthesis in a Cyanobacterium. *ChemBioChem* **2012**, 13 (4), 531–533.
- (49) Singh, S. P.; Klisch, M.; Sinha, R. P.; Häder, D.-P. Genome Mining of Mycosporine-like Amino Acid (MAA) Synthesizing and Non-Synthesizing Cyanobacteria: A Bioinformatics Study. *Genomics* **2010**, 95 (2), 120–128.
- (50) Cockell, C. S.; Knowland, J. Ultraviolet Radiation Screening Compounds. *Biol. Rev.* **1999**, 74 (3), 311–345.
- (51) Hu, C.; Völler, G.; Süßmuth, R.; Dittmann, E.; Kehr, J. Functional Assessment of Mycosporine-like Amino Acids in *Microcystis Aeruginosa* Strain PCC 7806. *Environ. Microbiol.* **2015**, 17 (5), 1548–1559.
- (52) D’Agostino, P. M.; Javalkote, V. S.; Mazmouz, R.; Pickford, R.; Puranik, P. R.; Neilan, B. A. Comparative Profiling and Discovery of Novel Glycosylated Mycosporine-like Amino Acids in Two Strains of the Cyanobacterium *Scytonema Cf. Crispum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, 82 (19), 5951–5959.
- (53) Rastogi, R. P.; Incharoensakdi, A. UV Radiation-Induced Biosynthesis, Stability and Antioxidant Activity of Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) in a Unicellular Cyanobacterium *Gloeocapsa Sp. CU2556*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2014**, 130, 287–292.
- (54) Karsten, U.; Franklin, L. A.; Lüning, K.; Wiencke, C. Natural Ultraviolet Radiation and Photosynthetically Active Radiation Induce Formation of Mycosporine-like Amino Acids in the Marine Macroalga *Chondrus Crispus* (Rhodophyta). *Planta* **1998**, 205 (2), 257–262.
- (55) Klisch, M.; Häder, D.-P. Mycosporine-like Amino Acids in the Marine Dinoflagellate

- Gyrodinium Dorsum: Induction by Ultraviolet Irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2000**, *55* (2–3), 178–182.
- (56) Sinha, R. P.; Klisch, M.; Gröniger, A.; Häder, D.-P. Mycosporine-like Amino Acids in the Marine Red Alga *Gracilaria Cornea*—Effects of UV and Heat. *Environ. Exp. Bot.* **2000**, *43* (1), 33–43.
- (57) Sinha, R. P.; Klisch, M.; Helbling, E. W.; Häder, D.-P. Induction of Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) in Cyanobacteria by Solar Ultraviolet-B Radiation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2001**, *60* (2–3), 129–135.
- (58) Rastogi, R. P.; Incharoensakdi, A. Occurrence and Induction of a Ultraviolet-absorbing Substance in the Cyanobacterium *Fischerella Muscicola* TISTR8215. *Phycol. Res.* **2015**, *63* (1), 51–55.
- (59) Khanipour Roshan, S.; Farhangi, M.; Emtiazjoo, M.; Rabbani, M. Effects of Solar Radiation on Pigmentation and Induction of a Mycosporine-like Amino Acid in Two Cyanobacteria, *Anabaena* Sp. and *Nostoc* Sp. ISC26. *Eur. J. Phycol.* **2015**, *50* (2), 173–181.
- (60) Rahman, M. A.; Kannaujiya, V. K.; Rajneesh, A.; Dixit, K.; Sinha, R. P.; Sundaram, S.; Sundaram, S. Impacts of Ultraviolet-B and Photo Synthetically Active Radiation on *Anabaena Cylindrica* and *Synechocystis* PCC 6803: A Comparative Study.
- (61) Singh, S. P.; Klisch, M.; Sinha, R. P.; Häder, D.-P. Effects of Abiotic Stressors on Synthesis of the Mycosporine-like Amino Acid Shinorine in the Cyanobacterium *Anabaena Variabilis* PCC 7937. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84* (6), 1500–1505.
- (62) Ha, S.-Y.; Lee, Y.; Kim, M.-S.; Kumar, K. S.; Shin, K.-H. Seasonal Changes in Mycosporine-Like Amino Acid Production Rate with Respect to Natural Phytoplankton Species Composition. *Mar. Drugs* **2015**, *13* (11), 6740–6758.
- (63) Portwich, A.; Garcia-Pichel, F. Ultraviolet and Osmotic Stresses Induce and Regulate the Synthesis of Mycosporines in the Cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Arch. Microbiol.* **1999**, *172* (4), 187–192.
- (64) Litchman, E.; Neale, P. J.; Banaszak, A. T. Increased Sensitivity to Ultraviolet Radiation in

- Nitrogen-limited Dinoflagellates: Photoprotection and Repair. *Limnol. Oceanogr.* **2002**, *47* (1), 86–94.
- (65) Korbee, N.; Huovinen, P.; Figueroa, F. L.; Aguilera, J.; Karsten, U. Availability of Ammonium Influences Photosynthesis and the Accumulation of Mycosporine-like Amino Acids in Two *Porphyra* Species (Bangiales, Rhodophyta). *Mar. Biol.* **2005**, *146* (4), 645–654.
- (66) Saadatmand, S.; Zamani, M. Investigating the Effect of Different Concentrations of Nitrate and Phosphate on the Quantity of Mycosporine like Amino Acids Production and Growth in *Spirulina Platensis*. *Int. J. Biosci.* **2015**, *6* (5), 63–69.
- (67) Singh, S. P.; Ha, S.; Sinha, R. P.; Häder, D.-P. Photoheterotrophic Growth Unprecedentedly Increases the Biosynthesis of Mycosporine-like Amino Acid Shinorine in the Cyanobacterium *Anabaena* Sp., Isolated from Hot Springs of Rajgir (India). *Acta Physiol. Plant.* **2014**, *36* (2), 389–397.
- (68) McClintock, J. B.; Karentz, D. Mycosporine-like Amino Acids in 38 Species of Subtidal Marine Organisms from McMurdo Sound, Antarctica. *Antarct. Sci.* **1997**, *9* (4), 392–398.
- (69) Shibata, K. Pigments and a UV-Absorbing Substance in Corals and a Blue-Green Alga Living in the Great Barrier Reef. *Plant Cell Physiol.* **1969**, *10* (2), 325–335.
- (70) Chollet-Krugler, M.; Nguyen, T. T. T.; Sauvager, A.; Thüs, H.; Boustie, J. Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in Time-Series of Lichen Specimens from Natural History Collections. *Molecules* **2019**, *24* (6), 1070.
- (71) Gröniger, A.; Sinha, R. P.; Klisch, M.; Häder, D.-P. Photoprotective Compounds in Cyanobacteria, Phytoplankton and Macroalgae—a Database. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2000**, *58* (2–3), 115–122.
- (72) Newman, S. J.; Dunlap, W. C.; Nicol, S.; Ritz, D. Antarctic Krill (*Euphausia Superba*) Acquire a UV-Absorbing Mycosporine-like Amino Acid from Dietary Algae. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **2000**, *255* (1), 93–110.
- (73) Osborn, A. R.; Almabruk, K. H.; Holzwarth, G.; Asamizu, S.; LaDu, J.; Kean, K. M.; Karplus, P. A.; Tanguay, R. L.; Bakalinsky, A. T.; Mahmud, T. De Novo Synthesis of a Sunscreen

Compound in Vertebrates. *Elife* **2015**, *4*, e05919.

- (74) Przeslawski, R.; Benkendorff, K.; Davis, A. R. A Quantitative Survey of Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) in Intertidal Egg Masses from Temperate Rocky Shores. *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31* (10), 2417–2438.
- (75) Carreto, J. I.; Carignan, M. O.; Montoya, N. G. A High-Resolution Reverse-Phase Liquid Chromatography Method for the Analysis of Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) in Marine Organisms. *Mar. Biol.* **2005**, *146* (2), 237–252.
- (76) Rastogi, R. P.; Sinha, R. P. Biotechnological and Industrial Significance of Cyanobacterial Secondary Metabolites. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27* (4), 521–539.
- (77) Richa, R. R. P.; Kumari, S.; Singh, K. L.; Kannaujiya, V. K.; Singh, G.; Kesheri, M.; Sinha, R. P. Biotechnological Potential of Mycosporine-like Amino Acids and Phycobiliproteins of Cyanobacterial Origin. *Biotechnol Bioinform Bioeng* **2011**, *1*, 159–171.
- (78) Conde, F. R.; Churio, M. S.; Previtali, C. M. The Photoprotector Mechanism of Mycosporine-like Amino Acids. Excited-State Properties and Photostability of Porphyrin-334 in Aqueous Solution. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2000**, *56* (2–3), 139–144.
- (79) Scherer, S.; Chen, T. W.; Böger, P. A New UV-A/B Protecting Pigment in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc Commune*. *Plant Physiol.* **1988**, *88* (4), 1055–1057.
- (80) de la Coba, F.; Aguilera, J.; Korbee, N.; de Gálvez, M. V.; Herrera-Ceballos, E.; Álvarez-Gómez, F.; Figueroa, F. L. UVA and UVB Photoprotective Capabilities of Topical Formulations Containing Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) through Different Biological Effective Protection Factors (BEPFs). *Mar. Drugs* **2019**, *17* (1), 55.
- (81) Lawrence, K. P.; Gacesa, R.; Long, P. F.; Young, A. R. Molecular Photoprotection of Human Keratinocytes in Vitro by the Naturally Occurring Mycosporine-like Amino Acid Palythine. *Br. J. Dermatol.* **2018**, *178* (6), 1353–1363.
- (82) Whitehead, K.; Hedges, J. I. Photodegradation and Photosensitization of Mycosporine-like Amino Acids. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2005**, *80* (2), 115–121.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.03.008>.

- (83) Oren, A.; Gunde-Cimerman, N. Mycosporines and Mycosporine-like Amino Acids: UV Protectants or Multipurpose Secondary Metabolites? *FEMS Microbiology Letters*. 2007, pp 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00650.x>.
- (84) Dunlap, W. C.; Yamamoto, Y. Small-Molecule Antioxidants in Marine Organisms: Antioxidant Activity of Mycosporine-Glycine. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *112* (1), 105–114.
- (85) Yakovleva, I.; Bhagooli, R.; Takemura, A.; Hidaka, M. Differential Susceptibility to Oxidative Stress of Two Scleractinian Corals: Antioxidant Functioning of Mycosporine-Glycine. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *139* (4), 721–730.
- (86) Wada, N.; Sakamoto, T.; Matsugo, S. Multiple Roles of Photosynthetic and Sunscreen Pigments in Cyanobacteria Focusing on the Oxidative Stress. *Metabolites* **2013**, *3* (2), 463–483.
- (87) Singh, S. P.; Häder, D.-P.; Sinha, R. P. Cyanobacteria and Ultraviolet Radiation (UVR) Stress: Mitigation Strategies. *Ageing Res. Rev.* **2010**, *9* (2), 79–90.
- (88) Cardozo, K. H. M.; Guaratini, T.; Barros, M. P.; Falcão, V. R.; Tonon, A. P.; Lopes, N. P.; Campos, S.; Torres, M. A.; Souza, A. O.; Colepicolo, P. Metabolites from Algae with Economical Impact. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146* (1–2), 60–78.
- (89) Kicklighter, C. E.; Kamio, M.; Nguyen, L.; Germann, M. W.; Derby, C. D. Mycosporine-like Amino Acids Are Multifunctional Molecules in Sea Hares and Their Marine Community. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (28), 11494–11499.
- (90) D’Orazio, J.; Jarrett, S.; Amaro-Ortiz, A.; Scott, T. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (6), 12222–12248.
- (91) Young, A. R. Acute Effects of UVR on Human Eyes and Skin. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2006**, *92* (1), 80–85.
- (92) Matsumura, Y.; Ananthaswamy, H. N. Short-Term and Long-Term Cellular and Molecular Events Following UV Irradiation of Skin: Implications for Molecular Medicine. *Expert Rev.*

Mol. Med. **2002**, 4 (26), 1–22.

- (93) Armstrong, B. K.; Krickler, A. The Epidemiology of UV Induced Skin Cancer. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2001**, 63 (1–3), 8–18.
- (94) Maier, T.; Korting, H. C. Sunscreens—Which and What For? *Skin Pharmacol. Physiol.* **2005**, 18 (6), 253–262.
- (95) Bonifacio, F. Vendas de Protetores Solares Devem Crescer 14% Em 2015. *Brazil Beauty News*. March 2015.
- (96) ABIHPEC. *Panorama Do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos*; 2018.
- (97) Diffey, B. L.; Tanner, P. R.; Matts, P. J.; Nash, J. F. In Vitro Assessment of the Broad-Spectrum Ultraviolet Protection of Sunscreen Products. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2000**, 43 (6), 1024–1035.
- (98) Ruzskiewicz, J. A.; Pinkas, A.; Ferrer, B.; Peres, T. V.; Tsatsakis, A.; Aschner, M. Neurotoxic Effect of Active Ingredients in Sunscreen Products, a Contemporary Review. *Toxicol. Reports* **2017**, 4, 245–259.
- (99) Krause, M.; Klit, A.; Blomberg Jensen, M.; Søbørg, T.; Frederiksen, H.; Schlumpf, M.; Lichtensteiger, W.; Skakkebaek, N. E.; Drzewiecki, K. T. Sunscreens: Are They Beneficial for Health? An Overview of Endocrine Disrupting Properties of UV-filters. *Int. J. Androl.* **2012**, 35 (3), 424–436.
- (100) Schlumpf, M.; Schmid, P.; Durrer, S.; Conscience, M.; Maerkel, K.; Henseler, M.; Gruetter, M.; Herzog, I.; Reolon, S.; Ceccatelli, R. Endocrine Activity and Developmental Toxicity of Cosmetic UV Filters—an Update. *Toxicology* **2004**, 205 (1–2), 113–122.
- (101) Balogh, T. S.; Velasco, M. V. R.; Pedriali, C. A.; Kaneko, T. M.; Baby, A. R. Ultraviolet Radiation Protection: Current Available Resources in Photoprotection. *An. Bras. Dermatol.* **2011**, 86 (4), 732–742.
- (102) Galamgam, J.; Linou, N.; Linos, E. Sunscreens, Cancer, and Protecting Our Planet. *Lancet Planet. Heal.* **2018**, 2 (11), e465–e466.
- (103) Hawaii Senate. Sale and Distribution of Sunscreen Containing Oxybenzone or Octinoxate, or

Both; Prohibition - Hawaii Senate Bill 2571. LegiScan - Bringing people to the process 2018.

- (104) Corinaldesi, C.; Marcellini, F.; Nepote, E.; Damiani, E.; Danovaro, R. Impact of Inorganic UV Filters Contained in Sunscreen Products on Tropical Stony Corals (*Acropora* Spp.). *Sci. Total Environ.* **2018**, *637*, 1279–1285.
- (105) ABIHPEC. Caderno de Tendências 2019-2020. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos 2018.
- (106) Zhang, L.; Li, L.; Wu, Q. Protective Effects of Mycosporine-like Amino Acids of *Synechocystis* Sp. PCC 6803 and Their Partial Characterization. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2007**, *86* (3), 240–245.
- (107) Oyamada, C.; Kaneniwa, M.; Ebitani, K.; Murata, M.; Ishihara, K. Mycosporine-like Amino Acids Extracted from Scallop (*Patinopecten Yessoensis*) Ovaries: UV Protection and Growth Stimulation Activities on Human Cells. *Mar. Biotechnol.* **2008**, *10* (2), 141–150.
- (108) Schmid, D.; Schürch, C.; Züllli, F. UV-A Sunscreen from Red Algae for Protection against Premature Skin Aging. *Cosmet. Toilet. Manufact. Worldw* **2004**, *129*, 139–143.
- (109) Hartmann, A.; Gostner, J.; Fuchs, J. E.; Chaita, E.; Aligiannis, N.; Skaltsounis, L.; Ganzera, M. Inhibition of Collagenase by Mycosporine-like Amino Acids from Marine Sources. *Planta Med.* **2015**, *81* (10), 813–820.
- (110) de Nys, R.; Steinberg, P. D. Linking Marine Biology and Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13* (3), 244–248.
- (111) Rastogi, R. P.; Kumari, S.; Han, T.; Sinha, R. P. Molecular Characterization of Hot Spring Cyanobacteria and Evaluation of Their Photoprotective Compounds. *Can. J. Microbiol.* **2012**, *58* (6), 719–727.
- (112) Ryu, J.; Park, S.-J.; Kim, I.-H.; Choi, Y. H.; Nam, T.-J. Protective Effect of *Porphyra*-334 on UVA-Induced Photoaging in Human Skin Fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* **2014**, *34* (3), 796–803.
- (113) ANVISA. *Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 69*; 2016.
- (114) Colabella, F.; Moline, M.; Libkind, D. UV Sunscreens of Microbial Origin: Mycosporines and

- Mycosporine- like Aminoacids. *Recent Pat. Biotechnol.* **2015**, 8 (3), 179–193.
<https://doi.org/10.2174/1872208309666150102104520>.
- (115) Schmid, D.; Schürch, C.; Zülili, F. D. Cosmetic Skin Care Products and Cosmetic Agents for Protecting Skin against Premature Aging. Europe Patent N° EP1473028, 2004.
- (116) Gerald, A.; Pellegrini, M.; Pellegrini, L. Algal Extracts Containing Amino Acid Analogs Of Mycosporin Are Useful As Dermatological Protecting Agents Against Ultraviolet Radiation. France Patente N° FR 2803201 A1, 2001.
- (117) Dunlap, W. C.; Chalker, B. E.; Bandaranayake, W. M.; Wu Won, J. J. Nature's Sunscreen from the Great Barrier Reef, Australia. *Int. J. Cosmet. Sci.* **1998**, 20 (1), 41–51.
- (118) Andreguetti, D.; Stein, E. M.; Pereira, C. M. P.; Pinto, E.; Colepicolo, P. Antioxidant Properties and UV Absorbance Pattern of Mycosporine-Like Amino Acids Analogs Synthesized in an Environmentally Friendly Manner. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2013**, 27 (6), 305–312.
- (119) Bird, G.; Fitzmaurice, N.; Dunlap, W. C.; Chalker, B E Bandaranayake, W. M. Sunscreen Compositions and Compounds for Use Therein. International patent application PCT/AU87/00330, publication no. WO 88/02251. Australian patent 595075., 1987.
- (120) Chalmers, P. J.; Fitzmaurice, N.; Rigg, D. J.; Thang, S. H.; Bird, G. UV-Absorbing Compounds and Compositions. International patent application PCT/AU90/00078, publication no. WO90/09995. Australian patent 653495., 1990.
- (121) Nakamura, H.; Kobayashi, J.; Hirata, Y. Separation of Mycosporine-like Amino Acids in Marine Organisms Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1982**, 250, 113–118.
- (122) Jeffrey, S. W.; MacTavish, H. S.; Dunlap, W. C.; Vesk, M.; Groenewoud, K. Occurrence of UVA-and UVB-Absorbing Compounds in 152 Species (206 Strains) of Marine Microalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1999**, 189, 35–51.
- (123) Callone, A. I.; Carignan, M. O.; Montoya, N. G.; Carreto, J. I. Biotransformation of Mycosporine like Amino Acids (MAAs) in the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium Tamarense*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, 84 (3), 204–212.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.03.001>.

- (124) Dunlap, W. C.; Chalker, B. E. Identification and Quantitation of Near-UV Absorbing Compounds (S-320) in a Hermatypic Scleractinian. *Coral Reefs* **1986**, *5* (3), 155–159.
- (125) Whitehead, K.; Hedges, J. I. Analysis of Mycosporine-like Amino Acids in Plankton by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Mar. Chem.* **2002**, *80* (1), 27–39.
- (126) Kaiser, C. R. RMN 2D: Detecção Inversa e Gradiente de Campo Na Determinação Estrutural de Compostos Orgânicos. *Quim. Nova* **2000**, *23* (2), 231–236.
- (127) Ross, B.; Tran, T.; Bhattacharya, P.; Martin Watterson, D.; Sailasuta, N. Application of NMR Spectroscopy in Medicinal Chemistry and Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11* (1), 93–114.
- (128) Sakamoto, T.; Hashimoto, A.; Yamaba, M.; Wada, N.; Yoshida, T.; Inoue-Sakamoto, K.; Nishiuchi, T.; Matsugo, S. Four Chemotypes of the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc Commune* Characterized by Differences in the Mycosporine-like Amino Acids. *Phycol. Res.* **2019**, *67* (1), 3–11.
- (129) Anderson, L.; Hunter, C. L. Quantitative Mass Spectrometric Multiple Reaction Monitoring Assays for Major Plasma Proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5* (4), 573–588.
- (130) Cardozo, K. H. M.; Vessecchi, R.; Carvalho, V. M.; Pinto, E.; Gates, P. J.; Colepicolo, P.; Galembeck, S. E.; Lopes, N. P. A Theoretical and Mass Spectrometry Study of the Fragmentation of Mycosporine-like Amino Acids. *Int. J. Mass Spectrom.* **2008**, *273* (1–2), 11–19.
- (131) Cardozo, K. H. M.; Vessecchi, R.; Galembeck, S. E.; Guaratini, T.; Gates, P. J.; Pinto, E.; Lopes, N. P.; Colepicolo, P. A Fragmentation Study of Di-Acidic Mycosporine-like Amino Acids in Electrospray and Nanospray Mass Spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20* (9), 1625–1631.
- (132) European Commission. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and Feed.*

SANTE/11813/2017; 2017.

- (133) Cardozo, K. H. M.; Carvalho, V. M.; Pinto, E.; Colepicolo, P. Fragmentation of Mycosporine-like Amino Acids by Hydrogen/Deuterium Exchange and Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. An Int. J. Devoted to Rapid Dissem. Up-to-the-Minute Res. Mass Spectrom.* **2006**, *20* (2), 253–258.
- (134) ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). In *International conference on harmonization, Geneva, Switzerland*; 2005.
- (135) European Commission. *Commission Decision of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results*; 2002.
- (136) ANVISA. *Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 899. Guia Para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*; 2003.
- (137) ANVISA. *Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166*; 2017.
- (138) Chandran, S.; Singh, R. S. P. Comparison of Various International Guidelines for Analytical Method Validation. *Die Pharm. Int. J. Pharm. Sci.* **2007**, *62* (1), 4–14.
- (139) Hartmann, A.; Murauer, A.; Ganzera, M. Quantitative Analysis of Mycosporine-like Amino Acids in Marine Algae by Capillary Electrophoresis with Diode-Array Detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *138*, 153–157.
- (140) Cassiano, N. M.; Barreiro, J. C.; Martins, L. R. R.; Oliveira, R. V.; Cass, Q. B. Validação Em Métodos Cromatográficos Para Análises de Pequenas Moléculas Em Matrizes Biológicas. *Quim. Nova* **2009**, *32* (4), 1021–1030.
- (141) Bortoli, S.; Oliveira-Silva, D.; Krüger, T.; Dörr, F. A.; Colepicolo, P.; Volmer, D. A.; Pinto, E. Growth and Microcystin Production of a Brazilian Microcystis Aeruginosa Strain (LTPNA 02) under Different Nutrient Conditions. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2014**, *24* (4), 389–398.
- (142) Molica, R. J. R.; Oliveira, E. J. A.; Carvalho, P. V. V. C.; Costa, A. N. S. F.; Cunha, M. C. C.; Melo, G. L.; Azevedo, S. M. F. O. Occurrence of Saxitoxins and an Anatoxin-a (s)-like Anticholinesterase in a Brazilian Drinking Water Supply. *Harmful Algae* **2005**, *4* (4), 743–

753.

- (143) Werner, V. R.; Laughinghouse IV, H. D.; Fiore, M. F.; Sant'Anna, C. L.; Hoff, C.; de Souza Santos, K. R.; Neuhaus, E. B.; Molica, R. J. R.; Honda, R. Y.; Echenique, R. O. Morphological and Molecular Studies of *Sphaerospermopsis Torques-Reginae* (Cyanobacteria, Nostocales) from South American Water Blooms. *Phycologia* **2012**, *51* (2), 228–238.
- (144) Zapomělová, E.; Jezberová, J.; Hrouzek, P.; Hisem, D.; Řeháková, K.; Komárková, J. Polyphasic Characterization of Three Strains of *Anabaena Reniformis* and *Aphanizomenon Aphanizomenoides* (Cyanobacteria) and Their Reclassification to *Sphaerospermum* Gen. Nov.(Incl. *Anabaena Kisseleviana*) 1. *J. Phycol.* **2009**, *45* (6), 1363–1373.
- (145) Carneiro, R. L.; dos Santos, M. E. V.; Pacheco, A. B. F.; Azevedo, S. M. F. de O. e. Effects of Light Intensity and Light Quality on Growth and Circadian Rhythm of Saxitoxins Production in *Cylindrospermopsis Raciborskii* (Cyanobacteria). *J. Plankton Res.* **2009**, *31* (5), 481–488.
- (146) Gorham, P. R.; McLachlan, J.; Hammer, U. T.; Kim, W. K. Isolation and Culture of Toxic Strains of *Anabaena Flos-Aquae* (Lyngb.) de Bréb: With Plate 7, 1 Figure and 3 Tables in the Text. *Int. Vereinigung für Theor. und Angew. Limnol. Verhandlungen* **1964**, *15* (2), 796–804.
- (147) Lima, S. T.; Alvarenga, D. O.; Etchegaray, A.; Fewer, D. P.; Jokela, J.; Varani, A. M.; Sanz, M.; Dörr, F. A.; Pinto, E.; Sivonen, K. Genetic Organization of *Anabaenopeptin* and *Spumigin* Biosynthetic Gene Clusters in the Cyanobacterium *Sphaerospermopsis Torques-Reginae* ITEP-024. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (3), 769–778.
- (148) Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. 2010. 2017.
- (149) Zhbannikov, I. Y.; Hunter, S. S.; Settles, M. L. SeqyClean: A Software Tool for Comprehensive Preprocessing of Sequence Data. 2015.
- (150) Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A. A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A. S.; Lesin, V. M.; Nikolenko, S. I.; Pham, S.; Prjibelski, A. D. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19* (5), 455–477.
- (151) Kajitani, R.; Toshimoto, K.; Noguchi, H.; Toyoda, A.; Ogura, Y.; Okuno, M.; Yabana, M.; Harada, M.; Nagayasu, E.; Maruyama, H. Efficient de Novo Assembly of Highly

- Heterozygous Genomes from Whole-Genome Shotgun Short Reads. *Genome Res.* **2014**, *24* (8), 1384–1395.
- (152) Seemann, T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30* (14), 2068–2069.
- (153) Sayers, E. W.; Agarwala, R.; Bolton, E. E.; Brister, J. R.; Canese, K.; Clark, K.; Connor, R.; Fiorini, N.; Funk, K.; Hefferon, T. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (Database issue), D23.
- (154) Boratyn, G. M.; Camacho, C.; Cooper, P. S.; Coulouris, G.; Fong, A.; Ma, N.; Madden, T. L.; Matten, W. T.; McGinnis, S. D.; Merezuk, Y. BLAST: A More Efficient Report with Usability Improvements. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (W1), W29–W33.
- (155) Carver, T.; Harris, S. R.; Berriman, M.; Parkhill, J.; McQuillan, J. A. Artemis: An Integrated Platform for Visualization and Analysis of High-Throughput Sequence-Based Experimental Data. *Bioinformatics* **2011**, *28* (4), 464–469.
- (156) Rutherford, K.; Parkhill, J.; Crook, J.; Horsnell, T.; Rice, P.; Rajandream, M.-A.; Barrell, B. Artemis: Sequence Visualization and Annotation. *Bioinformatics* **2000**, *16* (10), 944–945.
- (157) Zimmermann, L.; Stephens, A.; Nam, S.-Z.; Rau, D.; Kübler, J.; Lozajic, M.; Gabler, F.; Söding, J.; Lupas, A. N.; Alva, V. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at Its Core. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430* (15), 2237–2243.
- (158) Rausch, C.; Weber, T.; Kohlbacher, O.; Wohlleben, W.; Huson, D. H. Specificity Prediction of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases (NRPS) Using Transductive Support Vector Machines (TSVMs). *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (18), 5799–5808.
- (159) Röttig, M.; Medema, M. H.; Blin, K.; Weber, T.; Rausch, C.; Kohlbacher, O. NRSPredictor2—a Web Server for Predicting NRPS Adenylation Domain Specificity. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (suppl_2), W362–W367.
- (160) Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (22), 4673–4680.

- (161) Darriba, D.; Taboada, G. L.; Doallo, R.; Posada, D. ProtTest 3: Fast Selection of Best-Fit Models of Protein Evolution. *Bioinformatics* **2011**, *27* (8), 1164–1165.
- (162) Ronquist, F.; Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference under Mixed Models. *Bioinformatics* **2003**, *19* (12), 1572–1574.
- (163) Rambaut, A. Figtree 1.4.2. 2007.
- (164) Inkscape's Contributors. Inkscape 0.92.1. 2017.
- (165) Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A. D. NMRPipe: A Multidimensional Spectral Processing System Based on UNIX Pipes. *J. Biomol. NMR* **1995**, *6* (3), 277–293.
- (166) Vranken, W. F.; Boucher, W.; Stevens, T. J.; Fogh, R. H.; Pajon, A.; Llinas, M.; Ulrich, E. L.; Markley, J. L.; Ionides, J.; Laue, E. D. The CCPN Data Model for NMR Spectroscopy: Development of a Software Pipeline. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2005**, *59* (4), 687–696.
- (167) Allcrom. Synergi™ com 4 tipos de Seletividades a sua escolha!
<http://www.allcrom.com.br/produtos/produtos-hplc-uhplc/colunas-phenomenex/synergi>
(accessed Feb 8, 2017).
- (168) Magnusson, B.; Örnemark, U. (eds. . Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd Ed.). Eurachem 2014.
- (169) Garré, B.; Shebany, K.; Gryspeerdt, A.; Baert, K.; Van Der Meulen, K.; Nauwynck, H.; Deprez, P.; De Backer, P.; Croubels, S. Pharmacokinetics of Acyclovir after Intravenous Infusion of Acyclovir and after Oral Administration of Acyclovir and Its Prodrug Valacyclovir in Healthy Adult Horses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (12), 4308–4314.
- (170) Dolan, J. W. Peak Tailing and Resolution. *LC GC NORTH Am.* **2002**, *20* (5), 430–437.
- (171) Ciolla, R. Fundamentos Da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho: HPLC. *São Paulo Edgard Blücher* **2003**.
- (172) TPP Techno Plastic Products A. G. Tissue Culture Flasks 25 - 300 cm²

http://www.tpp.ch/page/produkte/01_zellkultur_flasche.php.

- (173) Bassous, G. F.; Calili, R. F. Analysis of Brazilian Solar Irradiance Data-Characteristic Curves of Each National Grid Subsystem. In *New Energy Landscape: Impacts for Latin America, 6th ELAEE/IAEE Latin American Conference, April 2-5, 2017*; International Association for Energy Economics, 2017.
- (174) Taylor & Francis Group. Dictionary of Natural Products 28.1 <http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml>.
- (175) Laatsch, H. AntiBase 2014: The Natural Compound Identifier <https://application.wiley-vch.de/stmdata/antibase.php>.
- (176) Spence, E.; Bryan, S. J.; Lisfi, M.; Cullum, J.; Dunlap, W. C.; Shick, J. M.; Mullineaux, C. W.; Long, P. F. 2-Epi-5-Epi-Valiolone Synthase Activity Is Essential for Maintaining Phycobilisome Composition in the Cyanobacterium *Anabaena Variabilis* ATCC 29413 When Grown in the Presence of a Carbon Source. *Photosynth. Res.* **2013**, *116* (1), 33–43.
- (177) Sant’Anna, C. L.; Branco, L. H. Z.; Júnior, G.; Arantes, W.; Werner, V. R. Lista de Cyanobacteria Do Estado de São Paulo. *Biota Neotrop.* **2011**, 455–495.
- (178) Sinha, R. P.; Ambasht, N. K.; Sinha, J. P.; Klisch, M.; Häder, D.-P. UV-B-Induced Synthesis of Mycosporine-like Amino Acids in Three Strains of *Nodularia* (Cyanobacteria). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2003**, *71* (1–3), 51–58.
- (179) Liu, Z.; Häder, D.-P.; Sommaruga, R. Occurrence of Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) in the Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa*. *J. Plankton Res.* **2004**, *26* (8), 963–966. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh083>.
- (180) Rios, J. F.; Leal, C. R.; Janaina, R.; Retz, C. L. Phenotypic Plasticity and Negative Allelopathy in *Microcystis* Strains. *Ann. Microbiol.* **2016**, *66* (3), 1265–1276.
- (181) Atta-ur-Rahman, F. R. S. *Studies in Natural Products Chemistry*; Elsevier, 2018.
- (182) Peinado, N. K.; Abdala Díaz, R. T.; Figueroa, F. L.; Helbling, E. W. Ammonium and UV Radiation Stimulate the Accumulation of Mycosporine-like Amino Acids in *Porphyra Columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *J. Phycol.* **2004**, *40* (2), 248–259.

- (183) Volkmann, M.; Gorbushina, A. A. A Broadly Applicable Method for Extraction and Characterization of Mycosporines and Mycosporine-like Amino Acids of Terrestrial, Marine and Freshwater Origin. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *255* (2), 286–295.
- (184) ACE & JChem PKa Calculator. 2017.
- (185) Stokvis, E.; Rosing, H.; Beijnen, J. H. Stable Isotopically Labeled Internal Standards in Quantitative Bioanalysis Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Necessity or Not? *Rapid Commun. Mass Spectrom. An Int. J. Devoted to Rapid Dissem. Up-to-the-Minute Res. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (3), 401–407.
- (186) Brown, P. R.; Grushka, E. Structure-Retention Relations in the Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography of Purine and Pyrimidine Compounds. *Anal. Chem.* **1980**, *52* (8), 1210–1215.
- (187) Brown, P. R.; Robb, C. S.; Geldart, S. E. Perspectives on Analyses of Nucleic Acid Constituents: The Basis of Genomics. *J. Chromatogr. A* **2002**, *965* (1–2), 163–173.
- (188) Rolle, I.; Hobucher, H.-E.; Kneifel, H.; Paschold, B.; Riepe, W.; Soeder, C. J. Amines in Unicellular Green Algae: 2. Amines in *Scenedesmus Acutus*. *Anal. Biochem.* **1977**, *77* (1), 103–109.
- (189) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.
- (190) Meylan, W. M.; Howard, P. H. Atom/Fragment Contribution Method for Estimating Octanol–Water Partition Coefficients. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84* (1), 83–92.
- (191) Yang, G.; Cozad, M. A.; Holland, D. A.; Zhang, Y.; Luesch, H.; Ding, Y. Photosynthetic Production of Sunscreen Shinorine Using an Engineered Cyanobacterium. *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7* (2), 664–671.
- (192) Zhang, Z.; Gao, X.; Yuri, T.; Shingo, M.; Hiroo, O. Researches on the Stability of Porphyra-334 Solution and Its Influence Factors. *J. Ocean Univ. China* **2004**, *3* (2), 166–170.
- (193) Sivalingam, P. M.; Ikawa, T.; Nisizawa, K. Physiological Roles of a Substance 334 in Algae.

Bot. Mar. **1976**, *19* (1), 9–22.

- (194) Rastogi, R. P.; Sonani, R. R.; Madamwar, D.; Incharoensakdi, A. Characterization and Antioxidant Functions of Mycosporine-like Amino Acids in the Cyanobacterium *Nostoc* Sp. R76DM. *Algal Res.* **2016**, *16*, 110–118.
- (195) Shang, J.; Zhang, Z.; Yin, X.; Chen, M.; Hao, F.; Wang, K.; Feng, J.; Xu, H.; Yin, Y.; Tang, H. UV-B Induced Biosynthesis of a Novel Sunscreen Compound in Solar Radiation and Desiccation Tolerant Cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20* (1), 200–213.
- (196) Portwich, A.; Garcia-Pichel, F. A Novel Prokaryotic UVB Photoreceptor in the Cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71* (4), 493–498.

ANEXOS

ANEXO 1

Genetic and biochemical evidence for redundant pathways leading to mycosporine-like amino acid biosynthesis in the cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP 024

Artigo submetido

Revista: Algal Research

Data de submissão: 25 de Outubro de 2019

Genetic and biochemical evidence for redundant pathways leading to mycosporine-like amino acid biosynthesis in the cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024

Vanessa Geraldes^a, Lívia Soman de Medeiros^b, Stella T. Lima^c, Danillo Oliveira Alvarenga^{c,d}, Ranko Gacesa^e, Paul F. Long^{a,e}, Marli Fátima Fiore^c, Ernani Pinto^{a,c}

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo-SP, Brazil

^b Department of Chemistry, Federal University of São Paulo, Diadema-SP, Brazil

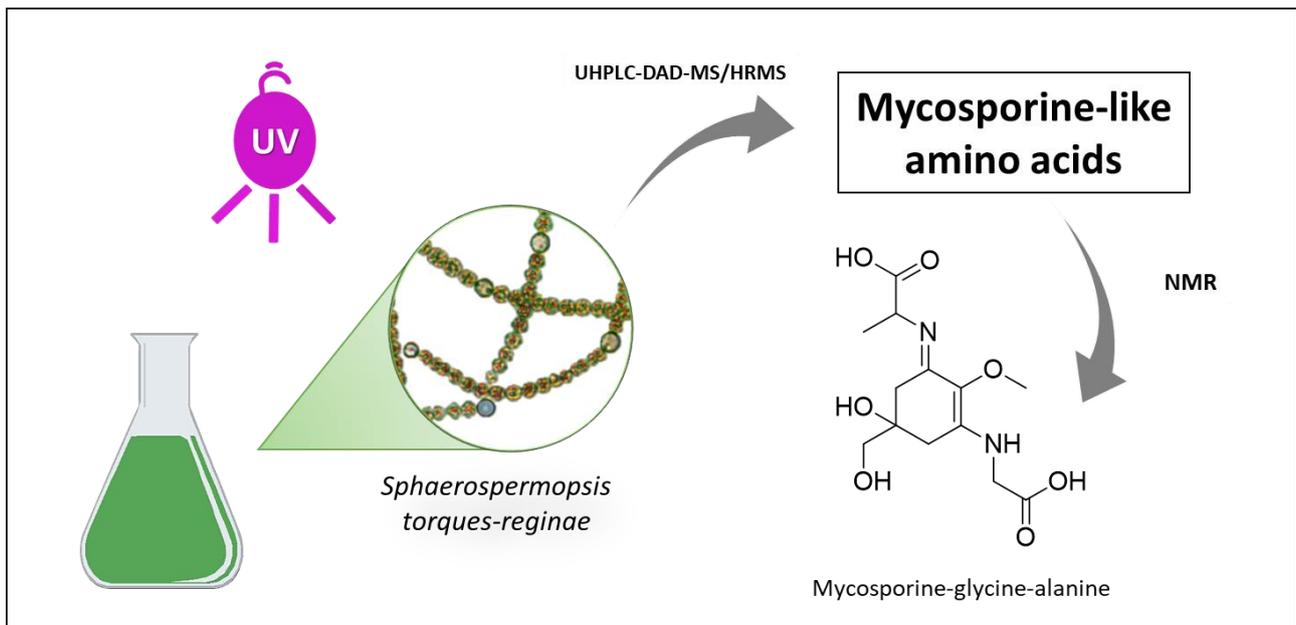
^c Centre for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba-SP, Brazil

^d Department of Microbiology, University of Helsinki, Helsinki, Finland

^e Institute of Pharmaceutical Science, Faculty of Life Sciences and Medicine, King's College London, London, United Kingdom

* Corresponding author.

E-mail address: ernani@usp.br (Ernani Pinto)



HIGHLIGHTS

- The MAAs composition of *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 was quantified.
- The rare MAA mycosporine-glycine-alanine was detected together with shinorine and porphyra-334.
- The genome sequence of *S. torques-reginae* ITEP-024 encodes an operon linked with MAA biosynthesis involving the pentose phosphate pathway.
- Glyphosate inhibited MAAs production suggesting that the shikimic acid pathway might actually be responsible for MAAs biosynthesis in *S. torques-reginae* ITEP-024.

ABSTRACT

Cyanobacteria have been widely reported to produce a variety of UV-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs). Herein, mycosporine-glycine-alanine (MGA) was confirmed using an UHPLC-DAD-MS/HRMS (ultra-high-performance liquid chromatography - diode array detection - high resolution tandem mass spectrometry) based dereplication method to be produced by the cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, together with two other common MAAs, shinorine and porphyra-334. MGA was previously identified in red algae, but until now has never been reported in cyanobacteria. The chemical structure of MGA was confirmed from 1D/2D NMR and HRMS data analyses. MAAs are constitutively produced by *S. torques-reginae* ITEP-024 and production was further enhanced following UV-irradiance. In previously studies has been proposed that MAA biosynthesis proceeds in cyanobacteria from the pentose phosphate pathway intermediate sedoheptulose 7-phosphate. Annotation of a gene cluster encoded in the genome sequence of *S. torques-reginae* ITEP-024 supports these gene products could catalyse the biosynthesis of MGA. However, addition of glyphosate to cultures of *S. torques-reginae* ITEP-024 abolished constitutive and UVR-enhanced production of MGA, shinorine and porphyra-334. This finding supports involvement of the shikimic acid pathway in the biosynthesis of MAAs by this species.

Key-words: Mycosporine-like amino acids (MAAs); Cyanobacteria; *Sphaerospermopsis torques-reginae*; UV-induction; Mycosporine-glycine-alanine (MGA).

Abbreviations: Ala: alanine; COSY: correlation spectroscopy; ESI: electrospray ionization; HMBC: heteronuclear multiple-bond correlation; HSQC: heteronuclear single-quantum coherence; LTPNA: Laboratory of Toxins and Natural Products of Algae and Cyanobacteria; MAAs: mycosporine-like amino acids; MGA: mycosporine-glycine-alanine, MS: mass spectrometry; NMR: nuclear magnetic resonance; PAR: Photosynthetically active radiation; P-334: porphyra-334; QTOF: quadrupole-time-of-flight; SH: shinorine; UHPLC-DAD-MS/HRMS: ultra-high performance liquid chromatography - diode array detection - high resolution tandem mass spectrometry; UVR: ultra-violet radiation.

1. Introduction

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes that probably evolved during the Precambrian (around 2.9 Ma-) to create the oxygenic environment that supports current life of Earth [1,2]. Cyanobacteria harness the sun's photosynthetically active radiation (PAR) to convert light into chemical energy. An obligate requirement for photosynthetically active radiation (PAR) results in prolonged exposure to ultra-violet radiation (UVR) which can directly cause cellular damage due to photochemical reactions such as dipyrimidine photodimers in DNA, or indirectly via the accumulation of reactive oxygen species (ROS) [3]. In order to circumvent the harmful effects associated with exposure to ultra-violet radiation (UVR), cyanobacteria and other aquatic organisms have evolved biochemical and mechanical defences [4,5]. Among these is the ability to synthesize, or otherwise acquire, mycosporine-like amino acids (MAAs); small (<400Da), colourless, water soluble metabolites, comprised of either a cyclohexenimine or cyclohexenone UV-absorbing chromophore, conjugated to the nitrogen or imino-alcohol component of an amino acid [4]. The absorption maxima of MAAs (λ_{max}) are within either UVB and UVA spectra of solar radiation [6], and MAAs have been convincingly demonstrated to possess physiologically relevant photo-protective and antioxidant properties [7] Thus, MAAs have been widely studied as natural alternatives to potentially toxic synthetic sunscreens and for other biotechnological applications [8]. We undertook a screening program to identify novel MAAs from cyanobacteria deposited in the culture collection of the Laboratory of Toxins and Natural Products of Algae and Cyanobacteria (LTPNA) at the University of São Paulo. *S. torques-reginae* strain ITEP-024 is a filamentous and heterocystous cyanobacterium that normally occurs as dense freshwater blooms and in waters with low salinity throughout South America [9,10]. Few secondary metabolites have been isolated from this strain, such as anatoxin-a(s), namalides, spumigins [11–13] while the biosynthesis of MAAs has never been described. Herein, the production of three MAAs by *S. torques reginae* ITEP-024 is reported, including MGA, which was isolated for the first time from a natural source (Figure 1). Molecular biology studies, UVR induction

experiments and the use of a shikimate pathway inhibitor (glyphosate) afforded biosynthetic insights about MAAs production by the strain.

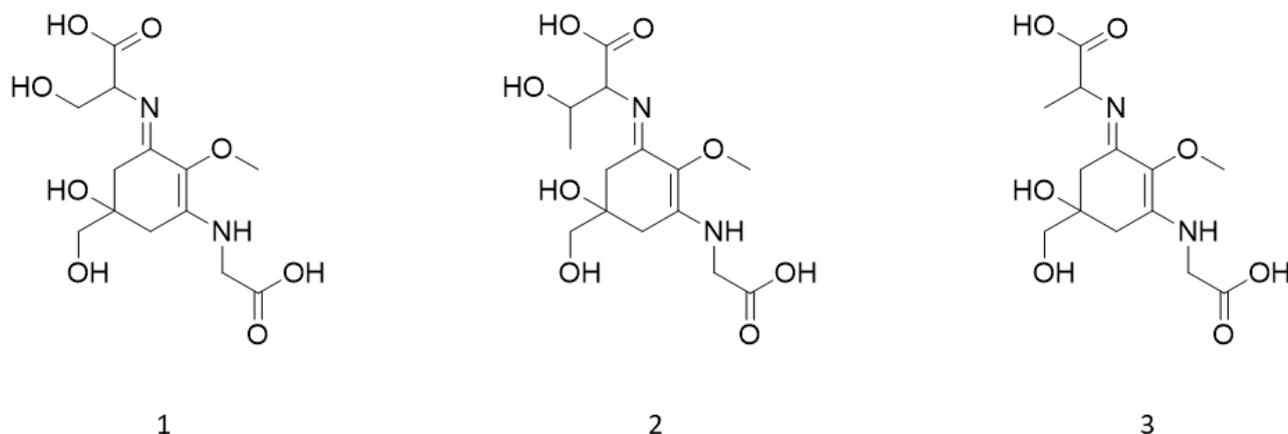


Figure 1. Structure of MAAs isolated from *S. torques-reginae* ITEP-024. 1: shinorine, 2: porphyra-334, 3: mycosporine-glycine-alanine.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and matrix

Acetonitrile (J. T. Baker), formic acid and ammonium formate were LC-MS grade (Fluka). Water was purified by a Milli-Q system (Millipore). Porphyra-334 and shinorine standards were kindly provided by Prof. Kazuo Yabe. Glyphosate (96%) was purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Cyanobacterial cultures

Sphaerospermopsis torques-reginae strain ITEP-024 was isolated from a toxic bloom sample collected in the Tapacura Reservoir, Recife, Brazil [10] *S. torques-reginae* was cultivated in ASM-1 medium [14] at $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ under a light:dark cycle (12h:12h) with PAR supplied by OSRAM L 36 W:32 Lumilux de luxe warm white lamps ($80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

2.3. MAAs extraction and partial purification

Cyanobacterial cells were harvested after 15 days growth by centrifugation at 10000 x g for 15 min at 5 °C and lyophilized. Then, cells were extracted with 0.2 % (v/v) formic acid solution + 2 mM ammonium formate. Cell debris was removed by centrifugation at 10000 x g for 15 min and the supernatant was retained as the partially purified MAA fraction.

2.4. MAAs isolation via HPLC-DAD

MAAs were purified by semi-preparative Shimadzu Prominence liquid chromatograph (LC 20AT) equipped with a photodiode array detector DAD (SPD M20A) and a fraction collector fitted to a Luna C18 (2) column (250 x 10 mm, 5 µm, Phenomenex). Buffer A was 0.2 % (v/v) formic acid solution + ammonium hydroxide (pH 3.15), buffer B was Milli-Q water/acetonitrile/methanol (8:1:1) + formic acid (pH 2.20), buffer C was acetonitrile/methanol (1:1) + 0.1 % (v/v) formic acid and the flow rate was 0.5 mL/min. The gradient used for separation was 100 % A at the start of the run, 22 % B at 6 min, 95 % C at 13 min, where the gradient was held for 10 min, followed by a 10 min equilibration at 100 % A prior to the next injection. Compound 3 was collected at 13.0 min in the run time.

2.5. UHPLC-DAD-MS/HRMS analysis

The UHPLC-DAD-MS/HRMS analyses were carried out on a Shimadzu Prominence system (Shimadzu) coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics) with an electrospray source. Sample extracts were injected (10 µL) onto a Synergi 4µ Hydro-RP 80 A column (150 x 2.0 mm) (Phenomenex) and eluted at a flow rate of 0.4 mL/min with 0.1 % (v/v) formic acid solution + 2 mM ammonium formate (buffer A). Eluent B was acetonitrile/Milli-Q water (8:2) + 0.1 % (v/v) formic acid. The gradient used for the separation was 100 % A at the start of the run up 2 min, 95 % B at 6 min, where the gradient was held for 1.5 min, followed by a 4 min

equilibration at 0 % B prior to the next injection. The ionization source conditions were as it follows: positive ionization, capillary potential of 4500 V, temperature of drying nitrogen gas 200 °C at a flow rate of 9 mL/min, nebulizer pressure of 60 psi. Mass spectra were acquired using electrospray ionization in the positive mode over a range of m/z from 50 to 500. The QTOF instrument was operated in scan and Auto MS/MS mode, performing MS/MS experiments on the three most intense ions from each MS survey scan. The chromatogram was monitored at 330 nm (indicative of the MAAs shinorine and porphyra-334) and retention times of eluted peaks were compared shinorine and porphyra-334 standards (kindly provided by Prof. Kazuo Yabe). Accurate mass data were processed using Data Analysis 4.0 software (Bruker Daltonics).

2.6. NMR Analysis

1 D and 2 D NMR spectra were obtained using a 500 MHz (125 MHz for ¹³C) Bruker DPX spectrometer. NMR experiments were all run using standard pulse sequences. Chemical shifts are reported on the δ scale relative to the residual solvent signal (CD₃OD).

2.7. Gene cluster identification and annotation

Prediction of genes encoding putative MAA biosynthetic enzymes was performed by mining the draft *S. torques-reginae* ITEP-024 genome sequence [15] using TBLASTN [16]. Artemis 18.0.2 [17], BLASTP and HHpred [18] searches against the GenBank database [19] were used for manual annotation of putative gene clusters.

2.8. MAAs induction using UV radiation

To induce MAA biosynthesis, cells were irradiated using a UVA source (maximum illumination at 370 nm) provided by twin Philips TL-K 40W/10-R UV-A lamps, and a UVB source (maximum

illumination at 290 nm) provided by twin Philips TL 40W/12 RS SLV/25 lamps in addition to the PAR lamps (maximum illumination at 550 nm). Cell density were normalized to 0.4 mg dry weight/mL culture, and 30 mL of suspended cells were irradiated in 25 cm² tissue culture flasks with a hydrophobic filter cap (TP90026, TPP) at a distance of 40 cm with lamps at 24 °C ± 2 °C under light/dark cycle (12h:12h) for 3 days. Cultures were harvest at the beginning and at the end of the experiment, and MAAs were extracted for subsequent analysis of MAAs using the LC-MS/MS method described by Geraldes *et al.*, 2019 [manuscript under revision in this journal].

2.9. MAAs induction in the presence of glyphosate

Cells were grown with illumination for 15 days as previously described, before the culture medium was supplemented with 2 mM glyphosate. Growth of the culture was allowed to proceed for a further 24 h, before MAAs were induced as described above.

3. Results and Discussion

3.1. Distribution of MAAs in *S. torques-reginae* Strain ITEP-024

Bioprospecting for photoprotective compounds from the LTPNA cyanobacteria collection was guided by UHPLC-DAD-HRMS biomass extracts data analysis. Extracts of *S. torques-reginae* ITEP-024 presented likely MAA chemical features. The base peak chromatogram (BPC) of the biomass extract gave 3 major peaks eluting at 1.3 min, 2.2 min and 3.1 min (Figure S1, Supporting Information). The corresponding molecular formulae $C_{13}H_{20}N_2O_8$ (1), $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (2) and $C_{13}H_{20}N_2O_7$ (3) were calculated from the protonated ions $[M+H]^+$ to m/z 333.1298 (0.0 ppm), m/z 347.1451 (-0.9 ppm) and m/z 317.1350 (0.3 ppm) (Figure S2, Supporting Information). Noteworthy, all compounds showed loss of a methyl radical, followed by sequential CO_2 eliminations [20] according to the detected common losses of 15 Da and 44 Da (Figure S3, Supporting Information). All UV spectra were very similar, suggesting the same conjugated chromophore with a maximum absorption at 332 nm. Accurate masses were then used as databases queries to search the Dictionary of Natural Products [21], Antibase [22] and MAA literature. Shinorine and porphyra-334 were suggested as possible MAAs for compounds (1) and (2). The chemical identity of these compounds was then confirmed using UV-HRMS data analyses in comparison to authentic reference standards. Mycosporine-glycine-alanine (MGA) was suggested as the possible MAA for compound (3). This MAA has been reported by Orfanoudaki *et al.*, 2019 as a constituent of red algae [23]. However, MGA has never been reported in cyanobacteria. To confirm that compound (3) was indeed MGA, the metabolite was isolated and characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) experiments.

3.2. Isolation and characterization of compound (3)

Biomass extract of *S. torques-reginae* ITEP-024 was separated by reversed phase chromatography, allowing the isolation of mycosporine-glycine-alanine (3). The chemical structure of (3) was established by 1D and 2D NMR, and MS/HRMS data analysis. The 1H -NMR spectrum of (3) revealed

the presence of one methyl group, four methylenes, one methyl and one methoxy group. The COSY spectrum defined three spin systems including the coupling of the pairs of duplets from the diastereotopic methylenes at δ_{H} 2.65/2.88 (CH₂-4) and δ_{H} 2.73/2.95 (CH₂-6) (Figure 2a) showing a geminal constant coupling ($J = 17$ Hz for both), as well as the nuclei coupling from methyl group at δ_{H} 1.48 (CH₃-13) with methine protons at δ_{H} 4.16 (CH-11), indicating the evidence of an alanine moiety for (3). The methyl protons at δ_{H} 1.48 (CH₃-13) were also confirmed through the long-range correlation detected in the HMBC spectrum (Figure 2b) with the carboxylic carbon (COOH-12) at δ_{C} 173 and the carbon nucleus attached to the imino moiety (C-11) at δ_{C} 55. Moreover, 2J and 3J -bond correlations from δ_{H} (H-7) to δ_{C} (C-5) and δ_{C} (C-6) were detected, supporting the oxymethylene protons; while the 3J -bond correlation from δ_{H} 3.66 (H-8) to the sp^2 carbon (C-2) at δ_{C} 122 allowed the assignment of the methoxy group attached to the aminocyclohexenimine ring.

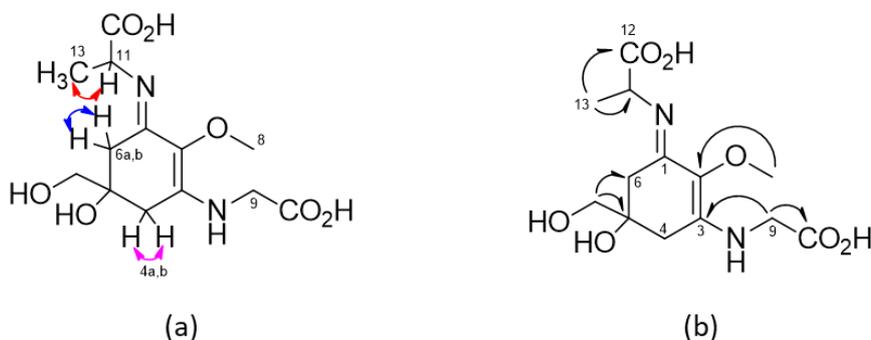


Figure 2. Observed COSY couplings (a) and HMBC (b) correlations for mycosporine glycine-alanine.

Full NMR assignments are described in Table 1 and are in agreement with data reported for MGA produced by heterologous expression [24]. The 1D and 2D spectra with main nuclei correlations are depicted in Figures S4 to S9 (Supporting Information).

Table 1. NMR chemical shifts (500 MHz, CD₃OD) of novel MAA. ^a ¹³C chemical shifts were obtained from the indirect dimensions of H–C HSQC(*) and H–C HMBC(**).

position	δ_c^a	δ_H (J in Hz)	HMBC ^a
1		-	-
2	122 **	-	-
3	160 **	-	-
4a	34.6 *	2.88 (d, 17.4)	-
4b	34.6 *	2.65 (d, 17.4)	-
5	71 **	-	-
6a	34.7 *	2.95 (d, 17.3)	-
6b	34.7 *	2.73 (d, 17.3)	-
7	69 *	3.49 (s)	C5, C6
8	59 *	3.66 (s)	C2
9	48 *	3.95 (s)	C3, C10
10	173 **	-	-
11	55 *	4.16 (q, 6.9)	-
12	174 **	-	-
13	n. o.	1.48 (d, 6.9)	C11, C12

MS/HRMS data analysis also confirmed the structure of (3). The spectrum of (3), (Figure S3- (3), Supporting Information) displayed the characteristic fragmentation pattern of a di-acidic MAA in positive ionization mode [25]. In particular, as a first fragmentation step the loss of a methyl radical from a protonated molecular ion m/z 317 was observed (Figure 3). As expected, the exit of two sequential CO₂ units from both carboxylic acid moieties occurs to give rise the product ions m/z 258 and m/z 214. The last loss of CO₂ represents the base peak ion which can undergo steps **a**, **b** and **c**. Step **a** is highlighted and provides the neutral elimination of the remaining lateral substituent chain, diagnostic for (3) from the chemical structure. Further loss of an amino unit is predicted in **b**, while step **c** presents the detection of m/z 199 which is afforded by another methyl radical loss prior to an internal atom transfer.

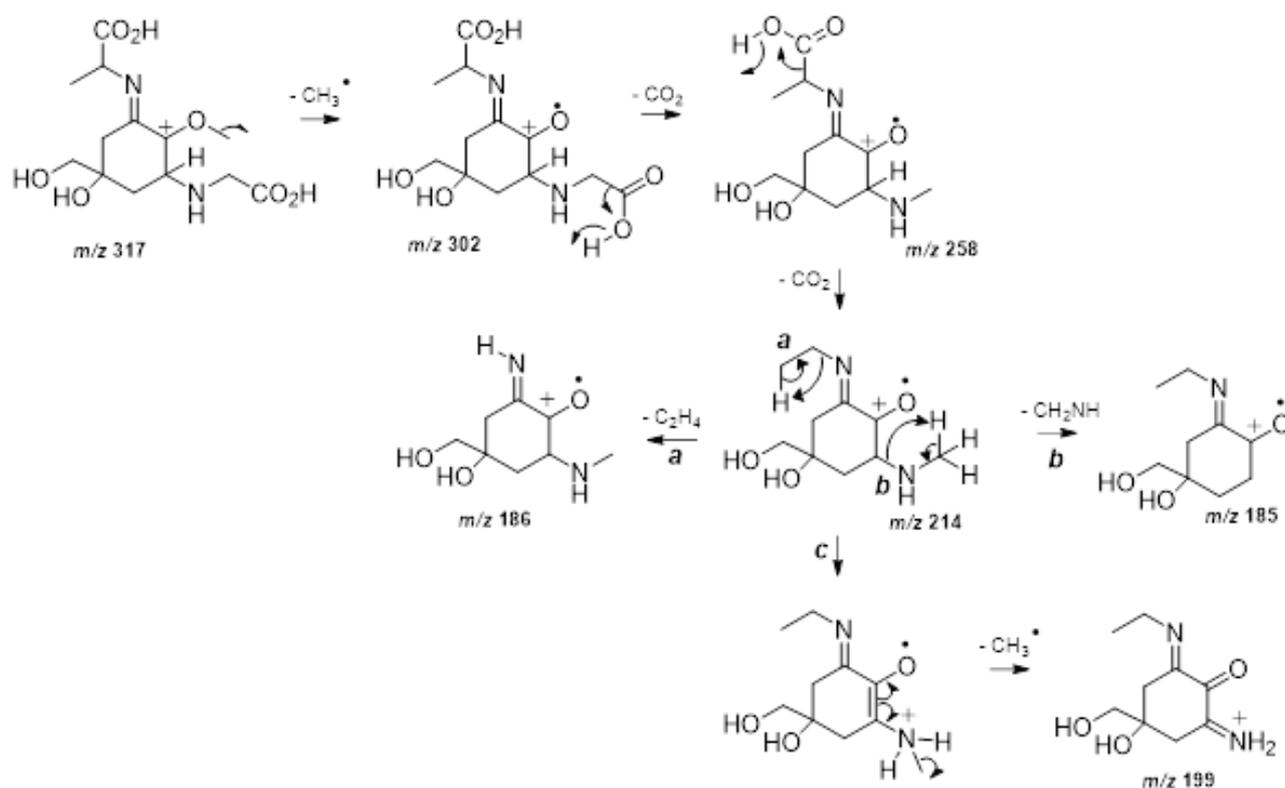


Figure 3. Plausible fragmentation mechanisms proposed to explain the product ions detected at MS/HRMS spectra from mycosporine glycine-alanine (3).

3.3. MAAs induction using UV radiation

Several studies reported MAAs biosynthesis in cyanobacteria is induced by PAR and UVR radiation [26–28]. The extract of *S. torques-reginae* ITEP-024 exposed to UV radiation for 3 days was analysed using the LC-MS/MS validated method developed by Geraldès *et al.* 2019 [manuscript under revision in this journal]. The extracted ion chromatogram of the extracts of *S. torques-reginae* ITEP-024 is shown in Figure 4.

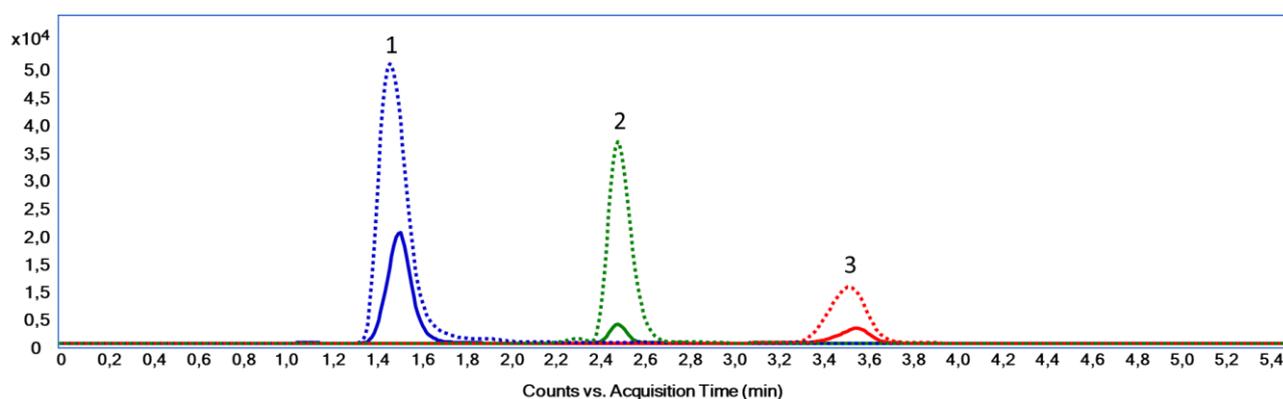


Figure 4. Extracted ion chromatogram (ESI+) of a MAAs extract of *S. torques-reginae* ITEP-024 before exposure (full line) and after exposure (dashed line) to UVA+UVB. 1: shinorine, 2: porphyra-334, 3: mycosporine-glycine-alanine.

The chromatogram showed a significant increase in peak intensities that corresponded to compounds (1), (2) and (3). After UVR induction the concentrations of these MAAs increased substantially from $0.90 \mu\text{g mg}^{-1}$ to $6.14 \mu\text{g mg}^{-1}$. MGA is present in *S. torques-reginae* ITEP-024 as a minor MAA (< 10 % of MAA yield). Sinha et al., 2007 reported a database on MAAs in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals and MGA was not listed in this dataset [29]. *S. torques-reginae* ITEP-024 produced MAAs even when not exposed to UVR. This observation suggested constitutive MAA biosynthesis in a quantitative level which has not been previously reported in the literature and might be a natural adaptation by *S. torques-reginae* ITEP-024 to extreme UVR-irradiance conditions in Northeastern Brazil where this strain was isolated [10,30]. Further experimentation using *S. torques-reginae* ITEP-024 are now warranted to determine how environmental and molecular mechanisms converge to induce and then regulate MAA biosynthesis, which currently remain elusive.

3.4. Genome annotations and protein predictions

Multiple lines of evidence support that MAAs are derived from conversion of the shikimic acid pathway [4,5,31,32]. However, contrasting evidence suggests that in cyanobacteria, the parent core structure of mycosporines (4-deoxygadusol) is derived from conversion of the pentose phosphate pathway intermediate sedoheptulose-7-phosphate by the enzymes 2-epi-5-epivaliolone synthase

(EVS) and an O-methyltransferase [32–35]. A cluster of four genes designated *mysABCD* were identified in the *S. torques-reginae* ITEP-024 draft genome supporting that these gene products could catalyse the biosynthesis of MGA. Similarities with publicly available sequences are shown in Table 2 and the organization of the biosynthetic gene cluster is illustrated in Figure 5. In addition, all protein sequences were further annotated using the homology and structural prediction HHpred platform in the MPI Bioinformatic Toolkit [18]. Based on these analyses and following the biosynthetic scheme proposed by Balskus and Walsh [33], *mysA* was predicted to encode EVS, while *mysB* encodes the enzyme OMT. Together, these gene products catalyse the biosynthesis of 4-deoxygadusol. The product of gene *mysC* was an ATP-grasp amino acid ligase predicted to catalyses the addition of glycine to the hydroxyl group at position C3 of 4-deoxygadusol yielding mycosporine-glycine. The cluster also contains *mysD*, that encodes for a protein with high sequence similarity to cyanobacterial alanine ligases to generate the final product, mycosporine-glycine-alanine. To our knowledge, the function of these enzymes has not been experimentally proven. However, their amino acid sequences share 100 % similarity to well characterised bacterial ligases (HHpred analysis) [18] which catalyse carbon-nitrogen bond addition of two alanine residues during peptidoglycan biosynthesis. Given the sequence homology between *mysD* and bacterial alanyl-alanine synthetases, we propose that *mysD* catalyses a somewhat different reaction, with the addition of a single alanine residue to the ketone group at position C1 of mycosporine-glycine to yield mycosporine-glycine-alanine.

Table 2. Proposed function for *mysA-D* encoded enzymes in the *mys* biosynthetic gene cluster of *S. torques-reginae* ITEP-024. ^a Data represent numbers of amino acids (aa).

Deduced Protein	aa ^a	Proposed Function	Function of the closest sequence	Most similar organism	Similarity	Accession Number
<i>mysA</i>	454	3-dehydroquinate synthase	3-dehydroquinate synthase	<i>Sphaerospermopsis reniformis</i>	96.92%	GCL37085.1
<i>mysB</i>	277	Methyltransferase	SAM-dependent methyltransferase	<i>Sphaerospermopsis kisseleviana</i>	93.50%	WP_096566485.1
<i>mysC</i>	423	ATP-grasp ligase	ATP-grasp domain-containing protein	<i>Sphaerospermopsis kisseleviana</i>	94.56%	WP_096566487.1
<i>mysD</i>	340	D-alanine ligase	D-alanine—D-alanine ligase	<i>Sphaerospermopsis kisseleviana</i>	92.94%	WP_096566489.1

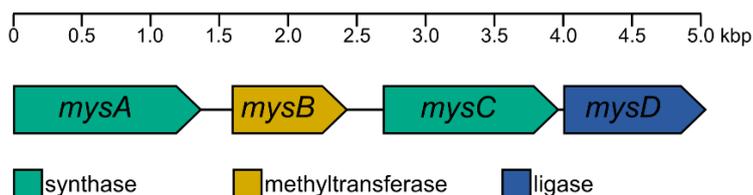


Figure 5. Organization of the MAAs biosynthetic gene cluster in *S. torques-reginae* ITEP-024.

Bioinformatic evidence that MAA biosynthesis proceeds by conversion of the pentose phosphate pathway intermediate sedoheptulose 7-phosphate has gained increasing traction over recent years, with homologous gene clusters found in many MAA producing organisms and, somewhat surprisingly, bioinformatic and biochemical data strongly supporting biosynthesis of 4-deoxygadusol in zebrafish [36]. However, none of these studies have provided evidence that MAA can be abolished following deletion of any of the gene in the cluster. The universal requirement of EVS in the biosynthesis of MAAs was challenged by complete in-frame gene deletion of the *EVS* gene (*Ava_3858*) in *A. variabilis* ATCC 29413 which produces only shinorine [35,37]. Upon UV exposure, shinorine was produced at levels nearly equivalent to that of the wild type strain, suggesting alternative pathways for MAA biosynthesis in *A. variabilis*. Subsequently, by using pathway specific inhibitors of the shikimate pathway, an alternative route to MAA biosynthesis has been proposed (Figure 6) [32]. Constructing an in-frame deletion and screening for complete segregation of the resultant mutant was beyond the scope of the current project, so we also used a pathway specific inhibitor to determine if the shikimate pathway was an alternative route to MAA biosynthesis in *S. torques-reginae* ITEP-024.

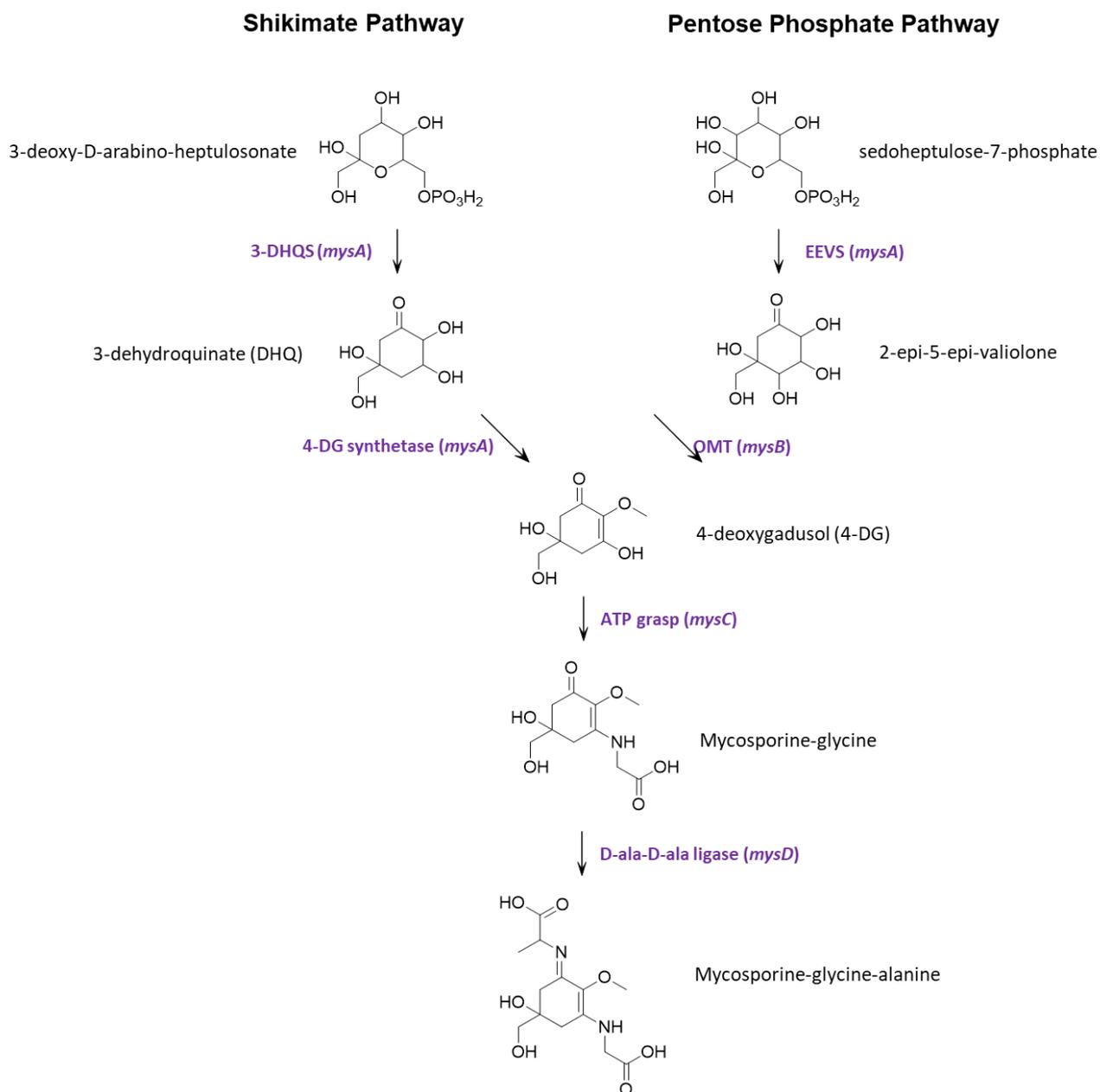


Figure 6. Proposed mycosporine-glycine-alanine biosynthetic pathway in *S. torques-reginae* ITEP-024.

The extracted ion chromatogram of the culture extract from *S. torques-reginae* ITEP-024 recorded after 3 days exposure to UVR in the presence of 2 mM glyphosate, a known shikimate pathway inhibitor [38,39], is shown in Figure 7.

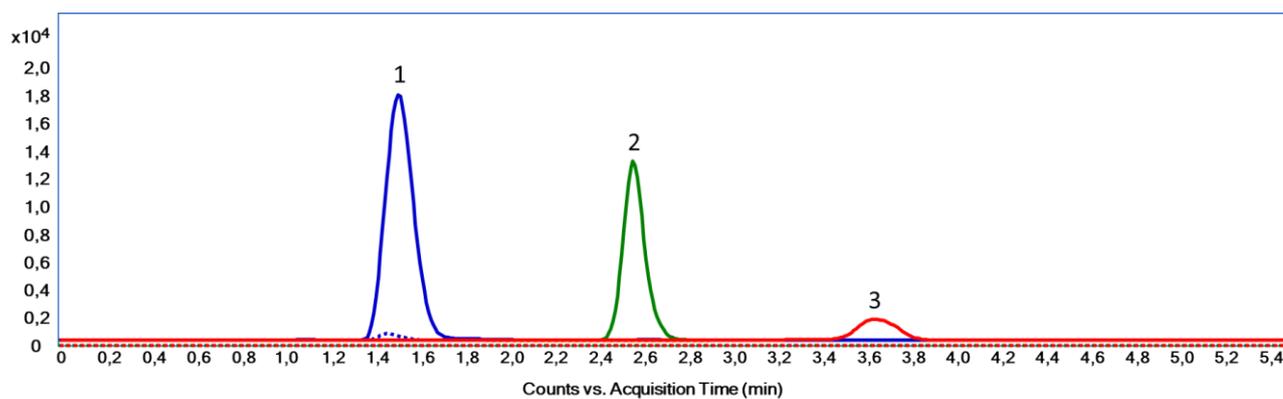


Figure 7. Extracted ion chromatogram (ESI+) of a MAAs extract of *S. torques-reginae* ITEP-024 after exposure to UVA+UVB in the presence (dashed line) or absence (full line) of glyphosate (2 mM). 1: shinorine, 2: porphyra-334, 3: mycosporine-glycine-alanine.

The chromatogram showed a reduction in peak intensities (dashed lines) corresponding to compounds (1), (2) and (3) compared to the control culture where the growth medium was not supplemented with glyphosate (full lines). Hence, using a pathway-specific inhibitor, we demonstrated that MAA biosynthesis occurs in *S. torques-reginae* ITEP-024 via the shikimate pathway, supporting the forgoing study of Pope et al. whereby the use of glyphosate abolished MAA biosynthesis in the wild type strain and *EVS* deletion mutant of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 [32]. Whether glyphosate might repress the promoters of the MAA-producing gene cluster of the pentose phosphate pathway and thereby also impede MAA biosynthesis is not known and warrants experimentation.

4. Conclusions

Shinorine, porphyra-334 and mycosporine-glycine-alanine were detected in *S. torques-reginae* ITEP-024. Mycosporine-glycine-alanine is a rare mycosporine previously only reported in red algae and as a shunt product during MAA biosynthesis in a heterologous host. Amounts of MAAs can be enhanced after UV irradiance in *S. torques-reginae* ITEP-024 in agreement with the role of MAAs as natural photo-protective sunscreens. A gene cluster encoded the genome of *S. torques-reginae* ITEP-024 suggested involvement of the pentose phosphate pathway in MAA biosynthesis. However, addition of glyphosate inhibited all MAA biosynthesis, supporting a role for the shikimic acid pathway in the MAAs biosynthesis in *S. torques-reginae* ITEP-024.

Accession number

The genome nucleotide sequence region from the *S. torques-reginae* ITEP-024 was deposited in GenBank under accession number MN401680.

Ethical statement

No animal or human subjects were used in the study encompassed by the manuscript titled “Genetic and biochemical evidence for redundant pathways leading to mycosporine-like amino acid biosynthesis in the cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024.”.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author contributions

VG, LSM, STL, DOA, RG, PFL, MFF and EP have worked in the conception and design of the study; VG and LSM have performed the UHPLC-DAD-MS/HRMS and RMN analyses; STL and DOA have performed the gene cluster identification and annotation; VG has performed the experiments and acquisition of data; VG, LSM, STL and EP have analysed the data and drafted the article. All authors have made substantial contributions to conception of this manuscript, agree to authorship and approve the final version for submission.

Acknowledgments

This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (311048/2016-1, 141253/2018-5 and 439065/2018-6), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Grant #23038.001401/2018-92), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (2018/01563-2, 2015/22742-4 and 2014/50420-9) and University of São Paulo Foundation - FUSP (Project #1979).

REFERENCES

- [1] R.P. Rastogi, R.P. Sinha, S.H. Moh, T.K. Lee, S. Kottuparambil, Y.-J. Kim, J.-S. Rhee, E.-M. Choi, M.T. Brown, D.-P. Häder, T. Han, Ultraviolet radiation and cyanobacteria, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 141 (2014) 154–169. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.020>.
- [2] W.W. Fischer, Biogeochemistry: life before the rise of oxygen, *Nature*. 455 (2008) 1051.
- [3] Y.-Y. He, D.-P. Häder, Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria, *Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (2002) 729–736. doi:10.1039/B110365M.
- [4] J.M. Shick, W.C. Dunlap, Mycosporine-Like Amino Acids and Related Gadusols: Biosynthesis, Accumulation, and UV-Protective Functions in Aquatic Organisms, *Annu. Rev. Physiol.* 64 (2002) 223–262. doi:10.1146/annurev.physiol.64.081501.155802.
- [5] S.P. Singh, S. Kumari, R.P. Rastogi, K.L. Singh, R.P. Sinha, Mycosporine-like amino acids (MAAs): Chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds, *Indian J. Exp. Biol.* 46 (2008) 7–17.
- [6] C.S. Cockell, J. Knowland, Ultraviolet radiation screening compounds, *Biol. Rev.* 74 (1999) 311–345.
- [7] K.P. Lawrence, R. Gacesa, P.F. Long, A.R. Young, Molecular photoprotection of human keratinocytes in vitro by the naturally occurring mycosporine-like amino acid palythine, *Br. J. Dermatol.* 178 (2018) 1353–1363.
- [8] K.P. Lawrence, P.F. Long, A.R. Young, Mycosporine-Like Amino Acids for Skin Photoprotection, *Curr. Med. Chem.* 25 (2017) 5512–5527. doi:10.2174/0929867324666170529124237.
- [9] V.R. Werner, H.D. Laughinghouse IV, M.F. Fiore, C.L. Sant’Anna, C. Hoff, K.R. de Souza Santos, E.B. Neuhaus, R.J.R. Molica, R.Y. Honda, R.O. Echenique, Morphological and

molecular studies of *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria, Nostocales) from South American water blooms, *Phycologia*. 51 (2012) 228–238.

- [10] R.J.R. Molica, E.J.A. Oliveira, P.V.V.C. Carvalho, A.N.S.F. Costa, M.C.C. Cunha, G.L. Melo, S.M.F.O. Azevedo, Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a (s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply, *Harmful Algae*. 4 (2005) 743–753.
- [11] F.A. Dörr, V. Rodríguez, R.J.R. Molica, P. Henriksen, B. Krock, E. Pinto, Methods for detection of anatoxin-a (s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Toxicon*. 55 (2010) 92–99.
- [12] M. Sanz, F.A. Dörr, E. Pinto, First report of spumigin production by the toxic *Sphaerospermopsis torques-reginae* cyanobacterium, *Toxicon*. 108 (2015) 15–18.
- [13] M. Sanz, R.K. Salinas, E. Pinto, Namalides B and C and Spumigins K–N from the Cultured Freshwater Cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae*, *J. Nat. Prod.* 80 (2017) 2492–2501.
- [14] P.R. Gorham, J. McLachlan, U.T. Hammer, W.K. Kim, Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb: With Plate 7, 1 figure and 3 tables in the text, *Int. Vereinigung Für Theor. Und Angew. Limnol. Verhandlungen*. 15 (1964) 796–804.
- [15] S.T. Lima, D.O. Alvarenga, A. Etchegaray, D.P. Fewer, J. Jokela, A.M. Varani, M. Sanz, F.A. Dörr, E. Pinto, K. Sivonen, Genetic organization of anabaenopeptin and spumigin biosynthetic gene clusters in the cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, *ACS Chem. Biol.* 12 (2017) 769–778.
- [16] G.M. Boratyn, C. Camacho, P.S. Cooper, G. Coulouris, A. Fong, N. Ma, T.L. Madden, W.T. Madden, S.D. McGinnis, Y. Merezuk, BLAST: a more efficient report with usability improvements, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) W29–W33.
- [17] T. Carver, S.R. Harris, M. Berriman, J. Parkhill, J.A. McQuillan, Artemis: an integrated

platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data, *Bioinformatics*. 28 (2011) 464–469.

- [18] L. Zimmermann, A. Stephens, S.-Z. Nam, D. Rau, J. Kübler, M. Lozajic, F. Gabler, J. Söding, A.N. Lupas, V. Alva, A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core, *J. Mol. Biol.* 430 (2018) 2237–2243.
- [19] E.W. Sayers, R. Agarwala, E.E. Bolton, J.R. Brister, K. Canese, K. Clark, R. Connor, N. Fiorini, K. Funk, T. Hefferon, Database resources of the national center for biotechnology information, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) D23.
- [20] K.H.M. Cardozo, V.M. Carvalho, E. Pinto, P. Colepicolo, Fragmentation of mycosporine-like amino acids by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom. An Int. J. Devoted to Rapid Dissem. Up-to-the-Minute Res. Mass Spectrom.* 20 (2006) 253–258.
- [21] Taylor & Francis Group, *Dictionary of Natural Products 28.1*, CRC Press. (2017).
<http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml>.
- [22] H. Laatsch, *AntiBase 2014: The Natural Compound Identifier*, Wiley-Vch. (2014).
<https://application.wiley-vch.de/stmdata/antibase.php>.
- [23] M. Orfanoudaki, A. Hartmann, U. Karsten, M. Ganzera, Chemical profiling of mycosporine-like amino acids in twenty-three red algal species, *J. Phycol.* 55 (2019) 393–403.
- [24] K.T. Miyamoto, M. Komatsu, H. Ikeda, Discovery of gene cluster for mycosporine-like amino acid biosynthesis from Actinomycetales microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 5028–5036.
- [25] K.H.M. Cardozo, R. Vessecchi, S.E. Galembeck, T. Guaratini, P.J. Gates, E. Pinto, N.P. Lopes, P. Colepicolo, A fragmentation study of di-acidic mycosporine-like amino acids in

electrospray and nanospray mass spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.* 20 (2009) 1625–1631.

- [26] R.P. Rastogi, A. Incharoensakdi, Occurrence and induction of a ultraviolet-absorbing substance in the cyanobacterium *Fischerella muscicola* TISTR8215, *Phycol. Res.* 63 (2015) 51–55.
- [27] R.P. Rastogi, A. Incharoensakdi, UV radiation-induced biosynthesis, stability and antioxidant activity of mycosporine-like amino acids (MAAs) in a unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. CU2556, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 130 (2014) 287–292.
- [28] R.P. Rastogi, R.R. Sonani, D. Madamwar, A. Incharoensakdi, Characterization and antioxidant functions of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc* sp. R76DM, *Algal Res.* 16 (2016) 110–118.
- [29] R.P. Sinha, S.P. Singh, D.-P. Häder, Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 89 (2007) 29–35.
- [30] G.F. Bassous, R.F. Calili, Analysis of Brazilian Solar Irradiance Data-Characteristic Curves of Each National Grid Subsystem, in: *New Energy Landsc. Impacts Lat. Am.* 6th ELAEE/IAEE Lat. Am. Conf. April 2-5, 2017, International Association for Energy Economics, 2017.
- [31] A. Portwich, F. Garcia-Pichel, Biosynthetic pathway of mycosporines (mycosporine-like amino acids) in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. strain PCC 6912, *Phycologia.* 42 (2003) 384–392.
- [32] M.A. Pope, E. Spence, V. Seralvo, R. Gacesa, S. Heidelberger, A.J. Weston, W.C. Dunlap, J.M. Shick, P.F. Long, O-Methyltransferase Is Shared between the Pentose Phosphate and Shikimate Pathways and Is Essential for Mycosporine-Like Amino Acid Biosynthesis in *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *ChemBioChem.* 16 (2015) 320–327.
- [33] E.P. Balskus, C.T. Walsh, The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in

cyanobacteria, *Science* (80-.). 329 (2010) 1653–1656.

- [34] M. Katoch, R. Mazmouz, R. Chau, L.A. Pearson, R. Pickford, B.A. Neilan, Heterologous production of cyanobacterial mycosporine-like amino acids mycosporine-ornithine and mycosporine-lysine in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (2016) 6167–6173.
- [35] E. Spence, W.C. Dunlap, J.M. Shick, P.F. Long, Redundant pathways of sunscreen biosynthesis in a cyanobacterium, *ChemBioChem.* 13 (2012) 531–533.
- [36] A.R. Osborn, K.H. Almabruk, G. Holzwarth, S. Asamizu, J. LaDu, K.M. Kean, P.A. Karplus, R.L. Tanguay, A.T. Bakalinsky, T. Mahmud, De novo synthesis of a sunscreen compound in vertebrates, *Elife.* 4 (2015) e05919.
- [37] E. Spence, S.J. Bryan, M. Lisfi, J. Cullum, W.C. Dunlap, J.M. Shick, C.W. Mullineaux, P.F. Long, 2-epi-5-epi-Valiolone synthase activity is essential for maintaining phycobilisome composition in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 when grown in the presence of a carbon source, *Photosynth. Res.* 116 (2013) 33–43.
- [38] R. Bentley, E. Haslam, The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25 (1990) 307–384.
- [39] R. Bode, C. Melo, D. Birnbaum, Mode of action of glyphosate in *Candida maltosa*, *Arch. Microbiol.* 140 (1984) 83–85.

Supporting Information

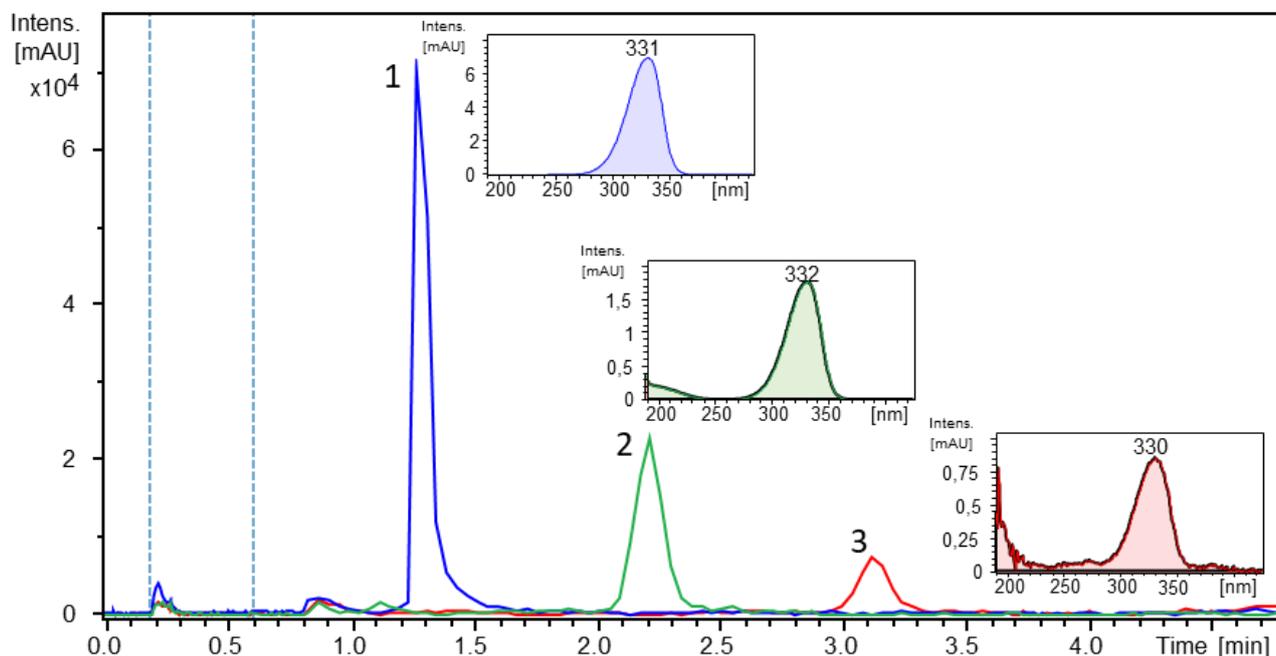


Figure S1. Extracted ion chromatograms (ESI+) and UV spectra of target MAAs: 1 - shinorine $C_{13}H_{20}N_2O_8$ (0.0 ppm; RT 1.1 min), 2 - porphyra-334 $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (-0.9 ppm; RT 2.2 min) and 3- mycosporine-glycine-alanine $C_{13}H_{20}N_2O_7$ (0.3 ppm, RT 3.1 min) from *S. torques-reginae* ITEP-024 biomass extract.

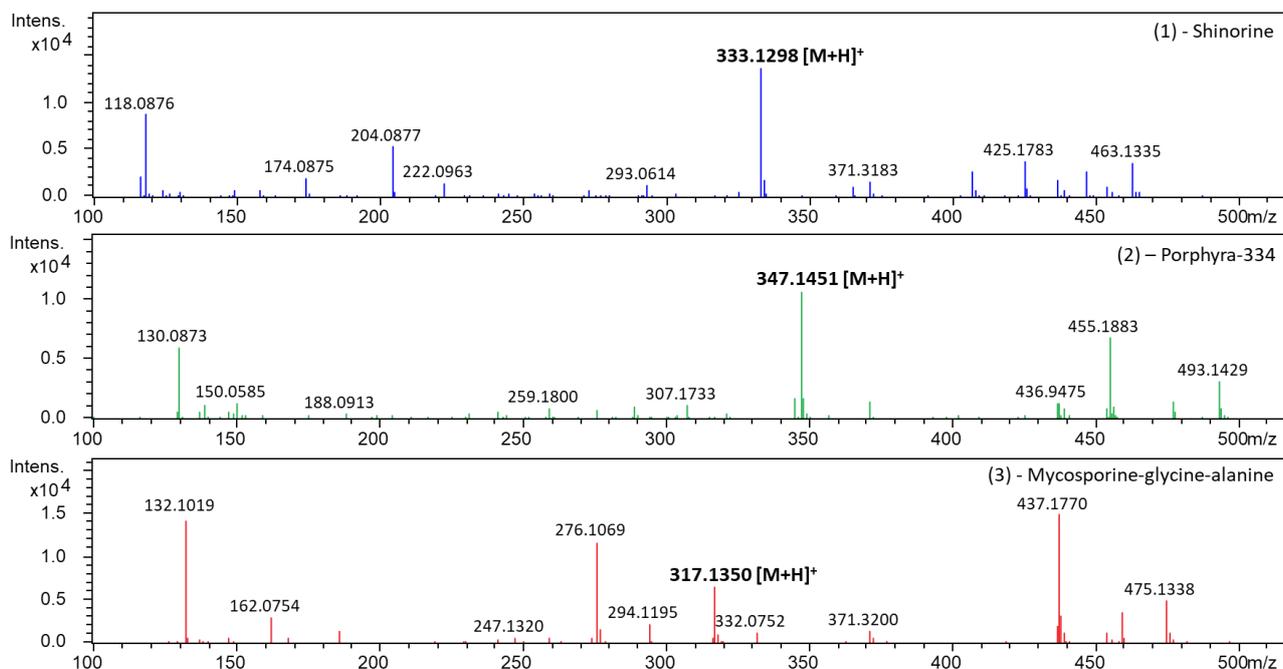


Figure S2. MS Spectra (ESI +) of target MAAs: (1) - shinorine $C_{13}H_{20}N_2O_8$, (2) - porphyra-334 $C_{14}H_{22}N_2O_8$ and (3) - mycosporine-glycine-alanine $C_{13}H_{20}N_2O_7$ from *S. torques-reginae* ITEP-024 biomass extract, 35.3 eV.

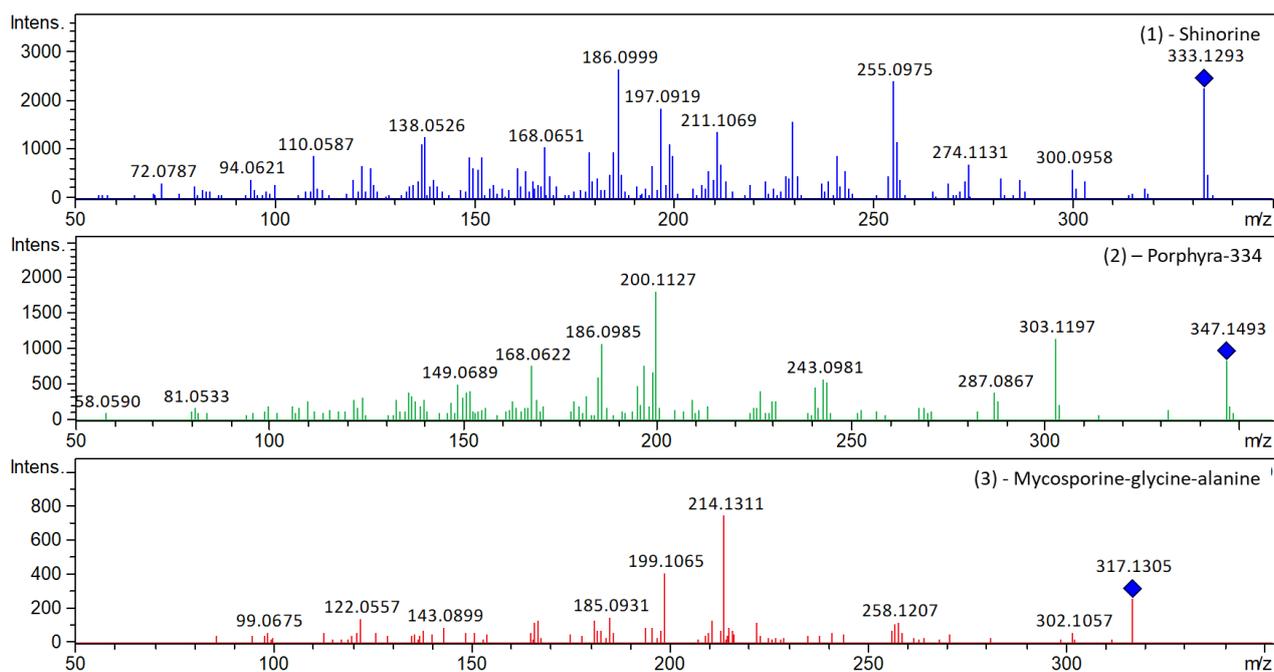


Figure S3. MS/MS Spectra (ESI +) of target MAAs: (1) - shinorine $C_{13}H_{20}N_2O_8$, (2) - porphyra-334 $C_{14}H_{22}N_2O_8$ and (3) - mycosporine-glycine-alanine $C_{13}H_{20}N_2O_7$ from *S. torques-reginae* ITEP-024 biomass extract, 35.3 eV.

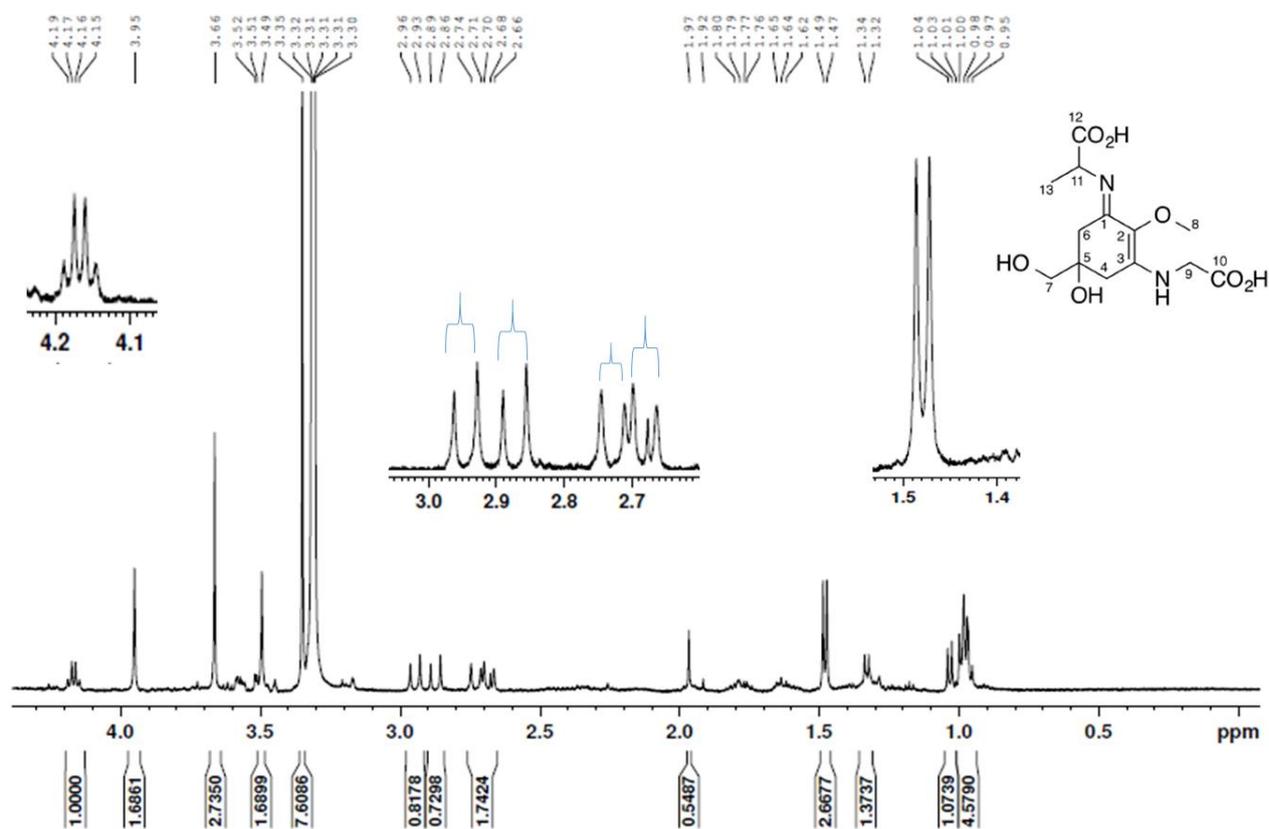


Figure S4. 1H NMR spectrum of mycosporine-glycine-alanine in CD_3OD (500 MHz).

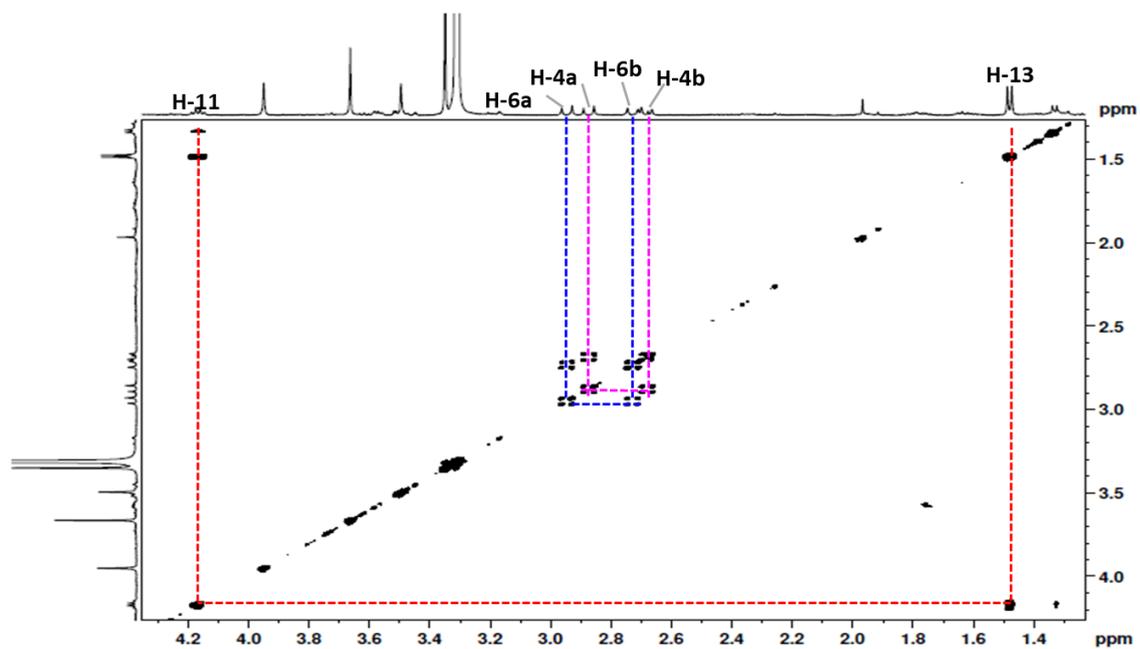


Figure S5. COSY spectrum of mycosporine-glycine-alanine in CD₃OD (500 MHz).

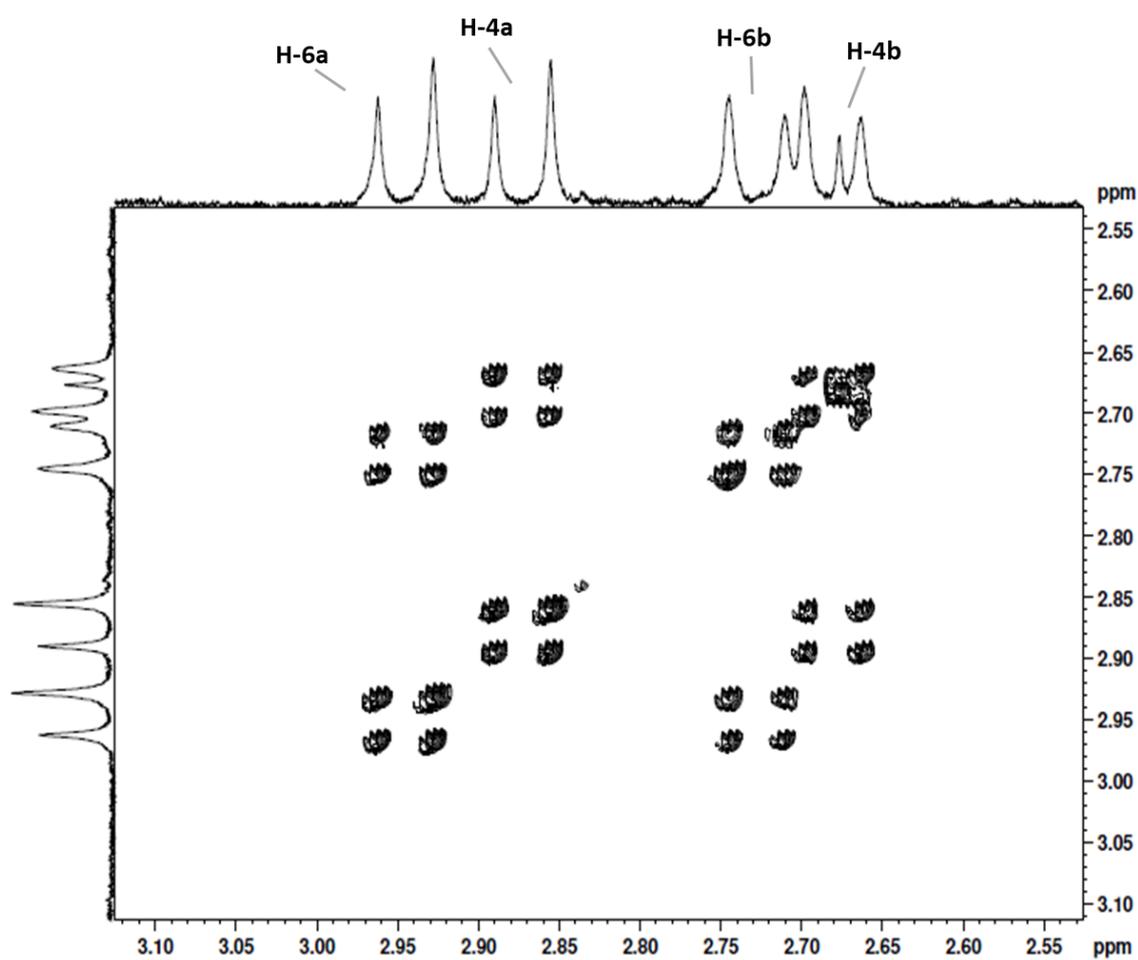


Figure S6. Magnified region of COSY spectrum of mycosporine-glycine-alanine in CD₃OD (500 MHz).

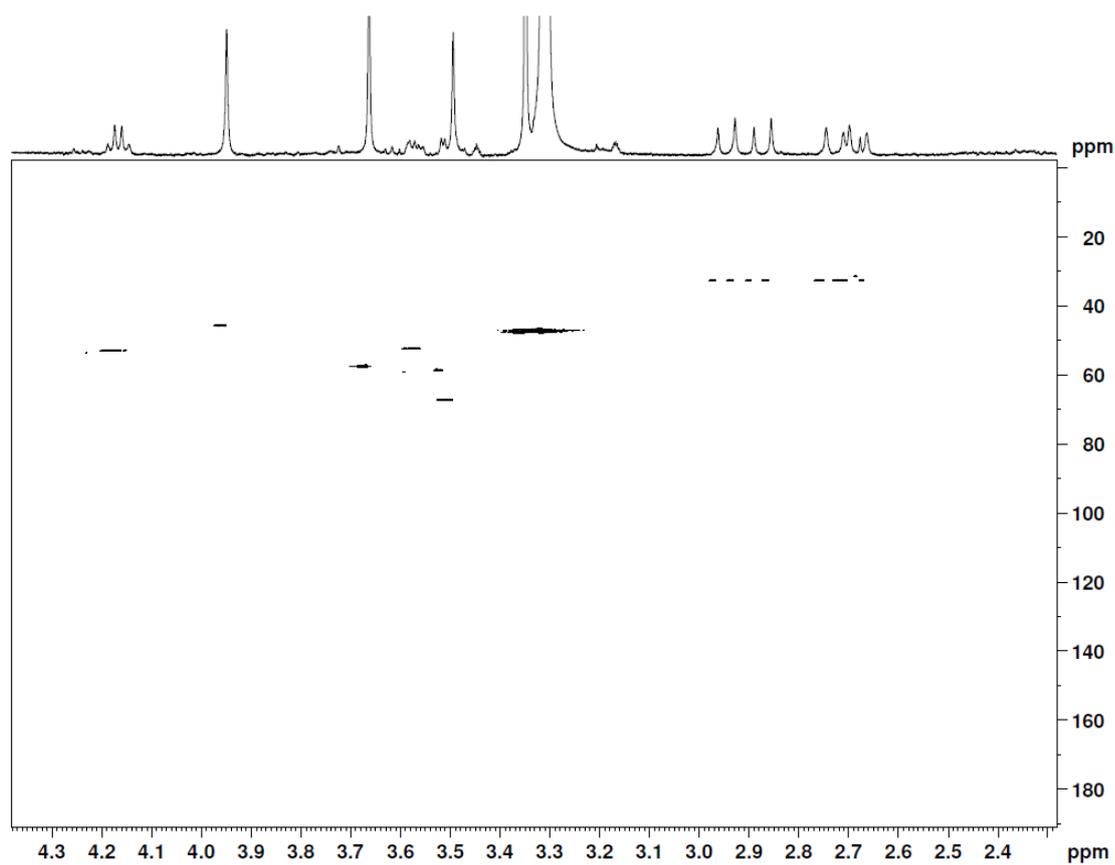


Figure S7. HSQC spectrum of mycosporine-glycine-alanine in CD₃OD (500 MHz).

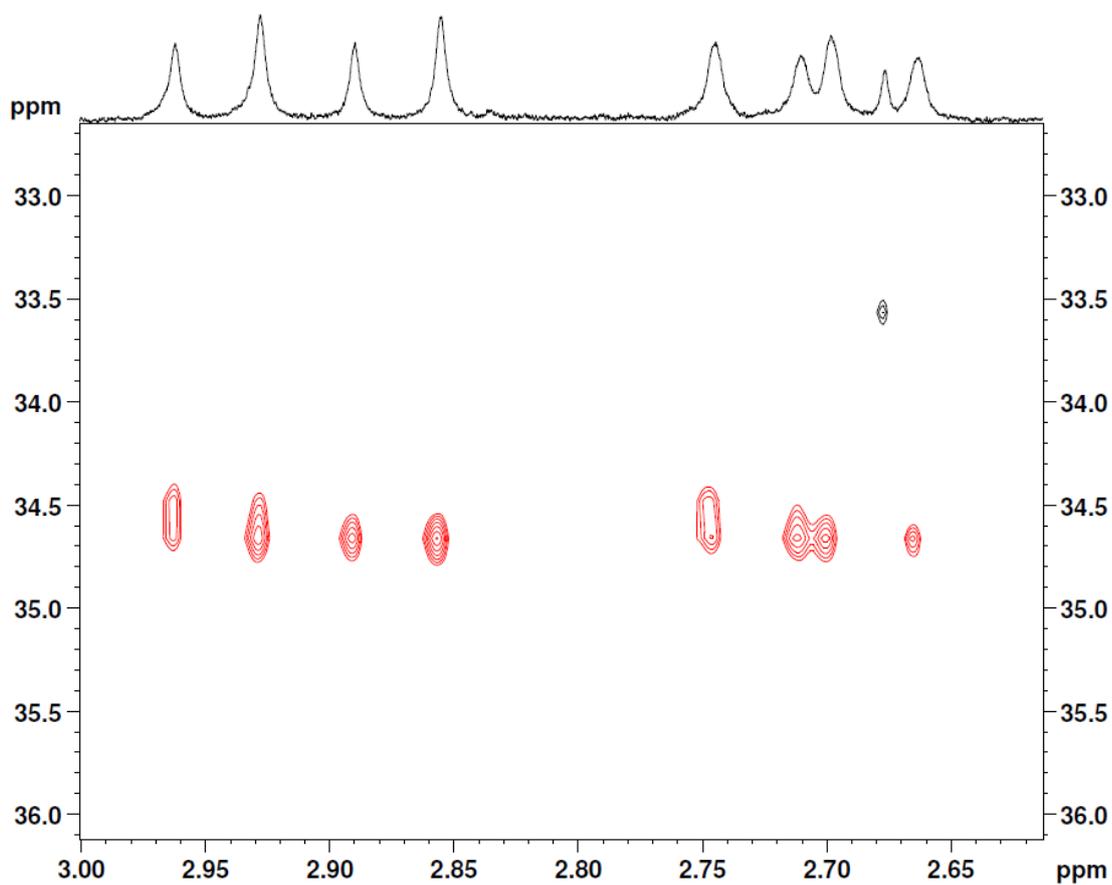


Figure S8. Magnified region of HSQC spectrum of mycosporine-glycine-alanine in CD₃OD (500 MHz).

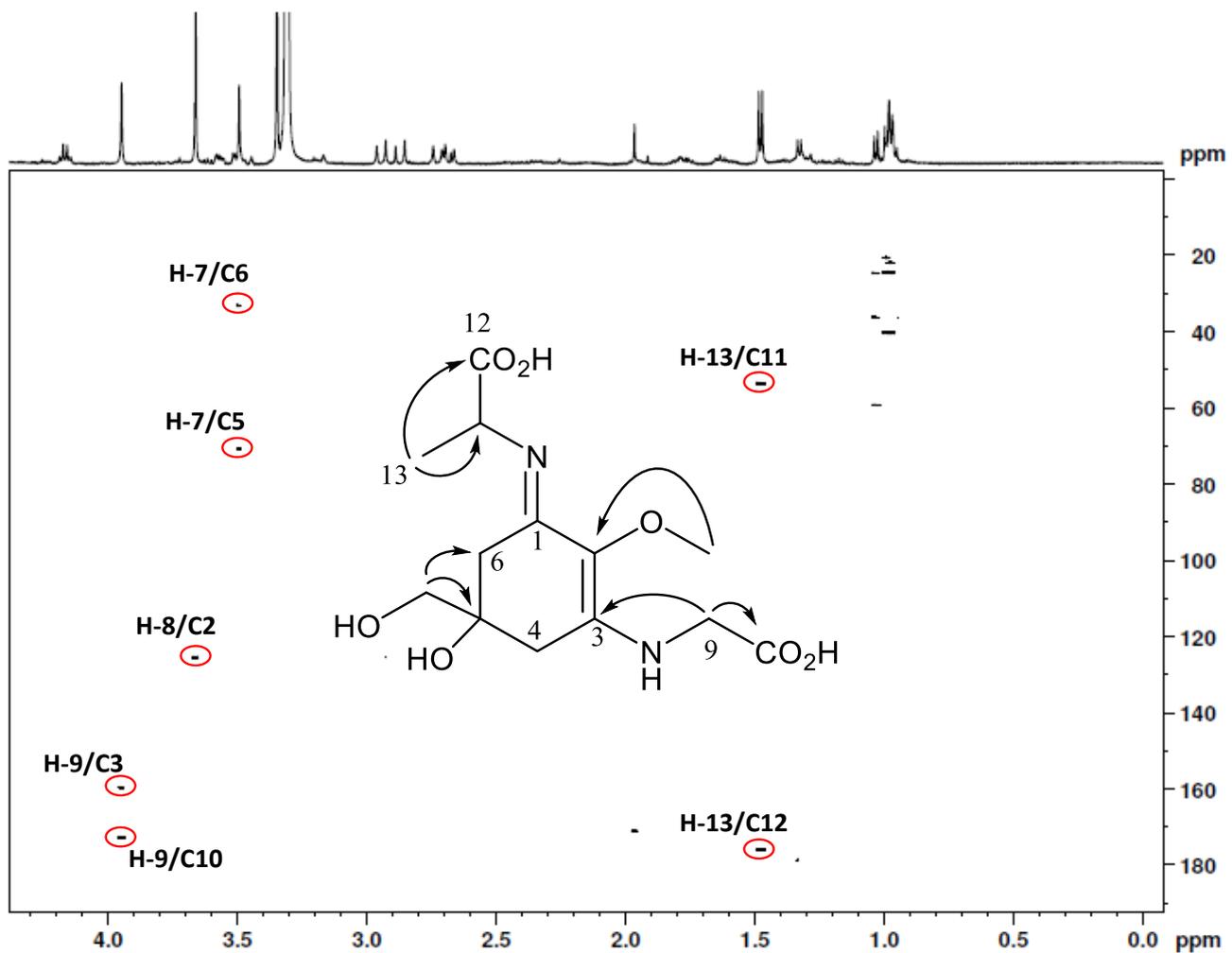


Figure S9. HMBC spectrum of mycosporine-glycine-alanine in CD₃OD (500 MHz).

ANEXO 2

Identification and distribution of mycosporine-like amino acids in Brazilian cyanobacteria by UHPLC-DAD-QTOF

Artigo aceite para publicação

Revista: Rapid Communication in Mass Spectrometry

Aceite: 09 de Outubro de 2019

Identification and distribution of mycosporine-like amino acids in Brazilian cyanobacteria by UHPLC-DAD-QTOF

Vanessa Geraldes¹, Fernanda Rios Jacinavicius¹, Diego Bonaldo Genuário², Ernani Pinto^{1,3}

¹ University of São Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo-SP, Brazil

² Laboratory of Environmental Microbiology, EMBRAPA Environment, 13820-000 Jaguariúna, São Paulo, Brazil

³ Centre for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba-SP, Brazil

*Corresponding author:

e-mail: ernani@usp.br

ABSTRACT

RATIONALE: Mycosporine-like amino acids (MAAs) are UV-absorbing compounds produced by fungi, algae, lichens, and cyanobacteria when exposed to ultra-violet radiation (UVR). These compounds have a photoprotective and an antioxidant function and have been widely studied for possible use in sunscreens and anti-aging products. This study aims to identify MAAs-producing cyanobacteria with potential application in cosmetics.

METHODS: A method for the identification of MAAs was developed using ultra-high-performance liquid chromatography - diode array detection - quadrupole time of flight mass spectrometry (UHPLC-DAD-QTOFMS). Chromatographic separation was carried out using a Luna C18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm) at 30 °C with 0.1% formic acid aqueous solution + 2 mM ammonium formate and acetonitrile/water (8:2) + 0.1 % formic acid as a mobile phase.

RESULTS: Out of the sixty-nine cyanobacteria studied, twenty-six strains (37%) synthesized MAAs. Nine different MAAs were identified in the UHPLC-DAD-HRMS. Imino-mycosporines were the major group detected (7 in 9 MAAs). In terms of abundance, the most representative genera for MAAs production were heterocyte-forming groups. *Oscillatoria* sp. CMMA 1600, from homocyte type, produced the greatest diversity of MAAs.

CONCLUSIONS: The UHPLC-DAD-QTOFMS method is a powerful tool for identification and screening of MAAs in cyanobacteria strains as well as in other organisms such as dinoflagellates, macroalgae, and microalgae. The different cyanobacteria genera isolated from diverse Brazilian biomes and environments are prolific source of MAA.

KEY-WORDS: UV-absorbing compound; Mycosporine-like amino acids (MAAs); Cyanobacteria; Screening; UHPLC-DAD-QTOFMS.

1 INTRODUCTION

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes and therefore highly dependent on photosynthetically active radiation (PAR). Due to the PAR requirement, cyanobacteria have prolonged exposure to ultra-violet radiation (UVR)¹. This exposure can directly incur cell damage due to photophysical and photochemical reactions or indirectly through the accumulation of reactive oxygen species (ROS)². In order to mitigate the negative effects of UVR, cyanobacteria and other organisms, like macroalgae³, dinoflagellates⁴ phytoplankton⁵ and fungi⁶ have evolved several adaptive strategies^{7,8}. Among them, is the ability to synthesize or acquire photoprotective compounds, namely mycosporine-like amino acids (MAAs). Mycosporine-like amino acids (MAAs) are UV-absorbing compounds (310 to 362 nm), water-soluble, small compounds (generally <400) comprised of either an aminocyclohexenone or an aminocyclohexenimine ring conjugated to a nitrogen or amino-alcohol substituent⁷. The mycosporine-like amino acid synthesis is induced under UV radiation and osmotic stresses⁹ its regulation by environmental conditions is not fully understood¹⁰. Up to now, more than 20 MAAs are known¹¹. The MAAs are capable of acting as photo-protective substances¹², and additionally can present other roles such as antioxidant activity¹³ and osmotic functions^{14,15}. Due to their sun-protection ability, low molecular-weight, water-solubility, and high light and heat stability these compounds have been an attractive candidate for possible use in sunscreens and anti-aging products^{16,17}. Recently, some studies demonstrated that the cyanobacteria are promising organisms with relevant secondary metabolites, including MAAs¹⁸⁻²⁰. Although cyanobacteria are promising, the detection of MAAs in the tropical strains, mainly isolated from Brazilian environments, has rarely been explored. Hence, this study aimed to screen MAAs-producing cyanobacteria isolated from different Brazilian environments with potential applications in cosmetics.

2 EXPERIMENTAL

Chemicals

Acetonitrile (J. T. Baker, Xalostoc, Mexico), formic acid, and ammonium formate (Fluka, Seelze, Germany) were LC-MS grade. Ultra-pure water was obtained from a Direct-Q8 water purification system (Millipore, Milford, USA). MAAs standards (palythine, shinorine, and porphyra-334) were kindly provided by Prof. Paul Long from King's College, London.

Cyanobacterial cultures

Cyanobacteria strains were obtained from the culture collection of the Laboratory of Toxins and Natural Products of Algae and Cyanobacteria (LTPNA) at the University of São Paulo (FCF-USP), from the Botanical Institute Cyanobacterial Culture Collection at the Institute of Botany, São Paulo (CCIBt), from the Culture Collection of the Centre for Nuclear Energy in Agriculture at the University of São Paulo (CENA/USP), from the Technological Institute of Pernambuco (ITEP) and from the Culture Collection of Agriculture and Environmental Importance (CMAA) of the Brazilian Agriculture Research Corporation (EMBRAPA) at Jaguariúna, São Paulo. Altogether, 69 cyanobacterial strains were screened in our study for their MAAs content. The strain codes, names and sources are presented in Table 1. Dinoflagellate (*Amphidinium* sp.), microalgae (*Chlorella* sp. and *Desmodesmus* sp.) and macroalgae (*Plocamium brasiliense*) were also tested using the same UHPLC-DAD-QTOFMS method to evaluate the efficiency of this method for MAAs identification in other organisms.

Table 1. Diversity of the cyanobacteria screened for their MAAs content.

Strain code	Name	Source
CCIBt 3106	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Americana Reservoir, 22°44'S and 47°19'W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3168	<i>Rhabdoderma</i> sp.	Billings Reservoir, 23°47'S and 46°35'W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3180	<i>Microcystis panniformis</i>	Heron Lake - IBt, 23°38'30"S and 46°37'14"W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3194	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Billings Reservoir, 23°47'S 46°35'W SP, Atlantic Forest

Strain code	Name	Source
CCIBt 3214	<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	Billings Reservoir, 23°47'S and 46°35'W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3247	<i>Nostoc</i> sp.	Bromeliad, IBt, 23°38'30"S and 46°37'14"W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3265	<i>Desertifilum tharense</i>	Salina da Ponta, 18°59'00"S and 56°39'35"W MS, Pantanal
CCIBt 3275	<i>Desertifilum tharense</i>	Salina da Ponta, 18°59'00"S and 56°37'26"W MS, Pantanal
CCIBt 3289	<i>Calothrix</i> sp.	Santa Virgínia Park, 23°20'S and 45°09'W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3292	<i>Nostoc</i> sp.	Santa Virgínia Park, 23°20'S and 45°09'W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3307	<i>Komarekiella atlantica</i>	Santa Virgínia Park, 23°20'S and 45°09'W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3313	<i>Chlorogloopsis</i> sp.	Santa Virgínia Park, 23°20'S and 45°09'W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3320	<i>Calothrix</i> sp.	Santa Virgínia Park, 23°20'S and 45°09'W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3321	<i>Tolypothrix</i> sp.	Cardoso Island Park, 25°04'12"S and 47°55'27"W, Atlantic Forest
CCIBt 3324	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Cardoso Island Park, 25°04'12"S and 47°55'27"W, Atlantic Forest
CCIBt 3329	<i>Nostoc</i> sp.	Trunk, Pirassununga, 21°59'46"S and 47°25'33"W SP, Cerrado
CCIBt 3330	<i>Cyanosarcina</i> sp.	Pirassununga, 21°59'46"S and 47°25'33"W SP, Cerrado
CCIBt 3338	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Pirassununga, 21°59'46"S and 47°25'33"W SP, Cerrado
CCIBt 3343	<i>Dolichospermum</i> sp.	Jaguari Reservoir, 22°55'27"S and 46°25'30"W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3454	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Billings Reservoir, 23°47'S 46°35'W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3464	<i>Scytonema</i> sp.	Cardoso Island Park, 25°04'12"S and 47°55'27"W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3496	<i>Myxosarcina</i> sp.	Ecological Station Juréia - Itatins, 24°26'S and 47°04'W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>	Cardoso Island Park, 25°04'12"S and 47°55'27"W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3607	<i>Gloecapsa</i> sp.	Prainha, 23°03'97"S and 43°50'53"W RJ, Atlantic Forest

Strain code	Name	Source
CCIBt 3626	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Water pipe system supply, 23°42'28"S and 46°43'24"W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3172	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Riacho Grande Reservoir, 23°52'03"S and 46°63'44"W SP, Atlantic Forest
CENA161	<i>Fischerella</i> sp.	Concrete dam of spring water, Capuava farm, Piracicaba 22°39'25"S and 47°37'24"W SP, Atlantic Forest
CENA21	<i>Nostoc piscinale</i>	Floodplain soil of Mari-Mari Island, Solimões River, 02°45'00"S, 65°15'00"W AM, Amazon
CENA543	<i>Nostoc</i> sp.	Lake Salina 67 Mil, 19°27'42"S, 56°08'21"W MS, Pantanal
CENA596	<i>Nodularia spumigena</i>	Shrimp production pond, 32°12'19"S, 52°10'42"W RS, Cassino Beach
CMAA 1554	<i>Alkalinema</i> sp.	Amazonas river, 03°08'58"S and 58°31'11"W AM, Amazon
CMAA 1556	<i>Pantanalinema rosaneae</i>	Amazonas river, 03°08'58"S and 58°31'11"W AM, Amazon
CMAA 1557	<i>Planktothrix mougeotti</i>	Solimões river, 03°14'34"S and 60°00'28"W AM, Amazon
CMAA 1598	<i>Cronbergia amazonensis</i>	Solimões river, 03°14'34"S and 60°00'28"W AM, Amazon
CMAA 1600	<i>Oscillatoria</i> sp.	Solimões river, 03°14'34"S and 60°00'28"W AM, Amazon
CMAA 1601	<i>Tolypothrix</i> sp.	Amazonas river, 03°08'58"S and 58°31'11"W AM, Amazon
CMAA 1602	<i>Amazoninema brasiliense</i>	Solimões river, 03°14'33"S and 60°00'28"W AM, Amazon
CMAA 1605	<i>Aliinostoc</i> sp.	Amazonas river, 03°08'58"S and 58°31'11"W AM, Amazon
CMAA 1606	<i>Aliinostoc</i> sp.	Amazonas river, 03°08'15"S and 58°29'51"W AM, Amazon
CMAA 1663	<i>Tolypothrix</i> sp.	Solimões river, 03°14'34"S and 60°00'28"W AM, Amazon
CMAA 1664	<i>Tolypothrix</i> sp.	Solimões river, 03°14'33"S and 60°00'28"W AM, Amazon
CMAA 1668	<i>Tolypothrix</i> sp.	Solimões river, 03°14'33"S and 60°00'28"W AM, Amazon
CMAA 1670	<i>Calothrix</i> sp.	Amazonas river, 03°08'58"S and 58°31'11"W AM, Amazon
CMAA 1675	<i>Tolypothrix</i> sp.	Solimões river, 03°14'33"S and 60°00'28"W AM, Amazon

Strain code	Name	Source
LTPNA DBG 07	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Negro river, 03°01'50"S and 60°09'07"W AM, Amazon
LTPNA DBG 08	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Solimões river, 03°14'33"S and 60°00'28"W AM, Amazon
LTPNA DBG 12	<i>Tolypothrix</i> sp.	Amazonas river, 03°08'58.2"S and 58°31'11"W AM, Amazon
LTPNA DBG 27	<i>Aliinostoc</i> sp.	Solimões river, 03°14'33"S and 60°00'28.6"W AM, Amazon
LTPNA DBG 28	<i>Aliinostoc</i> sp.	Solimões river, 03°14'33"S and 60°00'28"W AM, Amazon
LTPNA DBG 44	<i>Tolypothrix</i> sp.	Solimões river, 03°14'34"S and 60°00'28"W AM, Amazon
LTPNA DBG 46	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Amazonas river, 03°08'58"S and 58°31'11"W AM, Amazon
LTPNA DBG 52	<i>Aliinostoc</i> sp.	Solimões river, 03°14'33"S and 60°00'28"W AM, Amazon
LTPNA DBG 54	<i>Calothrix</i> sp.	Solimões river, 03°14'33"S and 60°00'28"W AM, Amazon
LTPNA DBG 55	<i>Aliinostoc</i> sp.	Solimões river, 03°14'34"S and 60°00'28"W AM, Amazon
LTPNA DBG 62	<i>Aliinostoc</i> sp.	Solimões river, 03°14'34"S and 60°00'28"W AM, Amazon
LTPNA DBG 72	<i>Nostoc</i> sp.	Solimões river, 03°14'33"S and 60°00'28"W AM, Amazon
LTPNA DBG 83	<i>Nostoc</i> sp.	Negro river, 03°01'50"S and 60°09'07"W AM, Amazon
LTPNA DBG 92	<i>Tolypothrix</i> sp.	Amazonas river, 03°08'15"S and 58°29'51"W AM, Amazon
LTPNA DBG 94	<i>Nostoc</i> sp.	Solimões river, 03°14'34"S and 60°00'28"W AM, Amazon
ITEP-018	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Tabocas Reservoir, e 08°06'15"S and 36°13'23"W PE, Caatinga
ITEP-030	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Ornamental lake (ITEP), 8°03'32"S and 34°56'53"W PE, Caatinga
LTPNA-01	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Salto Grande Reservoir, 22°44'S and 47°20'W SP, Atlantic Forest
LTPNA-02	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Salto Grande Reservoir, 22°44'S and 47°20'W SP, Atlantic Forest
LTPNA-06	<i>Limnothrix redekei</i>	Billings Reservoir (Taquacetuba arm), 23°48'26"S; 46° 37'29"W SP, Atlantic Forest

Strain code	Name	Source
LTPNA-07	<i>Limnothrix redekei</i>	Billings Reservoir (Taquacetuba arm), 23°48'26"S; 46°37'29"W SP, Atlantic Forest
LTPNA-08	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Salto Grande Reservoir, 22°44'S and 47°20'W SP, Atlantic Forest
LTPNA-09	<i>Microcystis</i> sp.	Salto Grande Reservoir, 22°44'S and 47°20'W SP, Atlantic Forest
LTPNA-10	<i>Oscillatoria</i> sp.	Billings Reservoir (Taquacetuba arm), 23°48'26"S; 46°37'29"W SP, Atlantic Forest
LTPNA-10A	<i>Planktothrix mougeotti</i>	Billings Reservoir (Taquacetuba arm), 23°48'26"S; 46°37'29"W SP, Atlantic Forest

Extraction and sample preparation

Prior to LC/MS analyses, 5 mg of lyophilized material of each cyanobacterium was extracted with 0.1 % (v/v) formic acid aqueous solution + 2 mM of ammonium hydroxide. No ultrasonic treatment of the lyophilized cyanobacteria or any other approach to lyse or homogenize the cells were used. Cell debris was removed by centrifugation at 10000 x g for 15 min, and the supernatant was filtered through a 0.45 µm PVDF syringe filters (Analitica, São Paulo, Brazil) into HPLC autosampler vials prior to LC/MS analyses.

UHPLC-DAD-HRMS conditions

Analyses were carried out on a LC-20D Shimadzu Prominence system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a diode-array detector (DAD) - SPD M20A coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics, MA, USA) with an electrospray source.

Chromatography

Sample extracts were injected (10 µL) onto a Synergi 4µ Hydro-RP 80 A column (150 x 2,0 mm) (Phenomenex, USA). Analytes eluted at a flow rate of 0.4 mL/min with 0.1 % (v/v) formic acid solution + 2 mM ammonium formate (buffer A). Eluent B was acetonitrile/Milli-Q water (8:2) + 0.1 % (v/v) formic acid. The gradient used for the separation was 100 % A at the start of the run up 2 min, 95 % B at 6 min, where the gradient was held for 1.5 min, followed by a 4 min equilibration at 0 % B prior to the next injection.

Mass spectrometry

The ionization source conditions were the following: positive ionization, capillary potential of 4500 V, temperature of drying nitrogen gas 200 °C at a flow rate of 9 mL/min, and a nebulizer pressure of 60 psi. Mass spectra were acquired using electrospray ionization in the positive mode over a range from m/z 50 to 500. The QTOF instrument was operated in scan and auto MS/MS mode, performing MS/MS experiments on the three most intense ions from each MS survey scan. The chromatogram was monitored at 330 nm. Accurate mass data were processed using Data Analysis 4.4 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

3 RESULTS AND DISCUSSION

UHPLC-DAD-HRMS analysis of analytical standards

The standards palythine, shinorine and porphyra-334 were initially analysed by UHPLC-DAD-HRMS to confirm the applicability of the method for MAAs identification and to discover their retention time. UV absorption maxima and MS/MS spectra of the standards are shown in Figure S1 (supporting information) and were compared with literature²¹. The molecular formulae $C_{10}H_{16}N_2O_5$ (palythine), $C_{13}H_{20}N_2O_8$ (shinorine) and $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (porphyra-334) were measured at m/z 245.1132 (-0.1 ppm), m/z 333.1292 (1.0 ppm) and m/z 347.1441 (2.3 ppm) and they were eluted at 1.5 min, 1.3 min and 2.1 min respectively.

Screening of MAAs in cyanobacteria extracts

Nine different MAAs (mass error < 5ppm and m sigma < 20 were considered) were identified in the UHPLC-DAD-HRMS. The structures of the identified MAAs are shown in Figure 1, and UV absorption maxima, retention times, calculated m/z values and fragmentation patterns are shown in Table 2. Assignments were made by comparing the UV spectra, MS (exact mass and isotopic distribution) and MS/MS data with data found in the literature for these compounds. Out of the sixty-nine cyanobacteria studied, twenty-six strains (37%) synthesized MAAs (Table 3). Among them, 62%, were recovered from freshwater, 19% terrestrial, 11% aerophytic, and 8% saline/marine water. Most of the knowledge from Brazilian cyanobacteria was acquired from lentic aquatic environments²², and the terrestrial, aerophytic, and saline/marine forms have been explored only recently. Thus, this work shows the importance of exploring different environments, because the MAAs were identified from different habitats. Brazil is geographically distributed among six terrestrial biomes (Amazon, Atlantic Forest, Caatinga, Cerrado, Pantanal, and Pampa) and one marine biome (Atlantic Ocean).

Despite the high diversity of cyanobacteria in the Brazilian biomes, the biotechnological applications and diversity of cyanobacteria in tropical environments are poorly explored²³. In this study, the cyanobacteria isolated from Amazon proved to be the most promising source of MAAs when compared to the other Brazilian biomes, followed by the Atlantic Forest. Although these findings are strongly supported, they could be biased by the restricted number of cyanobacteria strains isolated from the remaining biomes. Most of the MAAs-producing cyanobacteria species can synthesize both shinorine and porphyra-334²⁴. The strains *Nodularia spumigena* CENA 596 and *Chlorogloopsis* sp. CCIBt 3307 were able to synthesize these two compounds. Regarding the morphological identification, all the *Aliinostoc* strains isolated from Amazon biome synthesized shinorine, except for *Aliinostoc* sp. LTPNA DBG 55 which was not able to produce any MAA. On the other hand, none of the *Microcystis* strains analysed showed MAAs production. However, high concentrations of shinorine and several unknown MAAs were already reported in the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*²⁵. Hu and co-workers (2015) suggested a structural role of MAAs in the sheath of *Microcystis* and emphasized that its production is irregularly distributed within this genus. This demonstrated that same species of cyanobacteria isolated from the same environments may or may not synthesize MAAs²⁶. Other promising MAAs producing genera are *Tolypothrix* and *Calothrix*. All the MAAs-producing *Tolypothrix* strains were recovered from Amazon rivers and produced palythine-serine and palythine-threonine except LTPNA DBG92, which synthesized *N*-methyl palythine. Regarding the two MAAs-producing *Calothrix* strains, one was isolated from the Atlantic Forest and the other from the Amazon and both synthesized *N*-methyl palythine. In terms of abundance, the most representative genera for MAAs production were heterocyte-forming groups such as *Aliinostoc*, *Tolypothrix* and *Calothrix*. One study showed that MAAs can act as an intracellular nitrogen reservoir and their synthesis is regulated by nitrogen availability²⁷. Although the heterocyte-forming groups were the most representative in terms of abundance MAAs synthesized, the strain *Oscillatoria* sp. CMMA 1600, from homocyte type, produced the greatest diversity of compounds in this group. The MAAs can be divided into two groups: imino-mycosporines and oxo-mycosporines. In this study, imino-mycosporines were the major group detected (9 accounting for >77% of the total MAAs). This group is the most common in cyanobacteria²⁴. These MAAs contain an amino-cyclohexenimine ring linked to an amino acid, amino alcohol or amino group, with an absorption maximum between 320 and 360 nm²⁸. Within it, shinorine was the major MAA identified (found in 10 strains), followed by *N*-methylpalythine (found in 6 strains). Oxo-mycosporines appear exclusively in terrestrial organisms, mainly in fungi with only two

exceptions: mycosporine-glycine²⁴ and mycosporine-aurine that have been found in sea anemones^{28,29}. These compounds possess a ciclohexenone ring system linked with an amino acid (oxocarbonyl-MAAs), with an absorption maximum at 310 nm²⁸. Mycosporine-glycine was detected in two strains: *Cyanosarcina* sp. CCIBt 3330 and *Scytonema* sp. CCIBt 3464 which also produces *N*-methylpalythine. Furthermore, the current study demonstrated that two cyanobacterial strains synthesize mycosporine-ornithine. *Nostoc* sp. CCIBt 3329 was isolated from a tree trunk, and *Leptolyngbya* sp. DBG 07 isolated from freshwater in Negro river (Figure S2, supporting information). This indicated that mycosporine-ornithine, as mycosporine-glycine and mycosporine-aurine, is not exclusively from terrestrial organisms and could be synthesized by aquatic cyanobacteria. Two glycosylated MAAs were also found in this study. One MAA with an absorption maximum at 320 nm and a molecular mass of 436 Da was identified as a hexose-bound palythine-serine derivative. Another MAA with an absorption maximum at 322 nm and molecular mass of 450 Da was identified as a hexose-bound palythine-threonine derivative^{30,31}. Hexose-bound palythine-serine was found in two cyanobacterial strains, *Nostoc* sp. DBG 72 and *Oscillatoria* sp. CMAA 1600. Besides that, *Nostoc* sp. DBG 72 also synthesizes palythine-serine (Figure S3, supporting information). Hexose-bound palythine-serine can be produced by the glycosylation of palythine-serine. The MAA hexose-bound palythine-threonine was found only in *Oscillatoria* sp. CMAA 1600, which simultaneously produces four types of MAAs: hexose-bound palythine-threonine, palythine-serine, palythine-threonine and porphyrin-334 (Figure S4, supporting information). As previously suggested, hexose-bound palythine-serine can be produced by the glycosylation of palythine-serine, and hexose-bound palythine-threonine can be synthesized by the glycosylation of palythine-threonine. However, Nazifi and co-workers (2013) proposed another biosynthetic pathway for the hexose-bound palythine-threonine³¹. These authors proposed that the glycosylation of porphyrin-334 can generate the 508-Da MAA, and the 450-Da MAA can be formed via the elimination of a portion of glycine from the 508-Da MAA. However, in this study, 508-Da MAA was not detected, suggesting that the pathway proposed in this study should be the most likely for the biosynthesis of hexose-bound palythine-threonine.

Table 2. Mycosporine-like amino acids found in screened cyanobacteria and their UV absorption maxima, retention times (this study), calculated m/z values, and fragmentation patterns (references and this study).

MAAs	λ_{\max} (nm)	RT (min)	$[M+H]^+$	Fragmentation patterns	Reference
Mycosporine-glycine	310	1.2	246.0972	57, 84, 100,117, 143, 171, 231	32
N-methylpalythine	330	2.0	259.1288	151, 171, 185, 200. 223	33
Palythine-Serine	320	1.3	275.1238	172, 207, 216, 229, 242, 245, 257, 260	30
Palythine-Threonine	321	2.4	289.1394	172, 230, 256, 274	34
Mycosporine-Ornithine	310	2.1	303.1551	116, 188, 258	35
Shinorine	334	1.3	333.1292	186, 230, 274, 303 318	36
Porphyra-334	334	2.1	347.1449	186, 227, 288, 303, 332	36
Hexose-bound Palythine-Serine	320	1.6	437.1766	142, 171, 207, 241, 257, 275	30
Hexose--bound Palythine-Threonine	322	2.7	451.1896	91, 185, 245. 289	31

Figure 1. Structure of mycosporine-like amino acids identified in this study. Hexose-bound palythine-serine and hexose-bound palythine-threonine structures were proposed according to Nazifi et al. 2013³¹.

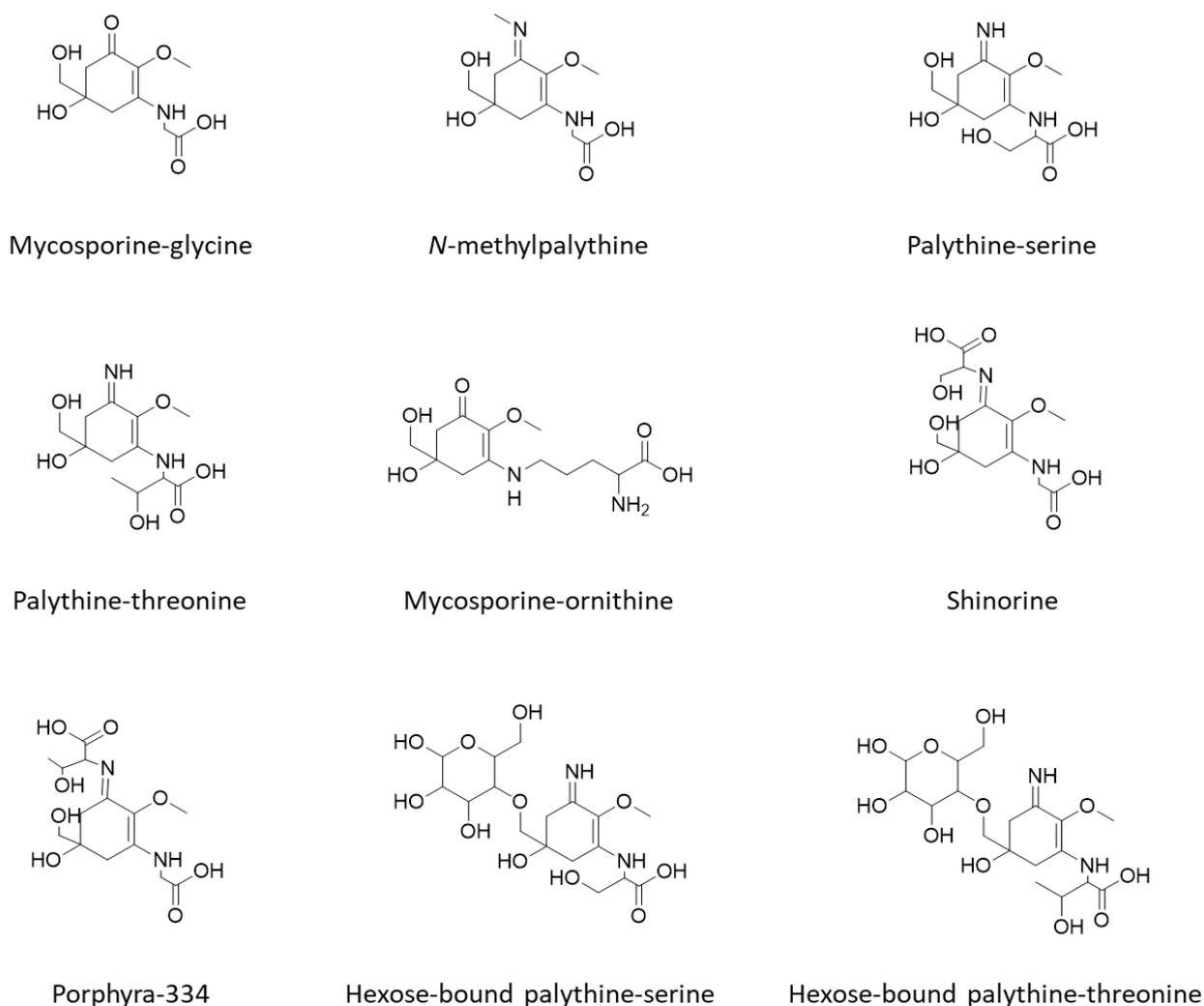


Table 3. Mycosporine-like amino acids identified in cyanobacterial strains.

Strain code	Name	MG	N-MePi	PiS	PiT	MO	Sh	P-334	Hexose-PiS	Hexose-PiT
CCIBt 3289	<i>Calothrix</i> sp.	.	X
CCIBt 3307	<i>Komarekiella atlantica</i>	X	X	.	.
CCIBt 3329	<i>Nostoc</i> sp.	X
CCIBt 3330	<i>Cyanosarcina</i> sp.	X
CCIBt 3343	<i>Dolichospermum</i> sp.	X	.	.	.
CCIBt 3464	<i>Scytonema</i> sp.	X	X
CCIBt 3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>	.	X
CCIBt 3626	<i>Leptolyngbya</i> sp.	.	X
CENA 161	<i>Fischerella</i> sp.	X	.	.	.
CENA 596	<i>Nodularia spumigena</i>	X	X	.	.
CMAA 1600	<i>Oscillatoria</i> sp.	.	.	X	X	.	.	X	X	X
CMAA 1605	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.
CMAA 1606	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.
CMAA 1668	<i>Tolypothrix</i> sp.	.	.	X	X
CMAA 1670	<i>Calothrix</i> sp.	.	.	X	X
CMAA 1675	<i>Tolypothrix</i> sp.	.	X
LTPNA DBG 07	<i>Leptolyngbya</i> sp.	X
LTPNA DBG 27	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.
LTPNA DBG 28	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.
LTPNA DBG 44	<i>Tolypothrix</i> sp.	.	.	X	X
LTPNA DBG 52	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.
LTPNA DBG 62	<i>Aliinostoc</i> sp.	X	.	.	.
LTPNA DBG 72	<i>Nostoc</i> sp.	.	.	X	X	.
LTPNA DBG 92	<i>Tolypothrix</i> sp.	.	X
LTPNA DBG 94	<i>Nostoc</i> sp.	.	.	.	X

MG – Mycosporine-glycine; N-MePi – N-methylpalythine; PiS – Palythine-serine; PiT – Palythine-threonine; MO – Mycosporine-ornithine; Sh – Shinorine; P-334 – Porphyrin-334; Hexose-PiS – Hexose-palythine-serine; Hexose-PiT – Hexose-palythine-threonine

Dinoflagellate (*Amphidinium* sp.), microalgae (*Chlorella* sp. and *Desmodesmus* sp.) and macroalgae (*Porphyra* sp and *Plocamium brasiliense*) were also tested for MAAs production using the same UHPLC-DAD-QTOFMS method. The data analysis showed that *Amphidinium* sp., *Porphyra* sp. and *Plocamium brasiliense* synthesized diverse types of MAAs and other MAAs not detected in cyanobacteria (Figure S5-S7, supporting information). In this direction, the method could be a useful tool for mycosporine-like amino acids discovery in other groups of organisms.

4 CONCLUSIONS

The UHPLC-DAD-QTOFMS method described herein is feasible and showed to be fast, reliable and a powerful tool for identification and screening of MAAs in cyanobacteria strains as well as in other organisms such as dinoflagellates, macroalgae, and microalgae. This comprehensive screening of cyanobacterial strains for MAA production revealed that different cyanobacteria genera isolated from diverse Brazilian biomes and environments are prolific sources of various types of MAAs. Different biomes and environments were not correlated with MAAs production in the cyanobacterial strains analysed.

5 ETHICAL STATEMENT

No animal or human subjects were used in the study encompassed by the manuscript titled “Identification, and distribution of mycosporine like amino acids in aqueous extracts of cyanobacterial isolates from Brazil using a ultra-high-performance liquid chromatography - diode array detection - quadrupole time of flight mass spectrometry”.

6 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest.

7 ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported through a grant by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) - 2014/50420-9 and 2014/26131-7, University of São Paulo Foundation (FUSP) - Project #1979, Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq) - 311048/2016-1, 439065/2018-6 and 141253/2018-5 and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Project # 23038.001401/2018-92 and 2018/1.1065.9.1.

8 ORCID

Vanessa Geraldes: <https://orcid.org/0000-0003-2843-9456>

Fernanda Rios Jacinavicius: <https://orcid.org/0000-0002-8140-209X>

Diego Bonaldo Genuário: <https://orcid.org/0000-0001-6884-331X>

Ernani Pinto: <https://orcid.org/0000-0001-7614-3014>

9 REFERENCES

1. Rastogi RP, Sinha RP, Moh SH, et al. Ultraviolet radiation and cyanobacteria. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2014;141:154-169. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.020>
2. He Y-Y, Häder D-P. Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1(10):729-736. doi:10.1039/B110365M
3. Hartmann A, Murauer A, Ganzera M. Quantitative analysis of mycosporine-like amino acids in marine algae by capillary electrophoresis with diode-array detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;138:153-157.
4. Carreto JI, Carignan MO, Daleo G, Marco SG De. Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*: UV-photoprotective compounds?

J Plankton Res. 1990;12(5):909-921.

5. Riemer U, Lamare MD, Peake BM. Temporal concentrations of sunscreen compounds (Mycosporine-like Amino Acids) in phytoplankton and in the New Zealand krill, *Nyctiphanes australis* GO Sars. *J Plankton Res.* 2007;29(12):1077-1086.
6. Sinha RP, Singh SP, Häder D-P. Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2007;89(1):29-35.
7. Shick JM, Dunlap WC. Mycosporine-Like Amino Acids and Related Gadusols: Biosynthesis, Accumulation, and UV-Protective Functions in Aquatic Organisms. *Annu Rev Physiol.* 2002;64(1):223-262. doi:10.1146/annurev.physiol.64.081501.155802
8. Singh SP, Kumari S, Rastogi RP, Singh KL, Sinha RP. Mycosporine-like amino acids (MAAs): Chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. *Indian J Exp Biol.* 2008;46(1):7-17.
9. Karsten U. Effects of salinity and ultraviolet radiation on the concentration of mycosporine-like amino acids in various isolates of the benthic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Phycol Res.* 2002;50(2):129-134.
10. Browne N, Donovan F, Murray P, Saha SK. Cyanobacteria as bio-factories for production of UV-screening compounds. *OA Biotechnol.* 2014;3(6).
11. Wada N, Sakamoto T, Matsugo S. Mycosporine-Like Amino Acids and Their Derivatives as Natural Antioxidants. *Antioxidants.* 2015;4(3):603-646. doi:10.3390/antiox4030603
12. Lawrence KP, Long PF, Young AR. Mycosporine-Like Amino Acids for Skin Photoprotection. *Curr Med Chem.* 2017;25(40):5512-5527. doi:10.2174/0929867324666170529124237
13. Gacesa R, Lawrence KP, Georgakopoulos ND, et al. The mycosporine-like amino acids

porphyrin-334 and shinorine are antioxidants and direct antagonists of Keap1-Nrf2 binding. *Biochimie*. 2018;154:35-44.

14. Oren A. Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria. *Geomicrobiol J*. 1997;14(3):231-240.
15. Singh SP, Klisch M, Sinha RP, Häder D-P. Effects of abiotic stressors on synthesis of the mycosporine-like amino acid shinorine in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Photochem Photobiol*. 2008;84(6):1500-1505.
16. Chrapusta E, Kaminski A, Duchnik K, Bober B, Adamski M, Bialczyk J. Mycosporine-like amino acids: potential health and beauty ingredients. *Mar Drugs*. 2017;15(10):326.
17. Kageyama H, Waditee-Sirisattha R. Mycosporine-like amino acids as multifunctional secondary metabolites in cyanobacteria: From biochemical to application aspects. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol 59. Elsevier; 2018:153-194.
18. Ngoennet S, Nishikawa Y, Hibino T, Waditee-Sirisattha R, Kageyama H. A Method for the Isolation and Characterization of Mycosporine-Like Amino Acids from Cyanobacteria. *Methods Protoc*. 2018;1(4):46. doi:10.3390/mps1040046
19. Pathak J, Ahmed H, Rajneesh A, Singh SP, Häder D-P, Sinha RP. Genetic regulation of scytonemin and mycosporine-like amino acids (MAAs) biosynthesis in cyanobacteria. *Plant Gene*. 2019;17. doi:10.1016/j.plgene.2019.100172
20. Yang G, Cozad MA, Holland DA, Zhang Y, Luesch H, Ding Y. Photosynthetic production of sunscreen shinorine using an engineered cyanobacterium. *ACS Synth Biol*. 2018;7(2):664-671.
21. Cardozo KHM, Carvalho VM, Pinto E, Colepicolo P. Fragmentation of mycosporine-like amino acids by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom An Int J Devoted to Rapid Dissem Up-to-the-Minute Res Mass Spectrom*. 2006;20(2):253-258.

22. Sant'Anna CL, Branco LHZ, Júnior G, Arantes W, Werner VR. Lista de Cyanobacteria do estado de São Paulo. *Biota Neotrop.* 2011;455-495.
23. Rigonato J, Alvarenga DO, Fiore MF. Tropical cyanobacteria and their biotechnological applications. In: *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*. Springer; 2017:139-167.
24. Sinha RP, Häder D-P. UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Sci.* 2008;174(3):278-289.
25. Liu Z, Häder D-P, Sommaruga R. Occurrence of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J Plankton Res.* 2004;26(8):963-966. doi:10.1093/plankt/fbh083
26. Hu C, Völler G, Süßmuth R, Dittmann E, Kehr J. Functional assessment of mycosporine-like amino acids in *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806. *Environ Microbiol.* 2015;17(5):1548-1559.
27. Peinado NK, Abdala Díaz RT, Figueroa FL, Helbling EW. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *J Phycol.* 2004;40(2):248-259.
28. Carreto JJ, Carignan MO. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Mar Drugs.* 2011;9(3):387-446.
29. Volkmann M, Gorbushina AA. A broadly applicable method for extraction and characterization of mycosporines and mycosporine-like amino acids of terrestrial, marine and freshwater origin. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;255(2):286-295.
30. D'Agostino PM, Javalkote VS, Mazmouz R, Pickford R, Puranik PR, Neilan BA. Comparative profiling and discovery of novel glycosylated mycosporine-like amino acids in two strains of the cyanobacterium *Scytonema cf. crispum*. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(19):5951-5959.
31. Nazifi E, Wada N, Yamaba M, et al. Glycosylated porphyra-334 and palythine-threonine from

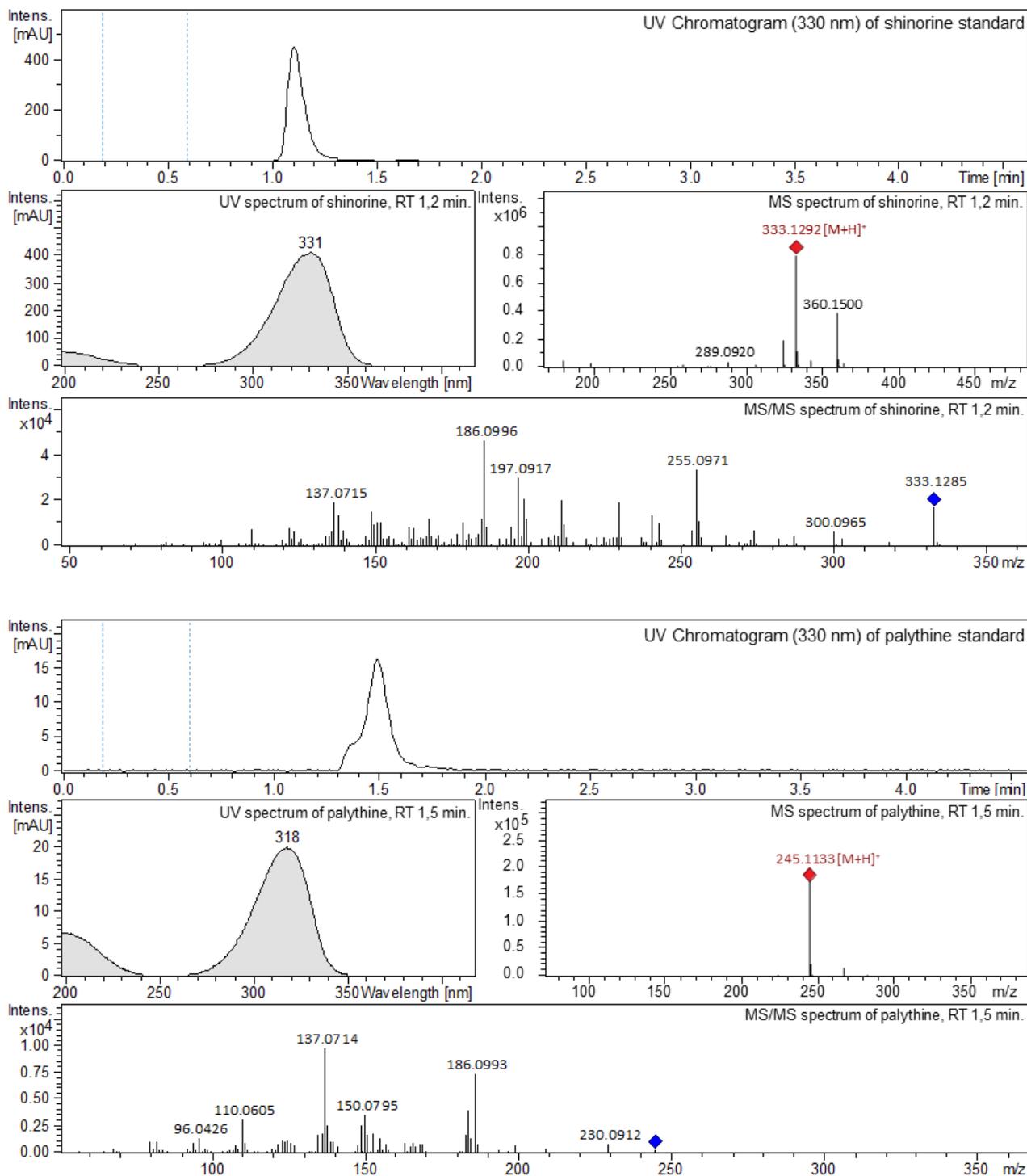
- the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Mar Drugs*. 2013;11(9):3124-3154.
32. Shukla V, Kumari R, Patel DK, Upreti DK. Characterization of the diversity of mycosporine-like amino acids in lichens from high altitude region of Himalaya. *Amino Acids*. 2016;48(1):129-136.
 33. Kamio M, Kicklighter CE, Nguyen L, Germann MW, Derby CD. Isolation and structural elucidation of novel mycosporine-like amino acids as alarm cues in the defensive ink secretion of the sea hare *Aplysia californica*. *Helv Chim Acta*. 2011;94(6):1012-1018.
 34. Carignan MO, Cardozo KHM, Oliveira-Silva D, Colepicolo P, Carreto JI. Palythine–threonine, a major novel mycosporine-like amino acid (MAA) isolated from the hermatypic coral *Pocillopora capitata*. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2009;94(3):191-200.
 35. Katoch M, Mazmouz R, Chau R, Pearson LA, Pickford R, Neilan BA. Heterologous production of cyanobacterial mycosporine-like amino acids mycosporine-ornithine and mycosporine-lysine in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(20):6167-6173.
 36. Cardozo KHM, Marques LG, Carvalho VM, et al. Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. *Rev Bras Farmacogn*. 2011;21(2):202-208.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found at the publisher's website in the supporting information tab for this article.

SUPPORTING INFORMATION

Figure S1. UHPLC-DAD-QTOFMS analysis (UV spectra and MS/MS spectra) of $[M+H]^+$ ions of shinorine - $C_{13}H_{20}N_2O_8$ (0.1 ppm, 2.2 msigma; RT 1.2 min), palythine - $C_{10}H_{16}N_2O_5$ (-0.6 ppm, 1.9 msigma; RT 1.5 min), and porphyra-334 - $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (0.7 ppm, 7.5 msigma; RT 2.1 min) (ESI +, 35.3 eV).



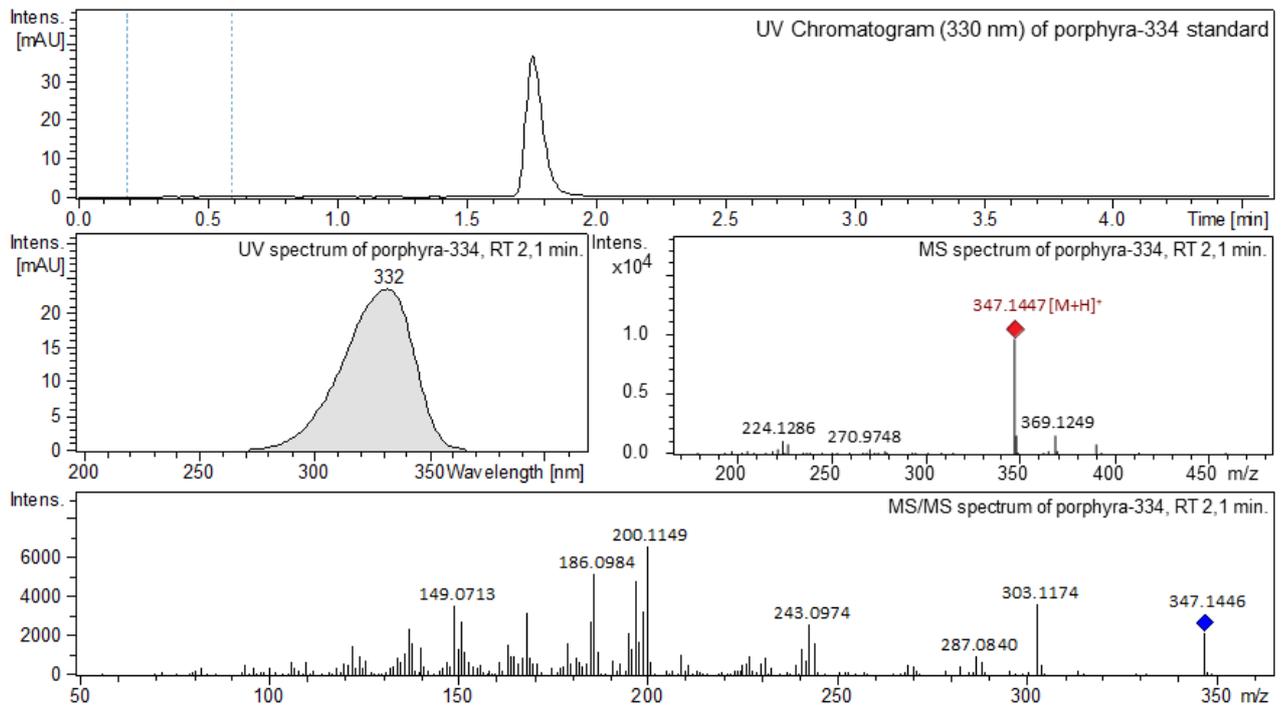


Figure S2. UHPLC-DAD-QTOFMS analysis (UV, MS and MS/MS spectra) of $[M+H]^+$ ions of mycosporine-ornithine - $C_{13}H_{22}N_2O_6$ from *Nostoc* sp. CCIBt 3329 (0.5 ppm, 11.8 msigma; RT 2.1 min) and *Leptolyngbya* sp. LTPNA DBG 07 (1.7 ppm, 44.4 msigma; RT 2.1 min) (ESI +, 35.3 eV).

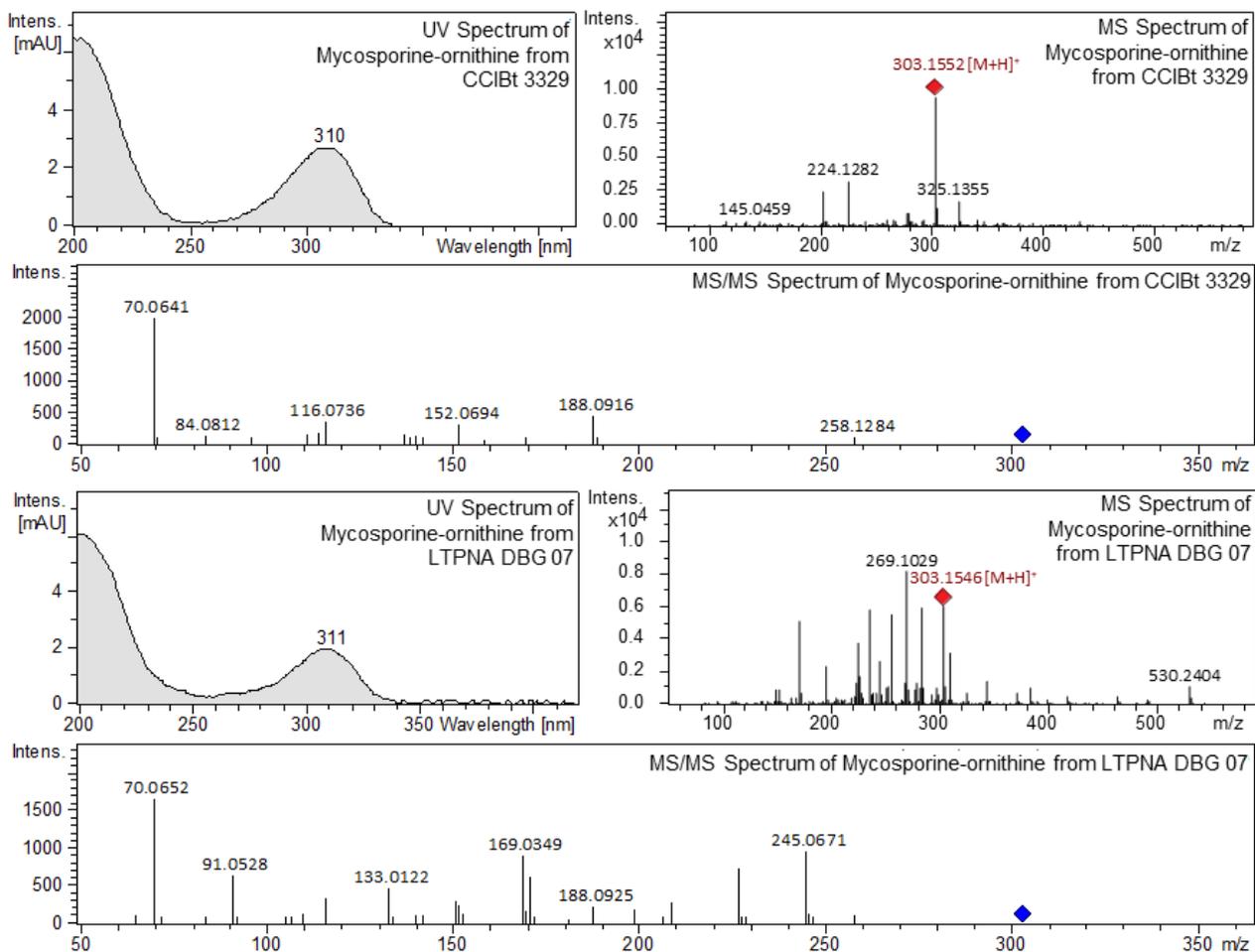


Figure S3. UHPLC-DAD-QTOFMS analysis (UV chromatogram (330 nm), UV, MS and MS/MS spectra) of $[M+H]^+$ ions of palythine-serine - $C_{11}H_{18}N_2O_6$ (-1.2 ppm, 13.2 msigma; RT 1.3 min) and hexose-bound palythine-serine - $C_{17}H_{28}N_2O_{11}$ (-0.2 ppm; 1.3 msigma; RT 1.6 min) from *Nostoc* sp. LTPNA DBG 72 (ESI +, 35.3 eV).

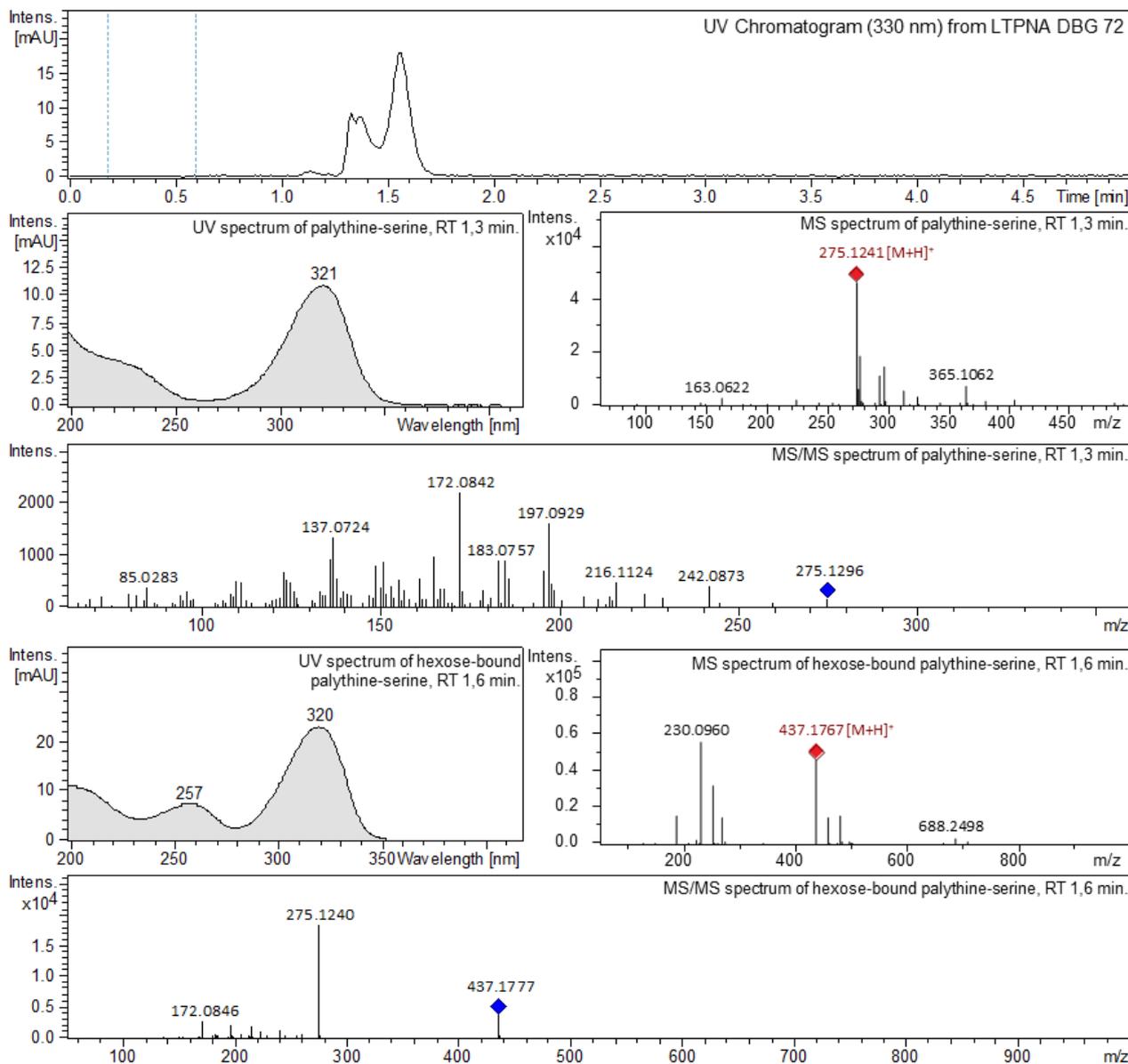
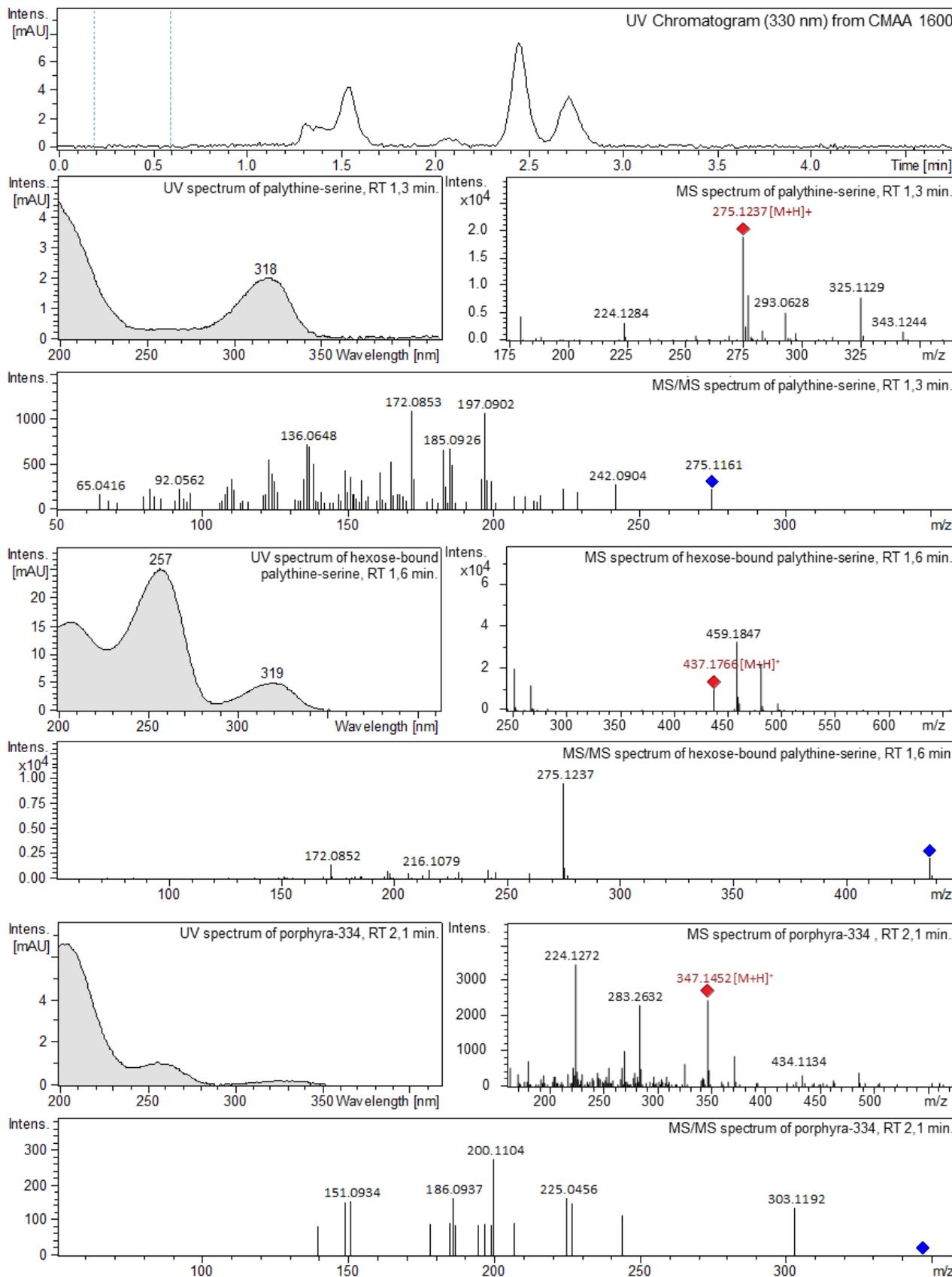


Figure S4. UHPLC-DAD-QTOFMS analysis (UV chromatogram (330 nm), UV, MS and MS/MS spectra) of $[M+H]^+$ ions of palythine-serine - $C_{11}H_{18}N_2O_6$ (0.1 ppm, 12.7 msigma; RT 1.3 min), hexose-bound palythine-serine - $C_{17}H_{28}N_2O_{11}$ (0.0 ppm; 16.0 msigma; TR 1.6 min), porphyra-334 - $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (-0.9 ppm; 20.0 msigma; RT 2.1 min), palythine-threonine - $C_{12}H_{20}N_2O_6$ (1.1 ppm; 4.4 msigma; RT 2.4 min) and hexose-bound palythine-threonine - $C_{18}H_{30}N_2O_{11}$ (2.8 ppm; 5.4 msigma; RT 2.7 min) from *Oscillatoria* sp. CMAA1600 (ESI +, 35.3 eV).



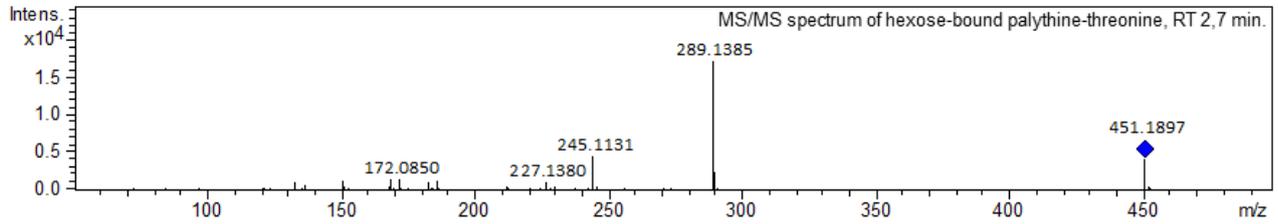
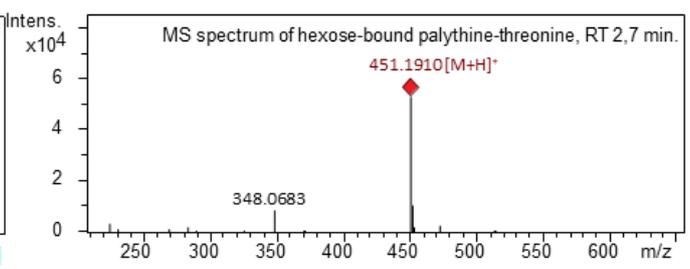
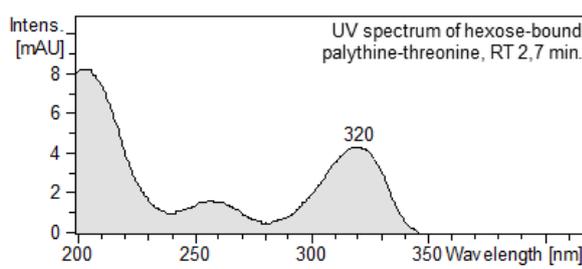
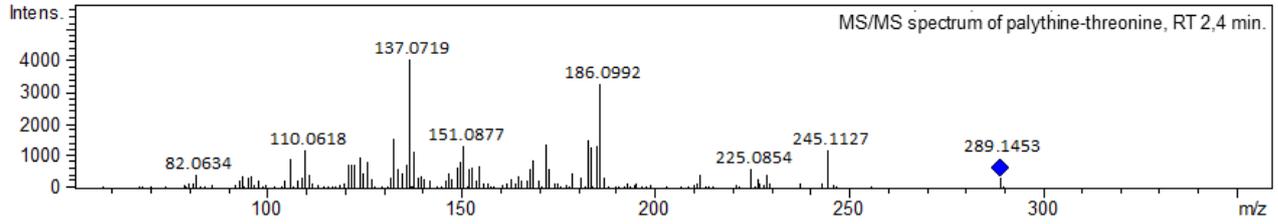
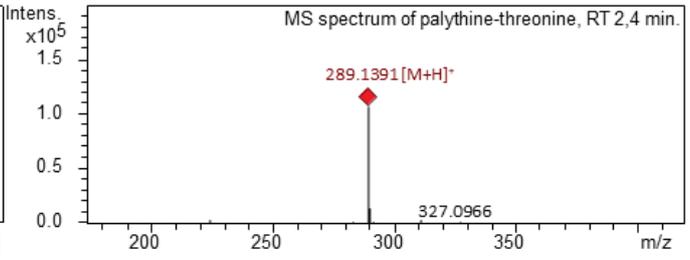
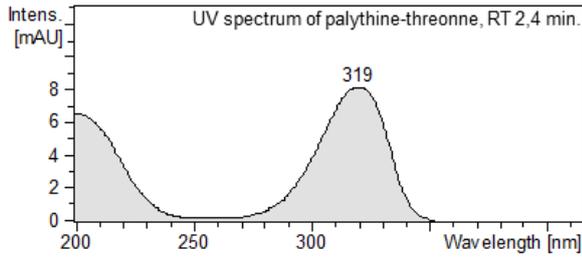


Figure S5. UHPLC-DAD-QTOFMS analysis (UV chromatogram (330 nm), UV and MS spectra) of $[M+H]^+$ ions of shinorine - $C_{13}H_{21}N_2O_8$ (0.8 ppm, 2.7 msigma; RT 1.3 min), palythine $C_{10}H_{16}N_2O_5$ (1.2 ppm; 6.3 msigma; RT 1.5 min), asterina-330 $C_{12}H_{20}N_2O_6$ (0.7 ppm; 2.1 msigma; RT 1.7 min), porphyra-334 - $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (-0.9 ppm; 2.1 msigma; RT 2.1 min), and N-ethylpalythine $C_{12}H_{20}N_2O_5$ (-2.2 ppm; 5.5 msigma; RT 4.0 min) from *Porphyra* sp. (ESI+, 35.3 eV).

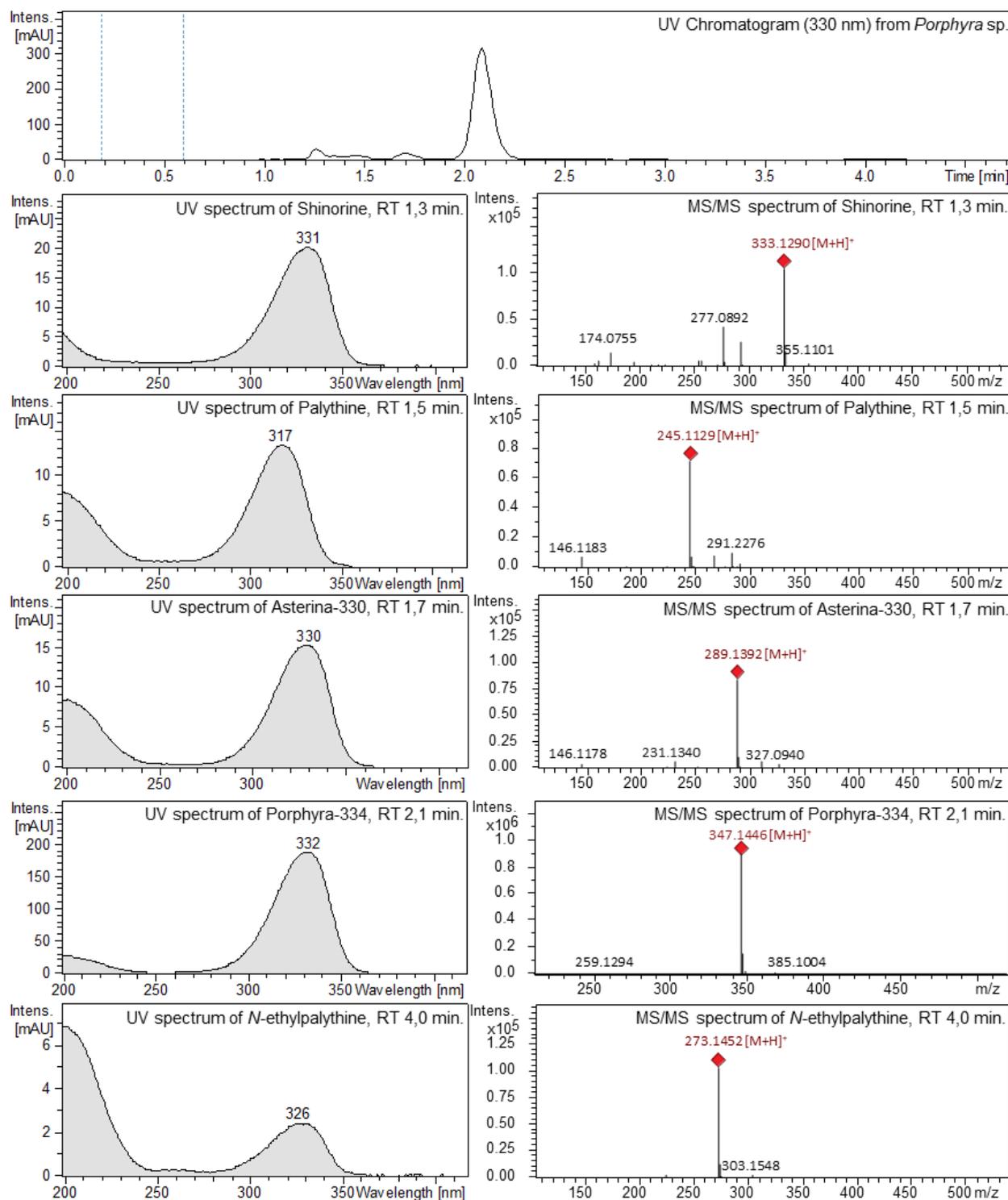


Figure S6. UHPLC-DAD-QTOFMS analysis (UV chromatogram (330 nm), UV and MS spectra) of $[M+H]^+$ ions of mycosporine GABA - $C_{12}H_{19}NO_6$ (-6.8 ppm, 9.6 msigma; RT 1.3 min), palythine $C_{10}H_{16}N_2O_5$ (1.7 ppm; 6.1 msigma; RT 1.5 min), porphyra-334 - $C_{14}H_{22}N_2O_8$ (-0.9 ppm; 62.7 msigma; RT 2.1 min), and palythenic acid - $C_{14}H_{20}N_2O_7$ (2.1 ppm; 4.1 msigma; RT 3.2 min) from *Amphidium* sp. (ESI +, 35.3 eV).

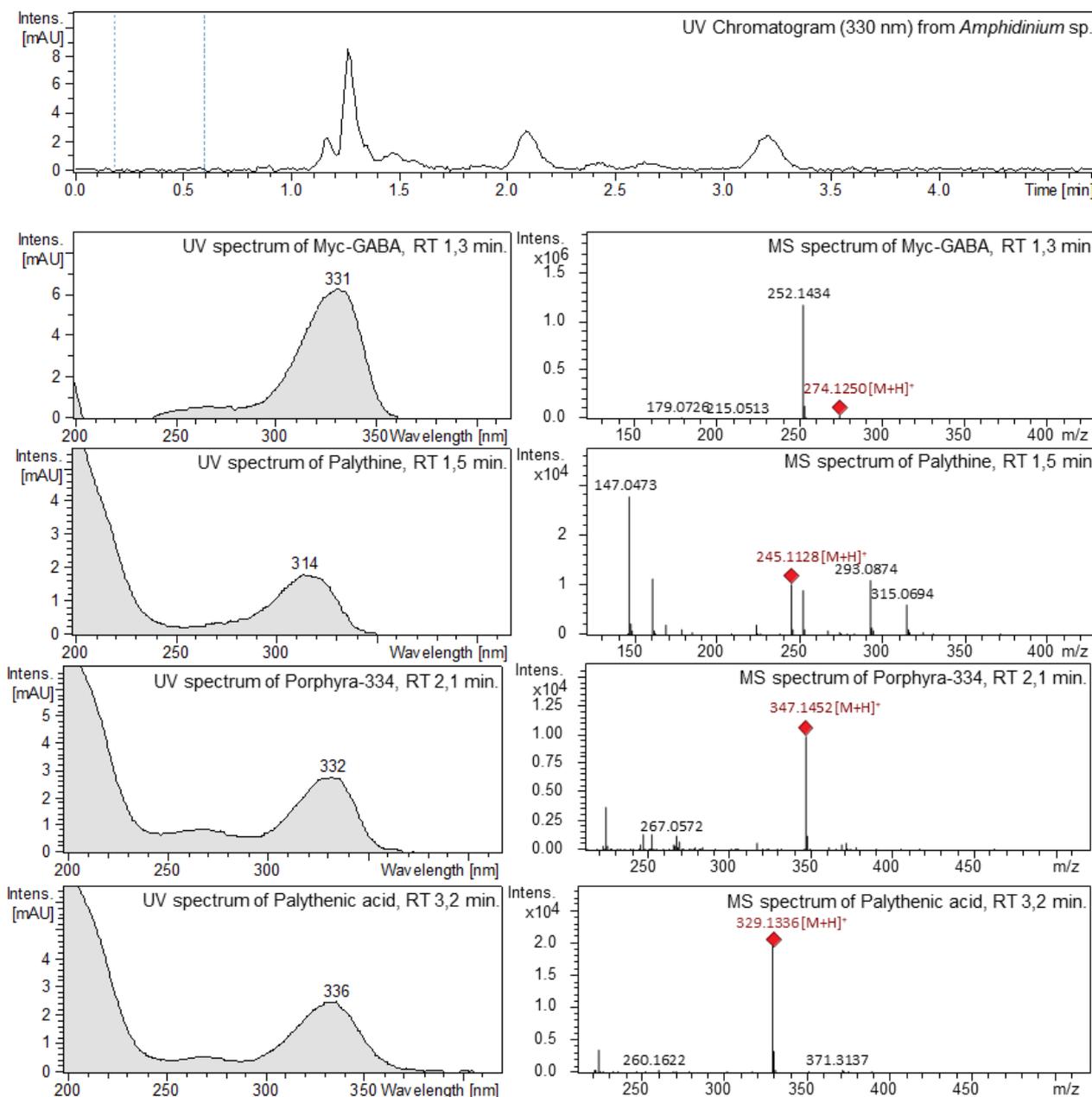
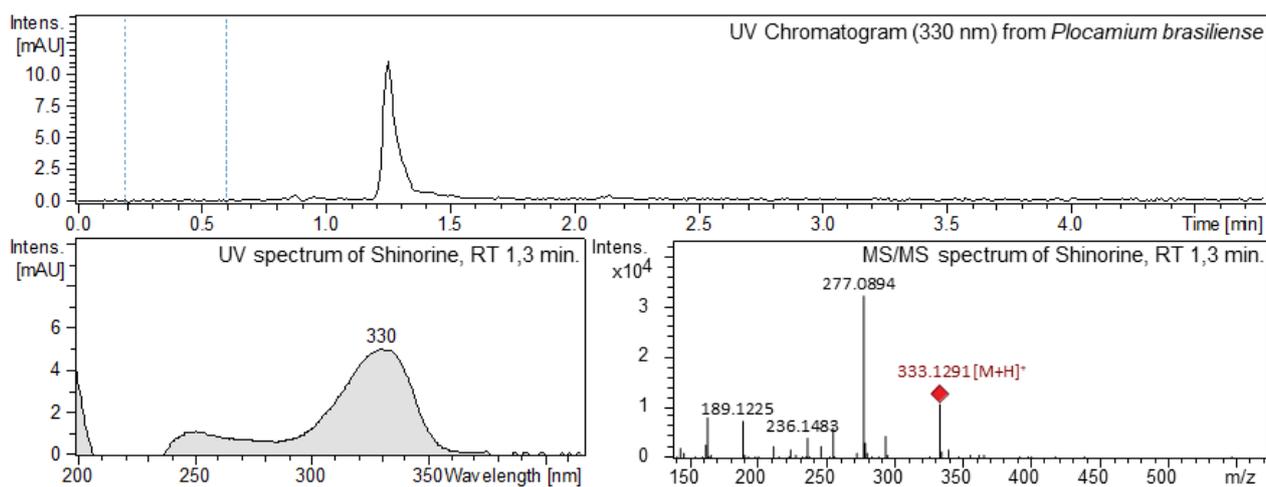


Figure S7. UHPLC-DAD-QTOFMS analysis (UV chromatogram (330 nm), UV and MS spectra) of $[M+H]^+$ ions of shinorine - $C_{13}H_{21}N_2O_8$ (0.6 ppm, 2.5 msigma; RT 1.3 min) from *Plocamium brasiliense* (ESI +, 35.3 eV).



ANEXO 3

Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the quantification of mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) from cyanobacteria

Artigo submetido

Revista: Algal Research

Data de submissão: 24 de Outubro de 2019

Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the quantification of mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) from cyanobacteria

Vanessa Geraldes^a, Livia Soman de Medeiros^b, Fernanda Rios Jacinavicius^a, Paul F. Long^{a,d}, Ernani Pinto^{a,c}

^a University of São Paulo, School of Pharmaceutical Sciences, Avenida Prof. Lineu Prestes, 580, Butantã, CEP 05508-900, São Paulo-SP, Brazil

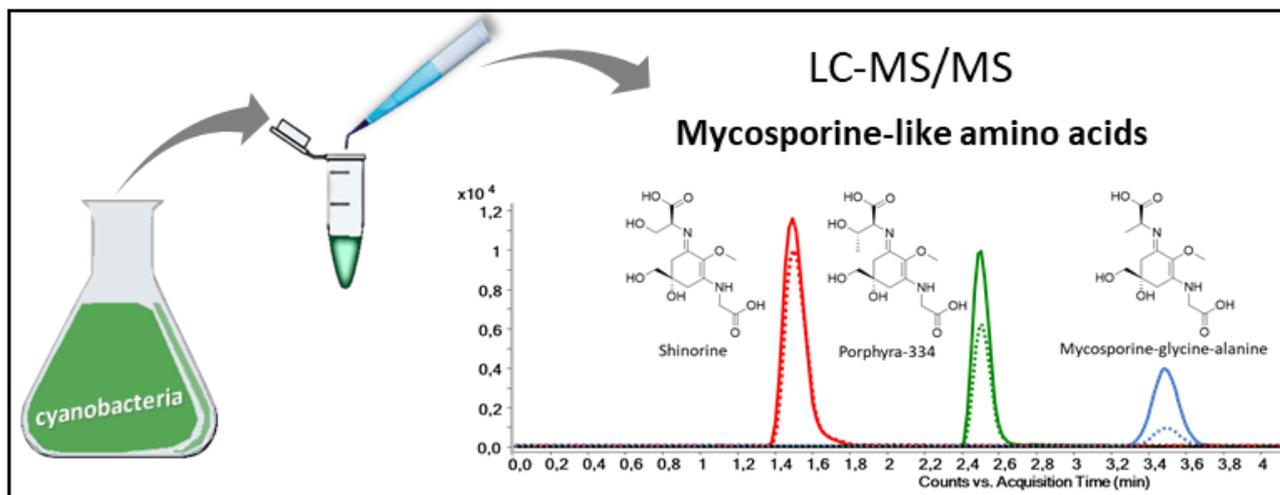
^b Federal University of São Paulo, Department of Chemistry, CEP 09913-030, Diadema-SP, Brazil

^c Centre for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, CEP 13418-260, Piracicaba-SP, Brazil

^d Faculty of Life Sciences and Medicine, King's College London, London, United Kingdom

* Corresponding author.

E-mail address: ernani@usp.br (Ernani Pinto)



HIGHLIGHTS

- Validated method for quantification of MAAs with lower limits of detection
- An easy-to-handle and rapid extraction procedure for MAAs
- An LC-MS method for detection and quantification of MAAs in 6 minutes

ABSTRACT

Mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) are ultra-violet radiation (UVR) absorbing compounds produced by lichens, fungi, algae and cyanobacterial species, especially upon exposure to solar ultraviolet radiation. These compounds are photoprotective and some have additional antioxidant functions useful to the natural cosmetics market. Analysis is generally achieved by separation using reverse-phase chromatography and, detection and quantification based upon characteristic absorption spectra and extremely high molar extinction coefficients. Herein, a validated liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) quantification method for MAAs is presented. Additionally, an easy-to-handle and rapid extraction procedure was developed which uses only water and volatile additives as the extractor solvents. The LC-MS/MS method was performed using multiple reaction monitoring in positive mode with a reverse-phase column. The method enabled the accurate determination and quantification of the MAAs porphyra-334, shinorine and mycosporine-glycine-alanine in a 6 minutes running time, with detection limits of 0.002 μgmg^{-1} , 0.001 μgmg^{-1} and 0.005 μgmg^{-1} respectively. These methods provided a simple extraction and rapid analysis procedure that efficiently identified and quantified MAAs produced by a collection of 29 cyanobacteria. MAAs could be detected at levels well above the limits of detection for the LC-MS/MS method in 12 strains, irrespective of whether the cultures had been exposed to UVR. A quantitative level of constitutive expression of MAAs in cyanobacteria has never been reported previously, and provides an opportunity to study mechanisms that regulate UVR induced MAA biosynthesis in the future.

Keywords: Mycosporine-like amino acids (MAAs), validation, quantification, LC-MS/MS, cyanobacteria.

Abbreviations: ACV: acyclovir, As: asymmetry factor, CCIBt: Cyanobacterial Culture Collection at the Institute of Botany, CE: collision energy, CENA/USP: Culture Collection of the Centre for Nuclear Energy in Agriculture at the University of São Paulo, F: fragmentor voltage, HQC: higher quality control, HILIC: hydrophilic interaction chromatography, ITEP: Technological Institute of Pernambuco, LC-MS: liquid chromatography coupled with mass spectrometry, LC-MS/MS: liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, LoD: limit of detection, LoQ: limit of quantification, LQC: lower quality control, LTPNA: Laboratory of Toxins and Natural Products of Algae and Cyanobacteria, MQC: medium quality control, MAAs: mycosporine-like amino acids, MGA: mycosporine-glycine-alanine, MRM: multiple reaction monitoring, P-334: porphyra-334, QqQ: Triple Quadrupole mass spectrometer, Rs: resolution, SH: shinorine, UVR ultraviolet radiation, UVA: ultraviolet A, UVB: ultraviolet B.

Introduction

Mycosporines and mycosporine-like amino acids are a family of some 50+ natural UV-absorbing sunscreens, having evolved for protection against chronic UVR exposure in cyanobacteria, plants (algae, seaweeds) and invertebrates, as well as in the skin, lenses and eggs of freshwater and marine teleost fish [1]. MAAs are water-soluble, low molecular-weight (generally <400 Da) compounds composed of either an aminocyclohexenone or an aminocyclohexenimine ring, carrying nitrogen or amino alcohol substituents [2]. These compounds have photoprotective and antioxidant function, protecting skin from UVR damage [3,4]. Furthermore, MAAs are purportedly involved in resistance to desiccation [5], osmotic regulation [6] and probably many other cellular functions [1,7]. MAAs are highly stable chemically [1,8] and have been widely studied as possible alternatives to synthetic sunscreens and anti-aging products, which are under increased scrutiny as potentially being harmful to human health and the environment [1,9–11]. Analytical methods and validated procedures are essential in the development of biotechnological products as they are reliable for monitoring the integrity, purity, quality, stability, strength and potency of an active compound in manufactured products. Some previous studies covering validation procedures for biotechnological products have been published [12,13]. The methods most often used to purify, identify and quantify MAAs are by HPLC comparison of retention times and UV spectra [14–16]. Although UV detection is sensitive because of high extinction coefficients (ϵ) for MAAs, a main drawback is a lack of selectivity since biosynthetic congeners can easily influence MAAs quantification. Moreover, no commercial sources for standard compounds exist and few laboratories worldwide have the capacity to provide reference material against which structural elucidation of MAAs can be verified [17]. Capillary electrophoresis has also been used to quantify MAAs, however this technique is not widely used because of it is limited to only high ionisable compounds [18]. In this sense LC-MS is a good alternative to provide high sensitivity and selectivity for analysis of MAAs. Whitehead & Hedges (2002) published a quantitative approach for LC-MS analysis of MAAs that allowed all MAAs known at that time to be characterised based on individual retention times, molecular weights and UV absorption maxima [17]. Hartmann *et al.* (2015) published an LC-MS method that used hydrophilic interaction chromatography (HILIC) to study MAAs in several marine species [19]. Although this method afforded good linear correlation coefficients, it did not account for some important validation parameters such as recovery and matrix effects. Using multiple reaction monitoring (MRM) instead of a full scan improved the selectivity and sensitivity of

this method, allowing mass distinction of isomeric compounds [20]. Here we present a rapid and validated LC-MS/MS method using a reversed phase column to quantify MAAs based upon individual retention times, molecular weights and specific mass transitions by MRM experiments in the presence of a biological matrix and internal standards. Additionally, a bioprospecting survey that induced MAAs in cyanobacteria by exposing cultures to UVR was performed to evaluate the applicability of the method developed.

Materials and Methods

Reagents and matrix

Acetonitrile (J. T. Baker), formic acid and ammonium formate were LC-MS grade (Fluka). Water was purified by a Milli-Q system (Millipore). Porphyra-334 and shinorine standards were kindly provided by Prof. Kazuo Yabe while a mycosporine-glycine-alanine standard was isolated as previously described [manuscript under revision in another journal]. MAAs standards were dissolved in water to form stock solutions. The working solution had the following concentrations: Shinorine – 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$; porphyra-334 – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$; mycosporine-glycine-alanine – 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The concentration of the working solution was 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The individual stock solutions and the working solutions were stored at 4 °C. Prior to use, the working solutions were brought to room temperature and were mixed thoroughly. Acyclovir (Sigma Aldrich) was used as the internal standard. Commercial spirulina (*Arthrospira platensis*) was used as a blank matrix.

Sample preparation

Lyophilized samples (5.00±0.05 g) were weighed into 2 mL polypropylene microcentrifuge tubes, (Merck, Germany). Samples were spiked with 10 μL of the working solution and stored capped for 4 h at room temperature to achieve equilibrium between the standard and samples. Then, extraction was performed with 1990 μL of water + 0.1 % (v/v) formic acid + 0.2 mM ammonium formate. Samples were mixed by vortex and stored for 1 h at room temperature. No ultrasonic treatment of the lyophilized cyanobacteria or any other approach to lyse or homogenize the cells were used. After extraction, the tubes were centrifuged for 10 min (10,000 rpm) with an Eppendorf Centrifuge 5415 R. An aliquot (1000 μL) of the supernatant was filtered and transferred into an HPLC vial (Agilent Technologies). 10 μL thereof was injected into the LC-MS/MS system.

LC-MS/MS parameters

The analyses were carried out on a 1290 series LC system coupled to a 6460 Triple Quadrupole mass spectrometer (QqQ) (Agilent Technologies) with an electrospray source. The QqQ instrument was operated by a MassHunter Workstation B.04.01 software. Precursor and product ion selection as well as optimization of collision energies were performed with flow injection of standard solutions using the MassHunter Optimizer software. Chromatographic separation was performed at 30 °C using a Synergi 4 μ Hydro-RP 80 A column (150 x 2,0 mm) (Phenomenex, USA). Sample extracts were injected (10 μ L) and eluted at a flow rate of 0.4 mL/min water + 0.1 % (v/v) formic acid containing 2 mM ammonium formate (eluent A). Eluent B was Acetonitrile/water (8:2, v/v) + 0.1 % (v/v) formic acid. The total run time for the chromatography was 12 min comprising an initial hold time of 2 min at 100 % A and a linear gradient to 95 % B within 4 min. After a hold time of 1.5 min at 95 % B, the starting composition of 100 % A was reached within 0.5 min and held for 4 min to allow column re-equilibration prior to the next injection. The eluent flow from 6 min until the end of the analysis was directed to the waste. Before sample injection, the needle was washed in the flush port with acetonitrile/water (50:50, v/v) for 5 sec. Analysis was carried out monitoring two transitions (quantifier and qualifier) using MRM in positive mode. The ionization source conditions were applied as follows: gas temperature and gas flow (nitrogen) were 350 °C and 10 mL min⁻¹, respectively; nebulizer pressure of 45 psi; sheath gas temperature and sheath gas flow were 300 °C and 12 mL min⁻¹, respectively; capillary voltage, 3500 V; and nozzle voltage, 500 V. Data were processed using Mass Hunter Qualitative Analysis Software and Mass Hunter Quantitative Analysis Software (Agilent Technologies, USA).

Method Validation

The present study was focused on an in-house validation approach. The method was validated in 3 days for the following parameters: specificity, linearity, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), accuracy, extraction recovery, matrix effects and stability. Additionally, the working range as well as limits of detection and quantification were evaluated. For the determination of all parameters, the guidelines of ICH and EURACHEM were considered [21,22].

2.4.1. Specificity and selectivity

Specificity was assessed with the analysis of matrix samples along-side MAAs calibration standards to determine qualitatively whether test samples contained any matrix components which may interfere with the detection and quantitation of the MAAs. Peak symmetry was defined using the asymmetry factor (As). The As factor represents a balance between the back and front of the peak, with an As of 1.0 indicating that the peak is balanced. Values <1 would indicate asymmetry and peak fronting, whereas values >1 suggest peak tailing. However, peaks with As > 1.5 are acceptable [23]. Resolution (Rs) quantifies time-axis selectivity for adjacent analytes due to chromatographic separation. Resolution values > 1.5 indicate a baseline separation of the substances showing good chromatographic separation [24]. The retention time is an important parameter for compound identification. Variability in retention time precision was assessed by repeated analysis over one analytical sequence of extracts containing MAAs.

2.4.2. Linearity

In order to determine the range of MAAs concentrations over which the quantitation method could be applied, MAAs standards were spiked into matrix extracts. Linearity was assessed using three replicates (n=3) with seven different concentrations of shinorine and mycosporine-glycine-alanine and six different concentrations of porphyra-334. The method was validated by constructing calibration curves of the three analytes (shinorine, porphyra-334 and mycosporine-glycine-alanine) from which linear regression equations could be calculated.

2.4.3. Limit of detection (LoD) and limit of quantification (LoQ)

The limit of detection (LoD) was defined as the lowest injected amount of MAAs producing a Gaussian-shaped peak eluting within ± 2 % of mean calibrator retention time and a minimum signal to noise (S/N) ratio of 3:1. The limit of quantitation (LoQ) was defined as the concentration of analyte which gives rise to an analytical peak with a minimum S/N ratio of 10:1.

2.4.4. Precision (repeatability and within-lab reproducibility) and accuracy

Precision (repeatability and within-lab reproducibility) and accuracy were evaluated with four replicates (n=4) at three different concentrations (low, medium and high). Inter-assay precision and accuracy were evaluated over three validation batches (n=12). Samples were extracted and analysed by LC-MS/MS, with quantitative

concentration data used to calculate standard deviations around the calculated means over both single batches and multiple batches. Precision was expressed as % coefficient of variation (standard deviation of the concentrations divided by the mean concentration) and accuracy is the percentage of calculated to target concentration. The variability in retention time precision was assessed with the repeated analysis over one analytical sequence of extracts containing MAAs.

2.4.5. Recovery extraction and matrix effect

Recovery experiments was performed by analysis of matrix samples spiked with working solutions of the analytes and internal standard both before and after extraction. For matrix samples spiked before extraction, accurately weighted samples of commercial spirulina samples (5.00 ± 0.05 mg) were spiked with 10 μ L of working solution of the three MAAs at three different concentrations, and 10 μ L of internal standard solution before extraction. Spiked samples were stored capped for 4 h at room temperature to achieve equilibrium between the analytes and matrix. The samples were then extracted according to the protocol described in section 2.2. For matrix samples spiked after extraction, blank matrix samples were extracted and thoroughly mixed with an aliquot of the raw extract (990 μ L) was combined with 5 μ L working solution of the three MAAs at three different concentrations, and 5 μ L working solution of the internal standard. Recovery extraction was defined as a percentage ratio of the concentration in matrix samples spiked before and after extraction. For LC-MS/MS analysis, the matrix components can influence the analyte ionization. Matrix effect was calculated as a percentage ratio of the slopes (m) of each calibration curve prepared in both matrix samples spiked after extraction and solvent standards ($m_{\text{matrix}}/m_{\text{solvent}}$). Solvent standards were unextracted standards reconstituted in eluent A.

2.4.6. Stability

It has been noted that poor stability of the analyte during analysis may give rise to significant deviations in results. It is essential that extracts of MAAs are sufficiently stable to allow for routine testing where samples can remain in the autosampler for several hours. It is also important to measure stability of the samples when delays in analysis occur, such as instrument breakdowns or overnight analyses. Stability of MAAs in extracts of *S. torques-reginae* ITEP-024 were investigated under 3 different conditions: short-term (5 h of exposure at

room temperature -22 °C, 38 °C, 4 °C and -18 °C), long-term (storage in the refrigerator at 4 °C for 101 days) and post-preparative (48 h in the autosampler at room temperature).

Bioprospecting for MAAs

2.5.1. Cyanobacterial cultures

Cyanobacteria strains were obtained from the culture collection of the Laboratory of Toxins and Natural Products of Algae and Cyanobacteria (LTPNA) at the University of São Paulo (FCF-USP), from the Culture Collection of the Centre for Nuclear Energy in Agriculture at the University of São Paulo (CENA/USP), from the Cyanobacterial Culture Collection at the Institute of Botany (CCIBt), São Paulo and from the Technological Institute of Pernambuco (ITEP). (Table 1). These strains were cultivated in ASM-1 medium [25] at 24 °C ± 2 °C under light:dark cycle (12h:12h) with photosynthetically active radiation (PAR) OSRAM L 36 W:32 Lumilux de luxe warm white lamps (80 μmol photons.μm⁻².s⁻¹).

2.5.2. MAAs induction using UVA and UVB radiation

To induce MAAs biosynthesis, samples were irradiated with ultraviolet A (UVA) radiation provided by twin Philips TL -K 40W/10-R UV-A lamps and ultraviolet B (UVB) radiation provided by twin Philips TL 40W/12 RS SLV/25 lamps in addition to PAR lamps. Suspended cells (150 mL) were irradiated in 75 cm² tissue culture flasks with a hydrophobic filter cap (TP90076, TPP) at a distance of 40 cm from the lamps at 24 °C ± 2 °C under light:dark cycle (12 h:12 h) for 3 days. Cultures were harvest at the beginning and at the end of the MAAs induction experiment, and were extracted using the protocol described in section 2.2 and analysed by LC-MS/MS. Quantification of MAAs was calculated against the calibration curves of the respective standards.

Table 1. Cyanobacteria strains tested in UVR induction experiment for quantification of MAAs.

Strain code	Name	Source
CCIBt 3168	<i>Rhabdoderma</i> sp.	Billings Reservoir, 23°47'S and 46°35'W SP, Atlantic Forest

Strain code	Name	Source
CCIBt 3180	<i>Microcystis</i>	Heron Lake - IBt, 23°38'30"S and 46°37'14"W
	<i>panniformis</i>	SP, Atlantic Forest
CCIBt 3194	<i>Microcystis</i>	Billings Reservoir, 23°47'S 46°35'W
	<i>aeruginosa</i>	SP, Atlantic Forest
CCIBt 3214	<i>Geitlerinema</i>	Billings Reservoir, 23°47'S and 46°35'W
	<i>amphibium</i>	SP, Atlantic Forest
CCIBt 3247	<i>Nostoc</i> sp.	Bromeliad, IBt, 23°38'30"S and 46°37'14"W
		SP, Atlantic Forest
CCIBt 3265	<i>Desertifilum</i>	Salina da Ponta, 18°59'00"S and 56°39'35"W
	<i>tharensis</i>	MS, Pantanal
CCIBt 3275	<i>Desertifilum</i>	Salina da Ponta, 18°59'00"S and 56°37'26"W
	<i>tharensis</i>	MS, Pantanal
CCIBt 3289	<i>Calothrix</i> sp.	Santa Virgínia Park, 23°20'S and 45°09'W
		SP, Atlantic Forest
CCIBt 3292	<i>Nostoc</i> sp.	Santa Virgínia Park, 23°20'S and 45°09'W
		SP, Atlantic Forest
CCIBt 3307	<i>Komarekiella</i>	Santa Virgínia Park, 23°20'S and 45°09'W
	<i>atlantica</i>	SP, Atlantic Forest
CCIBt 3313	<i>Chlorogloopsis</i> sp.	Santa Virgínia Park, 23°20'S and 45°09'W
		SP, Atlantic Forest
CCIBt 3320	<i>Calothrix</i> sp.	Santa Virgínia Park, 23°20'S and 45°09'W
		SP, Atlantic Forest
CCIBt 3321	<i>Tolypothrix</i> sp.	Cardoso Island Park, 25°04'12"S and 47°55'27"W, Atlantic Forest
CCIBt 3324	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Cardoso Island Park, 25°04'12"S and 47°55'27"W, Atlantic Forest
CCIBt 3329	<i>Nostoc</i> sp.	Trunk, Pirassununga, 21°59'46"S and 47°25'33"W
		SP, Cerrado
CCIBt 3330	<i>Cyanosarcina</i> sp.	Pirassununga, 21°59'46"S and 47°25'33"W SP, Cerrado

Strain code	Name	Source
CCIBt 3338	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Pirassununga, 21°59'46"S and 47°25'33"W SP, Cerrado
CCIBt 3343	<i>Dolichospermum</i> sp.	Jaguari Reservoir, 22°55'27"S and 46°25'30"W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3464	<i>Scytonema</i> sp.	Cardoso Island Park, 25°04'12"S and 47°55'27"W, Atlantic Forest
CCIBt 3496	<i>Myxosarcina</i> sp.	Ecological Station Juréia - Itatins, 24°26'S and 47°04'W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>	Cardoso Island Park, 25°04'12"S and 47°55'27"W SP, Atlantic Forest
CCIBt 3607	<i>Gloecapsa</i> sp.	Prainha, 23°03'97"S and 43°50'53"W RJ, Atlantic Forest
CCIBt 3626	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Water pipe system supply, 23°42'28"S and 46°43'24"W SP, Atlantic Forest
CENA21	<i>Nostoc piscinale</i>	Floodplain soil of Mari-Mari Island, Solimões River, 02°45'00"S, 65°15'00"W AM, Amazon
CENA543	<i>Nostoc</i> sp.	Lake Salina 67 Mil, 19°27'42"S, 56°08'21"W MS, Patanal
CENA596	<i>Nodularia spumigena</i>	Shrimp production pond, 32°12'19"S, 52°10'42"W RS, Cassino Beach
LTPNA DBG 72	<i>Nostoc</i> sp.	Solimões river; 03°14'33"S and 60°00'28"W AM, Amazon
ITEP 24	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	Reservatório Tapacurá, 08°02'14"S, 35°09'46"W PE, Brasil, Caatinga
ITEP 26	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	Reservatório Tapacurá, 08°02'14"S, 35°09'46"W PE, Brasil, Caatinga

Results and discussion

3.1. Method Validation

An LC-MS/MS method for quantification of MAAs was developed and validated by MRM experiments that monitored specific transitions of precursor ions to corresponding selected product ions for each target MAAs and an internal standard. Mass spectrometer performance parameters, including selection of the best precursor and product ions, along with the corresponding optimized collision energies and fragmentor voltages, were tested during flow injection of the standards solutions. For each analyte, the two mass transitions with highest abundance were selected that corresponded to the quantifier, and to the qualifier ion in further analyses. Table 2 summarizes the optimized parameters for the analytes and the internal standard.

Table 2. Selected transitions and optimized ESI parameters for the analytes and the internal standard for MRM analysis. F – fragmentor voltage; CE – collision energy; ACV – acyclovir; MGA – mycosporine-glycine-alanine; SH – shinorine; P-334 – porphyra-334.

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	quantifier Product ion (m/z)	qualifier Product ion (m/z)	F (V)	CE (V)
ACV	226	152		135	135	20
MGA	317	214		165	100	30
SH	333	186		230	100	25
P-334	347	303		186	100	30

Optimization studies were conducted to develop a simple, fast and efficient extraction protocol, without the need for pre-concentration procedures of cyanobacterial samples. Several extraction solvents were tested: MeOH/H₂O (50:50); EtOH/ H₂O (50:50), 100 % H₂O and 0.1 % (v/v) formic acid aqueous solution + 0.2 mM ammonium formate. MAAs extraction was found to be most efficient using aqueous acidic solvents. The use of a 0.1 % (v/v) formic acid solution + 0.2 mM ammonium formate allowed greater amounts of MAAs to be extracted and was selected as the solvent for MAAs extraction in this quantification method. For initial screening, different stationary phases were also tested: a Luna C18 (150 x 4.5 mm, 5 μm) (Phenomenex, USA), a ZIC®-HILIC (150 x 2.1 mm, 5 μm) and a Synergi 4μ Hydro-RP 80 A (150 x 2.0 mm) (Phenomenex, USA). The Synergi 4μ Hydro-RP 80 A column gave the best results when separation efficiency and peak shape were

considered, and allowed separation in less than 6 mins (Figure 1). Shinorine (1) eluted first (1.49 min), followed by porphyra-334 (2: 2.50 min) and mycosporine-glycine-alanine (3: 3.49 min). This column is very stable in 100 % aqueous mobile phase and provides prolonged retention of hydrophobic compounds and slight polar selectivity [26]. Although it has been reported that MAAs elute close to the void volume of reverse phase columns [19], in this study the retention capacity of the column was sufficient to separate all of the analytes of interest. The short separation time also allowed for considerable savings in the use of solvents.

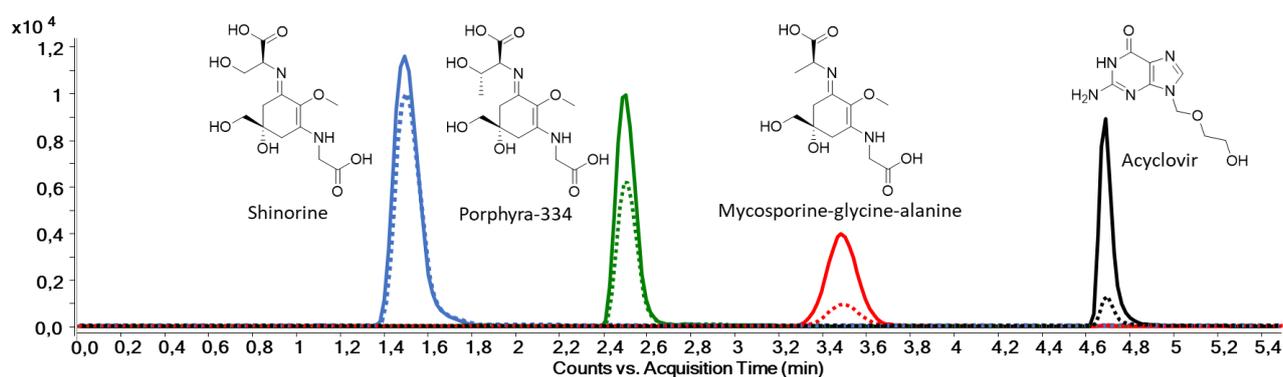


Figure 1. Extracted ion chromatogram of a matrix sample (spirulina), in positive mode, spiked before extraction with 10 μL of a analyte solution at a medium level (shinorine $600 \mu\text{g mL}^{-1}$, porphyra-334 $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, mycosporine-glycine-alanine $150 \mu\text{g mL}^{-1}$) and 10 μL of internal standard solution ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Each compound is displayed in a different color. The transitions corresponding to the quantifier (full line) and qualifier (dashed line) are presented.

High sensitivity and specificity could be achieved using this HPLC-MS/MS method as evinced from analysis of data from MRM experiments. Acceptable peak symmetry was achieved according to the asymmetry factor values (Table 3). Excellent resolution values were also obtained for all analytes showing a good chromatographic separation of all peaks with full overlap of the quantifier and the qualifier transitions (see Figure 1).

Table 3. Parameters of specificity and selectivity for each MAA: asymmetry factor (A_s), resolution (R_s), retention time (RT), retention time precision and retention time precision inter-day.

MAA	SH	P-334	MGA
A_s	1.4	1.6	1.1
R_s	2.2 (SH/P-334)	1.8 (P-334/MGA)	2.7 (MGA/ACV)
RT (min)	1.49	2.52	3.42

MAA	SH	P-334	MGA
RT Precision	0.3 %	0.2 %	0.4 %
RT Precision inter-day	1.0 %	0.9 %	0.5 %

Commercial spirulina was chosen as a blank matrix for spiking experiments. This commercial cyanobacterium was carefully analysed but no MAAs could be detected (as expected) and importantly, no interferences from the matrix affected the detection and quantitation of the MAAs. The use of an internal standard is important to assess reproducibility and to ensure reliable quantification [17,27]. Bioanalytical methods based on LC-MS-ESI ideally use stable isotopically labelled analogues of the analytes as internal standards because they have almost the same physical-chemical proprieties and responses when ionized in the ESI source [28]. However, since there are no stable isotopically labelled MAAs commercially available as internal standards, structural analogues have been used to quantify MAAs in other studies. For example, Whitehead & Hedges (2002) provided a quantitative LC-MS method for the analysis of MAAs compared to an internal standard of L-tyramine hydrochloride with precision of better than 3 % [17]. More recently, Chollet-Krugler *et al.* (2019) used cytosine as an internal standard to quantify mycosporine glutaminol and mycosporine glutamicol, with limits of detection of 1.41 µg/L and 4.49 µg/L, respectively [29]. Both cytosine and tyramine are endogenous metabolites and although may only be present in trace amounts, use of these compounds as standards should be avoided. In our method, synthetic acyclovir was adopted as the internal standard because of similarities in log *P* values to MAAs [30,31]. Acceptable linear correlation coefficients (shinorine $R^2 = 0.987$, porphyra-334 $R^2 = 0.988$, mycosporine-glycine-alanine $R^2 = 0.994$) were obtained within a concentration range of 0.2-3.2 µg mg⁻¹ for shinorine, 0.1-1.6 µg mg⁻¹ for porphyra-334 and 0.05 to 0.8 µg mg⁻¹ for mycosporine-glycine-alanine. All calibration results are summarized in Table 4. LoD and LoQ values were found to be between 0.002 and 0.2 µg mg⁻¹ for shinorine, from 0.001 to 0.1 µg mg⁻¹ for porphyra-334 and from 0.005 and 0.05 µg mg⁻¹ for mycosporine-glycine-alanine. Observed matrix effect rates were 52 % for shinorine, 39 % for porphyra-334 and 51 % for mycosporine-glycine-alanine. These results demonstrated the matrix components could influence the response of the analytes. However, excellent recoveries were obtained for all analytes: shinorine 93-102 %, porphyra-334 96-100 % and mycosporine-glycine-alanine 95-102 %, and results for other validation parameters such as linearity and quality controls obtained in the presence of the matrix were reliable.

Table 4. Parameters of calibration curve for each MAA: regression equation, correlation coefficient, curve range, limit of detection (LoD), limit of quantification (LoQ), retention time (RT), retention time precision and retention time precision inter-day and matrix effect.

MAA	SH	P-334	MGA
Regression Equation	$y = 0,7262x - 0,5909$	$y = 0,5468x - 0,3297$	$y = 0,3155x - 0,032$
Correlation Coefficient	0,987	0,988	0,994
Range ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	0.2-3.2	0.1-1.6	0.05-0.8
LoD ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	0.002	0.001	0.005
LoQ ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	0.2	0.1	0.05
Matrix effect	52 %	39 %	51 %

The precision was measured during and between days for all quality controls (low, medium and high) of the three MAAs and were below 15% and the accuracy was nearly 100 % (Table 5). These results indicated that this method was precise and accurate for MAAs quantification, when the analysis was performed in the same laboratory (same equipment and standards).

Table 5. Accuracy, precision and recovery obtained during the validation of the quantification method for SH - shinorine, P-334 - porphyra-334 and MGA - mycosporine-glycine-alanine. Higher quality control - HQC, medium quality control – MQC, lower quality control – LQC.

MAA		SH	P-334	MGA
Precision (n=4)	HQC	5%	1%	4%
	MQC	3%	7%	1%
	LQC	10%	8%	5%
Precision inter-day (n=12)	HQC	8%	4%	9%
	MQC	11%	6%	12%
	LQC	10%	15%	14%
Accuracy (n=4)	HQC	98%	98%	99%
	MQC	107%	111%	102%
	LQC	107%	97%	98%
Recovery (n=4)	HQC	102%	100%	102%
	MQC	93%	96%	95%
	LQC	97%	96%	97%

These results enabled the precise quantification of the three test MAAs (shinorine, porphyra-334 and mycosporine-glycine-alanine) for which standards were available.

Extracts of *S. torques-reginae* ITEP-024 were evaluated over short periods of time (5hrs), long periods of time (90 days) and following post preparative stability. For short-time stability MAA extracts of *S. torques-reginae* ITEP-024 were incubated for 5 h at different temperatures (-18 °C, 4 °C, 22 °C, 38 °C, 50 °C and 80 °C) (Figure 2).

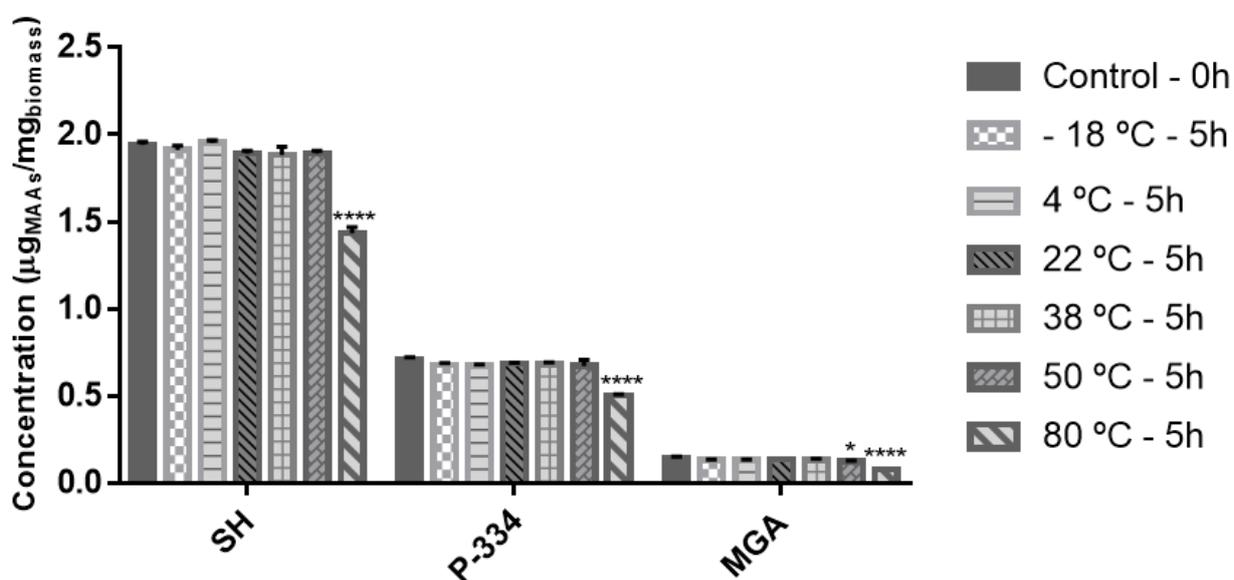


Figure 2. Concentration of MAAs - shinorine (SH), porphyra-334 (P-334) and mycosporine-glycine-alanine (MGA) - in an aqueous extract of *S. torques-reginae* ITEP-024 incubated for 5 h under different temperatures (-18 °C, 4 °C, 22 °C, 38 °C, 50 °C and 80 °C). Significant differences are reported according to two-way ANOVA: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$.

All MAAs were stable at temperatures below 50 °C. However, the stability of MAAs decreased at higher temperatures. Shinorine, porphyra-334 and mycosporine-glycine-alanine showed significant differences in levels of stability following incubation at 80 °C ($p < 0.001$). These results are in accordance with previous studies [32–34] and suggest that MAAs are highly stable at different ranges of temperature. Extracts of *S. torques-reginae* ITEP-024 were also evaluated for long-term stability. The results indicated that MAAs were stable for 90 days at 4 °C ($p > 0.05$). Post-preparative stability was determined for extracts of *S. torques-reginae* ITEP-024 standing in the autosampler at room temperature for 48 hrs. The extracted ion

chromatograms of MAAs determined immediately after extraction and 48 hrs following extraction are shown in Figure 3. All the MAAs were found to be highly stable during transit time in the autosampler, even up to 48 h ($p > 0.05$).

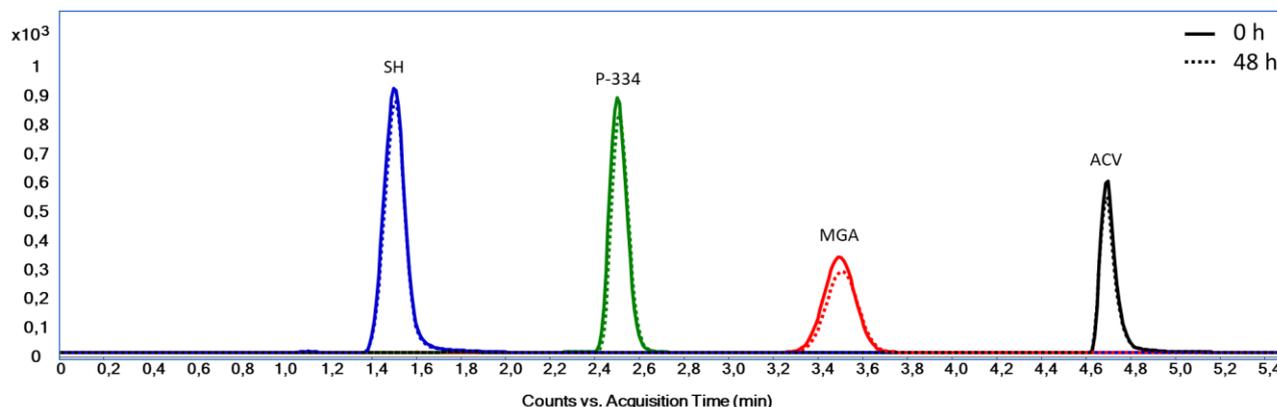


Figure 3. Extracted ion chromatogram, in positive mode, of an aqueous extract of *S. torques-reginae* ITEP-024, spiked before extraction with 10 μL of internal standard solution ACV (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), immediately after extraction (full line) and 48 h after extraction (dashed line). Each compound is displayed in a different color: blue- SH, shinorine, green - P-334, porphyra-334, red - MGA, mycosporine-glycine-alanine, black - ACV, acyclovir.

3.2. Bioprospecting for MAAs

The methods developed for MAA extraction and analysis were used in a bioprospecting program to screen for MAAs in the extracts of 29 cyanobacteria exposed to UVA and UVB irradiance for 3 days. Although shinorine is the most dominant MAA in cyanobacteria, followed by porphyra-334 [35], other MAAs could be produced by cyanobacteria [1]. In a previous study, different MAAs were detected in terrestrial strains of *Nostoc* sp. (CCIBt 3329), *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3330), *Leptolyngbya* sp (CCIBt 3626) and *Scytonema* sp. (CCIBt 3464) [36]. No shinorine, porphyra-334 or mycosporine-glycine-alanine were detected in 11 strains: *Microcystis aeruginosa* (CCIBt 3194), *Microcystis panniformis* (CCIBt 3180), *Rhabdoderma* sp (CCIBt 3168), *Desertifilum tharensense* (CCIBt 3265 and CCIBt 3275), *Chlorogloeopsis* sp. (CCIBt 3313), *Nostoc* sp. (CCIBt 3329), *Cyanosarcina* sp. (CCIBt 3330), *Leptolyngbya* sp (CCIBt 3338 and 3626) and *Scytonema* sp. (CCIBt 3464). Hu *et al.* 2015 reported that *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 did produce shinorine when isolated from an algal bloom and that the shinorine was located exclusively in the extracellular matrix [37]. When maintained under laboratory conditions, strains of *Microcystis* are known to lose the extracellular

matrix [38] which might explain why no MAAs could be detected in the biomass extracts of these strains. Six cyanobacterial strains only produced at least 1 MAA in response to 3 days irradiance (Table 6), suggestive that MAAs were produced as a photoprotective response to UVR exposure as has been conclusively demonstrated previously in other cyanobacteria [39]. Surprisingly, 12 strains constitutively produced at least 1 MAA (shinorine or porphyra-334 or mycosporine-glycine-alanine) under ambient light conditions, but the content of MAAs in the cell extracts significantly increased following UVR irradiance (Table 6).

Table 6. Total concentration of MAAs in cyanobacteria strains, before UV induction (D0) and after 72 h of exposure to UVR (D3). (X) MAAs detected > LoD. (.) No MAAs detected. Quantification results stated as $\mu\text{g MAAs}/\text{mg biomass}$. SH - shinorine; P-334 - porphyra-334, MGA - mycosporine-glycine-alanine.

Strain code	Name	Days	SH	P-334	MGA
			($\mu\text{g}/\text{mg}$)	($\mu\text{g}/\text{mg}$)	($\mu\text{g}/\text{mg}$)
CCIBt 3214	<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	D0	.	.	.
		D3	X	X	.
CCIBt 3247	<i>Nostoc</i> sp.	D0	.	X	.
		D3	X	4.79	X
CCIBt 3289	<i>Calothrix</i> sp.	D0	X	.	.
		D3	0.18	.	.
CCIBt 3292	<i>Nostoc</i> sp.	D0	.	.	.
		D3	X	X	.
CCIBt 3307	<i>Komarekiella atlantica</i>	D0	X	0.50	.
		D3	0.51	1.46	.
CCIBt 3320	<i>Calothrix</i> sp.	D0	X	X	.
		D3	X	0.31	.
CCIBt 3321	<i>Tolypothrix</i> sp.	D0	X	.	.
		D3	X	.	.
CCIBt 3324	<i>Leptolyngbya</i> sp.	D0	.	.	.
		D3	.	X	.
CCIBt 3343	<i>Dolichospermum</i> sp.	D0	X	.	.
		D3	0.41	.	.

Strain code	Name	Days	SH ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	P-334 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	MGA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
CCIBt 3496	<i>Myxosarcina</i> sp.	D0	.	.	.
		D3	.	X	.
CCIBt 3551	<i>Brasilonema octagenarum</i>	D0	X	.	.
		D3	X	X	.
CCIBt 3607	<i>Gloeocapsa</i> sp.	D0	.	.	.
		D3	X	X	.
CENA 543	<i>Nostoc</i> sp.	D0	X	.	.
		D3	X	.	.
CENA 596	<i>Nodularia spumigena</i>	D0	X	1.31	.
		D3	1.48	5.22	X
CENA 21	<i>Nostoc piscinale</i>	D0	.	.	.
		D3	.	X	.
LTPNA DBG 72	<i>Nostoc</i> sp.	D0	X	.	.
		D3	X	X	X
ITEP 24	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	D0	0.96	X	X
		D3	7.05	0.38	0.42
ITEP 26	<i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	D0	0.17	X	X
		D3	8.17	0.85	0.35

The strains in which MAAs were quantified are presented in Figure 4.

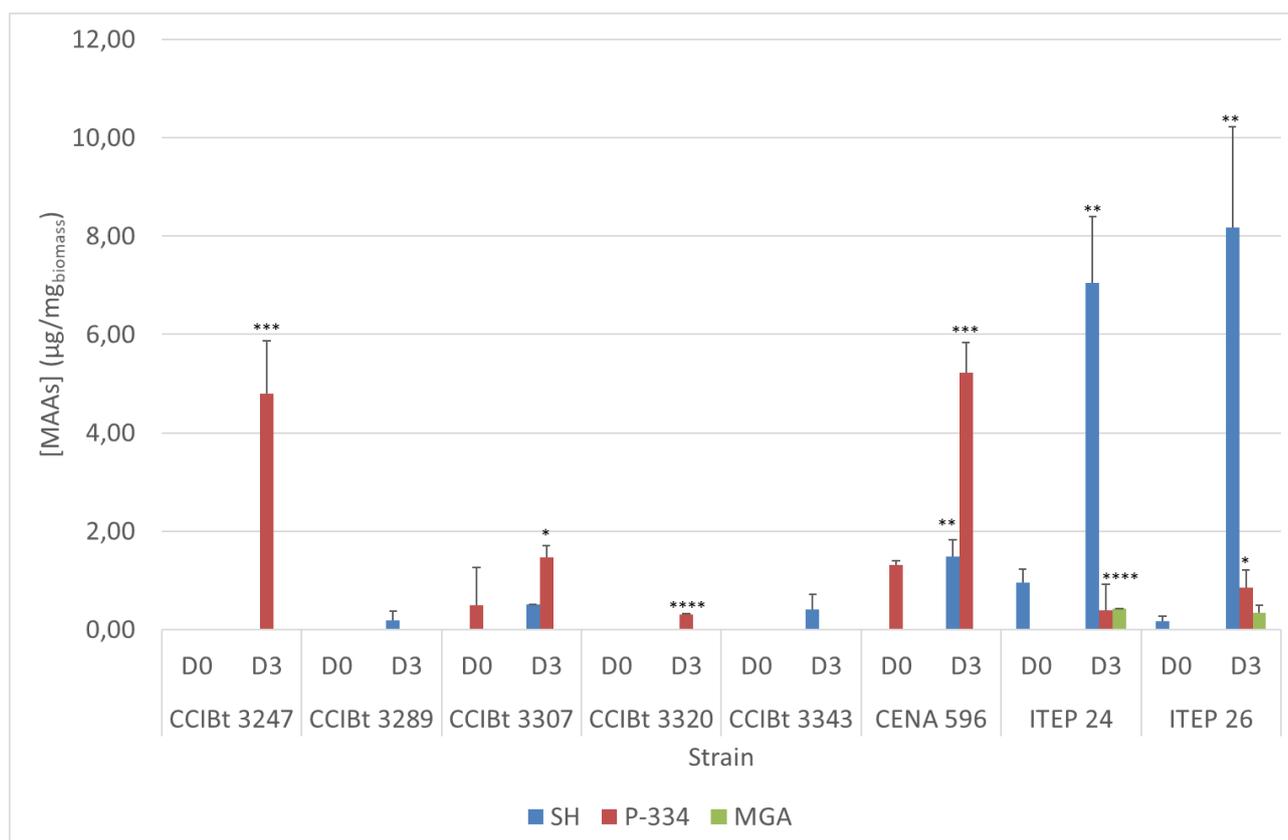


Figure 4. Summary of quantification results stated as μg MAAs/mg biomass. SH – shinorine; P-334 – porphyra-334, MGA – mycosporine-glycine-alanine. Data are presented as means \pm standard deviations ($n=3$). Significant differences are reported according to t-student to comparisons between same strain and MAAs under different days: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. D0 - day 0, before UV induction and D3 – day 3, after 72 h of exposure to PAR, UVA and UVB radiation.

For example, *Nodularia spumigena* CENA 596 produced porphyra-334 ($1.31 \mu\text{g mg}^{-1}$) and shinorine (above the limits of detection) before UV irradiance. After 72 h exposure to UVR, the concentrations increased significantly to $5.22 \mu\text{g mg}^{-1}$ for porphyra-334 and $1.48 \mu\text{g mg}^{-1}$ for shinorine (Figure 4). Sinha *et al.* 2003 reported these two MAAs in a strain of *Nodularia spumigena* and suggested that biosynthesis could be induced by UVB radiation to provide protection of organelles and other cellular components sensitive to UVR [40]. *Komarekiella atlantica* CCIBt 3307 also produced porphyra-334 ($0.50 \mu\text{g mg}^{-1}$) and shinorine (above the limits of detection) under ambient light conditions, with concentrations increasing significantly after UV irradiance to $1.46 \mu\text{g mg}^{-1}$ for porphyra-334 and $0.51 \mu\text{g mg}^{-1}$ for shinorine. A significant increase in the concentrations of MAAs was also observed in *Nostoc* sp. CCIBt 3247. After 3 days irradiance, the concentration of porphyra-334 increased to $4.79 \mu\text{g mg}^{-1}$. Rastogi *et al.* 2016 also reported a significant increase in MAA biosynthesis in *Nostoc* sp. R76DM when exposed to UVB radiation [41]. MAAs were also

constitutively biosynthesized in *Nostoc* sp. strains CENA 543 and LTPNA DBG 72, but at very low levels (Table 6). *Calothrix* sp. strains CCIBt 3289 and CCIBt 3320 biosynthesized MAAs above the LoD under ambient light exposure, with only a marginal increase after UV irradiance (Table 6). Hartmann *et al.* (2015) did not detect MAAs in a *Calothrix* sp. strain analysed by HILIC [19]. Likewise, in a previous study that used a UHPLC-DAD-QTOFMS method, no shinorine or porphyrin-334 could be detected in *Calothrix* sp. CCIBt 3289 [36]. When taken together with the data presented in Table 6 supports that the validated method using MRM experiments developed herein is more selective and allows MAAs to be detected and quantified even at extremely low concentrations.

Sphaerospermopsis torques-reginae ITEP-24 and ITEP-26 were the only strains that produced all three MAAs (porphyrin-334, shinorine and mycosporine-glycine-alanine) irrespective of whether the strains had been exposed to UVR or not. After UVR induction the concentrations of these MAAs increased substantially from 0.96 $\mu\text{g mg}^{-1}$ to 7.85 $\mu\text{g mg}^{-1}$ for strain ITEP-024 and from 0.17 $\mu\text{g mg}^{-1}$ to 9.37 $\mu\text{g mg}^{-1}$ for strain ITEP-026 (Figure 4). The chromatogram for the strain *S. torques-reginae* ITEP-024 is shown in Figure 5. The MAAs commonly found in cyanobacteria have UVR absorption maxima predominantly in the UVB spectrum and induction of MAA biosynthesis by exposure to UVB has convincingly been demonstrated herein and by many other studies [39,42,43]. The core precursor of MAAs is 4-deoxygadusol (4-DG) which can be synthesized through the shikimate pathway and pentose phosphate pathway [44]. Genes encoding a desmethyl-4-deoxygadusol synthase and *O*-methyltransferase essential for 4-DG biosynthesis are commonly located within an operon in many cyanobacteria [45]. This operon has been shown to be transcriptionally regulated by a LuxR family protein called OrrA under UVB radiation [46]. A reduced pterin has also been proposed as the photoreceptor responsible for UVB induction of MAA synthesis in *Chlorogloeopsis* PCC 6912 [47]. However, other UVB signal transduction components linking the photoreceptor to transcriptional activation of MAA biosynthesis have not yet been identified. Here we demonstrate that two strains of *S. torques-reginae* constitutively produce three MAAs well above the LoD of the detection methods, and that concentrations can be sustainably increased following UVB induction (Figures 4 and 5). We have recently obtained the genome sequence for *S. torques-reginae* ITEP-024, transcriptomics and proteomics analysis of this species could provide elucidate intermediates for UVB signalling in the future.

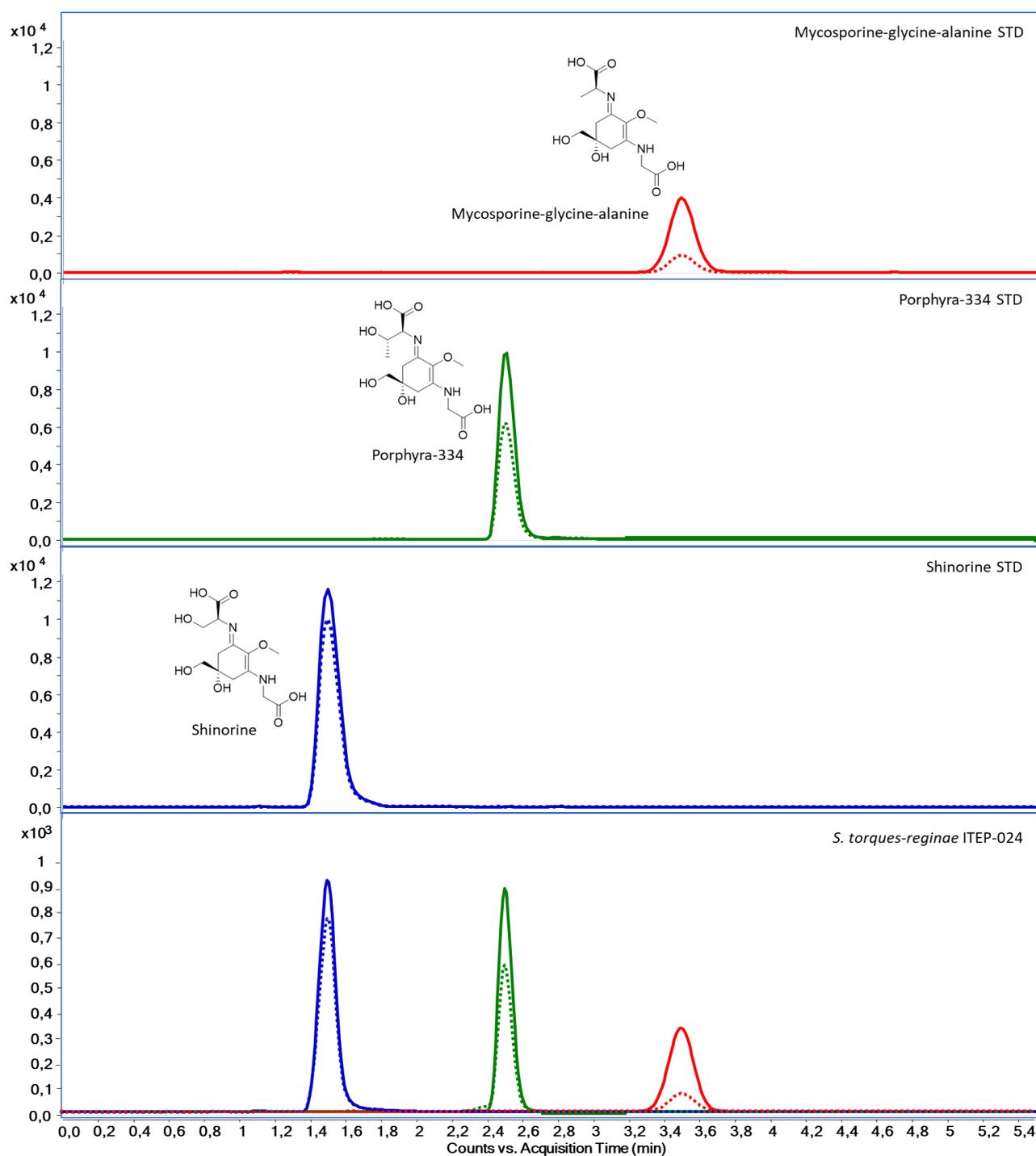


Figure 5. Extracted ion chromatogram, in positive mode, of MAAs standard (mycosporine-glycine-alanine, porphyra-334 and shinorine) and extracted ion chromatogram of a MAAs extract of *S. torques-reginae* ITEP-024. The transitions corresponding to the quantifier (full line) and qualifier (dashed line) are presented.

Conclusions

This study describes a method for the quantification of shinorine, porphyra-334 and mycosporine-glycine-alanine, and considers important validation parameters such as specificity, accuracy, recovery, matrix effects and stability. A rapid extraction method for MAAs was also developed which uses environmentally friendly and inexpensive solvents. The LC-MS/MS method can detect and quantify MAAs in 6 minutes and offers an easy-to-use system for non-specialist analyst interested in the identification and quantification of MAAs especially present in low concentrations.

Ethical statement

No animal or human subjects were used in the study encompassed by the manuscript titled “Development and validation of a rapid liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for mycosporine-like amino acids (MAAs) quantification in cyanobacteria”.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author contributions

VG, FRJ, LSM, PFL and EP have worked in the conception and design of the study; VG and LSM have performed the quantification tests; VG, FRJ, and LSM have performed the experiments and acquisition of data; VG and FRJ have analysed the data and drafted the article. All authors have made substantial contributions to conception of this manuscript, agree to authorship and approve the final version for submission.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES/PNPD (2018/1.1065.9.1) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq through a doctoral scholarship (Process 141253/2018-5) and by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (FAPESP 2015/22742-4 and 2014/50420-9).

References

- [1] K.P. Lawrence, P.F. Long, A.R. Young, Mycosporine-Like Amino Acids for Skin Photoprotection, *Curr. Med. Chem.* 25 (2017) 5512–5527. doi:10.2174/0929867324666170529124237.
- [2] H. Nakamura, J. Kobayashi, Y. Hirata, Separation of mycosporine-like amino acids in marine organisms using reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 250 (1982) 113–118.
- [3] E. Chrapusta, A. Kaminski, K. Duchnik, B. Bober, M. Adamski, J. Bialczyk, Mycosporine-like amino acids: potential health and beauty ingredients, *Mar. Drugs.* 15 (2017) 326.
- [4] N. Wada, T. Sakamoto, S. Matsugo, Mycosporine-Like Amino Acids and Their Derivatives as Natural Antioxidants, *Antioxidants.* 4 (2015) 603–646. doi:10.3390/antiox4030603.
- [5] D. Joshi, C. Mohandass, M. Dhale, Effect of UV-B Radiation and Desiccation Stress on Photoprotective Compounds Accumulation in Marine *Leptolyngbya* sp., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 184 (2018) 35–47.
- [6] R. Waditee-Sirisattha, H. Kageyama, W. Sopun, Y. Tanaka, T. Takabe, Identification and upregulation of biosynthetic genes required for accumulation of mycosporine-2-glycine under salt stress conditions in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 1763–1769.
- [7] A. Oren, N. Gunde-Cimerman, Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites?, *FEMS Microbiol. Lett.* 269 (2007) 1–10. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00650.x.
- [8] K. Whitehead, J.I. Hedges, Photodegradation and photosensitization of mycosporine-like amino acids, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 80 (2005) 115–121. doi:10.1016/j.jphotobiol.2005.03.008.
- [9] R. de Nys, P.D. Steinberg, Linking marine biology and biotechnology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 244–248.
- [10] R.P. Rastogi, R.P. Sinha, Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary

metabolites, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 521–539.

- [11] J. Ryu, S.-J. Park, I.-H. Kim, Y.H. Choi, T.-J. Nam, Protective effect of porphyra-334 on UVA-induced photoaging in human skin fibroblasts, *Int. J. Mol. Med.* 34 (2014) 796–803.
- [12] D.M. Bliesner, *Validating chromatographic methods: a practical guide*, John Wiley & Sons, 2006.
- [13] S. Chandran, R.S.P. Singh, Comparison of various international guidelines for analytical method validation, *Die Pharm. Int. J. Pharm. Sci.* 62 (2007) 4–14.
- [14] W.C. Dunlap, B.E. Chalker, Identification and quantitation of near-UV absorbing compounds (S-320) in a hermatypic scleractinian, *Coral Reefs.* 5 (1986) 155–159.
- [15] S.W. Jeffrey, H.S. MacTavish, W.C. Dunlap, M. Vesk, K. Groenewoud, Occurrence of UVA-and UVB-absorbing compounds in 152 species (206 strains) of marine microalgae, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 189 (1999) 35–51.
- [16] A.I. Callone, M.O. Carignan, N.G. Montoya, J.I. Carreto, Biotransformation of mycosporine like amino acids (MAAs) in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 84 (2006) 204–212. doi:10.1016/j.jphotobiol.2006.03.001.
- [17] K. Whitehead, J.I. Hedges, Analysis of mycosporine-like amino acids in plankton by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry, *Mar. Chem.* 80 (2002) 27–39.
- [18] A. Hartmann, A. Murauer, M. Ganzera, Quantitative analysis of mycosporine-like amino acids in marine algae by capillary electrophoresis with diode-array detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 138 (2017) 153–157.
- [19] A. Hartmann, K. Becker, U. Karsten, D. Remias, M. Ganzera, Analysis of mycosporine-like amino acids in selected algae and cyanobacteria by hydrophilic interaction liquid chromatography and a novel MAA from the red alga *Catenella repens*, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 6291–6305.
- [20] J.I. Carreto, M.O. Carignan, Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects, *Mar. Drugs.* 9 (2011) 387–446.
- [21] ICH, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), in: *Int. Conf. Harmon.*

Geneva, Switz., 2005.

- [22] B. Magnusson, *The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics* (2014), (2014).
- [23] J.W. Dolan, Peak tailing and resolution, *LC GC NORTH Am.* 20 (2002) 430–437.
- [24] R. Ciolla, *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho: HPLC*, São Paulo Edgard Blücher. (2003).
- [25] P.R. Gorham, J. McLachlan, U.T. Hammer, W.K. Kim, Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb: With Plate 7, 1 figure and 3 tables in the text, *Int. Vereinigung Für Theor. Und Angew. Limnol. Verhandlungen.* 15 (1964) 796–804.
- [26] Allcrom, Synergi™ com 4 tipos de Seletividades a sua escolha!, (2016). <http://www.allcrom.com.br/produtos/produtos-hplc-uhplc/colunas-phenomenex/synergi> (accessed February 8, 2017).
- [27] European Commission, *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.* SANTE/11813/2017, 2017.
- [28] E. Stokvis, H. Rosing, J.H. Beijnen, Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?, *Rapid Commun. Mass Spectrom. An Int. J. Devoted to Rapid Dissem. Up-to-the-Minute Res. Mass Spectrom.* 19 (2005) 401–407.
- [29] M. Chollet-Krugler, T.T.T. Nguyen, A. Sauvager, H. Thüs, J. Boustie, Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in Time-Series of Lichen Specimens from Natural History Collections, *Molecules.* 24 (2019) 1070.
- [30] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* 7 (2017) 42717.
- [31] W.M. Meylan, P.H. Howard, Atom/fragment contribution method for estimating octanol–water partition coefficients, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 83–92.

- [32] Z. Zhang, X. Gao, T. Yuri, M. Shingo, O. Hiroo, Researches on the stability of porphyrin-334 solution and its influence factors, *J. Ocean Univ. China*. 3 (2004) 166–170.
- [33] F. de la Coba, J. Aguilera, N. Korbee, M.V. de Gálvez, E. Herrera-Ceballos, F. Álvarez-Gómez, F.L. Figueroa, UVA and UVB Photoprotective Capabilities of Topical Formulations Containing Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) through Different Biological Effective Protection Factors (BEPFs), *Mar. Drugs*. 17 (2019) 55.
- [34] R.P. Rastogi, A. Incharoensakdi, UV radiation-induced biosynthesis, stability and antioxidant activity of mycosporine-like amino acids (MAAs) in a unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. CU2556, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 130 (2014) 287–292.
- [35] F.R.S. Atta-ur-Rahman, *Studies in natural products chemistry*, Elsevier, 2018.
- [36] V. Geraldes, F.R. Jacinavicius, D.B. Genuário, E. Pinto, Identification and distribution of mycosporine-like amino acids in Brazilian cyanobacteria by UHPLC-DAD-QTOF, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2019).
- [37] C. Hu, G. Völler, R. Süßmuth, E. Dittmann, J. Kehr, Functional assessment of mycosporine-like amino acids in *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806, *Environ. Microbiol.* 17 (2015) 1548–1559.
- [38] J.F. Rios, C.R. Leal, R. Janaina, C.L. Retz, Phenotypic plasticity and negative allelopathy in *Microcystis* strains, *Ann. Microbiol.* 66 (2016) 1265–1276.
- [39] R.P. Sinha, M. Klisch, E.W. Helbling, D.-P. Häder, Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 60 (2001) 129–135.
- [40] R.P. Sinha, N.K. Ambasht, J.P. Sinha, M. Klisch, D.-P. Häder, UV-B-induced synthesis of mycosporine-like amino acids in three strains of *Nodularia* (cyanobacteria), *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 71 (2003) 51–58.
- [41] R.P. Rastogi, R.R. Sonani, D. Madamwar, A. Incharoensakdi, Characterization and antioxidant functions of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc* sp. R76DM, *Algal Res.* 16

(2016) 110–118.

- [42] A. Portwich, F. Garcia-Pichel, Ultraviolet and osmotic stresses induce and regulate the synthesis of mycosporines in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912, *Arch. Microbiol.* 172 (1999) 187–192.
- [43] R.P. Sinha, N.K. Ambasht, J.P. Sinha, D.-P. Häder, Wavelength-dependent induction of a mycosporine-like amino acid in a rice-field cyanobacterium, *Nostoc commune*: role of inhibitors and salt stress, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2 (2003) 171–176.
- [44] M.A. Pope, E. Spence, V. Seralvo, R. Gacesa, S. Heidelberger, A.J. Weston, W.C. Dunlap, J.M. Shick, P.F. Long, O-Methyltransferase Is Shared between the Pentose Phosphate and Shikimate Pathways and Is Essential for Mycosporine-Like Amino Acid Biosynthesis in *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *ChemBioChem.* 16 (2015) 320–327.
- [45] E. Spence, W.C. Dunlap, J.M. Shick, P.F. Long, Redundant pathways of sunscreen biosynthesis in a cyanobacterium, *ChemBioChem.* 13 (2012) 531–533.
- [46] J. Shang, Z. Zhang, X. Yin, M. Chen, F. Hao, K. Wang, J. Feng, H. Xu, Y. Yin, H. Tang, UV-B induced biosynthesis of a novel sunscreen compound in solar radiation and desiccation tolerant cyanobacteria, *Environ. Microbiol.* 20 (2018) 200–213.
- [47] A. Portwich, F. Garcia-Pichel, A novel prokaryotic UVB photoreceptor in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912, *Photochem. Photobiol.* 71 (2000) 493–498.