

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**LUIZA GRECCO E MARQUES**

Aminoácidos tipo micosporina: novas  
metodologias e distribuição em  
macroalgas da costa brasileira

**Versão corrigida da Tese defendida**

São Paulo  
Data do Depósito na SPG:  
**02/mar/2015**

LUIZA GRECCO E MARQUES

Aminoácidos tipo micosporina: novas metodologias e  
distribuição em macroalgas da costa brasileira

*Tese apresentada ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências Biológicas  
(Bioquímica)*

*Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto*

São Paulo  
2015

**Ficha Catalográfica**

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

Marques, Luiza Grecco e  
M886a Aminoácidos tipo micosporina : novas metodologias e distribuição  
em macroalgas da costa brasileira / Luiza Grecco e Marques. -- São  
Paulo, 2015.  
152p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de  
São Paulo. Departamento de Bioquímica.  
Orientador: Colepicolo Neto, Pio

1. Aminoácido : Bioquímica 2. Produtos naturais 3. Macroalgas  
I. T. II. Colepicolo Neto, Pio, orientador.

574.19245 CDD

*Dedico esta tese aos meus pais, por todo o amor, compreensão, paciência e apoio, em todos os momentos da vida. Esta tese não existiria sem vocês.*

## *Agradecimentos*

Ao Pio, meu orientador desde que eu era uma aluna de graduação, cursando o 3º ano de Química. Pela boa convivência, pelas risadas e pelas broncas quando foram necessárias. Por ter me feito crescer muito durante esses anos, pessoal e cientificamente, obrigada.

Aos meus pais, por sempre terem me dado apoio para correr atrás dos meus sonhos. Por terem sido os maiores incentivadores da minha ida para a pós-graduação logo após concluir a graduação, e por todo o suporte (psicológico, financeiro, etc) que me deram esse tempo todo. Não tenho palavras que descrevam o quanto sou grata a vocês.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química, por terem fornecido os materiais e o ambiente necessários para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento (CNPq, Capes, Fapesp) pela possibilidade de confecção deste trabalho, por meio de todos os equipamentos e materiais que foram comprados com as verbas fornecidas. Em especial ao CNPq, pela bolsa de doutorado direto concedida.

A todos os colegas de laboratório de diferentes épocas: Aline, Ana, Anderson, Angela, Camila, Cicero, Cintia, Daniel, Diego, Diogo, Dinaelza, Ednailson, Eliezer, Erica, Erika, Evandro, Fabiane, Felipe, Helena, João, Karina, Leonardo, Ligia, Luiz, Michelle, Moacir, Patrícia, Paula, Renato, Sandra, Sara, Silvia, Stéphanie, Tatiana, Thais e Vanessa. Por tudo que me ensinaram, todas as ajudas e toda a parceria, científica ou não. Agradecimentos especiais vão à Silvia, à Sara e especialmente à Karina, que me auxiliaram muito quando eu era aluna de iniciação científica, e me mostraram várias vertentes do trabalho realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas; à Camila e à Michelle, que foram minhas alunas de iniciação científica e me ajudaram muito, além de me ensinarem muito; e aos técnicos do laboratório (Ed, Sandrinha, Renato, Fabi e Leo).

Ao Química em Ação e a todas as pessoas que passaram por ele desde que entrei no grupo. Obrigada por manterem minha mente fora da Química “pura” e por acreditarem, junto comigo, que é possível desmistificar esse bicho de sete cabeças. Mantenham o grupo forte e presente, pois ele merece (e vocês também).

Às Capitãs da Areia, aos Marechais do Mar e a todos os agregados. Obrigada por fazerem parte da minha vida há tanto tempo; por confrontarem a minha escolha de fazer doutorado – e, assim, fortalecer mais meus argumentos e razões; por sempre tentarem entender minha área de pesquisa; por me forçarem a explicá-la com palavras inteligíveis,

mantendo a minha mente aberta para o mundo fora da academia; por discutirem ciência comigo de um ponto de vista não-bioquímico; e por estarem sempre presentes. Obrigada.

Aos amigos de IQ, de todos os momentos que passei aqui, desde o início da graduação. Nosso desenvolvimento – em alguns casos, simultâneo – me faz olhar para trás e ver que a jornada toda foi excepcional. Obrigada por estarem presentes e por saberem o que dizer em tantos momentos.

À Representação Discente de Pós-Graduação e, agora, à Associação de Pós-Graduandos, por tudo que tem feito em favor dos alunos. Não é um processo fácil, mas é sempre bom ver gente disposta a se doar um pouco. Em especial ao Bruno Queliconi, à Marcela e ao Phillipe, que viraram grandes amigos em meio a todas as burocracias.

Aos funcionários do IQ, especialmente às Seções de Graduação, Pós-Graduação e Atividades Auxiliares. Todos vocês me ajudaram muito nessa jornada.

Às Profas. Dras. Flávia Carla Meotti, Iolanda Midea Cuccovia e Nadja Cristhina de Souza Pinto, por terem participado da minha banca de qualificação e me suscitado questionamentos muito importantes.

A outros professores do IQ-USP, por todas as discussões científicas, políticas e aleatórias que tivemos ao longo dos anos, que me enriqueceram muito. Às Profas. Dras. Alícia Kowaltowski e Shirley Schreier; e aos Profs. Drs. Bayardo Torres, Fabio Rodrigues, Frederico Gueiros, Guilherme Marson, Josef Wilhelm Baader, Lucas Rodrigues, Mauro Bertotti, Pedro Vitoriano, Paulo Teng (*in memoriam*) e Thiago Correra.

A diversos professores que também atuam na Ficologia e na área de Produtos Naturais, por terem me proporcionado discussões e dicas de grande valia. Às Profas. Dras. Mutue Fujii, Nair Yokoya e Luciana Retz, do Instituto de Botânica; ao prof. Dr. Ernani Pinto, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP; ao Prof. Dr. Claudio Pereira, do Instituto de Química e Geociências, na Universidade Federal de Pelotas; e à Profa. Dra. Valeria Teixeira, do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense. Em especial à Prof. Dra. Mutue Fujii, pela ajuda inestimável com a identificação das algas coletadas no Espírito Santo, e às suas alunas Mayra Jamas, Luanda Soares e Cecília Kano, que também auxiliaram no processo.

Ao Kekanto e às pessoas que conheci por causa dele, por não permitir que a minha escrita se tornasse exclusivamente técnica durante os anos de doutorado. E, claro, pelas amizades e pelos tesouros descobertos.

À Jocasta Ávila e à Nathalia Bernardino, do Laboratório de Espectroscopia Molecular, pelo auxílio com algumas medidas de espectroscopia UV-Visível.

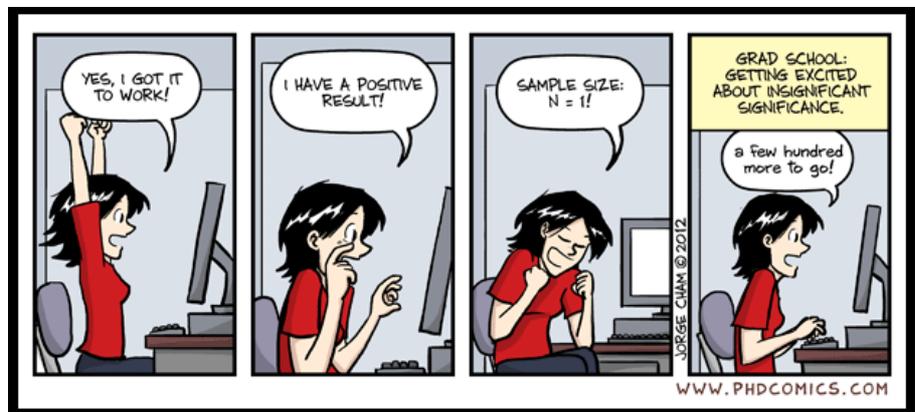
À Carina Petsch, do Centro Polar e Climático/UFRGS, e à Maria Teresa Burin, da Geografia/USP, pela ajuda com mapas ao longo do doutorado. Em especial à Carina, pela confecção do mapa que ilustra esta tese.

Ao Gustavo Fernandes, da Biodata Analysis, pela ajuda com as análises estatísticas.

À Profa. Dra. Maria Teresa Machini e ao Cleber Liria, do Laboratório de Química de Peptídeos (IQ/USP), pela parceria na análise dos aminoácidos de nosso composto desconhecido.

À Carol, pelo auxílio com a diagramação e com praticamente todas as coisas da minha vida. Obrigada por ter me mantido “menos pobre” após o término da bolsa, por enlouquecer (sempre!) junto comigo e pelos dez anos de amizade.

E por último, mas não menos importante, ao Rafael, pelo apoio e confiança incondicionais e pela paciência infinita durante estes últimos meses. O resultado não teria sido o mesmo sem você.



## ***Resumo***

Marques, L. G. **Aminoácidos tipo micosporina: novas metodologias e distribuição em macroalgas da costa brasileira.** 2015. 152p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A radiação ultravioleta (RUV) causa efeitos deletérios em ecossistemas aquáticos e terrestres. Um dos mecanismos de defesa criados pelos organismos para evitar estes danos é o acúmulo de compostos que absorvem RUV, dentre os quais os aminoácidos tipo micosporina (MAAs, do inglês *mycosporine-like amino acids*) representam uma classe importante. As MAAs são substâncias solúveis em água caracterizadas pela presença de uma unidade ciclohexenona ou ciclohexenimina conjugada com nitrogênio substituído por um aminoácido, aminoálcool ou grupo amino, apresentando absorção máxima entre 308 e 362 nm e altos coeficientes de absorvidade molar. Dado o importante papel desempenhado pelas MAAs na fisiologia e bioquímica celular de algas, seja atuando como protetoras de RUV ou como antioxidantes, o objetivo desta tese foi expandir o corpo de conhecimentos disponíveis sobre a ocorrência e distribuição destes compostos em macroalgas brasileiras.

Para atingir tal meta, foi necessário desenvolver procedimentos analíticos de isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência (*high procedure liquid chromatography*, HPLC), de modo a gerar padrões que pudessem ser utilizados para a qualificação e quantificação de MAAs em extratos de algas. Foi necessário também desenvolver dois novos métodos de análise por HPLC acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) – sendo um utilizado como método diagnóstico, capaz de indicar se há MAAs presentes em determinada amostra, e outro utilizado como método para quantificação. Todos os métodos trouxeram bons resultados, e os métodos por HPLC-MS foram utilizados para o estudo de diversas macroalgas coletadas na região intertidal de praias do litoral Sul do estado

do Espírito Santo – Brasil. Apesar da localização restrita, é o maior estudo desta natureza realizado até então com algas do litoral brasileiro. Além disso, 11 dos 32 gêneros e 34 das 45 espécies presentes nesta tese nunca haviam sido alvo de nenhum estudo relacionado a MAAs.

Nessas amostras, foi possível encontrar oito MAAs: chinorina, palitina, porphyra-334, asterina-330, palitinol, micosporina-2-glicina, o par *cis/trans* usujireno/palitenol e uma molécula desconhecida com relação massa-carga de 317  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ). Dentre elas, as três primeiras foram quantificadas de forma absoluta, e pôde-se perceber que as rodófitas apresentam níveis de MAAs sensivelmente maiores que as clorófitas e feófitas. Em relação à variedade, foi possível notar que, dentre as amostras que possuem dados do conteúdo de MAAs na literatura (seja para a espécie ou para o gênero), praticamente todas apresentam maior variedade de MAAs do que o anteriormente descrito. Foi encontrada a maior variedade de MAAs já descrita para uma alga parda: seis MAAs diferentes nas espécies *Dictyopteris delicatula* e *Padina gymnospora* coletadas na praia de Castelhanos – ES.

Pôde-se detectar, pela primeira vez, a presença de MAAs em 32 espécies de macroalgas. Algumas espécies mostram-se fontes muito interessantes de MAAs para diferentes usos pela indústria, seja para a obtenção de compostos puros ou para a utilização de seus extratos como ingredientes de formulações de filtros solares.

A molécula desconhecida, cujo íon quasimolecular  $[M+H]^+$  apresenta  $m/z$  317, foi tentativamente identificada como sendo a micosporina-glicina-alanina. Este é o primeiro trabalho a descrever a ocorrência desta molécula *in natura*.

**Palavras-chave:** Aminoácidos tipo micosporina, Compostos fotoprotetores, MAAs, Macroalgas, Radiação ultravioleta.

## *Abstract*

Marques, L. G. **Mycosporine-like amino acids: new methodologies and distribution among macroalgae from the Brazilian coast.** 2015. 152p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ultraviolet radiation (UVR) exerts deleterious effects on aquatic and terrestrial ecosystems. One defense mechanism created by organisms to avoid this damage is the accumulation of UV-absorbing compounds, among which the mycosporine-like amino acids (MAAs) represent an important class. MAAs are water-soluble compounds characterized by the presence of a cyclohexenone or cyclohexenimine ring conjugated with amino acids, amino alcohols or other amino groups, presenting absorption maxima ranging from 309 nm to 362 nm and high molar extinction coefficients. Given their important role in algae physiology and cellular biochemistry, as photoprotective compounds or antioxidants, the objective of this thesis is to expand the available knowledge on the occurrence and distribution of MAAs in Brazilian macroalgae.

To achieve this goal, it was necessary to develop an isolation methodology by high procedure liquid chromatography (HPLC), so as to generate standards for qualifying and quantifying MAAs in macroalgae extracts. It was also necessary to develop two new analysis methods by HPLC coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) – one utilized as a diagnosis method, capable of indicating if there are MAAs in a given sample; and the other utilized as quantification method. All methods gave good results, and the ones relying on HPLC-MS were used to study several macroalgae collected at the intertidal region of beaches located in the south coast of Espírito Santo State – Brazil. This is the biggest study of this nature ever done with Brazilian macroalgae; besides that, 11 out of 32 genera and 34 out of 45 species herein tested had never had their content of MAA assessed.

In these samples, it was possible to find eight MAAs: shinorine, palythine, porphyra-334, asterina-330, palythinol, mycosporine-2-glycine, the *cis/trans* pair usujirene/palythene and an unknown molecule with mass-to-charge ratio of 317  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ). Among them, absolute quantification was performed for the first three ones, and it was possible to notice that red algae have higher MAA levels than green and brown algae. In terms of variety, it could be seen that, amongst the samples that have MAA data available in the literature (either for the species or for the genus), nearly all present a higher MAA variety than the previously described one. The highest variety ever recorded from brown algae is presented in this work: six different MAAs in *Dictyopterus delicatula* and *Padina gymnospora*, both collected at Castelhanos Beach – ES.

For the first time, it was possible to detect MAAs in 32 species of macroalgae. Some species seem to be very interesting sources of MAAs for industrial purposes, either for obtaining pure compounds or for utilizing their extracts as ingredients of sunscreen formulas.

The unknown molecule, with mass-to-charge ratio of 317  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ), was tentatively identified as mycosporine-glycine-alanine. This is the first work to describe the occurrence of this molecule *in natura*.

**Keywords:** Mycosporine-like amino acids, Photoprotective compounds, MAAs, Macroalgae, Ultraviolet radiation.

## *Lista de figuras*

- Figura 1.1: Estruturas de algumas MAAs comumente encontradas em algas e de uma micosporina encontrada apenas em fungos. ....33
- Figura 1.2: Via do ácido chiquímico mostrando a biossíntese de flavonoides em plantas superiores via corismato e a possível biossíntese de MAAs via 3-deidroquinato e gadusol em fungos, algas e bactérias. R2 pode ser um grupo aminoácido ou aminoálcool, caracterizando diferentes MAAs. Adaptado de Shick e Dunlap (2002). ....38
- Figura 1.3: Organização dos genes relacionados à síntese de MAAs em *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 e *Aphanothece halophytica*, e os produtos gerados pelas enzimas por eles codificadas. Adaptado de Waditee-Sirisattha et al. (2014) e Balskus e Walsh (2010). ....39
- Figura 1.4: Vias de interconversão de diferentes MAAs. Os retângulos tracejados indicam compostos ainda não caracterizados. Adaptado de Carreto e Carignan (2011). ....42
- Figura 3.1: Localização dos pontos de coleta de macroalgas no estado do Espírito Santo – Brasil. 1: Praia da Bacutia. 2: Praia dos Padres. 3: Praia de Meaípe. 4: Praia Ponta de Ubu. 5: Praia de Parati. 6: Praia de Castelhanos. ....53
- Figura 3.2: Foto do ponto de coleta de número 6, a Praia de Castelhanos. Em períodos de maré baixa formam-se poças de maré, o que proporciona a ocorrência de diversas espécies e facilita a coleta. ....53
- Figura 3.3: Estruturas das MAAs isoladas por HPLC. ....65
- Figura 4.1: A: Perfis cromatográficos do extrato de Helioguard 365<sup>®</sup> com três diferentes volumes de injeção: 1, 2 e 5 µL. B: Detalhe do perfil cromatográfico de 6 a 12 minutos e destaque para os quatro picos isolados: 1-chinorina, 2-palitina, 3-porphyra-334 e 4-MAA não identificada. C: Estruturas das MAAs identificadas no extrato de Helioguard 365<sup>®</sup>. Condições cromatográficas: colunas: Synergi Polar-RP (Phenomenex<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 4 µm) e Synergi Fusion RP (Phenomenex<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 4 µm), acopladas; solvente A: 0,2% AF em água, pH 3,14 (ajustado com NH<sub>4</sub>OH); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 10 a 15 min; tempo total: 25 min; vazão: 1 mL·min<sup>-1</sup>; λ: 330 nm. ....74
- Figura 4.2: Perfis cromatográficos das corridas com os dois solventes orgânicos testados. Em preto, a fase orgânica é metanol (MeOH); em vermelho, tetra-hidrofurano (THF). Condições

cromatográficas gerais: coluna: Shim-pack PREP-SIL (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); solvente A: água deionizada; vazão: 1 mL·min<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : 330 nm. Condições específicas do perfil em preto: solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 100 a 0% de B de 10 a 20 min; tempo total: 30 min. Condições específicas do perfil em vermelho: solvente B: 100% de THF; gradiente: de 100 a 60% de B de 6 a 10 min, de 60 a 20% de B de 10 a 20 min e de 20 a 0% de B de 20 a 23 min; tempo total: 28 min. ....75

Figura 4.3: Perfil cromatográfico da primeira corrida utilizando coluna C18. Condições cromatográficas: coluna: Shim-Pack PREP-ODS (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); solvente A: 0,2% ácido acético em água (v/v) (método isocrático); tempo total: 20 min; vazão: 1 mL·min<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : 330 nm.....77

Figura 4.4: Perfis cromatográficos das quatro fases móveis aquosas testadas, entre 0 e 10 minutos (intervalo de tempo em que eluem os picos de MAAs). Condições cromatográficas gerais: coluna: Shim-pack PREP-ODS (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 8 a 10 min; tempo total: 16 min; vazão: 1 mL·min<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : 330 nm. Condições específicas: o solvente A era composto de 0,1% de AF em água, com adição de diferentes concentrações de NH<sub>4</sub>OAc, indicadas na figura.....78

Figura 4.5: Perfis cromatográficos das três condições de vazão testadas. Condições cromatográficas gerais: coluna: Shim-pack PREP-ODS (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); solvente A: 0,1% AF em água + 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 8 a 8,5 min; tempo total: 12,5 min;  $\lambda$ : 330 nm. Condições específicas: vazão variável entre 0,6 e 1,0 mL·min<sup>-1</sup>, conforme figura. ....80

Figura 4.6: Perfis cromatográficos das quatro condições de vazão testadas em coluna preparativa. Condições cromatográficas gerais: coluna: Shim-pack PREP-ODS (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 20 mm, 5  $\mu$ m); solvente A: 0,1% AF em água + 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 8 a 8,5 min; tempo total: 12,5 min;  $\lambda$ : 330 nm. Condições específicas: vazão variável entre 12 e 15 mL·min<sup>-1</sup>, conforme figura.....81

Figura 4.7: A: Perfil cromatográfico do extrato utilizado para o isolamento de MAAs. B: Detalhe do perfil cromatográfico entre 6 e 10 minutos. As frações coletadas encontram-se identificadas por seus números. Condições cromatográficas: coluna: Shim-pack PREP-ODS (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 20 mm, 5  $\mu$ m); solvente A: 0,1% AF em água + 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 8 a 8,5 min; tempo total: 12,5 min; vazão: 13 mL·min<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : 330 nm. ....82

Figura 4.8: Perfis cromatográficos de três frações isoladas. A: Perfil cromatográfico da fração 2 (contendo majoritariamente chinorina): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. B: Perfil cromatográfico da fração 3 (contendo majoritariamente palitina): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. C: Perfil cromatográfico da fração 5 (contendo majoritariamente porphyra-334): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. Condições cromatográficas: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm); solvente A: 0,1% AF em água (v/v) + 5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 5 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,1 mL·min<sup>-1</sup> .....83

Figura 4.9: Perfis cromatográficos das três frações isoladas. A: Perfil cromatográfico da fração 2 (contendo majoritariamente chinorina): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. B: Perfil cromatográfico da fração 3 (contendo majoritariamente palitina): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. C: Perfil cromatográfico da fração 5 (contendo majoritariamente porphyra-334): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. Condições cromatográficas: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm); solvente A: 0,1% AF em água (v/v) + 5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 5 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,1 mL·min<sup>-1</sup> .....85

Figura 4.10: Espectros de absorção na faixa de 250-400 nm das frações isoladas por HPLC e cromatografia em coluna. Da esquerda para a direita: fração 2 (chinorina), fração 3 (palitina) e fração 5 (porphyra-334). .....86

Figura 4.11: Perfis cromatográficos dos dois tratamentos de amostra testados. Em preto, *P. brasiliense* fresca; em vermelho, *P. brasiliense* liofilizada. No detalhe pode-se ver o cromatograma entre 5 e 12 min. Condições cromatográficas: coluna: Shim-pack PREP-ODS (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 5 µm); solvente A: 0,1% AF em água + 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 8 a 8,5 min; tempo total: 12,5 min; vazão: 1 mL·min<sup>-1</sup>. .....88

Figura 4.12: Espectros entre 250 nm e 400 nm do segundo extrato dos dois tratamentos de amostra testados. Em preto, *P. brasiliense* fresca; em vermelho, *P. brasiliense* liofilizada. ....88

Figura 4.13: Perfis cromatográficos da injeção do extrato de Helioguard 365<sup>®</sup> por dois diferentes métodos. A: Condições cromatográficas: colunas: Synergi Polar-RP (Phenomenex<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 4 µm) e Synergi Fusion RP (Phenomenex<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 4 µm), acopladas; solvente A: 0,2% AF em água (v/v), pH 3,14 (ajustado com NH<sub>4</sub>OH);

solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 10 a 15 min; tempo total: 25 min; vazão: 1 mL·min<sup>-1</sup>; λ: 330 nm. B: Condições cromatográficas: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm); solvente A: 0,2% AF em água (v/v), pH 3,14 (ajustado com NH<sub>4</sub>OH); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 6 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,0 mL·min<sup>-1</sup>; λ: 330 nm. ....90

Figura 4.14: Perfil cromatográfico da corrida de Helioguard 365<sup>®</sup> realizada com gradiente curto. Condições cromatográficas: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm); solvente A: 0,2% AF em água (v/v), pH 3,14 (ajustado com NH<sub>4</sub>OH); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 3 min; tempo total: 5 min; vazão: 1,0 mL·min<sup>-1</sup>; λ: 330 nm. ....92

Figura 4.15: Perfis cromatográficos das cinco fases móveis aquosas testadas, entre 0 e 4 minutos (intervalo de tempo em que eluem os picos de MAAs do padrão Helioguard<sup>®</sup>). Condições cromatográficas gerais: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 5 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,3 mL·min<sup>-1</sup>; λ: 330 nm. Condições específicas: solvente A variável, conforme mostra a figura. ....93

Figura 4.16: Perfis cromatográficos do segundo conjunto de fases móveis aquosas testadas, entre 0 e 3 minutos (intervalo de tempo em que eluem os picos de MAAs da macroalga *P. brasiliense*). Condições cromatográficas gerais: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 5 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,3 mL·min<sup>-1</sup>; λ: 330 nm. Condições específicas: solvente A variável, conforme mostra a figura. ....94

Figura 4.17: Resultados típicos do método exploratório desenvolvido. A: À esquerda, perfil geral da espectrometria de massas (TIC – *Total Ion Count*); à direita, perfil cromatográfico em 330 nm. B: À esquerda, perfil temporal da intensidade de íons precursores que geram o fragmento de *m/z* 186; à direita, perfil temporal da intensidade de íons precursores que geram o fragmento de *m/z* 197. C: Identificação de íons precursores no pico 1 (chinorina); à esquerda, íons geradores do pico de *m/z* 186; à direita, à esquerda, íons geradores do pico de *m/z* 197. D: Identificação de íons precursores no pico 2 (porphyra-334); à esquerda, íons geradores do sinal de *m/z* 186; à direita, à esquerda, íons geradores do sinal de *m/z* 197. Condições cromatográficas: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm); solvente A: 0,1% AF em água (v/v) + 5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 5 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,3 mL·min<sup>-1</sup>; λ: 330 nm. ....97

Figura 4.18: Curvas de calibração, por espectrometria de massas, dos isolados de palitina, chinorina e porphyra-334, respectivamente. As equações de cada curva e seus coeficientes de correlação estão descritos ao lado de cada gráfico. ....	100
Figura 4.19: Espectros de fragmentação e fórmula estrutural de ambas as espécies de íon quasimolecular $[M+H]^+$ de $m/z$ 303. A: Molécula identificada como palitinol. B: Molécula identificada como micosporina-2-glicina. ....	102
Figura 4.20: Estruturas das MAAs estudadas pelo método quantitativo.....	104
Figura 4.21: Proporção de algas vermelhas, pardas e verdes no número total de amostras coletadas, no número de espécies (e variedades) e no número de gêneros. ....	106
Figura 4.22: Quantificação relativa da MAA asterina-330 nas amostras em que pôde ser identificada. As médias apresentadas pelas algas de cada grupo, indicado pelas letras a/b/c/..., não podem ser consideradas estatisticamente diferentes (teste Tukey). ....	113
Figura 4.23: Quantificação relativa da MAA micosporina-2-glicina nas amostras em que pôde ser identificada. As médias apresentadas pelas algas de cada grupo, indicado pelas letras a/b/c/..., não podem ser consideradas estatisticamente diferentes (teste Tukey). ....	114
Figura 4.24: Quantificação relativa da MAA palitinol nas amostras em que pôde ser identificada. As médias apresentadas pelas algas de cada grupo, indicado pelas letras a/b/c/..., não podem ser consideradas estatisticamente diferentes (teste Tukey). ....	115
Figura 4.25: Quantificação relativa do par <i>trans/cis</i> paliteno/usujireno nas amostras em que pôde ser identificado. As médias apresentadas pelas algas de cada grupo, indicado pelas letras a/b/c/..., não podem ser consideradas estatisticamente diferentes (teste Tukey)....	116
Figura 4.26: Quantificação relativa da MAA de $m/z$ 317 nas amostras em que pôde ser identificada. As médias apresentadas pelas algas de cada grupo, indicado pelas letras a/b/c/..., não podem ser consideradas estatisticamente diferentes (teste Tukey). ....	117
Figura 4.27: Espectro de absorção no ultravioleta da molécula de íon quasimolecular $[M+H]^+$ de $m/z$ 317.....	125
Figura 4.28: Estruturas propostas para a MAA de $m/z$ 317.....	126
Figura 4.29: Determinação da massa exata do íon quasimolecular de $m/z$ 317 por espectrometria de massas de alta resolução. ....	128
Figura 4.30: Espectros de massas do íon $m/z$ 317. A: composto isolado. B: composto isolado após troca de H/D (deuteração dos hidrogênios ionizáveis). ....	129
Figura 4.31: Análise por HPLC e amperometria pulsada dos aminoácidos presentes na amostra hidrolisada. A: Perfil cromatográfico contendo apenas os padrões de glicina (1),	

alanina (2), ácido glutâmico (3) e ácido aspártico (4). B: Perfil cromatográfico da amostra hidrolisada (1 e 2) e dos padrões de aminoácidos (3-5), mostrando baixa reprodutibilidade. Condições cromatográficas: colunas: AminoPac PA10; solvente A: água; solvente B: NaOH 0,25 mol·L<sup>-1</sup> em água; solvente C: NaOAc 1,0 mol·L<sup>-1</sup>; gradiente descrito na Tabela 3.11; tempo total: 49 min; vazão: 0,25 mL·min<sup>-1</sup> .....131

Figura 4.32: Análise realizada em HPLC acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução, para a presença de alanina na amostra hidrolisada de  $m/z$  317. A: Perfil cromatográfico contendo apenas o pico relativo à  $m/z$  90, correspondente ao íon quasimolecular  $[M+H]^+$  da alanina; em marrom, a amostra hidrolisada; em verde, o branco. B: Íons encontrados na amostra hidrolisada, no tempo de retenção correspondente ao pico apresentado no perfil cromatográfico. Condições cromatográficas: colunas: Ascentis<sup>®</sup> Express HILIC (150 x 2,1 mm, 2,7  $\mu$ m); solvente A: 5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc em água, pH 3 (ajustado com AF); solvente B: 100% de acetonitrila; gradiente: de 95 a 65% de B de 2 a 17 min, e de 65 a 40% de B de 17 a 23 min; tempo total: 25 min; vazão: 0,5 mL·min<sup>-1</sup> .....132

## *Lista de tabelas*

Tabela 3.1: Relação das algas vermelhas coletadas no Estado do Espírito Santo, com as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das excicatas depositadas no herbário ficológico do Instituto de Botânica (SP).....	50
Tabela 3.2: Relação das algas pardas coletadas no Estado do Espírito Santo, com as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das excicatas depositadas no herbário ficológico do Instituto de Botânica (SP).....	51
Tabela 3.3: Relação das algas verdes coletadas no Estado do Espírito Santo, com as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das excicatas depositadas no herbário ficológico do Instituto de Botânica (SP).....	52
Tabela 3.4: Gradiente utilizado na primeira condição cromatográfica de isolamento de MAAs. Fase móvel B: MeOH 100%.....	57
Tabela 3.5: Condições cromatográficas utilizadas para o isolamento de MAAs utilizando coluna analítica polar (PREP-SIL).....	58
Tabela 3.6: Condições cromatográficas utilizadas para o isolamento de MAAs utilizando coluna analítica apolar (PREP-ODS).....	59
Tabela 3.7: Íons quasimoleculares $[M+H]^+$ estudados e transições utilizadas para identificar suas presenças em cada amostra. Em negrito, transição utilizada para a quantificação do íon quasimolecular em questão.....	63
Tabela 3.8: <i>Collision cell entrance potential</i> (CEP) utilizado para cada íon quasimolecular $[M+H]^+$ estudado.....	64
Tabela 3.9: MAAs isoladas por HPLC e cromatografia em coluna, seus comprimentos de onda de máxima absorção ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ), seus coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) e suas massas moleculares.....	65
Tabela 3.10: Programa de corrida no método de FIA-MS.....	68
Tabela 3.11: Gradiente de separação utilizado para análise de aminoácidos por HPLC com detecção por amperometria pulsada.....	70
Tabela 3.12: Forma de onda aplicada ao eletrodo na detecção amperométrica.....	70
Tabela 3.13: Gradiente utilizado na análise dos aminoácidos glicina e alanina por HPLC com detecção por espectrometria de massas. Fase móvel B: acetonitrila 100%.....	70

Tabela 4.1: Resolução entre os quatro picos observados nas duas combinações de colunas estudadas.....	91
Tabela 4.2: Atribuição dos íons quasimoleculares $[M+H]^+$ estudados pelo método quantitativo.....	99
Tabela 4.3: Distribuição das amostras coletadas dentre os três grupos que abrigam macroalgas: Rhodophyta (algas vermelhas), Chlorophyta (algas verdes) ou Ochrophyta (algas pardas). ....	105
Tabela 4.4: Análise qualitativa da presença de MAAs nas macroalgas do Espírito Santo utilizando o método exploratório.....	108
Tabela 4.5: Ocorrência de MAAs nas macroalgas coletadas no estado do Espírito Santo – Brasil.....	110
Tabela 4.6: Gêneros e espécies cujo conteúdo de MAAs foi estudado pela primeira vez neste trabalho. ....	122
Tabela 4.7: Determinação da massa exata das duas opções de fórmulas moleculares para o íon quasimolecular $m/z$ 317. ....	128

## *Lista de abreviações*

3-DHQ	3-dehidroquinato
$\lambda_{\text{máx}}$	comprimento de onda de máxima absorção
AF	ácido fórmico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , ou trifosfato de adenosina
CEP	<i>collision cell entrance potential</i> , ou potencial na entrada da cela de colisão
CIE	<i>Commission Internationale de L'Eclairage</i> , ou Comissão Internacional de Iluminação
D-Ala	D-alanina
DAD	detector de arranjo de diodos
DAHf	3-deoxi-D-arabinoheptosinato-7-fosfato
DHQS	3-dehidroquinato sintase
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EPCF	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato
EROs	espécies reativas de oxigênio
ESI	<i>electrospray ionization</i> , ou ionização por <i>electrospray</i>
EVS	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolona sintase
FDA	<i>U. S. Food and Drug Administration</i>
FIA	<i>flow injection analysis</i> , ou análise por injeção em fluxo
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , ou vírus da imunodeficiência humana
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> , ou cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-MS	<i>high-performance liquid chromatography-mass spectrometry</i> , ou cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> , ou Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano
MAAs	<i>mycosporine-like amino acids</i> , ou aminoácidos tipo micosporina
MeOH	metanol

MRM	<i>multiple reaction monitoring</i> , ou monitoramento de reações múltiplas
mUA	miliunidades de absorbância
NRPS	<i>nonribosomal peptide synthetase</i> , ou sintetase de peptídeo não ribossomal
O-MT	<i>O</i> -metiltransferase
(grau) P.A.	(grau) para análise
PAR	<i>photosynthetically active radiation</i> , ou radiação fotossinteticamente ativa
RUV	radiação ultravioleta
SRM	<i>selected reaction monitoring</i> , ou monitoramento de reação selecionada
TIC	<i>Total Ion Count</i>
UFLC	<i>ultra fast liquid chromatography</i> , ou cromatografia líquida ultrarrápida
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> , ou Farmacopeia dos Estados Unidos
UV-A	ultravioleta-A
UV-B	ultravioleta-B
UV-C	ultravioleta-C

## *Sumário*

1	Introdução .....	24
1.1	Radiação ultravioleta.....	25
1.2	Algas .....	27
1.2.1	Macroalgas e sua utilização .....	29
1.3	Aminoácidos tipo micosporina (MAAs).....	33
1.3.1	Histórico .....	34
1.3.2	Ocorrência e distribuição .....	35
1.3.3	Biossíntese.....	37
1.3.4	Funções e aplicações comerciais.....	43
2	Objetivos.....	46
3	Materiais e métodos .....	48
3.1	Organismos utilizados e obtenção da biomassa algal .....	49
3.2	Extração de MAAs das algas .....	54
3.2.1	Liofilização das amostras .....	54
3.2.2	Extração das MAAs das macroalgas brasileiras .....	55
3.3	Isolamento de MAAs por HPLC e cromatografia em coluna.....	56
3.3.1	Otimização do isolamento.....	56
3.3.1.1	Método com colunas analíticas.....	56
3.3.1.2	Método com colunas preparativas .....	57
3.4	Análise por HPLC .....	60
3.4.1	Estudo de liofilização .....	60

3.4.2	Preparação do padrão .....	60
3.5	Análise por HPLC-MS .....	61
3.5.1	Otimização do método de HPLC .....	61
3.5.2	Desenvolvimento de métodos de HPLC-MS .....	61
3.5.2.1	Método exploratório .....	61
3.5.2.2	Método quantitativo .....	62
3.5.3	Análise das frações isoladas .....	64
3.5.4	Análise das MAAs das algas .....	65
3.6	Determinação estrutural da MAA desconhecida (m/z 317) .....	66
3.6.1	Isolamento da m/z 317 .....	66
3.6.2	Determinação da massa exata .....	67
3.6.3	Determinação do número de hidrogênios ionizáveis e fragmentação do íon quasimolecular [M+H] <sup>+</sup> deuterado .....	68
3.6.4	Análise dos aminoácidos presentes na m/z 317 .....	69
3.7	Análises estatísticas .....	71
4	Resultados e Discussão .....	72
4.1	Isolamento de MAAs por HPLC e cromatografia em coluna .....	73
4.1.1	Otimização do isolamento .....	73
4.1.2	Análise das frações isoladas .....	84
4.2	Estudo de liofilização .....	87
4.3	Análise por HPLC-MS .....	89
4.3.1	Otimização do método de HPLC .....	89
4.3.2	Desenvolvimento de métodos de MS .....	96
4.3.2.1	Método exploratório .....	96
4.3.2.2	Método quantitativo .....	98

4.4	Análise do perfil de MAAs das macroalgas .....	104
4.4.1	Distribuição dos táxons estudados .....	104
4.4.2	Análise das MAAs .....	106
4.5	Determinação estrutural da MAA desconhecida (m/z 317).....	125
5	Conclusões .....	134
6	Referências.....	138
7	Anexos .....	158

# *1 Introdução*

---

## 1.1 Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta (RUV) é a região do espectro eletromagnético emitido pelo Sol compreendida em comprimentos de onda entre 100 e 400 nm e é considerada uma radiação não ionizante, uma vez que sua principal forma de interação com a matéria não causa o desprendimento de elétrons (gerando íons), e sim apenas sua excitação. Ela pode ser dividida em três faixas: UV-C, com comprimento de onda entre 100 e 280 nm; UV-B, entre 280 e 315 nm; e UV-A, entre 315 e 400 nm (Commission Internationale de L'Eclairage, 2011; Okuno e Vilela, 2005; World Health Organization, 1994). No entanto, diversos autores utilizam limites diferentes, como 290 nm como limite entre UV-C e UV-B, e 320 nm entre UV-B e UV-A (Chen et al., 2014; Fitzpatrick, 1988; Matheus e Kurebayashi, 2002). Neste trabalho, a definição usada (e já descrita) é a recomendada pela CIE (*Commission Internationale de L'Eclairage*, ou Comissão Internacional de Iluminação) (Commission Internationale de L'Eclairage, 2011).

A RUV que chega à atmosfera terrestre é composta por aproximadamente 6% de UV-C, 18% de UV-B e 76% de UV-A (World Health Organization, 1994). No entanto, os valores que atingem a superfície são bem diferentes, tendo irradiância total menor e distribuição diferenciada: 5% de UV-B e 95% de UV-A (Flor et al., 2007). Isto ocorre porque praticamente toda a radiação UV-C e cerca de 90% da radiação UV-B são absorvidas pelas camadas superiores na atmosfera, especialmente pelos gases oxigênio e ozônio (World Health Organization, 1994). Todavia, a destruição da camada de ozônio, causada principalmente pela liberação de poluentes atmosféricos como os clorofluorcarbonetos (CFCs), organoclorados e organobromados (Okuno e Vilela, 2005), oriundos da ação antropogênica, tem levado a um aumento na RUV, especialmente UV-B (Banaszak e Trench, 2001), na biosfera (Kerr e McElroy, 1993).

Em razão de sua alta energia, radiações UV-B podem causar danos a biomoléculas como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (Banaszak e Trench, 2001; Sinha et al., 2001; World Health Organization, 1994). Outros efeitos que estas radiações promovem são alterações na pigmentação celular e inibições de fotossíntese e de crescimento (Dunlap e Yamamoto, 1995), podendo levar assim o organismo à morte. Os danos celulares ocorrem por reações fotoquímicas (efeitos diretos) ou via fotodinâmica (efeitos indiretos) pela formação de espécies reativas ou espécies em um estado excitado metaestável, que podem se difundir e reagir com outros componentes celulares (Singh et al., 2014; Vincent e Neale, 2000; World Health Organization, 1994).

Os efeitos diretos ocorrem em moléculas possuidoras de cromóforos que absorvem na região do ultravioleta, como ácidos nucleicos (e, portanto, as macromoléculas DNA e RNA) e proteínas, especialmente as que possuem aminoácidos aromáticos. Essas moléculas podem sofrer diversos tipos de transformações químicas; no DNA, por exemplo, pode haver geração de dímeros de pirimidina e de (6-4) pirimidina-pirimidonas (Beukers e Berends, 1960; Chen et al., 2014; Franklin et al., 1983). Os efeitos indiretos são causados principalmente por espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ). As EROs reagem com uma vasta gama de moléculas, muitas vezes inativando suas funções biológicas e podendo levar o organismo à morte, assim como os danos diretos causados por RUV.

No caso dos seres humanos, a consequência mais alarmante da exposição à RUV é o câncer de pele. A incidência de ambos os tipos de câncer de pele, melanoma e não melanoma, vem crescendo nas últimas décadas e não dá sinais de estabilização (World Health Organization, 2008). Atualmente, entre 2 e 3 milhões de cânceres não melanoma e 132.000 melanomas ocorrem mundialmente a cada ano, e ambas as formas de câncer de pele

representam em torno de 30% dos novos diagnósticos de câncer (World Health Organization, 2014).

No ambiente aquático, os efeitos da RUV (e de outras variáveis ambientais, como temperatura e matéria orgânica dissolvida) também vêm sendo objeto de estudo há algum tempo (Häder e Worrest, 1991; Häder et al., 1995; 1998; 2003; 2007; 2011; 2015). Dentre as alterações causadas em diversos organismos, pode-se citar queda de motilidade e orientação (Häder e Worrest, 1991); diminuição na fotossíntese, na capacidade de osmorregulação e na captação de nutrientes (Giordanino et al., 2011; Sucré et al., 2012); variações nos metabolismos de nitrogênio e carbono; fotobranqueamento de corais; entre outros (Häder et al., 2015).

## **1.2 Algas**

As algas formam um conjunto heterogêneo de organismos, composto majoritariamente por espécies fotossintéticas que produzem oxigênio e vivem em ambientes aquáticos (Graham et al., 2009). Tais organismos pertencem a várias linhagens evolutivas e apresentam grandes variações em diversos aspectos, como suas formas (desde células microscópicas, com alguns micrômetros de diâmetro, até algas multicelulares chegando a 60 metros de comprimento), estruturas celulares, pigmentos fotossintéticos, macromoléculas de reserva nutricional e metabólitos secundários (Graham et al., 2009; Sze, 1998). Estima-se que existam entre 36.000 e mais de 10 milhões de espécies de algas, todas conectadas com outros organismos em ciclos biogeoquímicos, cadeias alimentares e associações simbióticas (Graham et al., 2009). Apesar de ocorrerem mais comumente em ambientes aquáticos, podem ser encontradas em praticamente qualquer ambiente terrestre, como na neve de algumas montanhas, em solos de desertos, em fontes termais e em fungos liquenizados (Lee, 2008).

As algas são extremamente importantes. Elas geram aproximadamente 50% do oxigênio presente na atmosfera terrestre – sendo que o grupo das cianobactérias é considerado o responsável pela acumulação desse gás na atmosfera há aproximadamente 2,5 bilhões de anos, o que possibilitou o surgimento de formas de vida aeróbias (Graham et al., 2009; Lee, 2008). Também atuam no ciclo biogeoquímico de muitos elementos, como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (Graham et al., 2009).

No ciclo do carbono, produzem uma enorme quantidade de carbono orgânico, seja utilizando  $\text{CO}_2$  (através da fixação de carbono proporcionada pela fotossíntese) ou nutrientes que contenham carbono, gerando esqueletos moleculares que são de grande utilidade para toda a cadeia alimentar. Dessa forma, são consideradas a base da cadeia alimentar em todos os sistemas aquáticos, servindo de fonte de alimento para moluscos, equinodermas, crustáceos e peixes nos seus diferentes estágios de crescimento. Entretanto, a relação ecológica das algas com o ambiente em que vivem vai muito além de serem produtores primários, uma vez que possuem relações de simbiose com uma série de organismos, como bactérias, protistas, fungos, animais e plantas; além disso, também podem ser consideradas parasitas e/ou patógenos para muitos outros seres, inclusive humanos (Graham et al., 2009).

No ciclo do nitrogênio, são importantes por serem organismos capazes de utilizar nitrogênio inorgânico (captado na forma dos íons nitrato ou amônio) para gerar moléculas maiores, principalmente aminoácidos e bases nitrogenadas. Além disso, os únicos organismos capazes de fixar nitrogênio da atmosfera (ou seja, converter o gás nitrogênio em amônio) são bactérias, dentre as quais se incluem diversas cianobactérias (Graham et al., 2009). Neste processo, a espécie  $\text{NO}_3^-$  é convertida a  $\text{NO}_2^-$  pela enzima nitrato redutase, e na sequência o  $\text{NO}_2^-$  é reduzido a  $\text{NH}_3$  pela nitrito redutase. Esta assimilação de nitrogênio é sofisticada e tem vários níveis de regulação, incluindo *feedback* enzimático, molecular e pelo relógio biológico (Lopes, 2001).

Já no ciclo do enxofre, são responsáveis por captar íons sulfato do meio e utilizá-los na produção de diversas moléculas sulfuradas, como os aminoácidos cisteína e metionina e outros compostos que, quando liberados no meio, podem atingir a atmosfera e regular a temperatura da superfície terrestre por meio da indução da formação de nuvens e da geração de espécies que refletem a luz solar (Lee, 2008; Simó, 2001; Van Alstyne, 2008).

Atualmente, as algas possuem inúmeros usos pela humanidade. Podem ser usadas como alimento, tanto para humanos quanto para cultivo de peixes e mariscos; como adubo na agricultura terrestre; como suplementos alimentares; e como organismos modelo em diversos estudos, como de genômica, proteômica e outros (Graham et al., 2009). Dentre as possibilidades de uso que ainda necessitam de mais estudos para sua implementação, estão sua utilização como fonte de combustíveis (como biodiesel, etanol e gás hidrogênio) e como fonte de produtos de alto valor agregado, tais como antibióticos e agentes quimioterápicos (Graham et al., 2009; Lee, 2008). Elas têm sido consideradas também biorremediadores muito promissores, dado que são capazes de acumular grandes quantidades de metais pesados e de metabolizar, por meio de enzimas especializadas, diversas substâncias orgânicas poluidoras. Por sua pronta resposta ao estresse ambiental, muitas algas são também utilizadas como bioindicadores de poluição (Torres et al., 2008).

Por formarem um conjunto bastante heterogêneo, as algas podem ser classificadas em diversos subgrupos. Uma das maneiras mais gerais de dividi-las é classificá-las como microalgas ou macroalgas. Macroalgas marinhas são o objeto de estudo desta tese e mais detalhes serão apresentados nos itens a seguir.

### **1.2.1 Macroalgas e sua utilização**

As macroalgas pertencem a três diferentes filos: Rhodophyta (ou algas vermelhas), no qual são representadas por mais de 6.500 espécies; Chlorophyta (ou algas verdes), em que são representadas por mais de 1.500 espécies; e Ochrophyta (ou algas pardas), no qual são

representadas por mais de 2.000 espécies (Guiry e Guiry, 2014). Muitas diferenças podem ser apontadas entre os três filos, tornando difícil a extrapolação de resultados de um filo para outro, especialmente porque Rhodophyta e Chlorophyta são considerados táxons monofiléticos, enquanto Ochrophyta é considerado polifilético (Graham et al., 2009).

As macroalgas podem ser encontradas em muitos *habitat*. Dentre os mais comuns, estão zonas rochosas intertidais, recifes tropicais e florestas de *kelp*; dentre os mais diferenciados, marismas (pântanos salinos) e regiões polares. Sabe-se que a presença de algas induz um aumento na biodiversidade marinha; isto ocorre não apenas por seu alto número de espécies, mas também porque servem de fonte de alimento, abrigo e esconderijo para diversos organismos pequenos, de outras algas a peixes. Em alguns casos, inclusive, elas são consideradas como o próprio *habitat* de diversas espécies (Lobban e Harrison, 1994).

As macroalgas apresentam grande potencial econômico. Já foram descritas aproximadamente 500 espécies de macroalgas utilizadas para alimentação, forragem e extração de moléculas variadas (Graham et al., 2009). De acordo com os relatórios “*The state of world fisheries and aquaculture*” da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura dos anos de 2012 e 2014, a produção global de algas cresceu de 3,8 milhões de toneladas em 1990 para 24,9 milhões de toneladas em 2012. Deste número, cabe frisar que 95,6% vieram de fazendas de cultivo, e 97% das algas cultivadas vêm de apenas oito países, a saber: China, Indonésia, Filipinas, Coreia do Sul, Japão, Malásia, Zanzibar (um estado semiautônomo da Tanzânia) e Ilhas Salomão. O valor total das algas cultivadas em 2012 é estimado em 6,4 bilhões de dólares, e aproximadamente 99% da produção vem de macroalgas marinhas (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012; 2014).

Essas macroalgas não são apenas cultivadas para alimentação humana, mas também para a extração de diversos compostos de interesse econômico, como ácidos graxos e ficocoloides (Cardozo et al., 2007). Enquanto os primeiros possuem utilização

majoritariamente nutracêutica, os últimos possuem muitos usos nas indústrias alimentícia e cosmética, especialmente como agentes emulsificantes, espessantes, estabilizantes e geleificantes (Lee, 2008). Este mercado também vem crescendo: em 1999, o volume de vendas de ficocoloides foi em torno de 72.500 toneladas, avaliadas em quase US\$ 644 milhões; em 2009, o volume cresceu para 86.100 toneladas, e seu valor para aproximadamente US\$ 1 bilhão (Bixler e Porse, 2011).

Macroalgas marinhas vêm sendo usadas também para outros propósitos, como alimentação animal, fertilização e tratamento de águas residuais (McHugh, 2003; Metting, 1996). Neste último caso, há duas áreas principais em que macroalgas possuem potencial utilização: no tratamento de esgotos e alguns rejeitos agrários para reduzir a concentração de compostos contendo nitrogênio e fósforo, e na remoção de metais tóxicos de rejeitos industriais.

Elas podem também ser usadas como modelos em diferentes estudos ecológicos, como estudos de ecotoxicologia, nos quais se busca organismos e moléculas que sejam capazes de indicar a qualidade de um determinado ambiente. Além disso, são modelos muito interessantes em estudos de competição, uma vez que habitam superfícies bidimensionais e frequentemente ocorrem em posições monoespecíficas, mas vizinhas a outras espécies (Lobban e Harrison, 1994). Também são muito usadas em estudos de ecologia química e biogeografia, uma vez que tiveram que desenvolver uma série de estratégias e sintetizar e/ou adquirir muitos compostos de forma a manter distantes herbívoros e epífitas (Amsler, 2008; Leal et al., 2013; Paul e Ritson-Williams, 2008).

Além dos estresses causados por relações ecológicas, como herbivoria, epifitismo e parasitismo, as macroalgas sofrem muitos outros tipos de perturbação. Com a variação das marés, por exemplo, macroalgas que vivem na zona intertidal ficam muito expostas a variações de radiação (visível e ultravioleta), temperatura, disponibilidade de nutrientes e

nível de hidratação, além de sofrerem estresse mecânico causado por ventos e ondas (Graham et al., 2009). Todas essas perturbações geram alterações no metabolismo das algas, podendo levar à síntese de compostos que as auxiliem a lidar com tais pressões ambientais. Esses compostos são, em geral, chamados de “produtos naturais” ou “metabólitos secundários” – ou seja, compostos que não estão intrinsecamente envolvidos no desenvolvimento ou na manutenção de um organismo, são limitados em sua distribuição biológica, frequentemente são espécie-específicos e mais frequentemente produzidos por um organismo para uso em interações ecológicas (Maschek e Baker, 2008; Williams et al., 1989).

Essas moléculas, além de úteis para os organismos que as produzem, podem ser também de grande utilidade para o ser humano. Diversos extratos de algas e também compostos isolados já mostraram possuir uma série de atividades biológicas, como antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoários, anti-helmíntica, inseticida, anticoagulante, antitumorogênica, antioxidante, anti-inflamatória, anti-incrustante, antiofídica, fotoprotetora e imunostimuladora (Cardozo et al., 2007; Fernandes et al., 2014). Dentre os produtos que se utilizam de tais potenciais, um microbicida vaginal baseado em carragenana, o Carraguard, mostrou bloquear a infecção por HIV e outras doenças sexualmente transmissíveis *in vitro* (Mariya e Ravindran, 2013), mas não foi aprovado nos estudos clínicos de fase III (Alcorn, 2008).

Há casos em que extratos fazem parte de formulações farmacêuticas. Um exemplo são os compostos que absorvem RUV e são comercializados pelo grupo Mibelle AG Biochemistry como uma matéria-prima para a confecção de protetores solares, sob o nome Helioguard 365<sup>®</sup> (Helioguard 365, 2014). Essa matéria-prima é um extrato da macroalga vermelha *Porphyra umbilicalis* e contém uma mistura de compostos chamados aminoácidos tipo micosporina, conhecidos por proporcionarem proteção contra RUV aos organismos que as sintetizam.

### 1.3 Aminoácidos tipo micosporina (MAAs)

Os aminoácidos tipo micosporina (ou MAAs, do inglês *mycosporine-like amino acids*) são compostos altamente polares, de baixo peso molecular (entre 200 e 400 Da) e alto coeficiente de absorvidade molar:  $\epsilon = 28100\text{--}50000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Shick e Dunlap, 2002). São caracterizados por uma unidade ciclo-hexenona ou ciclo-hexenimina conjugada com nitrogênio substituído por um aminoácido ou aminoálcool, com absorção máxima entre 309 e 362 nm (Bernillon et al., 1984; Grant et al., 1985).

Atualmente, mais de 30 compostos, entre micosporinas e MAAs (cuja diferença será descrita na seção 1.3.1), já foram caracterizados (Carignan e Carreto, 2013; Carreto e Carignan, 2011; Kamio et al., 2011; Miyamoto et al., 2014; Roullier et al., 2011). Algumas estruturas são mostradas na Figura 1.1.

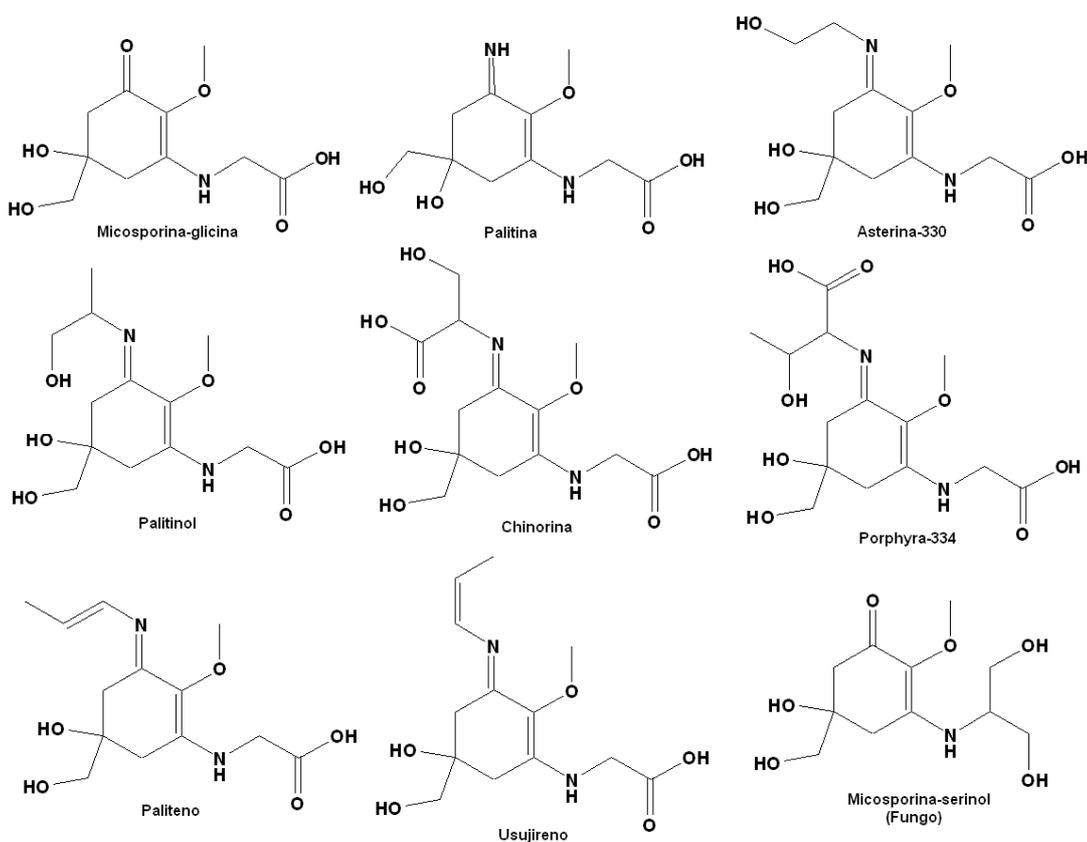


Figura 1.1: Estruturas de algumas MAAs comumente encontradas em algas e de uma micosporina encontrada apenas em fungos.

### 1.3.1 Histórico

O início do estudo das micosporinas e MAAs data da década de 1960. Muitos autores consideram que a primeira menção a estes compostos na literatura seria no artigo de Wittenberg (1960), que descreve a ocorrência de um componente com absorção máxima em 305 nm no extrato aquoso da glândula de gás da caravela-portuguesa (*Physalia physalis*). Esta possível substância teve seu comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) corrigido para 310 nm por Price e Forrest (1969), mas sua estrutura nunca foi plenamente elucidada.

Em 1961, dois artigos publicados por Tsujino (Tsujino, 1961; Tsujino e Saito, 1961) mencionam a existência de compostos com  $\lambda_{\text{máx}}$  entre 260 e 340 nm em macroalgas. Um dos artigos chega a mostrar frações mais puras dos extratos de algas vermelhas, e essas frações apresentam  $\lambda_{\text{máx}}$  em 318 nm e 332 nm (Tsujino, 1961).

Na segunda metade da década, trabalhando com fungos, pesquisadores demonstraram maior absorção entre 300 e 350 nm quando tais organismos eram irradiados com RUV (Leach, 1965a; b). Tal absorção foi atribuída a um conjunto de compostos desconhecidos, chamados então de P310 (Leach, 1965b; Leach e Trione, 1965). Algumas características químicas, como a estabilidade frente a altas temperaturas e a tratamentos com ácidos e bases, chegaram a ser estabelecidas, mas não houve nenhum avanço em relação à elucidação estrutural de tais moléculas (Trione e Leach, 1969; Trione et al., 1966).

Apesar de todos esses trabalhos na década de 1960, a primeira estrutura de uma micosporina foi elucidada apenas em 1976 (Favre-Bonvin et al., 1976). Chamada inicialmente apenas de *mycosporine*, hoje é conhecida como micosporina-serinol e foi isolada dos esporos do fungo *Stereum hirsutum* – daí o nome “micosporina”. Por ser a primeira a ser caracterizada, a micosporina-serinol, que possui um núcleo de ciclo-hexenona, tornou-se referência para todos os trabalhos posteriores. Dessa forma, as ciclo-hexenonas passaram a ser consideradas “micosporinas verdadeiras”, e os compostos com núcleos de ciclo-hexenimina

receberam o nome de “aminoácidos tipo micosporina” (*mycosporine-like amino acids*, MAAs). No entanto, atualmente, o termo MAAs é utilizado para descrever ambos os tipos de molécula, ciclo-hexenonas (ou oxo-MAAs) e ciclo-hexeniminas (ou imino-MAAs).

As décadas de 1970 e 1980 foram muito prolíficas quanto à caracterização estrutural de MAAs. Micosporina-2 (Arpin et al., 1977), micosporina-glicina (Ito e Hirata, 1977), palitina (Takano et al., 1978a; Tsujino et al., 1978), palitinol (Takano et al., 1978b), paliteno (Takano et al., 1978b), porphyra-334 (Chioccaro et al., 1979; Takano et al., 1979), chinorina (Chioccaro et al., 1979; Tsujino et al., 1980), normicosporina-glutamina (Lunel et al., 1980), ácido palitênico (Kobayashi et al., 1981), asterina-330 (Nakamura et al., 1981), micosporina-ácido glutâmico (Young e Patterson, 1982), micosporina-glutamina (Bernillon et al., 1984) e usujireno (Sekikawa et al., 1986) foram as moléculas caracterizadas nesta época. Mesmo assim, estudos estruturais continuaram a ser realizados nas décadas seguintes, e só na presente década já foram elucidadas as estruturas de mais cinco compostos: as aplisiapalitininas A, B e C (Kamio et al., 2011), micosporina-hidroxiglutamicol (Roullier et al., 2011) e micosporina-glicina-alanina (Miyamoto et al., 2014).

### 1.3.2 Ocorrência e distribuição

As MAAs são classicamente consideradas como sendo compostos sintetizados apenas por algas, fungos e bactérias. Entretanto, estes compostos já foram encontrados em muitos organismos, como corais, cnidários, esponjas, artêmias, ouriços-do-mar, estrelas-do-mar, pepinos-do-mar, moluscos bivalves, ascídias, peixes, poliquetas, platelmintos e até insetos (Carreto e Carignan, 2011; Nagiller e Sommaruga, 2009; Rastogi et al., 2010). Acredita-se que a maioria destes organismos adquira as MAAs por meio da dieta (Adams e Shick, 1996; Carreto e Carignan, 2011; Nagiller e Sommaruga, 2009) ou de associações simbióticas com algas e bactérias (Shick et al., 1992; Stochaj et al., 1994), embora alguns já tenham mostrado possuir os genes necessários para a biossíntese destas moléculas (ver seção 1.3.3).

Em corais, inclusive, sabe-se que há metabolização das MAAs produzidas pela zooxantela, gerando MAAs que a mesma não sintetiza, quando isolada, sob as mesmas condições (Banaszak et al., 2006; Carignan et al., 2009; Shick, 2004; Shick e Dunlap, 2002). Em outros casos, o hospedeiro apresenta menor variedade de MAAs que o simbiote, mas não compostos diferentes; nestes casos, acredita-se que as MAAs não tenham sido translocadas para o hospedeiro de maneira eficiente, ou que tenham sido catabolizadas pelo mesmo (Carreto e Carignan, 2011). Há hospedeiros que captam seletivamente as MAAs da zooxantela, mas ainda não se sabe como isso ocorre.

As MAAs não são encontradas em plantas superiores, nas quais a proteção contra RUV é feita pelos flavonoides (Caldwell et al., 1983). Também não são encontradas em vertebrados superiores, nos quais a função protetora é assumida pela melanina; e diferentemente de invertebrados e peixes, mamíferos aparentemente não são capazes de absorver estes compostos pela dieta (Mason et al., 1998; Shick e Dunlap, 2002).

Como seria esperado de compostos pequenos e solúveis em água, as MAAs encontram-se dissolvidas no citoplasma celular. No entanto, não se sabe se estariam homoganeamente dispersas ou reunidas em torno de organelas específicas, o que traria um maior fator de proteção aos processos vitais dos organismos em questão (Neale et al., 1998). Enquanto em cianobactérias elas parecem estar dispersas (Garcia-Pichel e Castenholz, 1993), Laurion et al. (2004) mostraram que, em dois dinoflagelados, elas parecem estar altamente empacotadas em torno de organelas mais sensíveis a RUV (como o núcleo e os cloroplastos). Além disso, também já foram encontradas MAAs extracelulares em cianobactérias, nas quais estão ligadas a oligossacarídeos (Böhm et al., 1995; Ehling-Schulz et al., 1997; Ehling-Schulz e Scherer, 1999; Scherer et al., 1988; Torres et al., 2004), e em muco de corais (Drollet et al., 1993; Shick e Dunlap, 2002; Teai et al., 1998).

Entre as microalgas, os níveis mais altos de MAAs foram encontrados nos táxons Dinophyta, Cryptophyta, Raphidophyceae e Prymnesiophyceae, sendo que dinoflagelados presentes nas marés vermelhas apresentaram os maiores níveis de todos (Carreto e Carignan, 2011; Jeffrey et al., 1999). Entre as macroalgas, as espécies que produzem maior quantidade e variedade de MAAs estão entre as algas vermelhas, enquanto as pardas e verdes são conhecidas por produzirem baixos níveis desses compostos (Carreto e Carignan, 2011; Hoyer et al., 2001; Karsten et al., 1998b; Karsten et al., 1998c; Tsujino e Saito, 1961). Isto corresponde ao padrão de distribuição dos produtos naturais já encontrados em macroalgas (Maschek e Baker, 2008).

Quanto à distribuição de MAAs no globo terrestre, sabe-se que estas moléculas ocorrem mais frequentemente e atingem suas maiores concentrações em organismos de regiões tropicais (Shick e Dunlap, 2002), o que pode ser resultado da exposição destes a níveis mais altos de RUV, devido ao menor ângulo de elevação solar, à menor espessura da camada de O<sub>3</sub> e à alta transparência das águas oligotróficas características dessas regiões (Banaszak e Trench, 2001; Fleischmann, 1989). Já em regiões polares e temperadas, Karsten et al. (1998b) mostraram que as concentrações de MAAs em rodofíceas de regiões polares e temperadas frias, como o Mar do Norte, são aproximadamente a metade dos níveis das mesmas espécies em regiões temperadas quentes, como a costa espanhola.

### **1.3.3 Biossíntese**

A biossíntese das MAAs ainda não é bem compreendida. A hipótese mais aceita até o início da década prega que as MAAs são sintetizadas a partir de um desvio da via do ácido chiquímico, numa maneira similar à biossíntese dos flavonoides em plantas superiores, como pode ser visto na Figura 1.2. Esse desvio ocorreria na molécula de 3-deidroquinato (3-DHQ), que por sua vez seria a precursora dos compostos gadusol e deoxigadusol – e um deles seria o precursor da micosporina-glicina, a partir da qual seriam biossintetizadas as outras MAAs. Essa hipótese foi testada pela utilização de intermediários dessa via marcados

radioativamente, em fungos e cianobactérias (Favre-Bonvin et al., 1987; Portwich e Garcia-Pichel, 2003), e pela inibição da via utilizando-se glifosato, em corais (Shick et al., 1999).

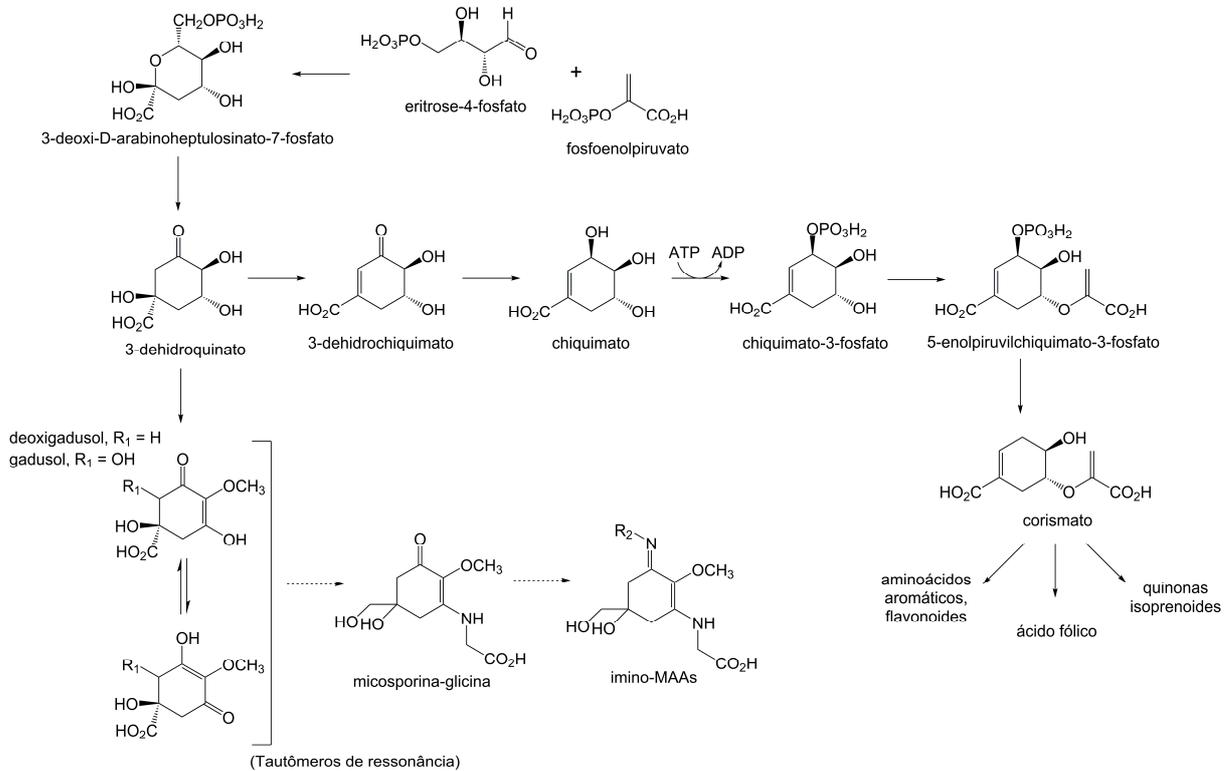


Figura 1.2: Via do ácido chiquímico mostrando a biossintese de flavonoides em plantas superiores via corismato e a possível biossintese de MAAs via 3-deidroquinato e gadusol em fungos, algas e bactérias. R2 pode ser um grupo aminoácido ou aminoálcool, caracterizando diferentes MAAs. Adaptado de Shick e Dunlap (2002).

Em 2010, foi encontrado o *cluster* responsável pela biossintese de chinorina na cianobactéria *Anabaena variabilis* (ATCC) 29413 (Balskus e Walsh, 2010). Este *cluster* é constituído por quatro genes: Ava\_3858, que codifica uma 2-*epi*-5-*epi*-valiolona sintase (EVS); Ava\_3857, que codifica uma *O*-metiltransferase (O-MT); Ava\_3856, que codifica uma proteína do tipo ATP-*grasp*, capaz de formar ligações peptídicas; e Ava\_3855, que codifica uma enzima do tipo NRPS (sintetase de peptídeo não ribossomal), capaz de formar ligações amídicas. Os produtos resultantes de cada enzima podem ser vistos na Figura 1.3, junto com genes ortólogos.

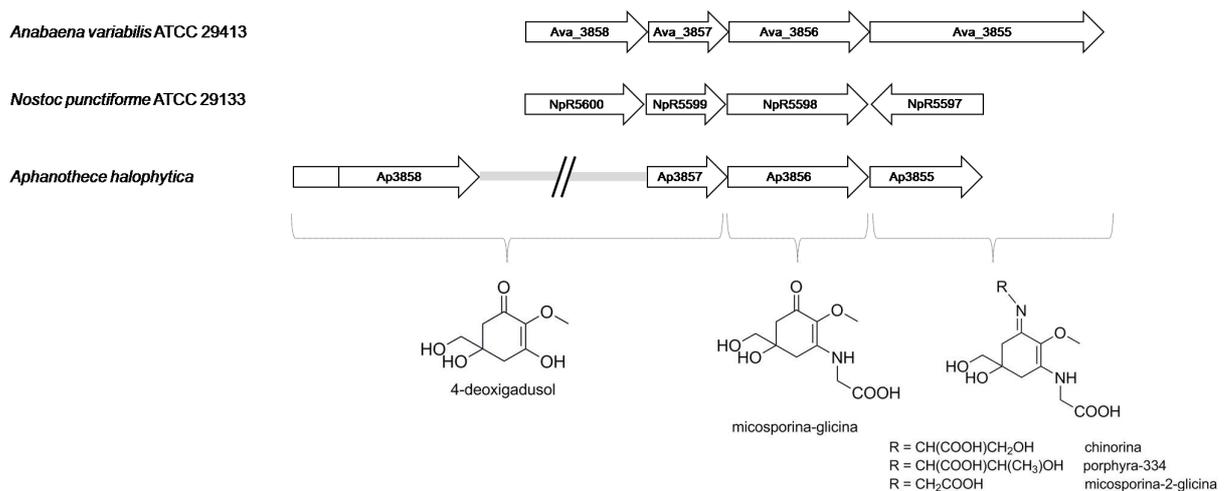


Figura 1.3: Organização dos genes relacionados à síntese de MAAs em *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 e *Aphanothece halophytica*, e os produtos gerados pelas enzimas por eles codificadas. Adaptado de Waditee-Sirisattha et al. (2014) e Balskus e Walsh (2010).

O *cluster* foi clonado em *Escherichia coli* e produziu MAAs, provando ser necessário e suficiente para a síntese de tais compostos. Em seguida, foi feito um estudo *in vitro* com as duas primeiras enzimas da via (EVS e O-MT) e todos os cofatores necessários para a produção de 4-deoxigadusol; no entanto, ao utilizar 3-deidroquinato como substrato, não foi possível obter o produto esperado. Em contraste, ao se utilizar sedoheptulose 7-fosfato, um intermediário da via das pentoses fosfato, as enzimas foram capazes de sintetizar 4-deoxigadusol. Esse resultado contradisse, então, a hipótese de que as MAAs seriam derivadas da via do ácido chiquímico, abrindo assim uma nova linha de pesquisa na biossíntese de tais moléculas.

Em 2012, Spence et al., trabalhando com o *cluster* mostrado para *A. variabilis*, deletaram o gene responsável pela primeira enzima da via (EVS) e notaram que a cianobactéria preservou sua capacidade de produzir chinorina. Desta forma, propuseram a hipótese atualmente aceita: a síntese de MAAs aparenta ocorrer por duas vias biossintéticas redundantes, uma a partir da via do ácido chiquímico e outra a partir da via das pentoses

fosfato. Corroborando esta hipótese está o fato de a EVS, que é uma enzima ligada à via das pentoses fosfato, ser muito similar à 3-deidroquinato sintase (DHQS) (Starcevic et al., 2010) – e também o fato de que genes correspondentes a ambas já foram encontrados no genoma de alguns organismos, como a própria *A. variabilis* (Singh et al., 2010a).

Atualmente, genes ortólogos aos encontrados em *A. variabilis* já foram encontrados em outras classes de organismos, como corais, fungos, dinoflagelados, bactérias Gram-positivas, uma macroalga vermelha e uma anêmona (Miyamoto et al., 2014; Shinzato et al., 2011; Singh et al., 2010a; Starcevic et al., 2010). Em fungos, todavia, ainda não foi encontrado nenhum ortólogo ao gene do último passo da via, o que é consistente com o fato de tais organismos produzirem apenas oxo-MAAs. Por ora, os dois primeiros genes da via (EVS ou DHQS + O-MT) parecem ser conservados em todos os organismos produtores de MAAs (Singh et al., 2012) – e a hipótese corrente para esta ampla distribuição é de que os genes teriam passado de cianobactérias a dinoflagelados por transferência horizontal, e pelo mesmo processo teriam passado de dinoflagelados a corais, por exemplo (Starcevic et al., 2008; Starcevic et al., 2010).

A última enzima da via, que em *A. variabilis* é uma enzima do tipo NRPS, em *Nostoc punctiforme* e *Aphanothece halophytica* é uma D-Ala D-Ala ligase, também capaz de formar ligações peptídicas. Nestes organismos, o produto final da síntese não é chinorina, mas sim porphyra-334 e micosporina-2-glicina, respectivamente (Gao e Garcia-Pichel, 2011; Waditee-Sirisattha et al., 2014) (Figura 1.3). Em um experimento de expressão heteróloga de genes da bactéria *Actinosynnema mirum* ortólogos aos de *N. punctiforme* na bactéria *Streptomyces avermitilis*, houve a produção de uma nova MAA, identificada como micosporina-glicina-alanina. Dessa forma, a D-Ala D-Ala ligase parece ser pouco específica, podendo gerar diferentes MAAs a partir de micosporina-glicina (Miyamoto et al., 2014).

Estas recentes descobertas em relação à biossíntese de MAAs estão de acordo com propostas anteriores da literatura. Em 1990, Carreto et al. já apontavam que a síntese desses compostos no dinoflagelado *Alexandrium excavatum* exposto a altas irradiâncias de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) é acompanhada de mudanças sequenciais no espectro de absorção, indicando possíveis interconversões entre as MAAs (Carreto et al., 1990). Estudos com outro dinoflagelado, *Alexandrium tamarense*, mostraram que a síntese destas moléculas ocorre em dois estágios após a exposição a alta PAR: no primeiro, há aumento das MAAs bissubstituídas por aminoácidos, especialmente porphyrina-334; no segundo, há aumento de MAAs secundárias (no caso, o paliteno), acompanhado de declínio nos níveis de MAAs primárias (Callone et al., 2006). Estes achados estão em concordância com as descobertas biossintéticas mais recentes e também com a proposta de Shick (2004), que divide as MAAs em primárias (micosporina-glicina, porphyrina-334 e chinorina) e secundárias, que seriam sintetizadas a partir destas. As possíveis vias de interconversão entre as diferentes MAAs são apresentadas na Figura 1.4.

A biossíntese de MAAs pode ser influenciada por alguns fatores abióticos, como a radiação: dependendo do organismo, a síntese pode ser estimulada por PAR, UV-A e/ou UV-B (Carreto e Carignan, 2011). Dentro da PAR, a radiação de cor azul é tida como a mais estimulante da síntese desses compostos (Franklin et al., 2001; Trione e Leach, 1969); entretanto, esse resultado deve ser visto com cautela, dado que Korbee et al. (2005a) mostraram que a luz azul induziu a formação de porphyrina-334, palitina e asterina-330, mas diminuiu os níveis de chinorina na alga vermelha *Porphyra leucosticta*. Esta variação de sensibilidade a diferentes radiações nos organismos pode ser devida a diferentes fotorreceptores. Portwich e Garcia-Pichel (2000) propõem que o fotorreceptor para UV-B em cianobactérias seja uma pterina, enquanto Korbee et al. (2005a) sugerem que o fotorreceptor



Outros fatores abióticos que alteram a síntese de MAAs são a temperatura da água, a salinidade, o fluxo de água e a disponibilidade de alguns nutrientes, especialmente nitrogênio (na forma de amônio) e enxofre (Barufi et al., 2011; Korbee et al., 2005b; Singh et al., 2010b; Waditee-Sirisattha et al., 2014). Foram encontrados, inclusive, efeitos combinados (e, em alguns casos, sinérgicos) de alguns dos fatores, como RUV e fluxo de água (Kuffner, 2001), RUV e temperatura (Ben-Yosef et al., 2008) e RUV e salinidade (Khosravi et al., 2013). Os mecanismos pelos quais estes fatores atuam na síntese de MAAs ainda não foram bem estabelecidos.

#### 1.3.4 Funções e aplicações comerciais

Ao longo dos anos, as MAAs tiveram uma série de funções associadas a elas. Uma das principais é a função fotoprotetora, que pode ser inferida por possuírem eficientes propriedades de absorção no UV-A e no UV-B com altos coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon = 28100\text{--}50000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , vide Shick e Dunlap (2002)), não fluorescerem, não produzirem radicais, dissiparem a energia luminosa absorvida em forma de calor e terem alta fotoestabilidade *in vitro* (Conde et al., 2000; Conde et al., 2004; Conde et al., 2007). Corroborando tal função, há a frequente observação de que a exposição a RUV no ambiente natural ou em condições experimentais provoca um aumento na concentração das MAAs (Brook, 1981; Garcia et al., 2014; Klisch e Häder, 2000; Leach, 1965b; Shick et al., 1999; entre muitos outros), além de diversos artigos relatando que a concentração de MAAs em um organismo é inversamente proporcional à profundidade em que o mesmo se encontra (Dunlap et al., 1986; Hoyer et al., 2001; Karsten e Wiencke, 1999). Vários autores também estudaram a extensão dos danos causados por RUV em organismos contendo diferentes quantidades de MAAs, chegando, em geral, à conclusão de que um maior teor de tais compostos é capaz de conferir alguma proteção aos organismos (Adams e Shick, 1996; Adams e Shick, 2001; de la Coba et al., 2009a; Dionisio-Sese et al., 1997; Jiang et al., 2008). Há poucos estudos

realizados em células humanas, mas já se sabe que MAAs são capazes de promover a proliferação de fibroblastos pulmonares (linhagem WI-38) e também de defendê-los das ações deletérias da RUV (Oyamada et al., 2008), e que células isoladas de carcinoma humano (linhagem A431) conseguem absorver MAAs do meio de crescimento (Mason et al., 1998).

Outras funções que também são de consenso geral entre os estudiosos do tema são as atividades antioxidante e antirradicalar desses compostos. Dentre as MAAs testadas até o presente momento, as que mais demonstraram possuir tais atividades são as oxo-MAAs micosporina-glicina e micosporina-aurina (Dunlap e Yamamoto, 1995; Suh et al., 2003; Yakovleva et al., 2004), mas também já foram encontrados indícios para o usujireno (Nakayama et al., 1999), para MAAs glicosiladas (Matsui et al., 2011) e para extratos com combinações de diferentes imino-MAAs, especialmente para a combinação de palitina e asterina-330 (de la Coba et al., 2009b). Além das MAAs naturais, também já foram sintetizados compostos com atividades interessantes, como um composto derivado da porphyra-334 e um análogo sintético de MAA que apresentaram atividade antirradicalar significativa em ensaio de DPPH (Andregueti et al., 2013; Yoshiki et al., 2009).

Foi também sugerido que as MAAs apresentam funções osmóticas (Oren, 1997), funções na dessecação e no estresse térmico (Jiang et al., 2008; Oren e Gunde-Cimerman, 2007), são metabólitos reguladores da esporulação e germinação de fungos (Trione e Leach, 1969; Trione et al., 1966) e da reprodução de invertebrados marinhos (Bandaranayake et al., 1997; Bandaranayake e Des Rocher, 1999) e atuam como sinalizadores intraespecíficos de ameaças (Kicklighter et al., 2007; Kicklighter et al., 2011) e na sinalização química entre corais e seus dinoflagelados simbiontes (Gates et al., 1995). Também podem ser reservas intracelulares de nitrogênio (Korbee Peinado et al., 2004; Miyamoto et al., 2014) e compostos que captem comprimentos de onda na região do ultravioleta e os transformem em comprimentos de onda utilizáveis pelo aparato fotossintético (Gao et al., 2007; Sinha et al.,

1998). Todavia, algumas dessas funções ainda são controversas e necessitam de maiores estudos.

Em vista de suas propriedades, as MAAs vêm sendo exploradas comercialmente como produtos para proteção da pele (Helioguard 365, 2014; Dainippon Ink&Chem Inc, 2009; Mibelle Cosmetics AG, 2004, 2011; Micro Alge Corp KK, Dokuritsu Gyosei Hojin Suisan Sogo Kenky, 2014; Universidad de Málaga, 2009, 2010) e proteção de materiais não biológicos, como aditivos fotoestabilizadores em indústrias de tintas, plásticos e vernizes (Bandaranayake, 1998).

## *2 Objetivos*

---

O objetivo geral deste trabalho foi expandir o corpo de conhecimentos disponíveis sobre a ocorrência e distribuição de aminoácidos tipo micospolina (MAAs) em macroalgas brasileiras.

Para isso, foram realizadas as seguintes etapas:

- Coleta de macroalgas na região intertidal de diversas praias do litoral Sul do estado do Espírito Santo – Brasil, e identificação das mesmas.
- Estudo para estabelecer o modo mais adequado para estocar o material coletado – fresco ou liofilizado – em termos do rendimento de extração de cada tipo de processamento de amostra.
- Obtenção de padrões de MAAs, por meio do desenvolvimento de método de isolamento utilizando cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência.
- Desenvolvimento de métodos de análise quantitativa e qualitativa de MAAs por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas.
- Investigação e comparação do perfil de MAAs das espécies de rodófitas, clorófitas e feófitas coletadas.

## *3 Materiais e métodos*

---

### ***3.1 Organismos utilizados e obtenção da biomassa algal***

As macroalgas estudadas foram coletadas na zona intertidal de diferentes praias dos municípios de Guarapari e Anchieta – ES (Figura 3.1), por Luiza G. Marques, Erika M. Stein e Daniel X. Andregueti. As coletas foram realizadas em 2011, entre os meses de setembro e outubro, e em maio de 2014. Todas as coletas foram realizadas no período de maré baixa, de acordo com a tábua de marés do Terminal da Ponta do Ubu fornecida pela Marinha do Brasil (Marinha do Brasil).

As amostras destinadas às análises morfológicas e confirmação da identificação taxonômica foram fixadas em formol 4% em água do mar. A identificação do material foi realizada no laboratório da Profa. Mutue Toyota Fujii, do Instituto de Botânica (SP), por meio de busca na literatura – especialmente em dissertações e teses –, realização de cortes histológicos, inspeção do material em microscópios estereoscópicos (lupas) e ópticos e auxílio de especialistas em taxonomia. Exemplares foram separados para servirem de testemunhas, as quais foram depositadas no Herbário Maria Eneida P. Kauffman Fidalgo do Instituto de Botânica, São Paulo (SP). A listagem completa das macroalgas estudadas pode ser vista nas Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3, dividida em algas vermelhas, pardas e verdes.

As amostras foram limpas em água do mar e separadas em sacos plásticos com fecho hermético, identificados com o nome da espécie, local e data de coleta. Foram então armazenadas em freezer  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

Tabela 3.1: Relação das algas vermelhas coletadas no Estado do Espírito Santo, com as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das exsicatas depositadas no herbário ficológico do Instituto de Botânica (SP).

(continua)

ESPÉCIES DE ALGAS	INFORMAÇÃO DAS COLETAS	NÚMERO DE ACESSO
<i>Acanthophora spicifera</i> (M.Vahl) Børgesen	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.737
<i>Amansia multifida</i> J.V.Lamouroux	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.740
<i>Amphiroa fragilissima</i> (Linnaeus) J.V.Lamouroux	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.716
<i>Botryocladia occidentalis</i> (Børgesen) Kyllin	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 27/09/2011	SP 469.021
<i>Bryothamnion seaforthii</i> (Turner) Kützing	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 28/09/2011	SP 469.027
<i>Ceratodictyon variabile</i> (J.Agardh) R.E.Norris	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.726
<i>Cryptonemia crenulata</i> (J.Agardh) J.Agardh	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 28/09/2011	SP 428.168
<i>Cryptonemia seminervis</i> (C.Agardh) J.Agardh	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 469.024
<i>Dichotomaria marginata</i> (J.Ellis & Solander) Lamarck	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 428.166
<i>Dichotomaria marginata</i> (J.Ellis & Solander) Lamarck	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 27/09/2011	SP 428.160
<i>Dichotomaria marginata</i> (J.Ellis & Solander) Lamarck	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.712
<i>Dichotomaria marginata</i> (J.Ellis & Solander) Lamarck	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.725
<i>Gracilaria cervicornis</i> (Turner) J.Agardh	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.711
<i>Gracilaria cuneata</i> Areschoug	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 28/09/2011	SP 469.019
<i>Gracilaria domingensis</i> (Kützing) Sonder ex Dickie	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 28/09/2011	SP 469.020
<i>Gracilaria cf. intermedia</i>	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.732
<i>Gracilaria cf. mamillaris</i>	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.731
<i>Gracilaria tepocensis</i> (E.Y.Dawson) E.Y.Dawson	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 28/09/2011	SP 469.018
<i>Heterosiphonia gibbesii</i> (Harvey) Falkenberg	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 27/09/2011	SP 469.033
<i>Hydropuntia caudata</i> (J.Agardh) Gurgel & Fredericq	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.744
<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) J.V.Lamouroux	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.728
<i>Jania rubens</i> (Linnaeus) J.V.Lamouroux	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 27/09/2011	SP 428.161
<i>Ochtodes secundiramea</i> (Montagne) M.A.Howe	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 428.159
<i>Ochtodes secundiramea</i> (Montagne) M.A.Howe	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.709
<i>Ochtodes secundiramea</i> (Montagne) M.A.Howe	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.723

Tabela 3.1: Relação das algas vermelhas coletadas no Estado do Espírito Santo, com as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das exsicatas depositadas no herbário ficológico do Instituto de Botânica (SP).

(conclusão)

ESPÉCIES DE ALGAS	INFORMAÇÃO DAS COLETAS	NÚMERO DE ACESSO
<i>Plocamium brasiliense</i> (Greville) M.A.Howe & W.R.Taylor	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 428.163
<i>Plocamium brasiliense</i> (Greville) M.A.Howe & W.R.Taylor	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.705
<i>Pterocladia capillacea</i> (S.G.Gmelin) Santelices & Hommersand	ES, Guarapari, Praia dos Padres 16/05/2014	SP 428.743
<i>Pyropia spiralis</i> (E.C.Oliveira & Coll) M.C.Oliveira, D.Milstein & E.C.Oliveira	ES, Anchieta, Praia de Parati 26/09/2011	SP 469.022
<i>Pyropia spiralis</i> (E.C.Oliveira & Coll) M.C.Oliveira, D.Milstein & E.C.Oliveira	ES, Guarapari, Praia da Bacutia 26/10/2011	SP 428.170
<i>Tricleocarpa cylindrica</i> (J.Ellis & Solander) Huisman & Borowitzka	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 428.167
<i>Tricleocarpa cylindrica</i> (J.Ellis & Solander) Huisman & Borowitzka	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 27/09/2011	SP 469.028
<i>Tricleocarpa cylindrica</i> (J.Ellis & Solander) Huisman & Borowitzka	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.736

Tabela 3.2: Relação das algas pardas coletadas no Estado do Espírito Santo, com as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das exsicatas depositadas no herbário ficológico do Instituto de Botânica (SP).

ESPÉCIES DE ALGAS	INFORMAÇÃO DAS COLETAS	NÚMERO DE ACESSO
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützting) De Paula & De Clerck	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.708
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützting) De Paula & De Clerck	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.734
<i>Colpomenia sinuosa</i> (Mertens ex Roth) Derbès & Solier	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.706
<i>Dictyopteris delicatula</i> J.V.Lamouroux	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.714
<i>Dictyopteris delicatula</i> J.V.Lamouroux	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.721
<i>Padina gymnospora</i> (Kützting) Sonder	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 469.034
<i>Padina gymnospora</i> (Kützting) Sonder	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 28/09/2011	SP 469.017
<i>Padina tetrastromatica</i> Hauck	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.735
<i>Sargassum cymosum</i> C.Agardh	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.733
<i>Sargassum vulgare</i> C.Agardh	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.713
<i>Zonaria tournefortii</i> (J.V.Lamouroux) Montagne	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 27/09/2011	SP 428.169
<i>Zonaria tournefortii</i> (J.V.Lamouroux) Montagne	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.739

Tabela 3.3: Relação das algas verdes coletadas no Estado do Espírito Santo, com as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das exsicatas depositadas no herbário ficológico do Instituto de Botânica (SP).

ESPÉCIES DE ALGAS	INFORMAÇÃO DAS COLETAS	NÚMERO DE ACESSO
<i>Anadyomene stellata</i> (Wulfen) C.Agardh	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 27/09/2011	SP 469.025
<i>Caulerpa cupressoides</i> var. <i>lycopodium</i> Weber-van Bosse	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 428.151
<i>Caulerpa cupressoides</i> var. <i>lycopodium</i> Weber-van Bosse	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.710
<i>Caulerpa cupressoides</i> var. <i>lycopodium</i> Weber-van Bosse	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.718
<i>Caulerpa prolifera</i> (Forsskål) J.V.Lamouroux	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 27/09/2011	SP 469.023
<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>macrophysa</i> (Sonder ex Kützing) W.R.Taylor	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 28/09/2011	SP 428.153
<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>occidentalis</i> (J.Agardh) Børgesen	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 428.150
<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>occidentalis</i> (J.Agardh) Børgesen	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.715
<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>occidentalis</i> (J.Agardh) Børgesen	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.722
<i>Caulerpa sertularioides</i> (S.G.Gmelin) M.A.Howe	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 428.152
<i>Caulerpa sertularioides</i> (S.G.Gmelin) M.A.Howe	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 27/09/2011	SP 469.026
<i>Caulerpa sertularioides</i> (S.G.Gmelin) M.A.Howe	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.745
<i>Chaetomorpha antennina</i> (Bory de Saint-Vincent) Kützing	ES, Anchieta, Praia de Parati 26/09/2011	SP 428.165
<i>Cladophora prolifera</i> (Roth) Kützing	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 27/09/2011	SP 469.030
<i>Codium decorticatum</i> (Woodward) M.A.Howe	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 428.162
<i>Codium isthmocladum</i> Vickers	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 14/05/2014	SP 428.707
<i>Codium isthmocladum</i> Vickers	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.738
<i>Halimeda cuneata</i> Hering	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 428.157
<i>Halimeda cuneata</i> Hering	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 27/09/2011	SP 428.156
<i>Halimeda cuneata</i> Hering	ES, Anchieta, Praia dos Castelhanos 15/05/2014	SP 428.720
<i>Udotea flabellum</i> (J.Ellis & Solander) M.A.Howe	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 428.155
<i>Ulva rigida</i> C. Agardh	ES, Anchieta, Praia Ponta de Ubu 26/09/2011	SP 428.158



Figura 3.1: Localização dos pontos de coleta de macroalgas no estado do Espírito Santo – Brasil. 1: Praia da Bacutia. 2: Praia dos Padres. 3: Praia de Meafpe. 4: Praia Ponta de Ubu. 5: Praia de Parati. 6: Praia de Castelhanos.



Figura 3.2: Foto do ponto de coleta de número 6, a Praia de Castelhanos. Em períodos de maré baixa formam-se poças de maré, o que proporciona a ocorrência de diversas espécies e facilita a coleta.

## 3.2 Extração de MAAs das algas

### 3.2.1 Liofilização das amostras

Liofilizar amostras é um processo muito utilizado para diminuir o volume das mesmas, facilitando sua estocagem. De modo a estabelecer se tal procedimento seria adequado para as algas utilizadas neste projeto e os compostos de interesse, foram feitos estudos relacionando o estado das algas antes da trituração (secas ou frescas) com o conteúdo de MAAs observado.

Foram pesados 3,00 g de *Plocamium brasiliense* e levados ao liofilizador (Labconco Lyph-Lock<sup>®</sup> 12) até a secagem total; o peso seco foi dividido em triplicatas. Outras triplicatas, de 1,00 g cada, foram recolhidas da mesma alga, fresca, para um estudo comparativo.

As seis amostras (três de alga fresca e três de alga seca) foram manualmente trituradas sob nitrogênio líquido, colocadas em tubos de centrífuga (tubos Falcon) contendo 10 mL de MeOH cada, vortexadas e incubadas no escuro por 24 h a 4 °C. Em seguida, os tubos foram centrifugados em uma centrífuga Eppendorf 5430R (rotor F-35-6-30), por 5 min a 4226 x g e 4 °C. O material acumulado no fundo de cada tubo recebeu mais 10 mL de MeOH e passou por mais uma etapa de extração e centrifugação. Os sobrenadantes das duas extrações, combinados, foram evaporados em Speed Vac<sup>®</sup> (Savant, modelo SC110) com o sistema de temperatura desligado (correspondendo a aproximadamente 30 °C). Cada amostra teve seus 10 mL da primeira extração secos em apenas um tubo Eppendorf, de modo a facilitar a ressuspensão do conteúdo final em pequeno volume de solvente.

Os extratos secos finais foram ressuspensos em 500 µL de ácido fórmico (AF) 0,2% (v/v) pH 3,14 e receberam 80 µL de CHCl<sub>3</sub> (grau P.A.) para a extração de compostos hidrofóbicos. As amostras foram novamente vortexadas e centrifugadas por 10 min a 10621 x g, e a fase aquosa (superior) foi coletada.

### 3.2.2 Extração das MAAs das macroalgas brasileiras

A partir dos dados obtidos no estudo de liofilização, alíquotas de todas as macroalgas estudadas foram manualmente trituradas sob nitrogênio líquido, colocadas em tubos de centrífuga (tubos Falcon) contendo MeOH, vortexadas e incubadas no escuro por 24 h a 4 °C. A proporção utilizada foi de 100 mg de alga fresca para 1 mL de MeOH. Após as 24 h de extração, os tubos foram centrifugados em uma centrífuga Eppendorf 5430R (rotor F-35-6-30), por 10 min a 2935 x g, e os sobrenadantes foram transferidos a novos tubos Falcon.

A extração foi repetida uma vez e o extrato combinado das duas extrações foi evaporado em Speed Vac<sup>®</sup> (Savant SPD1010, Thermo Scientific) com o sistema de temperatura desligado. De modo a facilitar a etapa de ressuspensão, cada extrato foi seco em apenas um microtubo de centrífuga (tipo Eppendorf), sendo necessária a adição frequente de extrato. A extração foi repetida novamente mas, como não houve acréscimo significativo no teor de compostos de interesse ao extrato final, optou-se por utilizar apenas duas etapas de extração.

Os extratos secos foram ressuspensos em 500 µL de AF 0,1% (v/v) + 5 mmol.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc e receberam CHCl<sub>3</sub> (grau P.A.) em quantidade suficiente para a extração de compostos hidrofóbicos. As amostras foram novamente vortexadas e centrifugadas por 10 min a 10621 x g (centrífuga Eppendorf 5430R, rotor F-45-30-11) e a fase aquosa (superior) foi coletada.

### 3.3 Isolamento de MAAs por HPLC e cromatografia em coluna

#### 3.3.1 Otimização do isolamento

##### 3.3.1.1 Método com colunas analíticas

O primeiro esforço de isolamento de MAAs por cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*, HPLC) foi feito a partir do extrato de Helioguard 365<sup>®</sup>. Helioguard 365<sup>®</sup> é uma matéria-prima utilizada na manufatura de protetores solares, gentilmente cedida ao laboratório pela Galena Química e Farmacêutica Ltda. Esse produto é um extrato da macroalga vermelha *Porphyra umbilicalis*, contendo principalmente porphyra-334, chinorina e palitina em sua composição, e foi utilizada como padrão qualitativo destas MAAs.

Para a extração de MAAs a partir deste produto, alíquotas de 1 mL foram retiradas e secas em Speed Vac<sup>®</sup> (Savant, modelo SC110) até assumirem a forma de um óleo bem denso. Os óleos foram solubilizados em 400 µL de AF 0,2 % (v/v) pH 3,14 (ajustado com hidróxido de amônio), agitados em vortex e deixados em banho de ultrassom (Ultrasonik<sup>TM</sup> Ney, modelo 57H) em água e gelo por 1 hora.

As amostras ressuspensas tiveram compostos de peso molecular superior a 5 kDa retirados com tubos Amicon<sup>®</sup> Ultra Centrifugal Filter Devices (Millipore), utilizando uma centrífuga Jouan modelo MR 22i a 13793 x g, 20 °C e oito ciclos de 30 min.

Para o isolamento, foi usado o aparelho Shimadzu SCL-10AVP composto por duas bombas LC-10AT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10AVP equipado com cela analítica e preparativa, injetor automático SIL-10ADVP, degaseificador DGU-14A e programa *Class-VP* 6.12 SP4. Utilizaram-se duas colunas: Synergi Polar-RP (Phenomenex<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 4 µm) e Synergi Fusion RP (Phenomenex<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 4 µm) a 30 °C, em sequência e nessa ordem. O sistema de solventes utilizado foi AF 0,2% (v/v) pH 3,14

(ajustado com  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) (bomba A) e MeOH 100% (bomba B), com vazão de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , corrida de duração de 25 min, 15 min de reequilíbrio entre cada corrida e gradiente mostrado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Gradiente utilizado na primeira condição cromatográfica de isolamento de MAAs. Fase móvel B: MeOH 100%.

Tempo / min	[Fase móvel B] (%)
0	0
10	0
15	100
25	100

Foram injetados  $5 \mu\text{L}$  de amostra a cada corrida. As frações foram coletadas manualmente logo após a saída do detector em diferentes tubos de ensaio e imediatamente transferidas a tubos Eppendorf e levadas ao Speed-Vac<sup>®</sup>, onde permaneceram até sua secagem completa. Em seguida, foram armazenadas a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

De modo a atestar o isolamento dos compostos de interesse e checar se houve degradação no processo, foram realizadas corridas cromatográficas com amostras com diferentes processamentos finais. No teste preliminar, em que foram isoladas apenas chinorina e porphyra-334, as frações secas foram ressuspensas em  $100 \mu\text{L}$  de AF 0,2% (v/v) pH 3,14 e o volume de injeção foi  $5 \mu\text{L}$ ; na coleta em que foram isoladas quatro frações, as mesmas, secas, foram ressuspensas em  $50 \mu\text{L}$  da mesma solução e o volume de injeção foi  $1 \mu\text{L}$ .

### 3.3.1.2 Método com colunas preparativas

A segunda forma de isolamento de MAAs por HPLC foi desenvolvida a partir de um extrato de *Gracilaria* sp. Como o extrato era antigo, não haveria como obter informações confiáveis acerca da alga em questão; no entanto, sua quantidade era grande, fazendo-nos

optar por utilizá-lo para o isolamento de MAAs, uma vez que o mesmo mostrou conter chinorina, palitina, porphyrina-334 e uma MAA não-identificada.

Para tornar o extrato mais apropriado para uso em HPLC, ele foi primeiramente centrifugado (centrífuga Eppendorf 5430R, rotor F-35-6-30) em tubos Falcon de 50 mL a 4960 x g, por 10 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em papel qualitativo Whatman (70 mm, poros de 11 µM) e depois refiltrado a vácuo em filtro Millipore LCR (politetrafluoretileno, PTFE) de 0,45 µm.

A elaboração do procedimento analítico utilizou dois pares de colunas diferentes. Cada par de colunas é vendido em conjunto e contém uma coluna analítica e uma preparativa. Os conjuntos usados foram Shim-pack (Shimadzu) PREP-ODS (H) KIT e Shim-pack (Shimadzu) PREP-SIL (H) KIT: coluna analítica, 250 x 4,6 mm, 5 µm; coluna preparativa, 250 x 20 mm, 5 µm.

Nos testes com a coluna analítica de sílica (PREP-SIL) foram utilizadas duas condições cromatográficas diferentes, no mesmo equipamento utilizado no item 3.3.1.1. O comprimento de onda para monitoramento de ambos foi de 330 nm, a vazão de 1,0 mL·min<sup>-1</sup>, e os solventes e gradientes podem ser vistos na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Condições cromatográficas utilizadas para o isolamento de MAAs utilizando coluna analítica polar (PREP-SIL).

Condição cromatográfica	Fase móvel		Gradiente	Tempo total de corrida
	A	B		
Is	Água deionizada	MeOH 100%	0-10 min – 100% B 10-20 min – 100-0% B	30 min
IIs	Água deionizada	THF 100%	0-6 min – 100% B 6-10 min – 100-60% B 10-20 min – 60-20% B 20-23 min – 20-0% B	28 min

Nos testes com a coluna analítica apolar (PREP-ODS), foram utilizados três procedimentos diferentes, na mesma aparelhagem utilizada com a coluna de sílica. Os métodos podem ser vistos na Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Condições cromatográficas utilizadas para o isolamento de MAAs utilizando coluna analítica apolar (PREP-ODS).

Condição cromatográfica	Fase Móvel		Gradiente	Vazão	Tempo total de corrida
	A	B			
Io	Ácido acético 0,2% (v/v)	—	0-20 min – 100% A	1 mL·min <sup>-1</sup>	20 min
IIo	AF 0,1% (v/v) + NH <sub>4</sub> OAc variável*	MeOH 100%	0-8 min – 0% B 8-10 min – 0-100% B	1 mL·min <sup>-1</sup>	16 min
IIIo	AF 0,1% (v/v) + 10 mmol·L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> OAc	MeOH 100%	0-8 min – 0% B 8-8,5 min – 0-100% B	Variável **	12,5 min

\*Concentrações de NH<sub>4</sub>OAc testadas: zero, 5 mmol·L<sup>-1</sup>, 10 mmol·L<sup>-1</sup> e 20 mmol·L<sup>-1</sup>.

\*\*Vazões testadas: 0,6 mL·min<sup>-1</sup>, 0,8 mL·min<sup>-1</sup> e 1 mL·min<sup>-1</sup>.

Com a coluna preparativa apolar (PREP-ODS), utilizou-se um aparelho *Shimadzu* SCL-10AVP composto por duas bombas LC-6AD, detector de arranjo de diodos SPD-M10AVP equipado com cela analítica e preparativa, injetor automático SIL-10AF, coletor de frações FRC-10A e programa *Class-VP* 6.14. O método utilizado foi sempre o mesmo: gradiente com AF 0,1% (v/v) + 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc (bomba A) e MeOH (bomba B), indo de 0 a 100% do conteúdo da bomba B de 8 a 8,5 min (corrida de 12,5 min), havendo apenas variação na vazão (12 mL·min<sup>-1</sup>, 13 mL·min<sup>-1</sup>, 14 mL·min<sup>-1</sup> e 15 mL·min<sup>-1</sup>).

Com o objetivo de tornar os isolados de MAAs mais livres de impurezas, optou-se por executar uma segunda etapa de purificação, desta vez uma cromatografia em coluna. A coluna, feita dentro de uma bureta de 25 mL, com 1,1 cm de diâmetro interno e 26 cm de fase estacionária. A resina utilizada foi a Sephadex LH-20, que permite eliminar no volume morto moléculas com peso molecular superior a 4000-5000 Da, dependendo do solvente escolhido.

A fase móvel utilizada foi MeOH + 0,1% AF (v/v), com vazão de 0,4 mL·min<sup>-1</sup>. Foram coletadas frações de 500 µL.

### 3.4 Análise por HPLC

#### 3.4.1 Estudo de liofilização

Para a análise das amostras de *P. brasiliense* utilizadas no estudo para avaliação do processamento da amostra (com ou sem liofilização), utilizou-se o mesmo aparelho descrito no item 3.3.1.1. Utilizou-se a coluna analítica do kit (Shimadzu) PREP-ODS (H) KIT (250 x 4,6 mm, 5 µm), com gradiente com AF 0,1% (v/v) + 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc (bomba A) e MeOH (bomba B), indo de 0 a 100% do conteúdo da bomba B entre 8 e 8,5 min (corrida de 12,5 min). A vazão foi de 1 mL·min<sup>-1</sup>, e a injeção, de 10 µL.

O extrato resultante da segunda extração foi transferido para outro tubo após 17 dias e analisado em espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC, com o programa UVProbe 2.35.

#### 3.4.2 Preparação do padrão

Novamente, Helioguard 365<sup>®</sup> foi utilizado como padrão qualitativo das MAAs chinorina, palitina e porphyra-334. Para preparar o padrão, utiliza-se 10 mg do produto Helioguard 365<sup>®</sup> diluído em 1 mL de MeOH 100%. Desta solução, uma alíquota de 10 µL é diluída em 990 µL da fase móvel aquosa a ser utilizada nas condições cromatográficas de escolha, e 10 µL da solução final são injetados no HPLC.

## 3.5 Análise por HPLC-MS

### 3.5.1 Otimização do método de HPLC

Os testes foram realizados no mesmo aparelho descrito no item 3.3.1.1. A coluna utilizada foi a Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ); a temperatura, 24 °C; o comprimento de onda para monitoramento, 330 nm; e a injeção, 10  $\mu\text{L}$ .

A duração da corrida foi sempre de 8 minutos, com diferentes gradientes e também diversas modificações no conteúdo da bomba A. As fases móveis aquosas (bomba A) utilizadas foram sempre soluções de ácido fórmico (AF). As variações testadas foram: AF 0,1% (v/v) pH 3,15; AF 0,2% (v/v) pH 2,50; AF 0,2% (v/v) pH 3,14; AF 0,2% (v/v) pH 4,14; AF 0,4% (v/v) pH 3,14 (todas com seu pH ajustado com hidróxido de amônio,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ); AF 0,1% (v/v) pH 2,66 (pH não ajustado); AF 0,1% (v/v) + 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de acetato de amônio ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ); AF 0,1% (v/v) + 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$ ; e AF 0,1% (v/v) + 20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$ .

Outro parâmetro avaliado foi a vazão, uma vez que o manual do fabricante alerta para o fato de que a eficiência da coluna é maior em vazões mais elevadas, especialmente a partir de 1,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O objetivo inicial era testar vazões sempre maiores, partindo de 1,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; mas como a pressão na coluna foi muito alta para o equipamento, passou-se a testar vazões gradativamente mais baixas (a saber, 1,4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e 1,3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

### 3.5.2 Desenvolvimento de métodos de HPLC-MS

#### 3.5.2.1 Método exploratório

A análise por HPLC foi realizada num aparelho Agilent 1200 Series composto por uma bomba quaternária G1311A, detector de arranjo de diodos G1315D e compartimento de termostatização de coluna G1316A. Para a separação, utilizou-se a coluna Kinetex PFP

(Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ) a 30 °C. O sistema de solventes utilizado foi AF 0,1% (v/v) + 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$  (bomba A) e MeOH 100% (bomba B), com vazão de 1,3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , corrida de duração de 8 min, gradiente indo de 0 a 100% do conteúdo da bomba B entre 2 e 5 min e 5 min para o reequilíbrio da coluna. O comprimento de onda para monitoramento foi de 330 nm, e a injeção, de 10  $\mu\text{L}$ .

O final da coluna Kinetex PFP foi acoplado a um espectrômetro de massas *AB Sciex* 3200 Q Trap<sup>®</sup> LC/MS/MS, um triplo-quadrupolo com híbrido *ion-trap* e ionização por *electrospray* (ESI), além do programa *Analyst* 1.4.2. O gás utilizado no aparelho foi o nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), e o equipamento configurado com os seguintes parâmetros: gás de cortina 20,0 V; voltagem do *ionspray* 5500,0 V; *ion source gas 1* 50,0 V; *ion source gas 2* 20,0 V. Os demais parâmetros foram *declustering potential* 70,0 V; *entrance potential* 10,0 V; e *collision energy* em rampa de 20,0 V a 40,0 V.

É possível encontrar na literatura os fragmentos mais comuns quando da fragmentação de MAAs por ionização à pressão atmosférica. Dessa forma, a análise foi realizada no modo *Precursor Ion*, buscando os íons que dessem origem aos fragmentos 186  $m/z$  e 197  $m/z$ . A polaridade foi positiva e o intervalo de massas procuradas, de  $m/z$  200 a 400.

### 3.5.2.2 Método quantitativo

O método quantitativo foi desenvolvido utilizando-se os mesmos equipamentos (HPLC e espectrômetro de massas) do método exploratório (item 3.5.2.1). Após a análise de todas as amostras do estado do Espírito Santo coletadas em 2014 pelo método exploratório, foi possível filtrar sete íons quasimoleculares  $[\text{M}+\text{H}^+]$  com características de MAAs, como a fragmentação gerando os íons de  $m/z$  186 e/ou 197 e o  $\lambda_{\text{máx}}$  entre 300 e 370 nm.

Estes sete íons tiveram sua fragmentação estudada e foram escolhidas as transições de maior intensidade para a elaboração de um método de análise por MRM (Tabela 3.7). Neste tipo de varredura é monitorada a fragmentação de um íon precursor (selecionado no primeiro

estágio do triplo quadrupolo) em seus correspondentes íons produtos (que atravessam o segundo estágio do triplo quadrupolo). Ao se monitorar apenas um íon produto, o método é denominado SRM (*selected reaction monitoring*, ou monitoramento de reação selecionada); ao se monitorar vários íons produto simultaneamente, é denominado MRM (*multiple reaction monitoring*, ou monitoramento de reações múltiplas) (Chiaradia et al., 2008). Para a realização da quantificação de cada MAA nas amostras, foi utilizada apenas a transição mais intensa, destacada em negrito na Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Íons quasimoleculares  $[M+H]^+$  estudados e transições utilizadas para identificar suas presenças em cada amostra. Em negrito, transição utilizada para a quantificação do íon quasimolecular em questão.

	$[M+H]^+$						
	245	285	289	303	317	333	347
Transições	245 → 230	285 → 270	289 → 274	<b>303 → 288</b>	<b>317 → 197</b>	<b>333 → 300</b>	<b>347 → 303</b>
	245 → 209	285 → 241	<b>289 → 230</b>	303 → 244	317 → 186	333 → 274	347 → 227
	245 → 197	285 → 226	289 → 197	303 → 230		333 → 230	347 → 197
	<b>245 → 186</b>	<b>285 → 197</b>	289 → 186	303 → 197		333 → 197	347 → 186
				303 → 186		333 → 186	

O gás utilizado no aparelho foi o nitrogênio ( $N_2$ ), e o equipamento configurado com os seguintes parâmetros: gás de cortina 20,0 V; voltagem do *ionspray* 4000,0 V; *ion source gas 1* 50,0 V; *ion source gas 2* 20,0 V. Os demais parâmetros foram *declustering potential* 35,0 V; *entrance potential* 10,0 V; *collision energy* 20,0 V; e *collision cell entrance potential* (CEP) variável para cada íon molecular, conforme a Tabela 3.8.

Ao final da análise, foram encontrados dois compostos contendo o íon quasimolecular  $[M+H]^+$  de  $m/z$  303. Para distingui-los, foi realizada a fragmentação ( $MS^2$ ) dos mesmos por infusão direta dos extratos de *Amansia multifida* e *Ceratodictyon variabile*, com os seguintes parâmetros: gás de cortina 10,0 V; voltagem do *ionspray* 4000,0 V; *ion source gas 1* 15,0 V; *ion source gas 2* 0,0 V. Os demais parâmetros foram *declustering potential* 35,0 V; *entrance*

*potential* 10,0 V; *collision energy* 30,0 V; *collision cell entrance potential* (CEP) 16,72; e *collision cell exit potential* 3,0 V.

Tabela 3.8: *Collision cell entrance potential* (CEP) utilizado para cada íon quasimolecular  $[M+H]^+$  estudado.

$[M+H]^+$	CEP (V)
245	11,77
285	13,36
289	13,51
303	14,11
317	14,66
333	15,26
347	15,81

### 3.5.3 Análise das frações isoladas

As frações isoladas foram primeiramente analisadas em espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC, com o programa UVProbe 2.35, de modo a checar quais frações continham as MAAs de interesse. As frações contendo cada MAA foram então reunidas e analisadas em HPLC-MS, pelos dois métodos descritos no item 3.5.2, de modo a determinar se a pureza atingida seria suficiente para sua utilização como padrão.

A concentração de cada MAA foi determinada da seguinte forma: 200  $\mu\text{L}$  da fração em questão foram secos em Speed Vac<sup>®</sup> (Savant SPD1010, Thermo Scientific), com o sistema de temperatura desligado, até a secagem total. A fração seca foi ressuspensa em 200  $\mu\text{L}$  de água deionizada, colocada em cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico e levada ao espectrofotômetro UV-Vis-NIR Shimadzu UV-3101PC, do Laboratório de Espectroscopia Molecular do IQ/USP. Cada fração teve seu espectro de absorção entre 200 e 500 nm registrado por três vezes e a concentração de cada MAA foi obtida pela equação de Beer-Lambert, utilizando os coeficientes de absorvidade molar descritos na literatura para o  $\lambda_{\text{máx}}$  de cada MAA (Tabela 3.9). A concentração foi calculada tanto em  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  quanto em  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

pela utilização da massa molecular de cada composto (Tabela 3.9), e cada isolado foi utilizado para a confecção de uma curva de calibração por HPLC-MS, utilizando o método quantitativo.

Tabela 3.9: MAAs isoladas por HPLC e cromatografia em coluna, seus comprimentos de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), seus coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) e suas massas moleculares.

MAA	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	Massa Molecular (Da)	Referência
chinorina	332	44680	332,31	Tsujino et al. (1980)
porphyrina-334	334	42300	346,33	Takano et al. (1979)
palitina	320	36200	244,25	Takano et al. (1978a)

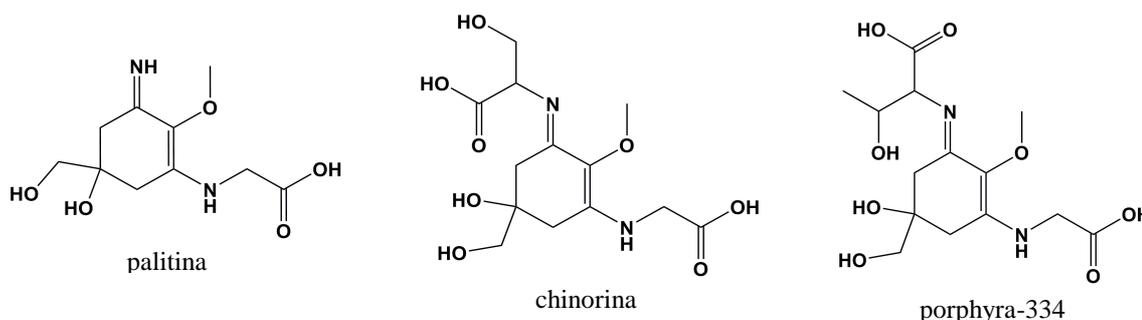


Figura 3.3: Estruturas das MAAs isoladas por HPLC.

### 3.5.4 Análise das MAAs das algas

Os extratos de todas as macroalgas estudadas foram analisados por HPLC-MS, pelos dois métodos descritos no item 3.5.2. A injeção utilizada no HPLC foi de 10  $\mu\text{L}$  para todas as algas vermelhas e de 20  $\mu\text{L}$  para todas as verdes e pardas.

A quantificação de palitina, chinorina e porphyrina-334 foi possível através de curva-padrão realizada para as mesmas, com as frações isoladas obtidas por HPLC e cromatografia em coluna. Uma vez que não foram obtidos padrões das demais MAAs encontradas, não foi possível realizar uma quantificação absoluta das mesmas, mas sim uma quantificação relativa para efeito de comparação das amostras.

### 3.6 Determinação estrutural da MAA desconhecida ( $m/z$ 317)

Utilizando o método exploratório por HPLC-MS, foi encontrada uma MAA cujo íon quasimolecular  $[M+H]^+$  apresenta razão  $m/z$  317, até então não descrita na literatura. Desse modo, foram elaborados diversos passos de elucidação estrutural.

#### 3.6.1 Isolamento da $m/z$ 317

A  $m/z$  317 foi encontrada nas amostras de *Ochtodes secundiramea* coletadas em 2014, nas praias de Castelhanos e Meaípe (ES). De modo a obter maior quantidade do composto com a biomassa disponível, 7,002 g da amostra de Castelhanos e 7,003 g da amostra de Meaípe (peso fresco) foram combinadas, congeladas em nitrogênio líquido e trituradas em moinho vibratório (Retsch MM 301) por 20 s a 30 Hz.

A biomassa triturada recebeu 140 mL de MeOH (razão do extrato: 100 mg peso fresco / mL solvente) e foi incubada no escuro por 24 h a 4 °C. Após as 24 h de extração, o sobrenadante foi coletado e a extração foi realizada novamente. Os extratos combinados foram centrifugados em tubos Falcon em uma centrífuga Eppendorf 5430R (rotor F-35-6-30), por 10 min a 2935 x  $g$ , e os sobrenadantes foram transferidos a novos tubos Falcon e então secos em Speed Vac<sup>®</sup> (Savant SPD1010, Thermo Scientific) com o sistema de temperatura desligado, até a secagem total.

O extrato seco foi ressuspensão em 5 mL de AF 0,1% (v/v) + 5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc e recebeu 3 mL de CHCl<sub>3</sub> (grau P.A.) para a extração de compostos hidrofóbicos. A amostra foi vortexada e centrifugada por 10 min a 2935 x  $g$  (centrífuga Eppendorf 5430R, rotor F-35-6-30) e a fase aquosa (superior) foi coletada. Esta fase foi novamente seca em Speed-Vac<sup>®</sup>, desta vez em um tubo Eppendorf, para a concentração da amostra.

O extrato seco final foi ressuspensão em 500 µL de AF 0,1% (v/v) + 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc, e o composto de interesse foi isolado utilizando-se as mesmas condições

cromatográficas da análise de MAAs por HPLC-MS. Concomitantemente foram testados diversos parâmetros no espectrômetro de massas, de modo a definir a combinação que resultaria na melhor fragmentação da espécie química de interesse.

### 3.6.2 Determinação da massa exata

A massa exata da  $m/z$  317 foi determinada por análise por injeção em fluxo acoplada a espectrometria de massas (FIA-MS). O equipamento utilizado foi um UFLC Shimadzu composto por duas bombas LC-20AD, injetor automático SIL-20AHT, degaseificador DGU-20A3R e controladora CBM-20A, além do programa Bruker Compass HyStar 3.2 – SR 2. A vazão, de  $0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , foi isocrática, com 50% do conteúdo da bomba A (AF 0,1% (v/v)) e 50% da bomba B (MeOH 100%). A corrida teve duração de 1,1 min.

Essa vazão foi injetada em espectrômetro de massas de alta resolução, o micrOTOF II (Bruker Daltonik GmbH) – analisador tipo tempo de voo de alta resolução, com fonte de ionização por ESI operada em polaridade positiva. Foi realizada uma varredura no intervalo de  $m/z$  50 a 600 através do programa Compass otofControl versão 3.2. O gás utilizado no aparelho foi o nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), e o equipamento configurado com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar 4500 V; *end plate offset* -500 V; nebulizador 4,0 bar; temperatura do *dry heater* 200 °C; e vazão do *dry gas*  $8,0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ . Este espectrômetro de massas possui uma válvula de seis portas com *loop* de 20  $\mu\text{L}$ , que permite a injeção de um calibrante antes do início da corrida. O composto utilizado como calibrante foi formiato de sódio, injetado pela bomba de seringa KDL 100 (KD Scientific) a  $200 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ . O intervalo das massas calibrantes foi de 90,9766  $m/z$  a 566,8886  $m/z$ , compreendendo oito valores, e os parâmetros de massas utilizados foram os mesmos da amostra. Os dados foram analisados no programa Compass DataAnalysis 4.1.

A injeção da amostra ou do calibrante no espectrômetro de massas seguiu o fluxo temporal visto na Tabela 3.10. Com esta divisão, o calibrante eluiu entre 0 e 0,2 minutos, e a amostra, após 0,45 minutos.

Tabela 3.10: Programa de corrida no método de FIA-MS.

Intervalo de tempo (min)	Conteúdo injetado no espectrômetro de massas
0-0,01	$m/z$ 317
0,01-0,1	formiato de sódio
0,1-1,1	$m/z$ 317

### 3.6.3 Determinação do número de hidrogênios ionizáveis e fragmentação do íon quasimolecular $[M+H]^+$ deuterado

A determinação do número de hidrogênios ionizáveis da  $m/z$  317 foi determinada por marcação isotópica com deutério. O procedimento, adaptado de Cardozo et al. (2006) e Carignan et al. (2009), consistiu na incubação de 0,1 mg da MAA de  $m/z$  317 em 120  $\mu$ L de  $D_2O$  durante a noite, a 4 °C. A amostra foi evaporada em Speed-Vac<sup>®</sup> (Savant SPD1010, Thermo Scientific), ressuspensa em 10 mL de  $D_2O$  e novamente incubada a 4 °C, desta vez por 24 h. O procedimento foi repetido uma vez. A amostra foi evaporada e ressuspensa em 1 mL  $D_2O$ .

A amostra foi injetada por infusão direta no espectrômetro de massas *Applied Biosystems/MDS Sciex 3200 Q Trap*<sup>®</sup> LC/MS/MS. O gás utilizado no aparelho foi o gás nitrogênio ( $N_2$ ), e o equipamento configurado com os seguintes parâmetros: gás de cortina 20,0 V; voltagem do *ionspray* 4000,0 V; *ion source gas 1* 50,0 V; *ion source gas 2* 20,0 V. Os demais parâmetros foram *declustering potential* 35,0 V; *entrance potential* 10,0 V; *collision energy* 38,0 V; *collision cell entrance potential* 14,62; e *collision cell exit potential* 3,0 V.

A análise por MS<sup>2</sup> foi realizada no modo positivo, buscando-se pelos íons-produto da fragmentação da  $m/z$  317, no intervalo de 100 a 320  $m/z$ .

#### **3.6.4 Análise dos aminoácidos presentes na $m/z$ 317**

A análise de aminoácidos foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Maria Teresa Machini, no Laboratório de Química de Peptídeos (IQ/USP).

O material contendo a  $m/z$  317 isolada foi submetido à hidrólise ácida gasosa com HCl 6 mol·L<sup>-1</sup>, em presença de fenol cristalizado e sob atmosfera de N<sub>2</sub>, a 110 °C por 24 horas em uma estação de trabalho Pico Tag (Waters). A amostra hidrolisada foi submetida a um analisador automático Dionex composto por um amostrador automático AS40, uma bomba quaternária GS50, um forno de coluna LC25, uma coluna de troca iônica AminoPac PA10, um detector eletroquímico ED50 e uma plataforma “Chromeleon” para controle e aquisição de dados. Neste analisador, os aminoácidos são separados em uma coluna de troca iônica e detectados diretamente (ausência de derivatização) por amperometria pulsada (Clarke et al., 1999). Também foi feita análise de uma solução padrão contendo 10 μmol·L<sup>-1</sup> de cada aminoácido esperado na amostra (alanina, glicina, ácido glutâmico e ácido aspártico). O gradiente de eluição é mostrado na Tabela 3.11 e a forma de onda aplicada no eletrodo de detecção é mostrada na Tabela 3.12.

A presença dos aminoácidos glicina e alanina no hidrolisado foi também estudada por HPLC acoplado a espectrometria de massas de alta resolução, com o mesmo equipamento descrito no item 3.6.2. Para a separação, utilizou-se a coluna Ascentis<sup>®</sup> Express HILIC (150 x 2,1 mm, 2,7 μm) a 40 °C. O sistema de solventes utilizado foi H<sub>2</sub>O + 5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc, pH 3 (ajustado com AF) (bomba A) e acetonitrila 100% (bomba B), com vazão de 0,5 mL·min<sup>-1</sup>, corrida de duração de 25 min, 5 min para o reequilíbrio da coluna, injeção de 5 μL e gradiente representado na Tabela 3.13.

Tabela 3.11: Gradiente de separação utilizado para análise de aminoácidos por HPLC com detecção por amperometria pulsada.

Tempo	H <sub>2</sub> O (%)	NaOH 0,25 mol/L (%)	NaOAc 1,0 mol/L (%)
0	76	24	0
2	76	24	0
8	64	36	0
11	64	36	0
18	40	20	40
21	54	16	40
23	14	16	70
45	14	16	70
45,1	76	24	0
49	76	24	0

volume de injeção = 25 µL, temperatura = 30 °C e vazão = 0,25 mL·min<sup>-1</sup>.

Tabela 3.12: Forma de onda aplicada ao eletrodo na detecção amperométrica.

Tempo (min)	Potencial (V)
0	0,13
0,04	0,13
0,05	0,33
0,21	0,33
0,22	0,55
0,46	0,55
0,47	0,33
0,56	0,33
0,57	-1,67
0,58	-1,67
0,59	0,93
0,60	0,13

Eletrodo de referência (Ag/AgCl), Eletrodo de trabalho (Au)

Tabela 3.13: Gradiente utilizado na análise dos aminoácidos glicina e alanina por HPLC com detecção por espectrometria de massas. Fase móvel B: acetonitrila 100%.

Tempo / min	[Fase móvel B] (%)
0	95
2	95
17	65
23	40
25	40

A análise por espectrometria de massas foi feita com ionização por ESI, em modo positivo. O gás utilizado no aparelho foi o nitrogênio (N<sub>2</sub>), e o equipamento configurado com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar 4500 V; *end plate offset* -500 V; nebulizador 4,0 bar; temperatura do *dry heater* 220 °C; e vazão do *dry gas* 10,0 L·min<sup>-1</sup>. O intervalo de massas pesquisado foi de 20 a 1100 *m/z*.

A identidade do aminoácido alanina foi confirmada por busca na base de dados METLIN (*Metabolite and Tandem MS Database*), do *Scripps Center for Metabolomics*. Foram buscados íons [M+H]<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup> e [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, com variação limitada a 10 ppm, no modo positivo.

### **3.7 Análises estatísticas**

Para as análises estatísticas utilizou-se os softwares Minitab (versão 17) e R (versão 3.1.2). Foi utilizado o teste t de Student para comparar as médias de cada grupo dois a dois, e contra os valores obtidos da literatura. Para a comparação de maiores quantidades de grupos (por exemplo, todas as amostras contendo uma MAA específica), utilizou-se o teste de Tukey para analisar o intervalo de confiança para as diferenças observadas. Foram consideradas significativas aquelas que apresentavam p-valor ajustado menor que 0,05.

## *4 Resultados e Discussão*

---

## 4.1 Isolamento de MAAs por HPLC e cromatografia em coluna

### 4.1.1 Otimização do isolamento

O isolamento de MAAs foi de grande importância para o andamento deste trabalho, uma vez que tais compostos não possuem forma comercial. Desse modo, foram realizados alguns testes, inclusive com matérias-primas diferentes (Helioguard 365<sup>®</sup> e extrato de *Gracilaria* sp.), para a obtenção de tais padrões.

Três diferentes volumes de amostra (1, 2 e 5  $\mu$ L) foram injetados no HPLC durante os testes utilizando Helioguard 365<sup>®</sup>. Os cromatogramas gerados por essas três injeções podem ser vistos na Figura 4.1. Como é possível perceber, a injeção de 2  $\mu$ L já é suficiente para se ter picos bastante abundantes, com intensidade em torno de 200.000 mUA; no entanto, a injeção de 5  $\mu$ L também proporciona picos abundantes, com intensidade de cerca de 1.900.000 mUA, e que permanecem bem resolvidos. Dessa maneira, o volume de 5  $\mu$ L foi escolhido para a coleta das frações contendo diferentes MAAs.

Num primeiro teste, foram coletadas apenas as frações relativas aos picos 1 e 3, contendo as MAAs chinorina e porphyrina-334, respectivamente. Essa avaliação evidenciou que ainda era necessário um aprimoramento no passo de coleta das frações, já que elas não foram completamente isoladas. Na coleta definitiva, foram coletadas quatro frações, enumeradas na Figura 4.1B: 1-chinorina, 2-palitina, 3-porphyrina-334 e 4-MAA não identificada (com  $\lambda_{\text{máx}}$  entre 331 e 334 nm). A ressuspensão das frações secas em ácido fórmico (AF) 0,2% (v/v) pH 3,14 foi muito complicada e, como a quantidade era pequena, foi difícil dizer se foi completa ou não. Quando as corridas com as frações isoladas foram executadas, não houve reprodutibilidade dos tempos de retenção.

Não muito tempo depois, notou-se que a limpeza do injetor não estava sendo suficiente para retirar todas as MAAs que ficavam aderidas, contaminando dessa maneira

todas as amostras e os brancos utilizados. Logo, já não era mais possível confiar na pureza das frações coletadas.

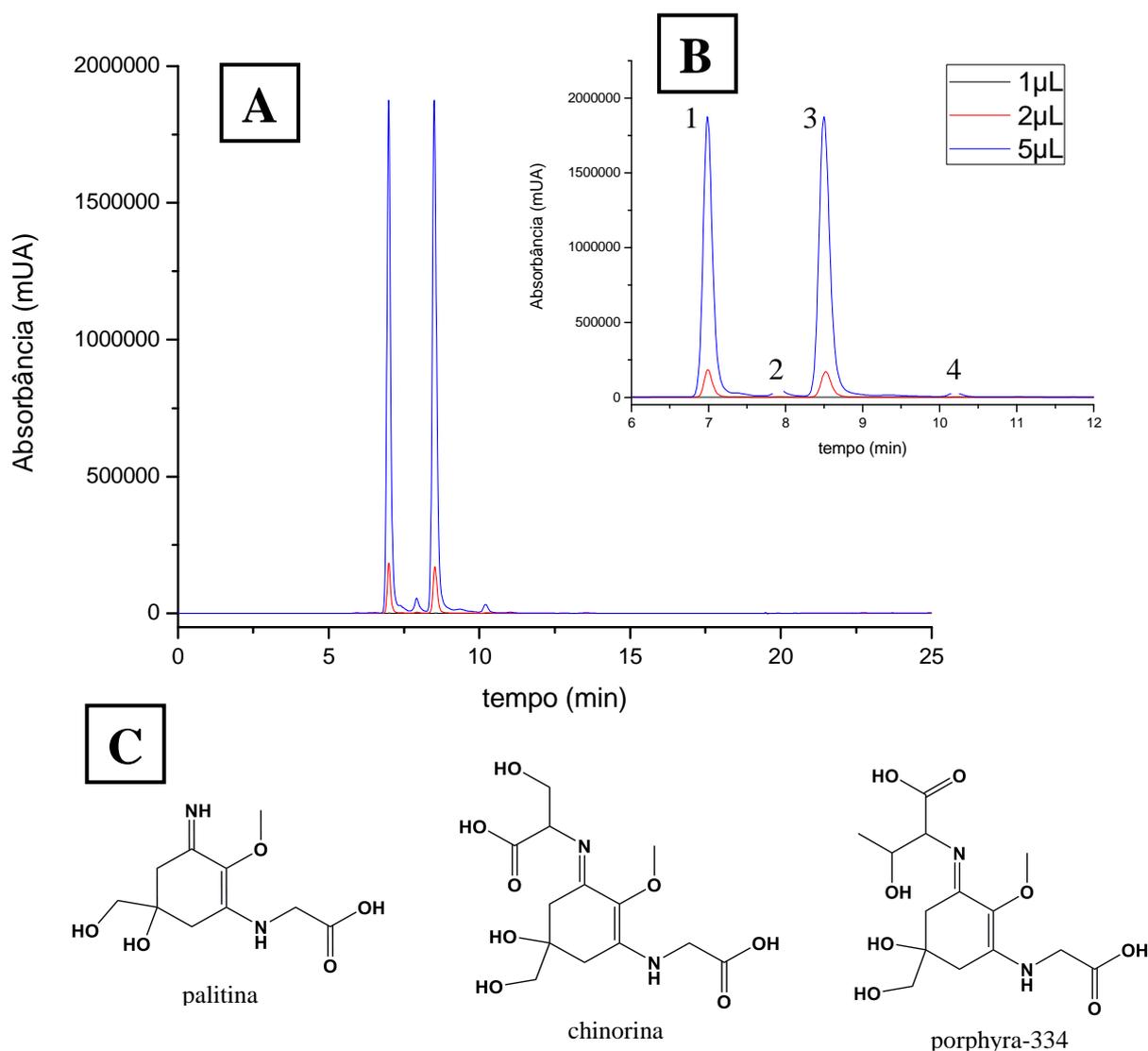


Figura 4.1: A: Perfis cromatográficos do extrato de Helioguard 365<sup>®</sup> com três diferentes volumes de injeção: 1, 2 e 5 µL. B: Detalhe do perfil cromatográfico de 6 a 12 minutos e destaque para os quatro picos isolados: 1- chinorina, 2-palitina, 3-porphyrina-334 e 4-MAA não identificada. C: Estruturas das MAAs identificadas no extrato de Helioguard 365<sup>®</sup>. Condições cromatográficas: colunas: Synergi Polar-RP (Phenomenex<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 4 µm) e Synergi Fusion RP (Phenomenex<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 4 µm), acopladas; solvente A: 0,2% AF em água, pH 3,14 (ajustado com NH<sub>4</sub>OH); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 10 a 15 min; tempo total: 25 min; vazão: 1 mL·min<sup>-1</sup>; λ: 330 nm.

Desse modo (e de modo a tornar o processo de isolamento de MAAs mais rápido), foram testadas diferentes condições cromatográficas com duas colunas preparativas: uma de fase C18 (octadecilsilano), apolar (Shim-pack ODS), e uma de fase de sílica, polar (Shim-pack SIL). As condições foram inicialmente testadas nas colunas analíticas vendidas em conjunto com as preparativas, de modo a diminuir o gasto de solventes nesta etapa.

Não há relatos na literatura sobre separação de MAAs utilizando coluna contendo sílica como fase estacionária, apesar da característica polar dessas moléculas. Os procedimentos realizados utilizaram primeiramente um gradiente de MeOH e água que se mostrou bastante insatisfatório (Figura 4.2): afinal, as MAAs são muito solúveis em MeOH e a interação com a coluna parece não ter sido suficiente para separá-las.

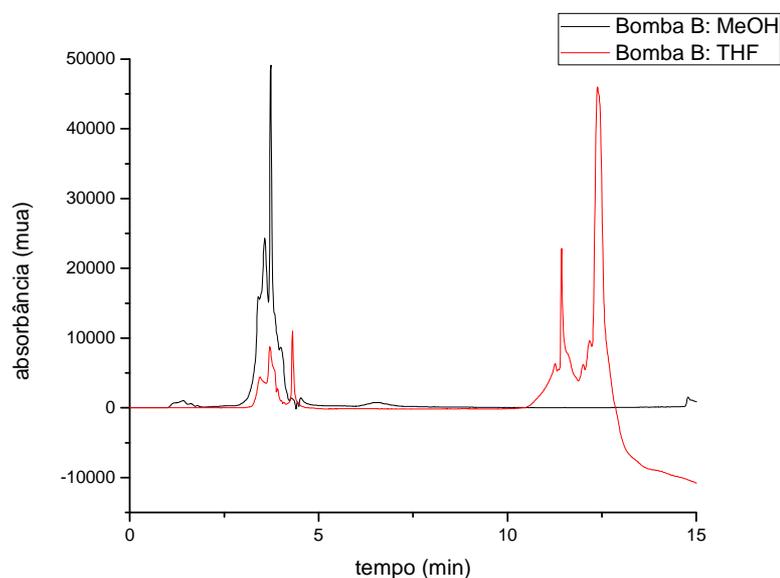


Figura 4.2: Perfis cromatográficos das corridas com os dois solventes orgânicos testados. Em preto, a fase orgânica é metanol (MeOH); em vermelho, tetra-hidrofurano (THF). Condições cromatográficas gerais: coluna: Shim-pack PREP-SIL (Shimadzu®, 250 x 4,6 mm, 5 µm); solvente A: água deionizada; vazão: 1 mL·min<sup>-1</sup>; λ: 330 nm. Condições específicas do perfil em preto: solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 100 a 0% de B de 10 a 20 min; tempo total: 30 min. Condições específicas do perfil em vermelho: solvente B: 100% de THF; gradiente: de 100 a 60% de B de 6 a 10 min, de 60 a 20% de B de 10 a 20 min e de 20 a 0% de B de 20 a 23 min; tempo total: 28 min.

Procedeu-se então à utilização de um solvente menos polar, mas que ainda fosse solúvel em água e solubilizasse o extrato. O solvente escolhido foi o THF, que possui polaridade igual a 4,2, enquanto a do MeOH é 6,6. Após um breve teste de solubilidade da amostra e a modificação do gradiente previamente utilizado, os resultados continuaram sendo insatisfatórios (Figura 4.2), apesar de a separação dos compostos ser visivelmente melhor do que na condição utilizando MeOH. Optou-se, então, por trabalhar com a coluna apolar.

Em contraste com a coluna de sílica, há muitos relatos na literatura de separação de MAAs utilizando coluna contendo C18 como fase estacionária. A maioria dos métodos utiliza ácido acético (HOAc) em baixas concentrações (de 0,02% a 0,2%, v/v), às vezes contendo pequenas proporções de MeOH (de 0,5% a 4%, v/v), numa corrida isocrática (Cardozo et al., 2006; Carreto et al., 1990; Conde et al., 2000; Klisch e Häder, 2000; Kogej et al., 2006; Misonou et al., 2003; Nakamura et al., 1982; Singh et al., 2008; Sinha et al., 2000; Volkmann e Gorbushina, 2006; Xiong et al., 1997). As separações mostradas são muito diferentes entre si; mesmo assim, os estudos foram iniciados com a mais simples dessas condições (HOAc 0,2% (v/v), corrida isocrática).

Os picos de tal corrida se mostraram mais bem resolvidos do que qualquer uma das condições testadas na coluna de sílica (Figura 4.3). Mesmo assim, parecia ainda haver espaço para melhorias, como a utilização de um gradiente que promovesse uma etapa de limpeza da coluna e a preparasse para a próxima injeção. Optou-se, então, por testar algumas das fases móveis que vinham sendo utilizadas para a otimização da análise pela coluna Kinetex PFP: soluções de AF 0,1% (v/v) em água contendo diferentes concentrações de NH<sub>4</sub>OAc. Teve início também a utilização de gradientes com a coluna de C18, de modo a melhorar a resolução entre os picos.

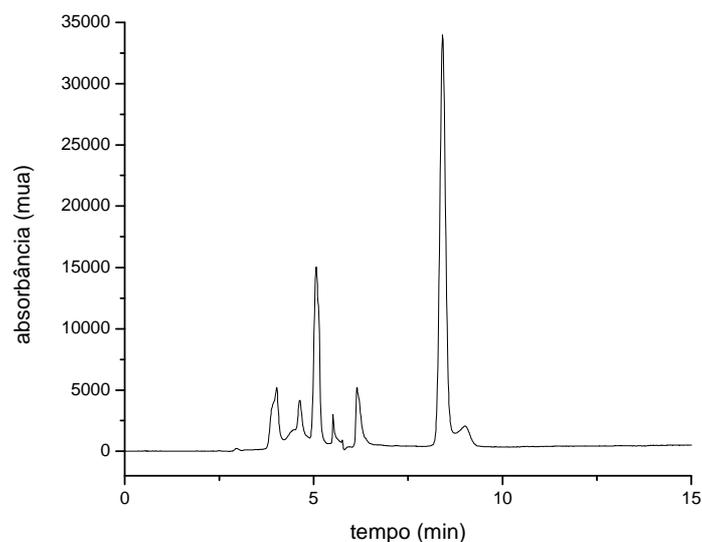


Figura 4.3: Perfil cromatográfico da primeira corrida utilizando coluna C18. Condições cromatográficas: coluna: Shim-Pack PREP-ODS (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); solvente A: 0,2% ácido acético em água (v/v) (método isocrático); tempo total: 20 min; vazão: 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : 330 nm.

Os resultados podem ser vistos na Figura 4.4. O extrato testado apresenta quatro MAAs, mas elas não são vistas em todas as corridas: na corrida com AF 0,1% (v/v), os dois primeiros picos parecem coeluir, e na corrida com AF 0,1% (v/v) + 20 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc o último pico não pode ser visto. Dentre as outras duas condições testadas, a com AF 0,1% (v/v) + 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc tem o segundo pico ligeiramente mais distante do primeiro, o que facilita a coleta e diminui a chance de contaminação das frações isoladas. Dessa forma, o sistema de solventes escolhido foi AF 0,1% (v/v) + 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc (bomba A) e metanol 100% (bomba B), com gradiente.

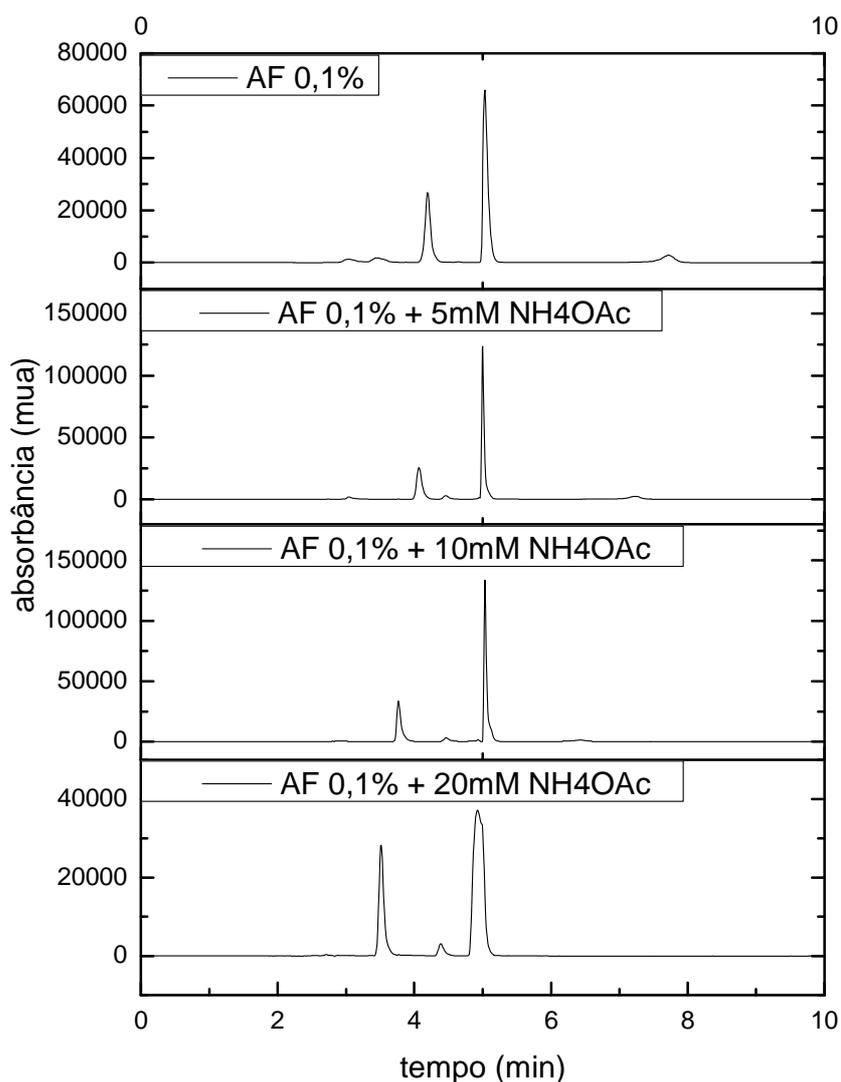


Figura 4.4: Perfis cromatográficos das quatro fases móveis aquosas testadas, entre 0 e 10 minutos (intervalo de tempo em que eluem os picos de MAAs). Condições cromatográficas gerais: coluna: Shim-pack PREP-ODS (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 8 a 10 min; tempo total: 16 min; vazão: 1 mL·min<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : 330 nm. Condições específicas: o solvente A era composto de 0,1% de AF em água, com adição de diferentes concentrações de NH<sub>4</sub>OAc, indicadas na figura.

Outro fator importante na elaboração de um método preparativo é a vazão de solvente a ser utilizada, uma vez que a vazão em coluna preparativa é muito maior do que a vazão em coluna analítica. Para se determinar quão maior ela deve ser, pode-se utilizar a fórmula

$$\text{fator de escalonamento} = \frac{(\text{raio da coluna B})^2}{(\text{raio da coluna A})^2}.$$

Como o diâmetro interno da coluna analítica, neste caso, é de 4,6 mm, e o da preparativa é de 20 mm, chega-se à conclusão de que a vazão deve ser aumentada em 18,9 vezes para que se mantenha a mesma separação. Dessa forma, passa a ser interessante reduzir a vazão utilizada nos testes em coluna analítica.

Foram testadas três diferentes vazões:  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Os resultados (Figura 4.5) deixam claro que a mudança na vazão não implica um aumento relevante de resolução entre os picos. No entanto, diminuir demais o valor deste parâmetro pode aumentar muito o tempo de análise, o que não traria benefícios. Dessa forma, optou-se por escolher a vazão de  $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ : os picos ficam mais distantes entre si, facilitando a coleta das frações, mas não é necessário aumentar o tempo de corrida.

Outros testes foram realizados de modo a diminuir o tempo de corrida, checando a pressão nas bombas e analisando quais passos poderiam ter seu tempo reduzido. Dessa forma, chegou-se ao método final: corrida com duração de 12,5 min e gradiente indo de 0 a 100% do conteúdo da bomba B entre 8 e 8,5 min.

Tendo esta condição cromatográfica como base, o próximo passo foi aperfeiçoar as condições de vazão e injeção já utilizando a coluna preparativa. A injeção escolhida foi de  $2000 \mu\text{L}$  (volume máximo de injeção, segundo o fabricante), e as vazões testadas foram  $12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $13 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $14 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (Figura 4.6).

É visível que o perfil cromatográfico mudou bastante da coluna analítica para a preparativa, o que já era esperado. A vazão que seria considerada ideal, de  $15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (afinal, fluxo de  $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  vezes o fator de escalonamento de 18,9 resulta em  $15,12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), faz com que a intensidade do pico inicial seja muito baixa, podendo este em alguns casos ser confundido com o ruído – dessa forma, as vazões de  $12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $13 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mostram-se mais adequadas. Outro problema é o pico correspondente à chinorina

(com tempo de retenção em aproximadamente 5 min na corrida a  $13 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), que passa a ter um ombro. Infelizmente, esse problema não foi contornado.

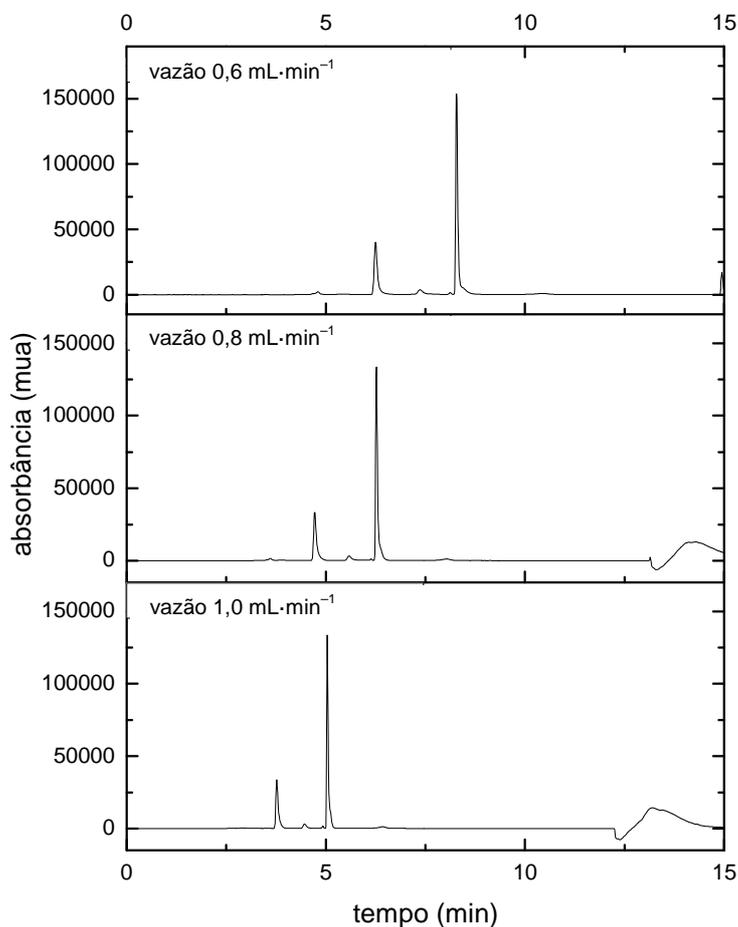


Figura 4.5: Perfis cromatográficos das três condições de vazão testadas. Condições cromatográficas gerais: coluna: Shim-pack PREP-ODS (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); solvente A: 0,1% AF em água + 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$ ; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 8 a 8,5 min; tempo total: 12,5 min;  $\lambda$ : 330 nm. Condições específicas: vazão variável entre 0,6 e 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , conforme figura.

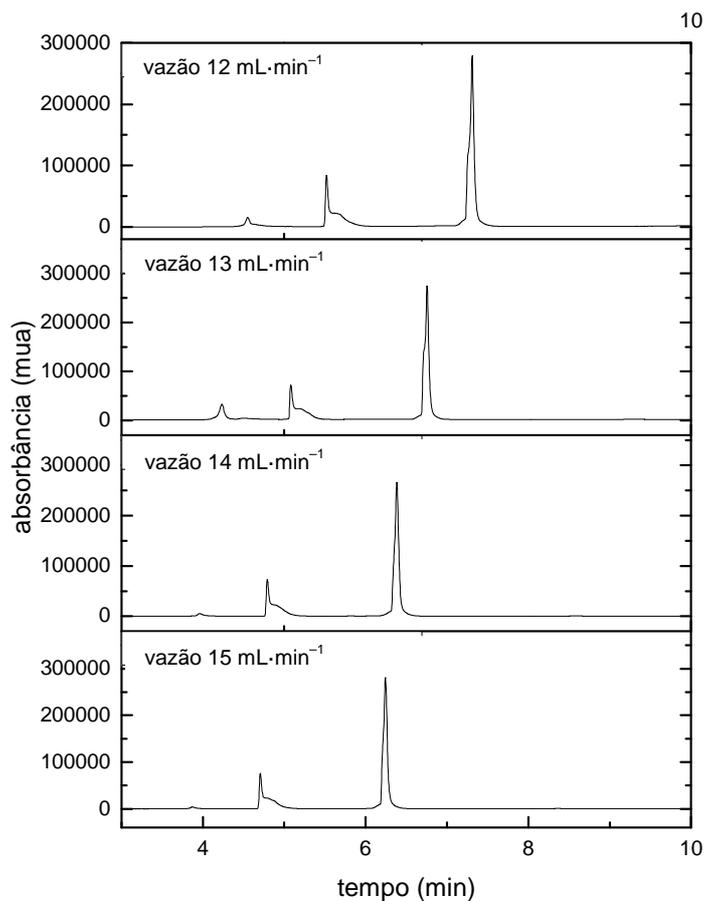


Figura 4.6: Perfis cromatográficos das quatro condições de vazão testadas em coluna preparativa. Condições cromatográficas gerais: coluna: Shim-pack PREP-ODS (Shimadzu®, 250 x 20 mm, 5  $\mu$ m); solvente A: 0,1% AF em água + 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 8 a 8,5 min; tempo total: 12,5 min;  $\lambda$ : 330 nm. Condições específicas: vazão variável entre 12 e 15 mL·min<sup>-1</sup>, conforme figura.

O melhor método testado foi: coluna Shim-pack (Shimadzu) PREP-ODS (250 x 20 mm, 5  $\mu$ m) a 24 °C; injeção de 2000  $\mu$ L; sistema de solventes ácido fórmico 0,1% (v/v) + 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc (bomba A) e metanol 100% (bomba B), com vazão de 13 mL·min<sup>-1</sup>, corrida de duração de 12,5 min e gradiente indo de 0 a 100% do conteúdo da bomba B entre 8 e 8,5 min.

Esta condição cromatográfica foi utilizada para gerar padrões a partir do mesmo extrato utilizado para a confecção do método. Este extrato, após sucessivas etapas de concentração e limpeza (na maioria das vezes, por filtração), foi injetado em um sistema de HPLC preparativo. Um cromatograma típico obtido pode ser observado na Figura 4.7. Nessa

figura pode-se notar a existência de cinco possíveis MAAs, com tempos de retenção em 3,9 min (pico 1), 5,5 min (pico 2), 7,4 min (pico 3), 9,1 min (pico 4) e 10,6 min (pico 5). Cabe dizer que o pico 4, de intensidade muito baixa, não pôde ser encontrado em todas as corridas.

As cinco frações foram coletadas com o auxílio do coletor de frações FRC-10A e levadas a um espectrofotômetro e ao HPLC-MS, de modo a analisar sua pureza. De tais análises, pôde-se notar que apenas três frações (2, 3 e 5) possuem MAAs – chinorina, palitina e porphyra-334, respectivamente. No entanto, nenhuma dessas frações estava realmente pura; apesar de as MAAs estarem separadas umas das outras, ainda havia contaminantes em todas elas (Figura 4.8).

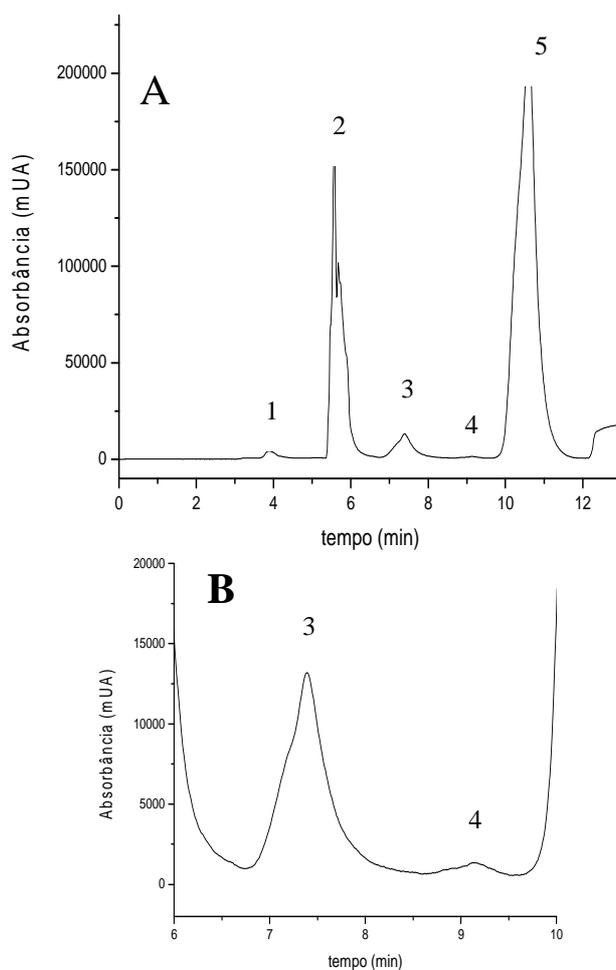


Figura 4.7: A: Perfil cromatográfico do extrato utilizado para o isolamento de MAAs. B: Detalhe do perfil cromatográfico entre 6 e 10 minutos. As frações coletadas encontram-se identificadas por seus números. Condições cromatográficas: coluna: Shim-pack PREP-ODS (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 20 mm, 5  $\mu$ m); solvente A: 0,1% AF em água + 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 8 a 8,5 min; tempo total: 12,5 min; vazão: 13 mL·min<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : 330 nm.

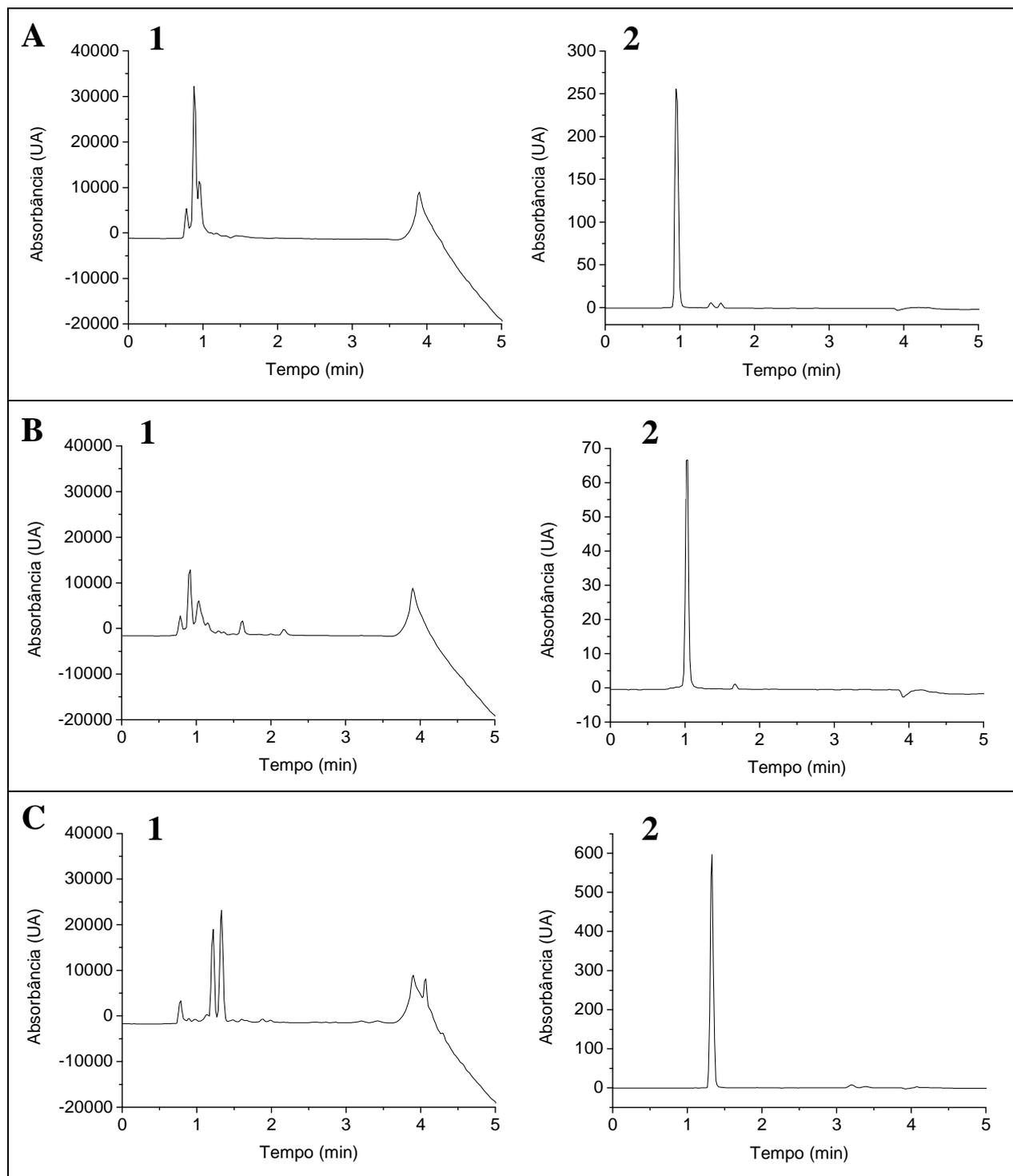


Figura 4.8: Perfis cromatográficos de três frações isoladas. A: Perfil cromatográfico da fração 2 (contendo majoritariamente chinorina): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. B: Perfil cromatográfico da fração 3 (contendo majoritariamente palitina): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. C: Perfil cromatográfico da fração 5 (contendo majoritariamente porphyrina-334): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. Condições cromatográficas: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex®, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm); solvente A: 0,1% AF em água (v/v) + 5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 5 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,1 mL·min<sup>-1</sup>.

Analisand-se apenas os perfis cromatográficos em 330 nm (gráficos 2 na Figura 4.8), poder-se-ia acreditar que as MAAs de interesse estão isoladas, ou pelo menos com alto teor de pureza. No entanto, pelos perfis cromatográficos que abrangem todos os comprimentos de onda registrados (gráficos 1 da Figura 4.8), é possível notar que ainda há vários contaminantes nas frações recolhidas. Como o objetivo deste isolamento era gerar padrões de MAAs que pudessem ser pesados e utilizados para a confecção de curvas-padrão destes compostos, pode-se dizer que apenas essa etapa de purificação não é suficiente.

Dessa forma, optou-se por utilizar outro método de isolamento de substâncias: a cromatografia em coluna. A resina escolhida foi a Sephadex LH-20, utilizada em vários relatos na literatura para a separação de compostos pequenos e polares (Cai et al., 2005; Cuevas-Rodríguez et al., 2010), inclusive micosporinas e MAAs (Cardozo et al., 2008). A fase móvel da coluna, MeOH contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v), foi escolhida por dois motivos. Primeiramente, as MAAs são muito solúveis em MeOH – dessa forma, diminuem os riscos de interação excessiva com a coluna, o que poderia alargar as bandas das MAAs (e dificultar sua separação dos outros componentes da amostra). Como as MAAs são zwitterions, trabalhar em ambiente bastante ácido faz com que todas as moléculas estejam protonadas e, portanto, interajam igualmente com a coluna – o que também deixa as bandas mais estreitas.

A introdução de mais um passo de isolamento gerou amostras mais limpas, porém não completamente puras, como pode ser visto no item abaixo.

#### **4.1.2 Análise das frações isoladas**

As frações isoladas, correspondentes às MAAs palitina, chinorina e porphyra-334, atingiram maior grau de pureza após a etapa de separação por cromatografia em coluna. Algumas das análises geradas para cada fração podem ser vistas nas Figuras 4.9 e 4.10.

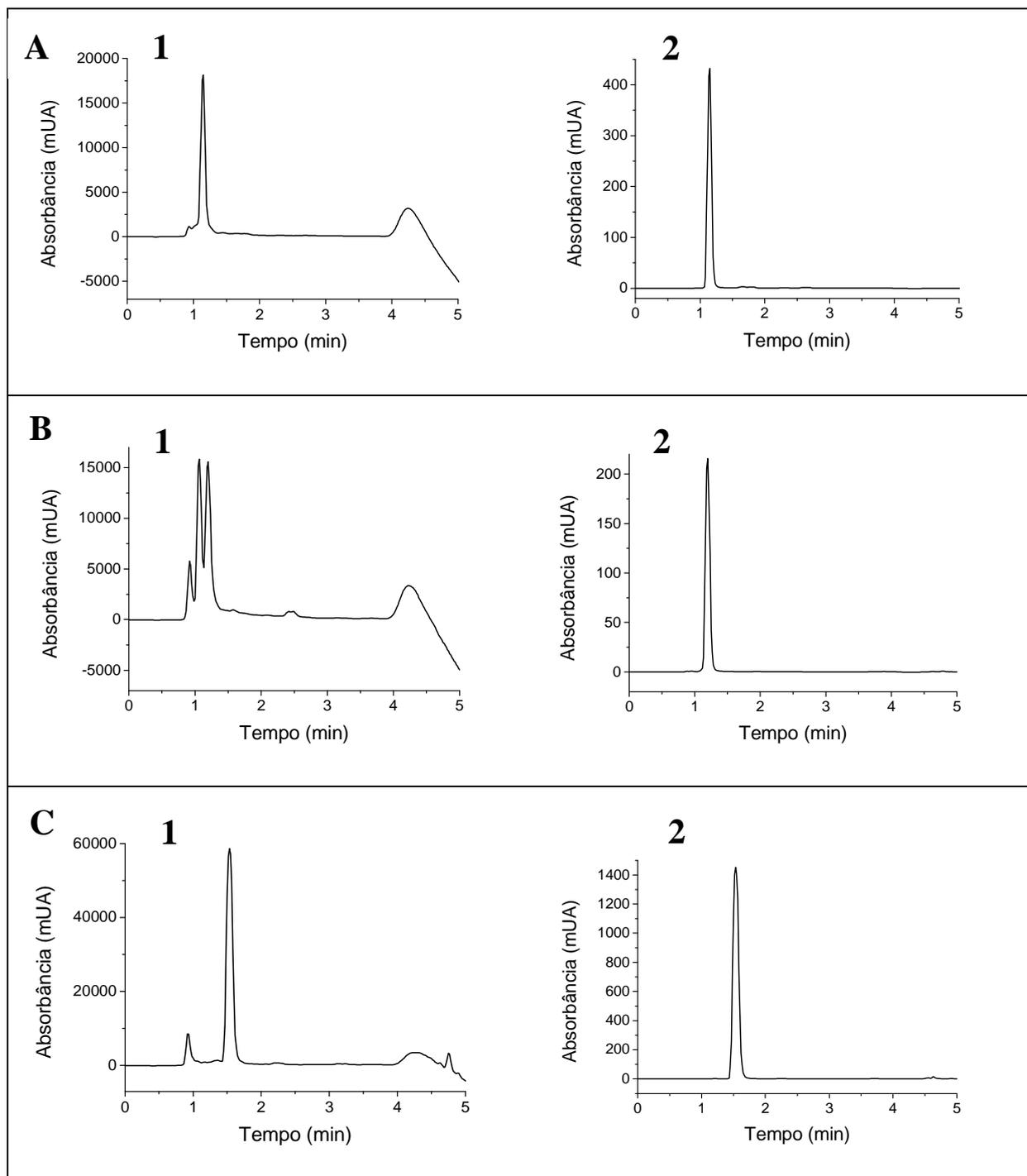


Figura 4.9: Perfis cromatográficos das três frações isoladas. A: Perfil cromatográfico da fração 2 (contendo majoritariamente chinorina): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. B: Perfil cromatográfico da fração 3 (contendo majoritariamente palitina): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. C: Perfil cromatográfico da fração 5 (contendo majoritariamente porphyrin-334): 1) somando todos os comprimentos de onda (190 – 800 nm); 2) em 330 nm. Condições cromatográficas: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu$ m); solvente A: 0,1% AF em água (v/v) + 5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 5 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,1 mL·min<sup>-1</sup>.

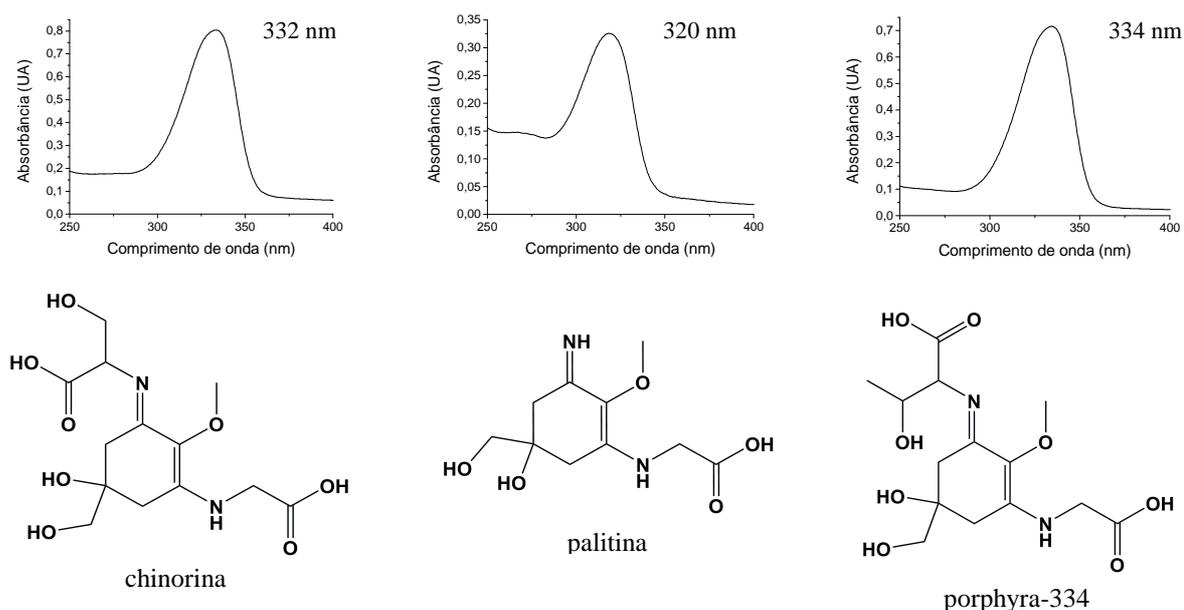


Figura 4.10: Espectros de absorção na faixa de 250-400 nm das frações isoladas por HPLC e cromatografia em coluna. Da esquerda para a direita: fração 2 (chinorina), fração 3 (palitina) e fração 5 (porphyra-334).

Segundo as Figuras 4.9 e 4.10, as amostras parecem não estar totalmente puras, dado que o perfil cromatográfico contendo todos os comprimentos de onda somados apresenta mais de um pico; mas parecem estar, sim, isoladas umas das outras, uma vez que seu perfil cromatográfico em 330 nm apresenta apenas um pico, e seus perfis de absorção entre 250 e 400 nm concordam com os descritos na literatura (Cardozo, 2007). No entanto, quando analisadas pelo método quantitativo por HPLC-MS (dados não mostrados), é possível ver que o isolado de chinorina contém uma pequena porção de palitina (do total de MAAs, a chinorina correspondia a 98%, e a palitina a 2%), e o isolado de palitina contém uma pequena fração de asterina-330. Uma vez que os compostos contaminantes não foram capazes de alterar o  $\lambda_{\text{máx}}$  de cada isolado, admitimos que não influenciam significativamente no espectro de absorção, e assim não foram contabilizados no momento de realizar a curva de calibração para cada MAA.

## 4.2 Estudo de liofilização

Uma vez que algas frescas ocupam um volume muito maior do que algas secas, seria interessante conseguir guardar todas as algas coletadas durante o projeto dessa forma. Uma boa alternativa para a secagem desse material seria por liofilização.

Após a liofilização, as 3,00 g de *Plocamium brasiliense* utilizadas resultaram em apenas 0,57 g. Dessa forma, pode-se dizer que esta alga é composta por aproximadamente 80% de água, o que é condizente com a literatura (Arasaki e Arasaki, 1983). No passo de trituração, a alga liofilizada se mostrou uma alternativa melhor do que a fresca: a pesagem é mais exata (afinal, a alga fresca tem apenas o excesso de água retirado com papel absorvente), a trituração é mais fácil e a extração, em si, parece ser mais eficiente a olho nu (pois apresenta, em geral, coloração mais intensa quando da adição de solvente).

Os extratos foram levados ao HPLC e cada amostra foi analisada em triplicata. Foi possível notar que as amostras frescas apresentaram picos de maior intensidade do que as amostras liofilizadas (Figura 4.11), o que pôde ser visto tanto para o composto majoritário quanto para os minoritários.

A segunda extração (em que o MeOH passou 17 dias em contato com o material restante da primeira extração) foi analisada em espectrofotômetro (Figura 4.12). Novamente, as triplicatas não foram completamente reprodutíveis; desta forma, estão mostrados aqui apenas os espectros mais representativos de cada tratamento de amostra. É possível perceber que, apesar de a amostra liofilizada apresentar maior absorbância nos comprimentos de onda superiores a 330 nm (típicos de muitas MAAs conhecidas), a amostra fresca apresenta possíveis MAAs com absorbância máxima em 305 nm e 321 nm, as quais não podem ser vistas na liofilizada.

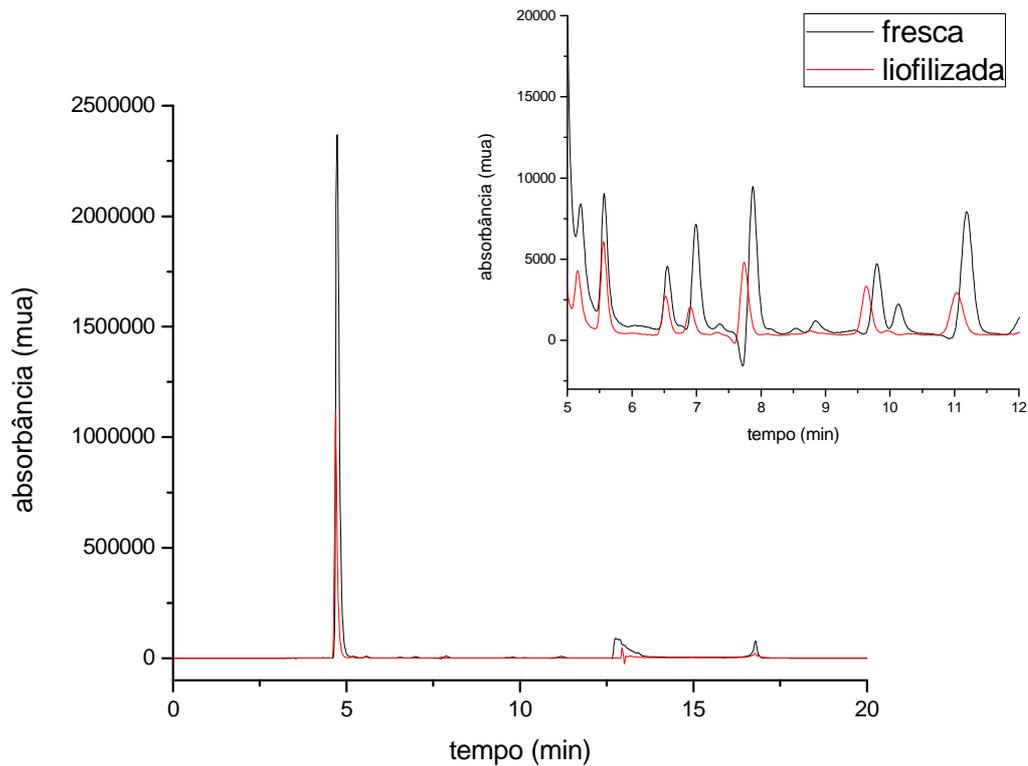


Figura 4.11: Perfis cromatográficos dos dois tratamentos de amostra testados. Em preto, *P. brasiliense* fresca; em vermelho, *P. brasiliense* liofilizada. No detalhe pode-se ver o cromatograma entre 5 e 12 min. Condições cromatográficas: coluna: Shim-pack PREP-ODS (Shimadzu<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); solvente A: 0,1% AF em água + 10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 8 a 8,5 min; tempo total: 12,5 min; vazão: 1 mL·min<sup>-1</sup>.

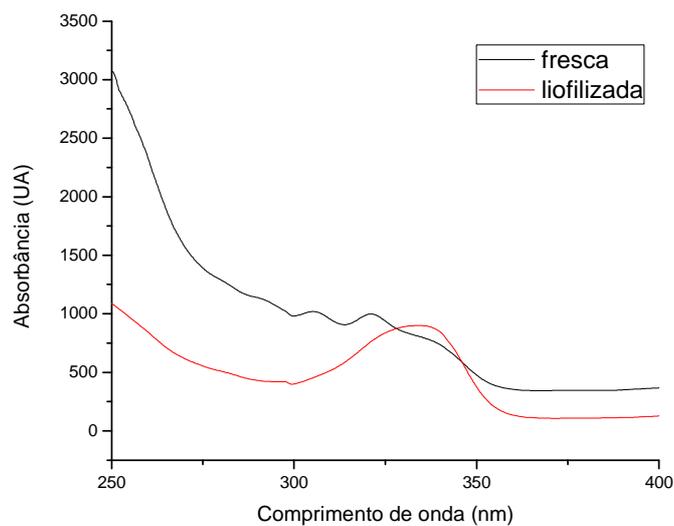


Figura 4.12: Espectros entre 250 nm e 400 nm do segundo extrato dos dois tratamentos de amostra testados. Em preto, *P. brasiliense* fresca; em vermelho, *P. brasiliense* liofilizada.

Unificando os resultados das duas extrações, pode-se concluir que o extrato gerado a partir de massa fresca é mais rico em MAAs. Uma possível explicação para isto é que haja perda de tais compostos quando a alga passa pelo processo de secagem por liofilização. Essa perda se daria pelo arraste ocasionado pelas moléculas de água que, ao saírem, levam consigo parte do material dissolvido (Cronin et al., 1995). Outra possível explicação envolve o rendimento de extração. Tartarotti e Sommaruga (2002) apontam que, para amostras secas, o rendimento de extração é baixo quando é usado metanol puro como solvente, e aumenta quando se usa uma mistura de MeOH : H<sub>2</sub>O (1:3, v/v).

Como não foi possível determinar a causa real da menor quantidade de MAAs no extrato de massa seca, optou-se pela utilização de massa algal fresca para todas as extrações. Além disso, neste estudo também se pôde concluir que apenas uma etapa de extração não é suficiente para a extração total de MAAs, seja a alga fresca ou liofilizada.

### ***4.3 Análise por HPLC-MS***

#### **4.3.1 Otimização do método de HPLC**

Como não há relatos de separação de MAAs na coluna Kinetex PFP, os primeiros testes foram realizados com extratos de Helioguard 365<sup>®</sup>, preparados segundo o item 3.4.2. O método testado como comparação foi o descrito no item 3.3.1.1, desenvolvido há alguns anos em nosso laboratório (Cardozo, 2007; Cardozo et al., 2011), também para a análise de MAAs.

Na Figura 4.13 tem-se a comparação entre uma corrida com o método anterior, contendo duas colunas, e o método utilizado com a Kinetex PFP. É possível notar que a nova separação foi muito mais rápida e que não houve perda significativa na resolução (Tabela 4.1), o que é ótimo no desenvolvimento de um método analítico para a análise das MAAs. Pensando na utilização desta nova coluna para corridas de isolamento de compostos, contudo,

ela já não é recomendada, uma vez que será mais difícil coletar apenas uma fração por vez e a quantidade de compostos obtidos a cada corrida será muito pequena.

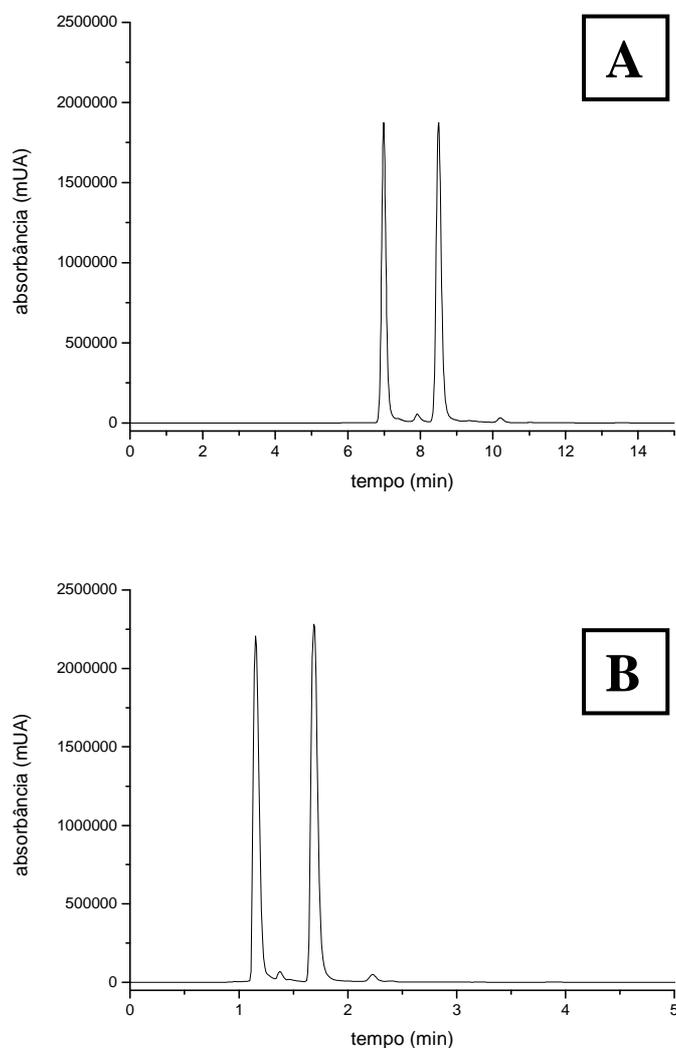


Figura 4.13: Perfis cromatográficos da injeção do extrato de Helioguard 365<sup>®</sup> por dois diferentes métodos. A: Condições cromatográficas: colunas: Synergi Polar-RP (Phenomenex<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 4  $\mu$ m) e Synergi Fusion RP (Phenomenex<sup>®</sup>, 250 x 4,6 mm, 4  $\mu$ m), acopladas; solvente A: 0,2% AF em água (v/v), pH 3,14 (ajustado com NH<sub>4</sub>OH); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 10 a 15 min; tempo total: 25 min; vazão: 1 mL·min<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : 330 nm. B: Condições cromatográficas: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu$ m); solvente A: 0,2% AF em água (v/v), pH 3,14 (ajustado com NH<sub>4</sub>OH); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 6 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,0 mL·min<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : 330 nm.

Tabela 4.1: Resolução entre os quatro picos observados nas duas combinações de colunas estudadas.

Picos	Resolução*	
	Synergi Polar + Fusion	Kinetex PFP
1 – 2	3,79	2,26
2 – 3	2,23	3,00
3 – 4	6,19	4,51

\*calculada com valores de largura à meia-altura de acordo com  $R = \frac{2(t_2 - t_1)}{1,70 \left( W_{1, \frac{h}{2}} + W_{2, \frac{h}{2}} \right)}$  (método USP).

O teste de qualidade realizado pelo fabricante mostra que o tempo de retenção de substâncias não retidas, na vazão de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , é de 0,85 min. Como o tempo de retenção do primeiro composto eluído é de 1,15 min, pode-se realizar o cálculo do fator de capacidade ( $k'$ ) pela fórmula

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

(sendo que  $t_R$  é o tempo de retenção do composto de interesse e  $t_0$  é o tempo de retenção do composto não retido) e obter-se um valor de 0,35. Assim, é possível mostrar que os compostos de interesse não são eluídos no volume morto da coluna e estão sendo, sim, retidos pela mesma.

Segundo o manual do fabricante, a eficiência da coluna é maior em vazões mais elevadas, especialmente a partir de  $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Os primeiros testes realizados não foram muito bem sucedidos – em geral, a pressão foi muito alta e a tubulação soltou da coluna –, mas o último teste mostrou um perfil cromatográfico não muito diferente do perfil gerado pela primeira corrida (Figura 4.14). Esse teste foi realizado com uma condição cromatográfica ligeiramente diferente, com corrida de 5 min e gradiente indo de 0 a 100% do conteúdo da bomba B entre 2 e 3 min.

Após alguns testes com vazão de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  com alguns brancos, que proporcionaram resultados bastante inesperados (como o surgimento de picos muito largos e

em tempos de retenção variados), chegou-se à conclusão de que a capacidade da coluna de lidar com mudanças bruscas de solvente foi superestimada. Assim, alterou-se a corrida, que passou a ter 8 min, com gradiente indo de 0 a 100% do conteúdo da bomba B entre 2 e 5 min.

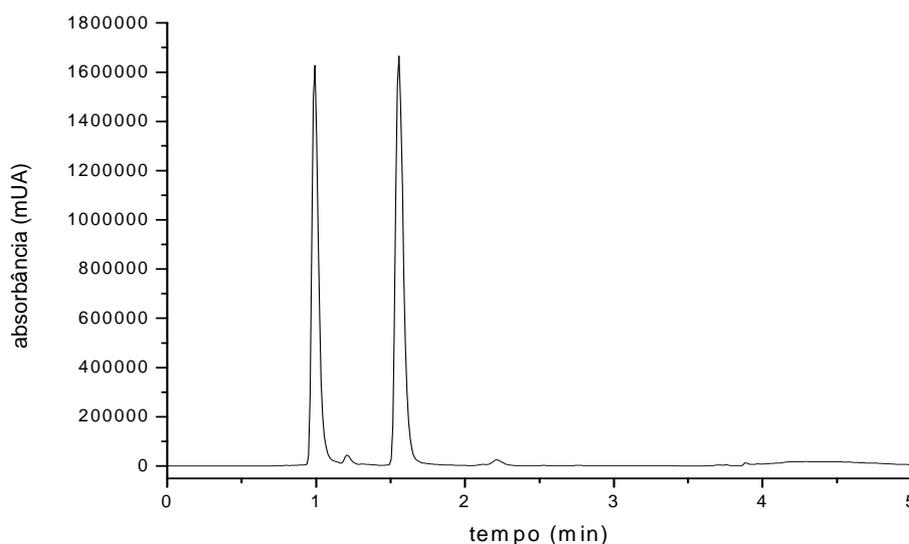


Figura 4.14: Perfil cromatográfico da corrida de Helioguard 365<sup>®</sup> realizada com gradiente curto. Condições cromatográficas: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ); solvente A: 0,2% AF em água (v/v), pH 3,14 (ajustado com  $\text{NH}_4\text{OH}$ ); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 3 min; tempo total: 5 min; vazão: 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $\lambda$ : 330 nm.

Os testes de elevação da vazão seguiram em frente, e pôde-se notar que, a 1,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , a pressão ultrapassa o limite do aparelho; logo, percebeu-se não ser possível trabalhar na faixa ótima da coluna. O próximo teste, feito a 1,4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , também atingiu o limite de pressão do equipamento. Foi apenas em 1,3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  que a pressão máxima atingida pelo sistema apresentou certa margem de segurança em relação à pressão suportada pelo aparelho (tal vazão alcançou uma pressão de 413 kgf, e a pressão suportada é de 432 kgf). Dessa forma, optou-se por trabalhar com uma vazão de 1,3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Em seguida, foram testadas diferentes fases móveis aquosas. Os testes iniciaram-se com fases semelhantes à usada no método de duas colunas: AF 0,1% (v/v) pH 3,15; AF 0,2%

(v/v) pH 2,50; AF 0,2% (v/v) pH 3,14; AF 0,2% (v/v) pH 4,14; e AF 0,4% (v/v) pH 3,14 (todas com seu pH ajustado com  $\text{NH}_4\text{OH}$ ).

Pelos cromatogramas apresentados na Figura 4.15, pode-se perceber que aumentar a porcentagem de AF ou o pH da solução são alternativas ineficazes, pois só fazem diminuir o intervalo de tempo entre os dois compostos majoritários (chinorina e porphyrina-334, nessa ordem). Uma vez que esse método será utilizado para a análise de amostras diversas, que podem ser muito mais complexas do que o padrão Helioguard<sup>®</sup>, é interessante que os picos referentes aos compostos majoritários apresentem boa separação, diminuindo as chances de coeluição.

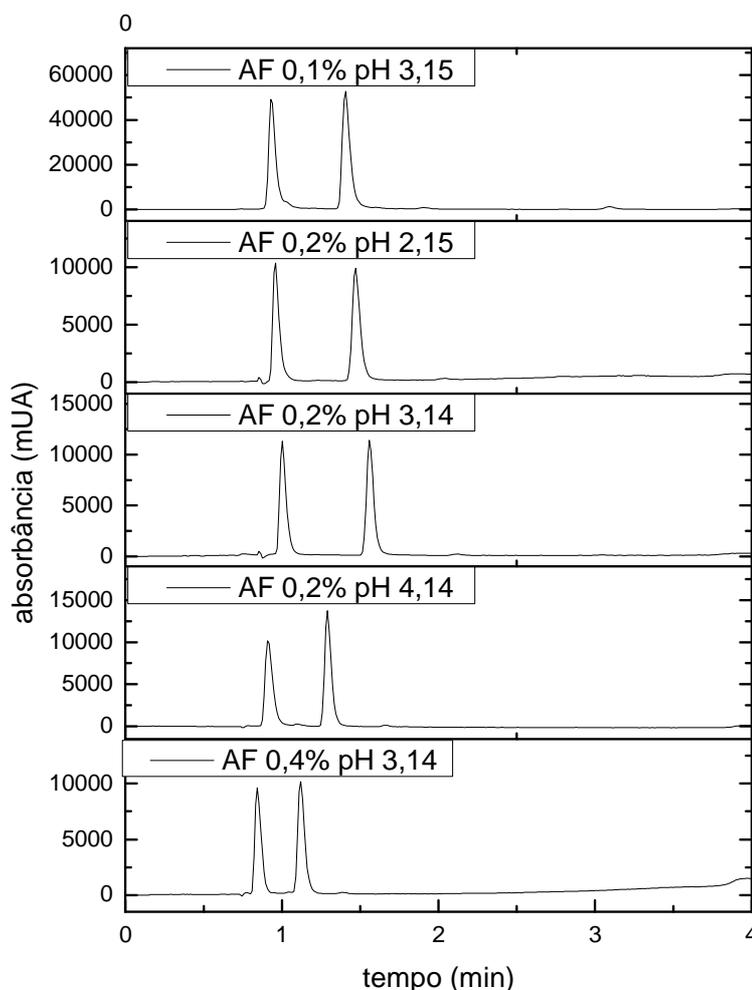


Figura 4.15: Perfis cromatográficos das cinco fases móveis aquosas testadas, entre 0 e 4 minutos (intervalo de tempo em que eluem os picos de MAAs do padrão Helioguard<sup>®</sup>). Condições cromatográficas gerais: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 5 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,3  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $\lambda$ : 330 nm. Condições específicas: solvente A variável, conforme mostra a figura.

Um dos objetivos quando do desenvolvimento deste método era acoplar a saída da coluna ao espectrômetro de massas e assim realizar análises por HPLC-MS, mais ricas em informação. De modo a aumentar o sinal proporcionado por cada composto quando da realização de tais análises, optou-se por incluir na fase móvel um sal volátil que promova uma melhora na ionização da amostra – no caso, o  $\text{NH}_4\text{OAc}$ . Assim, foi testado outro conjunto de fases móveis aquosas: AF 0,1% (v/v) sem  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ; AF 0,1% (v/v) + 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$ ; AF 0,1% (v/v) + 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$ ; e AF 0,1% (v/v) + 20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$ .

Tais testes foram realizados com uma das triplicatas de *Plocamium brasiliense* liofilizada. Como esta alga possui apenas uma MAA majoritária, que é a chinorina, o perfil cromatográfico foi bem diferente do encontrado para o Helioguard 365<sup>®</sup> (vide Figura 4.16); mesmo assim, é possível comparar todas as condições cromatográficas.

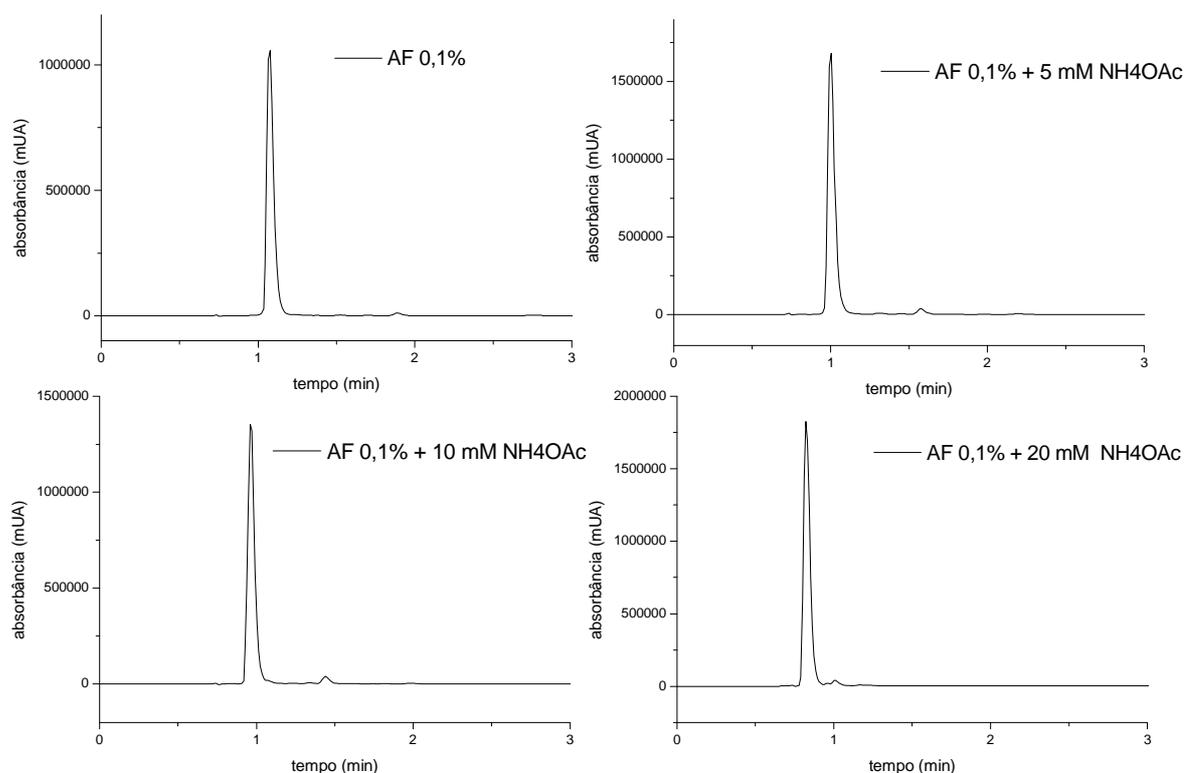


Figura 4.16: Perfis cromatográficos do segundo conjunto de fases móveis aquosas testadas, entre 0 e 3 minutos (intervalo de tempo em que eluem os picos de MAAs da macroalga *P. brasiliense*). Condições cromatográficas gerais: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ); solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 5 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $\lambda$ : 330 nm. Condições específicas: solvente A variável, conforme mostra a figura.

Assim como aumentar o pH ou a concentração de AF, aumentar a concentração de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  também não traz benefícios à separação, uma vez que os dois compostos com picos mais intensos (chinorina e porphyrina-334, nessa ordem) mostram-se muito próximos. A condição contendo apenas AF 0,1% (v/v) também não é ideal, uma vez que é interessante para a análise por MS que a solução contenha  $\text{NH}_4\text{OAc}$  – na realidade, tal condição foi usada apenas como base de comparação.

Analisando as triplicatas realizadas para cada condição, nota-se que a fase aquosa AF 0,1% (v/v) + 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$  traz maior reprodutibilidade, além de seus dois picos mais intensos estarem ligeiramente mais distantes do que os da condição AF 0,1% (v/v) + 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$ . Dessa forma, a fase móvel aquosa escolhida foi AF 0,1% (v/v) + 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$ .

A condição final selecionada, portanto, foi: coluna Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ), a 24 °C, com sistema de solventes constituído de AF 0,1% (v/v) + 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$  (bomba A) e MeOH 100% (bomba B), com vazão de 1,3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , corrida de duração de 8 min e gradiente indo de 0 a 100% do conteúdo da bomba B entre 2 e 5 min. Contudo, ao se transferir o método para o sistema de HPLC Agilent 1200 Series, foi necessário introduzir algumas modificações, para que a pressão gerada não ultrapassasse os limites do equipamento. Dessa forma, o método passou a ser o descrito acima, mas a 30 °C e com vazão de 1,1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Com o aumento de temperatura, a viscosidade da fase móvel diminui, o que resulta em menor pressão no equipamento e também em melhora na difusão dentro do sistema cromatográfico, gerando picos mais estreitos – mas não necessariamente mais bem resolvidos, uma vez que o aumento de temperatura também costuma diminuir os tempos de retenção.

## 4.3.2 Desenvolvimento de métodos de MS

### 4.3.2.1 Método exploratório

A ideia central nesta etapa era desenvolver um método analítico que pudesse funcionar como diagnóstico, acusando as amostras (e os tempos de retenção) em que se poderia encontrar imino-MAAs. Esta informação obtida por espectrometria de massas, em conjunto com a informação cromatográfica, é tanto capaz de identificar MAAs conhecidas quanto apontar picos cromatográficos que representem MAAs de estrutura ainda não descrita.

Para a elaboração deste “método diagnóstico”, foi necessário buscar na literatura quais seriam os fragmentos mais comuns quando de sua fragmentação por ionização à pressão atmosférica. Segundo Whitehead e Hedges (2003), o fragmento mais comum seria o de  $m/z$  197, acompanhado de outros fragmentos que também seriam característicos de MAAs:  $m/z$  137, 168, 186 e 199. Outros autores, por estudos teóricos e práticos, propõem vias de fragmentação que levariam à geração dos íons de  $m/z$  137, 168, 186 e 197, mas apontam que o fragmento mais comum seria o de  $m/z$  186 (Cardozo et al., 2006; 2008; 2009).

Tendo em vista esta heterogeneidade nos resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa, optou-se por utilizar ambos os fragmentos,  $m/z$  186 e  $m/z$  197, para o diagnóstico de MAAs. O modo *Precursor Ion* faz com que o equipamento busque por todos os íons, dentro do intervalo de massas estabelecido (neste caso, de  $m/z$  200 a 400), que geram pelo menos um dos fragmentos em questão. Um resultado típico obtido por este método está exemplificado na Figura 4.17, na qual se vê o padrão Helioguard 365<sup>®</sup>, o qual foi a matéria-prima usada para o desenvolvimento do método.

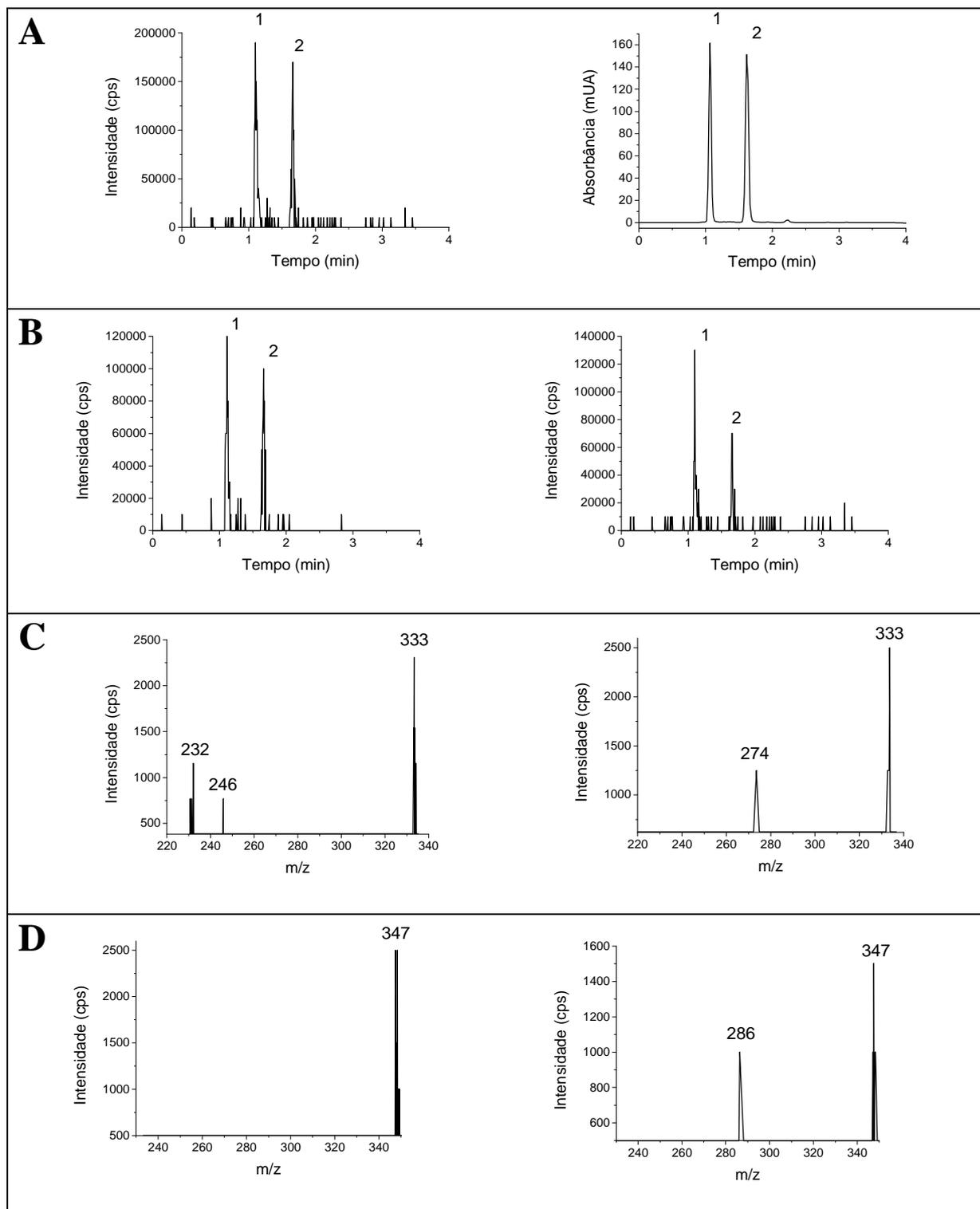


Figura 4.17: Resultados típicos do método exploratório desenvolvido. A: À esquerda, perfil geral da espectrometria de massas (TIC – Total Ion Count); à direita, perfil cromatográfico em 330 nm. B: À esquerda, perfil temporal da intensidade de íons precursores que geram o fragmento de  $m/z$  186; à direita, perfil temporal da intensidade de íons precursores que geram o fragmento de  $m/z$  197. C: Identificação de íons precursores no pico 1 (chinorina); à esquerda, íons geradores do pico de  $m/z$  186; à direita, à esquerda, íons geradores do pico de  $m/z$  197. D: Identificação de íons precursores no pico 2 (porphyra-334); à esquerda, íons geradores do sinal de  $m/z$  186; à direita, à esquerda, íons geradores do sinal de  $m/z$  197. Condições cromatográficas: coluna: Kinetex PFP (Phenomenex<sup>®</sup>, 100 x 4,6 mm, 2,6  $\mu$ m); solvente A: 0,1% AF em água (v/v) + 5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc; solvente B: 100% de MeOH; gradiente: de 0 a 100% de B de 2 a 5 min; tempo total: 8 min; vazão: 1,3 mL·min<sup>-1</sup>;  $\lambda$ : 330 nm.

Por estes resultados, percebe-se que o método é perfeitamente capaz de cumprir seu propósito: indicar quais picos do perfil cromatográfico possuem alguma imino-MAA. Dessa forma, a análise de MAAs passa a ser mais exata, uma vez que a análise por HPLC com leitura em detector de arranjo de diodos (DAD) pode trazer resultados dúbios e de difícil interpretação – especialmente porque pelo menos doze MAAs conhecidas possuem seu  $\lambda_{\text{máx}}$  entre 330 e 336 nm. O método criado parece ser aplicável a todo tipo de amostra que possua imino-MAAs.

Infelizmente, método semelhante não pôde ser desenvolvido para as oxo-MAAs, dado que não há informações suficientes disponíveis na literatura sobre sua fragmentação. Mesmo assim, com o avanço dos estudos sobre diversos aspectos desses compostos, acreditamos que seja possível construir um método similar, a ser empregado principalmente em fungos – nos quais só foram encontradas, por ora, oxo-MAAs (Sinha et al., 2007).

#### 4.3.2.2 Método quantitativo

Nesta etapa, buscamos desenvolver um método que atuasse tanto como um diagnóstico mais específico – buscando por massas específicas de MAAs e seus principais fragmentos gerados – quanto tornasse possível a quantificação dessas moléculas. A criação de tal método foi limitada pela quantidade de MAAs presentes em quantidade adequada nas amostras estudadas, o que acabou por excluir muitas das MAAs já conhecidas. No entanto, foi possível estabelecer condições analíticas para sete íons quasimoleculares  $[M+H]^+$ :  $m/z$  245,  $m/z$  285,  $m/z$  289,  $m/z$  303,  $m/z$  317,  $m/z$  333 e  $m/z$  347.

Dentre estes íons, alguns tiveram sua identidade resolvida imediatamente, por comparação com o padrão Helioguard<sup>®</sup> ou com dados da literatura. Outros necessitaram de estudos mais intensos, uma vez que existe mais de MAA conhecida com a mesma massa – caso dos íons de  $m/z$  289 e  $m/z$  303. Por último, há um íon que não correspondia a nenhuma

MAA identificada até então, o de  $m/z$  317. Na Tabela 4.2, pode-se ver a relação entre cada um dos íons quasimoleculares  $[M+H]^+$  e sua(s) MAA(s) correspondente(s).

Tabela 4.2: Atribuição dos íons quasimoleculares  $[M+H]^+$  estudados pelo método quantitativo.

Íon quasimolecular $[M+H]^+$ ( $m/z$ )	MAA(s)
245	Palitina
285	Usujireno/Paliteno (par <i>cis/trans</i> )
289	Asterina-330 $m/z$ 289
303	Palitinol Micosporina-2-glicina
317	desconhecida
333	Chinorina
347	Porphyra-334

Para se realizar a quantificação absoluta de algumas MAAs, foi necessário utilizar os padrões isolados de chinorina, palitina e porphyra-334 gerados por HPLC e cromatografia em coluna. Suas concentrações foram determinadas e foi construída uma curva de calibração para cada composto (Figura 4.18). A faixa de concentração dos isolados de chinorina e palitina ficou entre  $6,25 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , enquanto para a porphyra foi de  $6,25 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  a  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

A quantificação absoluta das outras MAAs, que não possuíam padrões isolados, não foi possível; nestes casos, foi possível apenas realizar uma quantificação relativa, de modo a comparar a quantidade de tais compostos em diferentes amostras.

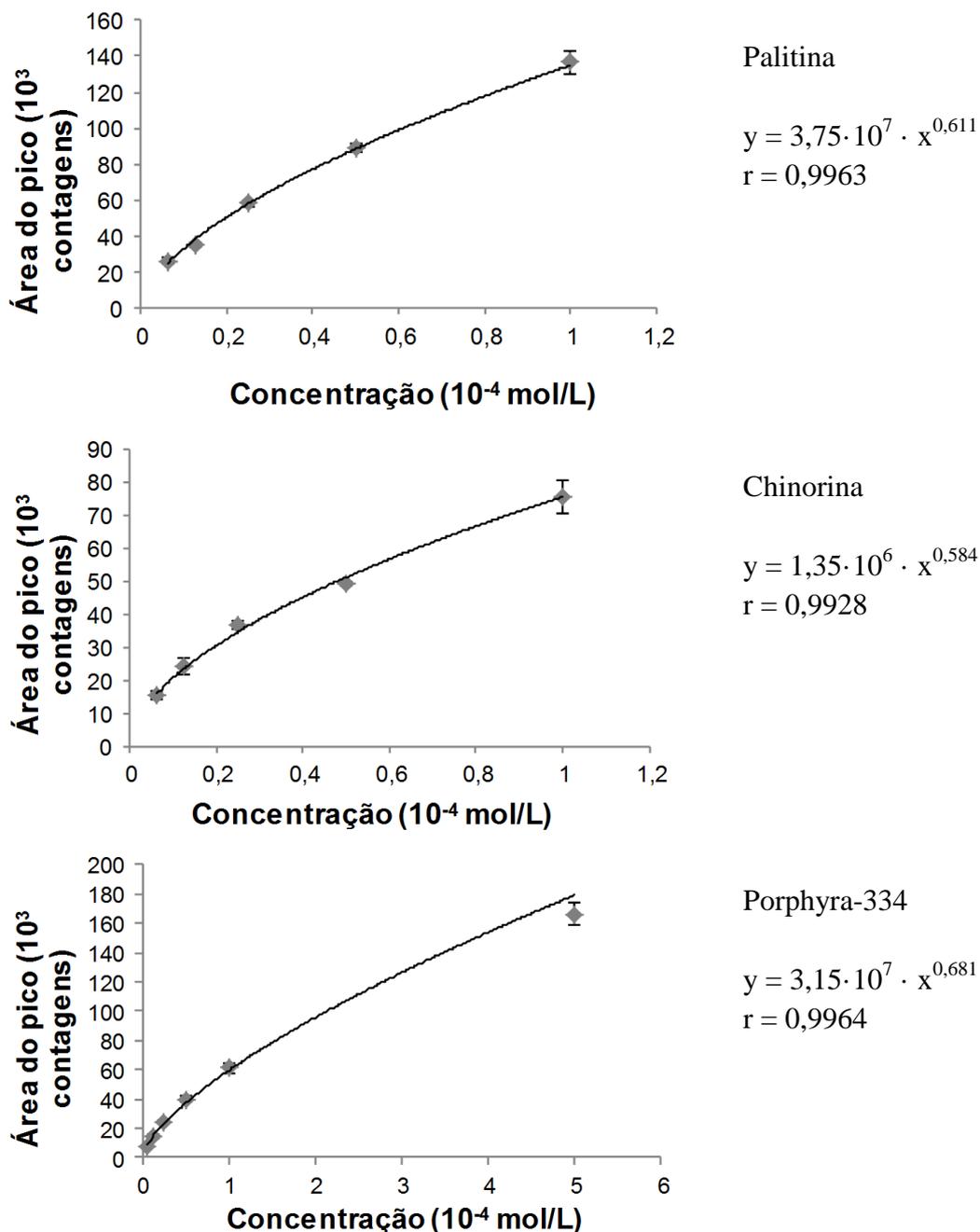


Figura 4.18: Curvas de calibração, por espectrometria de massas, dos isolados de palitina, chinorina e porphyra-334, respectivamente. As equações de cada curva e seus coeficientes de correlação estão descritos ao lado de cada gráfico.

Resultados obtidos pela utilização deste método podem ser vistos na Tabela 4.5, no item 4.4.2. Apesar da confecção das curvas de calibração, nem todos os conteúdos de chinorina, palitina e porphyra-334 puderam ser adequadamente quantificados. Isso se deve ao fato de alguns dos picos cromatográficos referentes a essas moléculas mostrarem-se muito

baixos, não chegando a apresentar razão sinal/ruído superior a 10 – valor preconizado pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) e pela ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ou Conferência Internacional sobre harmonização de requisitos técnicos para o registro de productos farmacêuticos para uso humano) para a quantificação de compostos (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, 2005). Neste caso, picos que apresentaram razão sinal/ruído entre 3 e 10 foram apenas identificados; e picos com tal razão inferior a 3 foram descartados. Tais análises foram feitas para todas as amostras, uma a uma.

Utilizando-se este método, a  $m/z$  289 foi encontrada em dois diferentes tempos de retenção, indicando dois compostos diferentes com a mesma massa molecular. Interessantemente, apenas uma amostra apresentou estes dois diferentes compostos, a alga *Ochtodes secundiramea* coletada na praia Ponta de Ubu em 2011. O composto mais frequente foi identificado como sendo a MAA asterina-330, já descrita como bastante comum em macroalgas e também como presente em alguns dos gêneros aqui estudados, nos quais também foi encontrada, como *Acanthophora*, *Hypnea*, *Gracilaria*, *Plocamium* e *Codium* (Sinha et al., 2007). A identidade da outra molécula não pôde ser confirmada – segundo a literatura, as outras duas MAAs que possuem massa molecular de 288 Da são a palitina-treonina e a micosporina-metilamina-serina, e o perfil de fragmentação gerado pelas amostras em MRM não é suficiente para dar certeza da identidade do composto. Deste modo, optou-se por manter esta molécula com a nomenclatura “ $m/z$  289”.

Outra  $m/z$  encontrada em mais de um tempo de retenção foi a  $m/z$  303. Neste caso, foi possível fragmentar os dois diferentes compostos (Figura 4.19) e tentar identificá-los. Dentre as MAAs já identificadas em organismos marinhos que apresentam íon quasimolecular de  $m/z$  303, tem-se o palitinol, a micosporina-2-glicina e a aplisiapalitina A. O palitinol é a MAA

mais estudada dentre as três e já foi encontrado em três gêneros presentes neste trabalho, a saber: *Acanthophora*, *Gracilaria* e *Porphyra* (gênero ao qual pertencia a espécie *Pyropia spiralis*) (Banaszak et al., 1998; Cardozo et al., 2011; Hoyer et al., 2001; Huovinen et al., 2004; Karsten et al., 1998c). Tendo em vista que quase todas as amostras testadas de tais gêneros continham o mesmo composto de  $m/z$  303, e que os fragmentos gerados por espectrometria de massas (Figura 4.19A) são condizentes com a literatura (Cardozo, 2007), uma das moléculas em questão foi identificada como sendo o palitinol. A outra molécula, por sua vez, gerou fragmentos (Figura 4.19B) que estão de acordo com o descrito na literatura para a micospolina-2-glicina (Cardozo, 2007). Dessa forma, foi possível identificar as MAAs palitinol e micospolina-2-glicina.

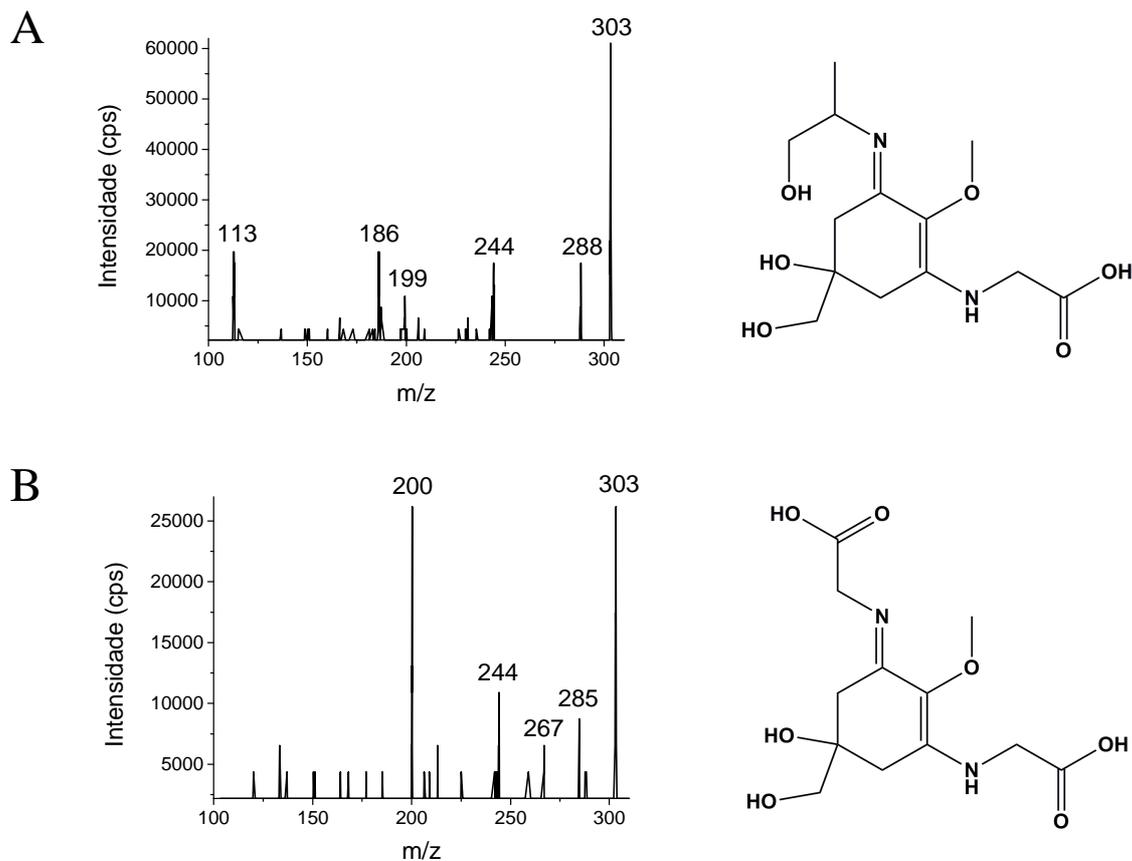


Figura 4.19: Espectros de fragmentação e fórmula estrutural de ambas as espécies de íon quasimolecular  $[M+H]^+$  de  $m/z$  303. A: Molécula identificada como palitinol. B: Molécula identificada como micospolina-2-glicina.

Este método se mostrou uma boa alternativa ao método convencional de análise de MAAs, realizado por HPLC com leitura em detector de arranjo de diodos. Inclusive, são raros os relatos de quantificação na literatura, e mais raros ainda os trabalhos que realizam quantificação absoluta das MAAs nas amostras estudadas – dentre estes últimos, pode-se destacar os trabalhos de Carreto et al. (2005) e Cardozo et al. (2011).

Com a elaboração de uma curva de calibração em um equipamento de espectrometria de massas, o método alia acuidade, precisão e sensibilidade de modo inédito. Isto diminui as incertezas geradas pelo método mais comum, que quantifica MAAs apenas fazendo um paralelo entre a absorvidade molar do composto em seu comprimento de onda de máxima absorção e a área do pico obtido para o mesmo, sem uma curva-padrão (Banaszak et al., 1998; Carefoot et al., 1998; de la Coba et al., 2009b; Hoyer et al., 2001; Hoyer et al., 2002; Karsten et al., 1998b; Korbee Peinado et al., 2004; Nahon et al., 2012). Desta forma, acreditamos que este método possa ser implantado como método de escolha para a análise de MAAs em laboratórios que tenham acesso a um equipamento de HPLC-MS. Além disso, o método apresenta grande potencial de expansão, uma vez que possibilita a inclusão de diversas outras MAAs.

Até onde vai nosso conhecimento, este é o primeiro método que se propõe a quantificar MAAs de forma absoluta por meio de HPLC-MS. As estruturas das MAAs conhecidas que puderam ser quantificadas podem ser vistas na Figura 4.20.

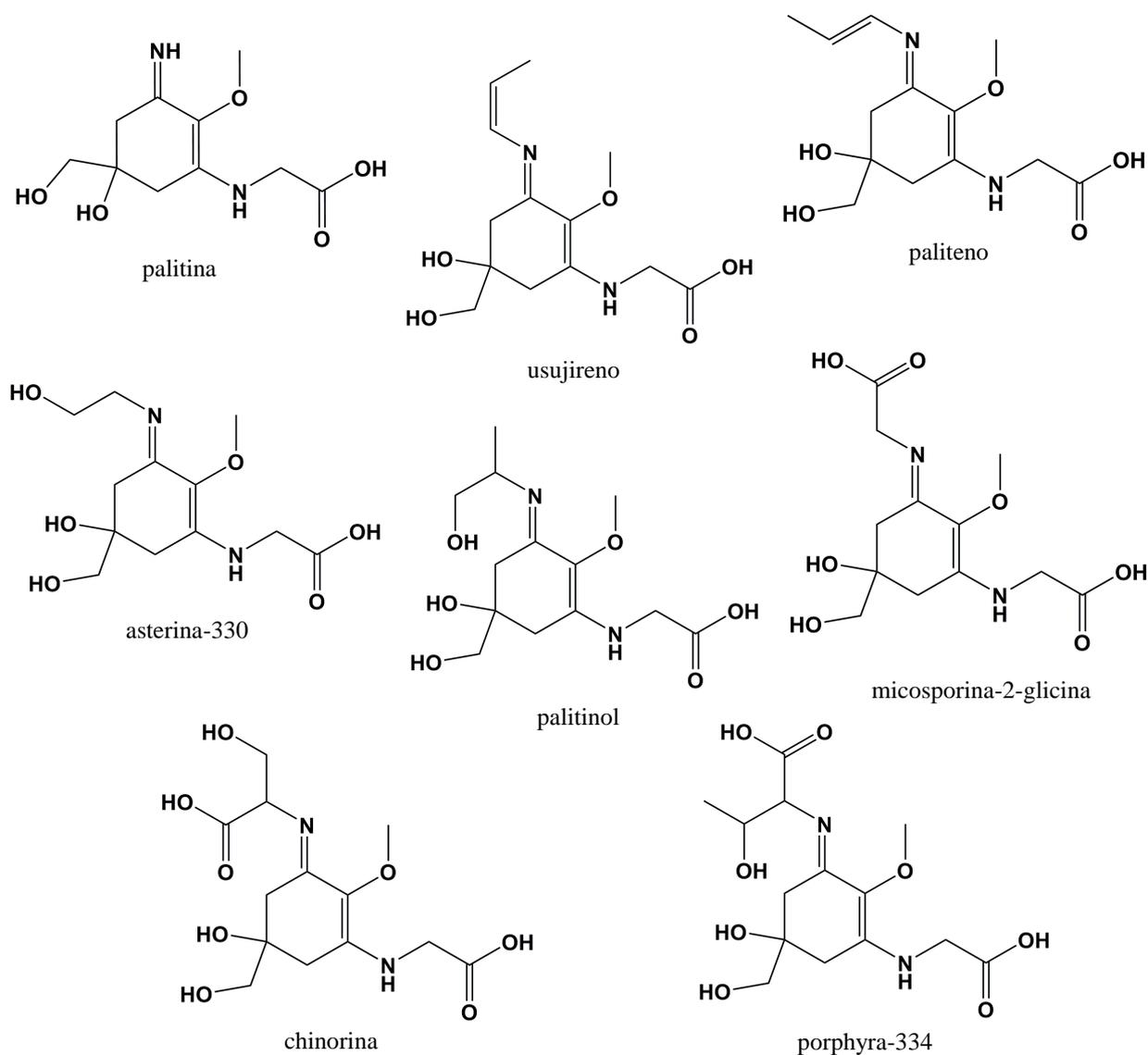


Figura 4.20: Estruturas das MAAs estudadas pelo método quantitativo.

## 4.4 Análise do perfil de MAAs das macroalgas

### 4.4.1 Distribuição dos táxons estudados

O Espírito Santo é tido como um estado muito rico para o estudo de flora ficológica, uma vez que é considerado uma zona de transição entre a região tropical (Norte/Nordeste) e a temperada quente (Sul/Sudeste), apresentando características peculiares e alta diversidade

específica – esta última associada à heterogeneidade de ambientes e às condições de temperatura. Com relação às macroalgas marinhas, o Espírito Santo é tido como o segundo estado com maior riqueza de táxons do Brasil, ficando atrás apenas do Rio de Janeiro (Bicudo e Menezes, 2010).

Dos 416 táxons de macroalgas descritos para o estado, 257 (62%) são de rodófitas, 97 (23%) de clorófitas e 62 (15%) de feófitas (Bicudo e Menezes, 2010). Comparando estes dados com os apresentados na Tabela 4.3 e na Figura 4.21, onde estão mostrados os números de amostras, táxons infragenéricos (espécies e variedades) e gêneros coletados no estado do Espírito Santo, é possível dizer que as algas vermelhas encontram-se sub-representadas em nosso espaço amostral, enquanto as algas verdes e pardas estão ligeiramente sobrerrepresentadas. Mesmo assim, o estudo não perde importância química, dado que a proposta é estudar o perfil de MAAs de diversas macroalgas brasileiras.

Tabela 4.3: Distribuição das amostras coletadas dentre os três grupos que abrigam macroalgas: Rhodophyta (algas vermelhas), Chlorophyta (algas verdes) ou Ochrophyta (algas pardas).

	<b>Rhodophyta</b>	<b>Chlorophyta</b>	<b>Ochrophyta</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Amostras</b>	33	22	12	67
<b>Táxons infragenéricos (espécies / variedades)</b>	24	13	8	45
<b>Gêneros</b>	18	8	6	32

De todas as praias visitadas (Bacutia, Castelhanos, Meaípe, dos Padres, Parati e Ponta de Ubu), a praia dos Castelhanos foi certamente a mais interessante para coletas na maré baixa. Uma característica marcante dessa praia é a presença de recifes rochosos de baixa inclinação e alta complexidade estrutural, que ficam em grande parte emersos durante o período de maré baixa. Neste período, formam-se poças de maré em depressões na superfície do recife, o que proporciona a ocorrência de diversas espécies, tanto de algas quanto de invertebrados sésseis, e facilita a coleta (Pimentel, 2012). Esta foi a única praia visitada tanto

na coleta de 2011 quanto na de 2014, gerando um volume de amostras coletadas que representa cerca de 60% do total e possui representantes de 73% das espécies estudadas.

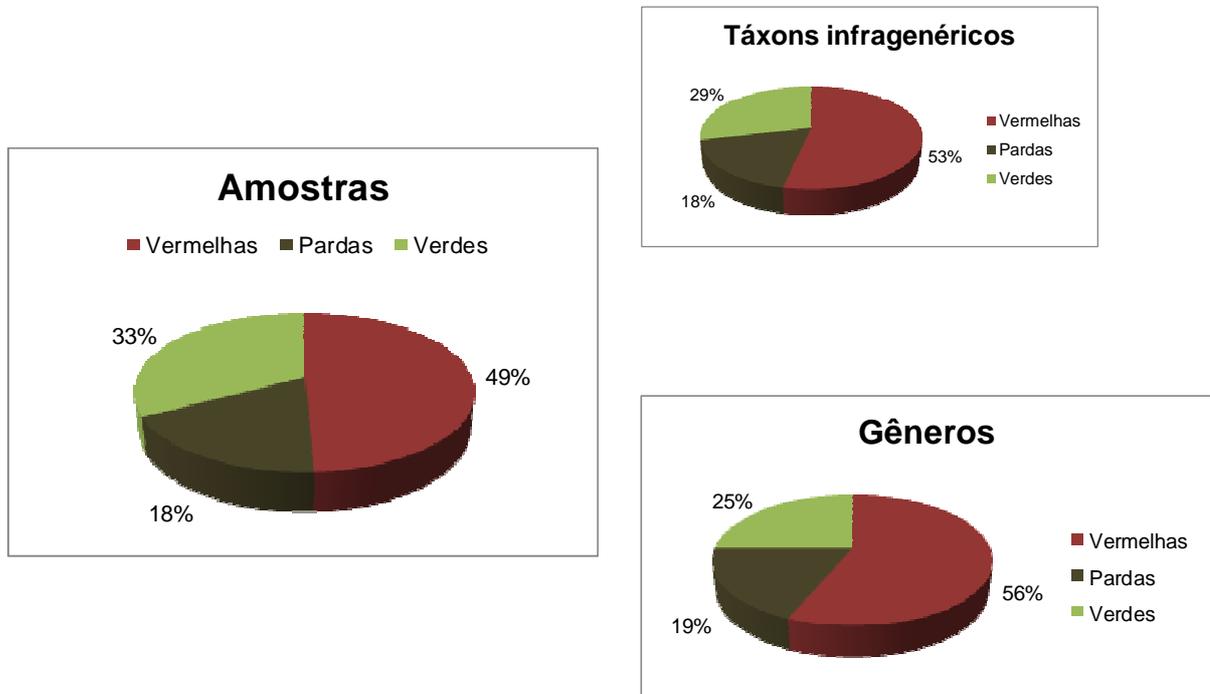


Figura 4.21: Proporção de algas vermelhas, pardas e verdes no número total de amostras coletadas, no número de espécies (e variedades) e no número de gêneros.

#### 4.4.2 Análise das MAAs

Uma vez que as análises das MAAs presentes nas macroalgas coletadas foram realizadas pelos dois métodos por HPLC-MS desenvolvidos, o exploratório e o quantitativo, foram obtidos dois tipos de resultados diferentes. O resultado gerado pelo método exploratório é qualitativo e, além disso, é tentativo: como foi desenvolvido para ser um “guia” da presença de MAAs em uma amostra, não pode ser tomado como resultado definitivo, correndo-se o risco de aceitar resultados falsos positivos e falsos negativos.

Na Tabela 4.4, tem-se os resultados obtidos com o método exploratório. Pode-se notar que ele fornece bastante informação, mas apenas de forma qualitativa – mesmo assim, foi capaz de identificar uma MAA de  $m/z$  até então não descrito na literatura, o  $m/z$  317. Para se obter mais informação, como a confirmação da identidade de cada pico cromatográfico e sua quantidade, passa a ser necessária a utilização do método quantitativo. Os resultados das análises realizadas por este método, para todas as algas estudadas, podem ser vistos na Tabela 4.5. No caso das MAAs quantificadas, os valores foram normalizados pelo peso fresco de alga utilizado para a extração. Em seguida, nas Figuras 4.22 a 4.26, tem-se a determinação semiquantitativa das MAAs asterina-330, palitinol, micosporina-2-glicina,  $m/z$  317 e do par *trans/cis* paliteno/usujireno.

Tabela 4.4: Análise qualitativa da presença de MAAs nas macroalgas do Espírito Santo utilizando o método exploratório.

(continua)

Espécie	Coleta	m/z						
		245	285	289	303	317	333	347
<b>Rhodophyta</b>								
<i>Acanthophora spicifera</i>	Castelhanos 15/05/2014	x	x	x	x		x	x
<i>Amansia multifida</i>	Castelhanos 15/05/2014	x	x	x	x			x
<i>Amphiroa fragilissima</i>	Meaípe 14/05/2014	x		x			x	
<i>Botryocladia occidentalis</i>	Castelhanos 27/09/2011							
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	Castelhanos 28/09/2011	x			x			x
<i>Ceratodictyon variabile</i>	Castelhanos 15/05/2014	x		x	x			
<i>Cryptonemia crenulata</i>	Castelhanos 28/09/2011							
<i>C. seminervis</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011							
<i>Dichotomaria marginata</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	x					x	x
<i>D. marginata</i>	Castelhanos 27/09/2011						x	
<i>D. marginata</i>	Meaípe 14/05/2014	x					x	
<i>D. marginata</i>	Castelhanos 15/05/2014	x					x	
<i>Gracilaria cervicornis</i>	Meaípe 14/05/2014	x		x	x		x	x
<i>G. cuneata</i>	Castelhanos 28/09/2011	x		x	x			x
<i>G. domingensis</i>	Castelhanos 28/09/2011	x		x	x		x	x
<i>Gracilaria cf. intermedia</i>	Castelhanos 15/05/2014							
<i>Gracilaria cf. mamillaris</i>	Castelhanos 15/05/2014	x		x			x	x
<i>G. tepocensis</i>	Castelhanos 28/09/2011	x		x	x		x	x
<i>Heterosiphonia gibbesii</i>	Castelhanos 27/09/2011						x	
<i>Hydropuntia caudata</i>	Castelhanos 15/05/2014	x	x	x	x		x	x
<i>Hypnea musciformis</i>	Castelhanos 15/05/2014	x		x	x		x	x
<i>Jania rubens</i>	Castelhanos 27/09/2011	x		x			x	x
<i>Ochtodes secundiramea</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	x						
<i>O. secundiramea</i>	Meaípe 14/05/2014	x		x	x	x		
<i>O. secundiramea</i>	Castelhanos 15/05/2014	x		x	x	x	x	
<i>Plocamium brasiliense</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	x					x	
<i>P. brasiliense</i>	Meaípe 14/05/2014	x		x			x	
<i>Pterocladia capillacea</i>	Padres 16/05/2014	x		x			x	
<i>Pyropia spiralis</i>	Parati 26/09/2011	x	x	x	x		x	x
<i>P. spiralis</i>	Bacutia 26/10/2011	x	x	x	x		x	x
<i>Tricleocarpa cylindrica</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011						x	x
<i>T. cylindrica</i>	Castelhanos 27/09/2011							
<i>T. cylindrica</i>	Castelhanos 15/05/2014	x					x	x
<b>Chlorophyta</b>								
<i>Anadyomene stellata</i>	Castelhanos 27/09/2011							
<i>Caulerpa cupressoides</i> var. <i>lycopodium</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011							
<i>C. cupressoides</i> var. <i>lycopodium</i>	Meaípe 14/05/2014							
<i>C. cupressoides</i> var. <i>lycopodium</i>	Castelhanos 15/05/2014							x
<i>C. prolifera</i>	Castelhanos 27/09/2011							
<i>C. racemosa</i> var. <i>macrophysa</i>	Castelhanos 28/09/2011							

Tabela 4.4: Análise qualitativa da presença de MAAs nas macroalgas do Espírito Santo utilizando o método exploratório.

(conclusão)

Espécie	Coleta	m/z						
		245	285	289	303	317	333	347
<i>C. racemosa</i> var. <i>occidentalis</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011							
<i>C. racemosa</i> var. <i>occidentalis</i>	Meaípe 14/05/2014							
<i>C. racemosa</i> var. <i>occidentalis</i>	Castelhanos 15/05/2014							
<i>C. sertularioides</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011							
<i>C. sertularioides</i>	Castelhanos 27/09/2011	x	x	x	x			x
<i>C. sertularioides</i>	Castelhanos 15/05/2014							
<i>Chaetomorpha antennina</i>	Parati 26/09/2011						x	
<i>Cladophora prolifera</i>	Castelhanos 27/09/2011							
<i>Codium decorticatum</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011							
<i>C. isthmocladum</i>	Meaípe 14/05/2014							
<i>C. isthmocladum</i>	Castelhanos 15/05/2014							
<i>Halimeda cuneata</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011							
<i>H. cuneata</i>	Castelhanos 27/09/2011							
<i>H. cuneata</i>	Castelhanos 15/05/2014							
<i>Udotea flabellum</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011							
<i>Ulva rigida</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011							
<b>Ochrophyta</b>								
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	Meaípe 14/05/2014							
<i>C. cervicornis</i>	Castelhanos 15/05/2014							
<i>Colpomenia sinuosa</i>	Meaípe 14/05/2014							
<i>Dictyopteris delicatula</i>	Meaípe 14/05/2014							
<i>D. delicatula</i>	Castelhanos 15/05/2014	x	x	x	x			x
<i>Padina gymnospora</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	x						
<i>P. gymnospora</i>	Castelhanos 28/09/2011							
<i>P. tetrastromatica</i>	Castelhanos 15/05/2014							
<i>Sargassum cymosum</i>	Castelhanos 15/05/2014							
<i>S. vulgare</i>	Meaípe 14/05/2014							
<i>Zonaria tournefortii</i>	Castelhanos 27/09/2011							
<i>Z. tournefortii</i>	Castelhanos 15/05/2014							

Tabela 4.5: Ocorrência de MAAs nas macroalgas coletadas no estado do Espírito Santo – Brasil.

(continua)

Espécie	Coleta		MAA ( $\mu\text{g/g}$ peso fresco de alga) (n = 3)								
			PT	CH	PR	PE/US	AS	m/z 289	m/z 317	PL	M2G
<b>Rhodophyta</b>											
<i>Acanthophora spicifera</i>	Castelhanos	15/05/2014	53 $\pm$ 1	0,89 $\pm$ 0,03	652 $\pm$ 56	sim*	sim	—	—	sim	—
<i>Amansia multifida</i>	Castelhanos	15/05/2014	39 $\pm$ 1	0,07 $\pm$ 0,02	17,1 $\pm$ 0,7	sim	sim	—	—	sim	—
<i>Amphiroa fragilissima</i>	Meaípe	14/05/2014	40 $\pm$ 5	65 $\pm$ 9	sim	—	sim	—	—	sim	—
<i>Botryocladia occidentalis</i>	Castelhanos	27/09/2011	sim	—	sim	sim	—	—	—	—	—
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	Castelhanos	28/09/2011	0,33 $\pm$ 0,03	1,1 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,1	—	sim	—	—	sim	—
<i>Ceratodictyon variabile</i>	Castelhanos	15/05/2014	54 $\pm$ 6	0,07 $\pm$ 0,03	—	—	sim	—	—	—	sim
<i>Cryptonemia crenulata</i>	Castelhanos	28/09/2011	sim	—	0,052 $\pm$ 0,009	sim	—	—	—	sim	—
<i>C. seminervis</i>	Ponta de Ubu	26/09/2011	0,033 $\pm$ 0,004	sim	0,50 $\pm$ 0,05	sim	sim	—	—	sim	—
<i>Dichotomaria marginata</i>	Ponta de Ubu	26/09/2011	0,09 $\pm$ 0,02	12 $\pm$ 1	2,1 $\pm$ 0,2	—	sim	—	—	sim	—
<i>D. marginata</i>	Castelhanos	27/09/2011	sim	10 $\pm$ 1	0,12 $\pm$ 0,02	—	sim	—	—	—	—
<i>D. marginata</i>	Meaípe	14/05/2014	sim	17,3 $\pm$ 0,3	0,338 $\pm$ 0,006	—	sim	—	—	—	—
<i>D. marginata</i>	Castelhanos	15/05/2014	sim	23 $\pm$ 3	0,38 $\pm$ 0,05	—	sim	—	—	—	—
<i>Gracilaria cervicornis</i>	Meaípe	14/05/2014	0,18 $\pm$ 0,03	5 $\pm$ 2	106 $\pm$ 10	—	sim	—	—	sim	—
<i>G. cuneata</i>	Castelhanos	28/09/2011	2,71 $\pm$ 0,05	sim	1,3 $\pm$ 0,1	—	sim	—	—	sim	—
<i>G. domingensis</i>	Castelhanos	28/09/2011	6,1 $\pm$ 0,3	23 $\pm$ 3	67 $\pm$ 2	sim	sim	—	—	sim	—
<i>Gracilaria cf. intermedia</i>	Castelhanos	15/05/2014	—	0,005 $\pm$ 0,006	sim	—	—	—	—	—	sim
<i>Gracilaria cf. mamillaris</i>	Castelhanos	15/05/2014	0,15 $\pm$ 0,03	178 $\pm$ 7	18,2 $\pm$ 0,7	—	sim	—	—	—	—
<i>G. tepocensis</i>	Castelhanos	28/09/2011	6,5 $\pm$ 0,2	24 $\pm$ 5	45,7 $\pm$ 0,7	—	sim	—	—	sim	—
<i>Heterosiphonia gibbesii</i>	Castelhanos	27/09/2011	sim	13 $\pm$ 2	0,13 $\pm$ 0,02	—	sim	—	—	—	sim
<i>Hydropuntia caudata</i>	Castelhanos	15/05/2014	182 $\pm$ 7	134 $\pm$ 12	229 $\pm$ 11	sim	sim	—	—	sim	—
<i>Hypnea musciformis</i>	Castelhanos	15/05/2014	63 $\pm$ 7	1757 $\pm$ 97	5,1 $\pm$ 0,3	—	sim	—	—	sim	—
<i>Jania rubens</i>	Castelhanos	27/09/2011	0,010 $\pm$ 0,002	15,3 $\pm$ 0,7	12,2 $\pm$ 0,8	—	sim	—	—	—	—
<i>Ochtodes secundiramea</i>	Ponta de Ubu	26/09/2011	0,24 $\pm$ 0,03	sim	sim	—	sim	sim	—	—	sim
<i>O. secundiramea</i>	Meaípe	14/05/2014	0,54 $\pm$ 0,04	0,2 $\pm$ 0,1	—	—	—	sim	sim	—	sim

Tabela 4.5: Ocorrência de MAAs nas macroalgas coletadas no estado do Espírito Santo – Brasil.

(continuação)

Espécie	Coleta	MAA (µg/g peso fresco de alga) (n = 3)									
		PT	CH	PR	PE/US	AS	m/z 289	m/z 317	PL	M2G	
<i>O. secundiramea</i>	Castelhanos 15/05/2014	0,52 ± 0,06	0,17 ± 0,04	—	—	—	sim	sim	—	sim	
<i>Plocamium brasiliense</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	0,09 ± 0,01	34,6 ± 0,8	0,11 ± 0,02	—	—	—	—	—	sim	
<i>P. brasiliense</i>	Meaípe 14/05/2014	5 ± 1	371 ± 100	0,15 ± 0,04	—	sim	—	—	—	sim	
<i>Pterocladia capillacea</i>	Padres 16/05/2014	0,10 ± 0,01	363 ± 118	0,24 ± 0,02	—	sim	—	—	—	—	
<i>Pyropia spiralis</i>	Parati 26/09/2011	4,2 ± 0,2	15 ± 2	574 ± 19	sim	sim	—	—	sim	—	
<i>P. spiralis</i>	Bacutia 26/10/2011	2,1 ± 0,2	1236 ± 147	694 ± 71	sim	sim	—	—	sim	—	
<i>Tricleocarpa cylindrica</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	sim	21 ± 1	0,67 ± 0,07	—	sim	—	—	—	—	
<i>T. cylindrica</i>	Castelhanos 27/09/2011	—	—	sim	—	—	—	—	—	sim	
<i>T. cylindrica</i>	Castelhanos 15/05/2014	sim	52 ± 3	7 ± 1	—	sim	—	—	—	—	
Chlorophyta											
<i>Anadyomene stellata</i>	Castelhanos 27/09/2011	sim	sim	sim	sim	—	—	—	—	—	
<i>Caulerpa cupressoides</i> var. <i>lycopodium</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	sim	—	0,09 ± 0,01	—	—	—	—	—	—	
<i>C. cupressoides</i> var. <i>lycopodium</i>	Meaípe 14/05/2014	sim	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>C. cupressoides</i> var. <i>lycopodium</i>	Castelhanos 15/05/2014	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>C. prolifera</i>	Castelhanos 27/09/2011	0,0008 ± 0,0003	—	0,03 ± 0,02	—	—	—	—	—	—	
<i>C. racemosa</i> var. <i>macrophysa</i>	Castelhanos 28/09/2011	sim	—	sim	sim	sim	—	—	—	—	
<i>C. racemosa</i> var. <i>occidentalis</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	—	—	sim	—	—	—	—	—	—	
<i>C. racemosa</i> var. <i>occidentalis</i>	Meaípe 14/05/2014	sim	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>C. racemosa</i> var. <i>occidentalis</i>	Castelhanos 15/05/2014	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>C. sertularioides</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	sim	sim	0,25 ± 0,05	—	sim	—	—	—	—	
<i>C. sertularioides</i>	Castelhanos 27/09/2011	0,065 ± 0,007	0,21 ± 0,05	21 ± 2	sim	sim	—	—	sim	—	
<i>C. sertularioides</i>	Castelhanos 15/05/2014	sim	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Chaetomorpha antennina</i>	Parati 26/09/2011	0,0019 ± 0,0005	sim	0,48 ± 0,03	—	sim	—	—	sim	—	
<i>Cladophora prolifera</i>	Castelhanos 27/09/2011	0,005 ± 0,001	sim	0,39 ± 0,04	—	sim	—	—	sim	—	
<i>Codium decorticatum</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	sim	—	sim	—	—	—	—	—	—	
<i>C. isthmocladum</i>	Meaípe 14/05/2014	sim	—	sim	—	sim	—	—	—	—	

Tabela 4.5: Ocorrência de MAAs nas macroalgas coletadas no estado do Espírito Santo – Brasil.

(conclusão)

Espécie	Coleta	PT	CH	MAA ( $\mu\text{g/g}$ peso fresco de alga) (n = 3)							
				PR	PE/US	AS	m/z 289	m/z 317	PL	M2G	
<i>C. isthmocladum</i>	Castelhanos 15/05/2014	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Halimeda cuneata</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	sim	sim	$0,029 \pm 0,007$	—	—	—	—	—	—	—
<i>H. cuneata</i>	Castelhanos 27/09/2011	sim	—	sim	—	—	—	—	—	—	—
<i>H. cuneata</i>	Castelhanos 15/05/2014	—	—	sim	—	—	—	—	—	—	—
<i>Udotea flabellum</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	—	—	$0,14 \pm 0,06$	—	sim	—	—	—	sim	—
<i>Ulva rigida</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	sim	—	$0,25 \pm 0,04$	—	sim	—	—	—	—	—
<b>Ochrophyta</b>											
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	Meaípe 14/05/2014	$0,0068 \pm 0,0001$	—	—	—	—	—	—	—	sim	—
<i>C. cervicornis</i>	Castelhanos 15/05/2014	sim	—	—	—	sim	—	—	—	sim	—
<i>Colpomenia sinuosa</i>	Meaípe 14/05/2014	$0,030 \pm 0,002$	sim	sim	sim	—	—	—	—	—	—
<i>Dictyopteris delicatula</i>	Meaípe 14/05/2014	$0,094 \pm 0,003$	sim	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>D. delicatula</i>	Castelhanos 15/05/2014	$3,2 \pm 0,2$	sim	$8 \pm 1$	sim	sim	—	—	—	sim	—
<i>Padina gymnospora</i>	Ponta de Ubu 26/09/2011	$0,004 \pm 0,002$	—	$0,21 \pm 0,06$	sim	sim	—	—	—	—	—
<i>P. gymnospora</i>	Castelhanos 28/09/2011	sim	sim	sim	sim	sim	—	—	—	sim	—
<i>P. tetrastromatica</i>	Castelhanos 15/05/2014	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Sargassum cymosum</i>	Castelhanos 15/05/2014	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. vulgare</i>	Meaípe 14/05/2014	sim	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Zonaria tournefortii</i>	Castelhanos 27/09/2011	sim	—	sim	sim	—	—	—	—	—	—
<i>Z. tournefortii</i>	Castelhanos 15/05/2014	—	—	—	—	sim	sim	—	—	—	—

PT, palitina; CH, chinorina, PR, porphyra-334; PE/US, paliteno/usujireno (par *trans/cis*); AS, asterina-330; PL, palitinol; M2G, micosporina-2-glicina.

\*sim: MAA encontrada na amostra, mas não passível de quantificação.

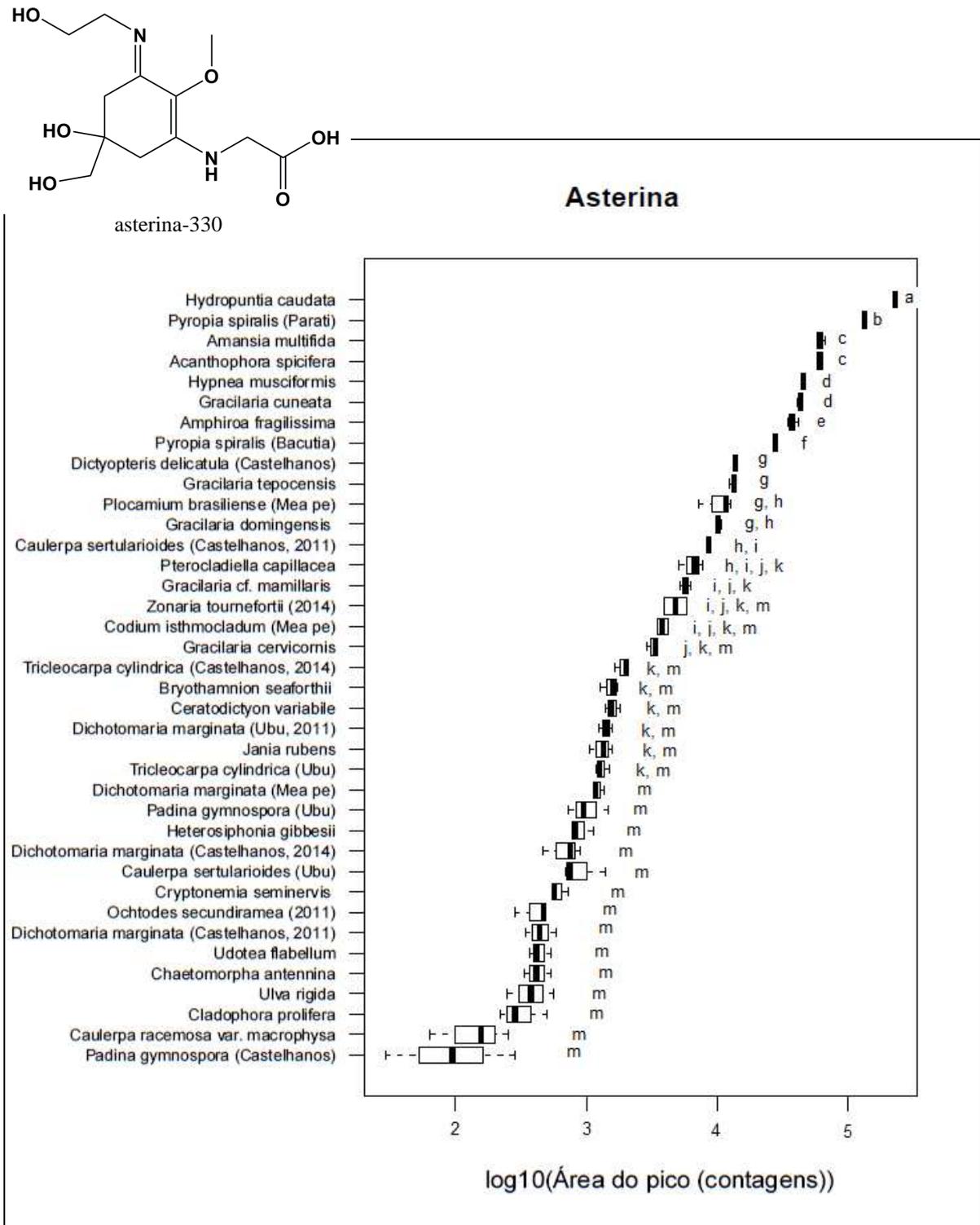


Figura 4.22: Quantificação relativa da MAA asterina-330 nas amostras em que pôde ser identificada. As médias apresentadas pelas algas de cada grupo, indicado pelas letras a/b/c/..., não podem ser consideradas estatisticamente diferentes (teste Tukey).

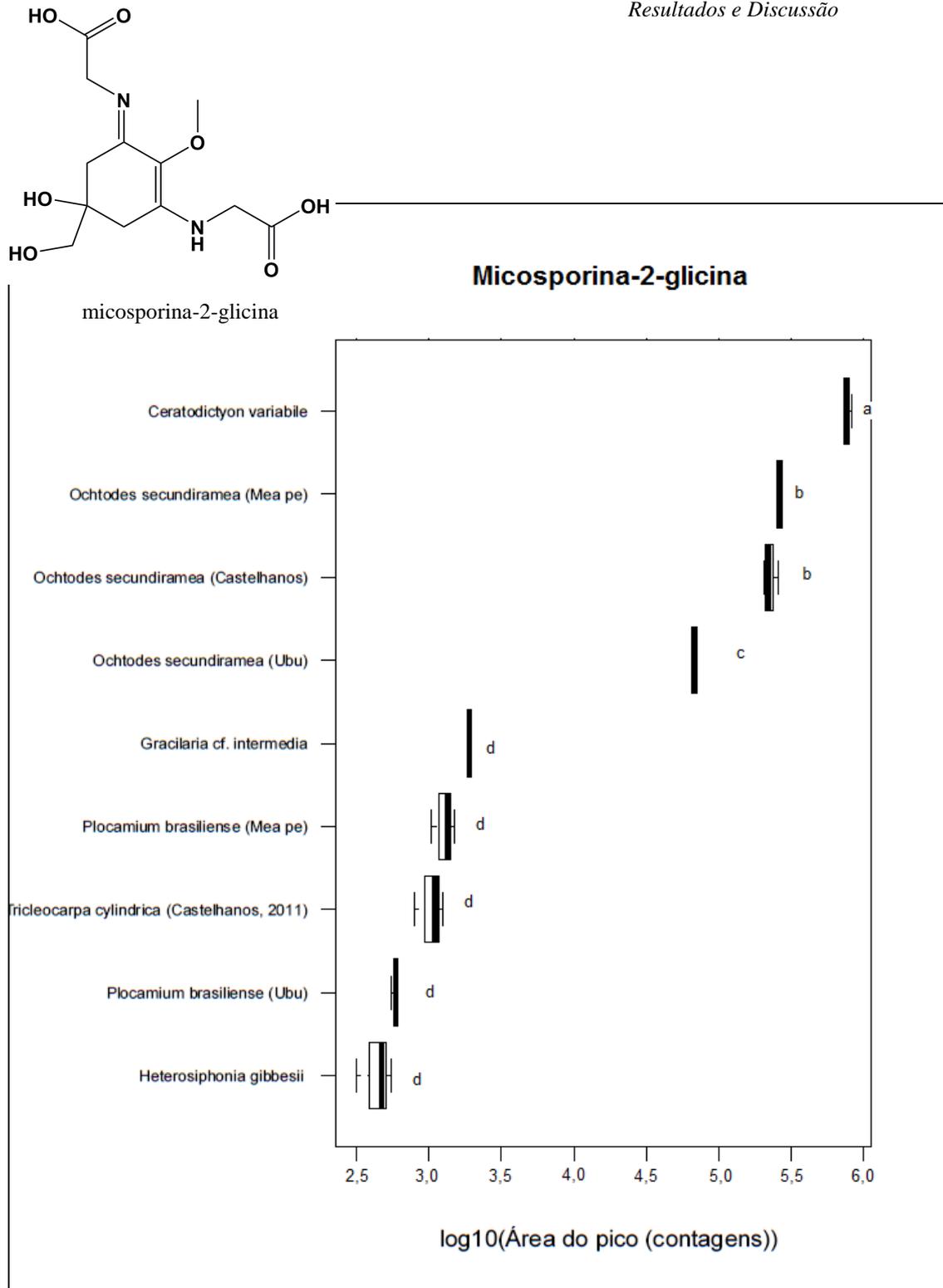


Figura 4.23: Quantificação relativa da MAA micosporina-2-glicina nas amostras em que pôde ser identificada. As médias apresentadas pelas algas de cada grupo, indicado pelas letras a/b/c/..., não podem ser consideradas estatisticamente diferentes (teste Tukey).

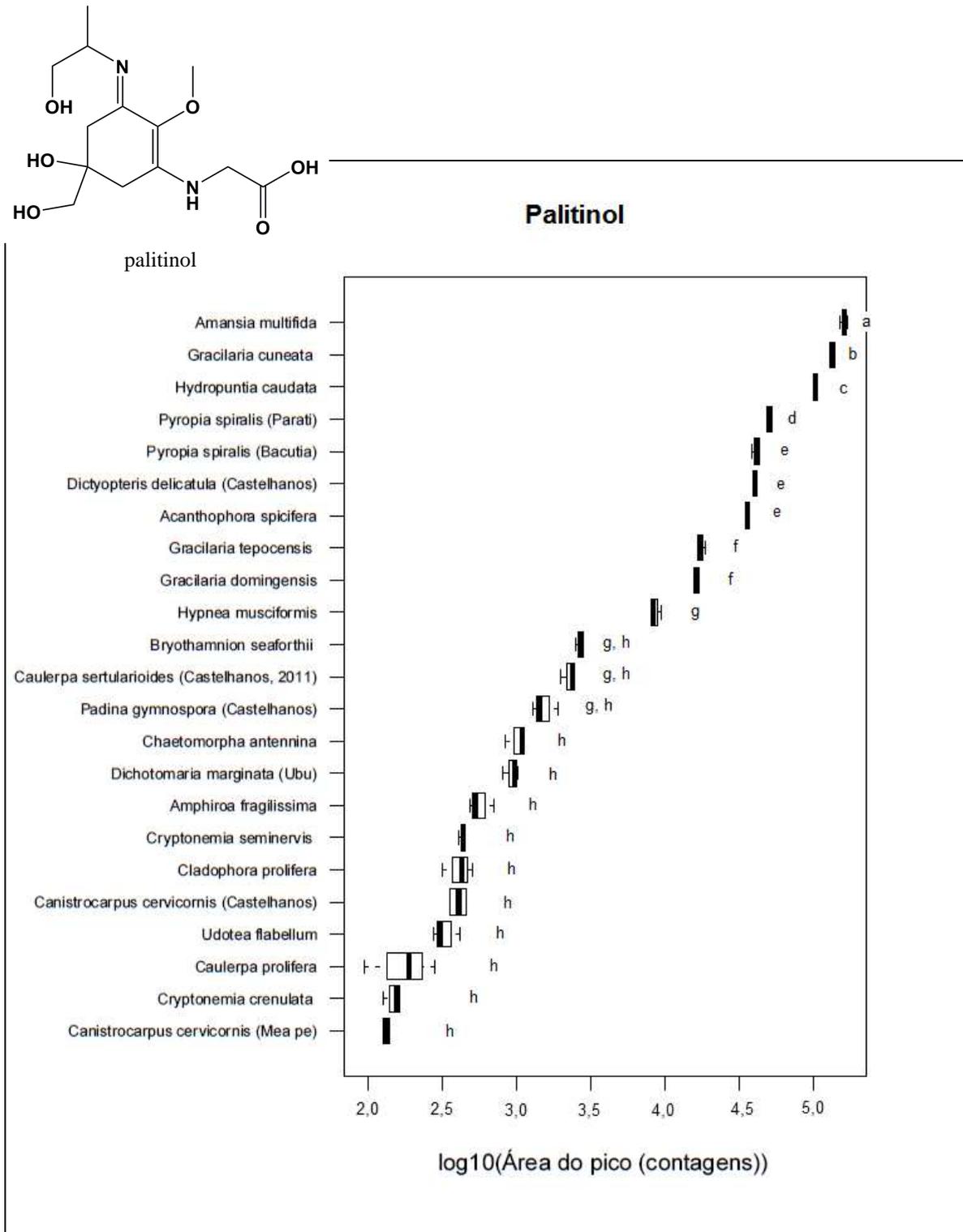


Figura 4.24: Quantificação relativa da MAA palitinol nas amostras em que pôde ser identificada. As médias apresentadas pelas algas de cada grupo, indicado pelas letras a/b/c/..., não podem ser consideradas estatisticamente diferentes (teste Tukey).

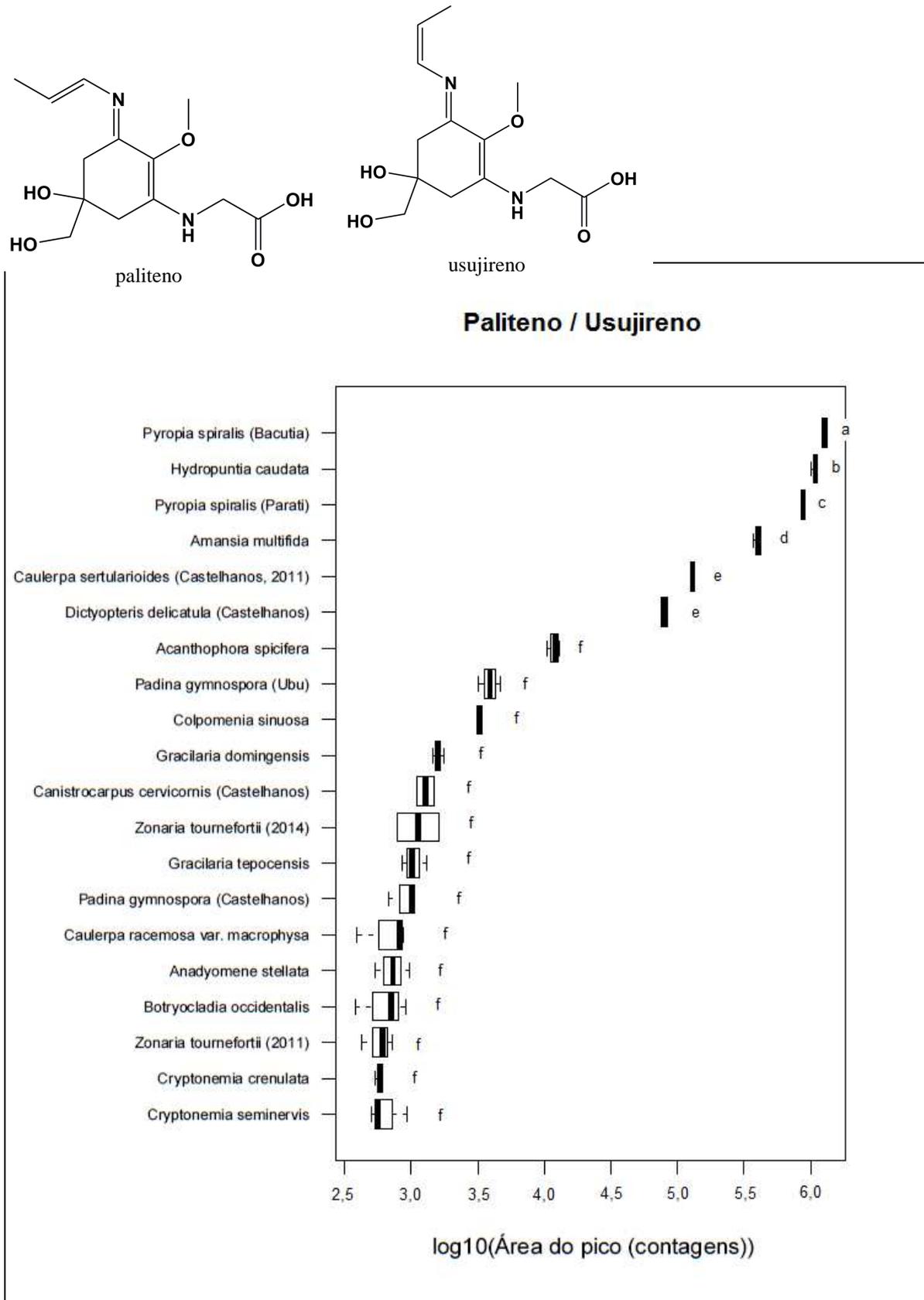


Figura 4.25: Quantificação relativa do par *trans/cis* paliteno/usujireno nas amostras em que pôde ser identificado. As médias apresentadas pelas algas de cada grupo, indicado pelas letras a/b/c/..., não podem ser consideradas estatisticamente diferentes (teste Tukey).

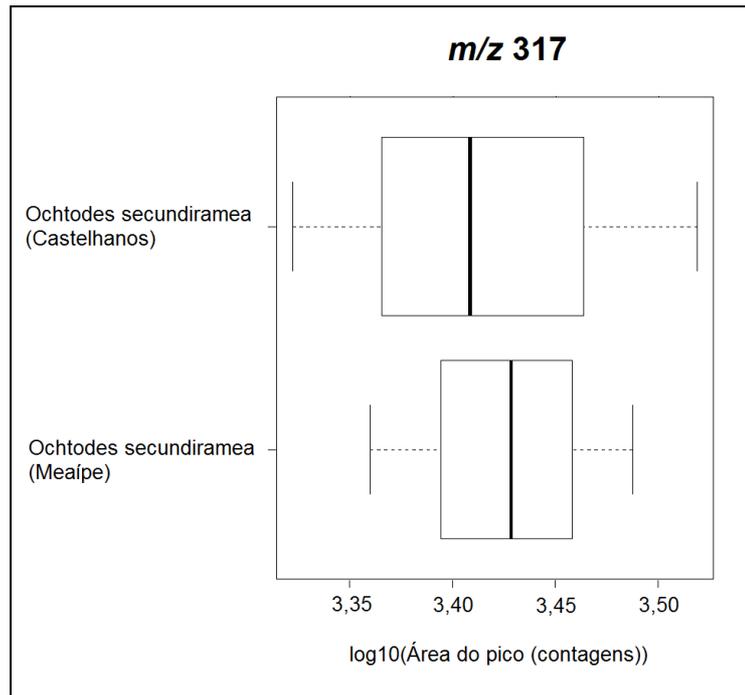


Figura 4.26: Quantificação relativa da MAA de m/z 317 nas amostras em que pôde ser identificada. As médias apresentadas pelas algas de cada grupo, indicado pelas letras a/b/c/..., não podem ser consideradas estatisticamente diferentes (teste Tukey).

O perfil de distribuição de MAAs nas amostras – com concentrações e variedade maiores em algas vermelhas, menores em algas pardas e ainda menores em algas verdes – segue o mesmo perfil de distribuição de metabólitos secundários de forma geral. Com aproximadamente 1500 produtos naturais descritos, as rodófitas superam as clorófitas e feófitas (com cerca de 1150 e 300 produtos naturais descritos, respectivamente) tanto em abundância quanto em diversidade (Maschek e Baker, 2008).

Uma vez que organismos fotossintetizantes aquáticos estão expostos às radiações visíveis e RUV do espectro em seu *habitat* natural – inclusive debaixo da superfície do mar, onde os efeitos biológicos da RUV estendem-se por pelo menos 20 m em águas bem transparentes (Jerlov, 1950) –, eles desenvolveram mecanismos de defesa contra os efeitos maléficis destas radiações. Movimentação vertical na coluna de água (Smith et al., 1992), redução do hábito do talo e/ou formação de tapetes (“*turf*”) (Barnes et al., 2014), reparo no

DNA por fotorreativação e excisão (Britt, 1995) e acúmulo de antioxidantes – enzimáticos ou não – (Dunlap e Shick, 1998) e de compostos que absorvem RUV são alguns exemplos destes mecanismos (Häder et al., 2015).

O acúmulo de compostos que absorvem RUV é tido como a primeira linha de defesa da célula, uma vez que impede que a RUV penetre no meio celular e cause danos, direta ou indiretamente. Além disso, o uso desta “proteção passiva” por um organismo pode ter também vantagens energéticas, dado que processos de fuga e reparo passam a ser menos requisitados (Cockell e Knowland, 1999). Assim, seria esperado encontrar substâncias com esta propriedade em todos os organismos estudados neste trabalho. Contudo, diversas algas não apresentaram quantidades detectáveis de MAAs, indicando que provavelmente possuem outras classes de compostos que cumprem a mesma função.

Nas algas pardas, o papel fotoprotetor parece ser desempenhado primariamente pelos florotaninos, em vez de pelas MAAs. Florotaninos são compostos fenólicos encontrados exclusivamente em feófitas, nas quais atingem de 10% a 20% do peso seco (Maschek e Baker, 2008). Por estarem localizadas na periferia de células e tecidos, e por possuírem máximos de absorbância entre 200 e 300 nm (abrangendo o UV-C e parte do UV-B), sugeriu-se que tenham função fotoprotetora nos organismos que as possuem – fato que já foi evidenciado por Pavia et al. (1997), Swanson e Druehl (2002) e Gómez e Huovinen (2010).

Nas algas verdes, não se sabe quais compostos cumpririam esta função, se é que realmente há algum – afinal, outras estratégias de defesa, como o reparo de DNA e o acúmulo de compostos antioxidantes, podem ser suficientes para a mitigação dos efeitos danosos da RUV. Todas as divisões de macroalgas possuem compostos fenólicos (Clifford, 2000); logo, esta pode ser uma alternativa às MAAs também em clorófitas. Sabe-se que cumarinas (também compostos fenólicos) são produzidas por alguns gêneros de macroalgas verdes, como *Caulerpa* e *Dasycladus* (García-Sánchez et al., 2012; Pérez-Rodríguez et al., 1998);

além disso, a camada de tri-hidroxycumarina próxima à parede celular de *Dasycladus vermicularis* mostrou-se capaz de absorver 88% da radiação incidente a 346 nm (Pérez-Rodríguez et al., 2003), e esta mesma alga é capaz de excretar tais compostos, provendo proteção contra RUV a si mesma e a outras espécies ao redor (Pérez-Rodríguez et al., 2003; Pérez-Rodríguez et al., 2001).

Neste estudo, optamos por utilizar biomassa fresca para a extração das MAAs, o que dificulta a comparação dos dados obtidos com dados da literatura, que frequentemente se utiliza de biomassa seca. Entretanto, adotando-se o teor de água das macroalgas como sendo aproximadamente 80% (Arasaki e Arasaki, 1983), é possível fazer comparações aproximadas com o que já se sabe sobre algumas espécies.

*Acanthophora spicifera*, por exemplo, apresenta quantidades de chinorina, palitina e porphyra-334 significativamente superiores às encontradas na literatura para a mesma espécie, enquanto *Hypnea musciformis* apresenta quantidades superiores às encontradas em outra espécie do mesmo gênero (Karsten et al., 1998c). As duas amostras de *Plocamium brasiliense* possuem porphyra-334 em maior concentração do que a descrita, enquanto as concentrações de chinorina e palitina caem dentro do intervalo já referido para o mesmo gênero, porém em ambiente polar (Hoyer et al., 2001). *Jania rubens*, por sua vez, apresenta níveis de chinorina, palitina e porphyra-334 menores que os encontrados na literatura para a mesma espécie em regiões temperadas (Karsten et al., 1998b); enquanto as espécies de *Gracilaria*, de maneira geral, apresentam níveis menores que a literatura – mas há também níveis dentro do intervalo já descrito e até níveis maiores, como na caso da chinorina de *Gracilaria* cf. *mamillaris* (Karsten et al., 1998c). As amostras de *Pyropia spiralis* também apresentam comportamento variável em relação ao que a literatura descreve para o gênero *Porphyra*: apenas os níveis de porphyra-334 de ambas as amostras estão dentro do intervalo descrito, enquanto o nível de chinorina da amostra de Parati é menor e o da amostra de Bacutia é maior que o descrito na

literatura, e o nível de palitina da amostra de Bacutia é menor que a literatura e o da amostra de Parati está dentro do intervalo descrito (de la Coba et al., 2009b; Figueroa et al., 2003; Hoyer et al., 2001; Hoyer et al., 2002; Korbee et al., 2005a). A comparação das amostras de *Pyropia spiralis* com o gênero *Porphyra* decorre do fato de que diversas espécies anteriormente identificadas como pertencentes ao gênero *Porphyra* passaram recentemente a ser descritas como pertencentes ao gênero *Pyropia* (Sutherland et al., 2011).

Quanto à variedade, *Acanthophora spicifera*, *Amphiroa fragilissima*, *Anadyomene stellata*, *Chaetomorpha antennina*, *Cladophora prolifera*, *Colpomenia sinuosa*, *Jania rubens*, *Hydropuntia caudata* e *Pterocladia capillacea* apresentam número de MAAs superior ao encontrado na literatura para os gêneros em questão (Figueroa et al., 2012; Gröniger et al., 2000; Karsten et al., 1998b; Karsten et al., 1998c; Lee e Shiu, 2009; Nahon et al., 2012), enquanto *Canistrocarpus cervicornis*, *Halimeda cuneata*, *Hypnea musciformis*, *Plocamium brasiliense*, *Pyropia spiralis* e as espécies do gênero *Gracilaria* e *Padina* possuem variedade semelhante à descrita para outras espécies dos mesmos gêneros (Banaszak et al., 1998; Barufi et al., 2011; Hoyer et al., 2001; Huovinen et al., 2004; Karsten et al., 1998b; Karsten et al., 1998c; Nakamura et al., 1982; Sinha et al., 2000). No caso das espécies *Gracilaria domingensis* e *Ulva rigida*, ambas apresentam variedade superior à descrita para a mesma espécie (Cardozo et al., 2011; Banaszak et al., 1998), mas dentro do intervalo descrito para o gênero (Barufi et al., 2011; Figueroa et al., 2014; Karsten et al., 1998c; Sinha et al., 2000). Ambas as espécies do gênero *Sargassum* estudadas apresentam variedade semelhante a outras espécies do mesmo gênero em ambiente polar (Karsten et al., 1998b), mas inferior à registrada em ambiente tropical (Karsten et al., 1998c); e *Codium* foi o único gênero que apresentou variedade nitidamente inferior em relação à literatura (Banaszak et al., 1998; Karsten et al., 1998b; Nakamura et al., 1982).

A alga com maior concentração de palitina é *Hydropuntia caudata*, seguida de *Acanthophora spicifera*, *Ceratodictyon variabile* e *Hypnea musciformis*; de chinorina, *H. musciformis*, seguida de *Pyropia spiralis* (Bacutia); e de porphyra-334, *P. spiralis* (Bacutia), seguida de *A. spicifera* e *P. spiralis* (Parati). Em relação às MAAs que não tiveram sua quantidade absoluta determinada (Figuras 4.22 a 4.26), *P. spiralis* (Bacutia) é a que possui maior concentração do par *cis/trans* usujireno/palitenos, seguida de *H. caudata*; a qual, por sua vez, possui a maior concentração de asterina-330, seguida de *P. spiralis* (Parati); o íon de m/z 317 é encontrado nas mesmas concentrações em ambas as amostras que o possuem; a micosporina-2-glicina está em maior concentração na *C. variabile*, seguida por *Ochtodes secundiramea* (amostras de Castelhanos e Meaípe); e *A. multifida*, *Gracilaria cuneata* e *H. caudata* apresentam os maiores níveis de palitinol, seguidas de *P. spiralis* (amostras de Bacutia e Parati), *Dictyopteris delicatula* (Castelhanos) e *A. spicifera*. Nota-se que *A. spicifera*, *H. caudata* e *P. spiralis* (amostras de Bacutia e Parati) são os grandes destaques em termos de quantidade.

Não foi possível encontrar nenhuma MAA em *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium*, *Caulerpa racemosa* var. *occidentalis*, *Codium isthmocladum*, *Padina tetrastromatica* e *Sargassum cymosum* (sendo todas amostras coletadas na praia de Castelhanos em 2014). Em comparação, as algas que apresentaram maior diversidade de MAAs foram *Acanthophora spicifera*, *Amansia multifida*, *Caulerpa sertularioides* (Castelhanos, 2011), *Cryptonemia seminervis*, *Dictyopteris delicatula* (Castelhanos), *Gracilaria domingensis*, *Hydropuntia caudata*, *Ochtodes secundiramea* (Ubu), *Padina gymnospora* (Castelhanos) e *Pyropia spiralis* (amostras de Parati e Bacutia). Como esperado, a quantidade absoluta é, em geral, menor nas feófitas (*D. delicatula* e *P. gymnospora*) e na clorófitas (*C. sertularioides*) do que nas rodófitas; entretanto, este resultado é importante por ser o primeiro relato de tamanha variedade de MAAs em algas pardas.

A palitina foi a MAA mais comum neste estudo, sendo encontrada em 84% das amostras. Isto contraria a visão de que chinorina e porphyra-334 seriam as MAAs mais comuns em macroalgas (Carreto e Carignan, 2011), uma vez que estas MAAs são vistas em 60% e 76% das amostras deste trabalho, respectivamente.

Até onde pudemos apurar, este é o primeiro estudo do conteúdo de MAAs de onze gêneros apresentados nesta tese, conforme visto na Tabela 4.6. Nesta relação, poder-se-ia incluir também o gênero *Canistrocarpus*; entretanto, como a alga *Canistrocarpus cervicornis* era anteriormente conhecida como *Dictyota cervicornis* e a mudança de gênero é recente (De Clerck et al., 2006), optamos por não considerar *Canistrocarpus* como gênero independente nesta comparação. Em se tratando de espécies, tal listagem é ainda maior (Tabela 4.6), alcançando 34 das 45 espécies estudadas.

Tabela 4.6: Gêneros e espécies cujo conteúdo de MAAs foi estudado pela primeira vez neste trabalho.

Gêneros	Espécies
<i>Amansia</i>	<i>Amansia multifida</i>
<i>Botryocladia</i>	<i>Amphiroa fragilissima</i>
<i>Bryothamnion</i>	<i>Anadyomene stellata</i>
<i>Ceratodictyon</i>	<i>Botryocladia occidentalis</i>
<i>Cryptonemia</i>	<i>Bryothamnion seaforthii</i>
<i>Dictyopteris</i>	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>
<i>Heterosiphonia</i>	<i>Caulerpa cupressoides</i> var. <i>lycopodium</i>
<i>Ochtodes</i>	<i>Caulerpa prolifera</i>
<i>Tricleocarpa</i>	<i>Caulerpa sertularioides</i>
<i>Udotea</i>	<i>Chaetomorpha antennina</i>
<i>Zonaria</i>	<i>Cladophora prolifera</i>
	<i>Ceratodictyon variabile</i>
	<i>Codium decorticatum</i>
	<i>Codium isthmocladum</i>
	<i>Cryptonemia crenulata</i>
	<i>Cryptonemia seminervis</i>
	<i>Dichotomaria marginata</i>
	<i>Dictyopteris delicatula</i>
	<i>Gracilaria cervicornis</i>
	<i>Gracilaria cuneata</i>
	<i>Gracilaria tepocensis</i>
	<i>Halimeda cuneata</i>
	<i>Heterosiphonia gibbesii</i>
	<i>Hydropuntia caudata</i>
	<i>Hypnea musciformis</i>
	<i>Ochtodes secundiramea</i>
	<i>Padina tetrastromatica</i>
	<i>Plocamium brasiliense</i>
	<i>Pyropia spiralis</i>
	<i>Sargassum cymosum</i>
	<i>Sargassum vulgare</i>
	<i>Tricleocarpa cylindrica</i>
	<i>Udotea flabellum</i>
	<i>Zonaria tournefortii</i>

Não há dados de MAAs disponíveis na literatura para macroalgas da costa brasileira, à exceção de seis rodófitas: duas do gênero *Gracilaria*, *G. birdiae* e *G. domingensis* (Cardozo et al., 2011), e quatro do gênero *Bostrychia*: *B. calliptera*, *B. montagnei*, *B. moritziana* e *B. radicans* (Karsten et al., 1998a; Karsten et al., 2000). Uma vez que o Brasil possui 7367 km de costa (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015) e aproximadamente 800 espécies descritas (Bicudo e Menezes, 2010), acreditamos ser de fundamental importância estudar tanto aspectos biológicos (taxonomia, ecologia, etc.) quanto aspectos químicos dessa vasta diversidade. O presente estudo busca ampliar o conhecimento químico relacionado aos compostos fotoprotetores existentes na costa brasileira, sendo de interesse ecológico, taxonômico, farmacêutico e cosmético.

Focando no interesse industrial, as espécies aqui estudadas poderiam ter dois usos principais: serem utilizadas como fontes *in natura* de MAAs, as quais poderiam ser comercializadas para fins de pesquisa e de produção de formulações com propriedades específicas; ou serem utilizadas como fontes de extratos ricos em MAAs, tanto em quantidade quanto em variedade, para incorporação em formas cosmeceúticas de fotoprotetores (já existentes ou ainda a serem desenvolvidas). Por possuírem uma MAA em concentração muito superior às outras, algumas algas deste trabalho poderiam ser utilizadas para a obtenção de padrões isolados: *Pterocladia capillacea*, *Plocamium brasiliense*, *Hypnea musciformis*, *Dichotomaria marginata* e *Gracilaria* cf. *mamillaris*, como fontes de chinorina; *Ceratodictyon variabile*, como fonte de palitina; e *Acanthophora spicifera* e *Gracilaria cervicornis*, como fontes de porphyra-334. Entretanto, pela variedade de MAAs disponíveis – e também pela quantidade em que foram encontradas – o extrato de *A. spicifera* parece ser melhor aproveitado se for incorporado por inteiro a um filtro solar, assim como os extratos de *Amansia multifida*, *Gracilaria domingensis*, *Hydropuntia caudata* e *Pyropia spiralis*. Um filtro contendo apenas o extrato de qualquer uma dessas rodófitas terá um espectro de ação

que compreende todo o UV-A e se estende para o UV-B; caso tenha este extrato combinado com outros compostos com ação fotoprotetora, será muito mais eficiente.

Existe uma série de atributos que um filtro solar “ideal” deve possuir (Flor et al., 2007; Okuno e Vilela, 2005). Alguns deles, como absorver radiação na faixa de 280-400 nm e possuir alto coeficiente de extinção molar, são bem caracterizados para as MAAs. Outros, no entanto, precisam ser melhor estudados – tanto para MAAs individuais quanto para extratos que se queira incorporar a formulações farmacêuticas –, como ser atóxico, não-irritante, não-sensibilizante e química, fotoquímica e termicamente estável. Uma vez que estes atributos irão variar com a composição do extrato utilizado (que pode conter muitas outras classes de moléculas), cada extrato deve ser analisado cuidadosamente.

Ao se utilizar um organismo que possua alguma molécula de interesse industrial, é interessante que este composto (ou conjunto de compostos) não seja o único produto derivado do organismo, de modo a diminuir os custos de produção e tornar o produto competitivo. Dentre as algas aqui estudadas, uma boa proposta seria utilizar o gênero *Gracilaria*, que apresenta níveis razoavelmente altos de MAAs e já é cultivada para a extração de ágar, tanto sozinha quanto em cultivos integrados com camarões e peixes em diversos países do mundo (McHugh, 2003). Outra proposta seria utilizar a rodófito *Hypnea musciformis*, que vem sendo cultivada em alguns locais (inclusive no Brasil) com a finalidade de se extrair carragenana – e apresenta altos níveis de MAAs, especialmente de chinorina (McHugh, 2003; Msuya et al., 2014). Logicamente, vários estudos teriam que ser feitos de modo a otimizar a produção de diferentes classes de substâncias no mesmo organismo; todavia, o esforço seria compensado pelo aumento do valor agregado da biomassa cultivada.

#### 4.5 Determinação estrutural da MAA desconhecida ( $m/z$ 317)

O íon de  $m/z$  317 encontrado pelo método exploratório por HPLC-MS foi considerado como sendo uma MAA ainda não descrita, uma vez que não havia relatos na literatura para esta  $m/z$ , e também porque apresentou ambos os fragmentos descritos como os mais comuns para MAAs (186 e 197  $m/z$ ) e espectro de absorção idêntico ao já mostrado para diversos compostos desta classe, com  $\lambda_{\text{máx}} = 332$  nm em água contendo 0,1% AF (v/v) e 5 mmol.L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc (Figura 4.27).

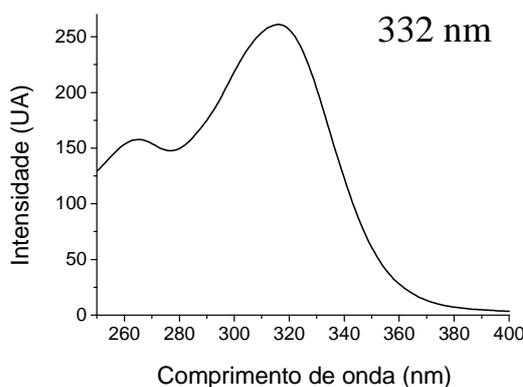


Figura 4.27: Espectro de absorção no ultravioleta da molécula de íon quasimolecular  $[M+H]^+$  de  $m/z$  317.

A primeira estratégia para a determinação estrutural desta MAA, então, foi a proposição de diversas estruturas cujo íon quasimolecular  $[M+H]^+$  apresentasse a mesma  $m/z$ , mantendo o cerne comum a todas as MAAs e tomando por base estruturas já descritas. Foi possível propor sete estruturas, que se encontram na Figura 4.28, juntamente com suas fórmulas moleculares.

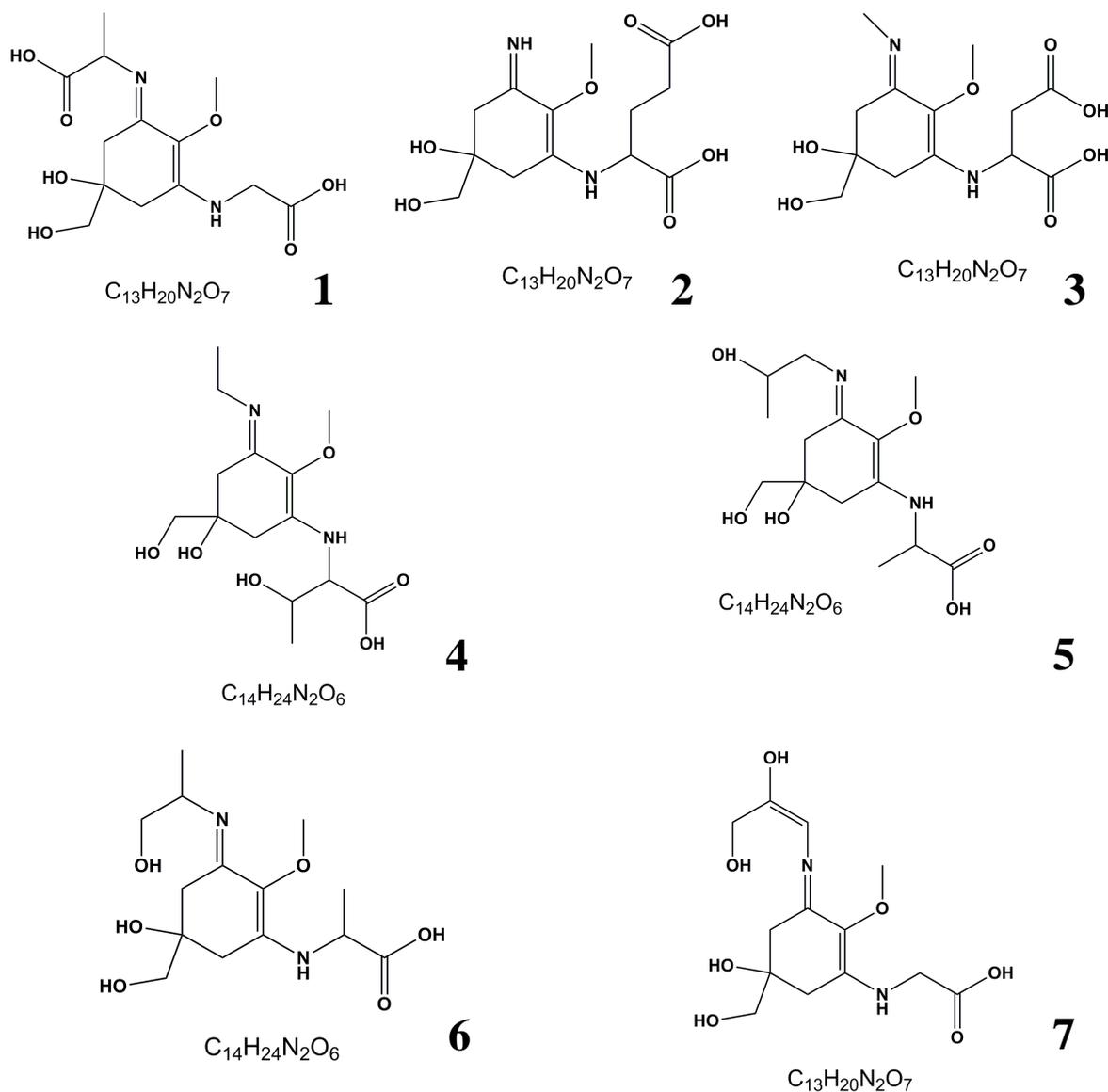


Figura 4.28: Estruturas propostas para a MAA de  $m/z$  317.

Para dar procedimento a diversos passos de elucidação estrutural, foi necessário isolar o composto em questão. Inicialmente, utilizou-se o método de isolamento desenvolvido por HPLC preparativo e cromatografia em coluna; no entanto, por se tratar de uma amostra mais complexa que o extrato utilizado para o isolamento de chinorina, palitina e porphyra-334, não foi possível obter bons resultados. Dessa forma, optou-se por isolar esse composto pelo método descrito no item 3.5.4.

O isolamento resultou na obtenção de 1 mg desse composto, o que resulta num rendimento de extração de 0,007% (a partir de biomassa fresca) e em uma proporção, em massa, de 0,07 mg / g de peso fresco. Uma vez que aproximadamente 80% da massa de macroalgas é composta por água (Arasaki e Arasaki, 1983) e que *O. secundiramea*, coletada também no estado do Espírito Santo, já teve seu teor de água calculado em 81,06% – dado obtido por meio de comunicação pessoal com o autor de Machado (2010) –, pode-se calcular o teor aproximado deste composto por peso seco de alga, tornando mais fácil a comparação com dados da literatura. Este cálculo resulta em uma concentração aproximada de 0,35 mg / g de peso seco de alga, o que é compatível com concentrações de MAAs já descritas em macroalgas tropicais (Karsten et al., 1998c).

O composto que apresenta íon quasimolecular  $[M+H]^+$  com  $m/z$  317 foi isolado das outras MAAs do extrato e injetado no espectrômetro de massas de alta resolução. O espectro de massas obtido pode ser visualizado na Figura 4.29. As estruturas possíveis foram desenhadas no software ChemBioDraw Ultra 13.0 e tiveram suas fórmulas e massas moleculares calculadas (Tabela 4.7). O erro relativo na determinação da massa, em ppm, foi calculado para ambas as opções de massas exatas (Tabela 4.7) e mostrou que a fórmula molecular correta para a  $m/z$  317 é  $C_{13}H_{21}N_2O_7^+$  – excluindo, assim, três das sete estruturas propostas.

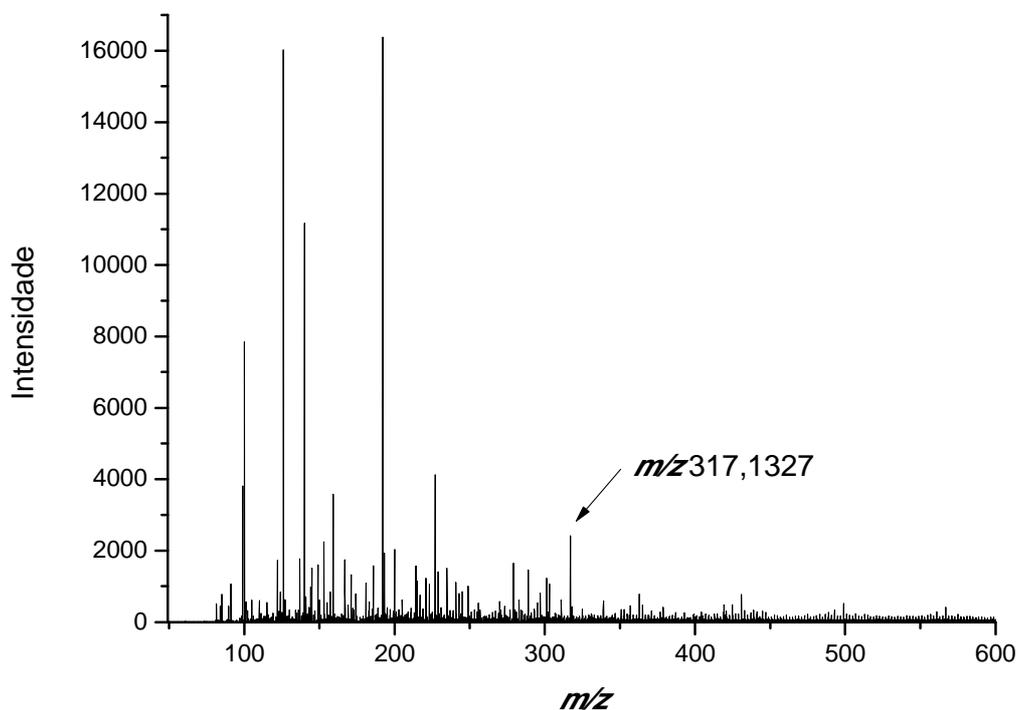


Figura 4.29: Determinação da massa exata do íon quasimolecular de  $m/z$  317 por espectrometria de massas de alta resolução.

Tabela 4.7: Determinação da massa exata das duas opções de fórmulas moleculares para o íon quasimolecular  $m/z$  317.

Estruturas propostas	Fórmula molecular (molécula neutra)	Fórmula do íon quasimolecular $[M+H]^+$	Massa exata	Erro (ppm)
1, 2, 3, 7	$C_{13}H_{20}N_2O_7$	$C_{13}H_{21}N_2O_7^+$	317,1349	- 6,94
4, 5, 6	$C_{14}H_{24}N_2O_6$	$C_{14}H_{25}N_2O_6^+$	317,1713	- 121,7

Analisando a fragmentação da  $m/z$  317 não-deuterada (Figura 4.30A), é possível notar perdas já caracterizadas como típicas de MAAs, como a perda inicial de 15 Da e uma perda, seguida a esta, de 44 Da. Estas perdas, descritas por Cardozo et al. (2006; 2008), correspondem à perda radicalar de uma metila ( $\cdot CH_3$ ) e à perda neutra de um  $CO_2$  de um

grupo carboxila, respectivamente; e neste caso, levariam às  $m/z$  302 e 258. É possível também notar uma segunda perda de 44 Da, resultando no íon mais abundante do espectro:  $m/z$  214.

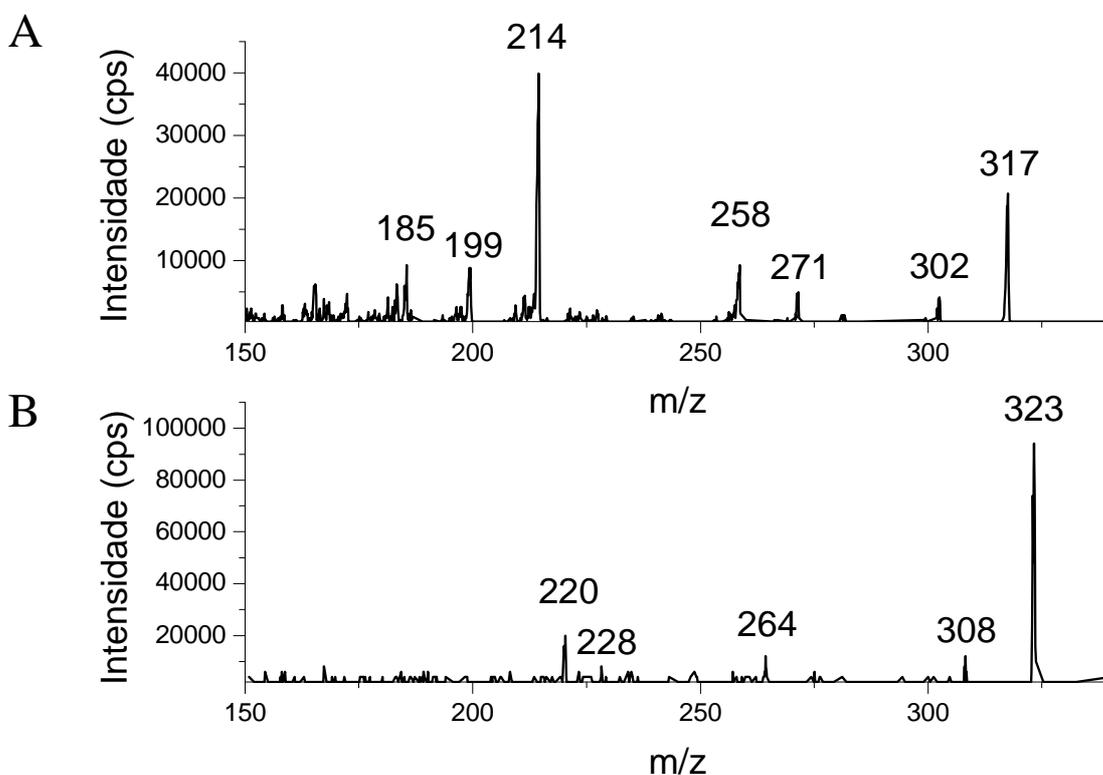


Figura 4.30: Espectros de massas do íon  $m/z$  317. A: composto isolado. B: composto isolado após troca de H/D (deuteração dos hidrogênios ionizáveis).

Em estudos anteriormente realizados por ESI, foi proposto que a eliminação de radical metila no modo positivo de análise seja um processo minoritário de fragmentação em MAAs contendo dois grupamentos carboxila (Cardozo et al., 2009), o que é consistente com a intensidade do íon de  $m/z$  302 mostrado na Figura 4.30A. No entanto, as perdas subsequentes parecem vir deste íon  $[(M+H)-15]^+$ , indicando que, na verdade, a formação deste íon não seja um processo minoritário, mas sim que ele seja facilmente fragmentado em outros íons-produto. Além disso, as perdas previamente descritas mostram também a possibilidade de a molécula em questão apresentar dois grupos ácidos.

Analisando a fragmentação da  $m/z$  317 deuterada (Figura 4.30B), nota-se que o íon quasimolecular  $[M+H]^+$  teve um acréscimo de seis unidades de massa, indicando uma molécula que apresenta cinco hidrogênios lábeis (com 1 Da sendo atribuído ao  $D^+$  que proporciona carga ao íon). Apesar de a fragmentação ter ocorrido em diferente extensão em relação à amostra não-deuterada, é possível encontrar novamente os três íons que apresentam as quebras típicas de MAAs: a perda de 15 Da, gerando o íon de  $m/z$  308; a perda sequencial de 44 Da, gerando o íon de  $m/z$  264; e uma nova perda de 44 Da, gerando o íon de  $m/z$  220. Estas fragmentações, que ocorrem sem a perda de hidrogênios lábeis (Cardozo et al., 2006), confirmam a existência de cinco hidrogênios lábeis na molécula em questão. Desta forma, é possível descartar mais duas estruturas propostas, uma vez que as estruturas **1** e **3** apresentam cinco hidrogênios ionizáveis, mas as de número **2** e **7** apresentam seis.

A análise realizada a seguir foi uma hidrólise da molécula de interesse, de modo a liberar os aminoácidos presentes no composto e identificá-los. Diversos artigos propõem diferentes condições de hidrólise, utilizando ácido ou base, com molaridades diferentes e também diferentes tempos de reação (Carignan et al., 2009; Chioccare et al., 1979; Price e Forrest, 1969; Takano et al., 1979; Tsujino et al., 1978). Neste trabalho, optou-se por utilizar a condição descrita no item 3.6.4, já estabelecida para hidrólise total de peptídeos em meio ácido.

Os dados obtidos pelo analisador de aminoácidos não foram conclusivos. A reprodutibilidade de análise dos padrões injetados (os aminoácidos glicina, alanina, ácido glutâmico e ácido aspártico) foi baixa, mostrando grandes alterações nos tempos de retenção e nos formatos dos picos dos aminoácidos analisados (Figura 4.31). Mesmo assim, os ensaios realizados com a amostra hidrolisada não mostraram nenhum pico semelhante aos dos aminoácidos de cadeia lateral ácida, enquanto foi possível ver picos que se assemelham aos mostrados por glicina e alanina em algumas das injeções de padrão (Figura 4.31). Desta

forma, é possível supor, mas não provar, que existam os aminoácidos glicina e alanina na molécula em questão.

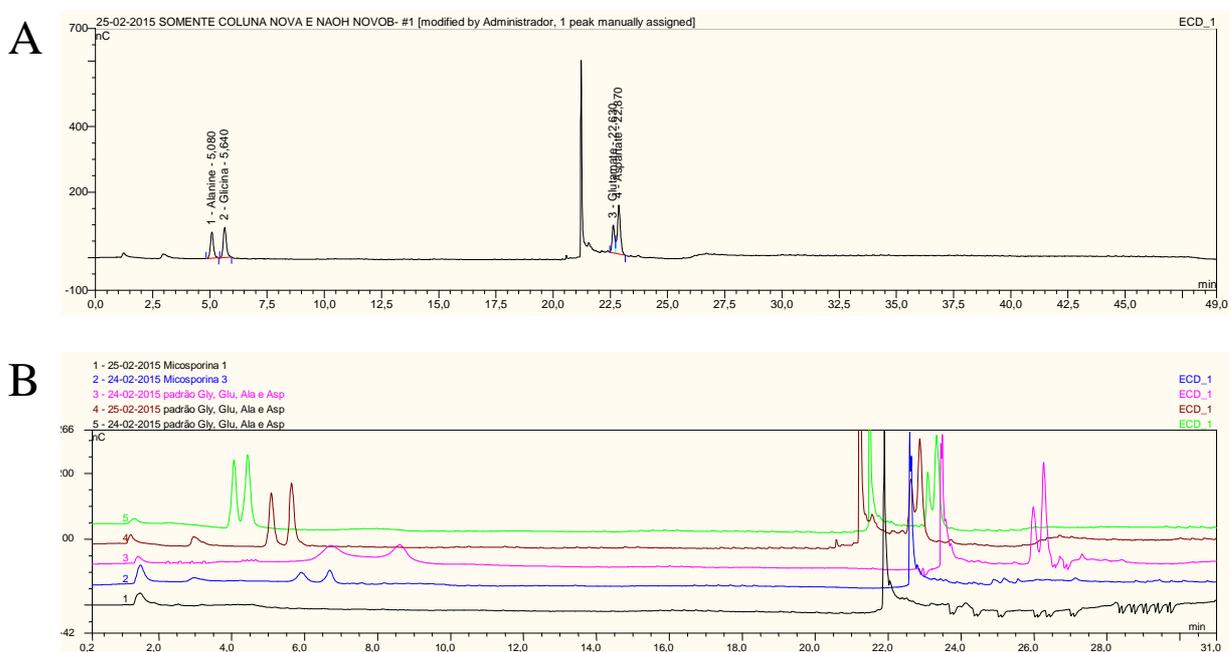


Figura 4.31: Análise por HPLC e amperometria pulsada dos aminoácidos presentes na amostra hidrolisada. A: Perfil cromatográfico contendo apenas os padrões de glicina (1), alanina (2), ácido glutâmico (3) e ácido aspártico (4). B: Perfil cromatográfico da amostra hidrolisada (1 e 2) e dos padrões de aminoácidos (3-5), mostrando baixa reprodutibilidade. Condições cromatográficas: colunas: AminoPac PA10; solvente A: água; solvente B: NaOH 0,25 mol·L<sup>-1</sup> em água; solvente C: NaOAc 1,0 mol·L<sup>-1</sup>; gradiente descrito na Tabela 3.11; tempo total: 49 min; vazão: 0,25 mL·min<sup>-1</sup>.

A amostra hidrolisada foi então levada ao mesmo equipamento utilizado para a determinação da massa exata na  $m/z$  317. Padrões de glicina e alanina foram previamente analisados e foi possível identificar apenas a alanina, com  $m/z$  90,0550. Com a injeção da amostra, foi possível detectar um composto com o mesmo tempo de retenção e a mesma relação massa-carga da alanina (Figura 4.32), mostrando que a molécula em questão realmente possui este aminoácido. No entanto, como a análise não foi satisfatória para o aminoácido glicina, esta conclusão é, novamente, apenas uma forte evidência de que a molécula em questão seja a estrutura **1** apresentada na Figura 4.28.

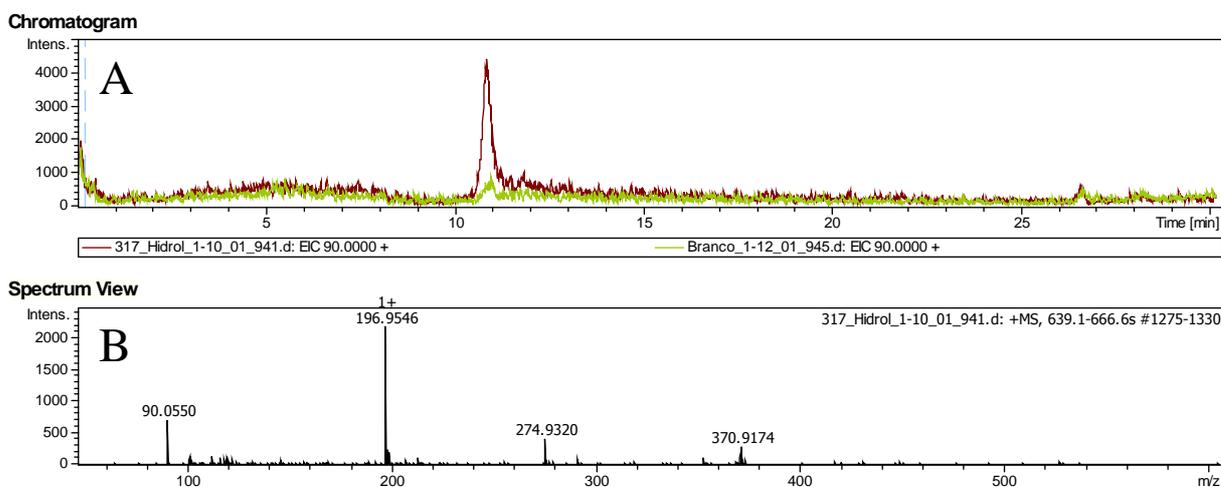


Figura 4.32: Análise realizada em HPLC acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução, para a presença de alanina na amostra hidrolisada de  $m/z$  317. A: Perfil cromatográfico contendo apenas o pico relativo à  $m/z$  90, correspondente ao íon quasimolecular  $[M+H]^+$  da alanina; em marrom, a amostra hidrolisada; em verde, o branco. B: Íons encontrados na amostra hidrolisada, no tempo de retenção correspondente ao pico apresentado no perfil cromatográfico. Condições cromatográficas: colunas: Ascentis<sup>®</sup> Express HILIC (150 x 2,1 mm, 2,7  $\mu$ m); solvente A: 5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OAc em água, pH 3 (ajustado com AF); solvente B: 100% de acetonitrila; gradiente: de 95 a 65% de B de 2 a 17 min, e de 65 a 40% de B de 17 a 23 min; tempo total: 25 min; vazão: 0,5 mL·min<sup>-1</sup>.

Esta estrutura **1** foi isolada e descrita em agosto de 2014 por Miyamoto et al. (2014), com o nome de micosporina-glicina-alanina. Esta MAA não foi isolada de uma amostra *in natura*, mas sim obtida como produto de um experimento de expressão heteróloga de genes da bactéria *Actinosynnema mirum*, ortólogos ao *cluster* proposto para a síntese de MAAs em *N. punctiforme*, na bactéria *Streptomyces avermitilis*. Dessa forma, se a MAA de  $m/z$  317 encontrada no presente trabalho realmente for a micosporina-glicina-alanina, descrevemos aqui a primeira ocorrência natural, e em algas, deste composto.

Esta molécula foi apenas encontrada em amostras da espécie *Ochtodes secundiramea*, o que nos leva a questionar como se dá sua síntese, e qual seria a diferença entre as enzimas da via de biossíntese de MAAs em *O. secundiramea* e em diversas outras macroalgas. Atualmente, esta alga vem sendo foco de outros estudos relacionados a produtos naturais, especialmente em relação a antifúngicos (Bianco et al., 2013; Machado et al., 2014a;

Machado et al., 2014b), mostrando que ainda possui grande potencial a ser explorado. A realização de mais estudos com essa macroalga poderia levar a uma maior compreensão da via de biossíntese de MAAs e, provavelmente, ao isolamento de outros compostos com atividades biológicas variadas.

## *5 Conclusões*

---

- O estudo de processamento de amostras, testando diferenças de extração entre biomassa fresca e biomassa liofilizada, mostrou que, para extração com MeOH 100%, há menor perda de MAAs ao se utilizar biomassa fresca. Estudos mais detalhados devem ser conduzidos de modo a determinar se o processo de liofilização faz com que as MAAs sejam perdidas ou se o motivo do menor rendimento reside na interação do solvente com a biomassa.

- O método de isolamento desenvolvido, utilizando HPLC seguida de cromatografia em coluna, mostra-se bom para extratos contendo baixa variedade de MAAs, mas não capaz de prover amostras totalmente puras de MAAs, pelo menos para a matriz de amostra utilizada. Além disso, não é adequado para todo tipo de amostra; desse modo, o isolamento da MAA de  $m/z$  317 teve de ser realizado pelo método analítico por HPLC-MS.

- O método analítico de HPLC mostrou-se mais rápido e tão eficiente quanto o anteriormente utilizado no laboratório. Em amostras complexas, pode haver coeluição de alguns compostos, sendo recomendável que seja utilizado com detecção tanto por DAD quanto por espectrometria de massas.

- Foi possível desenvolver um método, denominado exploratório, que funciona como diagnóstico para imino-MAAs – e, inclusive, foi capaz de identificar a presença de uma MAA desconhecida em algumas amostras. Acreditamos que possa ser aplicado a qualquer amostra que contenha imino-MAAs, e também apresenta potencial de modificação para gerar um método específico para oxo-MAAs.

- O método quantitativo desenvolvido se mostrou adequado para a proposta, possibilitando a quantificação absoluta de chinorina, palitina e porphyra-334 e a quantificação relativa de asterina-330, de palitinol, de micosporina-2-glicina, do par *cis/trans* usujireno/paliteno e da MAA de  $m/z$  317 em diversas amostras. É outro método que apresenta

grande potencial de expansão, uma vez que possibilita a inclusão de diversos outros compostos de interesse.

- Dentre as praias visitadas para coleta, Castelhanos (município de Anchieta-ES) é a que apresentou maior potencial para coletas no período de maré baixa. Sessenta por cento das amostras coletadas neste estudo são da praia em questão, com representantes em 73% das espécies analisadas.

- Descrevemos nesta tese a identificação de oito MAAs em 45 espécies de macroalgas marinhas do litoral Sul do estado do Espírito Santo. Apesar da localização restrita, é o maior estudo desta natureza realizado até então com algas do litoral brasileiro. Além disso, 11 dos 32 gêneros e 34 das 45 espécies presentes nesta tese nunca haviam sido alvo de nenhum estudo relacionado a MAAs.

- Pôde-se detectar, pela primeira vez, a presença de MAAs nas seguintes espécies: *Amansia multifida*, *Amphiroa fragilissima*, *Botryocladia occidentalis*, *Bryothamnion seaforthii*, *Canistrocarpus cervicornis*, *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium*, *C. prolifera*, *C. sertularioides*, *Chaetomorpha antennina*, *Ceratodictyon variabile*, *Cladophora prolifera*, *Codium decorticatum*, *C. isthmocladum*, *Colpomenia sinuosa*, *Cryptonemia crenulata*, *C. seminervis*, *Dichotomaria marginata*, *Dictyopteris delicatula*, *Gracilaria cervicornis*, *G. cuneata*, *G. tepocensis*, *Halimeda cuneata*, *Heterosiphonia gibbesii*, *Hydropuntia caudata*, *Hypnea musciformis*, *Ochtodes secundiramea*, *Plocamium brasiliense*, *Pyropia spiralis*, *Sargassum vulgare*, *Tricleocarpa cylindrica*, *Udotea flabellum* e *Zonaria tournefortii*.

- Dentre as amostras que possuem dados do conteúdo de MAAs na literatura (seja para a espécie ou para o gênero), praticamente todas apresentam variedade de MAAs maior ou igual ao anteriormente descrito. Descrevemos aqui a maior variedade de MAAs já encontrada em algas pardas: seis MAAs diferentes nas espécies *Dictyopteris delicatula* e *Padina gymnospora* coletadas na praia de Castelhanos.

- As rodófitas apresentaram níveis de MAAs sensivelmente maiores que as clorófitas e as feófitas. Palitina foi a MAA mais comum, estando presente em 84% das amostras.
- Por possuírem uma MAA em concentração muito superior às outras, algumas algas deste trabalho poderiam ser utilizadas para a obtenção de padrões isolados: *Pterocladia capillacea*, *Plocamium brasiliense*, *Hypnea musciformis*, *Dichotomaria marginata* e *Gracilaria cf. mamillaris*, como fontes de chinorina; *Ceratodictyon variabile*, como fonte de palitina; e *Acanthophora spicifera* e *Gracilaria cervicornis*, como fontes de porphyra-334.
- Por apresentarem alta quantidade e também variedade de MAAs, propomos as rodófitas *Acanthophora spicifera*, *Amansia multifida*, *Gracilaria domingensis*, *Hydropuntia caudata* e *Pyropia spiralis* como boas fontes de extratos a serem incorporados em formulações de filtros solares pelas indústrias farmacêutica, cosmética e de tintas e vernizes.
- De forma a diminuir os custos associados a um cultivo de macroalgas para a obtenção de MAAs, seria interessante utilizar uma espécie que já seja utilizada comercialmente. Neste caso, propomos aqui a utilização do gênero *Gracilaria* e da espécie *Hypnea musciformis*, os quais já são cultivados para a extração de ficocoloides e possuem níveis razoavelmente altos de MAAs.
- O íon quasimolecular  $[M+H]^+$  de  $m/z$  317 foi tentativamente identificado como sendo a micosporina-glicina-alanina. Este é o primeiro trabalho a descrever a ocorrência desta molécula *in natura*, uma vez que o único relato de sua existência até então ocorreu por meio de um experimento de expressão heteróloga em bactérias. Desta forma, mostramos que ainda há MAAs a serem identificadas na natureza – as quais podem possuir propriedades interessantes dos pontos de vista ecológico, taxonômico e cosmeceútico.

## *6 Referências*

---

ADAMS, N. L.; SHICK, J. M. Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, n. 1, p. 149-158, 1996. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.1996.tb02435.x/abstract> >.

ADAMS, N. L.; SHICK, J. M. Mycosporine-like amino acids prevent UVB-induced abnormalities during early development of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. **Marine Biology**, v. 138, n. 2, p. 267-280, 2001. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002270000463> >.

ALCORN, K. Carraguard microbicide safe but not effective (updated). Disponível em: < <http://www.aidsmap.com/iCarraguardi-microbicide-safe-but-not-effective-updated/page/1429597/> >. Acesso em: 14 jan 2015.

AMSLER, C. D., (ED.). **Algal Chemical Ecology**. Berlim, Alemanha: Springer-Verlag, 2008. 313 pp.

ANDREGUETTI, D. et al. Antioxidant Properties and UV Absorbance Pattern of Mycosporine-Like Amino Acids Analogs Synthesized in an Environmentally Friendly Manner. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 27, n. 6, p. 305-312, 2013. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbt.21489/full> >.

ARASAKI, S.; ARASAKI, T. **Low calorie, high nutrition vegetables from the sea. To help you look and feel better**. 1st. Tokyo: Japan Publications, Inc., 1983. 196 p. ISBN 978-0870404757.

ARPIN, N.; FAVRE-BONVIN, J.; THIVEND, S. Structure de la mycosporine 2, nouvelle molecule, isolee de *Botrytis cinerea*. **Tetrahedron Letters**, v. 18, n. 10, p. 819-820, 1977. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403901927649> >.

BALSKUS, E. P.; WALSH, C. T. The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. **Science**, v. 329, n. 5999, p. 1653-1656, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/329/5999/1653.full.pdf> >.

BANASZAK, A. T. et al. Relationship between ultraviolet (UV) radiation and mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. **Bulletin of Marine Science**, v. 63, n. 3, p. 617-628, 1998. Disponível em: < <http://www.ingentaconnect.com/content/umrsmas/bullmar/1998/00000063/00000003/art00016> >.

BANASZAK, A. T. et al. The distribution of mycosporine-like amino acids (MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic dinoflagellates in cnidarian hosts from the Mexican Caribbean. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 337, n. 2, p. 131-146, 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098106003443> >.

BANASZAK, A. T.; TRENCH, R. K. Ultraviolet sunscreens in dinoflagellates. **Protist**, v. 152, n. 2, p. 93-101, 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1434461004700462> >.

BANDARANAYAKE, W. M. Mycosporines: are they nature's sunscreens? **Natural Product Reports**, v. 15, n. 2, p. 159-172, 1998. Disponível em: < <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/1998/np/a815159y> >.

BANDARANAYAKE, W. M.; BOURNE, D. J.; SIM, R. G. Chemical composition during maturing and spawning of the sponge *Dysidea herbacea* (Porifera : Demospongiae). **Comparative Biochemistry and**

**Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 118, n. 4, p. 851-859, 1997. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305049197001806> >.

BANDARANAYAKE, W. M.; DES ROCHER, A. Role of secondary metabolites and pigments in the epidermal tissues, ripe ovaries, viscera, gut contents and diet of the sea cucumber *Holothuria atra*. **Marine Biology**, v. 133, n. 1, p. 163-169, 1999. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002270050455> >.

BARNES, B. B. et al. Estimation of diffuse attenuation of ultraviolet light in optically shallow Florida Keys waters from MODIS measurements. **Remote Sensing of Environment**, v. 140, p. 519-532, 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034425713003611> >.

BARUFI, J. B. et al. Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 457-466, 2011. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/46551428q307076p/fulltext.pdf> >.

BEN-YOSEF, D. Z.; KASHMAN, Y.; BENAYAHU, Y. Mycosporine-like amino acids in azooxanthellate and zooxanthellate early developmental stages of the soft coral *Heteroxenia fuscescens*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 355, n. 1, p. 12-17, 2008. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098107005436> >.

BERNILLON, J. et al. Mycosporine glutamine and related mycosporines in the fungus *Pyronema omphalodes*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1083-1087, 1984. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003194220082614X> >.

BEUKERS, R.; BERENDS, W. Isolation and identification of the irradiation product of thymine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 41, n. 3, p. 550-551, 1960. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006300260900639> >.

BIANCO, E. M. et al. Anti-Infective Potential of Marine Invertebrates and Seaweeds from the Brazilian Coast. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5761-5778, 2013. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/5/5761> >.

BICUDO, C. E. D. M.; MENEZES, M. As algas do Brasil. In: FORZZA, R. C., et al. (Ed.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio : Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.1, 2010. p.49-60. Disponível em: < <http://reflora.jbrj.gov.br/downloads/vol1.pdf> >.

BIXLER, H. J.; PORSE, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 321-335, 2011. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10811-010-9529-3> >.

BÖHM, G. A. et al. Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 15, p. 8536-8539, 1995. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/270/15/8536.full.pdf> >.

BRITT, A. B. Repair of DNA damage induced by ultraviolet-radiation. **Plant Physiology**, v. 108, n. 3, p. 891-896, 1995. Disponível em: < <http://www.plantphysiol.org/content/108/3/891.full.pdf> >.

BROOK, P. J. Protective function of an ultraviolet-absorbing compound associated with conidia of *Glomerella cingulata*. **New Zealand Journal of Botany**, v. 19, n. 3, p. 299-304, 1981. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/0028825X.1981.10426382> >.

CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. HPLC characterization of betalains from plants in the amaranthaceae. **Journal of Chromatographic Science**, v. 43, n. 9, p. 454-460, 2005. Disponível em: < <http://chromsci.oxfordjournals.org/content/43/9/454.long> >.

CALDWELL, M. M.; ROBBERECHT, R.; FLINT, S. D. Internal filters - Prospects for UV-acclimation in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 58, n. 3, p. 445-450, 1983. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1983.tb04206.x/abstract> >.

CALLONE, A. I. et al. Biotransformation of mycosporine like amino acids (MAAs) in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 84, n. 3, p. 204-212, 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134406000777> >.

CARDOZO, K. H. M. **Estudo de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas: aminoácidos tipo micosporinas (MAAs)**. 2007. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil, 2007.

CARDOZO, K. H. M. et al. Fragmentation of mycosporine-like amino acids by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 2, p. 253-258, 2006. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.2305/pdf> >.

CARDOZO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 60-78, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045606001530> >.

CARDOZO, K. H. M. et al. Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. **Revista Brasileira De Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 202-208, 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v21n2/aop4811.pdf> >.

CARDOZO, K. H. M. et al. A theoretical and mass spectrometry study of the fragmentation of mycosporine-like amino acids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 273, n. 1-2, p. 11-19, 2008. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138738060800064X> >.

CARDOZO, K. H. M. et al. A fragmentation study of di-acidic mycosporine-like amino acids in Electrospray and Nanospray Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p. 1625-1631, 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/jbchs/v20n9/09.pdf> >.

CAREFOOT, T. H. et al. Mycosporine-like amino acids: possible UV protection in eggs of the sea hare *Aplysia dactylomela*. **Marine Biology**, v. 130, n. 3, p. 389-396, 1998. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s002270050259> >.

CARIGNAN, M. O. et al. Palythine-threonine, a major novel mycosporine-like amino acid (MAA) isolated from the hermatypic coral *Pocillopora capitata*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 94, n. 3, p. 191-200, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134408002388> >.

CARIGNAN, M. O.; CARRETO, J. I. Characterization of mycosporine-serine-glycine methyl ester, a major mycosporine-like amino acid from dinoflagellates: a mass spectrometry study. **Journal of Phycology**, v. 49, n. 4, p. 680-688, 2013. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpy.12076/pdf> >.

CARRETO, J. I.; CARIGNAN, M. O. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 387-446, 2011. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1660-3397/9/3/387/> >.

CARRETO, J. I. et al. Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum* - UV-photoprotective compounds? **Journal of Plankton Research**, v. 12, n. 5, p. 909-921, 1990. Disponível em: < <http://plankt.oxfordjournals.org/content/12/5/909.full.pdf+html> >.

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. **Marine Biology**, v. 146, n. 2, p. 237-252, 2005. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/8cbv23e5nen2bcd0/fulltext.pdf> >.

CHEN, H.; WENG, Q. Y.; FISHER, D. E. UV Signaling Pathways within the Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 8, p. 2080-2085, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2014.161> >.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008. Disponível em: < [http://quimicanova.s bq.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=1124](http://quimicanova.s bq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1124) >.

CHIOCCARA, F. et al. Occurrence of two new mycosporine-like aminoacids, mytilins A and B in the edible mussel, *Mytilus galloprovincialis*. **Tetrahedron Letters**, v. 20, n. 34, p. 3181-3182, 1979. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403901953560> >.

CLARKE, A. P. et al. An integrated amperometry waveform for the direct, sensitive detection of amino acids and amino sugars following anion-exchange chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2774-2781, 1999. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac9811524> >.

CLIFFORD, M. N. Miscellaneous phenols in foods and beverages - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1126-1137, 2000. Disponível em: < [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7%3C1126::AID-JSFA604%3E3.0.CO;2-0/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7%3C1126::AID-JSFA604%3E3.0.CO;2-0/epdf) >.

COCKELL, C. S.; KNOWLAND, J. Ultraviolet radiation screening compounds. **Biological Reviews**, v. 74, n. 3, p. 311-345, 1999. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00189.x/epdf> >.

COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ECLAIRAGE. **ILV: International Lighting Vocabulary**. Vienna, Austria: Commission Internationale de L'Eclairage. CIE S 017/E:2011: 203 p. 2011. Disponível em: < <http://eilv.cie.co.at/> >.

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. **Journal of**

**Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 56, n. 2-3, p. 139-144, 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S10111344000066X#> >.

CONDE, F. R.; CHURIO, M. S.; PREVITALI, C. M. The deactivation pathways of the excited-states of the mycosporine-like amino acids shinorine and porphyra-334 in aqueous solution. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 10, p. 960-967, 2004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/B405782A> >.

CONDE, F. R.; CHURIO, M. S.; PREVITALI, C. M. Experimental study of the excited-state properties and photostability of the mycosporine-like amino acid palythine in aqueous solution. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 6, p. 669-674, 2007. Disponível em: < <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2007/pp/b618314j> >.

CRONIN, G. et al. Effects of storage and extraction procedures on yields of lipophilic metabolites from the brown seaweeds *Dictyota ciliolata* and *D. menstrualis*. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 119, n. 1-3, p. 265-273, 1995. Disponível em: < <http://www.int-res.com/articles/meps/119/m119p265.pdf> >.

CUEVAS-RODRÍGUEZ, E. O. et al. Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Wild and Domesticated Mexican Blackberries (*Rubus* spp.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7458-7464, 2010. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf101485r> >.

DAINIPPON INK&CHEM INC. Miyamoto, M.; Sakakibara, M.; Torii, M. **Novel mycosporine-like amino acid derivative having glycosyl group useful in ultraviolet absorber and ultraviolet-radiation-protection cosmetics for exhibiting UV absorption effect and moisturizing effect**. JP2009120562-A JP297904 16 Nov 2007. JP2009120562-A 04 Jun 2009 C07H-015/18 200939. 04 Jun. 2009.

DE CLERCK, O. et al. A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on rbcL and 26S ribosomal DNA sequence analyses. **Journal of Phycology**, v. 42, n. 6, p. 1271-1288, 2006. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1529-8817.2006.00279.x/epdf> >.

DE LA COBA, F. et al. Prevention of the ultraviolet effects on clinical and histopathological changes, as well as the heat shock protein-70 expression in mouse skin by topical application of algal UV-absorbing compounds. **Journal of Dermatological Science**, v. 55, n. 3, p. 161-169, 2009a. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181109001650> >.

DE LA COBA, F. et al. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 2, p. 161-169, 2009b. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/u417615765627t40/fulltext.pdf> >.

DIONISIO-SESE, M. L. et al. UV-absorbing substances in the tunic of a colonial ascidian protect its symbiont, *Prochloron* sp., from damage by UV-B radiation. **Marine Biology**, v. 128, n. 3, p. 455-461, 1997. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002270050112> >.

DROLLET, J. H.; GLAZIOU, P.; MARTIN, P. M. V. A study of mucus from the solitary coral *Fungia fungites* (Scleractinia, Fungiidae) in relation to photobiological UV adaptation. **Marine Biology**, v. 115, n. 2, p. 263-266, 1993. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fbfb00346343> >.

DUNLAP, W. C.; CHALKER, B. E.; OLIVER, J. K. Bathymetric adaptations of reef-building corals at Davies Reef, Great Barrier Reef, Australia. III. UV-B absorbing compounds. **Journal of Experimental Marine**

**Biology and Ecology**, v. 104, n. 1-3, p. 239-248, 1986. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098186901085> >.

DUNLAP, W. C.; SHICK, J. M. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: A biochemical and environmental perspective. **Journal of Phycology**, v. 34, n. 3, p. 418-430, 1998. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1529-8817.1998.340418.x/pdf> >.

DUNLAP, W. C.; YAMAMOTO, Y. Small-molecule antioxidants in marine organisms - Antioxidant activity of mycosporine-glycine. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 112, n. 1, p. 105-114, 1995. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030504919500086N> >.

EHLING-SCHULZ, M.; BILGER, W.; SCHERER, S. UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 6, p. 1940-1945, 1997. Disponível em: < <http://jb.asm.org/content/179/6/1940.full.pdf> >.

EHLING-SCHULZ, M.; SCHERER, S. UV protection in cyanobacteria. **European Journal of Phycology**, v. 34, n. 4, p. 329-338, 1999. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/09670269910001736392> >.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture 2012**. Rome: 209 p. 2012. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf> >.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture 201**. Rome: 223 p. 2014. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf> >.

FAVRE-BONVIN, J.; ARPIN, N.; BREVARD, C. Structure of mycosporine (P-310). **Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie**, v. 54, n. 7, p. 1105-1113, 1976. Disponível em: < <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/v76-158> >.

FAVRE-BONVIN, J. et al. Biosynthesis of mycosporines - mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2509-2514, 1987. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200838662> >.

FERNANDES, D. R. P.; DE OLIVEIRA, V. P.; VALENTIN, Y. Y. Seaweed biotechnology in Brazil: six decades of studies on natural products and their antibiotic and other biological activities. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 5, p. 1923-1937, 2014. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10811-014-0287-5> >.

FIGUEROA, F. L. et al. Short-term effects of increasing CO<sub>2</sub>, nitrate and temperature on three Mediterranean macroalgae: biochemical composition. **Aquatic Biology**, v. 22, p. 177-193, 2014. Disponível em: < <http://www.int-res.com/articles/ab2014/22/b022p177.pdf> >

FIGUEROA, F. L. et al. Effects of short-term irradiation on photoinhibition and accumulation of mycosporine-like amino acids in sun and shade species of the red algal genus *Porphyra*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 69, p. 21-30, 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134402003883> >

FIGUEROA, F. L. et al. Biofiltration of fishpond effluents and accumulation of N-compounds (phycobiliproteins and mycosporine-like amino acids) versus C-compounds (polysaccharides) in *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta). **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 2, p. 310-318, 2012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X11006047> >.

FITZPATRICK, T. B. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 6, p. 869-871, 1988. Disponível em: < <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=549509> >.

FLEISCHMANN, E. M. The measurement and penetration of ultraviolet radiation into tropical marine water. **Limnology and Oceanography**, v. 34, n. 8, p. 1623-1629, 1989. Disponível em: < [http://www.aslo.info/lo/toc/vol\\_34/issue\\_8/1623.pdf](http://www.aslo.info/lo/toc/vol_34/issue_8/1623.pdf) >.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Sunscreens. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n1/26.pdf> >.

FRANKLIN, L. A.; KRABS, G.; KUHLENKAMP, R. Blue light and UV-A radiation control the synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae). **Journal of Phycology**, v. 37, n. 2, p. 257-270, 2001. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1529-8817.2001.037002257.x/pdf> >.

FRANKLIN, W. A.; LO, K. M.; HASELTINE, W. A. (6-4) UV-light induced DNA photoproducts. **Radiation Research**, v. 94, n. 3, p. 662-662, 1983. Disponível em: < <http://www.rrjournal.org/doi/pdf/10.2307/3575910> >.

GAO, K. S. et al. Solar UV radiation drives CO<sub>2</sub> fixation in marine phytoplankton: A double-edged sword. **Plant Physiology**, v. 144, n. 1, p. 54-59, 2007. Disponível em: < <http://www.plantphysiol.org/content/144/1/54.full.pdf> >.

GAO, Q. J.; GARCIA-PICHEL, F. An ATP-Grasp Ligase Involved in the Last Biosynthetic Step of the Iminomycosporine Shinorine in *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 21, p. 5923-5928, 2011. Disponível em: < <http://jb.asm.org/content/193/21/5923.full.pdf> >.

GARCIA-PICHEL, F.; CASTENHOLZ, R. W. Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 163-169, 1993. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/59/1/163.full.pdf+html> >.

GARCÍA-SANCHÉZ, M. et al. Physiological response and photoacclimation capacity of *Caulerpa prolifera* (Forsskål) J.V. Lamouroux and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson meadows in the Mar Menor lagoon (SE Spain). **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 37-47, 2012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113612000888> >.

GARCIA, P. E. et al. Contrasting patterns of MAAs accumulation in two populations of the copepod *Boeckella gracilipes*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 6, p. 898-906, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C3PP50317H> >.

GATES, R. D. et al. Free amino acids exhibit anthozoan host factor activity: They induce the release of photosynthate from symbiotic dinoflagellates in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

**United States of America**, v. 92, n. 16, p. 7430-7434, 1995. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/92/16/7430.full.pdf> >.

GIORDANINO, M. V. F. et al. Influence of temperature and UVR on photosynthesis and morphology of four species of cyanobacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 103, n. 1, p. 68-77, 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134411000170> >.

GÓMEZ, I.; HUOVINEN, P. Induction of Phlorotannins During UV Exposure Mitigates Inhibition of Photosynthesis and DNA Damage in the Kelp *Lessonia nigrescens*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 5, p. 1056-1063, 2010. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.2010.00786.x/epdf> >.

GRAHAM, L. E.; GRAHAM, J. M.; WILCOX, L. W. **Algae**. 2ª edição. San Francisco, CA: Pearson Benjamin Cummings, 2009.

GRANT, P. T. et al. The isolation of four aminocyclohexanimines (mycosporines) and a structurally related derivative of cyclohexane-1:3-dione (gadusol) from the brine shrimp, *Artemia*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 80, n. 4, p. 755-759, 1985. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305049185904572> >.

GRÖNIGER, A. et al. Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae - a database. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 58, n. 2-3, p. 115-122, 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134400001123> >.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. Disponível em: < <http://www.algaebase.org/> >. Acesso em: 16 dez. 2014.

HÄDER, D.-P. et al. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with other environmental factors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 1, p. 108-126, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C4PP90035A> >.

HÄDER, D. P. et al. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 2, p. 242-260, 2011. Disponível em: < <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2011/pp/c0pp90036b> >.

HÄDER, D. P. et al. Effects on aquatic ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 46, n. 1-3, p. 53-68, 1998. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134498001857> >.

\_\_\_\_\_. Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 39-50, 2003. Disponível em: < <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2003/pp/b211160h> >.

\_\_\_\_\_. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 267-285, 2007. Disponível em: < <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2007/pp/b700020k> >.

HÄDER, D. P.; WORREST, R. C. Effects of enhanced solar ultraviolet-radiation on aquatic ecosystems. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 5, p. 717-725, 1991. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.1991.tb08502.x/abstract> >.

HÄDER, D. P. et al. Effects of increased solar ultraviolet-radiation on aquatic ecosystems. **Ambio**, v. 24, n. 3, p. 174-180, 1995.

HELIOGUARD 365. Disponível em: < <https://www.mibellebiochemistry.com/products/active-protection/helioguard365.php> >. Acesso em: 05 jan. 2015.

HOYER, K. et al. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 211, p. 117-129, 2001. Disponível em: < <http://www.int-res.com/articles/meps/211/m211p117.pdf> >.

HOYER, K.; KARSTEN, U.; WIENCKE, C. Induction of sunscreen compounds in Antarctic macroalgae by different radiation conditions. **Marine Biology**, v. 141, n. 4, p. 619-627, 2002. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/9qvb2w080bqe202t/fulltext.pdf> >.

HUOVINEN, P. et al. Ultraviolet-absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile. **Botanica Marina**, v. 47, n. 1, p. 21-29, 2004. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000189266500002 >.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Mão na roda » posição e extensão. Disponível em: < <http://cod.ibge.gov.br/215OL> >. Acesso em: 21 fev. 2015.

INTERNATIONAL, CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)** p.17. 2005. Disponível em: < [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guide\\_line.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guide_line.pdf) >.

ITO, S.; HIRATA, Y. Isolation and structure of a mycosporine from zoanthid *Palythoa tuberculosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 18, n. 28, p. 2429-2430, 1977. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403901837849> >.

JEFFREY, S. W. et al. Occurrence of UVA- and UVB-absorbing compounds in 152 species (206 strains) of marine microalgae. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 189, p. 35-51, 1999. Disponível em: < <http://www.int-res.com/articles/meps/189/m189p035.pdf> >.

JERLOV, N. G. Ultraviolet radiation in the sea. **Nature**, v. 166, n. 4211, p. 111-112, 1950. Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v166/n4211/pdf/166111a0.pdf> >.

JIANG, H.; GAO, K.; HELBLING, E. W. UV-absorbing compounds in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) with special reference to effects of desiccation. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 4, p. 387-395, 2008. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/61w886u41h64mv40/fulltext.pdf> >.

KAMIO, M. et al. Isolation and Structural Elucidation of Novel Mycosporine-Like Amino Acids as Alarm Cues in the Defensive Ink Secretion of the Sea Hare *Aplysia californica*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, n. 6, p. 1012-1018, 2011. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hlca.201100117/pdf> >.

KARSTEN, U. et al. Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). **Planta**, v. 205, n. 2, p. 257-262, 1998a. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004250050319> >.

KARSTEN, U. et al. An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. **Botanica Marina**, v. 41, n. 5, p. 443-453, 1998b. Disponível em: < <http://www.degruyter.com/view/j/botm.1998.41.issue-1-6/botm.1998.41.1-6.443/botm.1998.41.1-6.443.xml?format=INT> >.

KARSTEN, U. et al. Ultraviolet sunscreen compounds in epiphytic red algae from mangroves. **Hydrobiologia**, v. 432, n. 1-3, p. 159-171, 2000. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1004046909810> >.

KARSTEN, U.; SAWALL, T.; WIENCKE, C. A survey of the distribution of UV-absorbing substances in tropical macroalgae. **Phycological Research**, v. 46, n. 4, p. 271-279, 1998c. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1440-1835.1998.00144.x/pdf> >.

KARSTEN, U.; WIENCKE, C. Factors controlling the formation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Palmaria palmata* from Spitsbergen (Norway). **Journal of Plant Physiology**, v. 155, n. 3, p. 407-415, 1999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161799801242> >.

KERR, J. B.; MCELROY, C. T. Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. **Science**, v. 262, n. 5136, p. 1032-1034, 1993. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/262/5136/1032.full.pdf> >.

KHOSRAVI, S. et al. Effects of Salinity and Ultraviolet Radiation on the Bioaccumulation of Mycosporine-like Amino Acids in *Artemia* from Lake Urmia (Iran). **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 2, p. 400-405, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01245.x> >.

KICKLIGHTER, C. E. et al. Pyrimidines and micosporin-like amino acids function as alarm cues in the defensive secretions of the sea hare *Aplysia californica*. **Chemical Senses**, v. 32, n. 6, p. A30-A31, 2007. Disponível em: < <http://chemse.oxfordjournals.org/content/32/6/A1.full.pdf+html> >.

KICKLIGHTER, C. E. et al. Mycosporine-like amino acids are multifunctional molecules in sea hares and their marine community. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 28, p. 11494-11499, 2011. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/108/28/11494.full.pdf> >.

KLISCH, M.; HÄDER, D. P. Mycosporine-like amino acids in the marine dinoflagellate *Gyrodinium dorsum*: induction by ultraviolet irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 55, n. 2-3, p. 178-182, 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134400000452> >.

KOBAYASHI, J.; NAKAMURA, H.; HIRATA, Y. Isolation and structure of a UV-absorbing substance 337 from the ascidian *Halocynthia roretzi*. **Tetrahedron Letters**, v. 22, n. 31, p. 3001-3002, 1981. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403901818116> >.

KOGEJ, T. et al. Mycosporines in extremophilic fungi - Novel complementary osmolytes? **Environmental Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 105-110, 2006. Disponível em: < <http://www.publish.csiro.au/?paper=EN06012> >.

KORBEE, N.; FIGUEROA, F. L.; AGUILERA, J. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 80, n. 2, p. 71-78, 2005a. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134405000606> >.

KORBEE, N. et al. Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like amino acids in two *Porphyra species* (Bangiales, Rhodophyta). **Marine Biology**, v. 146, n. 4, p. 645-654, 2005b. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-004-1484-6> >.

KORBEE PEINADO, N. et al. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 2, p. 248-259, 2004. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1529-8817.2004.03013.x/pdf> >.

KUFFNER, I. B. Effects of ultraviolet radiation and water motion on the reef coral *Porites compressa* Dana: a flume experiment. **Marine Biology**, v. 138, n. 3, p. 467-476, 2001. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s002270000471> >.

LAURION, I.; BLOUIN, F.; ROY, S. Packaging of mycosporine-like amino acids in dinoflagellates. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 279, p. 297-303, 2004. Disponível em: < <http://www.int-res.com/articles/meps2004/279/m279p297.pdf> >.

LEACH, C. M. Detection of ultraviolet absorbing substances in living mycelium of fungi. **Mycologia**, v. 57, n. 2, p. 291-300, 1965a. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/3756830> >.

\_\_\_\_\_. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. **Canadian Journal of Botany**, v. 43, n. 2, p. 185-200, 1965b.

LEACH, C. M.; TRIONE, E. J. An action spectrum for light induced sporulation in fungus *Ascochyta pisi*. **Plant Physiology**, v. 40, n. 5, p. 808-812, 1965. Disponível em: < <http://www.plantphysiol.org/content/40/5/808.full.pdf> >.

LEAL, M. C. et al. Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 11, p. 1380-1390, 2013. Disponível em: < <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2013/NP/C3NP70057G> >.

LEE, R. E. **Phycology**. 4ª edição. New York, NY: Cambridge University Press, 2008. 560 pp. ISBN 978-0-521-68227-0.

LEE, T.-M.; SHIU, C.-T. Implications of mycosporine-like amino acid and antioxidant defenses in UV-B radiation tolerance for the algae species *Pterocliadiella capillacea* and *Gelidium amansii*. **Marine Environmental Research**, v. 67, p. 8-16, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113608002158> >

LOBBAN, C. S.; HARRISON, P. J. **Seaweed ecology and physiology**. 1ª edição. New York, NY: Cambridge University Press, 1994. 366 pp.

LOPES, P. F. **Caracterização bioquímica e regulação da nitrato redutase na macroalga marinha *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta)**. 2001. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil, 2001.

LUNEL, M. C.; ARPIN, N.; FAVRE-BONVIN, J. Structure de la nor-mycosporine glutamine, nouvelle substance isolée de *Pyronema omphalodes* (Bull ex Fr.) Fuckel. **Tetrahedron Letters**, v. 21, n. 49, p. 4715-4716, 1980. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040403980881019#> >.

MACHADO, L. P. **Avaliações fisiológicas e antifúngicas de três espécies de macroalgas cultivadas *in vitro***. 2010. 41 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil, 2010.

MACHADO, L. P. et al. Comparative chemical analysis and antifungal activity of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta) extracts obtained using different biomass processing methods. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 5, p. 2029-2035, 2014a. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10811-014-0353-z> >.

MACHADO, L. P. et al. Chemical analysis and toxicity of seaweed extracts with inhibitory activity against tropical fruit anthracnose fungi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 9, p. 1739-1744, 2014b. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.6483/epdf> >.

MARINHA DO BRASIL. Previsões de marés (Máximas e Mínimas diárias). Disponível em: < <http://www.mar.mil.br/dhn/chm/box-previsao-mare/tabuas/index.htm> >. Acesso em: 24 jan. 2015.

MARIYA, V.; RAVINDRAN, V. S. Biomedical and Pharmacological significance of marine macro algae-review. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 42, n. 5, p. 527-537, 2013. Disponível em: < <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/24787/1/IJMS%2042%285%29%20527-537.pdf> >.

MASCHEK, J. A.; BAKER, B. J. The Chemistry of Algal Secondary Metabolism. In: AMSLER, C. D. (Ed.). **Algal Chemical Ecology**. Berlim, Alemanha: Springer-Verlag, 2008. cap. 1, p.1-24.

MASON, D. S. et al. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) are acquired from their diet by medaka fish (*Oryzias latipes*) but not by SKH-1 hairless mice. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology**, v. 120, n. 4, p. 587-598, 1998. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643398100697> >.

MATHEUS, L. G. M.; KUREBAYASHI, A. K. **Fotoproteção: a radiação ultravioleta e sua influência na pele e nos cabelos**. 1ª edição. São Paulo: Tecnopress e ABC - Associação Brasileira de Cosmetologia, 2002. 80 pp.

MATSUI, K. et al. Novel glycosylated mycosporine-like amino acids with radical scavenging activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 105, n. 1, p. 81-89, 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134411001643> >.

MCHUGH, D. J. **A guide to the seaweed industry**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 2003. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/006/Y4765E/Y4765E00.HTM> >.

METTING, F. B. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 17, n. 5-6, p. 477-489, 1996. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/1148110p17031634/fulltext.pdf> >.

MIBELLE COSMETICS AG. Schmid, D.; Schuerch, C.; Zuelli, F.; Zuelli, F. N. **Harmless, natural cosmetic skin treatment compositions, for protecting against UV-A induced lipid oxidation and premature aging, containing mycosporine-like amino acids**. EP1473028-A1 EP405098 23 Feb 2004 CH702571-B1 CH000761 30 Apr 2003. EP1473028-A1 03 Nov 2004 A61K-007/48 200477. 23 Fev. 2004, 29 Jul. 2011.

MICRO ALGE CORP KK; DOKURITSU GYOSEI HOJIN SUISAN SOGO KENKY. Suzuki, T.; Sakamoto, T.; Matsugo, S.; Wada, N.; Takenaka, H.; Yamaguchi, Y.; Watanabe, R.; Ishihara, K. **New mycosporine-type amino acid useful in UV-ray protection agent, animal feed and antioxidant**. JP2014227339-A JP105285 17 May 2013. JP2014227339-A 08 Dec 2014 C07H-015/04 201501. 08 Dez. 2014.

MISONOU, T. et al. UV-absorbing substance in the red alga *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) block thymine photodimer production. **Marine Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 194-200, 2003. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/g64g59ccc2f64jgm/fulltext.pdf> >.

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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 16, p. 5028-5036, 2014. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/80/16/5028.full.pdf+html> >.

MSUYA, F. E. et al. Cultivation and utilisation of red seaweeds in the Western Indian Ocean (WIO) Region. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 2, p. 699-705, 2014. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10811-013-0086-4> >.

NAGILLER, K.; SOMMARUGA, R. Differential tolerance of UV radiation between *Chaoborus* species and role of photoprotective compounds. **Journal of Plankton Research**, v. 31, n. 5, p. 503-513, 2009. Disponível em: < <http://plankt.oxfordjournals.org/content/31/5/503.full.pdf> >.

NAHON, S. et al. Trophic relationships and UV-absorbing compounds in a Mediterranean medio-littoral rocky shore community. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 424, p. 59-65, 2012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098112001748> >.

NAKAMURA, H.; KOBAYASHI, J.; HIRATA, Y. Isolation and structure of a 330 nm UV-absorbing substance, asterina-330 from the starfish *Asterina pectinifera*. **Chemistry Letters**, v. 10, n. 10, p. 1413-1414, 1981. Disponível em: < [https://www.jstage.jst.go.jp/article/cl1972/10/10/10\\_10\\_1413/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cl1972/10/10/10_10_1413/_pdf) >.

\_\_\_\_\_. Separation of mycosporine-like amino acids using reversed-phase high-performance liquid-chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 250, n. 1, p. 113-118, 1982. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300952191> >.

NAKAYAMA, R. et al. Antioxidant effect of the constituents of Susabinori (*Porphyra yezoensis*). **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, n. 5, p. 649-653, 1999. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/47n8v1754768u2qg/fulltext.pdf> >.

NEALE, P. J.; BANASZAK, A. T.; JARRIEL, C. R. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): Mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. **Journal of**

**Phycology**, v. 34, n. 6, p. 928-938, 1998. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1529-8817.1998.340928.x/pdf> >.

OKUNO, E.; VILELA, M. A. C. **Radiação ultravioleta: características e efeitos**. 1ª edição. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2005. 76 pp. ISBN 85-88325-31-4.

OREN, A. Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria. **Geomicrobiology Journal**, v. 14, n. 3, p. 231-240, 1997.

OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? **Fems Microbiology Letters**, v. 269, n. 1, p. 1-10, 2007. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2007.00650.x/pdf> >.

OYAMADA, C. et al. Mycosporine-like amino acids extracted from scallop (*Patinopecten yessoensis*) ovaries: UV protection and growth stimulation activities on human cells. **Marine Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 141-150, 2008. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/33h50444277w3481/fulltext.pdf> >.

PAUL, V. J.; RITSON-WILLIAMS, R. Marine chemical ecology. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 4, p. 662-695, 2008. Disponível em: < <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2008/np/b702742g> >.

PAVIA, H. et al. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 157, p. 139-146, 1997. Disponível em: < <http://www.int-res.com/articles/meps/157/m157p139.pdf> >.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, E.; AGUILERA, J.; FIGUEROA, F. L. Tissular localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser: a photoprotective role? **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 384, p. 1093-1100, 2003. Disponível em: < <http://jxb.oxfordjournals.org/content/54/384/1093.full.pdf+html> >.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, E. et al. Excretion of coumarins by the Mediterranean green alga *Dasycladus vermicularis* in response to environmental stress. **Marine Biology**, v. 139, n. 4, p. 633-639, 2001. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002270100588> >.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, E. et al. Effects of UV radiation on photosynthesis and excretion of UV-absorbing compounds of *Dasycladus vermicularis* (Dasycladales, Chlorophyta) from southern Spain. **Phycologia**, v. 37, n. 5, p. 379-387, 1998. Disponível em: < <http://www.phycologia.org/doi/pdf/10.2216/i0031-8884-37-5-379.1> >.

PIMENTEL, C. R. **Organização trófica da comunidade de peixes de poças de maré da Praia dos Castelhanos (ES), Atlântico sudoeste tropical**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil, 2012.

PORTWICH, A.; GARCIA-PICHEL, F. A novel prokaryotic UVB photoreceptor in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 4, p. 493-498, 2000. Disponível em: < [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1562/0031-8655\(2000\)0710493ANPUI2.0.CO2/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1562/0031-8655(2000)0710493ANPUI2.0.CO2/pdf) >.

\_\_\_\_\_. Biosynthetic pathway of mycosporines (mycosporine-like amino acids) in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp strain PCC 6912. **Phycologia**, v. 42, n. 4, p. 384-392, 2003. Disponível em: < <http://www.phycologia.org/doi/pdf/10.2216/i0031-8884-42-4-384.1> >.

PRICE, J. H.; FORREST, H. S. 310 m $\mu$  absorbance in *Physalia physalis*: Distribution of the absorbance and isolation of a 310 m $\mu$  absorbing compound. **Comparative Biochemistry And Physiology**, v. 30, n. 5, p. 879-888, 1969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0010406X69900425> >.

RASTOGI, R. P. et al. Photoprotective compounds from marine organisms. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 537-558, 2010. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/1643086m4384373x/fulltext.pdf> >. Errata em: **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.37, n. 9, p. 991, 2010. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10295-010-0779-5> >

ROULLIER, C. et al. Characterization and identification of mycosporines-like compounds in cyanolichens. Isolation of mycosporine hydroxyglutamicol from *Nephroma laevigatum* Ach. **Phytochemistry**, v. 72, n. 11-12, p. 1348-1357, 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942211002020> >.

SCHERER, S.; CHEN, T. W.; BOGER, P. A new UV-A/B protecting pigment in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. **Plant Physiology**, v. 88, n. 4, p. 1055-1057, 1988. Disponível em: < <http://www.plantphysiol.org/content/88/4/1055.full.pdf> >.

SEKIKAWA, I. et al. Isolation and structure of a 357 nm UV-absorbing substance, usujirene, from the red alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. **Japanese Journal of Phycology**, v. 34, p. 185-188, 1986.

SHICK, J. M. The continuity and intensity of ultraviolet irradiation affect the kinetics of biosynthesis, accumulation, and conversion of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the coral *Stylophora pistillata*. **Limnology and Oceanography**, v. 49, n. 2, p. 442-458, 2004. Disponível em: < [http://www.aslo.org/lo/toc/vol\\_49/issue\\_2/0442.pdf](http://www.aslo.org/lo/toc/vol_49/issue_2/0442.pdf) >.

SHICK, J. M.; DUNLAP, W. C. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. **Annual Review of Physiology**, v. 64, p. 223-262, 2002. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.physiol.64.081501.155802> >.

SHICK, J. M. et al. Survey of ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in organs of coral reef holothuroids. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 90, n. 2, p. 139-148, 1992. Disponível em: < <http://www.int-res.com/articles/meps/90/m090p139.pdf> >.

SHICK, J. M. et al. 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. **Limnology and Oceanography**, v. 44, n. 7, p. 1667-1682, 1999. Disponível em: < [http://www.aslo.org/lo/toc/vol\\_44/issue\\_7/1667.pdf](http://www.aslo.org/lo/toc/vol_44/issue_7/1667.pdf) >.

SHINZATO, C. et al. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. **Nature**, v. 476, n. 7360, p. 320-U82, 2011. Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v476/n7360/pdf/nature10249.pdf> >.

SIMÓ, R. Production of atmospheric sulfur by oceanic plankton: biogeochemical, ecological and evolutionary links. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 6, p. 287-294, 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534701021528#> >.

SINGH, S. P.; HÄDER, D.-P.; SINHA, R. P. Bioinformatics evidence for the transfer of mycosporine-like amino acid core (4-deoxygadusol) synthesizing gene from cyanobacteria to dinoflagellates and an attempt to mutate the same gene (YP\_324358) in *Anabaena variabilis* PCC 7937. **Gene**, v. 500, n. 2, p. 155-163, 2012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111912003769> >.

SINGH, S. P. et al. Genome mining of mycosporine-like amino acid (MAA) synthesizing and non-synthesizing cyanobacteria: A bioinformatics study. **Genomics**, v. 95, n. 2, p. 120-128, 2010a. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754309002353> >.

\_\_\_\_\_. Sulfur deficiency changes mycosporine-like amino acid (MAA) composition of *Anabaena variabilis* PCC 7937: A possible role of sulfur in MAA bioconversion. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 4, p. 862-870, 2010b. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.2010.00736.x/pdf> >.

SINGH, S. P. et al. Temporal dynamics of ROS biogenesis under simulated solar radiation in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. **Protoplasma**, v. 251, n. 5, p. 1223-1230, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-014-0630-3> >.

SINGH, S. P. et al. Mycosporine-like amino acids (MAAs) profile of a rice-field cyanobacterium *Anabaena doliolum* as influenced by PAR and UVR. **Planta**, v. 229, n. 1, p. 225-233, 2008. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/f865295611g45052/fulltext.pdf> >.

SINHA, R. P. et al. Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 47, p. 83-94, 1998. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134498001985> >. Errata em: **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 50, p. 205, 1999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134499000809> >.

\_\_\_\_\_. Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea* - effects of UV and heat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 43, n. 1, p. 33-43, 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009884729900043X> >.

SINHA, R. P. et al. Induction of mycosporine-like amino acids (MAAS) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 60, n. 2-3, p. 129-135, 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134401001373> >.

SINHA, R. P.; SINGH, S. P.; HADER, D. P. Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 89, n. 1, p. 29-35, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101113440700108X> >.

SMITH, R. C. et al. Ozone depletion - Ultraviolet-radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. **Science**, v. 255, n. 5047, p. 952-959, 1992. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/255/5047/952.full.pdf> >.

SPENCE, E. et al. Redundant Pathways of Sunscreen Biosynthesis in a Cyanobacterium. **ChemBiochem**, v. 13, n. 4, p. 531-533, 2012. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.201100737/abstract> >.

STARCEVIC, A. et al. Enzymes of the shikimic acid pathway encoded in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*, have microbial origins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7, p. 2533-2537, 2008. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/105/7/2533.full.pdf#page=1&view=FitH> >.

STARCEVIC, A. et al. Gene expression in the scleractinian *Acropora microphthalma* exposed to high solar irradiance reveals elements of photoprotection and coral bleaching. **Plos One**, v. 5, n. 11, p. e13975, 2010. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0013975> >.

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. **Marine Biology**, v. 118, n. 1, p. 149-156, 1994. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00699229> >.

SUCRÉ, E. et al. Impact of ultraviolet-B radiation on planktonic fish larvae: Alteration of the osmoregulatory function. **Aquatic Toxicology**, v. 109, p. 194-201, 2012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X11002682> >.

SUH, H. J.; LEE, H. W.; JUNG, J. Mycosporine glycine protects biological systems against photodynamic damage by quenching singlet oxygen with a high efficiency. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78, n. 2, p. 109-113, 2003. Disponível em: < [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1562/0031-8655\(2003\)0780109MGPBSA2.0.CO2/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1562/0031-8655(2003)0780109MGPBSA2.0.CO2/pdf) >.

SUTHERLAND, J. E. et al. A new look at an ancient order: Generic revision of the Bangiales (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 47, n. 5, p. 1131-1151, 2011. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1529-8817.2011.01052.x/pdf> >.

SWANSON, A. K.; DRUEHL, L. D. Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. **Aquatic Botany**, v. 73, n. 3, p. 241-253, 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304377002000359> >.

SZE, P. **A biology of the algae**. 3ª edição. WCB/McGraw-Hill, 1998.

TAKANO, S. et al. Isolation and structure of a 334 nm UV-absorbing substance, porphyra-334 from the red alga *Porphyra tenera* Kjellman. **Chemistry Letters**, v. 8, n. 4, p. 419-420, 1979. Disponível em: < [https://www.jstage.jst.go.jp/article/cl1972/8/4/8\\_4\\_419/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cl1972/8/4/8_4_419/_pdf) >.

TAKANO, S.; UEMURA, D.; HIRATA, Y. Isolation and structure of a new amino-acid, palythine, from zoanthid *Palythoa tuberculosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 19, n. 26, p. 2299-2300, 1978a. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403901915199> >.

\_\_\_\_\_. Isolation and structure of two new amino acids, palythinol and palythene, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 19, n. 49, p. 4909-4912, 1978b. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403901857683> >.

TARTAROTTI, B.; SOMMARUGA, R. The effect of different methanol concentrations and temperatures on the extraction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in algae and zooplankton. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 154, n. 4, p. 691-703, 2002.

TEAI, T. et al. Occurrence of ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral mucus and whole corals of French Polynesia. **Marine and Freshwater Research**, v. 49, n. 2, p. 127-132, 1998. Disponível em: < [http://www.publish.csiro.au/?act=view\\_file&file\\_id=MF97051.pdf](http://www.publish.csiro.au/?act=view_file&file_id=MF97051.pdf) >.

TORRES, A. et al. A new UV-B absorbing mycosporine with photo protective activity from the lichenized ascomycete *Collema cristatum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 4, p. 780-784, 2004. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.2004.03981.x/pdf> >.

TORRES, M. A. et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 1-15, 2008. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651308001401> >.

TRIONE, E. J.; LEACH, C. M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. **Phytopathology**, v. 59, n. 8, p. 1077-1083, 1969.

TRIONE, E. J.; LEACH, C. M.; MUTCH, J. T. Sporogenic substances isolated from fungi. **Nature**, v. 212, n. 5058, p. 163-164, 1966. Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v212/n5058/pdf/212163a0.pdf> >.

TSUJINO, I. Studies on the compounds specific for each group of marine algae. II. Extraction and isolation of characteristic ultraviolet absorbing material in Rhodophyceae. **Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University**, v. 12, n. 1, p. 59-65, 1961.

TSUJINO, I.; SAITO, T. Studies on the compounds specific for each group of marine algae. I. Presence of characteristic ultraviolet absorbing material in Rhodophyceae. **Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University**, v. 12, n. 1, p. 49-58, 1961.

TSUJINO, I.; YABE, K.; SEKIKAWA, I. Isolation and structure of a new amino acid, shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi* Yamada et Mikami. **Botanica Marina**, v. 23, n. 1, p. 65-67, 1980.

TSUJINO, I. et al. Isolation and structure of a mycosporine from the red alga *Chondrus yendoi*. **Tetrahedron Letters**, v. 19, n. 16, p. 1401-1402, 1978. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403901945563> >.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA. Aguilera Arjona, J.; de la Coba Luque, F.; Korbee Peinado, N.; Lopez Figueroa, F. **Composition for preparing sunscreen, comprises antioxidants such as mycosporine-like amino acids, porphyrins isolated from red algae and mycosporine-glycine isolated from marine lichen**. ES2317741-A1 ES001662 20 Jun 2006. ES2317741-A1 16 Apr 2009 A61K-008/44 200934. 16 Abr. 2009, 10 Fev. 2010.

VAN ALSTYNE, K. L. Ecological and Physiological Roles of Dimethylsulfoniopropionate and Its Products in Marine Macroalgae. In: AMSLER, C. D. (Ed.). **Algal Chemical Ecology**. Berlim, Alemanha: Springer-Verlag, 2008. cap. 8, p.173-194.

VINCENT, W.; NEALE, P. Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. In: MORA, S., et al. (Ed.). **The effects of UV radiation in the marine environment**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. p.149.

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 Microbiology Letters**, v. 255, n. 2, p. 286-295, 2006. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2006.00088.x/pdf> >.

WADITEE-SIRISATTHA, R. et al. Identification and Upregulation of Biosynthetic Genes Required for Accumulation of Mycosporine-2-Glycine under Salt Stress Conditions in the Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1763-1769, 2014. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/80/5/1763.full.pdf+html> >.

WHITEHEAD, K.; HEDGES, J. I. Electrospray ionization tandem mass spectrometric and electron impact mass spectrometric characterization of mycosporine-like amino acids. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 18, p. 2133-2138, 2003. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.1162/pdf> >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria 160: Ultraviolet radiation**. Genebra, Suíça: World Health Organization (WHO), United Nations Environment Program (UNEP), and International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNRP), 1994. 352 pp.

\_\_\_\_\_. **World Cancer Report 2008**. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. 2008. Disponível em: < [http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr\\_2008.pdf](http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf) >.

\_\_\_\_\_. Ultraviolet radiation and the INTERSUN Programme. Disponível em: < <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html> >. Acesso em: 30 dez. 2014.

WILLIAMS, D. H. et al. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 6, p. 1189-1208, 1989. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50066a001> >.

WITTENBERG, J. B. The source of carbon monoxide in the float of the portuguese man-of-war, *Physalia physalis* L. **Journal of Experimental Biology**, v. 37, n. 4, p. 698-704, 1960. Disponível em: < <http://jeb.biologists.org/content/37/4/698.full.pdf+html> >.

XIONG, F. S. et al. Strategies of ultraviolet-B protection in microscopic algae. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 378-388, 1997. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1997.tb04796.x/pdf> >.

YAKOVLEVA, I. et al. Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 139, n. 4, p. 721-730, 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096495904002751> >.

YOSHIKI, M. et al. Production of new antioxidant compound from mycosporine-like amino acid, porphyra-334 by heat treatment. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1127-1132, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608010650> >.

YOUNG, H.; PATTERSON, V. J. A UV protective compound from *Glomerella cingulata* - A mycosporine. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1075-1077, 1982. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003194220082419X> >.

## *7 Anexos*

---

## SÚMULA CURRICULAR

### 1. Dados Pessoais

Luiza Grecco e Marques

São Paulo, 31 de dezembro de 1986

e-mail: lugrecco@gmail.com

### 2. Educação

- 2009 – 2015          Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.
- 2004 – 2008          Graduação em Química (Bacharelado com Atribuições Biotecnológicas e Licenciatura). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.
- 2001 – 2003          Ensino Médio. Colégio Rio Branco, Cotia, SP, Brasil.

### 3. Formação complementar

- 2013                  Minicurso de Compostos Bioativos. IV Congresso Latinoamericano de Biotecnologia de Algas & IV Workshop da Rede Nacional de Biotecnologia de Algas Marinhas. Carga horária: 7 h.
- 2011                  Curso “A última fronteira em HPLC e UHPLC”. Dionex Brasil. Carga horária: 8 h.
- 2010                  Curso "Proteomics Methods and Approaches for Protein Identification and Quantitation". IQ/USP. Carga horária: 12 h.
- 2010                  Curso Básico sobre LC-MS/MS e suas aplicações. Centro de Espectrometria de Massas Aplicada (CEMSA). Carga horária: 32 h.
- 2009                  Curso “Medidas de Fotossíntese”. II Workshop em Novos Bioativos de Macroalgas. Carga horária: 6 h.
- 2006 – 2008          Iniciação Científica em Bioquímica no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.
- Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo

#### 4. Ocupação

Bolsista de Doutorado CNPq (junho de 2009 a maio de 2014).

#### 5. Publicações

##### a. Artigos Completos

- **Marques, L. G.**; Zambotti-Villela L.; Colepicolo, P. Diagnostic and quantitative methods for mycosporine-like amino acid analyses. Em preparação.
- **Marques, L. G.**; Zambotti-Villela L.; Stein, E. M.; Colepicolo, P. Screening of mycosporine-like amino acids in seaweed from Southeastern Brazilian Coastline. Em preparação.
- Martins, P. L. G.; **Marques, L. G.**; Colepicolo, P. Antioxidant enzymes are induced by phenol in the marine microalga *Lingulodinium polyedrum*. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, v. 116, p. 84-89, 2015. Publicado.
- Simas-Rodrigues, C.; Villela, H. D. M.; Martins, A. P.; **Marques, L. G.**; Colepicolo, P.; Tonon, A. P. Microalgae for economic applications: advantages and perspectives for bioethanol. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/erv130. Publicado online (Advance Access).
- 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. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, p. 202-208, 2011. Publicado.

##### b. Resumos publicados em anais de congressos

- **MARQUES, L. G.**; STEIN, E. M.; ANDREGUETTI, D.X.; COLEPICOLO, P. Screening of mycosporine-like amino acids in Ulvophyceae (Chlorophyta) from the south coast of Espírito Santo State. IV Latin American Congress for Algae Biotechnology and IV Workshop of Brazilian Network of Marine Algae Techonology, Florianópolis - Abstracts, 2013.
- **MARQUES, L. G.**; STEIN, E. M.; ANDREGUETTI, D. X.; COLEPICOLO, P. Screening of specific photoprotective compounds in Ulvophyceae (Chlorophyta) from the Southeastern Brazilian coastline. 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). *Planta Medica*, v. 79, p. 79 - PI70, 2013.
- STEIN, E. M.; **MARQUES, L. G.**; FUJII, M. T.; COLEPICOLO, P. Mycosporine-like amino acids (MAAs): qualitative analysis of photoprotective compounds in *Laurencia* complex seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) from Espírito Santo State, Brazil. 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). *Planta Medica*, v. 79, p. 79 - PI104, 2013.

- **MARQUES, L. G.;** CARDOZO, K. H. M.; COLEPICOLO, P. Prospecção de aminoácidos tipo micospolina em microalgas marinhas. XIII Congresso Brasileiro de Ficologia, 2010, Paraty - RJ. Anais do XIII Congresso Brasileiro de Ficologia, 2010.
- PESTANA, C. M.; **MARQUES, L. G.;** COLEPICOLO, P. Investigação de compostos fotoprotetores na microalga *Chlorella minutissima*. In: XIII Congresso Brasileiro de Ficologia, 2010, Paraty - RJ. Anais do XIII Congresso Brasileiro de Ficologia, 2010.

## 6. Participações em Eventos

- 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). Screening of specific photoprotective compounds in Ulvophyceae (Chlorophyta) from the Southeastern Brazilian coastline. 2013. (Pôster).
- IV Latin American Congress for Algae Biotechnology and IV Workshop of Brazilian Network of Marine Algae Technology. Screening of mycosporine-like amino acids in Ulvophyceae (Chlorophyta) from the south coast of Espírito Santo State. 2013. (Pôster).
- 5th Symposium on Biological Chemistry. Screening of specific photoprotective compounds in Ulvophyceae (Chlorophyta) from the Southeastern Brazilian coastline. 2013. (Pôster).
- 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Análise de compostos fotoprotetores em três algas do litoral sul do estado do Espírito Santo. 2012. (Pôster).
- 8th Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology and 1st International Conference on Coastal Biotechnology. Screening of specific photoprotective compounds in Brazilian macroalgae. 2012. (Pôster).
- II Congresso Institucional do Instituto de Química - USP. Screening of specific photoprotective compounds in Brazilian macroalgae. 2012. (Pôster).
- Conferência USP sobre o Mar. 2012. (Participante).
- III Workshop da Redealgas: Biodiversidade, Aplicações Tecnológicas e Sustentabilidade. (Participante).
- 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Análise de compostos fotoprotetores em duas espécies de algas do gênero *Gracilaria* Greville presentes na costa brasileira. 2011. (Pôster).
- XIII Congresso Brasileiro de Ficologia. Prospecção de aminoácidos tipo micospolina em microalgas marinhas. 2010. (Pôster).

- II Encontro de Pós-Graduação do Instituto de Química - USP. Prospecção de aminoácidos tipo micosporina em microalgas marinhas. 2010. (Apresentação oral e pôster).
- II Workshop em Novos Bioativos de Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade. Compostos fotoprotetores de algas marinhas: possível aplicação em cosméticos. 2009. (Palestra).
- II Workshop em Novos Bioativos de Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade. Identificação de compostos fotoprotetores em microalgas. 2009. (Pôster).

#### **7. Supervisões de Iniciação Científica concluídas**

- Michelle Mi Na Kwon (2013 – 2015). Análise da Biossíntese de Aminoácidos tipo Micosporina sob Variação das Concentrações de Nutrientes do Meio f/2. Graduanda em Química – Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- Camila Mancini Pestana (2009 – 2010). Investigação de compostos fotoprotetores em microalgas marinhas. Graduanda em Farmácia, Universidade Nove de Julho.

#### **8. Outras atividades realizadas no período**

- Manutenção do Banco de Algas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas (Instituto de Química, Universidade de São Paulo), de 2009 até o corrente ano.
- Representante Discente de Pós-Graduação na Comissão de Cultura e Extensão (2010 – 2011) e na Comissão de Pós-Graduação (2012).
- Membro da Comissão Organizadora do II Encontro da Pós-Graduação do IQ/USP (11 a 13 de agosto de 2010, em São Paulo-SP), do III Encontro da Pós-Graduação do IQ/USP (31 de agosto a 02 de setembro de 2011, em São Paulo-SP) e do II Congresso Institucional do IQ/USP (04 a 06 de setembro de 2012, no Guarujá-SP).
- Participante do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), como monitora da disciplina QBQ0212 – Biologia Molecular, que é oferecida para o primeiro ano do curso de Medicina e possui 6 créditos (2010).